

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^{1,2)}。

本试剂盒采用能和β-gal产生荧光的荧光染料SPiDER-βGal³⁾,用培养板可以简便地定量细胞裂解液中的β-gal。本试剂盒测定结果可以通过细胞计数,蛋白质质量及核酸量检测等方法进行修正。



图1. SA-β-gal的检测步骤

试剂盒内含

	20 tests	100 tests
SPiDER-βGal	1 管	5管
裂解液	40 ml	100 ml × 2
Assay Buffer	1.5 ml	7.5 ml
终止液	3 ml	15 ml

储存条件

0-5

所需的设备和材料

- 荧光酶标仪
- 37 培养箱
- 100-1,000 μl, 20-200 μl移液器
- DMSO
- 96孔黑色透明底培养板
- 20-200 μl多通道移液器
- PBS
- 锥形管

注意事项

- 使用前请将试剂盒恢复至室温后使用。
- 由于运输中震动等原因,内容物可能粘附在管壁或管盖上,在开盖前请离心管子。
- 推荐每个样品做3个复孔以获得准确的数据。
- 由于在SPiDER-βGal 工作液加入孔中后,酶反应会立即发生,请使用多通道移液器以减少由于加样时间延迟而导致的实验误差。

溶液配制

配制SPiDER-βGal DMSO储存液

在SPiDER-βGal管子中加入125 μl DMSO,采用涡旋等方法溶解,配制成SPiDER-βGal DMSO储存液。

由于管子中内容物量很少,肉眼看不见,在开盖前请先离心管子。加入DMSO后,为了使溶解均匀完全,请采用涡旋等方法。

配制好的SPiDER-βGal DMSO储存液在-20 可以稳定保存1个月。

配制SPiDER-βGal工作液

用Assay Buffer稀释SPiDER-βGal DMSO储存液10倍,配制成SPiDER-βGal工作液。

SPiDER-βGal工作液不能保存,请在配制好后当天使用完。

当使用96孔黑色透明底培养板时,每孔加50 μl SPiDER-βGal工作液。

操作步骤

检测SA-β-gal

1. 在培养板或培养皿中接种细胞,在37 , 5% CO₂培养箱中过夜培养。
 2. 为了获得精确的定量值,需要修正细胞数。
关于修正细胞数的方法,可以用细胞计数标准化试剂盒(货号:C544)来修正或咨询我们。
 3. 去除上清液,用PBS清洗1次。
 4. 加入裂解液,在室温下培养10 min。
- 请根据下表的容器大小来加裂解液的量。

	96孔板	24孔板	6孔板	10 cm培养皿
裂解液	50 μl	400 μl	1 ml	1.5 ml

表1.裂解液的添加量

实验例

5. 将50 μ l裂解后的细胞溶液添加到另外准备的96孔黑色培养板的每孔中。
如果步骤1是在96孔黑色透明底培养板中接种细胞，可以直接利用这块96孔板进行检测。
6. 在每孔中加入50 μ l SPiDER- β Gal工作液，在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养30 min。
必要时可以延长培养时间。
7. 在每孔中加入100 μ l终止液。
8. 在荧光酶标仪下检测 (Ex: 500 – 540 nm, Em: 540 – 580 nm)。

一. 测定在不同传代数诱导的WI-38细胞的SA- β -gal

1. 在96孔黑色透明底培养板中分别接种传代数为3代和19代的WI-38细胞 (1×10^4 个/孔, 含有10%FBS和1%青霉素-链霉素的MEM培养基), 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 为了修正细胞数量, 采用细胞计数标准化试剂盒 (货号: C544) 染色核酸, 测定荧光值。
3. 去除上清液, 用100 μ l PBS清洗1次。
4. 在每孔中加入50 μ l裂解液, 在室温培养10 min。
5. 在每孔中加入50 μ l SPiDER- β Gal工作液, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养30 min。
6. 在每孔中加入100 μ l终止液。
7. 在荧光酶标仪下检测SPiDER- β Gal的荧光值 (Ex: 535 nm, Em: 580 nm)。
8. 用核酸染色的荧光值修正得到的SPiDER- β Gal的荧光值, 计算出SA- β -gal的量。

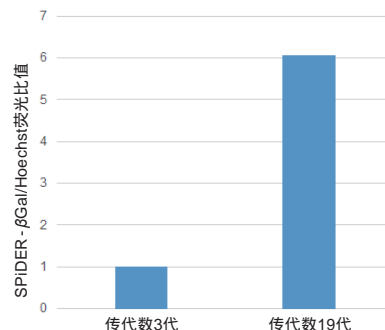


图2. WI-38细胞中的SA- β -gal活性(培养板检测)

二. 测定用Doxorubicin处理的WI-38细胞的SA- β -gal

1. 在10 cm培养皿中接种传代数为3代的WI-38细胞 (1×10^4 个/皿, 含有10%FBS和1%青霉素-链霉素的MEM培养基), 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中过夜培养。
2. 去除培养基, 用10 ml PBS清洗1次。加入10 ml用无血清MEM培养基稀释的0.2 μ mol/l的Doxorubicin溶液, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中培养3天。
3. 去除上清液, 用10 ml PBS清洗1次。加入含有10%FBS和1%青霉素-链霉素的MEM培养基, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中培养3天。
4. 在96孔黑色透明底培养板中分别接种用Doxorubicin处理的和无处理的WI-38细胞 (1×10^4 个/孔, 含有10%FBS和1%青霉素-链霉素的MEM培养基), 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱中过夜培养。
5. 为了修正细胞数量, 采用细胞计数标准化试剂盒 (货号: C544) 染色核酸, 测定荧光值。
6. 去除上清液, 用100 μ l PBS清洗1次。
7. 在每孔中加入50 μ l裂解液, 在室温培养10 min。
8. 在每孔中加入50 μ l SPiDER- β Gal工作液, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养30 min。
9. 在每孔中加入100 μ l终止液。
10. 在荧光酶标仪下检测SPiDER- β Gal的荧光值 (Ex: 535 nm, Em: 580 nm)。
11. 用核酸染色的荧光值修正得到的SPiDER- β Gal的荧光值, 计算出SA- β -gal的量。

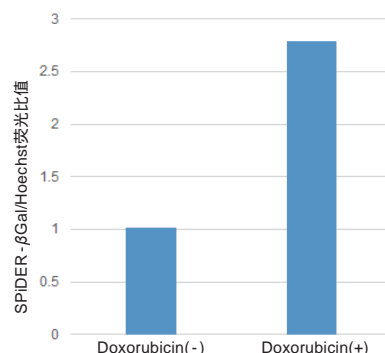


图3. WI-38细胞中的SA- β -gal活性(培养板检测)

参考文献

- 1) Dimri, G. P. *et al.*, *Cell Biology*, **1995**, 92, 9363–9367.
- 2) Park, A. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2018**, 293, DOI: 10.1074/jbc.RA118.003310
- 3) Doura, T. *et al.*, *Angew. Chem.*, **2016**, 55, 9620–9624.

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方式联系我们：

网址：<http://www.dojindo.cn>

E-mail: info@dojindo.cn

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1月