天净沙系列

CAT#:7-SC4091-99-1-MROS

低温运输和保存

DCFH-DA 法线粒体活性氧测定试剂盒

DCFH-DA-Based Mitochondrial Reactive Oxygen Species Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定线粒体活性氧（（Reactive Oxygen Species，ROS）产生速度。其原理是还原型二氯荧光素（DCFH-DA）可扩散通过线粒体膜，在线粒体内被酯酶水解，形成无荧光的 DCFH，DCFH 迅速与 ROS 反应生成氧化型二氯荧光素（DCF）。DCF 可在 500 nm 激发产生 520 nm 荧光，通过测定荧光值上升的速度即可测定 DCFH-DA 法线粒体活性氧产生速度。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本产品足够 100 次 96 孔板测定实验，每次 40 μL 反应体系。
4. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
DCFH-DA 法线粒体活性氧测定反应液	7-SC4091-99-1-MROS-r	50 mL	50 mL 本色瓶
DCFH-DA 干粉	CAS:4091-99-0	100 T	1.5 mL 本色管
5 μM 荧光标准品溶液	7-SC4091-99-1-MROS-b	100 μL	0.5 mL 棕色管
使用手册	sc7-SC4091-99-1-MROS	1 份	无

运输及保存

低温运输，4℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样品、超纯水、蛋白浓度测定试剂盒、比色皿及与之匹配的分光光度计、黑色不透光 96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制 DCFH-DA 溶液：将 50 mL DCFH-DA 法线粒体活性氧测定反应液加入到装有 DCFH-DA 干粉的管中，颠倒摇晃 20 次，得 DCFH-DA 溶液。
2. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、待测样本的制备

3. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.0。注意：由于二氧化硫、DTT 等还原剂会与活性氧反应，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是在 500 nm 激发产生 520 nm 荧光的物质，故样本中不得有可以在 520 nm 处产生荧光的成分。
4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作后续测荧光值时的阴性对照。
5. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算速率时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

6. 在每管中加入 50 μL DCFH-DA 法线粒体活性氧测定反应液。盖上 0 号管作为

对照。

7. 在 6 号管中加入 50 μL 5 μM 的荧光标准品溶液（试剂盒提供），涡旋 1 分钟混匀，得 2.5 μM 的荧光标准品稀释液。常温放置待用。
8. 换枪头，在 5 号管中加入 50 μL 2.5 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 1.25 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
9. 换枪头，在 4 号管中加入 50 μL 1.25 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 0.625 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
10. 重复上面的操作，直到在 1-6 号管中得到 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078 μM 共 6 个荧光标准品稀释液，加上 0 号管共 7 个样本。常温放置待用。此溶液每次需新鲜配制。

四、DCFH-DA 法线粒体活性氧反应设置

11. 如有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则反应数为 N+7，其中 N 个用于待测样本，1 个用于阴性对照，7 个用于标曲样本。
12. 在黑色不透光 96 孔板的各反应孔中按下表加入各成分，反应总体积为 40 μL:

成分	N 个样本管	阴性对照	7 个标曲管
自备样本溶解液	不加	20 μL	不加
DCFH-DA 溶液	各 20 μL	20 μL	不加
各梯度的荧光标准品溶液	不加	不加	各 40 μL
N 个自备待测样本	各 20 μL	不加	不加
总体积	40 μL	40 μL	40 μL

13. 摇晃 30 秒混合均匀，放 37℃保温，每 5 分钟在 500 nm 激发光/520 nm 发射光条件下记录一次荧光值，共 30 分钟。

五、数据分析

14. 对采样数据点即荧光强度随时间的变化进行线性回归拟合处理，计算出回归系数，即直线斜率（k）。
15. 实际线粒体 ROS 产生速率等于样本荧光强度随时间变化的数据点线性回归直线斜率 (k 测定) 减去本底荧光强度随时间变的数据点线性回归直线斜率 (k 空白)。
16. 按样本鲜重计算: 每 g 组织线粒体每秒钟荧光单位的变化，即 u/s/g 鲜重。ROS 产生速率（u/s/g 鲜重）= (k 测定-k 空白) / (V 样÷V 总×样本鲜重) =2×（k 测定-k 空白）÷样本鲜重。
17. 按样本蛋白浓度计算：每毫克蛋白线粒体每秒钟荧光单位的变化 u/s/mg prot。ROS 产生速率（u/s/mg prot）= (k 测定-k 空白) / (V 样÷V 总×样本蛋白

	浓度）=2×（k 测定-k 空白）÷样本蛋白浓度。
关联产品	ABTS 自由基法抗氧化能力测定试剂盒

20250903ztl