

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01188

产品介绍

DCFH-DA (二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯) 本身无荧光, 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 无荧光且不能通透细胞膜, 从而被细胞内的活性氧氧化生成有荧光的 DCF。根据活细胞中荧光的产生, 可以判断细胞活性氧的含量和变化。用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察, 是一种经典的组织或活细胞中活性氧检测方法。Rosup 为活性氧阳性诱导药物, 根据其荧光信号强度, 可分析活性氧的真正水平。

应用范围

活性氧检测

储运条件

-20 °C 避光保存, 有效期见外包装; 冰袋运输。

产品特点

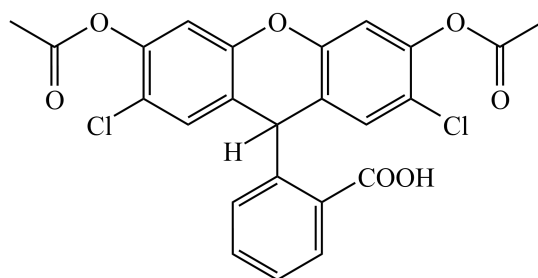
稳定性好: 荧光亮度高且抗淬灭性好;

批间差小: 产品为公司自研, 批间差控制的好。

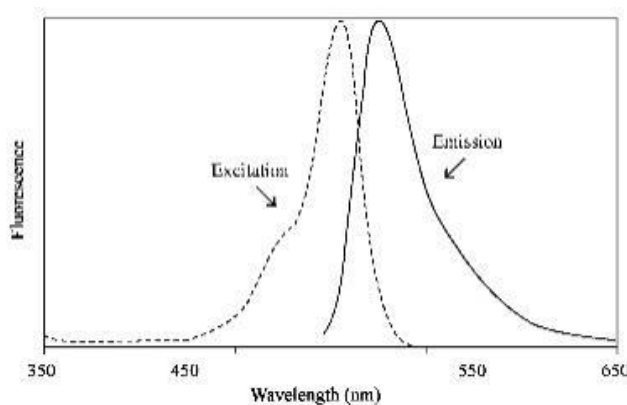
产品参数

Ex/Em: 504/529 nm

分子结构图:



光谱图:



注意事项

- 1.阳性对照 Rosup 一般使用浓度为 100 μM (推荐浓度 100~400 μM , 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。如果活性氧升高得过快, 可缩短诱导时间或适当降低活性氧阳性对照的浓度。
- 2.实验过程中, 如果发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强, 可以按照 1: 2000~1: 5000 稀释 DCFH-DA, 使 DCFH-DA 的终浓度为 2~5 μM 。探针装载的时间也可以根据情况在 15~60 min 内适当进行调整。
- 3.活性氧阳性对照 (Rosup) 仅仅用于作为阳性对照的样品, 并不是在每个样品中都需加入活性氧阳性对照。
- 4.探针装载后, 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。
- 5.本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 6.为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材: 细胞培养板
- 2.试剂: 无血清细胞培养基

操作步骤

1.ROS 探针准备

探针装载前按照 1: 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μM 。

2.ROS 探针装载

吸除处理药物, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA 工作液。加入的体积需充分盖住细胞。例如: 6 孔板通常不少于 1 mL, 对于 96 孔板通常不少于 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内避光孵育 30 min。

3.细胞清洗

用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 DCFH-DA。

4.收集细胞后装载探针 (适用于贴壁细胞和悬浮细胞)

(1) 细胞准备

按照标准方法培养细胞, 必须保证检测用细胞状态。按照适当方法, 清洗并收集足量的细胞。

(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 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内避光孵育, 实际诱导时间由药物特性和细胞类型决定。

(3) (可选) 阳性对照

先用无血清培养基稀释阳性对照 (Rosup, 100 mM) 到常用工作浓度 100 μM , 加入细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min~4 h 以提高活性氧水平, 不同细胞类型存在差异。例如: HeLa 细胞需孵育 30~60 min, MRC5 人胚胎成纤维细胞则需孵育 90 min。

(4) ROS 探针准备

探针装载前, 按照 1: 1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μM 。

(5) 探针装载

除去细胞内药物, 离心收集细胞, 加入稀释好的探针, 使其细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ 。

注: 细胞密度需根据后续的检测体系, 检测方法, 以及检测总量来进行调整。例如: 对于流式分析, 单管检测内细胞数目不少于 104, 也不可多于 106。

(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 DCFH-DA。

5.检测设备的选择

(1) 荧光显微镜检测

1) 对贴壁生长细胞或活组织, 可直接在荧光显微镜下观察; 对悬浮生长细胞, 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。

2) 荧光显微镜下, 选用 FITC 滤光片观察荧光, 去除背景观察荧光的变化。

(2) 流式细胞仪分析

- 1) 对贴壁生长细胞, 用胰酶消化制备成单细胞悬液; 对悬浮生长细胞, 直接收集细胞。用 0.5~1 mL PBS 重悬细胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$)。
- 2) 选择流式细胞仪 FL1 或 BL1 通道, 488 nm 激发, 测定 530 nm 的发射, 细胞应可分成两个亚群: ROS 阴性细胞仅有很低的荧光强度, ROS 阳性细胞有较强的绿色荧光。