组织衰老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
冰切机	赛默飞	NX50
OCT 包埋剂	樱花	4583
载玻片	陕西依科生物技术有限公司	YK116
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	货号
β-半乳糖苷酶试剂盒	碧云天	C0602
PBS 缓冲液	陕西依科生物技术有限公司	BF002
甘油	国药集团化学试剂有限公司	40025860

二、β-半乳糖甘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-半乳糖甘酶染色实验步骤：

1. **冰冻切片复温固定：**冰冻切片从-80℃拿出来放室温，复温 30min，PBS 清洗 2 遍，每次 5min，加 β-半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 分钟；
2. **洗涤：** 弃掉固定液，用PBS洗涤细胞3次，每次3分钟；
3. **加工作液:**每张加 1 毫升染色工作液； 37℃孵育过夜，可以用 parafilm 或保鲜膜封住，防止干片。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;
5. **核固红染色:**核固红染液孵育 3min 后，水洗。
6. 甘油封片。

三、染色结果判读：衰老细胞呈深蓝色,细胞核呈红色。