

## 细胞增殖检测：MTT 法

MTT 分析法以活细胞代谢物还原剂 3- (4, 5) -dimethylthiazol-4-yl-4-methyl-5-phenyltetrazoliumbromide, MTT 噻唑蓝为基础。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 tetrazolium 环开裂，生成蓝色的 formazan 结晶，formazan 结晶的生成量仅与活细胞数目成正比（死细胞中琥珀酸脱氢酶消失，不能将 MTT 还原）。还原生成的 formazan 结晶可在含 50%的 N, N-二甲基甲酰胺和 20%的十二烷基磺酸钠（pH 4.7）的 MTT 溶解液中溶解，利用酶标仪测定 490 nm 处的光密度 OD 值，以反映出活细胞数目。也可以用 DMSO 来溶解。

MTT 粉末和溶液保存时都需要避光，用铝箔纸包好就可以。实验的时候我一般关闭超净台上的日光灯来避光，觉得这样比较好。

### 一、步骤

#### 1、接种细胞

用含 10%胎小牛血清得培养液配成单个细胞悬液，以每孔 1000 - 10000 个细胞接种到 96 孔板，每孔体积 200ul。

#### 2、培养细胞

同一般培养条件，培养 3 - 5 天（可根据试验目的和要求决定培养时间）。

#### 3、呈色

培养 3 - 5 天后，每孔加 MTT 溶液（5mg/ml 用 PBS 配）20ul.继续孵育 4 小时，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液，对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加 150ul DMSO，振荡 10 分钟，使结晶物充分融解。

#### 4、比色

选择 490nm 波长，在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值，记录结果，以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

## 二、注意事项

- 1、选择适当得细胞接种浓度。
- 2、避免血清干扰：一般选小于 10%的胎牛血清的培养液进行试验。在呈色后尽量吸尽孔内残余培养液。
- 3、设空白对照：与试验平行不加细胞只加培养液的空白对照。其他试验步骤保持一致，最后比色以空白调零。

MTT 实验吸光度最后要在 0-0.7 之间，超出这个范围就不是直线关系，

IC50 是半抑制率，意思是抑制率 50%的时候药物的浓度。把药品稀释成不同的浓度，然后计算各自的抑制率，以药品的浓度为横坐标，抑制率为纵坐标作图，然后得到 50%抑制率时候的药品浓度，就是 IC50。要点：药品 2 倍稀释，多做梯度，做点线图即可！

## 三、举例

各组浓度 0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001、0.000001，稀释倍数为 10，最大浓度为 0.1，抑制率为 0.95、0.80、0.65、0.43、0.21，0.06。代入计算公式：

$$P_m = 0.95$$

$$P_n = 0.06$$

$$P = 0.95 + 0.80 + 0.65 + 0.43 + 0.21 + 0.06 = 3.1$$

$$X_m = \lg 0.1 = -1$$

$$\lg I = \lg 0.1 / 0.01 = 1$$

$$\lg IC_{50} = -1 - 1 * (3.1 - (3 - 0.95 - 0.06) / 4) = -3.6025$$

$$IC_{50} = 0.00025$$

有一个公式可供参考;

$$\lg IC_{50} = X_m - l \cdot (P - (3 \cdot P_m - P_n) / 4)$$

$X_m$ :  $\lg$  最大剂量

$l$ :  $\lg$  (最大剂量/相临剂量)

$P$ : 阳性反应率之和

$P_m$ : 最大阳性反应率

$P_n$ : 最小阳性反应率

抑制率 = 1 - 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值

公式中的最大最小阳性反应率就是最大最小抑制率

例:

用 96 孔板培养 SMMC-7721 肝癌做 MTT 测细胞活力, 应该加多少 1640 培养基, 多少 MTT 和 DMSO 合适? 根据书上说的加 200ul 1640, 20ul MTT, 150ul DMSO 加 DMSO 之前要尽量去掉培养液, 便于 DMSO 溶解甲臞颗粒进行比色测定

一般每孔 4000 个细胞为宜, 既细胞浓度在 20000 个/ml, MTT 加 20ul, 作用四小时后洗掉上清液, 注意不要将甲臞洗掉, 然后每孔加 150ul DMSO, 在脱色摇床上振荡 10 分钟, 然后测吸光值。

一般要低于  $IC_{50}$ , 避免非凋亡性杀伤的细胞太多, 造成流式细胞仪检测碎片太多。我一般用 1/2-1/3 的  $IC_{50}$ , 作用时间为 36h。一般肿瘤细胞系空白处理的调亡率应低于 1%, 用药后一般为 5-10% (Annexin V), 细胞周期的亚 G0 峰比较明显。

## MTT 法心得

MTT 实验是检测细胞活力的实验方法，由于细胞活力与细胞数呈正相关，因此也常常用来检测细胞的增殖情况。

## 一、MTT 的原理

活细胞有琥珀酸脱氢酶，将 MTT 还原成棕褐色沉淀。由于一般介绍园子里已经很多，笔者将自己的心得按照实验流程与大家交流交流。

## 二、MTT 法检测细胞增殖实验的注意事项

### 1、培养好细胞点板

养细胞没啥好说的，如果不知道细胞如何养，那就看看相关的文献方法。如果知道了细胞的名字，就可以上 [www.atcc.org](http://www.atcc.org) 检索细胞的培养信息，这个网站上的培养方法是标准培养方法。当然可以根据自己实验要求进行修改。由于细胞计数很繁琐，点板时的细胞浓度是最难掌握的，这一点笔者的心得如下：

自己先将细胞养一段时间，大概了解细胞的增殖情况，在 MTT 检测时实际上要求细胞大概能长满 96-孔板的 80-90%，如果打算养 48 小时就检测，根据细胞的生长情况反推点板时的细胞浓度状况。这时可以将细胞不进行计数，将消化好的细胞混匀后（可能是 10ml）直接在一个废弃（最好进行过无菌处理）的 96 孔板中依次加入 180、100、50 微升细胞，将细胞放置几分钟就会沉到板底了，这时在显微镜下观察，推测哪个孔的细胞 48 h 能基本长满板底，假设 50 微升的孔比较合适，而点板时没孔需点 200 微升，那么就将细胞浓度再稀释 4 倍就可以正式点板了，这时顺便将细胞进行计数（因为实验记录要求写啊）。这样就 OK 了！如果细胞还太多，将细胞稀释 4 倍后再重复以上操作。注意：不要过分信赖细胞计数，因为细胞计数的取样量为 20 微升左右，由于颗粒的分布不均匀，代表性是很差的。建议：细胞计数一定要会，但不要完全依赖它。

点板时一定要将细胞消化成单个细胞，而且一定要混匀，最好用排枪，否则，MTT 的 SD 会狂大！

## 2、点板布局

其实这一点很多人不懈一顾。如果你的细胞要养 48 h 或更长，建议不要吝嗇 96-孔板的四周边孔，这 32 个边孔不能使用，建议加入灭菌 PBS 以饱和中间 64 个孔的水分。因为细胞培养过程中，边孔的水分蒸发很快，培养液及里面的药物会出现浓缩现象，细胞的状况就复杂了，有些人称之为“边缘效应”；这些孔的 SD 也会狂大，既然如此，不如不用。

## 3、加 MTT

如果确认你考察的药物没有氧化还原性，你可以直接加入 MTT 溶液（总体积的 1/10），如果你没有把握，建议在加 MTT 前换一次液；如果你肯定考察的药物的氧化还原性很强，比如谷胱甘肽、Vit E、VitC，那建议你用 PBS 将细胞洗洗，否则这些药物会将 MTT 还原成棕褐色沉淀，这种效果可能是你不需要的。

## 4、加入 MTT 后的反应

时间为 3-4h，此时弃去各孔中的液体在加入 200 微升的 DMSO。为了将沉淀溶解完全，尽可能将水弃除干净，加入 DMSO 后在摇床上震摇 10min。提醒：如果你的细胞贴壁不好，此时的沉淀在弃去液体时易丢失，因此贴壁不好的细胞在点板时记得将 96 孔板用多聚赖氨酸处理处理，要么在弃液体时先用甩板机离心，再轻轻弃去液体。关于 DMSO 的量，每孔的体积有点儿差异不干扰检测，只要能将沉淀完全溶解就行了。至于 DMSO 的体积差异不同为什么不影响检测值已经被数学证明了，在此我不多说，如果有人不明白我再证明给他看。当然为了养成良好的实验习惯，DMSO 的体积还是一致的好。

## 5、检测 MTT

还原的 MTT 在 460-630 均有较好的吸收，如果你的酶标仪是滤光片，可以选 470 nm 左右或 630 nm 左右的滤光片，如果酶标仪有单波长，你可以在检测前扫描一下吸收谱，选用最大吸收波长检测就是了，最大波长，大概在 550nm 附近，必要时加一个参比波长以扣除非特异性吸收。

## 6、吸收值分析

在理想的 MTT 实验中，如果是细胞抑制实验，不加药物处理组的吸收值应该在 0.8-1.2 左右，太小检测误差占的比例较多，太大吸收值可能已经超出线性范围。这个原理在朗伯-比尔定律中有解释。

## 7、建议

如果你觉得 MTT 中出现的问题不好解决，那么建议你做 CCK-8 实验，原理与 MTT 相似，但操作上简化些，当然，费用也稍微高一些。