细胞衰老检测试剂盒（β-半乳糖苷酶法）

货号：PMK0995

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：100T

适用样本：细胞和组织切片

产品简介

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。衰老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，并表达在 pH6.0 时有高酶活性的β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)，这被认为是细胞衰老的生物标记。本试剂盒是一种基于衰老时衰老相关β-半乳糖苷酶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。其原理是以 X-Gal 为底物，在 pH 6.0 条件下，衰老特异性的β-半乳糖苷酶催化会生成深蓝色产物，从而在光学显微镜下观察到变成蓝色的表达β-半乳糖苷酶的细胞或组织。本试剂盒适用于培养细胞和组织切片的衰老检测，但仅染色衰老细胞，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。

产品内容

试剂盒组分	规格	储存条件
	100T	
10×固定液	15mL	-20℃
10×PBS	50mL	4℃
试剂一	1.5mL	-20℃
试剂二	1.5mL	-20℃
试剂三	1.5mL	-20℃
底物	6mL	-20℃，避光保存

自备耗材

显微镜、无 CO_2 的 37℃培养箱
6 孔板、移液器及枪头、封口膜
聚丙烯管(15 or 50mL)、制备试剂和缓冲溶液的各种玻璃器皿
去离子水、甘油

试剂准备

1×PBS：使用前，用去离子水将 10×PBS 稀释成 1×PBS，平衡到室温；4℃保存。
1×固定液：使用前，用 1×PBS 将 10×固定液稀释成 1×固定液，平衡到室温；-20℃保存。
试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。
试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。
试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃保存。
底物：即用型；使用前，平衡到 37℃；-20℃避光保存。将底物在 37℃加热 1h 是非常重要的，以避免聚集体的形成，因为其可能干扰染色细胞的可视化。
染色溶液配制：按 10μL 试剂一，10μL 试剂二，10μL 试剂三，50μL 底物和 920μL1×PBS 的比例混匀试剂，再用 NaOH 或 HCl 调至 pH 6.0。
注意：1. 小管试剂开盖前，请先低速离心。

2. 试剂解冻后或使用前如果有沉淀，必须在使用前确保沉淀全部溶解。试剂三刚从试剂盒中取出时，管底可能存在少量沉淀，属正常现象，充分混匀后，沉淀会全部溶解，并须确保在全部溶解后使用。

3. 准备染色溶液时，请使用聚丙烯材料的容器或玻璃容器。可能会出现少量絮凝沉淀，摇动和混合后它将完全溶解。使用前确保完全溶解。染色溶液对人体有毒和腐蚀性。处理时请小心，并注意有效的保护。避免与人体接触或直接吸入。

实验步骤

对于贴壁细胞：

1. 在 6 孔板中培养细胞，进行需要的处理。
2. 吸除细胞培养液，用 1×PBS 洗涤 2 次。
3. 每孔加入 1mL 1×固定液，室温固定 15min。对于其它类型的培养板，固定液及后续溶液的用量参照此比例进行操作。
4. 吸除细胞固定液，用 1×PBS 洗涤细胞 3 次。
5. 吸除 1×PBS，每孔加入 1mL 染色溶液。
6. 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜，直到细胞染上蓝色。

注意：用封口膜密封 6 孔板防止细胞干燥，并选择适当的染色时间。 由于细胞衰老染色与 pH 值相关，因此无法在含有 CO_2 的培养箱中培养细胞。

7. 将细胞置于光学显微镜下观察。计数蓝色细胞和总细胞的数目，并计算表达 β-半乳糖苷酶的细胞（衰老细胞）的百分比。染色后，如不能及时观察计数，可以去除染色溶液，加入 2mL 1×PBS，4℃可以保存数天或用 70%甘油溶液覆盖细胞在 4℃下长期保存。

对于悬浮细胞：

1. 离心（4℃，300g，5min）收集细胞至 1.5mL 离心管内，并用 1×PBS 洗涤 2 次。
2. 每管加入 1mL 1×固定液，室温固定 15min。固定时可以在摇床上缓慢摇动，以避免细胞结成团块。
3. 500g，离心 5min 后吸除细胞固定液,用 1×PBS 洗涤细胞 3 次。
4. 吸除 1×PBS，每管加入 1mL 染色溶液。
5. 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜，直到细胞染上蓝色。
6. 取部分染色后的细胞，滴加到载玻片上或 6 孔板内，普通光学显微镜下观察。计数蓝色细胞和总细胞的数目，并计算表达 β-半乳糖苷酶的细胞（衰老细胞）的百分比。如不能及时观察计数，可以去除染色溶液，加入 2mL 1×PBS，4℃可以保存数天或用 70%甘油溶液覆盖细胞在 4℃下长期保存。

对于组织切片：

对于石蜡切片先按照常规方法进行脱蜡和水化处理。对于冷冻切片直接按照以下步骤进行。

1. 对于准备好的组织切片，加入适当体积的 1×固定液，以充分盖住组织为宜，室温固定 15min。
2. 用 1×PBS 浸泡洗涤组织 3 次。
3. 吸除 1×PBS，加入适当量的染色溶液。
4. 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜，直到细胞染上蓝色。
5. 将组织切片置于光学显微镜下观察。计数蓝色细胞和总细胞的数目，并计算表达 β-半乳糖苷酶的细胞（衰老细胞）的百分比。染色后，如不能及时观察，用 70%甘油溶液覆盖组织切片在 4℃下长期保存。

相关产品：

PMK0992 EdU-488 法细胞增殖成像检测试剂盒
PMK0993 EdU-555 法细胞增殖成像检测试剂盒
PMK0997 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
PMK0998 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）

更多产品详情了解，请关注公众号：