

## Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green)

产品编号	产品名称	包装
C0607S	Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green)	200次
C0607M	Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green)	1000次

### 产品简介:

- 碧云天的Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green), 即Senescence-Tracker™ Green Fluorescence Staining Kit with SA-Green, 是一种使用SA-Green绿色荧光探针特异性地检测细胞内衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(Senescence-associated  $\beta$ -gal, SA- $\beta$ -gal)的活性, 从而特异性识别衰老细胞的高灵敏度荧光检测试剂盒。本试剂盒既可用于活细胞染色, 也可用于固定细胞或组织冰冻切片的染色。根据所检测的样品, 可使用荧光显微镜、流式细胞仪、荧光酶标仪等荧光检测系统进行检测。
- 绝大多数正常细胞被认为仅具备有限的分裂能力, 在停止分裂后就会逐渐进入衰老(Senescence)状态。此时细胞仍然是存活的, 但细胞的RNA的转录谱和蛋白表达谱发生了巨大改变。衰老细胞不能再发生有丝分裂, 并且衰老细胞的细胞周期分布也比较特殊, 不同于某些损伤诱导的细胞休眠(Dormancy), 也不同于细胞生长接触抑制产生的细胞静默(Quiescence)。细胞衰老也被认为是生物体抑制肿瘤的一种方式, 但累积的衰老细胞同时也是生物体老化(Aging)的直接原因[1, 2]。追踪衰老细胞通常依赖于检测衰老细胞的标记物和表型特征, 如SA- $\beta$ -gal、细胞周期抑制蛋白p16和p21、衰老相关分泌表型(Senescent associated secretory phenotype, SASP)等[3-5]。其中, SA- $\beta$ -gal是最为广泛接受和使用的细胞衰老生物标志物。
- SA-Green染色活细胞时, 可以进入细胞膜后, 在SA- $\beta$ -gal的酶促反应下迅速产生荧光, 最终可固定在细胞内的蛋白质上而滞留在细胞内。SA-Green被SA- $\beta$ -gal催化后的产物的最大激发波长约为530nm, 最大发射波长约为550nm, 实际检测时可以采用常见的检测绿色荧光的参数设置, 或自行适当优化检测波长。
- **本试剂盒检测特异性强、灵敏度高。**本试剂盒能够检测低水平的SA- $\beta$ -gal活性, 能兼容衰老早期细胞等SA- $\beta$ -gal酶活性较低的情况, 且能够特异性识别SA- $\beta$ -gal, 确保检测的高灵敏度和准确性。
- **本试剂盒可用于活细胞检测, 操作简单, 使用方便。**常规的 $\beta$ -gal检测法方法是基于 $\beta$ -gal催化X-gal生成深蓝色产物, 如碧云天的细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(C0602)、溶酶体 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(C0605)。类似的基于X-gal显色的细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒方法都无法进行活细胞或活体检测。本试剂盒使用的SA-Green是一种细胞膜通透性荧光探针, 可以对活细胞进行荧光染色, 并且可与其它活细胞荧光染色方法结合使用。使用时, 只需进行简单孵育, 就可实时检测活细胞的衰老。本试剂盒同样也适用于固定细胞或冰冻组织切片的染色。碧云天还提供一种新型的可用于体内或体外、高亮度、高稳定性、高特异性、高生物安全性并快速便捷地检测衰老细胞的近红外荧光探针Senescence-Tracker™衰老细胞近红外荧光探针(C0603)。
- 对于活细胞检测, 本试剂盒同时提供了Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)和SAup (1000X)。其中Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor可抑制活细胞中内源性非衰老相关的 $\beta$ -gal活性, 可在抑制背景的基础上特异地检测出衰老特异性 $\beta$ -gal的活性。SAup是一种诱导细胞衰老的阳性对照试剂。两者的终浓度通常为0.5-2X, 最优先的推荐终浓度为1X。
- 本试剂盒对衰老细胞的检测效果请参考图1、图2和图3。

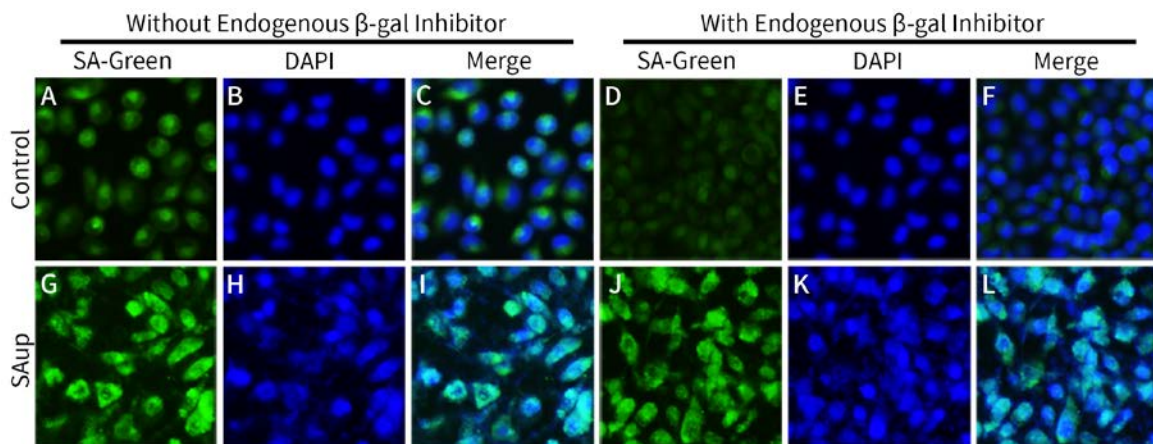


图1. 碧云天Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green) (C0607)对L929细胞的染色效果图。正常(Control)和经细胞衰老诱导试剂(SAup)诱导的L929细胞的检测效果如上图所示。L929正常细胞内部也存在内源性 $\beta$ -半乳糖苷酶(图A), 经Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor处理, 内源性 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性有一定降低(图D)。经SAup处理, 衰老细胞内衰老特异性 $\beta$ -半乳糖苷酶表达有显著提升, 使用SA-Green进行检测, 荧光强度明显增强(图G、J)。蓝色荧光为DAPI染色的细胞核。实际检测效果

会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

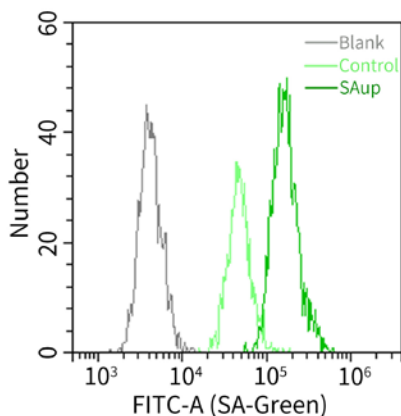


图2. 碧云天Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green) (C0607)对HeLa细胞的流式检测效果图。正常(Control)和经细胞衰老诱导试剂诱导(SAup)的HeLa细胞的固定染色后检测效果如上图所示，流式细胞仪检测通道为FITC (Ex/Em=488/525)。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

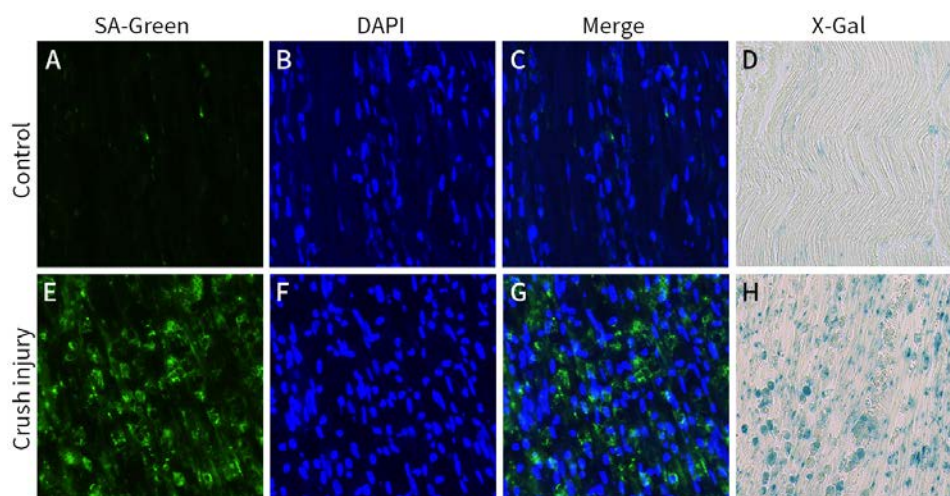


图3. 碧云天Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green) (C0607)染色大鼠坐骨神经(Sciatic nerve)冰冻切片的效果。图A为大鼠正常坐骨神经染色；图E为经过挤压损伤(Crush injury)的坐骨神经部位染色，衰老细胞明显增多。图A和E的染色效果与使用细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒(C0602)染色的效果(图D、H)一致。蓝色荧光为DAPI染色的细胞核。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 对于细胞样品，按照96孔板中的样品每孔使用100μl SA-Green染色工作液计算，本试剂盒小包装和中包装分别可以检测200和1000个样品；对于组织冰冻切片样品，按照每个切片需要50μl SA-Green染色工作液计算，本试剂盒小包装和中包装分别可以检测400和2000个样品；按照6孔板中的样品每孔使用1ml SA-Green染色工作液计算，本试剂盒小包装和中包装分别可以检测20和100个样品。

**包装清单：**

产品编号	产品名称	包装
C0607S-1	SA-Green (1000X)	20μl
C0607S-2	Endogenous β-gal Inhibitor (1000X)	40μl
C0607S-3	SAup (1000X)	10μl
C0607S-4	Assay Buffer	20ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C0607M-1	SA-Green (1000X)	100μl
C0607M-2	Endogenous β-gal Inhibitor (1000X)	200μl
C0607M-3	SAup (1000X)	50μl
C0607M-4	Assay Buffer	100ml
—	说明书	1份

## 保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中SA-Green (1000X)须避光保存。

## 注意事项：

- 对于组织样品的检测，本试剂盒仅可用于冰冻切片样品，不可用于石蜡切片样品。
- 初次使用解冻后各试剂可酌情适当分装，尽量避免反复冻融。
- 对于微量的液体，每次使用前先离心数秒钟，使液体充分沉降到管底。
- 对于细胞染色，建议染色完成后立即进行观测；如果条件限制，请避光4°C保存，并在24小时内进行检测，放置时间过久可能会导致荧光部分猝灭。
- Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)和SAup (1000X)仅用于活细胞的染色，而Assay Buffer仅用于固定细胞或组织的染色。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明：

### 1. 溶液配制。

- a. SA-Green染色工作液的用量。对于6、12、24、96孔板，每孔的SA-Green染色工作液分别为1ml、0.5ml、200 $\mu$ l和100 $\mu$ l；对于流式细胞样品，每个样品的SA-Green染色工作液为0.5ml；对于切片，可以根据切片大小，每个切片使用50 $\mu$ l的SA-Green染色工作液。

- b. SA-Green染色工作液(SA-Green Staining Solution)的配制。

按照96孔板每孔100 $\mu$ l SA-Green染色工作液的体系，参考下表配制适量的SA-Green染色工作液，充分混匀。

#### (a) 对于活细胞染色：配制SA-Green染色工作液A。

根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出SA-Green染色工作液A的总体积。取一定量SA-Green (1000X)和Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)分别按照1:1000的比例加入到完全培养液或HBSS (C0218/C0219)、PBS (C0221B)等合适的溶液中，使最终浓度为1X。例如取1 $\mu$ l SA-Green (1000X)和1 $\mu$ l Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)加入到1ml完全培养液中，混匀后即为1ml SA-Green染色工作液A。如果需要染色细胞核，可以同时将Hoechst 33342 (C1027/C1028/C1029)等适当的细胞核染色液按一定比例加入SA-Green染色工作液A中。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
SA-Green (1000X)	0.1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Endogenous $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)	0.1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Culture medium	100 $\mu$ l	1ml	10ml
<b>SA-Green Staining Solution A</b>	<b>~100<math>\mu</math>l</b>	<b>~1ml</b>	<b>~10ml</b>

#### (b) 对于固定细胞或冰冻切片样品的染色：配制SA-Green染色工作液B。

根据样品数量和每个样品所需工作液的体积，计算出SA-Green染色工作液B的总体积。取一定量SA-Green (1000X)按照1:1000的比例加入到Assay Buffer中，使最终浓度为1X。例如取1 $\mu$ l SA-Green (1000X)加入到1ml Assay Buffer中，混匀后即为1ml SA-Green染色工作液B。

Reagent	1 Sample	10 Samples	100 Samples
SA-Green (1000X)	0.1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Assay Buffer	100 $\mu$ l	1ml	10ml
<b>SA-Green Staining Solution B</b>	<b>~100<math>\mu</math>l</b>	<b>~1ml</b>	<b>~10ml</b>

注1：SA-Green染色工作液A或者B须现配现用。

注2：染色工作液中SA-Green的最终浓度需根据不同细胞和冰冻切片实验体系通过预实验进行优化。SA-Green的推荐工作浓度为1X，可以在0.2-4X范围内摸索最佳工作浓度，通常组织冰冻切片样品的工作浓度可能需要适当提高。但为降低非特异性荧光染色，在染色效果可以接受的范围内，建议尽量使用较低浓度的SA-Green。

注3：衰老细胞中可能会积累一些具有自发荧光的不溶性物质，从而导致更高的荧光背景，建议同时设置一组无SA-Green染色工作液的空白对照。

注4：Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor的终浓度通常为0.5-2X，最优先的推荐终浓度为1X。

- c. Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor工作液的配制：取一定Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)按照1:1000的比例加入到完全培养液中，使最终浓度为1X。例如取1 $\mu$ l Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor (1000X)加入到1ml完全培养液中，混匀后即为1ml Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor工作液。

注：Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor的终浓度通常为0.5-2X，最优先的推荐终浓度为1X。

### 2. 活细胞衰老阳性对照的设置(选做)。如下方法实测对于L929和Hela细胞有效，其余细胞请自行尝试和摸索。

- a. 1X SAup溶液的配制。取一定SAup (1000X)按照1:1000的比例加入到无血清培养液中，使最终浓度为1X。例如取1 $\mu$ l SAup (1000X)加入到1ml无血清培养液中，混匀后即为1ml 1X SAup溶液。
- b. 每孔加入一定量1X SAup溶液，置于细胞培养箱中培养3天。
- c. 除去上清液，PBS洗涤细胞1次。

d. 加入完全培养液, 置于细胞培养箱中继续培养3天, 随后可进行检测。

注1: SAup的终浓度通常为0.5-2X, 最优的推荐终浓度为1X。对于特定的细胞, SAup作用浓度和作用时间可能有所不同, 需自行摸索最佳工作浓度和作用时间, 甚至某些细胞可能对SAup不敏感。

注2: 阳性对照(SAup)仅用于作为阳性对照的样品, 并不是在每个样品中都需加入阳性对照(SAup)。

### 3. 贴壁活细胞染色。

a. 将贴壁细胞种于细胞培养皿、多孔细胞培养板或者细胞爬片上。

b. 吸除细胞培养液, 用HBSS或PBS洗涤细胞1次。

c. 加入适当体积的Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor工作液。

d. 37°C孵育细胞1小时。

e. 吸除Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor工作液, 用HBSS或PBS洗涤细胞1次。

f. 缓慢加入适当体积的步骤1b (a)配制的SA-Green染色工作液A, 轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞。

g. 37°C避光孵育细胞0.5-1小时, 不同的细胞最佳培养时间不同。以0.5小时作为初始孵育时间, 根据实际所用的细胞优化染色时间, 以得到最佳的荧光染色效果。

h. 吸除SA-Green染色工作液A, 用HBSS或PBS洗涤2-3次, 然后加入HBSS、PBS或细胞培养液即可在荧光显微镜下观察, 或使用荧光酶标仪检测。

注1: 如果使用流式细胞仪检测, 可以消化收集细胞, PBS重悬后进行检测。

注2: 如果细胞贴壁不太好, 各溶液加入时请沿着孔板壁缓慢加入, 然后轻轻晃动培养器皿, 以避免细胞被冲散。

注3: 荧光酶标仪检测时需要考虑检测到检测时的细胞数量。如果接种后需要培养一段时间或药物处理时间比较长, 则需要适当降低接种细胞数量。细胞数量过多或过少, 都可能影响荧光酶标仪的检测效果, 其它相关条件也可能需要进行一些优化。

### 4. 悬浮活细胞染色。

a. 加入适当体积的Endogenous  $\beta$ -gal Inhibitor工作液重悬细胞, 使其密度为100-2000万/ml左右。

b. 37°C孵育细胞1小时。

c. 600×g 4°C离心3-4分钟。

d. 吸除上清液, 缓慢加入适当体积的SA-Green染色工作液A (步骤1b (a))重悬细胞。

e. 37°C避光孵育细胞0.5-1小时。不同的细胞最佳孵育时间不同。以0.5小时作为初始孵育时间, 根据实际所用的细胞优化染色时间, 以得到最佳的荧光染色效果。

f. 600×g 4°C离心3-4分钟。

g. 吸除上清液, 缓慢加入适量PBS重悬细胞。

h. 重复4f-4g步骤1-2次。

i. 流式细胞仪检测, 或将细胞转移至多孔板、细胞培养皿或者细胞爬片上, 在荧光显微镜下观察。

注: 如果需要在载玻片或盖玻片上粘附悬浮细胞, 可选用碧云天的Poly-D-lysine/多聚赖氨酸(ST508)处理载玻片或盖玻片。

### 5. 固定细胞或组织冰冻切片样品的染色。

a. 使用免疫染色固定液(P0098)或4%多聚甲醛固定液(P0099)进行固定。

注: 由于固定可能会降低 $\beta$ -gal的活性, 请摸索最佳固定液和固定时间。通常可以固定10-30分钟。

b. 吸除固定液, 用PBS洗涤细胞3次。

c. 加入适当体积步骤1b (b)配制的SA-Green染色工作液B, 轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞或样品。

d. 避光孵育0.5小时, 最佳染色时间需要根据实验条件摸索, 以达到最佳的荧光染色效果。

e. 吸除SA-Green染色工作液B, 用PBS洗涤2-3次。

f. 直接在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察, 或使用抗荧光淬灭封片液(P0126)或抗荧光淬灭封片液(含DAPI) (P0131)封片后, 在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

注1: 如果细胞贴壁不太好, 各溶液加入时请沿着孔板壁缓慢加入, 然后轻轻混匀, 以避免细胞被冲散。

注2: 在固定细胞染色孵育过程中请勿使用CO<sub>2</sub>培养箱。若在CO<sub>2</sub>培养箱中进行孵育, 培养箱中的CO<sub>2</sub>可能会影响缓冲液的pH值使其呈酸性, 进而导致内源性 $\beta$ -gal活性的背景升高, 难以区分正常细胞和衰老细胞。

### 6. 参数设置。

检测不同组别细胞荧光的强弱, 通常可使用常见的绿色荧光的参数设置, 例如激发波长为488的荧光通道进行检测。流式细胞检测时的推荐通道为FITC (Ex/Em=488/525)。

### 参考文献:

1. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, et al. Nature. 2016. 530(7589):184-9.
2. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, et al. Nature. 2011. 479(7372):232-6.
3. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Nat Rev Nephrol. 2022. 18(10):611-627.
4. Birch J, Gil J. Genes Dev. 2020. 34(23-24):1565-1576.
5. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods Mol Biol. 2007. 371:21-31.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0602	细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒	>100次

C0603-0.1ml	Senescence-Tracker™衰老细胞近红外荧光探针	10mM×0.1ml
C0603	Senescence-Tracker™衰老细胞近红外荧光探针	1mg/5mg/25mg
C0605	溶酶体β-半乳糖苷酶染色试剂盒	>100次
C0607	Senescence-Tracker™衰老细胞绿色荧光染色试剂盒(SA-Green)	200次/1000次
C2035S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法)	>100次
C2036S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 兔单抗, 红色)	>100次
C2037S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 绿色)	>100次
C2038S	DNA损伤检测试剂盒(γ-H2AX免疫荧光法, 鼠单抗, 红色)	>100次
C2041	彗星电泳试剂盒	20次/100次
D8021	人端粒酶活性检测试剂盒(TERT mRNA探针法)	50次/200次
D8025	人端粒长度染料法qPCR检测试剂盒	50次/200次

Version 2026.03.24