

概述

正常细胞的DNA损伤是由细胞的不断分裂和氧化应激引起。在没有修复DNA损伤的情况下，为了抑制细胞的癌化，需要不可逆地终止DNA损伤细胞的分裂。细胞衰老是一种可以不可逆地终止DNA损伤细胞分裂的状态，它可以抑制DNA受损细胞的生长。SA-β-gal (细胞衰老β-半乳糖苷酶) 在衰老细胞中过表达，被广泛作为细胞衰老的标识之一。用X-gal染色检测SA-β-gal是一种常用的方法，但此方法存在几个缺点：1) 由于细胞透膜性差，需要固定细胞。2) 由于很难区分染色细胞和未染色细胞，所以定量困难。3) 染色时间长。

本试剂盒检测SA-β-gal灵敏度高，方法简便。SPiDER-βGal是一种检测β-gal的新型试剂，具有细胞透膜性高，胞内荧光维持时间长的特点。本试剂盒不仅可以特异性地检测到活细胞中的SA-β-gal (用Bafilomycin A1抑制内源性β-galactosidase的活性)，也可以检测到固定细胞中的SA-β-gal (用McIlvaine缓冲液 (pH 6.0)。由于SPiDER-βGal和SA-β-gal反应后会产生很强且持续的荧光，因此SPiDER-βGal可被用于流式细胞仪来进行定量分析。

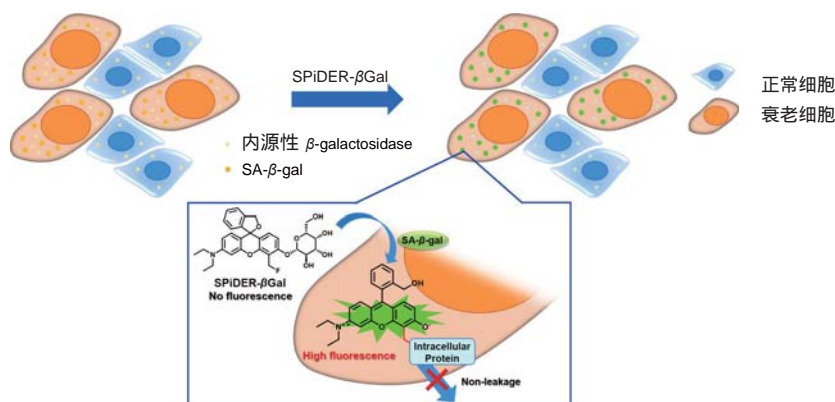


图1. 用SPiDER-βGal检测衰老细胞的原理

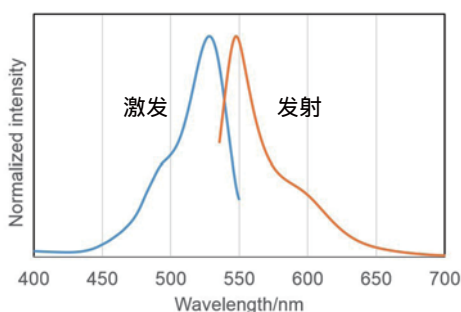


图2. SPiDER-βGal和β-半乳糖苷酶反应的激发和发射光谱图

推荐波长：

Ex : 500 ~ 540 nm

Em : 530 ~ 570 nm

用共聚焦显微镜或流式细胞仪请

选择488 nm激发波长

试剂盒内含

- SPiDER-βGal × 1管

- Bafilomycin A1 × 1管

* 由于Bafilomycin A1的量极少，很难看见内容物，请小心操作。

试剂盒规格

5 Assays (35 mm 培养皿)

储存条件

0-5

所需的设备和材料

DMSO、培养基或HBSS、移液器

溶液配制

配制SPiDER-βGal DMSO储存液

在含有SPiDER-βGal的管子中加入7 μl DMSO，吹打溶解。SPiDER-βGal DMSO 储存液请在-20 °C 保存。

配制Bafilomycin A1 DMSO储存液

在含有Bafilomycin A1的管子中加入24 μl DMSO，吹打溶解。Bafilomycin A1 DMSO 储存液请在-20 °C 保存。

* 在细胞中的不溶性物质，例如脂褐素 (老年素) 会加速细胞衰老。由于脂褐素有自发荧光，会产生较强的背景荧光。为了准确地测定衰老细胞的SA-β-gal活性，建议制备SPiDER-βGal不染色的样品，对比SPiDER-βGal染色和不染色样品的荧光强度。如有问题请咨询。

操作步骤

- 检测活细胞 -

配制Bafilomycin A1工作液

用培养基或HBSS稀释Bafilomycin A1 DMSO储存液1,000倍。

配制SPiDER-βGal工作液

混合SPiDER-βGal DMSO储存液和Bafilomycin A1 DMSO储存液，用培养基或HBSS稀释混合液1,000倍。

* 例如：配制1 ml SPiDER-βGal工作液：混合1 μl SPiDER-βGal DMSO储存液和1 μl Bafilomycin A1 DMSO 储存液，用1 ml培养基或1 ml HBSS稀释成1 ml的SPiDER-βGal工作液。

1. 在35 mm 培养皿中接种细胞后，在37 °C，5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基后，用2 ml培养基或2 ml HBSS洗涤1次。
3. 加入1 ml Bafilomycin A1工作液后，在37 °C，5% CO₂培养箱中培养1 h。
4. 加入1 ml SPiDER-βGal工作液后，在37 °C，5% CO₂培养箱中培养30 min。
5. 去除上清液，用2 ml培养基或2 ml HBSS洗涤2次后，在荧光显微镜下观察或用流式细胞仪检测。

- 检测固定细胞 -

配制SPiDER-βGal工作液

用pH 6.0的Mcllvaine 缓冲液稀释SPiDER-βGal DMSO储存液2,000倍。

* 配制pH 6.0的Mcllvaine 缓冲液：混合3.7 ml 0.1 mol/l的柠檬酸溶液和6.3 ml 0.2 mol/l的磷酸钠溶液，检测pH是否为6.0？如果pH不是6.0，用柠檬酸溶液或磷酸钠溶液调节pH至6.0，然后用超纯水稀释5倍。

1. 在35 mm 培养皿中接种细胞后，在37 °C，5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基，用2 ml HBSS洗涤1次后，加入2 ml 4%的多聚甲醛(PFA)/PBS溶液，在室温固定3 min。
3. 去除上清液，用2 ml HBSS洗涤3次。
4. 加入2 ml SPiDER-βGal工作液后，在37 °C 培养30 min。

* 用固定细胞检测SA-β-gal时，请不要使用5% CO₂培养箱。如果使用5% CO₂培养箱，SPiDER-βGal工作液会变成酸性，与内源性β-galactosidase发生反应，背景会上升，很难区分正常细胞和衰老细胞。

5. 去除上清液，用2 ml HBSS洗涤2次，然后在荧光显微镜下观察或用流式细胞仪检测。

实验例

SA-β-gal的荧光成像

1. 在35 mm μ-Dish (ibidi公司) 中分别接种传代数0代和12代的WI-38细胞 (5 × 10⁴ 个/dish、10% FBS、1%青霉素-链霉素的MEM培养基) 后，在37 °C、5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基，用2 ml HBSS洗涤1次。
3. 加入1 ml Bafilomycin A1工作液后，在37 °C，5% CO₂培养箱中培养1 h。
4. 将1 ml SPiDER-βGal 工作液和1 μl浓度为1 mg/ml 的Hoechst 33342溶液混合后加入培养皿中，在37 °C、5% CO₂培养箱中培养30 min。
5. 去除上清液，用2 ml HBSS洗涤2次，再加入2 ml HBSS后，用共聚焦荧光显微镜观察 (激发波长：488 nm，发射波长：500-600 nm)。

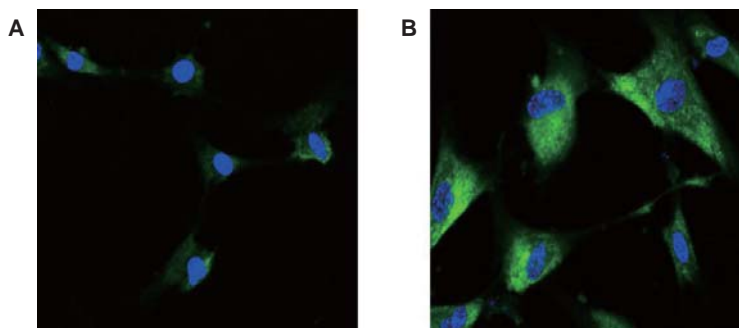


图3. WI-38细胞的SA-β-gal荧光成像图

A. 传代数为0代的WI-38细胞, B. 传代数为12代的WI-38细胞
(绿色: SPiDER-βGal, 蓝色: Hoechst 33342)

用流式细胞仪定量分析SA-β-gal阳性细胞

1. 在35 mm μ -Dish (ibidi公司) 中分别接种传代数为1代和12代的WI-38细胞 (1×10^5 个/dish, 含有10% FBS, 1% 青霉素-链霉素的MEM培养基) 后, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基, 用2 ml HBSS洗涤1次。
3. 加入1 ml Bafilomycin A1工作液后, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养1 h。
4. 加入1 ml SPiDER-βGal工作液后, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中培养30 min。
5. 去除上清液, 用2 ml HBSS洗涤2次。
6. 用胰蛋白酶消化细胞, 将细胞用MEM培养基 (含有10%的FBS、1%的青霉素-链霉素) 重悬。
7. 用流式细胞仪检测 (激发波长: 488 nm, 发射波长: 515-545 nm)。

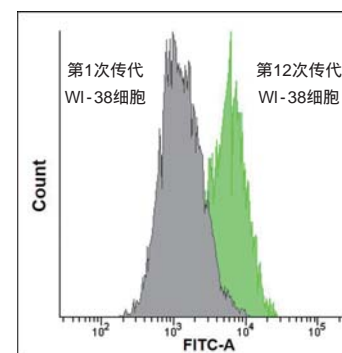


图4. 定量SA-β-gal阳性的WI-38细胞

Q&A

Q: 如果衰老细胞和对照组细胞之间的荧光强度没有差异, 应该如何解决?

A: STEP1: 优化显微镜的观察条件。

STEP2: 如果优化观察条件仍无法解决, 请对染色条件进行优化。

STEP1 < 优化显微镜的观察条件 >

如果衰老细胞和对照组细胞之间的荧光强度没有差异, 请按照以下步骤进行调整。

1. 观察对照组细胞, 通过降低激发光强度, Gain值或缩短曝光时间等条件将仪器调节至可以观察到微弱荧光的状态。
(共聚焦显微镜: 调整Gain值、激发光强度 落射型显微镜: 调整曝光时间)
 2. 慢慢增强激发光强度, 延长曝光时间, 观察衰老细胞的荧光变化, 寻找到衰老细胞和对照组细胞之间的最大荧光差异的条件。
- 如果两者荧光没有差异, 请参考STEP2。

请使用玻璃底的培养皿容器观察。

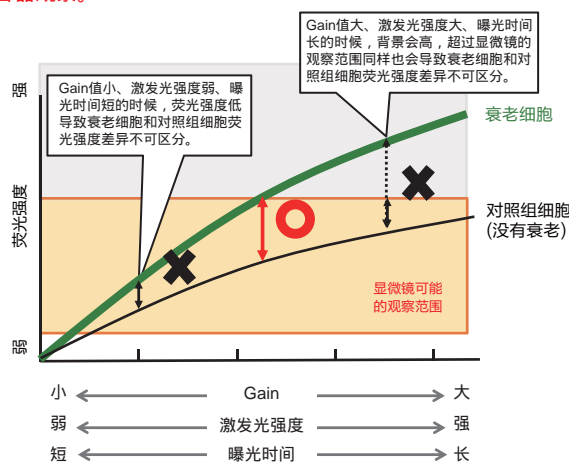


图5. 显微镜观察条件与衰老细胞和对照组细胞荧光强度的关系

STEP2 < 染色条件的优化 >

根据不同的细胞种类，可能需要调整SPiDER-βGal的染色时间和工作液浓度。

以下为最佳条件的参考数据。

染色时间：10~60 min

染色浓度：说明书中1/2~2倍的浓度

分别加入不同浓度的工作液，并调整不同的染色时间，寻找到衰老细胞和对照组细胞之间的最大荧光差异的条件。

※如果观察的细胞数少的话，有可能灵敏度不够。必要时，需要调整细胞数量。

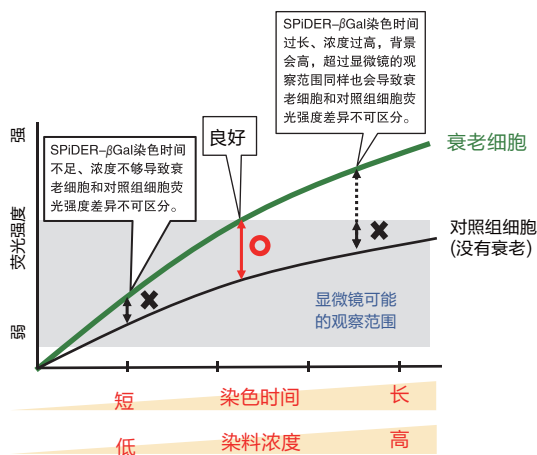


图6. 染色条件与衰老细胞和对照组细胞荧光强度的关系

Q: 如果染色后的荧光太弱，应该如何解决？

A: 请确认以下三点。

① 使用的仪器要与试剂的荧光特性一致。

< 推荐仪器 >

- 荧光显微镜：Ex: 500–540 nm, Em: 530–570 nm
- 流式细胞仪：Ex: 488 nm, Em: 530–570 nm

② 工作液需要现配现用。

③ 延长染色时间。

如果加入SPiDER-βGal工作液培养30 min后无法检测到荧光，可以考虑将培养时间延长至45–60 min。

参考文献

- 1) T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura and Y. Urano, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 9620.



网址: <http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下方式联系我们：

东仁化学科技 (上海) 有限公司

北仁化学科技 (北京) 有限公司

上海

北京

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

北京市朝阳区德外马甸裕民路12号元辰鑫大厦E1-210室

邮编: 200030

邮编: 100029

电话: 400-823-9388

电话: 010-8225-1765

2019年7月