MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒 C1310

描述：MTT 四唑蓝是一种能接受氢原子的染料，在细胞培养基中可被活细胞的线粒体琥珀酸脱氢酶还原为水不溶性的深紫色结晶状产物 Formazan，但死亡细胞不能进行此还原反应。用特定溶剂溶解 MTT 所产生的水不溶性紫色结晶，然后用酶标仪在 570 nm 波长附近(500~600 nm)测定光吸收值，可反映活细胞的数量和代谢活力，并由此反映出细胞的存活、增殖、生长和毒性等状态。例如，加入细胞生长因子后，增殖生长旺盛的细胞将还原更多的 MTT，并具有较高的光吸收度；反之，抗增殖抗肿瘤或细胞毒药物处理后，细胞生长变慢或毒性变大，光吸收度下降。该方法也可用于检测非药物刺激，如物理因素对细胞增殖和活力的影响。与 3H-胸腺嘧啶掺入方法相比，简便快速可靠，不使用放射性同位素，广泛用于检测细胞存活、增殖、生长、毒性实验[1]。

组成与储存 ：(500 次)

1. MTT Stock: 5 ml，−20℃ 12 个月有效 2. MTT 溶解剂: 50 ml, 室温保存 12 个月有效

所需仪器：酶标仪，96孔培养板。

使用方法：

1. 使用与酶标仪匹配的 96 孔培养板。测定细胞增殖时，建议每孔加 100 微升(约含 2000 个细胞左右)，测定细胞毒性每孔加 100 微升（约含 5000 个细胞左右），应根据所用的细胞类型、增殖速度进行调整。注意设置 2-3 个重复孔，分别为接受处理细胞，未处理细胞对照、无细胞培养基对照。37 ℃ 培养细胞 24-48 小时，然后给予特定的药物或物理因素刺激。
2. 处理结束后，每孔每 100 µl 培养基加入 10µl MTT Stock，37 ℃ 培养箱内继续孵育 4 小时。也可更换 100 µl 新鲜无血清培养基后再加 MTT Stock。 样品数多时，可将 MTT Stock 与培养基预先混合后加入。
3. 溶解：(a) 如果细胞贴壁良好，可吸除培养基，然后每孔加入 100µl MTT 溶解剂，此时应注意保持各孔内液体容积一致。37 ℃ 培养箱内继续孵育 4 小时。

   (b) 如果细胞贴壁不佳吸除培养基会导致 MTT 生成的结晶丢失，在这种情况下，可直接在孔内加入 100µl MTT 溶解剂，注意此时测试孔和对照孔内原有的液体体积应保持一致。37 ℃ 培养箱内继续孵育 4 小时至紫色结晶状 formazan 沉积物全部溶解，可用显微镜进行观察。这一步骤通常需要 2~4 h，但随细胞类型、数量、活力的不同而变化。如未完全溶解应延长孵育时间。当用显微镜观察时，一旦结晶溶解完毕应尽快测定 OD 吸光度值。
4. 在 570nm 测定 OD 吸光度并进行比较计算。如无 570nm 滤光片可用 500-600nm 范围内的滤光片。注意：为准确考虑可在 699 nm 处测定未还原的 MTT 本身的吸光度 OD 值， 然后用 OD_{570} 减去 OD_{699}。这在进行 3(b)操作时尤为必要。
5. 结果判断：细胞增殖或毒性＝100％ x ($OD_{实验}$－$OD_{本底}$) / ($OD_{对照}$－$OD_{本底}$)。

   $OD_{实验}$是接受处理细胞的 OD 值，$OD_{对照}$是未处理细胞对照管 OD 值，$OD_{本底}$是无细胞培养基对照 OD 值。处理后细胞增殖或毒性变化表示为未处理对照的百分数。

DATA INTERPRETATION：

Absorbance values that are lower than the control cells indicate a reduction in the rate of cell proliferation. Conversely a higher absorbance rate indicates an increase in cell proliferation. Rarely, an increase in proliferation may be offset by cell death; evidence of cell death may be inferred from morphological changes.

说明 ：

1. 在进行培养或检测反应时，为避免培养基应蒸发体积减少，可用封口膜部分封闭培养板。
2. 微生物污染将导致测定结果不准确。另外，如果 MTT Stock 由黄色变灰绿色应弃去。MTT Stock 可预先稀释于培养基中配制成工作液，通常在 4℃ 一周内稳定。
3. 对于使用方法的第三步骤，溶解这一步，为了能够更节省时间，可以用 DMSO 来代替 MTT 溶解剂，室温孵育 10 分钟，稍微震荡下就可以检测。
4. 可在非 96 孔板进行 MTT Assay，需要成比例加大反应体系。反应后用比色杯测定 OD。
5. 浓度高于 10%血清将降低灵敏度。使用不含酚红的培养基将使灵敏度提高约 20%。

Reference

1. Mossman, T. (1983) J. Immunol. Methods 65:55.