



简介

MTT

MTT法又称MTT比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法。MTT为黄色化合物,是一种接受氢离子的染料,可作用于活细胞线粒体中的呼吸链,在琥珀酸脱氢酶和细胞色素C的作用下,外源性MT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓚,用酶联免疫检测仪在490nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,MTT结晶形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。它的优点是灵敏度高、经济。缺点是由于MTT经还原所产生的甲瓚产物不溶于水,需被溶解后才能检测。这不仅使工作量增加,也会对实验结果的准确性产生影响,而且溶解甲瓚的有机溶剂对实验者也有损害。而CCK-8试剂盒具有灵敏度高、反应时间短、线性范围宽、数据可靠、重现性好等特点,可以广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验,因此越来越多的实验人员选择CCK试剂盒。

配制方法

MTT法

通常,此法中的MTT浓度为5mg/ml。因此,可以称取MTT 0.5克,溶于100 ml的磷酸缓冲液(PBS)或无酚红的培养基中,用0.22 μ m滤膜过滤以除去溶液里的细菌,放4℃避光保存即可。在配制和保存的过程中,容器最好用铝箔纸包住。

实验步骤

贴壁细胞

- 1、收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入100ul,铺板使待测细胞调密度至1000-10000孔,(边缘孔用无菌PBS填充)。
- 2、5%CO₂, 37℃孵育,至细胞单层铺满孔底(96孔平底板),加入浓度梯度的药物,原则上,细胞贴壁后即可加药,或两小时,或半天时间,但我们常在前一天下午铺板,次日上午加药。一般5-7个梯度,每孔100ul,设3-5个复孔。建议设5个,否则难以反应真实情况
- 3、5%CO₂, 37℃孵育16-48小时,倒置显微镜下观察。
- 4、每孔加入20ulMTT溶液(5mg/ml,即0.5%MTT),继续培养4h。若药物与MTT能够反应,可先离心后弃去培养液,小心用PBS冲2-3遍后,再加入含MTT的培养液。
- 5、终止培养,小心吸去孔内培养液。
- 6、每孔加入150ul二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD490nm处测量各孔的吸光值。
- 7、同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜)

悬浮细胞

- 1、收集对数期细胞,调节细胞悬液浓度 1×10^6 /ml,按次序将①补足的1640(无血清)培养基40ul;②加Actinomycin D(有毒性)10ul用培养液稀释1 g/ml,需预试寻找最佳稀释度,1:10-1:20;③需检测物10ul;④细胞悬液50ul(即 5×10^4 cell/孔),共100ul加入到96孔板(边缘孔用无菌水填充)。每板设对照(加100 (储存液100 1640))。
- 2、置37℃, 5%CO₂孵育16-48小时,倒置显微镜下观察。
- 3、每孔加入10 ul MTT溶液(5 mg/ml,即0.5%MTT),继续培养4 h。(悬浮细胞推荐使用WST-1,培养4 h后可跳过步骤4),直接酶联免疫检测仪OD490nm测量各孔的吸光值)
- 4、离心(1000转x10min),小心吸掉上清,每孔加入100 ul二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD490nm测量各孔的吸光值。
- 5、同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜),每组设定3复孔

【注意事项】

▶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。

▶MTT一般最好现用现配,过滤后4℃避光保存两周内有效,或配制成5mg/ml保存在-20℃长期保存,避免反复冻融,最好小剂量分装,用避光袋或是黑纸、锡箔纸包住避光以免分解。常规一般都把MTT粉分装在EP管里,用的时候现配,直接往培养板中加,没必要一下子配那么多,尤其当MTT变为灰绿色时就绝对不能再用。

▶MTT有致癌性,用的时候小心,有条件最好带那种透明的薄膜手套。配成的MTT需要无菌,MTT对菌很敏感;往96孔板加时不避光也没有关系,毕竟时间较短,或者你不放心的时候可以把操作台上的照明灯关掉。

▶配制MTT时用PBS溶解,也有人用生理盐水配,60℃水浴助溶。