

# Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal

## Technical Manual

### はじめに

正常細胞は、分裂を繰り返すことや、酸化ストレス等により DNA に損傷を生じます。損傷 DNA が修復されない場合には、不可逆的に細胞分裂を停止することにより細胞の癌化を抑制します。不可逆的な細胞分裂の停止は細胞老化と呼ばれており、老化細胞には SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) が過剰発現しています。このため、SA-β-gal は、老化マーカーのひとつとしてその判別に汎用されています<sup>1,2)</sup>。本製品は、β-galactosidase と反応し発蛍光する SPiDER-βGal を蛍光基質とし<sup>3)</sup>、マイクロプレートを用い細胞溶解液中の SA-β-gal 量を簡便に測定するキットです。本製品により得られた測定値は、細胞数カウント、タンパク質量測定または核酸量測定などの一般的な手法で補正可能です。



図 1 SA-β-gal の検出操作

### キット内容

	20 tests	100 tests
SPiDER-βGal	1 tube	5 tubes
Lysis Buffer	40 mL×1	100 mL×2
Assay Buffer	1.5 mL×1	7.5 mL×1
Stop Solution	3 mL×1	15 mL×1

### 保存条件

0-5 °C で保存して下さい。

### 必要なもの (キット以外)

- 蛍光プレートリーダー
- 96 穴ブラックプレート
- インキュベーター (37 °C)
- マルチチャンネルピペット (20-200 μL)
- マイクロピペット (100-1000 μL, 20-200 μL)
- Phosphate buffered salts (PBS)
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- コニカルチューブ

### 使用上のご注意

- ・キット中の試薬は、室温に戻してからご使用下さい。
- ・輸送中の振動等により、内容物がスクリーキャップマイクロチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、開封前に内容物を底面に落としてからご使用下さい。
- ・正確な測定値を得るために、ひとつの測定試料につき複数 (n=3 以上) のウェルを使用下さい。
- ・SPiDER-βGal working solution をサンプルに加えると直ちに反応が始まります。各ウェル間のタイムラグによる測定誤差を少なくするためにマルチチャンネルピペットをご使用下さい。

### 溶液調製

#### SPiDER-βGal DMSO stock solution の調製

SPiDER-βGal を含むチューブに DMSO 125 μL を加え、ボルテックスミキサー等により溶解し、SPiDER-βGal DMSO stock solution を調製する。

※チューブ内容物は極少量のため目視では確認できません。DMSO 添加後は、チューブ内が均一になるようボルテックスミキサー等で溶解操作を行って下さい。

※ DMSO stock solution 調製後は冷凍保存 (-20 °C) して下さい (1 カ月間安定)。

#### SPiDER-βGal working solution の調製

SPiDER-βGal DMSO stock solution を Assay Buffer で 10 倍希釈し、SPiDER-βGal working solution を調製する。

※ SPiDER-βGal working solution は保存できません。その日の内にお使い下さい。

※ 96 穴ブラックプレートをご使用の場合、1 ウェルあたり SPiDER-βGal working solution 50 μL が必要です。

### 操作

#### SA-β-gal アッセイ

1. 細胞をプレートもしくはディッシュに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養する。
2. 実験系に合った細胞数補正を行う。  
※細胞数補正について情報をお探しの場合は、弊社テクニカルサポートにお尋ね下さい。
3. 上清を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄する。
4. Lysis Buffer を添加し、室温で 10 分間インキュベートする。  
※実験に用いるディッシュのサイズによって Lysis Buffer の添加量は異なります。表 1 を参照して下さい。

	96-well plate	24-well plate	6-well plate	10 cm dish
Lysis Buffer	50 μL	400 μL	1 mL	1.5 mL

表 1 Lysis Buffer 添加量

5. 細胞溶解液 50 μL を、別途準備した 96 穴ブラックプレートの各ウェルに添加する。

※手順 1. の段階で細胞を 96 穴ブラックプレートに播種された場合は、同一プレート内でのアッセイが可能です。

- SPiDER-βGal working solution 50 μL を各ウェルに添加し、37 °C で 30 分インキュベートする。  
※必要に応じてインキュベーション時間を伸ばして下さい。
- 各ウェルに Stop Solution 100 μL を添加する。
- 蛍光プレートリーダーで測定する (Ex: 500–540 nm, Em: 540–580 nm)。

#### 実験例 1 継代数の違いで老化誘導した WI-38 細胞中の SA-β-gal アッセイ

- 継代数 3 回および継代数 19 回の WI-38 細胞 (  $1 \times 10^4$  cells/well、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地 ) をそれぞれ 96 穴ブラックプレート (透明底) に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養した。
- 細胞数による補正のため、Cell Count Normalization Kit [コード: C544] を使用し核酸染色を行い、蛍光値を測定した。
- 上清を吸引除去し、PBS 100 μL で 1 回洗浄した。
- Lysis Buffer 50 μL を各ウェルに添加し、室温で 10 分間インキュベートした。
- SPiDER-βGal working solution 50 μL を各ウェルに添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。
- 各ウェルに Stop Solution 100 μL を添加した。
- 蛍光プレートリーダーで SPiDER-βGal 由来の蛍光値を測定した (Ex: 535nm, Em: 580 nm)。
- 得られた SPiDER-βGal の蛍光値を核酸染色の蛍光値で補正し、SA-β-gal 量を算出した。

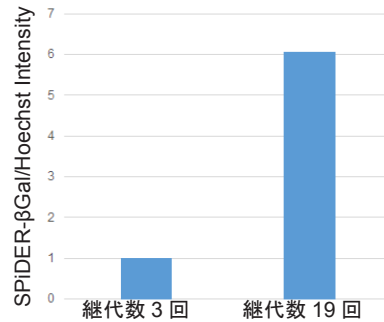


図 2 WI-38 細胞中の SA-β-gal 活性 (プレートアッセイ)

#### 実験例 2 Doxorubicin 処理で老化誘導した WI-38 細胞中の SA-β-gal アッセイ

- 継代数 3 回の WI-38 細胞 (  $1 \times 10^4$  cells/well、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地 ) を 10 cm ディッシュに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養した。
- 培地を吸引除去し、PBS 10 mL で 1 回洗浄後、無血清 MEM 培地で希釈した 0.2 μmol/L の Doxorubicin 溶液 10 mL を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した。
- 上清を吸引除去し、PBS 10 mL で 1 回洗浄後、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地を 10 cm ディッシュに添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 日間培養した。
- Doxorubicin 処理あり、なしの WI-38 細胞 (  $1 \times 10^4$  cells/well、10% fetal bovine serum、1% penicillin-streptomycin を含む MEM 培地 ) をそれぞれ 96 穴ブラックプレート (透明底) に播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養した。
- 細胞数による補正のため、Cell Count Normalization Kit [コード: C544] を使用し核酸染色を行い、蛍光値を測定した。
- 上清を吸引除去し、PBS 100 μL で 1 回洗浄した。
- Lysis Buffer 50 μL を各ウェルに添加し、室温で 10 分間インキュベートした。
- SPiDER-βGal working solution 50 μL を各ウェルに添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。
- 各ウェルに Stop Solution 100 μL を添加した。
- 蛍光プレートリーダーで SPiDER-βGal 由来の蛍光値を測定した (Ex: 535nm, Em: 580 nm)。
- 得られた SPiDER-βGal の蛍光値を核酸染色の蛍光値で補正し、SA-β-gal 量を算出した。

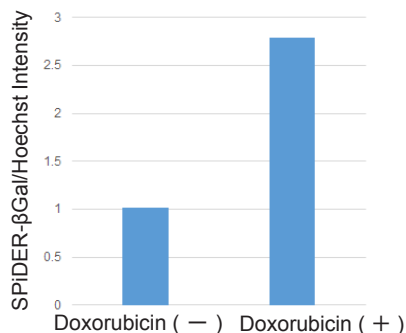


図 3 WI-38 細胞中の SA-β-gal 活性 (プレートアッセイ)

#### 参考文献

- Dimri, G. P. et al., *Cell Biology*, **1995**, 92, 9363–9367.
- Park, A. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **2018**, 293, DOI: 10.1074/jbc.RA118.003310
- Doura, T. et al., *Angew. Chem.*, **2016**, 55, 9620–9624.  
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。