

MTT 法测定细胞相对数和相对活力

一、原理

噻唑兰，简称 MTT，可透过细胞膜进入细胞内，活细胞线粒体中的琥珀脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶于水的蓝紫色的 Formazan 结晶并沉积在细胞中，结晶物能被二甲基亚砷 (DMSO) 溶解，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映细胞数量。

二、试剂材料准备与实验仪器

- 1) 对数生长期细胞
- 2) 受试因素 (药物)
- 3) MTT: 以 PBS 配制成 5mg /ml，抽滤除菌，保存在 4°C
- 4) DMSO (二甲基亚砷)
- 5) 96 孔板
- 6) 酶联免疫检测仪
- 7) 细胞培养箱

三、实验步骤 (适用于贴壁细胞)

- 1) 收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，分于 96 孔板， 1×10^4 /孔，细胞浓度可以调整。
- 2) 置 37°C、5%CO₂ 温箱培养使细胞贴壁。
- 3) 加入不同浓度的药物，如 1、5、10、40、50、80、160、320mg/ml 的药物，时间依据实验需要，一般 3 天。
- 4) 小心吸去上清，PBS 轻轻洗涤，再次离心，弃上清。
- 5) 每孔加入 180 ul 新鲜 RPMI 1640 培养液，再加入 20 ul MTT 溶液 (5 mg/ml，即 0.5%MTT)，继续培养 4 h。

- 6) 终止培养（可离心，1000 rpm，10 min），小心吸去孔内培养液。
- 7) 每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷（也可以用酸化异丙醇，10%SDS 代替），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 490 nm 处测量各孔的吸光值。
- 8) 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），每组设定 3 复孔。

三、结果统计学处理

所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 软件进行方差分析， $p < 0.05$ 时为相差显著， $p < 0.01$ 时为相差非常显著。可以以时间为横轴，光吸收值为纵轴绘制细胞生线，专门公式求 IC_{50} 。或计算抑制率。

四、注意事项与常见问题

- 1) 实验时应设置调零孔，对照孔，加药孔。调零孔加培养基、MTT、二甲基亚砷。对照孔和加药孔都要加细胞、培养液、MTT、二甲基亚砷，不同的是对照加溶解药物的介质，而加药组加入不同浓度的药物。
- 2) 每孔中的细胞数可以根据细胞生长的速度调整，并进行预实验调整浓度，太多敏感性降低，太少观察不到差异。
- 3) 贴壁细胞加 MTT 前吸掉培养液，悬浮细胞可以不吸除培养液，再加入 0.5%MTT，量为 20 μ l/孔。
- 4) 如果不使用 96 孔板，培养基超过 100 ml，MTT 按照 10%的比例加入。
- 5) MTT 一般 4 度保存两周，注意避光保存，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，配制完后可过滤一下。

6) 对于 DMSO, 溶解后呈紫 (红) 色, 490nm 有最大吸收值; 而对于 SDS 和酸化异丙醇, 则选用 570nm, 并且建议以 655nm 作为参考波长。

7) 96 孔板在培养箱中, 由于湿度不够, 而培养箱由于具有一定的温度, 使得边缘的孔水分蒸发较快, 导致培养基中各种成分浓度变化增大, 导致细胞状态不同。对于这种现象, 要保证培养箱中的湿度, 减少开关培养箱的次数和时间。

8) 注意细胞悬液一定要混匀, 已避免细胞沉淀下来, 导致每孔中的细胞数量不等, 可以每接几个就要再混匀一下。

9) 没有去掉上清直接加 DMSO, 沉淀会很难溶解。加 DMSO 前要把液体吸掉, 但培养液里的紫色结晶可能会吸去, 也可在倒之前先用平板离心机离心 96 孔板, 2000r, 5 分钟, 然后吸掉上清。加入 DMSO 后可用排枪反复抽吸助溶, 溶解后尽快检测。

10) 为了减少误差, 培养板的四边孔只加培养基或只接种细胞, 而不作为指标检测孔。

11) 除置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解外, 可用枪头吹打, 加快溶解, 效果亦可; 或放入 37 度放孵箱 15 分钟溶解结晶。

12) 关于如何计算 IC50 方法有多种

(1)改良寇式法: $\lg IC_{50} = X_m - [P - (3 - P_m - P_n) / 4]$

(2) Bliss 法:自己查阅书籍

(3) IC50 计算软件, 见下面附件 (暂时找不到了)

(4)自己用 EXCEL 做趋势线来求 IC50, 关于 LD50 的方法与此相似!

(5)在线求 IC50 或 EC50: <http://chiryo.phar.nagoya-cu.ac.jp/javastat/JavaStat-j.htm>

13) 计算抑制率, 公式 $[(\text{对照}-\text{本底}) - (\text{给药}-\text{本底})] / (\text{对照}-\text{本底}) * 100\%$.