

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：(实验) SOP-3.13

版次：01

MTT 比色法标准操作规程		修订年份：2012 年
修 订 人：潘傅晶	审 核 人：	批 准 人：
修订日期：2012.9	审核日期：	批准日期：
颁发部门：	分发部门：	生效日期：

MTT 比色法标准操作规程

1. 目的及原理

MTT 比色法是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 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。

2. 适用范围：本实验方法适用于细胞实验人员进行 MTT 比色法的各项操作。

3. 人员职责：

4. 器材仪器试剂

各型号的移液枪及枪头、96 孔板、细胞计数器、排枪、V 型槽、混匀仪、酶联检测仪、倒置显微镜、PBS 溶液、胰蛋白酶溶液、完全培养基、需要研究的药物、CO₂ 培养箱等。

5. 操作步骤（对于贴壁细胞）

5.1 收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，在 96 孔板中每孔加入 100ul,铺板使待测细胞调密度至 1000-10000 孔，（边缘孔用不含细胞的培养液或 PBS 填充）。

5.2 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，一般前一天铺板，次日加药。一般 9 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

5.3 5%CO₂，37℃孵育 16-48 小时，倒置显微镜下观察。

- 5.4 每孔加入 10ulMTT 溶液 (5mg/ml, 即 0.5%MTT), 继续培养 4h-24h。
- 5.5 终止培养, 小心吸去孔内培养液。
- 5.6 每孔加入 100ul 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 30min, 使结晶物充分溶解, 同时预热酶联免疫检测仪。在酶联免疫检测仪 OD492nm 处测量各孔的吸光值。
- 5.7 同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砷), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷), 每组设置 1 复孔。
- 5.8 整理原始数据, 提交实验报告。

6. 溶液的配制

6.1 MTT 溶液的配制

通常 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) 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。(我们现在用的 MTT 为 SIGMA 公司生产)

6.2 PBS 溶液的配制

Nacl 8g Kcl 0.2g Na₂HPO₄ 1.44g KH₂PO₄ 0.24g, 调 pH 7.4 , 定容 1L。

6.3 0.25%胰蛋白酶的配制 (我们一般购买配制好的胰蛋白酶溶液)

胰蛋白酶 0.625g, 10×D-Hank's 液 25ml 于双蒸水中溶解, 调 pH 值至 7.4, 定容于 250ml, 4℃ 过夜溶解, 次日以 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, -20℃ 保存备用。

7. 注意事项

7.1 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 0.2-0.8 范围内, 误差较小。

7.2 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 度长期保存, 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。

7.3 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。

7.4 铺板后，向左 3 下，向右 3 下，再往返回复 3 下移动，目的是使得细胞能分散的均匀些。

7.5 复孔的 OD 值差别一般应在 0.1-0.15。

7.6 96 孔板周围的一圈孔全部不用，影响非常大，而且最外一圈一定要加水、PBS 或者培养液，防止蒸发。