

活性氧检测试剂盒(CM-H₂DCFDA, 含稀释液)

产品编号	产品名称	包装
S0036S	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA, 含稀释液)	20-200次
S0036M	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA, 含稀释液)	100-1000次

产品简介:

- 碧云天的活性氧检测试剂盒(CM-H₂DCFDA, 含稀释液) (Reactive Oxygen Species Assay Kit with CM-H₂DCFDA and Diluent, 也称ROS Assay Kit with CM-H₂DCFDA and Diluent), 是一种使用便捷、检测效果更有保障的提供了所需的稀释液, 并利用荧光探针CM-H₂DCFDA进行活性氧检测的试剂盒。
- 本试剂盒是活性氧检测试剂盒(S0033/S0034)的升级产品。活性氧检测试剂盒(S0033/S0034)是一种利用荧光探针DCFH-DA (即H₂DCFDA)进行活性氧检测的试剂盒, 而CM-H₂DCFDA是H₂DCFDA的氯甲基衍生物(Chloromethyl derivative), 也称CM-DCFH-DA, 其在活细胞中比H₂DCFDA具有更好的滞留率, 因此荧光信号更强, 且更适合细胞内活性氧的相对较长时间的研究。CM-H₂DCFDA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CM-H₂DCF (也可称为CM-DCFH)。而CM-H₂DCF不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被装载到细胞内[1-2]。CM-H₂DCF的氯甲基可与细胞内谷胱甘肽或其它巯基发生反应从而具有更好的细胞内滞留性, 后续细胞内的活性氧可以氧化无荧光的CM-H₂DCF生成有荧光的CM-DCF [3-6], 检测CM-DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。
- 本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂Rosup, 以便于活性氧的检测。Rosup是一种混合物(Compound mixture), 浓度为50mg/ml。使用本试剂盒检测细胞内活性氧的效果请参考图1和图2。本试剂盒同时提供了经优化的探针稀释液和Rosup稀释液, 使用更便捷, 通常可以确保获得更稳定可靠的检测效果。

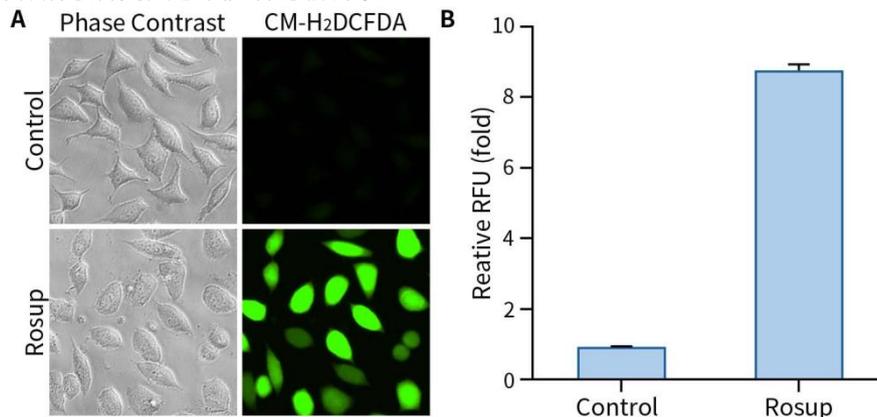


图1. 碧云天活性氧检测试剂盒(CM-H₂DCFDA, 含稀释液) (S0036)检测L929 (小鼠成纤维细胞)细胞内活性氧的效果图。L929细胞使用本试剂盒装载CM-H₂DCFDA探针后用50μg/ml Rosup处理30分钟, 随后PBS洗涤一次后用荧光显微镜(图A)和荧光酶标仪(图B)检测。正常的L929细胞中探针几乎未被氧化成荧光化合物, 细胞中的绿色荧光非常弱; 使用活性氧阳性对照试剂Rosup处理使细胞内活性氧生成大幅增加, CM-H₂DCFDA与活性氧反应, 细胞中的绿色荧光显著增强。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

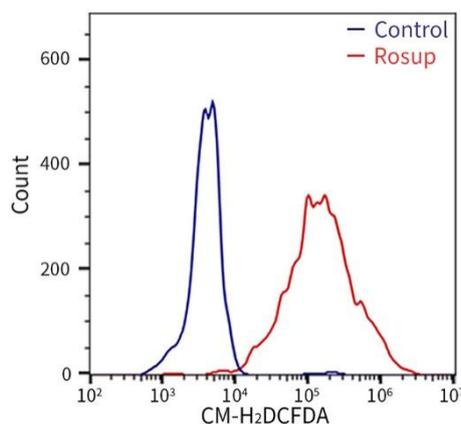


图2. 碧云天活性氧检测试剂盒(CM-H₂DCFDA, 含稀释液) (S0036)检测NRK-52E (大鼠肾小管上皮细胞)细胞内活性氧的流式细胞检测效果图。NRK-52E细胞不处理或用阳性对照试剂Rosup处理后, 使用本试剂盒进行染色并进行流式细胞检测。正常的NRK-52E细胞中探针未被氧化成荧光化合物, 细胞中的绿色荧光非常弱; 使用活性氧阳性对照Rosup处理使细胞内活性氧生成大幅增加, CM-H₂DCFDA与活性氧反应, 细胞中的绿色荧光显著增强。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用便捷。
- 本试剂盒小包装和中包装, 6孔板每孔检测体系的体积为1ml时, 分别可以检测20次和100次; 96孔板每孔检测体系为100μl时, 分别可以检测200次和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, 分别可以检测40次和200次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0036S-1	CM-H ₂ DCFDA (5mM)	20μl
S0036S-2	探针稀释液	20ml
S0036S-3	活性氧阳性对照(Rosup, 50mg/ml)	20μl
S0036S-4	Rosup稀释液	20ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0036M-1	CM-H ₂ DCFDA (5mM)	100μl
S0036M-2	探针稀释液	100ml
S0036M-3	活性氧阳性对照(Rosup, 50mg/ml)	100μl
S0036M-4	Rosup稀释液	100ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中CM-H₂DCFDA (5mM)须避光保存。

注意事项:

- 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。
- 探针装载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, 以确认探针的装载情况是否良好。
- 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间(刺激时间除外), 以减少各种可能的误差。
- 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)。
- 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. 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。

注: 活性氧阳性对照(Rosup)推荐使用本试剂盒提供的Rosup稀释液进行稀释, 以确保获得良好的诱导效果。对于目的药物, 也可以酌情使用Rosup稀释液进行稀释, 以获得良好的诱导效果。

原位装载探针: 本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照1:1000用探针稀释液稀释CM-H₂DCFDA, 使终浓度为5μM。去除细胞培养液, 加入适当体积稀释好的CM-H₂DCFDA。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CM-H₂DCFDA不少于1毫升。37°C细胞培养箱内孵育30分钟。用细胞外液或PBS、HBSS等适当溶液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的CM-H₂DCFDA。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用探针稀释液稀释CM-H₂DCFDA, 使终浓度为5微摩尔/升。细胞收集后悬浮于稀释好的CM-H₂DCFDA中, 细胞浓度为二百万至二千万/毫升, 37°C细胞培养箱内孵育30分钟。每隔3-5分钟颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。用细胞外液或PBS、HBSS等适当溶液洗涤细胞三次, 以充分去除未进入细胞内的CM-H₂DCFDA。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。

注1: 配制CM-H₂DCFDA工作液时注意避光, 且须现配现用, 稀释后不能长期保存。

注2: CM-H₂DCFDA最优先的推荐终浓度为5μM, 对大多数细胞都适用, 但为了得到满意的结果, 对于不同类型的细胞请自行进行一定摸索, CM-H₂DCFDA的终浓度一般为1-10μM。

注3: 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。

注4: 细胞外液推荐使用细胞外液(Extracellular Solution) (C0216), PBS推荐使用PBS (C0221A), HBSS推荐使用Hanks'

Balanced Salt Solution (C0218)。

2. 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。

3. 参数设置

使用495nm激发波长，530nm发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。CM-DCF的荧光光谱和FITC非常相似，可以用FITC的参数设置检测CM-DCF。

4. 其它说明

阳性对照Rosup可以按照1:1000的比例用Rosup稀释液稀释后使用。例如装载好探针的细胞，直接吸除液体或离心后吸除液体，加入适当体积的按照1:1000稀释的Rosup阳性对照刺激。通常刺激后20-30分钟内可以观察到非常显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照(Rosup)的效果可能有较大的差别。如果在刺激后30分钟内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照(Rosup)的浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照(Rosup)的浓度。对于特定的细胞，Rosup作用浓度和作用时间可能有所不同，需自行摸索最佳工作浓度和作用时间，甚至某些细胞可能对Rosup不敏感。

另外，对于某些细胞，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CM-H₂DCFDA，使装载探针时CM-H₂DCFDA的浓度为1-2.5μM。

探针装载的时间也可以根据情况在15-60分钟内适当进行调整。

活性氧阳性对照(Rosup)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(Rosup)。

参考文献：

1. Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen LMPE, Szczepanowska J, et al. Methods. 2016. 109:3-11.
2. Forkink M, Smeitink JA, Brock R, Willems PH, Koopman WJ. Biochim Biophys Acta. 2010. 1797(6-7):1034-44.
3. BRANDT R, KESTON AS. Anal Biochem. 1965. 11:6-9.
4. KESTON AS, BRANDT R. Anal Biochem. 1965. 11:1-5.
5. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Anal Biochem. 1983. 134(1):111-6.
6. Jakubowski W, Bartosz G. Cell Biol Int. 2000. 24(10):757-60.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C2055	BODIPY 500/510 C1, C12(脂肪酸绿色荧光探针)	1mg/5mg/25mg
S0019	DAF-FM DA (NO荧光探针)	>100次/>500次
S0033	活性氧检测试剂盒	>100次/>500次
S0034	活性氧检测试剂盒(含稀释液)	>100次/>500次
S0035	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA)	20-200次/100-1000次
S0036	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA, 含稀释液)	20-200次/100-1000次
S0038	过氧化氢检测试剂盒	150次
S0043	脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)	100-1000次/500-5000次
S0051	过氧化氢酶检测试剂盒	100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次/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次/500次

Version 2025.01.19