

线粒体活性氧产生速率(ROS)检测试剂盒说明书

荧光法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)包括超氧自由基、过氧化氢、及其下游产物过氧化物和羟化物等,研究表明,机体 95% 以上的活性氧 (ROS) 都来自于线粒体,其失衡所致的氧化应激与细胞生长增殖、发育分化、衰老和凋亡以及许多生理和病理过程有关。

正常情况下,细胞内抗氧化防御系统与氧自由基处于平衡状态,细胞内活性氧 (ROS) 水平维持在较低的生理范围;在病理情况下,细胞内抗氧化系统与氧自由基的平衡被打破,细胞内活性氧水平过多,就可破坏线粒体酶类、脂类和核酸,使机体出现氧化应激,同时,活性氧还可攻击线粒体 DNA 产生氧化损伤,导致线粒体 ATP 合成减少、线粒体膜电位破坏等结构和功能变化。

因此,通过检测活性氧的变化来判断线粒体的功能是否正常具有重要意义。

测定原理:

荧光探针-还原型二氯荧光素 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 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 反应生成荧光物—氧化型二氯荧光素(2', 7'-dichlorofluorescein, DCF)。根据上述原理设计了利用荧光法直接定量检测线粒体 ROS 产生速率的方法。将荧光强度随时间变化的数据点拟合,线性回归直线斜率与 ROS 产生的速率呈正比。

组成:

| 产品名称 | AO036-100T/96S | Storage |
|---------|----------------|---------|
| 试剂一: 液体 | 120ml | 4°C |
| 试剂二: 液体 | 50ml | 4°C |
| 试剂三: 液体 | 1.5ml | -20°C |
| 试剂四: 粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂五: 粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂六: 粉剂 | 1 瓶 | 4°C |
| 试剂七: 液体 | 1 瓶 | -20°C避光 |
| 说明书 | 一份 | |

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C保存; 临用前加入 6 ml 试剂二充分溶解;

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4°C保存; 临用前加入 6 ml 试剂二充分溶解;

试剂六: 粉剂×1 瓶, 4°C保存; 临用前加入 6 ml 试剂二充分溶解;

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

试剂七：液体×1 瓶，保存；临用前用试剂二稀释 300 倍后使用；

自备仪器和用品：

多功能酶标仪、恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、冰、蒸馏水。

线粒体提取：

- 1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1ml 试剂一和 10 μ l 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将上述匀浆液于 600g（离心率），4 $^{\circ}$ C 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min。
- 4、弃上清，沉淀中加入 200 μ l 试剂二重悬。

测定步骤：

- 1、多功能酶标仪预热 30min 以上，调节激发光 499nm，发射光 521nm。
2. 在黑色不透光 96 孔板中加入下列试剂

| 试剂名称 (μ l) | 测定管 | 空白管 |
|--------------------------------|-----|-----|
| 线粒体悬液 | 20 | |
| 试剂二 | | 20 |
| 试剂四 | 50 | 50 |
| 试剂五 | 50 | 50 |
| 试剂六 | 50 | 50 |
| 试剂七 | 30 | 30 |
| 混匀，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min。 | | |

孵育完成后，在 37 $^{\circ}$ C 恒温下测定 10min 内荧光强度，激发波长 499nm，发射波长 521nm，记录 10min 内的荧光值变化。

ROS 产生速率计算：

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）。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）。

(1)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

$$\text{ROS 产生速率}(u/ s/g \text{ 鲜重})=(k \text{ 测定}-k \text{ 空白})/(V \text{ 样}\div V \text{ 总}\times W) =10\times(k \text{ 测定}-k \text{ 空白})\div W$$

(2)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。

$$\text{ROS 产生速率}(u/ s/ \text{mg prot})=(k \text{ 测定}-k \text{ 空白})/(V \text{ 样}\div V \text{ 总}\times \text{Cpr}) =10\times(k \text{ 测定}-k \text{ 空白})\div \text{Cpr}$$

V 样：加入样本体积，0.02 ml；V 样总：悬液体积，0.2 ml；W：样本鲜重，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/ml。

