

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
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432c
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
移液枪	Dragon	KE0003087/KA0056573
正置显微镜	日本尼康	ci-s
成像系统	日本尼康	Ds-Fi3

2. 主要实验试剂

试剂	厂家
β -半乳糖苷酶试剂盒	陕西依科生物技术有限公司
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术有限公司
甘油封片剂	陕西依科生物技术有限公司

二、 β -半乳糖苷酶染色实验原理及步骤

实验原理 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色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。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。此时细胞仍然是存活的，但细胞的基因和蛋白的表达谱发生了很大改变。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)。细胞衰老也被认为是生物体抑制肿瘤的一种方式，同时也是生物体老化 (aging) 的一种潜在原因。染色中以 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 为底物，在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下，半乳糖苷键被水解生成深蓝色产物，光学显微镜下很容易观察到变成蓝色的表达 β -半乳糖苷酶的细胞或组织。

β -半乳糖苷酶染色实验步骤：

1. **固定** 对于 6 孔板中培养的细胞，吸除细胞培养液，用 PBS 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；

2. **洗涤：**吸除细胞固定液，用PBS洗涤细胞3次，每次3分钟；
3. **加工作液：**每孔加入 1 毫升染色工作液； 37℃孵育过夜，可以用 parafilm 或保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发。注意：37℃孵育不能在二氧化碳培养箱中进行；
4. **水洗、封片：**吸掉工作液，加入 70%酒精洗 2min，然后用 PBS 洗 3min，甘油封片。

三、染色结果判读：衰老细胞呈深蓝色。