

蘿絲® ROS®

DCFDA 胞內氧化壓力(ROS)檢測套組使用說明

Instructions of DCFDA Cellular reactive oxygen species (ROS) Assay Kit

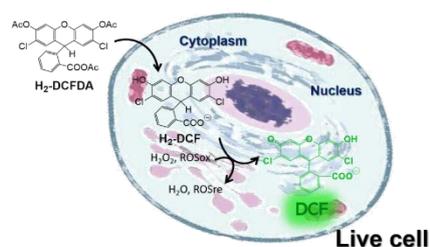
快速使用指引

1. 開封前存放條件：4°C 冷藏保存半年。
2. 螢光孔盤測量儀激發波長/偵檢波長(nm)：485 / 530。
3. 螢光顯微鏡與流式細胞儀濾鏡：FITC。
4. 一般細胞株 DCFDA 染色濃度與時間：20 μM/ 30 分鐘。
5. 此套組為螢光套組，為避免相鄰孔位影響，建議使用透明底黑邊框孔盤。

原理介紹

活性氧化物(ROS)包括了數種細胞代謝過程中所產生的高活性分子與自由基。ROS 對細胞來說，是必須的，卻也是有害的。ROS 對細胞的成長、存活、發展、分化、衰老、凋亡不可或缺，並參與了細胞的數種生理和病理過程。相對地，ROS 也會傷害 DNA 與 RNA，氧化蛋白質與脂質。過量的 ROS 造成高的氧化壓力，傷害細胞，而被認為是形成許多疾病，如癌症、心血管疾病和糖尿病的原因之一。

二氯二氫螢光素二乙酸酯(H₂-DCFDA) 是一種可穿透細胞膜的氧化螢光應激指示劑。H₂-DCFDA 本身不具螢光性質，但在穿透細胞膜後，經 ROS 氧化形成二氫螢光素(DCF)，而放出高強度的綠色螢光(如圖一)。本套組使用 H₂-DCFDA 作為螢光探針，檢測細胞內所產生的 ROS 濃度。套組內包含了雙氧水，作為氧化正控制組(positive control)試劑；亦包含了乙醯半胱氨酸(N-Acetyl cysteine, NAC)，作為抗氧化負控制組(Negative control)試劑。



圖一 DCFDA 胞內氧化壓力(ROS)檢測套組原理

套組組成、運送與保存資訊

組成	包裝型式	運送資訊	包裝開封前保存資訊
1. ① 劑：螢光試藥 DCFDA (5 mg)	綠標咖啡色瓶	4 °C 冷藏 運送	4 °C 冷藏保存。 正確保存狀況 下，可存放半 年。
2. ② 劑：10X 緩衝溶液 (50 mL)	白標半透明瓶		
3. ③ 劑：DMSO (1 mL)	黃標半透明瓶		
4. ④ 劑：8.8 M 雙氧水 (500 μL)	綠標綠蓋半透明瓶		
5. ⑤ 劑：乙醯半胱氨酸試藥 (50 mg)	紅標紅蓋半透瓶瓶		

使用者須自行準備材料與儀器

1. 螢光孔盤光譜儀/螢光顯微鏡/流式細胞儀。
2. 96 孔盤(透明底黑框)。
3. 細胞培養 and/or 清洗液(D-PBS, HBSS 或使用者自行配製之緩衝液)
4. 實驗細胞株與影響 ROS 之實驗組物質。

使用步驟

操作前準備：

1. **配製 DCFDA 保存液**：本產品提供定量粉末形式 DCFDA 螢光劑(5 mg · (A) 劑)，請加入 500 μ L DMSO ((C) 劑)，搖晃溶解後，配製成 20 mM 的 DCFDA/DMSO 保存液。請分裝此保存液，並在避光低溫(<-20 °C) 下存放，避免多次反覆凍溶。正確保存情況下，可存放逾三個月。
2. **配製 1X 緩衝溶液**：自冰箱中取出 (B) 劑((B) 劑在冷藏下會呈現凝膠狀，這是自然現象)，在 37 °C 搖晃下，回溫一小時，或在 60 °C 溫水中回溫半小時後，將 10 mL 的 10X 緩衝溶液((B) 劑)以 90 mL 的去離子水稀釋十倍，稍微搖晃混合均勻，配製成 100 mL 1X 緩衝溶液，回復至室溫。
3. **配製 DCFDA 操作液**：將適量的 DCFDA 保存液(步驟 1.)，以 1X 緩衝溶液 (步驟 2.) 稀釋成需要的濃度。例如配製 20 μ M 的操作液 10 mL：將保存液(步驟 1.) 10 μ L，加入 10 mL(步驟 2.) 1X 緩衝溶液，稍加搖晃均勻。

附註：建議使用上述步驟 2.所配製之 1X 緩衝溶液，作為 DCFDA 之稀釋液。使用者亦可根據文獻或自身經驗，使用合適之緩衝液，如：D-PBS、HBSS，作為稀釋液。

附註：請每次實驗前，配製新鮮的 DCFDA 操作液。未使用完的操作液，請勿隔天再使用。

4. **配製雙氧水操作液**：將適量的 8.8 M 雙氧水((D) 劑)以 1X 緩衝溶液 (步驟 2.) 稀釋成需要的濃度。例如配製 1 mM 的雙氧水 8.8 mL：將 (D) 劑 1 μ L，加入 8.8 mL(步驟 2.) 1X 緩衝溶液，稍加搖晃均勻。

附註：請每次實驗前，配製新鮮的雙氧水操作液。未使用完的操作液，請勿隔天再使用。

5. **配製乙醯半胱氨酸操作液**：秤取乙醯半胱氨酸試藥 10 mg((E) 劑)，加入 200 μ L 的 1X 緩衝溶液 (步驟 2.)，搖晃溶解後，配製成 300 mM 的乙醯半胱氨酸操作液。

附註：請每次實驗前，配製新鮮的乙醯半胱氨酸操作液。未使用完的操作液，請勿隔天再使用。

套組分析步驟(以 96 孔盤為例)：

- A. 細胞培養並以影響 ROS 之實驗組物質處理後，移除培養液，以 150 μ L 的 1X 緩衝溶液(步驟 2.)清洗一~二次。
- B. 每孔加入 150 μ L DCFDA 操作液(步驟 3.)將細胞染色。

附註：DCFDA 最佳染色濃度取決於所使用的細胞株種類，一般而言，染色

濃度介於 10~50 μM ，染色時間約三十分鐘。使用者須根據經驗或是相關文獻，自行決定最佳染色濃度與染色時間。

- C. 於正控制組(Positive control)孔位，加入 10 uL 的雙氧水操作液(步驟 4.)。
D. 於負控制組(Negative control)孔位，加入 10 uL 的乙醯半胱氨酸操作液(步驟 5.)。

附註：正控制組與負控制組並非必須，使用者視實驗設計需要自行選擇。

- E. 將細胞在 37 °C、5% CO_2 、避光的環境下，繼續培養 30 分鐘。
F. 移除 DCFDA 操作液，以 150 uL 的 1X 緩衝溶液(步驟 2.)清洗一~二次。
G. 使用者根據實驗需要，選擇適當儀器進行測量：
螢光孔盤測量儀：激發波長/偵檢波長為 485 nm / 530 nm。
顯微鏡與流式細胞儀：使用 FITC 濾鏡。

困難排除

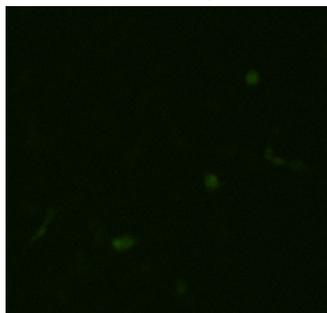
問題點	可能原因	解決方式
沒有螢光或是螢光訊號微弱	細胞濃度不足	實驗前請先確定細胞濃度。
	實驗設備與參數位最佳化	請調整實驗參數，若問題仍未解決，請洽本公司技術人員。

引用文獻

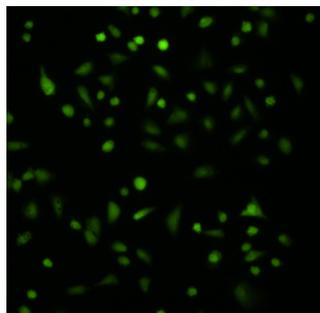
增加中。

測試範例

Negative Control (20mM NAC)



Positive Control (2mM H_2O_2)



(Evaluation of ROS production under fluorescence microscopy in B4G12 cells stain 30 mins with 20 μM H2-DCFDA.).

*特別感謝國內多所研究機構協助本產品測試並提供相關測試數據。

聚創新材料股份有限公司

IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

