

超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------------|-----------|
| S0064S | 超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE) | 100-1000次 |

产品简介:

- 碧云天研发生产的超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE) (Reactive Oxygen Species Assay Kit for Superoxide Anion with DHE), 简称ROS Assay Kit for Superoxide Anion with DHE, 是一种以DHE为荧光探针, 快速灵敏地检测细胞内超氧阴离子活性氧的试剂盒。本试剂盒可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统进行检测。
- 活性氧(Reactive oxygen species, ROS)主要包括超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)等。在细胞或组织的正常生理代谢过程中会产生活性氧, 同时一些环境因素例如紫外照射、 γ 射线照射、环境污染等也可以诱导活性氧的产生。活性氧产生后, 可以导致细胞内脂、蛋白和DNA等的氧化损伤, 诱发氧化应激(Oxidative stress), 继而可能导致肿瘤、动脉粥样硬化、风湿性关节炎、糖尿病、肝损伤、以及中枢神经系统疾病等[1]。
- Dihydroethidium简称DHE, 是最常用的检测细胞内超氧化物阴离子水平的荧光探针。分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3$, 分子量为315.41。
- Dihydroethidium是一种最常用的超氧化物阴离子荧光检测探针。可以直接用于活细胞的标记。Dihydroethidium被活细胞摄入后, 可以在细胞内的超氧化物阴离子作用下脱氢, 产生Ethidium。Ethidium (例如溴化乙锭)可以和RNA或DNA结合产生红色荧光。当细胞内的超氧化物阴离子水平较高时, 产生的Ethidium较多, 红色荧光就较强, 反之则较弱。这样就可以用dihydroethidium进行超氧化物阴离子水平的检测[2]。
- Dihydroethidium本身为蓝色荧光, 最大激发波长为370nm, 最大发射波长为420nm, 脱氢后和RNA或DNA结合产生红色荧光, 最大激发波长为300nm, 最大发射波长为610nm, 实际观察时也可以使用535nm作为激发波长。
- 本试剂盒同时提供了DHE探针、阳性对照和检测缓冲液, 使用更便捷。本试剂盒提供的DHE为1000X储存液, 该溶液经过优化, 对大多数细胞都适用; 超氧阴离子活性氧阳性对照试剂Rosup II可短时间内诱导细胞活性氧生成。同时, 本试剂盒提供了Assay Buffer, 使用更便捷。使用本试剂盒检测NRK-52E和L-929细胞内超氧阴离子活性氧的效果参考图1、图2。

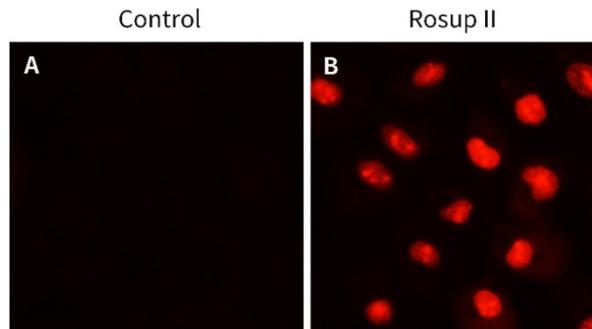


图1. 碧云天超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE) (S0064)检测NRK-52E (大鼠肾小管上皮细胞)细胞内超氧阴离子活性氧的效果图。正常的NRK-52E细胞中超氧化物阴离子含量很低, 使用本试剂盒染色后细胞核内无明显红色荧光(图A); 使用超氧阴离子活性氧阳性对照试剂Rosup II处理细胞60分钟后, 使用本试剂盒染色后细胞核内红色荧光显著增强(图B)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异, 本图仅供参考。

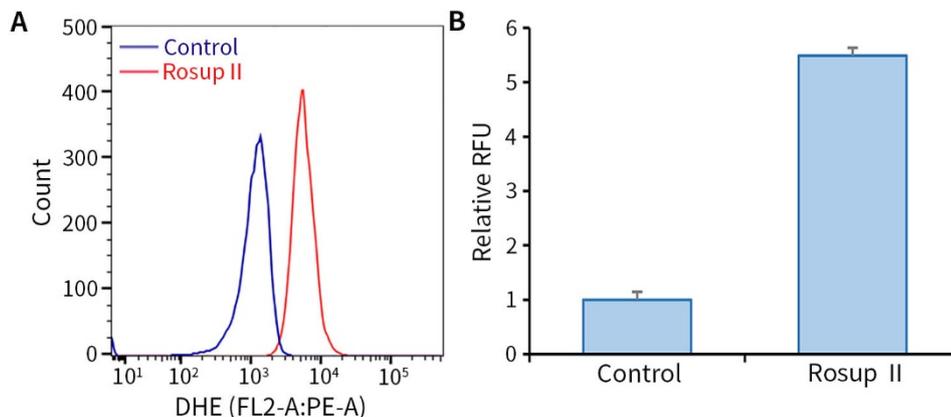


图2. 碧云天超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE) (S0064)检测L-929 (小鼠成纤维细胞)细胞内超氧阴离子活性氧的效果图。正常的

L-929细胞内超氧化物阴离子含量很低；使用超氧阴离子活性氧阳性对照试剂Rosup II处理细胞60分钟后，使用本试剂盒进行荧光染色后经流式细胞仪(图A)或酶标仪(图B)检测荧光强度显著升高。实际检测效果会因实验条件、检测仪器的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 本试剂盒小包装，6孔板每孔检测体系的体积为1ml时，可以检测100次；96孔板每孔检测体系为100 μ l时，可以检测1000次。如果用于流式细胞仪，每个样品检测体系体积为0.5ml时，可以进行200次检测。

包装清单：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|------------------|-------------|
| S0064S-1 | DHE (1000X) | 100 μ l |
| S0064S-2 | Rosup II (1000X) | 50 μ l |
| S0064S-3 | Assay Buffer | 200ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C避光保存，一年有效。其中DHE (1000X)须避光保存。

注意事项：

- DHE (1000X)和Rosup II (1000X)第一次使用时请分装后-20 $^{\circ}$ C保存，避免反复冻融。
- 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。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- Assay Buffer经过过滤除菌处理，在使用时须注意避免微生物污染，否则很可能严重影响染色效果。如果Assay Buffer发生浑浊等明显的微生物污染，就不能继续使用。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP965)。
- BSA和酚红(Phenol red)对DHE的检测有干扰，需避免。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. DHE染色液的配制。

按照96孔板每孔100 μ l DHE染色液(DHE Staining Solution)的体系，参考下表配制适量的 DHE染色液，并充分混匀。

| Samples | 1 | 10 | 100 |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| DHE (1000X) | 0.1 μ l | 1 μ l | 10 μ l |
| Assay Buffer | 99.9 μ l | 999 μ l | 9.99ml |
| DHE Staining Solution | 100μl | 1ml | 10ml |

注1：配制DHE染色液时注意避光，且须现配现用，稀释后不能长期保存。

注2：DHE最优先的推荐终浓度为1X，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0.5-2X。

注3：本试剂盒提供的Assay Buffer可在一段时间内维持细胞的正常状态，并给细胞提供一定的营养，效果比PBS或HBSS更好。也可以使用Assay Buffer外的其它合适的溶液配制，如无血清培养液、HBSS (C0218)或PBS等稀释DHE (1000X)。

2. 阳性对照的设置。

将试剂盒中提供的超氧阴离子活性氧阳性对照Rosup II (1000X)按照推荐的1:1000的比例加入到细胞培养液中，通常处理细胞30-120分钟即可，具体处理时间可以根据细胞种类适当调整。随后按照下述各种检测方法的步骤加入DHE染色液，进行检测。

注1：超氧阴离子活性氧阳性对照试剂Rosup II可短时间内诱导细胞活性氧生成，终浓度通常为0.5-2X，最优先的推荐终浓度为1X。

注2：仅在阳性对照孔中加入Rosup II作为阳性对照，其余孔不能加入Rosup II。

注3：Rosup II可能对某些细胞效果较弱或者完全没有效果。

3. 荧光显微镜检测。

a. **接种培养。**将细胞接种于96孔板等多孔板、细胞培养皿中或者细胞爬片上，按实验设计对细胞进行一定处理。

b. **洗涤(选做)。**对于贴壁细胞，吸除培养液，用PBS洗涤细胞1次；对于悬浮细胞，250-1000 \times g室温离心5分钟，吸除上清，用PBS洗涤1次。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰，吸除培养液和PBS时推荐使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下，可以不使用PBS洗涤。真空泵推荐BeyoVac™台式真空吸液器(E6878/E6883)。

c. **染色。**加入适当体积的DHE染色液。通常96孔板每孔加入100 μ l，24孔板每孔加入250 μ l，12孔板每孔加入500 μ l，6孔板每孔加入1ml。37 $^{\circ}$ C避光孵育20分钟。孵育时间可在10-30分钟之间进行调整。

注：如果是首次实验不能确定孵育时间，建议先尝试37 $^{\circ}$ C孵育20分钟，观察荧光效果。如果正常细胞染色较深，则适当缩短时间；如果荧光强度太弱，则适当延长时间。

d. **检测。**孵育结束后可以直接在荧光显微镜下观察染色效果。如果发现荧光背景比较高，可以酌情洗涤1-3次后再在荧光显微镜

下观察染色效果。DHE为红色荧光, Ex/Em = 535/610nm。

4. 流式细胞仪检测。

- a. **接种培养。**将细胞接种于6孔板或细胞培养皿中, 按实验设计对细胞进行一定处理。
- b. **细胞准备。**贴壁细胞胰酶消化后用培养液重悬, 并用PBS洗涤一次; 悬浮细胞250-1000×g室温离心5分钟, 弃上清, 用PBS洗涤一次。每个样品推荐的细胞用量为100万个细胞。
- c. **染色。**对于上一步骤的100万个细胞的沉淀, 加入1ml DHE染色液, 重悬为单细胞悬液。37°C避光孵育20分钟。孵育时间可在10-60分钟之间进行调整。
注1: 如果是首次实验不能确定孵育时间, 建议先尝试37°C孵育20分钟, 观察荧光效果。如果正常细胞染色较深, 则适当缩短时间; 如果荧光强度太弱, 则适当延长时间。
注2: 孵育后可以酌情用PBS或HBSS洗涤1-3次。
- d. **检测。**可以直接进行流式细胞仪检测, 也可以250-1000×g室温离心5分钟沉淀细胞, 吸净液体后每个样品加入0.5ml检测缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测(DHE为红色荧光, Ex/Em = 535/610nm)。
注: 由于流式检测比较灵敏, 使用的荧光探针浓度可能要比荧光显微镜检测时要低, 此时可根据细胞类型和实际染色情况对DHE稀释倍数进行适当调整。

5. 荧光酶标仪检测。

- a. **接种培养。**将细胞接种于96孔板黑色多孔板中, 如BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965), 每孔的细胞数需要控制在100-10,000个, 通常宜在2000-5000个范围内。按实验设计对细胞进行一定处理。
- b. **洗涤(选做)。**对于贴壁细胞, 吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1次; 对于悬浮细胞, 250-1000×g室温离心5分钟, 吸除上清, 用PBS洗涤1次。酚红或血清对于本试剂盒的检测有一定的干扰, 吸除培养液和PBS时最好使用真空泵。在能充分吸净残留液体的情况下, 可以不使用PBS洗涤。真空泵推荐BeyoVac™台式真空吸液器(E6878/E6883)。
- c. **染色。**加入适量的DHE染色液, 通常96孔板每孔加入100μl。37°C避光孵育20分钟。孵育时间可在10-30分钟之间进行调整。
注1: 如果是首次实验不能确定孵育时间, 建议先尝试37°C孵育20分钟, 观察荧光效果。如果正常细胞染色较深, 则适当缩短时间; 如果荧光强度太弱, 则适当延长时间。
注2: 孵育后可酌情用PBS或HBSS洗涤1-3次。
- d. **检测。**孵育结束后, 可直接用荧光酶标仪检测。如果发现荧光背景比较高, 可以酌情洗涤1-3次后再用荧光酶标仪进行检测。DHE为红色荧光, Ex/Em = 535/610nm。通过对比对照组与处理组的RFU (Relative fluorescence values), 可以得出药物刺激的效果。

参考文献:

1. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK, et.al. Circ Res. 2018. 122(6):877-902.
2. Daiber A, Oelze M, Steven S, Krölller-Schön S, Münzel T. Redox Biol. 2017. 12:35-49.

相关产品:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------------|--------------------------------|--------------------|
| S0033 | 活性氧检测试剂盒 | >100/>500次 |
| S0038 | 过氧化氢检测试剂盒 | 150次 |
| S0060 | 超氧化物检测试剂盒 | 100次 |
| S0061 | 线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red) | 20-200/100-1000次 |
| S0063 | Dihydroethidium (超氧化物阴离子荧光探针) | 5mg |
| S0064S | 超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE) | 100-1000次 |
| S0067-100μg | SOSG (单线态氧绿色荧光探针) | 100μg |
| S0068S | 单线态氧检测试剂盒(SOSG) | 30-300次 |
| S0131 | 脂质氧化(MDA)检测试剂盒 | 100/500次 |
| S0043 | 脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11) | 100-1000/500-5000次 |

Version 2024.10.10