

线粒体活性氧产生速率(ROS)检测试剂盒（荧光法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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 200μL 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°C 避光孵育 15min。		

孵育完成后, 在 37°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

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

- (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。

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

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。