

# 併用プロトコル

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal  
Cell Count Normalization Kit

Technical Manual

## はじめに

老化細胞を 96 ウェルプレートで評価する際には、細胞数に応じた SA-β-gal の変化を確認することで、より信頼性の高い測定値を得ることができます。本プロトコルでは、96 ウェルプレートにて培養した細胞について、小社の Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal [製品コード:SG05] 及び Cell Count Normalization Kit [製品コード: C544] にて評価する際の操作手順を示した 96 穴プレート専用のプロトコルです (96 穴プレート以外はお使いになれません)。本プロトコルでの実験の前に、各製品の取扱説明書に記載された取扱い条件や溶液調製、測定操作を必ずご確認ください。

## 使用製品

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal [製品コード: SG05]  
Cell Count Normalization Kit [製品コード: C544]

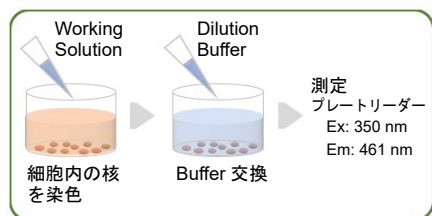
## キット以外に必要なもの

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

## 操作の概要

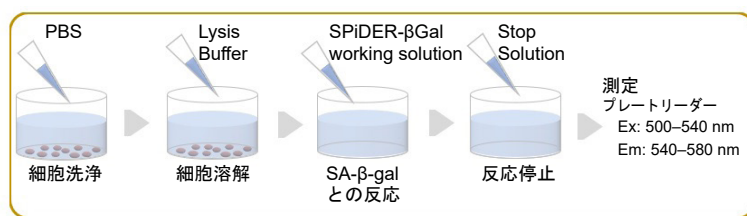
### 細胞数の計測

[製品コード: C544] (培地交換法)



### 老化細胞の検出

[製品コード: SG05]



## 細胞数の計測

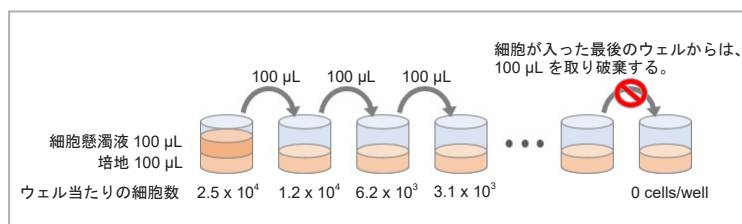
### Cell Count Normalization Kit を使った評価

細胞数計測の際は、段階希釈した細胞による検量線 (X 軸: 細胞数、Y 軸: 蛍光強度) を作成し、細胞数と蛍光強度に直線性がある範囲内の細胞数を事前にご確認ください。確認の際は、細胞をプレートに播種後、老化細胞の評価時と同じ培養時間で培養した細胞をお使いください。

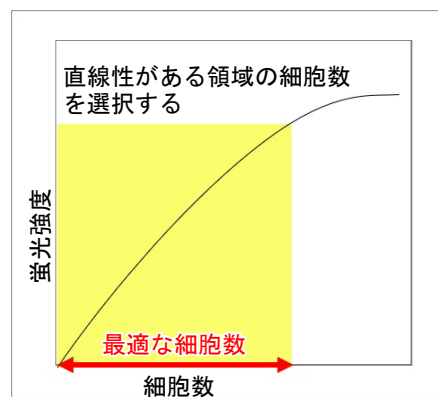
細胞数の目安: 1000-30000 cells/well (付着細胞)、5000-60000 cells/well (浮遊細胞)

### 細胞の段階希釈方法

8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 穴プレートの各ウェルに培地 100 μL を入れる。次に、 $5 \times 10^5$  cells/mL に調製した細胞懸濁液 100 μL を細胞数が最大となるウェルに加えてピペティングする。その後、細胞濃度が半分となった細胞懸濁液 100 μL を次のウェルに移して、同様にピペティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。



### 最適な細胞数の確認方法



得られた蛍光強度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、細胞数と蛍光強度でプロットし直線性がある領域の細胞数を選択する。

## 溶液調製

Staining Solution を Dilution Buffer で 500 倍希釈し Working solution を作成する。

※ Working solution は保存できません。その日のうちにお使いください。

※ 1 ウェル (96 穴プレート) あたり 100  $\mu$ L の Working solution が必要です。

## 測定法

1. 培地に懸濁した細胞 100  $\mu$ L をプレートに播種し、薬剤暴露等の老化誘導を行う。また試薬ブランク<sup>\*1</sup> 測定のため、細胞を含まない培地 100  $\mu$ L をプレートに添加しておく。
2. Working solution を全てのウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加する。
3. 37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 30 分間インキュベートする。
4. 上清全量を取り除き、全てのウェルに Dilution Buffer を 100  $\mu$ L ずつ添加する。
5. 蛍光プレートリーダーで測定する。(Ex: 350 nm, Em: 461 nm)

<sup>\*1</sup> 細胞数を計測する際、細胞を含むサンプルの蛍光強度から試薬ブランクの蛍光強度を差し引く必要があります。試薬ブランクのウェルでは Working solution 添加、上清除去および Dilution Buffer 添加の操作を細胞を含まないウェル中で行ってください。

## 老化細胞の評価

Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER- $\beta$ Gal を使った評価

### 溶液調製

#### SPiDER- $\beta$ Gal DMSO stock solution の調製

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

#### SPiDER- $\beta$ Gal working solution の調製

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

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

※ウェル (96 穴プレート) あたり SPiDER- $\beta$ Gal working solution 50  $\mu$ L が必要です。

## 測定法

1. 「細胞数の計測」の操作 5 で測定したプレート中の上清を除去し、PBS で 1 回洗浄する。
2. Lysis Buffer 50  $\mu$ L を添加し、室温で 10 分間インキュベートする。
3. SPiDER- $\beta$ Gal working solution 50  $\mu$ L を各ウェルに添加し、37 °C で 30 分インキュベート<sup>\*1</sup> する。
4. 各ウェルに Stop Solution<sup>\*2</sup> 100  $\mu$ L を添加する。
5. 蛍光プレートリーダーで測定する (Ex: 500–540 nm, Em: 540–580 nm)。

<sup>\*1</sup> コントロール細胞と老化細胞の SA- $\beta$ -gal 活性の差がみられない場合は、インキュベーション時間を長く (30 分から一晩まで) してください。

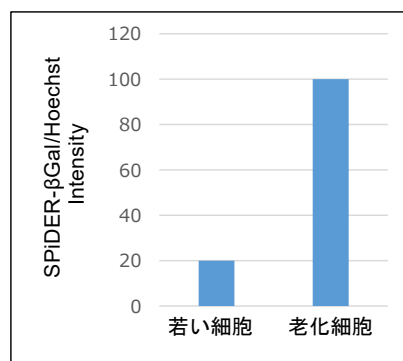
<sup>\*2</sup> Stop solution を添加すると反応が止まります。最適なインキュベーション時間決定後に Stop solution をお使い下さい。

## 老化細胞の算出

老化細胞の評価で得られた SPiDER- $\beta$ Gal の蛍光値を、細胞数の計測で得られた核酸染色の蛍光値で補正し、細胞数に応じた SA- $\beta$ -gal 活性を算出する。

### SPiDER- $\beta$ Gal の蛍光強度 [「老化細胞の評価」で得られた測定値]

$$\text{細胞数に応じた SA-}\beta\text{-gal 活性 (SPiDER-}\beta\text{Gal/Hoechst Intensity)} = \frac{\text{細胞数に応じた SPiDER-}\beta\text{Gal の蛍光強度 (細胞含む) - 試薬ブランクの蛍光強度 (細胞なし)}}{\text{細胞数に応じた核酸染色の蛍光強度 (細胞含む) - 試薬ブランクの核酸染色の蛍光強度 (細胞なし)}}$$



細胞数補正後の老化細胞検出例

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。  
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 会社同仁化学研究所  
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5  
熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202  
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: www.dojindo.co.jp

ドージン・イースト (東京)  
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012  
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
フリーダイヤル : 0120-489548  
フリーファックス : 0120-021557