

细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
冰冻切片机	赛默飞世尔科技有限公司	HM525NX
防脱载玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0510
高品质盖玻片	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0531
正置显微镜	奥林巴斯有限公司	CX-31
成像系统	日本滨松光子学株式会社	NanoZoomer®S360

2、主要试剂及货号

名称	厂家	型号
OCT 包埋剂	日本樱花 SAKURA	
环保封片剂	武汉同声科技	
细胞衰老 β -半乳糖 苷酶染色试剂盒	湖北百奥斯生物科技有限公司	
PBS 粉剂	湖北百奥斯生物科技有限公司	BP0170

二、实验步骤

贴壁细胞:

- 1、对于 6 孔板中培养的细胞，吸除细胞培养液，用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次，加入 1 毫升 β -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 分钟。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。
- 2、吸除细胞固定液，用 PBS 或 HBSS 洗涤细胞 3 次，每次 3 分钟。
- 3、吸除 PBS 或 HBSS，每孔加入 1 毫升染色工作液。染色工作液的配制方法参考表 1。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

表 1. 染色工作液的配置方法

组分	体积
β -半乳糖苷酶染色液 A	10 μ l
β -半乳糖苷酶染色液 B	10 μ l
β -半乳糖苷酶染色液 C	930 μ l
X-Gal 溶液	50 μ l

4、37°C 孵育过夜，可以用 parafilm 或保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发。注意：37°C 孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。

5、普通光学显微镜下观察。如不能及时观察计数，可以除去染色工作液，加入 2 毫升 PBS，4°C 可以保存数天；或加上封片液封片后，4°C 可以保存较长时间。

注：如果有结晶形成，请参考注意事项中的建议使用 70%乙醇进行洗涤处理。

悬浮细胞：

1、离心收集细胞至 1.5ml 离心管内，用 PBS 或 HBSS 洗涤 1 次，加入 1 毫升 β -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 分钟。固定时可以在摇床上缓慢摇动，以避免细胞结成团块。

2、离心，吸除细胞固定液，用 PBS 或 HBSS 洗涤细胞 3 次，每次 3 分钟。

3、离心，吸除 PBS 或 HBSS，每管加入 0.5-1 毫升染色工作液。染色工作液的配制方法参考表 1。

4、37°C 孵育过夜。注意：37°C 孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。

5、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。如不能及时观察计数，可以离心，去除染色工作液，然后加入 1 毫升 PBS，4°C 可以保存数天。如果离心，取细胞用于涂片，加上封片液封片后，4°C 可以保存较长时间。注：如果有结晶形成，请参考注意事项中的建议使用 70%乙醇进行洗涤处理。

组织切片：

1、冰冻切片在染色前进行复温，加入适当体积的 β -半乳糖苷酶染色固定液，以

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司

武汉长衍病理科技有限公司

充分盖住组织为宜，室温固定不少于 15 分钟。

- 2、用 PBS 浸泡洗涤组织 3 次，每次不少于 5 分钟。
- 3、吸除 PBS，加入适当量的染色工作液。染色工作液的配制方法参考表 1。
- 4、37°C 孵育过夜，可以用 parafilm 或保鲜膜封住防止蒸发。最好把整个切片浸泡在染色工作液中。注意：37°C 孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。
- 5、普通光学显微镜下观察。如不能及时观察，加上封片液封片后 4°C 可以保存较长时间。注：如果有结晶形成，请参考注意事项中的建议使用 70%乙醇进行洗涤处理。
- 6、可以用核固红进行染核。

三、结果判读

衰老细胞呈深蓝色，细胞核呈红色。

四、注意事项

- 1、加入染色工作液后，由于溶液蒸发或其它未知原因等因素，可能会有结晶形成而影响观察和拍摄照片，此时建议吸除染色工作液，加入适量 70%乙醇进行洗涤，70%乙醇可在短时间内溶解结晶，待结晶溶解消失后再更换成 PBS 或生理盐水。70%乙醇的洗涤对染色效果没有任何影响。
- 2、在石蜡包埋的过程中，温度、固定液等因素可能会导致 β -半乳糖苷酶失活，从而造成染色失败，因此本实验不建议用于石蜡切片的衰老检测。如果一定要用于石蜡切片的检测，建议自行对实验条件进行一定的优化。
- 3、 β -半乳糖苷酶染色固定液对人体有毒、有腐蚀性，操作时请特别小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 4、X-Gal 溶液在 -20°C 或 4°C 保存会冻结，室温或 37°C 水浴 2-5 分钟并适当摇动即可完全融解。
- 5、细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色反应依赖于特定的 pH 条件，不能在二氧化碳培养箱中进行染色反应。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。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

6、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。 β -半乳糖苷酶染色液 B 刚从试剂盒中取出时，管底可能存在少量沉淀，属正常现象，充分混匀或 Vortex 后，沉淀会全部溶解，并须确保在全部溶解后使用。配制染色工作液时，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。

7、使用 96 孔板等多孔板进行检测时，如果孵育过夜容易产生所谓的“边缘效应”(edge effect)，即多孔板四周的孔由于和外界最直接接触，易受外界环境影响，其中最明显的是四周细胞培养孔的蒸发效应。边缘效应会导致细胞生长不均匀、细胞分布不均一、培养液体积不一致、培养液中相关成分的浓度、pH 值不一致。建议采取以下方法避免 96 孔板等多孔板的边缘效应：避免孵育过长时间，以避免蒸发等带来的边缘效应；弃用边缘孔并在弃用的边缘孔中加入等量的水、PBS 或其他适当溶液；在多孔板非孔的凹陷处加入适量的水或其他适当溶液；将整块板放在湿盒中；使用防挥发盖；在实验设计时，实验样品最好进行随机分配，不要将某一组样品固定放在某个位置而引入可能的系统性误差。