即用型细胞衰老检测试剂盒（β-半乳糖苷酶法）

货号: KTA3031　　规格：100 T　　批号：见产品标签

	适用样本：细胞和组织冰冻切片
	保质期：-20℃保存 12 个月

01 背景与原理

细胞是生物体结构和功能的基本单位，也是生物体衰老的基本单位。细胞衰老在形态学上表现为细胞结构的退行性变化，如核膜凹陷，最终导致核膜崩解，染色质结构变化，超二倍体和异常多倍体的细胞数目增加；细胞膜脆性增加和选择性通透能力下降，膜受体种类、数目和对配体的敏感性等发生变化；脂褐素在细胞内堆积，多种细胞器和细胞内结构发生退行性变化。细胞衰老在生理学上的表现为功能衰退与代谢低下，如细胞周期停滞，细胞复制能力丧失，对促有丝分裂刺激的反应性减弱，对促凋亡因素的反应性改变；细胞内酶活性中心被氧化，酶活性降低，蛋白质合成下降等。衰老细胞不再能够复制，但它们仍保持代谢活性，并且与衰老相关的 β-半乳糖苷酶活性呈阳性，这被认为是细胞衰老的生物标记。

细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色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。以 X-Gal 为底物，在 pH6.0 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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格 100 T	储存条件
Fixation Buffer	100 mL	-20℃保存
Reagent A	100 mL	-20℃保存
Reagent B	1.5 mL	-20℃保存
Reagent C	1.5 mL	-20℃保存
X-Gal solution	6 mL	-20℃避光保存

注：本试剂盒 100 T 规格用于贴壁细胞检测，以 96 孔板为例，每孔 100 μL 体系，足够进行 1000 次检测；以 48 孔板为例，每孔 250 μL 体系，足够进行 400 次检测；以 24 孔板为例，每孔 500 μL 体系，足够进行 200 次检测；以 12 孔板为例，每孔 1 mL 体系，足够进行 100 次检测；以 6 孔板为例，每孔 2 mL 体系，足够进行 50 次检测。用于悬浮细胞，以 1.5mL EP 管为例，每管 1 mL 体系，可以进行 100 次检测。对于组织切片和组织块，可检测样品数量视样品大小而定。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	显微镜，无 CO_2 的 37℃培养箱	/
耗材	封口膜、细胞培养板	/
试剂	去离子水、甘油、1×PBS、70%乙醇	/
其他	可调节式移液枪及枪头	/

04 注意事项

- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。
- 本试剂盒仅可染色衰老细胞，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。
- X-Gal 溶液在-20℃或 4℃保存会冻结，使用前将 X-Gal 溶液在 37℃加热 1 h 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。
- 细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色反应依赖于特定的 pH 条件，不能在 CO_2 培养箱中进行染色反应。培养箱中较高浓度的 CO_2 会影响 Staining Working Solution 的 pH 值，从而导致染色失败。对于多孔板，可以用封口膜或保鲜膜封住防止蒸发。
- 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。Reagent C 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。配制 Staining Working Solution 时，也可能有少量絮状沉淀出现，震荡混匀后就会完全溶解，且须确保全部溶解后才能使用。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Fixation Buffer	即用型；使用前，平衡到室温。可按需分装至-20℃长期保存，使用前可提前一天放置 4℃。	-20℃保存。
Reagent A	即用型；使用前，平衡到室温。可按需分装至-20℃长期保存，使用前可提前一天放置 4℃。配制 Staining Working Solution 前平衡到室温。	-20℃保存。
Reagent B	即用型，使用前，平衡到室温。	-20℃保存。
Reagent C	即用型，使用前，平衡到室温。	-20℃保存。
X-Gal solution	即用型；使用前，平衡到 37℃ (**将 X-Gal 溶液在 37℃加热 1 h 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)**。	-20℃避光保存。
Staining Working Solution	按 930 µL Reagent A, 10 µL Reagent B,10 µL Reagent C, 50 µL X-Gal solution 的比例混匀试剂。	/

注意：Staining Working Solution 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。

05-2 实验步骤

05-2-1 贴壁细胞

(1) 用 24 孔板接种适量细胞并培养、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 500 μL Fixation Buffer，室温固定 15 min。通常 96 孔板每孔加入 100 μL，48 孔板每孔加入 250 μL，24 孔板每孔加入 500 μL，12 孔板每孔加入 1mL，6 孔板每孔加入 2 mL。

(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 500 μL Staining Working Solution。通常 96 孔板每孔加入 100 μL，48 孔板每孔加入 250 μL，24 孔板每孔加入 500 μL，12 孔板每孔加入 1mL，6 孔板每孔加入 2 mL。

(6) 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜（12-16 h），直到细胞染上蓝色。

注意：用封口膜密封 24 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) 吸除 Staining Working Solution，每孔加入 500 μL 70%乙醇，洗涤 10min。

(8) 吸除 70%乙醇，用 1×PBS 洗涤 2 次。加入 500 μL1×PBS。

(9) 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，加入的 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。

05-2-2 悬浮细胞

(1) 300 g 离心 5 min 收集 1×10^6 个细胞至 1.5 mL EP 管内，并用 1×PBS 洗涤 2 次。

(2) 每管加入 1 mL Fixation Buffer，室温固定 15 min。固定时可以在摇床上缓慢摇动，以避免细胞结成团块。

(3) 800 g 离心 5 min 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 1 mL Staining Working Solution。

(5) 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜（12-16 h），直到细胞染上蓝色。

注意：用封口膜密封 EP 管防止细胞干燥，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。

(6) 800 g 离心 5 min，弃去 Staining Working Solution，每管加入 1 mL 70%乙醇，洗涤 10min。

(7) 800 g 离心 5 min，吸除 70%乙醇，加入 1×PBS，800 g 离心 5 min 弃去上清，洗涤 2 次，每管加入 200 μL1×PBS 重悬细胞。

(8) 取部分染色后的细胞，滴加到载玻片上或 96 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。染色后，加入的 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。

05-2-3 组织冰冻切片

(1) 对于准备好的组织切片，加入适当体积的 Fixation Buffer，以充分盖住组织为宜，室温固定 15 min。

(2) 用 1×PBS 浸泡洗涤组织 3 次。

(3) 吸除 1×PBS，加入适量的 Staining Working Solution。

注意：为了防止液体蒸干，建议放到避光湿盒中染色，最好把整个切片浸泡在染色工作液中。

(4) 在无 CO_2 的 37℃培养箱中孵育过夜（12-16 h），直到细胞染上蓝色。

(5) 吸除 Staining Working Solution，用 70%乙醇浸泡洗涤组织 10min。

(6) 吸除 70%乙醇，用 1×PBS 浸泡洗涤组织洗涤 2 次。

(7) 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。

06 结果示例

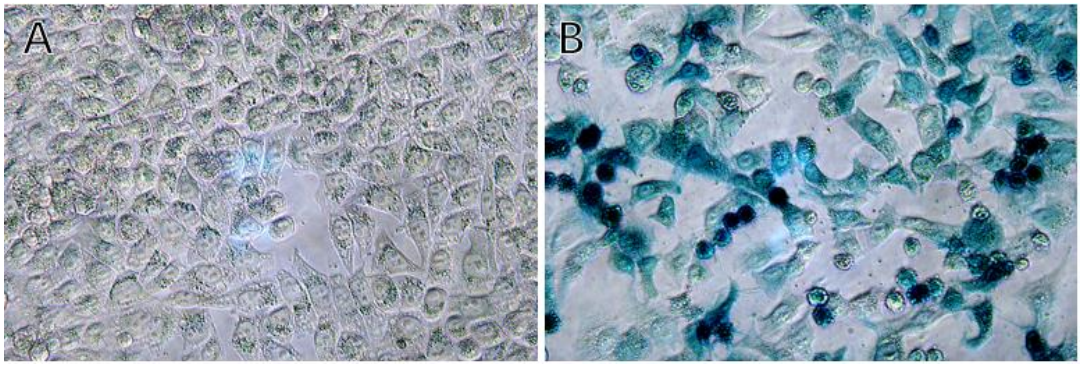


Figure 1. Hela 细胞用细胞衰老检测试剂盒(β-半乳糖苷酶法)染色。A: 正常 Hela 细胞, β-半乳糖苷酶活性阴性; B: 转染 pCMV-β-gal 的 Hela 细胞，显示 β-半乳糖苷酶活性阳性蓝色信号。

07 FAQ

1．有结晶应该如何处理?

添加染色工作液后，如因溶剂蒸发或其他原因析出结晶，影响显微观察与拍照，可吸除染色液，用 70%乙醇短时间处理溶解结晶，结晶溶解后替换成 PBS。70%乙醇洗涤不会对染色效果造成影响。若仍有结晶析出，可再使用 70%乙醇短时处理溶解结晶；待结晶完全消除后替换成 PBS。

2．染不上色有哪些原因?

需要确认造模是否成功，摸索合适的细胞衰老诱导条件，优化处理时间、药物浓度等等;

3．为什么不能在二氧化碳培养箱中孵育过夜呢?

细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色反应依赖于特定的 pH 条件。用于细胞培养的二氧化碳培养箱中较高浓度的二氧化碳会影响染色工作液的 pH 值，而导致染色失败。

08 相关产品

货号	试剂盒名称
KTA2010	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2011	一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（红色荧光）
KTA2030	EdU 法细胞增殖成像/流式检测试剂盒（绿色荧光）
KTA2031	EdU法细胞增殖成像/流式检测试剂盒（橙色荧光）
KTA0002	Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒
KTA0006	Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

即用型细胞衰老检测试剂盒（β-半乳糖苷酶法）

（Abbkine 货号：KTA3031）



Staining Working Solution:	
Reagent A	930 μL
Reagent B	10 μL
Reagent C	10 μL
X-Gal solution	50 μL