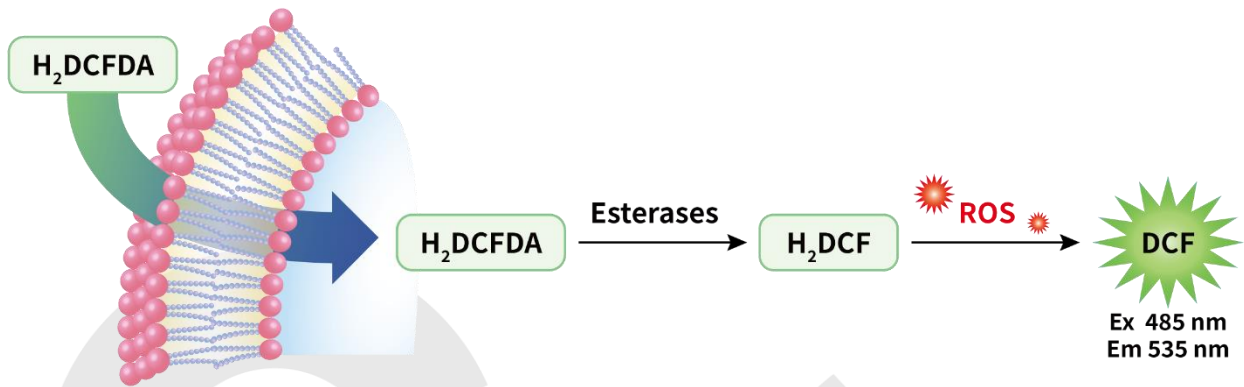


# OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit - H<sub>2</sub>DCFDA (Fluorometric)

BO-ROS-RD200, 200 tests

## 제품 원리



OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit(H<sub>2</sub>DCFDA)는 세포 투과성 형광 프로브로 H<sub>2</sub>DCFDA를 사용합니다. H<sub>2</sub>DCFDA는 세포 내 활성산소(ROS)를 측정하는데 사용되는 형광 프로브로 비형광 상태로 세포에 침투한 후, 세포 내 에스테라제에 의해 탈아세틸화되고 ROS에 의해 형광성의 DCF(2', 7'-dichlorofluorescein)로 산화되며 이는 485nm/535nm에서 형광 분광법에 의해 검출됩니다.

## 제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
10X Assay Buffer	10 ml	-20°C
20 mM H <sub>2</sub> DCFDA	25 µl	
55 mM TBHP	35 µl	

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

## 검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ Fluorometric microplate reader / Fluorescence Microscope / Flow Cytometry (Ex/Em 485/535 nm or FITC filter)
- ▶ Tissue culture-treated 96well microwell plate, Dark clear-bottomed
- ▶ Microtube / Round bottom test tube / 15 or 50 ml conical tube
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ 8 or 12 Channel micropipette
- ▶ Vortexer / mini centrifuge
- ▶ Distilled or deionized water

## 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.

### H<sub>2</sub>DCFDA working solution

20 mM H<sub>2</sub>DCFDA를 1X Assay Buffer로 희석하여 20 μM H<sub>2</sub>DCFDA working solution을 준비합니다.

- \* 실험 직전에 필요한 양만큼 희석하여 사용하며, 남은 용액은 폐기합니다.
- \* 개봉 후 20 mM H<sub>2</sub>DCFDA는 소량 Aliquot하여 -20 °C에 보관합니다.

### TBHP working solution

양성대조군으로 사용할 55 mM TBHP는 1X Assay Buffer로 희석하여 50-250 μM TBHP working solution을 준비합니다.

- \* 실험 직전에 필요한 양만큼 희석하여 사용하며, 남은 용액은 폐기합니다.
- \* 세포주의 민감도에 따라 반응성이 다르므로 예비 실험을 통해 농도를 조절합니다.
- \* 개봉 후 55 mM TBHP는 소량 Aliquot하여 -20 °C에 보관합니다.

## 실험 과정

- 1X Assay Buffer 실험 직전에 37 °C로 데워서 사용합니다.
- H<sub>2</sub>DCFDA 최적의 농도는 세포주에 따라 다를 수 있습니다(10-50 μM).

### Suspension Cells Protocol (Microplate Assay)

- ① 실험 당일 1.5X10<sup>5</sup> cells/well이 사용 가능하도록 세포 현탁액을 준비합니다.
- ② 준비된 세포를 1X Assay Buffer로 세척한 후 다시 원심분리 합니다.
- ③ 1X10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 세포를 20 μM H<sub>2</sub>DCFDA working solution에 현탁합니다.  
DCFDA 최적의 농도는 세포주에 따라 다를 수 있습니다(10-50 μM).
- ④ 빛을 차단하여 37 °C, 30 분간 배양합니다.
- ⑤ 1X Assay Buffer로 세척한 다음 원심분리 후 1X Assay Buffer로 재현탁합니다.
- ⑥ 10<sup>5</sup> cells/100 μl의 세포를 96-well microplate(dark, clear-bottomed)에 분주합니다. 필요한 경우, 1X Assay Buffer로 2X 시험물질 및 2X 양성대조군을 준비하여 각 well에 100 μl씩 첨가합니다.  
배양 시간은 사용된 물질에 따라 달라지므로 예비실험이 필요합니다.
- ⑦ Microplate reader (Ex/Em=485/535nm)로 측정합니다.

### Adherent Cells Protocol (Fluorescent microscope / Microplate Assay)

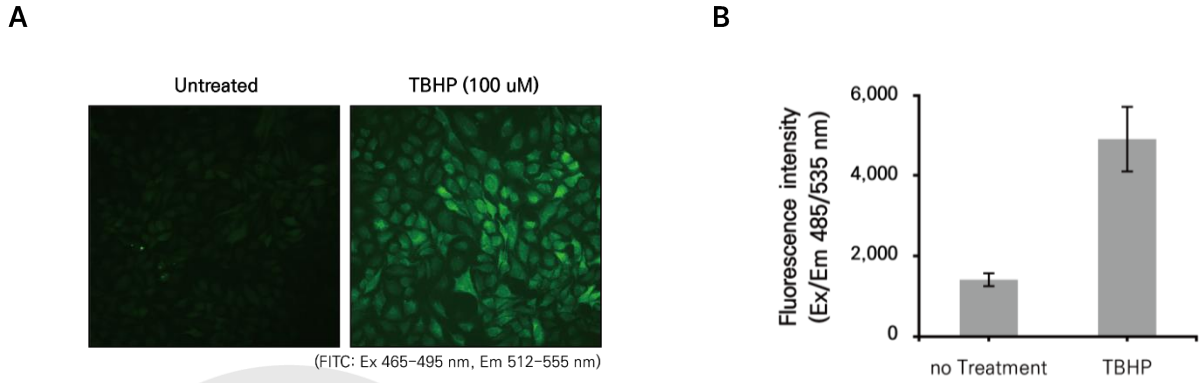
- ① 실험 전날 96-well microplate(dark, clear-bottomed)에 세포 현탁액을 1-5X10<sup>4</sup> cells/well로 100 μl씩 분주한 후 37 °C, 24 시간 배양합니다.
- ② 배지를 제거하고 1X Assay Buffer를 well당 100 μl씩 첨가합니다.
- ③ 1X Assay Buffer를 제거하고, 준비된 20 μM H<sub>2</sub>DCFDA working solution을 100 μl씩 첨가합니다.
- ④ 빛을 차단하여 37 °C, 45 분간 배양합니다.
- ⑤ H<sub>2</sub>DCFDA working solution을 제거하고 1X Assay Buffer 100 μl씩 첨가합니다. 시험물질 및 양성대조군을 처리할 경우, 1X Assay Buffer 대신 각 물질을 1X Assay Buffer로 희석하여 100 μl씩 첨가합니다.  
배양 시간은 사용된 물질에 따라 달라지므로 예비실험이 필요합니다.
- ⑥ Microplate reader(Ex/Em=485/535nm)로 측정하거나 형광 현미경(FITC filter)으로 즉시 관찰합니다.

### Flow Cytometry Analysis

- 실험 과정 중에는 세포 현탁액을 균일하게 유지하는 것이 중요합니다.
  - 대조군(control compound, control vehicle and non-stained control) 준비가 반드시 필요합니다.
- ① 실험 당일 1.5X10<sup>5</sup> cells/well이 사용 가능하도록 균일한 세포 현탁액을 준비합니다.
  - ② 준비된 세포를 1X Assay Buffer로 세척한 후 다시 원심분리 합니다.
  - ③ 1X10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 세포를 20 μM H<sub>2</sub>DCFDA working solution에 현탁합니다.
  - ④ 빛을 차단하여 37 °C, 30 분간 배양합니다.
  - ⑤ 1X Assay Buffer로 세척한 다음 원심분리 후 1X Assay Buffer로 재현탁합니다.
  - ⑥ 10<sup>5</sup> cells/100 μl의 세포를 test tube에 분주합니다. 필요한 경우, 1X Assay Buffer로 2X 시험물질 및 2X 양성대조군을 준비하여 각 well에 100 μl씩 첨가합니다.  
배양 시간은 사용된 물질에 따라 달라지므로 예비실험이 필요합니다.
  - ⑦ 균일한 세포 현탁액을 준비하여 유세포 분석기(Ex/Em=485/535nm, F1)로 분석합니다.

**결과 분석**

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



**Figure 1.** ROS production measurement using H<sub>2</sub>-DCFDA probe in HeLa cells after TBHP stimulation. The fluorescence signal was measured using fluorescence microscope with a FITC filter(A) and a fluorometric microplate reader(B).

## Related products

- BO-ROS-SH200 OxiTec™ Cellular ROS Detection Kit(DHE) (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](http://www.biomax.com)

Shopping mall : [www.biomaxmall.com](http://www.biomaxmall.com)

E-mail : [info@scgbiomax.com](mailto:info@scgbiomax.com)

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

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

**Note**

