

CheKine™ 线粒体活性氧 (ROS) 产生速率检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1911

规格: 96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞、真菌
	荧光激发/发射: Ex/Em=488/525 nm
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是氧正常代谢的天然副产物, 包括超氧自由基、过氧化氢、及其下游产物过氧化物和羟化物等, 研究表明, 机体 95% 以上的活性氧 (ROS) 都来自于线粒体, 其失衡所致的氧化应激与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程有关。正常情况下, 细胞内抗氧化防御系统与氧自由基处于平衡状态, 细胞内活性氧 (ROS) 水平维持在较低的生理范围; 在病理情况下, 细胞内抗氧化系统与氧自由基的平衡被打破, 细胞内活性氧水平过多, 就可破坏线粒体酶类、脂类和核酸, 使机体出现氧化应激, 同时, 活性氧还可攻击线粒体 DNA 产生氧化损伤, 导致线粒体 ATP 合成减少、线粒体膜电位破坏等结构和功能变化。

本试剂盒检测原理是利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测, DCFH-DA (2',7'-二氯荧光素二乙酸酯) 可扩散通过线粒体膜, 并在线粒体内被酯酶水解形成无荧光的 DCFH, DCFH 被活性氧 (ROS) 氧化生成有荧光的 DCF, DCF 荧光强度增加速率与 ROS 产生的速率呈正比, 通过测定 488 nm 处荧光激发波长和 525 nm 处发射波长的荧光值变化, 即可计算出样本线粒体 ROS 的产生速率。

02 包装清单

试剂盒组分	规格 96 T	储存要求
Extraction Buffer	60 mL×2	4℃
Reagent I	50 mL	4℃
Reagent II	1.5 mL	-20℃, 避光保存
Reagent III	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent VI	20 µL	-20℃, 避光保存

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	多功能酶标仪	荧光激发波长 488 nm, 荧光发射波长 525 nm
耗材	96 孔酶标板	全黑酶标板或全白酶标板
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3002 的蛋白质定量试剂盒（Bradford 法）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存。
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存。
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	实验过程中避光放置；-20℃避光保存。
Reagent III	临用前配制，加入 6 mL Reagent I 充分溶解。	未用完的已溶解的 Reagent III 可 4℃避光保存 1 个月。
Reagent IV	临用前配制，加入 6 mL Reagent I 充分溶解。	未用完的已溶解的 Reagent IV 可 4℃避光保存 1 个月。
Reagent V	临用前配制，加入 6 mL Reagent I 充分溶解。	未用完的已溶解的 Reagent V 可 4℃避光保存 1 个月。
Working Reagent VI	临用前配制，用 Reagent I 稀释 300 倍后使用。	稀释后的 Reagent VI 不可重复使用。有一定的刺激性，建议在使用时做好个人防护。

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。提取好的线粒体样本需要在当天检测完，不可冷冻保存。

- 动植物组织或细胞、真菌样本：
 - 1.称取约 0.1 g 组织或收集 5×10⁶ 个细胞或真菌，加入 1 mL Extraction Buffer 和 10 μL Reagent II，匀浆器冰浴匀浆，600 g，4℃离心 5 min，收集上清至新的离心管中，舍弃沉淀。
 - 2.再次离心上清，11000 g，4℃离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体。

3.弃上清，沉淀加入 200 μ L Reagent I 重悬，置于冰上待测。

05-3 实验步骤

注意：需 37℃ 恒温下测定 10 min 内荧光强度变化，用移液器混匀时，要小心吸打，避免产生气泡，检测时需使用全黑色或白色的 96 孔板，防止相邻孔的干扰。

- 1. 酶标仪准备：多功能酶标仪预热到 37℃，调节荧光激发波长 488 nm，发射波长 525 nm。酶标板用 96 孔全黑酶标板或全白酶标板。
- 2. 检测体系配制：

试剂	空白孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
样本	0	20
Reagent I	20	0
Reagent III	50	50
Reagent IV	50	50
Reagent V	50	50
Working Reagent VI	30	30

- 3. 反应体系在 37℃ 避光孵育 15 min。
- 4. 吸光度检测：激发波长 488 nm，发射波长 525 nm，仪器温度保持在 37℃，记录 10 min 内的荧光值变化。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

对采样数据点即荧光强度随时间的变化进行线性回归拟合处理，计算出回归系数，即直线斜率（k）。实际线粒体 ROS 产生速率等于样本荧光强度随时间变化（s）的数据点线性回归直线斜率($k_{测定}$)减去本底荧光强度随时间变化的数据点线性回归直线斜率（ $k_{空白}$ ）， $k=(RFU_{10min}-RFU_{0min})/600$ 。

2. 样本 ROS 产生速率计算

- 按样本质量计算：每 g 组织线粒体每秒钟荧光单位的变化，即 u/s/g 鲜重。

$ROS\ 产生速率(u/s/g\ 鲜重)=(k_{测定}-k_{空白})\div(V_{样}\div V_{总}\times W)=10\times(k_{测定}-k_{空白})\div W$

- 按细胞或真菌数量计算：每 10⁴ 个细胞或真菌每秒钟荧光单位的变化 u/s/10⁴。

$ROS\ 产生速率\ (u/s/10^4)=(k_{测定}-k_{空白})\div(500\times V_{样}\div V_{总})=(k_{测定}-k_{空白})\div 50$

- 按蛋白浓度数量计算：每 mg 蛋白线粒体每秒钟荧光单位的变化 u/s/mg prot。

$ROS\ 产生速率(u/s/mg\ prot)=(k_{测定}-k_{空白})\div(V_{样}\div V_{总}\times Cpr)=10\times(k_{测定}-k_{空白})\div Cpr$

$V_{样}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{总}$ ：重悬样本总体积，0.2 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，0.1 g；500：细胞或真菌数量，5×10⁶，以 10⁴ 为单位。

07 结果展示

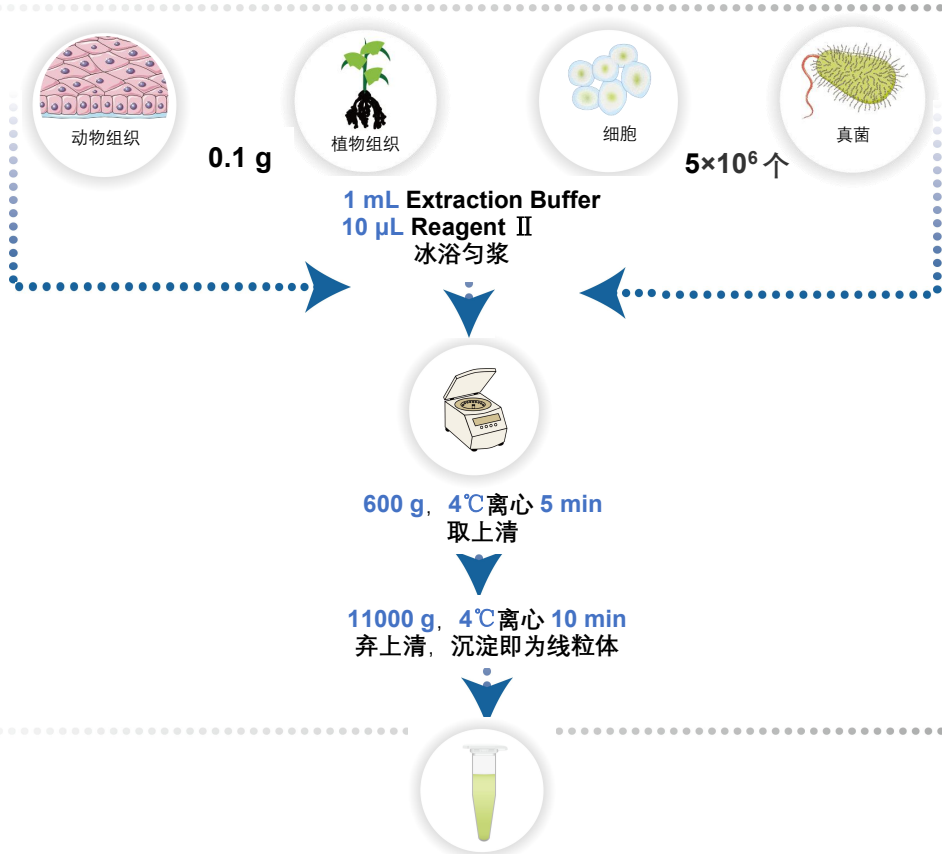
示例-1: 取 0.1 g 小鼠肝脏组织，按照测定步骤操作，用 96 孔全黑板进行检测。测得小鼠肝脏 0 min 的 RFU 值为 4188,10 min 的 RFU 值为 9201; 空白孔 0 min 的 RFU 值为 275,10 min 的 RFU 值为 272, $k_{测定} = (9201-4188) / 600 = 8.355$, $k_{空白} = (272-275)/600 = -0.005$ 。按样本质量计算得：ROS 产生速率(u/s/g 鲜重)= $10 \times (k_{测定} - k_{空白}) \div W = 836$ 。

08 相关产品

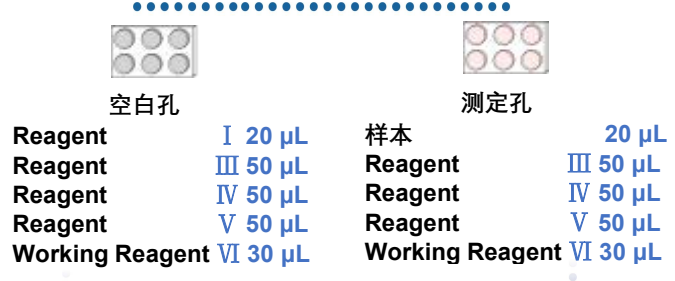
货号	试剂盒名称
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1500	CheKine™ 总抗氧化能力（TAC）检测试剂盒（微量法）
KTB1501	CheKine™ 氧基抗氧化能力（ORAC）检测试剂盒（荧光法）
KTB1502	CheKine™ 羟基抗氧化能力（HORAC）检测试剂盒（荧光法）
KTB1910	CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（荧光法）

CheKine™ 线粒体活性氧（ROS）产生速率检测流程示意图
(Abbkine 货号: KTB1911)

样本处理



体系配置



数据检测

混匀, 37°C避光孵育 15 min

Ex/Em=488/525 nm, 测定 10 min 内的荧光值变化 (仪器设置 37°C)
结果计算