ROS 实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
青链霉素	合肥知恩生物	ZNCA-008
胰蛋白酶	合肥知恩生物	ZNCA-009
胎牛血清	合肥知恩生物	ZNCA-007
活性氧检测试剂盒	碧云天	S0033S

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
超净工作台	苏州安泰	SW-CJ-2FD
显微镜	江南永新	XD202
CO2 培养箱	Thermo	3111
流式细胞仪	BD	BD FACSCalibur
荧光显微镜	广州明美	MF52
台式离心机	Thermo	Pico17

三、实验方法（参考试剂盒说明书）

背景介绍

活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit，也称 ROS Assay Kit)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装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。

实验步骤

1、按实验方案进行细胞接种，然后进行给药、转染等实验；

2、装载探针：

对于刺激时间较短(通常为 2 小时以内)的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为 6 小时以上)的细胞，先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针。

原位装载探针：本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使终浓度为 10 微摩尔/升。去除细胞培养液，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，通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的 DCFH-DA 不少于 1 毫升。37ºC 细胞培养箱内孵育 20 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。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

收集细胞后装载探针：按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA，使终浓度为 10 微摩尔/升。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中，细胞浓度为一百万至二千万/毫升，37ºC 细胞培养箱内孵育 20 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

细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞 20-30 分钟后可以显著提高活性氧水平。

说明：仅在阳性对照孔中加入 Rosup 作为阳性对照，其余孔不必加入 Rosup。

3、检测

对于原位装载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。

对于收集细胞后装载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。

4、参数设置

使用 488nm 激发波长，525nm 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。