

## 衰老细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书

### 产品简介：

绝大多数正常细胞的分裂能力是有限的，在不能分裂后就进入衰老状态，此过程即为细胞衰老（cell senescence），细胞衰老是细胞控制其生长潜能的保障机制，一般含义是复制型衰老（replicative senescence）。正常细胞经过有限次数的分裂后停止分裂，出现不可逆的生长停滞，此时细胞仍然是存活的，但是细胞形态和生理代谢活性发生明显变化，通常表现为细胞体积变大，与衰老相关的 $\beta$ -半乳糖苷酶为活化状态。 $\beta$ -半乳糖苷酶是细胞溶酶体内的水解酶，通常在pH 4.0时表现活性，但在衰老细胞内该酶在pH 6.0条件下表现活性。本试剂盒即是基于此现象及原理，针对衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶活性水平上调而对衰老组织或细胞进行染色。具体反应原理就是以X-Gal为底物，衰老细胞特异性 $\beta$ -半乳糖苷酶催化该底物生成蓝色产物，表现为细胞胞质有蓝色沉积物，可以在光学显微镜下进行观察。按照每个样品染色液用量为1 mL计算，本试剂盒可完成100个样品的染色。

### 储存与运输

冰袋（wet ice）运输；4℃避光保存，有效期12个月。其中X-Gal粉末如果配制成溶液后分装成小份-20℃保存，3个月内有效。

### 组成

Component Number	Component	ZC-G10053-500T
ZC-G10054-1	$\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液	100 mL
ZC-G10054-2	$\beta$ -半乳糖苷酶染色液A	100 mL
ZC-G10054-3	$\beta$ -半乳糖苷酶染色液B	1.2 mL
ZC-G10054-4	DMF（二甲基甲酰胺）	5 mL
ZC-G10054-5	X-Gal（powder）	100mg
说明书	1 份	

### 使用方法：

1. 自备PBS缓冲液。
2. 将100 mg X-Gal粉末用5 mL DMF（二甲基甲酰胺）充分溶解混匀，分装至1.5 mL洁净离心管中，每管0.5 mL，-20℃避光保存。避免反复冻融。
3. 按照下表比例配制 $\beta$ -半乳糖苷酶染色工作液。如果是6孔板培养的细胞，每孔需要1.0-1.5 mL染色工作液，如果是12孔板，每孔需要0.5-1.0 mL染色工作液。根据样本量配制染色液，避免浪费。

Component	Volume
$\beta$ -半乳糖苷酶染色液A	940ul
$\beta$ -半乳糖苷酶染色液B	10ul
X-Gal溶液	50ul
总体积	1ml

#### 1. 对于贴壁细胞

- (1) 6孔板培养好的细胞（或细胞爬片），吸除细胞培养液，用PBS洗涤2次，加入1mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定15min。
- (2) 弃去固定液，用PBS洗涤细胞3次，每次2min。
- (3) 用移液器将PBS吸除干净，每孔加入1 mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色工作液，置于37℃孵育2 h至过夜。注意：不能在37℃二氧化碳培养箱中孵育。染色期间需及时观察显色情况，如果样本中 $\beta$ -半乳糖

苷酶表达量较高，在数小时内即可完成染色。如果 $\beta$ -半乳糖苷酶表达量低，则需适当延长孵育时间，期间需用保鲜膜或parafilm封住6孔板，防止液体蒸发影响染色结果。

(4) 普通光学显微镜下观察，阳性细胞显色后，去除染色工作液。如果需要复染细胞核，向孔板内加入少量核固红染液覆盖细胞室温染色3 min，去除染色液，用PBS清洗数次。

(5) 加入2 mL PBS覆盖细胞，至此染色完成，此样本可于4°C保存1周。或者加入70%甘油覆盖细胞，4°C可保存较长时间。如果是细胞爬片，则可将爬片充分烤干，二甲苯透明后滴加中性树胶封片，可长期保存。

## 2. 对于冰冻切片

(1) 冰冻切片室温复温10min。以组化笔画圈，将组织圈出。

(2) 向组织上滴加适量 $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液，以完全覆盖住组织为宜，室温固定20min。

(3) 组织切片经PBS浸泡洗涤3次，每次5 min。

(4) 将切片置于避光湿盒中，向组织上滴加适量 $\beta$ -半乳糖苷酶染色工作液，需完全覆盖住组织。湿盒放入37°C孵育，每隔2 h显微镜下观察显色情况，如果未见显色，则继续孵育，直到组织上衰老细胞显色。如果样本需过夜孵育，则需滴加足量的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色工作液，防止染液蒸发干片。

(5) 待组织显色后，去除染色液，切片入PBS浸洗2次，纯水浸洗2次。

(6) (可选) 滴加核固红染液染色3min，水洗3次。

(7) 切片无水乙醇脱水2次，每次5min再经二甲苯透明5min，滴加中性树胶封片。

## 3. 染色结果

衰老细胞胞质内呈散在分布的蓝色。

## 注意事项：

1. X-Gal溶液需室温完全解冻混匀后再使用。

2.  $\beta$ -半乳糖苷酶染色液A和B需提前恢复至室温后再使用，配制好的染色工作液需充分混匀无沉淀方可使用。

3. 衰老细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色反应依赖于特定的pH条件，不能在CO<sub>2</sub>培养箱中进行孵育显色，否则会影响染色工作液的pH，导致染色失败。

4. 配制染色工作液时请选择聚丙烯(PP)或玻璃材质的耗材，不能用聚苯乙烯(PS)材质的耗材。

5. 在显色2 h-过夜期间需多次观察显色情况，时间过短可能导致阴性结果；时间太长则可能导致假阳性。显色时间与样本本身所含的 $\beta$ -半乳糖苷酶量多少有密切关系。

6. 在配制染色工作液前，需检查染色液A的pH值，如果不是6.0(可能因保存条件导致pH发生改变)，需用HCl或NaOH调节pH至6.0再使用。

7. 组织切片的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色，对于样本的前期准备要求较高，样本需-80°C保存，并尽快完成检测。因为 $\beta$ -半乳糖苷酶非常容易失活，样本保存不当或时间过久，都可能导致酶失活，则染色时没有阳性。

8. 操作时请穿实验服，佩戴一次性手套。