

产品组成:

规格	200T	400T
活性氧荧光探针DCFHDA	100ul	100ul*2

储存条件:

-20℃避光保存。

有效期:

6 个月。

注意事项:

1. 避免反复冻融。
2. 可以根据需要分装后冻存。
3. 探针为 DMSO 溶液，在 2-8℃时是固体状态，冬季气温较低时为凝固状态，极易粘附在管壁、吸头壁。注意需要加热融解，从冰箱取出后恢复至室温或 37℃短时间水浴，变成液体状态后离心至管底部再开盖。

产品简介:

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜，从而使探针很容易被标记到细胞内。在活性氧存在的条件下，DCFH 被氧化生成荧光物质 DCF，绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比，检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

在激发波长 502 nm，发射波长 530 nm 附近，使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光分光光度计、荧光酶标仪、流式细胞仪等检测 DCF 荧光，从而测定细胞内活性氧水平。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 包括过氧化氢 (H_2O_2 , Hydrogen peroxide)、羟基自由基 ($\cdot OH$, Hydroxyl radical)、单线态氧 (1O_2 , Singlet oxygen)、一氧化氮 (NO , Nitric oxide)、超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$, Superoxide anion)、过氧化自由基 ($ROO\cdot$, Peroxyl radical)、过氧羟自由基 ($HOO\cdot$, hydroperoxyl) 及其下游产物过氧化物过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$, Peroxynitrite anion)、 $-OCl$ 和羟化物等，参与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程。

产品特点:

1. 使用方便：可用激光共聚焦显微镜直接观察、荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测；
2. 背景低，灵敏度高；
3. 线性范围宽，使用方便。

使用方法:

1. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖内壁上的液体收集至管底，避免开盖时液体洒落。
2. DCFHDA 荧光探针在 2-8℃时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 荧光探针标记后，一定要洗净残余的未进入细胞内的探针，否则会导致背景较高。
4. 探针标记完毕并洗净残余探针后，可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描，以确认探针的标记情况是否正常。
5. 尽量缩短探针标记后到测定所用的时间，以减少各种可能的误差。

6. 原位检测必须使用荧光检测专用的黑色透明底 96 孔细胞培养板。
7. 以下操作步骤仅供参考，请根据实际样本情况调整或参考文献。

一、 探针标记

原位标记：仅适用于贴壁培养细胞。

按照 1:1000-2000 用无酚红无血清培养基稀释 DCFH-DA。

去除细胞培养基，用 PBS 洗细胞一次。

加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜，通常对于 96 孔板每孔加入 100-200 μ L 染色液，六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1 毫升。

在 37℃细胞培养箱内避光孵育 20-60 分钟。

用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

收集后标记：悬浮细胞或贴壁细胞消化处理

按照 1:1000 用无酚红无血清培养基稀释 DCFH-DA。

离心移除培养基，用 PBS 洗细胞一次。

细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为 1×10^6 - 2×10^7 /毫升，37℃细胞培养箱内避光孵育 20-60 分钟。每隔 3-5 分钟颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。

用无血清细胞培养基洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

用无血清细胞培养基重悬细胞。

二、 检测：

对于原位标记探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察，或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。

对于收集细胞后标记探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

使用 488 nm 激发波长，525 nm 发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似，可以用 FITC 的参数设置检测 DCF。