

## **MTT Cell Proliferation Assay Kit**

## **MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒**

**Cat NO.40206**

### **产品说明书**

**本产品仅作科研用途!**

## MTT Cell Proliferation Assay Kit

### MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
MTT Cell Proliferation Assay Kit	40206ES76	500 T
MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	40206ES80	1000 T
	40206ES90	5000 T

#### 产品描述

噻唑兰 (*Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide*, MTT), 也称作溴化噻唑蓝四氮唑, 是一种黄色染料, 已经普遍替代传统的台盼蓝染色法或者放射性同位素插入法, 用来检测细胞的活力, 细胞增殖以及细胞毒性分析。检测原理在于: MTT 是一种可接受氢离子的化合物染料, 带正电荷, 具有细胞膜渗透性。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能够将外源进入的 MTT 还原成为水不溶性的深蓝色 MTT-甲臜结晶, 而死细胞不具有此功能。甲臜结晶是不能穿透细胞膜, 因此沉积在处于增殖且未受损伤的细胞内。甲臜结晶可用 DMSO 或者酸化的异丙醇溶解出来, 酶标仪下测定 570 nm 的吸光度反映甲臜的生成量。而甲臜的生成量与活细胞数目成正比, 用以评估细胞存活状况。

本试剂盒以 MTT (高纯度) 作为指示剂, 在经典操作步骤的基础上, 采用独特的甲臜溶解液配方, 可以直接溶解甲臜沉淀, 无需去除原有的培养液。从而避免因去除培养液时甲臜被部分去除而引起的操作误差。具有本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 操作简单等特点。另外, 本试剂盒还提供配套的一次性针头过滤器和注射器, 为实验带来更多的便利。

#### 产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		40206ES76 (500T)	40206ES80 (1000T)	40206ES90 (5000T)
40206-A	MTT 粉末	25 mg	50 mg	250 mg
40206-B	MTT 溶剂	5 mL	10 mL	50 mL
40206-C	甲臜溶解液	50 mL	100 mL	100 mL×5
40206-D	除菌套装	1 包	1 包	1 包

#### 运输和保存方法

冰袋运输。

收到产品后, 取出除菌套装室温保存, 其他组分 4℃ 保存。甲臜溶解液也可以放到室温保存。一年有效。

#### 注意事项

- 1) 甲臜溶解液具有腐蚀性和毒性, 使用时注意防护。
- 2) MTT 有致癌性, 应小心操作; MTT 溶液需要无菌, 因其对菌很敏感。MTT 溶液不可 4℃ 保存超过 1 周, 因其可能发生降解, 导致检测结果错误。
- 3) MTT 法只能用来检测细胞相对数和相对活力, 但不能测定细胞绝对数。在用酶标仪检测结果的时候, 为了保证实验结果的线性, MTT 吸光度最好在 0-0.7 范围内。
- 4) 使用微孔板进行检测, 如果细胞培养时间比较长, 需要注意蒸发的问题。一般情况, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 建议弃用周围一圈的方法, 改加 PBS, 水或者细胞培养液等。也可通过将 96 孔板放在靠近培养箱内水源的位置, 以减缓蒸发现象。
- 5) 甲臜溶解液低温或者常温保存可能会产生沉淀, 只需 37℃ 水浴使其充分溶解, 混匀后即可使用。
- 6) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用方法 (以 96 孔板为例)

细胞生长的培养条件会影响检测效果, 因此进行 MTT 检测时需考虑这些条件, 包括: 培养时间, 传代次数以及生长培养基的成分等。一般情况, 48-72 h 培养时间下, 最初铺板的细胞密度可控制在  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$ 。也可根据细胞大小, 增殖速度的快慢来优化最初的细胞铺板密度以及培养时间。

**注意:** 1) 最终检测的培养液内含有酚红会严重影响检测结果。推荐 MTT 检测时细胞培养在无酚红环境下。也可以在 MTT 孵育的时候改用无酚红培养液。2) 每次实验都要设置空白对照孔 (不含细胞)。对于细胞毒性试验, 还要设置未经药物处理的细胞孔, 此对照孔的吸光度范围一般控制在 0.75-1.25 之间; 每个样品孔建议做三个平行。

### A. 实验前试剂准备

#### 1. MTT 溶液

用 5 mL MTT 溶剂直接溶解 25mg MTT 粉末配制成 5 mg/mL 的工作液, 用试剂盒内提供的除菌套装以除去溶液中的细菌, 该溶液可 4°C 避光短时间保存 (越短越好)。建议溶解后, 直接将剩余液体小剂量分装放到 -20°C 保存, 避免反复冻融, 6 个月稳定。

#### 2) 甲臞溶解液 (MTT 终止液)

甲臞溶解液低温或者常温保存可能会产生沉淀, 只需 37°C 水浴使其充分溶解, 混匀后即可使用。

### B. MTT 细胞增殖检测

- 1) 接种细胞: 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的培养液配制成单个细胞悬液, 调整细胞密度, 以每孔  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$  个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100  $\mu\text{L}$ , 培养板的边缘孔用无菌 PBS, 水或者培养液填充。设置空白对照孔 (不含有细胞)。
- 2) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 培养 24-72 h。
- 3) 可选: 对于贴壁细胞, 去除旧的培养液, 更换 100  $\mu\text{L}$ /孔新鲜的培养液 (不含酚红); 对于悬浮细胞, 离心 96 孔板, 去除尽可能多的上清液。然后加入 100  $\mu\text{L}$ /孔新鲜的培养液 (不含酚红) 重悬细胞;
- 4) 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 工作液 (5 mg/mL), 加样时尽量勤换枪头, 控制加量误差。
- 5) 水平摇床上低速混匀 1 min 后, 放入 37°C 培养箱孵育 4h。**注:** 对于高密度的细胞 (>100,000 cells/孔) 可缩短孵育时间至 2 h。
- 6) 对于贴壁细胞, 直接吸掉旧的培养液, 避免枪尖刮破单细胞层。对于悬浮细胞, 离心收集细胞, 去除培养液。
- 7) 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔甲臞溶解液, 用枪充分混匀后放入 37°C 培养箱孵育 4 h。**注:** 更长的孵育时间会降低检测灵敏度。
- 8) 孵育结束, 放置在酶标仪上摇匀后, 选择 570 nm, 测定吸光度。记录结果, 比色以空白调零。如果无 570 nm 滤光片, 可以使用 560-600 nm 滤光片。

**注:** 对于细胞毒性检测, 以未经药物处理细胞的 OD 值为 100%, 然后计算药物处理细胞所占的比率 (x), 公式如下:  
$$\text{OD (未处理细胞)} / \text{OD (药物处理细胞)} = 100\% / x$$
。然后建立直方图。