

细胞衰老检测试剂盒

说明书修订日期: 2021.04.06

Cat Number: KGPAG001

Store at -20°C for one year, protected from light

For Research Use Only(科研专用)

一、试剂盒说明

绝大多数正常细胞被认为仅有有限的分裂能力,在不能分裂后就进入衰老(senescence)状态。此时细胞仍然是存活的,但细胞的基因和蛋白的表达谱发生了很大改变。衰老(senescence)的细胞不能在一些常规的刺激下再诱导细胞分裂,并且衰老细胞的细胞周期分布也比较特殊,不同于一些损伤诱导的细胞休眠,也不同于细胞生长接触抑制的情况。衰老细胞通常体积变大,表达 pH 6.0 时有高酶活性的 β -半乳糖苷酶。细胞衰老也被认为是生物体抑制肿瘤的一种方式,同时也是生物体老化(aging)的一种潜在原因。

细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (Senescence β -Galactosidase Staining Kit) 是一种基于衰老时 SA- β -Gal(senescence-associated β -galactosidase)活性水平上调而对衰老细胞或组织进行染色检测的试剂盒。在普通的光学显微镜下就可以观测到细胞或组织的衰老情况。本试剂盒可以用于培养细胞的衰老检测,也可以用于组织切片的衰老检测。

本试剂盒仅染色衰老细胞,不会染色衰老前的细胞(presenescent cells)、静止期细胞(quiescent cells)、永生细胞(immortal cells)或肿瘤细胞。

KGPAG001 如果使用6孔板检测,足够测定100个样品;使用24孔板测定,足够测定400个样品;使用96孔板测定,足够测定1000个样品。对于组织切片或组织块,可以检测的样品数量视样品的大小而定。对于普通切片的滴染足够检测100个样品。

二、试剂盒组份

组份	KGPAG001	保存条件
固定液	100 ml	-20°C
染色液 A	1 ml	-20°C
染色液 B	1 ml	-20°C
染色液C	100 ml	-20°C
X-gal	5 ml	-20°C, 避光

三、操作步骤

对于悬浮细胞

- % 离心收集细胞于1.5ml离心管中,用PBS轻柔洗1-2遍。
- & 每管加入500-1000 ul 固定液,室温固定 10-15min。(注:固定时可在摇床上缓慢摇动,以免细胞结成团块。)
- ' " 离心,吸去固定液,PBS轻柔洗三遍,每次3 min。
- (" 离心吸去PBS,每管加 500-1000 ul 左右染色工作液(临用前,配置所需工作液: 10 ul染色液A+10 ul染色液B +930 ul染色液C+50 ul的X-gal充分混匀, 2-8°C避光,现用现配)。
-)" 59°度无CO₂温箱中避光孵育过夜。
- *" 取部分染色后的细胞,滴加到载玻片或8孔板中,普通光学显微镜下观察,分别计数三个不同视野,计算蓝染的阳性细胞数。(注:如不能及时观察计数,可以离心去除染色液后,加入30 μ l RDU, 6°C保存一周。也可离心后取细胞用于涂片,加上封片液封片后, 6°C保存较长时间。)"

对于贴壁细胞

1. 针对6孔板中培养的细胞，去除细胞培养液，用PBS轻柔洗1-2遍。
2. 每孔加入500-1000 ul 固定液，室温固定10-15min。
3. 吸去固定液，PBS轻柔洗三遍，每次3 min。
4. 吸去PBS，每孔滴加 500-1000 ul 左右染色工作液（临用前，配置所需工作液：10 ul染色液A+10 ul染色液B+930 ul染色液C+50 ul的X-gal充分混匀，2-8℃避光，现用现配）。
5. 37度无CO₂温箱中避光孵育过夜。（注：可用保鲜膜封住孔板，防止蒸发，不能放置于含CO₂培养箱中。）
6. 普通光学显微镜下观察，分别计数三个不同视野，计算蓝染的阳性细胞数。
（注：如不能及时观察计数，可以去除染色液后，加入1ml PBS，4℃保存一周。也可加上封片液封片后，4℃保存较长时间。）

对于冰冻组织切片

1. 切片室温复温，PBS浸泡组织切片3次，每次不少于5min；加入适量的固定液，以充分盖住组织为宜，室温固定15 min以上。
2. 吸去固定液，PBS轻柔洗三遍，每次5 min。
3. 吸去PBS，加入适量的染色工作液，最好把整个切片浸泡在染色工作液中（临用前，可根据样本数量，配置所需工作液：10 ul染色液A+10 ul染色液B+930 ul染色液C+50 ul的X-gal充分混匀，2-8℃避光，现用现配）。
4. 37度无CO₂温箱中避光孵育过夜。（注：可用保鲜膜封住防止蒸发，不能放置于含CO₂培养箱中。）
5. 普通光学显微镜下观察，分别计数三个不同视野，计算蓝染的阳性细胞数。
（注：如不能及时观察计数，可加上封片液封片后，4℃保存较长时间。）

四、注意事项

- 1、X-gal 低温保存可能会结冻，室温或37℃水浴2-5min溶解即可，注意避光保存。固定液对人体有毒，请小心操作。
- 2、染色工作液现用现配。如不能一次用完，请分装保存。
- 3、细胞衰老β-半乳糖苷酶染色反应依赖于特定的pH条件，不能在二氧化碳培养箱中进行染色反应。用于细胞培养的二氧化碳培养箱中较高浓度的二氧化碳会影响染色工作液的pH值，而导致染色失败。
- 4、本试剂盒不适用于石蜡切片组织样本，在石蜡包埋的过程中，温度、固定液等因素可能会导致β-半乳糖苷酶失活，从而造成染色失败；如果一定要用于石蜡切片的检测，建议自行对实验条件进行一定的优化。
- 5、使用96孔板等多孔板进行检测时，如果孵育过夜容易产生所谓的“边缘效应”(edge effect)，即多孔板四周的孔由于和外界最直接接触，易受外界环境影响，其中最明显的是四周细胞培养孔的蒸发效应。边缘效应会导致细胞生长不均匀、细胞分布不均一、培养液体积不一致、培养液中相关成分的浓度、pH值不一致。建议采取以下方法避免96孔板等多孔板的边缘效应：避免孵育过长时间，以避免蒸发等带来的边缘效应；弃用边缘孔并在弃用的边缘孔中加入等量的水、PBS或其他适当溶液；在多孔板非孔的凹陷处加入适量的水或其他适当溶液；将整块板放在湿盒中；使用防挥发盖；在实验设计时，实验样品最好进行随机分配，不要将某一组样品固定放在某个位置而引入可能的系统性误差。