

组织活性氧(ROS)活性

规格：荧光法 96 样

检测波长：激发波长 488nm

检测原理：化学荧光法

发射波长 525nm

编号：ROS.T-W96-N(1620)

注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

测定意义：

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是植物体内的一把“双刃剑”。ROS 作为信号分子在植物生命活动中发挥关键作用，但 ROS 过量积累会造成氧化损伤，测定 ROS 含量对于评估植物细胞内的氧化还原状态至关重要。

测定原理：

ROS 荧光探针是一类无色、无荧光的染料分子，利用化学荧光指示剂即荧光探针:2',7-Dichlorofluorescein Diacetate, (DCFH-DA),在细胞内与 ROS 发生反应后生成具有强荧光的产物，通过检测产物的荧光强度可在一定程度上反映组织内的活性氧，这种荧光信号在激发波长 488nm 和发射波长 525nm 处有最大波峰，其荧光强度和活性氧水平成正比。

自备仪器和用品：

荧光酶标仪、黑色 96 孔板、可调式移液器、低温离心机、研钵/匀浆器、300 目尼龙网、冰和蒸馏水。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
提取液	液体 300mL	x1	4℃	
试剂一	液体	x1	-20℃	低温时可能出现结晶现象，使用前室温震荡溶解即可

样本处理（按照步骤依次操作）：

一、组织样品

1. 直接匀浆提取法：

称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃ 离心 10min 取上清待测，建议提取后尽快反应测定。

2. **网搓法：**称取 0.1 组织立即放入预冷的提取液中，清洗处理干净后，将组织块剪成厚度小于 1mm 薄片，放在预冷提取液中进行漂洗。将 300 目尼龙网扎在小烧杯上，将剪碎的组织放在网上，用镊子等轻搓组织块，边搓边用提取液冲洗，直至将组织搓完。收集细胞悬液，500g，4℃离心 10min，去上清留沉淀，并用提取液洗 1~2 次。

3. 酶解法：

使用酶解液制备组织原生质体（需要自行处理）

二、液体样本

澄清样本可直接检测，若浑浊则离心取上清检测；

实验准备：

- 1、荧光酶标仪预热 30min，设定激发波长 488nm，发射波长 525nm；
- 2、所有试剂解冻至室温（25℃）

测定操作：

- 1、在黑色 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	2	2
样本	200	
提取液		200
混匀，37℃ 避光孵育 30min 后于激发波长 488nm，发射波长 525nm 处读取荧光值 F。荧光强度=F 测定-F 空白		

注意:

1、若荧光值较小 (小于 200Au) , 可以增加 37℃ 孵育反应时间 T(如增至 1 小时), 或增加试剂一(由 2μL 增至 5μL); 改变后的 T 需代入公式重新计算。

若荧光值较大 (大于 4000Au) , 可以减少 37℃孵育反应时间 T(如减至 10min), 或稀释试剂一(稀释 5~10 倍); 改变后的 T 需代入公式重新计算。

结果计算:

1、按照样本质量计算:

活性氧强度定义:每克组织每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度=荧光强度÷T÷W×V

2、按照样本蛋白浓度计算:

活性氧强度定义:每毫克组织蛋白每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度=荧光强度÷T÷Cpr×V

3、按照液体体积计算:

活性氧强度定义:每毫升液体每分钟产生的荧光强度定义为活性氧强度。

活性氧强度=荧光强度÷T÷V1

T: 反应时间, 30min;

V: 加入提取液体积, 1ml

W: 组织重量, g

Cpr: 蛋白浓度, mg/ml;可使用本公司蛋白含量试剂盒测定

V1: 测定加入样品体积, 0.2ml

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本) ;
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。