

线粒体活性氧产生速率(ROS)检测试剂盒说明书

荧光法 100 管/96 样

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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 50 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：液体 1.5 mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 6 mL 试剂二充分溶解；

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 6 mL 试剂二充分溶解；

试剂六：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 6 mL 试剂二充分溶解；

试剂七：液体×1 瓶，避光-20℃ 保存；临用前用试剂二稀释 300 倍后使用；

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 10uL 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℃ 离心 5min。

3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。

4、弃上清，沉淀中加入 200 μL 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 (μL)	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℃避光孵育 15min。		

孵育完成后，在 37℃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

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

(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。

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

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。