

CheKine™ 活性氧 (ROS) 含量检测试剂盒 (红色荧光)

货号: KTB1913

规格: 50 T/100 T

批号: 见产品标签

	适用样本: 活细胞、新鲜组织 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=300/610 nm 或 518/610 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。但是, 在氧化应激相关状态下, ROS 水平可以大大增加。ROS 的积累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探针二氢乙锭 (Dihydroethidium, DHE) 被活细胞摄入后, 可以在细胞内的超氧阴离子型活性氧氧化作用下脱氢, 产生 Ethidium。Ethidium 可以和 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光。二氢乙锭本身为蓝色荧光, 最大激发波长为 370 nm, 最大发射波长为 420 nm, 脱氢后与 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光, 激发波长为 300 nm 或 518 nm, 发射波长为 610 nm。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	50 T	100 T	
DHE (1000×)	60 μL	120 μL	-20℃避光保存
RosUP (1000×)	60 μL	120 μL	-20℃保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

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	流式推荐用 PE 通道/检测波长 610 nm（300 或 518 nm 激发）
耗材	6 孔板/24 孔板/96 孔板（全黑或全黑底透）	孵育时注意避光
试剂	PBS（pH 7.4）/无血清培养基、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 1x（推荐浓度 0.5-2x，具体依细胞类型而定）。通常刺激后 30 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，可缩短诱导时间或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 1:2000 稀释荧光探针 DHE，使 DHE 的终浓度为 0.5x。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，并且试验组、对照组曝光时间需保持一致。
- RosUP(1000×)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。
- DHE 易在空气中氧化，请尽量避免暴露于空气中。DHE 脱氢后产生一定毒性的 Ethidium，请注意防护。
- 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处理。

试剂名称	试剂准备	注意事项
DHE 工作液	用检测缓冲液按 1:1000 稀释	实验过程中避光放置
RosUP（1000×）	用检测缓冲液（可加 10%FBS）稀释 1000 倍至 1x	现配现用，稀释后不能储存

05-2 实验步骤

注意：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，建议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，在对细胞处理前均可将要用到的检测缓冲液提前预热，此处仅提供后者的实验方法，具体步骤如下：

05-2-1 原位装载探针 (仅适用于贴壁细胞)

- 1. 细胞准备：检测前一天细胞铺板，对于 96 孔板每孔的细胞接种数量需控制在 100-10000 个，推荐每孔接种 2000-5000 个细胞。
- 2. 药物诱导：待细胞密度达 70%左右，去除细胞培养液，加入无血清培养液稀释的药物处理细胞，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。
- 3. （选做）阳性对照：用无血清培养液稀释 RosUP (1000×)到 1×，加入细胞，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，例如：HeLa 细胞需处理 2 h。
- 4. DHE 工作液准备：用 PBS 或无血清培养液稀释 DHE (1000×)到 1×。

注意：DHE 推荐的终浓度为 1×，对大多数细胞都适用，但为了得到更理想的结果，对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索，DHE 的终浓度通常为 0.5-2×。

- 5. ROS 探针装载：去除处理药物，用 PBS 或无血清培养液洗涤细胞 1-2 次，加入适当体积稀释好的 DHE 工作液，37℃细胞培养箱内避光孵育 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

- 6. 细胞清洗：用 PBS 或无血清培养液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DHE。

05-2-2 收集细胞后装载探针 (适用于贴壁细胞、悬浮细胞和新鲜组织)

- 1. 细胞准备：清洗并收集足量的生长状态良好的细胞；组织样本用胰酶或网筛制备成单细胞悬液。
- 2. 药物诱导：将收集好的细胞悬浮于适量稀释好的药物，于 37℃细胞培养箱内避光孵育，实际诱导时间可根据药物特性和细胞类型决定。
- 3. （选做）阳性对照：用无血清培养液稀释 RosUP(1000×)到 1×，加入细胞，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，例如：HeLa 细胞需处理 2 h。
- 4. DHE 工作液准备：用 PBS 或无血清培养液稀释 DHE (1000×)到 1×。
- 5. ROS 探针装载：离心收集细胞去除处理药物，并用 PBS 或无血清培养液洗涤细胞 1-2 次，离心收集细胞，加入稀释好的 DHE 工作液，使其细胞密度为 1×10⁶个/mL，37℃细胞培养箱内避光孵育 30 min。
- 6. 细胞清洗：用无血清细胞培养液洗涤细胞 1-2 次，以充分去除未进入细胞内的 DHE。

06 结果检测

06-1 荧光显微镜检测

- 1. 贴壁生长细胞：按照 05-2-1 步骤操作，细胞清洗后，在细胞培养孔中加适量的无血清细胞培养液或 PBS（以免细胞被晾干），在荧光显微镜下观察；悬浮生长细胞：按照 05-2-2 步骤操作，取 25-50 μL 细胞悬液滴到一张显微载玻片上，再盖上一张盖玻片，荧光显微镜选用 PE 滤光片观察荧光，以及去除背景观察荧光的变化。

06-2 荧光酶标仪和流式细胞分析检测

- 1. 细胞处理：贴壁生长细胞：按照 05-2-1 步骤操作，用胰酶消化制备细胞悬液；悬浮生长细胞：按照 05-2-2 步骤，直接收集细胞，用 0.5-1 mL PBS 重悬细胞(0.5-1×10⁵/mL)。
- 2. 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 300 nm 为激发波长，610 nm 为发射波

长，或 518 nm 为激发波长，610 nm 为发射波长。

3. 流式细胞分析：选择 PE 通道，实时或设置不同时间点检测刺激前后荧光的强弱。

07 结果示例

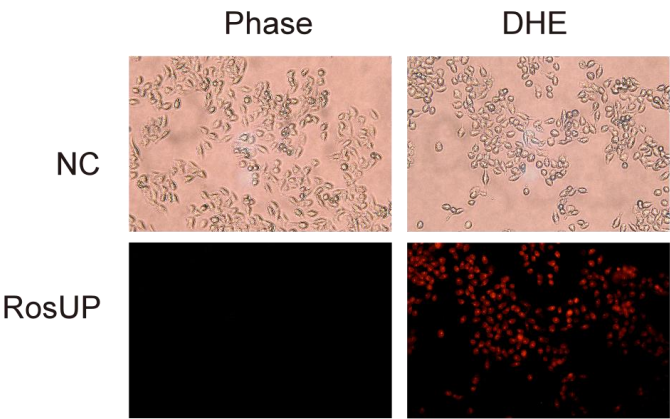


Figure 1. HeLa 细胞实验组经 RosUP (1000×)（用 KTB1914 细胞检测缓冲液稀释至 1×）处理，清洗后用 DHE 探针（1:1,000）处理 20min，然后用荧光显微镜检测。

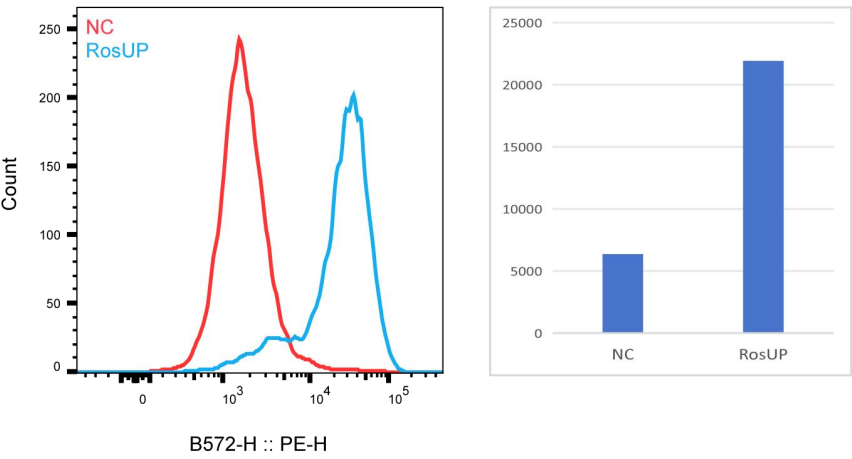


Figure 2. Jurkat 细胞实验组经 RosUP (1000×)（用 KTB1914 细胞检测缓冲液稀释至 1×）处理，清洗后 DHE 探针（1:1,000）处理 20min，然后用流式细胞仪检测（左）和荧光酶标仪检测（右）。

08 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 PE 通道下拍照；另外用含 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 后阳性对照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无酚红基础培养液，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？

清洗时用 37℃ 预热的检测缓冲液或商品化 PBS 或无血清基础培养液可以减少清洗换液时对细胞形态的刺激，但是探针装载和药物刺激的时间较长时，推荐用适合细胞培养的无血清培养基或用 abbkine 的检测缓冲液（KTB1914）。

4. 如果需要短时间刺激怎么操作？

推荐用 KTB1910 检测。

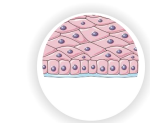
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1914	CheKine™ 细胞检测缓冲液
KTB1910	CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（绿色荧光）
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 (红色荧光)

(Abbkin 货号: KTB1913)

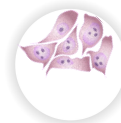
样本处理



原位装载探针



去除细胞培养液，加入无血清培养液稀释的待测试剂



细胞悬液装载探针



将细胞悬浮于无血清培养液稀释的待测试剂

根据药物特性和细胞类型确定药物作用时间

以 HeLa 细胞为例：用无血清培养液稀释阳性对照至终浓度为 $1\times$ ， 37°C 避光孵育 30 min-4 h



探针工作液配制：用 PBS 或无血清培养基稀释探针至终浓度为 $1\times$



体系配置

探针装载：用无血清培养液清洗细胞 1-2 次，加入探针工作液，在 37°C 细胞培养箱中避光孵育 30 min

推荐用量：6 孔板不少于 $500\ \mu\text{L}/\text{孔}$

探针装载：用无血清培养液清洗细胞 1-2 次，离心收集细胞，用探针工作液重悬细胞，密度为 1×10^6 个/mL，在 37°C 细胞培养箱中避光孵育 30 min



细胞清洗：用 PBS 或无血清培养液清洗细胞 1-2 次，去除未进入细胞的探针



数据检测



选择 PE 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= $300\ \text{nm}/610\ \text{nm}$ 或
 $518\ \text{nm}/610\ \text{nm}$



选择 PE 通道细胞密度为
 $0.5-1\times 10^6/\text{mL}$