

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。

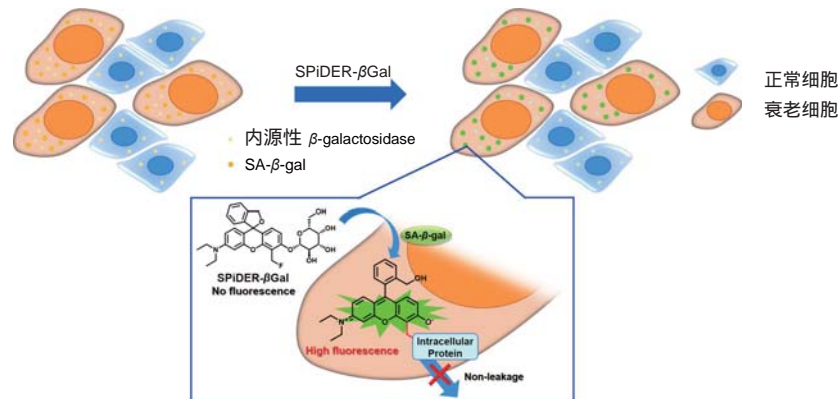


图1. 用SPiDER-βGal检测衰老细胞的原理

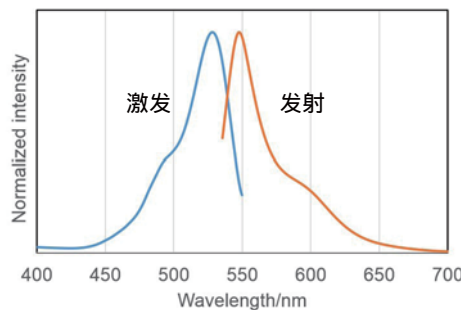


图2. SPiDER-βGal和β-半乳糖苷酶反应的激发和发射光谱图

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

10 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14 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)。

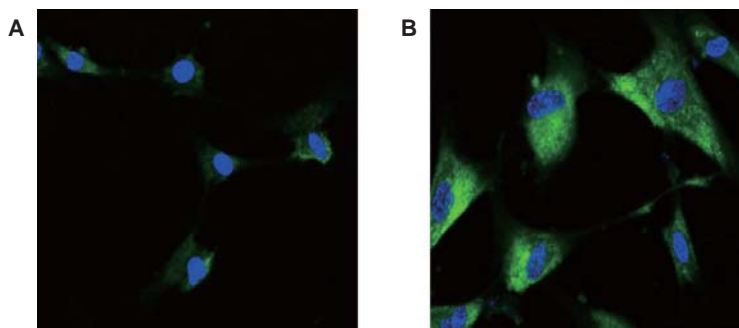


图3. WI-38细胞的SA-β-gal荧光成像图

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)。

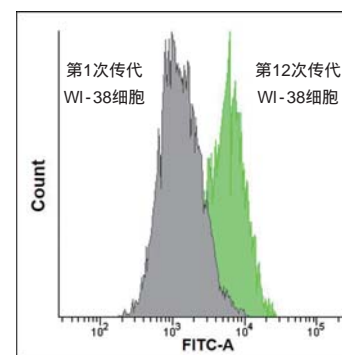


图4. 定量SA-β-gal阳性的WI-38细胞

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。

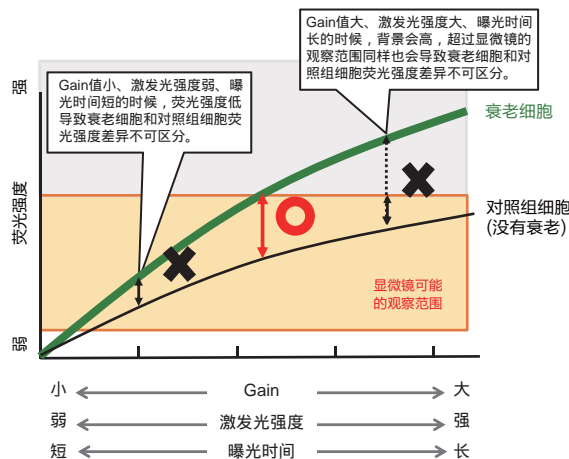


图5. 显微镜观察条件与衰老细胞和对照组细胞荧光强度的关系

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。

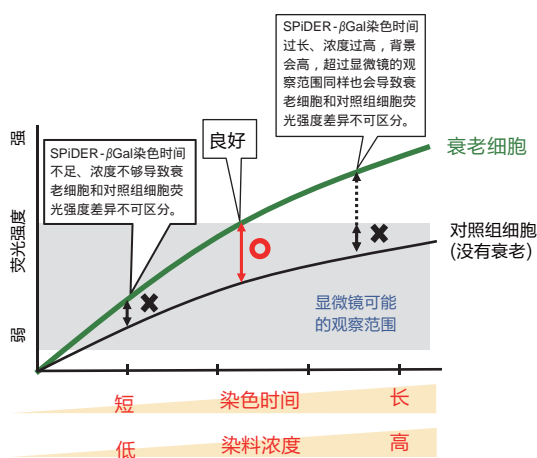


图6. 染色条件与衰老细胞和对照组细胞荧光强度的关系

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。

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

工作液需要现配现用。

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.

DOJINDO 东仁化学科技(上海)有限公司

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们：

网址：www.dojindo.cn

E-mail: info@dojindo.cn

上海

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

邮编：200030

电话：400-823-9388

北京

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：100029

电话：010-8225-1765

2019年2月