

CheKine™ 活性氧 (ROS) 含量检测试剂盒 (绿色荧光)

货号: KTB1910

规格: 50 T/100 T

批号: 见产品标签

	适用样本: 活细胞	检测仪器: 荧光显微镜/流式细胞仪/荧光酶标仪
	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, 在细胞信号传导和体内平衡中起重要作用。在氧化应激相关状态下, ROS 水平会显著增加, 积累的 ROS 会严重破坏细胞结构。氧化应激在心血管疾病、糖尿病、骨质疏松症、中风、炎症性疾病、以及神经退行性疾病和癌症的研究发挥重要的作用。ROS 检测将有助于确定氧化应激如何调节各种细胞内途径。

本试剂盒检测原理是荧光探针 DCFH-DA (二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯) 可自由透过活细胞膜进入细胞内, 并被细胞内的酯酶水解, 形成 DCFH。DCFH 无荧光且不能自由透过细胞膜, 其可以被细胞内的活性氧 (ROS) 氧化生成有荧光的 DCF, 可以通过荧光显微镜、流式细胞仪或荧光酶标仪进行检测。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	50 T	100 T	
DCFH-DA (10 mM)	55 μ L	105 μ L	-20℃避光保存
RosUP (10,000 $\times$)	50 μ L	100 μ L	-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	荧光显微镜/流式细胞仪/荧光酶标仪	配备 FITC 滤光片/Ex/Em=488 nm/ 525 nm
耗材	荧光酶标仪: 96 孔板 (全黑或全黑透明低)	孵育时注意避光
试剂	PBS (pH 7.4) /无血清无酚红培养基, 胰酶	清洗细胞用/消化贴壁细胞/稀释刺激物或阳性对照或清洗细胞用
其他	37℃恒温细胞培养箱、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。
- 阳性对照推荐初始使用浓度为 1:10,000（推荐 1:10,000-1:100,000 稀释，具体依细胞类型而定）。通常刺激后 15 min-4 h 可以观察到显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照的效果可能有较大的差别。如果在刺激后 30 min 内观察不到活性氧的升高，可延长诱导时间或适当提高活性氧阳性对照的浓度。如果荧光信号过强，可适当降低活性氧阳性对照的浓度。
- 实验过程中，如果阴性对照细胞荧光也比较强，可以按照 1:2,000-1:5,000 稀释荧光探针 DCFH-DA，使 DCFH-DA 的终浓度为 2-5 μM 。探针装载的时间可在 15-60 min 内适当进行调整，尽量缩短读片时的曝光时间，并且对照组、实验组曝光时间需保持一致。
- RosUP 仅用于作为阳性对照的样品，并非所有试验组样品中都需要加入活性氧阳性对照。
- 探针装载后，一定要洗净未进入细胞内的探针，否则会导致背景较高。
- 尽量缩短探针装载后到检测所用的时间（刺激时间除外），以减少各种可能的误差。
- 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

注：探针装载过程需要用到检测缓冲液，可以用无血清无酚红基础培养基（有酚红的无血清培养基可能增加背景），或商品化的 PBS、DPBS 或 HBSS。推荐使用 Abbkine 的 CheKine™ 细胞检测缓冲液（货号：KTB1914），该缓冲液相比 PBS 等，对贴壁细胞形态的影响更小，同时具有更好的信噪比。探针装载时，检测缓冲液不能含有血清，探针装载后可以用不含或含血清的检测缓冲液进行药物或阳性对照试剂 RosUP 处理。

试剂名称	试剂准备	注意事项
DCFH-DA 工作液	用检测缓冲液按 1: 1000 稀释 DCFH-DA (10 mM)至 10 μM	实验过程中避光放置
RosUP (10,000 $\times$)	用检测缓冲液（可加 10%FBS)稀释 10,000 倍至 1x	现配现用，稀释后不能储存

05-2 实验步骤

注：（1）RosUP 仅在阳性对照孔中加入（可选做），其余实验组不需要加阳性对照。（2）对于刺激时间较短（通常为 2 h 以内）的细胞，建议先装载探针，后用活性氧阳性对照或感兴趣的药物刺激细胞；对于需要较长时间刺激（通常为 6 h 以上）的细胞，先用活性氧阳性对照或感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针，如果染色不佳，推荐用 KTB1913 试剂盒进行检测。（3）探针需要严格避光，细胞装载探针时及之后注意避光。

05-2-1 荧光显微镜检测 (仅适用于贴壁细胞)

- 1. 检测前一天细胞铺板，确保检测时细胞密度达到 70%左右。
- 2. 提前半小时于 37℃预热检测缓冲液。
- 3. ROS 探针工作液：用 37℃预热的检测缓冲液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10 μM。（注意避光）
- 4. ROS 探针装载：用 37℃预热的检测缓冲液洗涤细胞 2 次，加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液，37℃细胞培养箱内避光孵育 20-30 min 。探针工作液需覆盖细胞，如：

试剂	96 孔板	48 孔板	24 孔板	12 孔板	6 孔板
探针工作液 (μL)	100	150	200	300	500

- 5. 去除探针工作液，用 37℃预热的检测缓冲液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。
- 6. 药物诱导：去除洗液，用 37℃预热的检测缓冲液（根据需要可加 10% FBS）稀释药物刺激细胞，于 37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间根据药物特性和细胞类型决定。
- 7. 阳性对照 (选做)：在步骤 6 中，用含 10%FBS 的检测缓冲液稀释 RosUP (10,000×) 到 1x，加到细胞中（24 孔板不少于 500 μL,12 孔板不少于 1 mL, 6 孔板不少于 2 mL，以此类推），37℃避光孵育 15-30 min。为提高活性氧水平，不同类型细胞刺激时间存在差异，例如：HeLa 细胞需处理 15-30 min。
- 8. 选择合适的时间点，用荧光显微镜检测。（建议提前预实验多做几个时间点摸索最佳检测点）

注：强激光照射可能增加 NC 组背景信号，所以建议先白光视野下找到合适的视野，再切换到 FITC 通道下拍照；如果诱导组背景颜色比较深，可通过调整仪器参数扣除背景和清洗细胞进行解决。

05-2-2 流式细胞仪和荧光酶标仪检测 (适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

- 1. 收集细胞，制备细胞悬液，推荐装载探针和 RosUP 诱导时细胞密度为 1.0×10⁶ 个/mL 左右。
- 2. 提前半小时于 37℃预热检测缓冲液。
- 3. ROS 探针工作液：用 37℃预热的检测缓冲液稀释 DCFH-DA，使其终浓度为 10 μM。（注意避光）
- 4. ROS 探针装载：收集细胞用 37℃预热的检测缓冲液洗涤细胞 2 次，离心收集细胞，加入稀释好的探针，使其细胞密度为 1×10⁶-2.0×10⁷ 个/mL（实际建议细胞密度不超过 2.0×10⁶ 个/mL，避免细胞团聚），37℃细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 5. 离心，去掉上清，用 37℃预热的检测缓冲液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。
- 6. 药物诱导：去除洗液，用 37℃预热的检测缓冲液（根据需要可加 10% FBS）稀释药物刺激细胞，于 37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间根据药物特性和细胞类型决定。
- 7. 阳性对照 (选做)：在步骤 6 中，用含 10%FBS 的检测缓冲液稀释 RosUP (10,000×) 到 1x，加到细胞中（使细胞密度在 5×10⁵ 个/mL 左右），37℃避光孵育 30 min-4 h。为提高活性氧水平，不同类型细胞刺激时间存在差异，如：Jurkat 细胞处理 2h-4h 信号较稳定。
- 8. 选择合适的时间点，对细胞进行流式细胞仪或荧光酶标仪检测（荧光酶标仪检测：每孔取 100μL 细胞悬液加到 96 孔全黑或全黑底透板进行检测），选择 488 nm 为激发波长，525 nm 为发射波长。（建议提前预实验多做几个时间点摸索最佳检测点）

06 结果示例

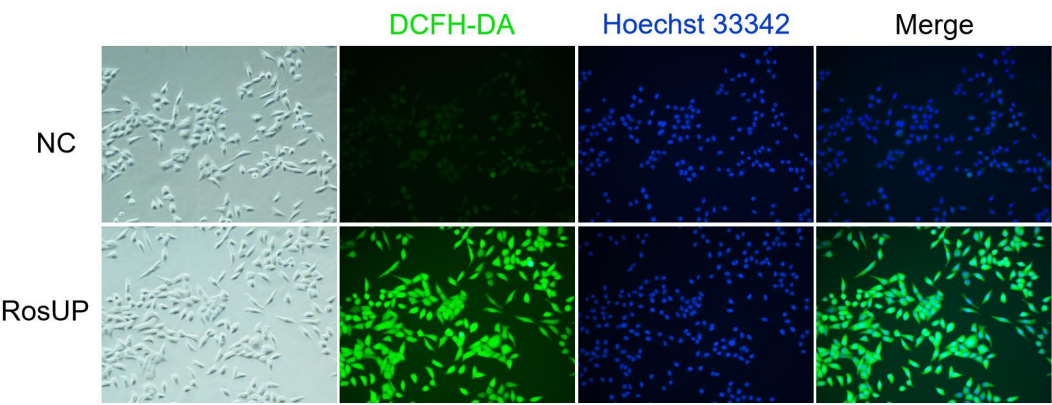


Figure 1. HeLa 细胞经 DCFH-DA（用 KTB1914 细胞检测缓冲液稀释至 10 μ M）和 Hoechst 33342 染色，清洗后实验组用 RosUP（1:10,000）处理 15min，然后用荧光显微镜检测。

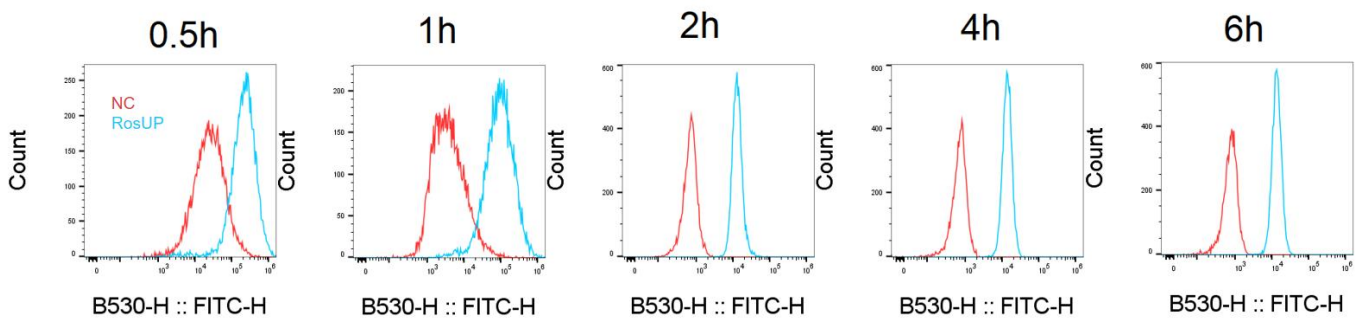


Figure 2. Jurkat 细胞经 DCFH-DA（用 KTB1914 细胞检测缓冲液稀释至 10 μ M）装载后，用 RosUP（1:10,000）处理，在不同时间点进行流式细胞仪检测。

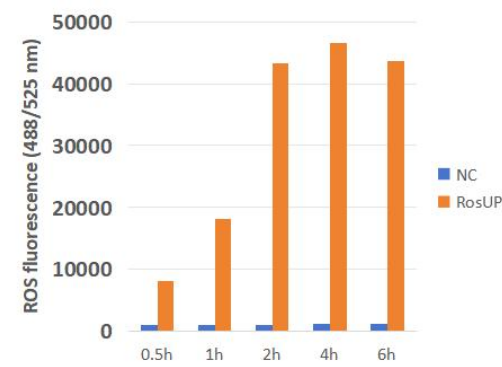


Figure 3. Jurkat 细胞经 DCFH-DA（用 KTB1914 细胞检测缓冲液稀释至 10 μ M）装载后，用 RosUP（1:10,000）处理，在不同时间点进行荧光酶标仪检测。

07 FAQ

1．荧光显微镜拍照时，NC 组信号较高如何解决？

探针装载后不要立即拍照，强激光照射可能增加 NC 组背景信号；其次拍照时，建议先在水光视野下找到合适的视野，再切换到 FITC 通道下拍照；另外含 10% FBS 的检测缓冲液孵育细胞可改善 NC 组信号高的问题，但注意孵育时间不要太久，一般贴壁细胞孵育 15 min 左右最佳，30-60 min 后 RosUP 组信号可能显著降低（根据细胞而定）。

2．荧光显微镜拍照时，溶液背景信号较强怎么处理？

拍照前更换新的检测缓冲液，或调整仪器对比度等进行背景扣除。

3．显微镜拍照时对照组细胞形态发生变化？

推荐用适合细胞培养的无血清无酚红培养基或用 abbkine 的检测缓冲液（KTB1914）。

4．如果刺激过夜需要怎么操作？

推荐用 KTB1913 检测。

5．如何制备单细胞悬液？

A.采用单细胞悬液制备仪制备单细胞悬液。

B.酶消化法：①选取的组织立即放入预冷的 PBS（0.01M，pH7.4）中，清洗血迹及其它污染物。去除组织块中的坏死成分、纤维、脂肪及血管（专门制备相关细胞时除外）。②用眼科剪将组织块剪成 1mm³左右小块，放在预冷 PBS（0.01M，pH7.4）中并进行漂洗，洗去剪碎的细胞碎片。③加入适量酶消化液，37℃恒温水浴消化 20～30 min，期间进行间断振荡或吹打细胞。④加入含血清的培养基终止消化，用 300 目尼龙网过滤除去组织团块，收集滤过的细胞，500×g 离心 10 min 后去上清，并用 PBS（0.01M，pH7.4）洗 1～2 次，并重悬制备单细胞悬液，细胞计数总数不少于 10⁶ 个细胞。

C.机械法（网搓法）：①前处理同酶消化法①、②步。②将 300 目尼龙网扎在小烧杯上，将剪碎的组织放在网上，以眼科镊或刮刀轻搓组织块，边搓边以 PBS（0.01M，pH7.4）冲洗，直至将组织搓完。③收集细胞悬液，500×g 离心 10min 后去上清，并用 PBS（0.01M，pH7.4）洗 1～2 次，并重悬制备单细胞悬液，细胞计数总数不少于 10⁶ 个细胞。

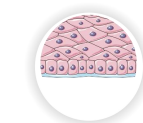
08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1914	CheKine™ 细胞检测缓冲液
KTB1913	CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（红色荧光）
KTB1912	CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（荧光酶标仪法）
KTB1911	CheKine™ 线粒体活性氧（ROS）产生速率检测试剂盒（荧光法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性分析试剂盒（微量法）
KTB1050	CheKine™ 脂质过氧化（丙二醛）分析试剂盒（微量法）
KTB1600	CheKine™ 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 活性氧 (ROS) 含量检测试剂盒 (绿色荧光)

(Abbkine 货号: KTB1910)

体系配置



原位装载探针

去除细胞培养液，用 37℃ 预热检测缓冲液清洗细胞两次

探针装载：去上清，加入探针工作液，在 37℃ 细胞培养箱中避光孵育 30 min
推荐用量：24 孔板不少于 200 μL/孔



细胞悬液装载探针

制备细胞悬液，离心收集细胞，用 37℃ 预热的检测缓冲液清洗细胞两次

探针装载：收集细胞，用探针工作液重悬细胞，密度为 $1-2 \times 10^6$ 个/mL，在 37℃ 细胞培养箱中避光孵育 30 min

探针工作液配制：
用检测缓冲液稀释探针至终浓度为 10 μM

细胞清洗：用检测缓冲液清洗细胞 1-2 次，去除未进入细胞的探针

样本处理

根据药物特性和细胞类型确定药物作用时间，以 HeLa 为例，用含 10% FBS 的检测缓冲液稀释 RosUP(10,000×) 至 1×，37℃ 避光孵育 15 min 左右即可拍照检测；如果用流式细胞仪和荧光酶标仪检测，建议 RosUP(10,000×) 孵育更长时间，如 Jurkat 孵育 2-4h 较为稳定。

数据检测



选择 FITC 滤光片观察荧光
结果分析（去除背景荧光）



荧光酶标仪检测：
Ex/Em=488 nm/525 nm



流式分析 Ex/Em=488 nm/525 nm
细胞密度为 $5-1 \times 10^5$ /mL