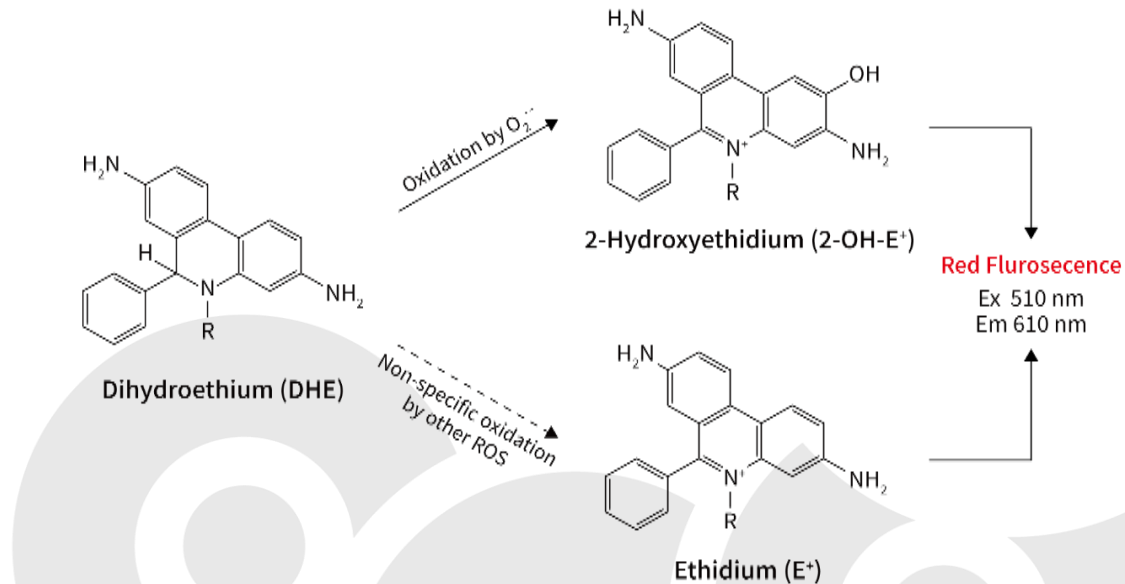


OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit - DHE

(Fluorometric)

BO-ROS-SH200, 200 tests

제품 원리



DHE는 ROS 중 과산화물($O_2^{\cdot -}$, superoxide)에 대해 높은 특이성을 가지나, 다른 ROS 종(예, H_2O_2 , hydroxy radical, peroxyxynitrite etc.)과의 비특이적 반응으로도 에티듐(E⁺)을 형성할 수 있습니다. BIOMAX 사의 OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit(DHE)는 세포 투과성 형광 프로브로 DHE를 사용합니다. 세포 내에서 DHE는 과산화물 라디칼과 특이적으로 반응하여 2-Hydroxyethidium(2-OH-E⁺)이라는 적색 형광 물질을 형성하며, 이는 510/610 nm에서 형광 분광법으로 검출됩니다. 이 키트는 ROS 생성에 대한 양성 대조군으로 미토콘드리아 전자 전달 사슬의 복합체 III 억제제인 Antimycin A, 항산화 대조군으로 N-Acetyl Cysteine을 포함합니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
10X Assay Buffer	15 ml	-20°C
5 mM Dihydroethidium (DHE)	20 μ l $\times$ 4 vials	
10 mM Antimycin A	100 μ l	
N-Acetyl Cysteine (10 mg)	4 vials	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 약 1년간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ Fluorometric microplate reader / Fluorescence Microscope (Ex/Em 510/610 nm or TRITC filter)
- ▶ Tissue culture-treated 96well microwell plate, Dark clear-bottomed
- ▶ V-bottom, 96-well dilution plate (suspension cell protocol)
- ▶ Centrifuge with microplate adapter capable of >400 x g
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Distilled or deionized water
- ▶ Microtube / 15 ml conical tube
- ▶ Vortexer / mini centrifuge

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 제품의 모든 구성품은 상온에서 완전히 녹인 후 사용합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.
- 빛이 차단된 상태로 보관합니다.

1X Assay Buffer

10X Assay Buffer 10 ml과 D.W. 90 ml을 혼합하여 준비합니다. 1X Assay Buffer는 4 °C에 1년간 보관 가능합니다.

DHE working solution

5 mM DHE 15 μ l와 1X Assay Buffer 15 ml를 혼합하여 5 μ M DHE working solution 15 ml을 준비합니다.

* 실험 직전에 필요한 양만큼 희석하여 사용하며, 남은 용액은 폐기합니다.

* 개봉한 5 mM stock solution은 -20 °C에서 최대 1 개월까지 보관 가능합니다.

Antimycin A working solution

10 mM Antimycin A 15 μ l와 1X Assay Buffer 1 ml를 혼합하여 150 μ M Antimycin A working solution 1 ml을 준비합니다.

* 실험 직전에 필요한 양만큼 희석하여 사용하며, 남은 용액은 폐기합니다.

* 개봉한 10 mM Antimycin A는 -20 °C에서 최대 6 개월까지 보관 가능합니다. 소량 Aliquot하여 -20 °C에 보관합니다.

N-Acetyl Cysteine working solution

N-Acetyl Cysteine (10 mg) vial에 1X Assay Buffer 200 μ l를 넣어 녹입니다.

* 실험 직전에 녹여 사용하며, 남은 용액은 폐기합니다.

실험 과정

- 1X Assay Buffer 실험 직전에 37 °C로 데워서 사용합니다.
- V-bottom, 96-well dilution plate 및 Centrifuge with microplate adapter(400 x g)를 사용할 수 없는 경우, 1.5 ml microtube로 대체 가능합니다.

Suspension Cells Protocol (Microplate Assay)

- ① 실험 당일 세포 현탁액을 1-2X10⁵ cells/well로 100 µl씩 분주합니다. Positive control과 negative control well을 반드시 포함시킵니다.
- ② 400 x g에서 원심분리 한 후 배지를 제거한 다음 1X Assay Buffer를 well당 150 µl씩 넣습니다.
- ③ 다시 원심분리 후 1X Assay Buffer를 10-20 µl만 남기고 제거합니다.
- ④ 준비된 5 µM DHE working solution을 130 µl씩 넣습니다.
- ⑤ N-acetyl Cysteine working solution 10 µl를 negative control well에 첨가합니다.
- ⑥ 빛을 차단하여 37 °C, 30 분간 배양합니다.
- ⑦ 150 µM Antimycin A working solution 10 µl를 positive control well에 첨가한 후 빛을 차단한 다음 37 °C, 1 시간 추가 배양합니다.
- ⑧ 배지를 제거하고 1X Assay Buffer를 well당 100 µl씩 넣습니다.
- ⑨ 세포를 96-well microplate (dark, clear-bottomed)에 옮기고 Microplate reader(Ex/Em=510/610 nm)로 측정합니다.

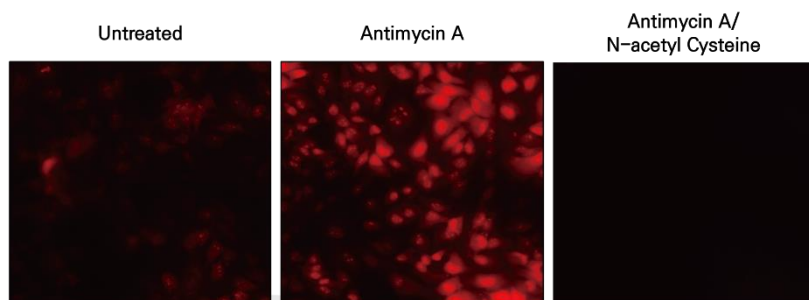
Adherent Cells Protocol (Fluorescent microscope / Microplate Assay)

- ① 실험 전날 96-well microplate(dark, clear-bottomed)에 세포 현탁액을 1-5X10⁴ cells/well로 100 µl씩 분주한 후 37 °C, 24 시간 배양합니다. Positive control과 negative control well을 반드시 포함시킵니다.
- ② 배지를 제거하고 1X Assay Buffer를 well당 150 µl씩 넣습니다.
- ③ 1X Assay Buffer를 10-20 µl만 남기고 제거합니다.
- ④ 준비된 5 µM DHE working solution을 130 µl씩 넣습니다.
- ⑤ N-acetyl Cysteine working solution 10 µl를 negative control well에 첨가합니다.
- ⑥ 빛을 차단하여 37 °C, 30 분간 배양합니다.
- ⑦ 150 µM Antimycin A working solution 10 µl를 positive control well에 첨가한 후 빛을 차단한 다음 37 °C, 1 시간 추가 배양합니다.
- ⑧ 배지를 제거하고 1X Assay Buffer를 well당 100 µl씩 넣습니다.
- ⑨ Microplate reader(Ex/Em=510/610 nm)로 측정하거나 형광 현미경(TRITC filter)으로 즉시 관찰합니다.

결과 분석

- 누적 관찰 및 촬영 시 광산화에 의해 누적될수록 형광이 증가할 수 있습니다.

A



B

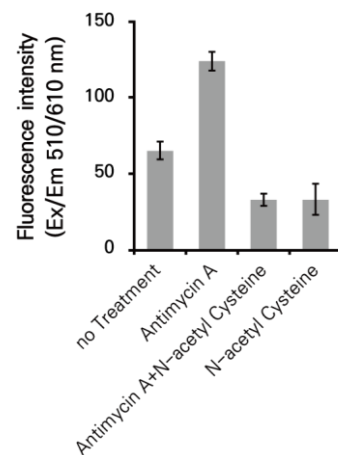


Figure 1. ROS production measurement using DHE probe in HeLa cells after Antimycin A treatment with or without antioxidant NAC. The fluorescence signal was measured using fluorescence microscope with a TRITC filter(A) and a fluorometric microplate reader(B).

Related products

- BO-ROS-RD200	OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit(H ₂ DCFDA) (Fluorometric)
- BO-ABTS-100	OxiTec™ ABTS Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)
- BO-TAC-200	OxiTec™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)
- BO-TBR-200	OxiTec™ TBARS Assay Kit (Colorimetric)
- BO-GLU-200	OxiTec™ Glutathione(GSH/GSSG/Total) Assay Kit (Colorimetric)
- BO-SOD-250/500	OxiTec™ SOD Assay Kit (Colorimetric)
- BO-PER-500	OxiTec™ Hydrogen Peroxide/peroxidase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)
- BO-DPPH-200/500	OxiTec™ DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)
- BO-CAT-400	OxiTec™ Catalase Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.



Homepage : www.biomax.com

Shopping mall : www.biomaxmall.com

E-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note