

SA- β -gal - окрашивание стареющих клеток

Артикулы Servicebio: G1073-100T

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Подготовьте световой микроскоп, термостат без подачи CO₂, PBS и подходящие ёмкости для растворов. До начала опыта запишите пассаж, плотность культуры и условия обработки. Продумайте защиту образцов от высыхания и время промежуточного просмотра. Для сравнения групп нужна одинаковая процедура наблюдения.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Выявление активности β -галактозидазы, связанной со старением клеток, при pH 6,0. Продукт реакции X-Gal образует синие отложения в цитоплазме, видимые в световом микроскопе.

Подготовка

Растворите 100 мг X-Gal в 5 мл DMF из набора. На 1 мл рабочего раствора берут 940 мкл раствора А, 10 мкл В и 50 мкл раствора X-Gal. Для приготовления используют полипропилен или стекло, не полистирол.

Адгезивные клетки

Для 6-луночного планшета: дважды промойте клетки PBS; фиксируйте 1 мл фиксатора 15 мин при комнатной температуре. Промойте PBS трижды по 2 мин. Добавьте 1 мл рабочего раствора; выдерживайте при 37 °C в темноте от 2 ч до ночи, регулярно оценивая окрашивание.

Критичные условия

Не используйте CO₂-инкубатор: изменение pH нарушает реакцию. Перед приготовлением проверьте pH раствора А - 6,0. Не допускайте высыхания; слишком длительное окрашивание может давать ложноположительный результат. Для замороженных срезов предусмотрен отдельный протокол.

Хранение

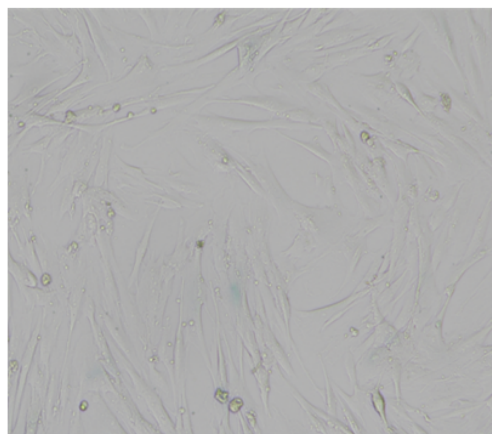
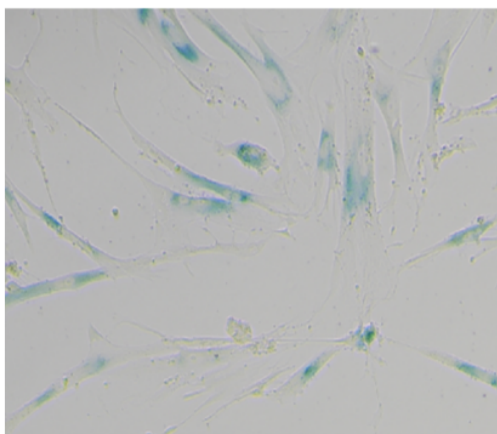
Набор: 2-8 °C, в темноте, 12 месяцев. Приготовленный X-Gal: порционно при -20 °C, до 3 месяцев.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

Предлагаем заранее определить, какие клетки считать положительными и как выбирать поля зрения. Сравнивайте случайно или систематически выбранные поля, а не только наиболее яркие участки. Желательно скрыть обозначения групп от человека, выполняющего подсчёт. Отдельно сохраните исходные фотографии, чтобы позднее можно было проверить отнесение клеток к положительным.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб



Servicebio: окрашивание клеток WI-38. Слева - стареющая культура, справа - клетки ранних пассажей.

Что означает результат

SA- β -gal - один из признаков клеточного старения, но не самостоятельное доказательство необратимого прекращения деления. На сигнал могут влиять плотная культура, контактное торможение, сывороточное голодание и увеличение числа лизосом по другим причинам. Пониженный pH также повышает риск неспецифического результата.

Какие контроли нужны

Включите сопоставимую культуру без исследуемого воздействия и, если она есть, проверенную положительную модель. Для содержательного вывода сопоставляйте окрашивание с данными о пролиферации и другими wybranными признаками старения. Само по себе увеличение размера клеток не заменяет такой проверки.

Если результат вызывает вопросы

Синие клетки есть во всех группах	Проверьте pH, плотность культуры и длительность проявления.
Положительный контроль не окрасился	Проверьте подготовку растворов и сохранность ферментативной активности образца.
Сравниваются только красивые поля	Повторите подсчёт по заранее заданному правилу отбора участков.

Что сохранить в лабораторном журнале

Указывайте число положительных и общее число учтённых клеток, число полей и независимых культур. Например, 36 положительных из 180 учтённых клеток - 20%; это учебный пример подсчёта, не характеристика набора.