

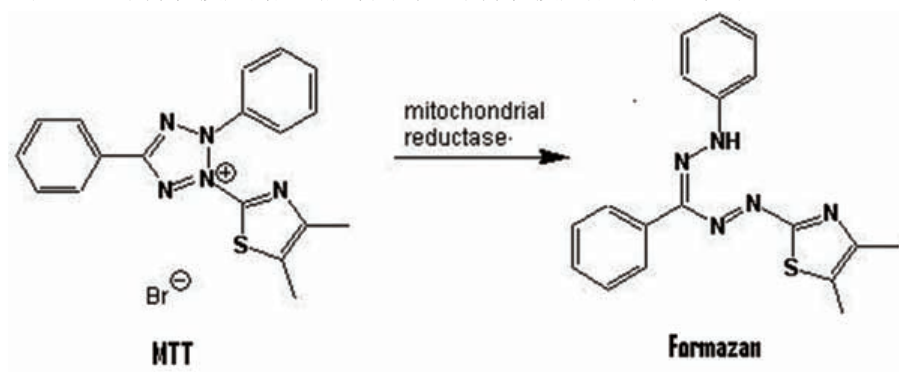
MTT检测试剂盒

MTT Assay Kit

产品编号: BA00209

保存条件: -20℃ 避光保存一年有效.

产品介绍: MTT广泛用于检测细胞生长, 其原理是MTT可以被活细胞线粒体内的脱氢酶还原生成深紫色的formazan结晶, 而死细胞则无此活性。深紫色的formazan结晶被溶解后可以通过测定490nm波长的光吸收而测定出其浓度, 并由此推测出细胞的活力, 细胞增殖越旺盛, 则吸光度越高; 细胞毒性越大, 则吸光度越低。其原理如下:



产品特点:

1. 采用独特的Formazan溶解液, 可以充分溶解formazan, 减少误差。
2. 背景低, 灵敏度高, 线性范围宽, 重复性好。
3. 本产品为足够500次 (5个96孔细胞培养板) 微孔板检测。
4. 可用于生物活性因子活性检测、抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验、肿瘤放射敏感性测定等。

试剂盒组成:

成分	规格
溶液A	5ml
溶液B	50ml
说明书	1份

储存条件: 低温运输、-20℃ 保存 (但溶液B也可以常温运输和保存), 有效期一年。

使用方法:

下面操作是检测细胞毒性的试验, 其他应用跟此类似或更简单 (如生长曲线试验), 操

作步骤可以以此为基础稍作修改即可，故不再赘述。

(一)、接种细胞

1. 按常规胰酶消化法消化汇合的单层细胞，收集到含血清的培养基中。
2. 200g离心5分钟收集细胞沉淀。
3. 用培养基重悬细胞沉淀，制备成单细胞悬浮液并计数。
4. 将细胞稀释到 2.5×10^3 个/mL~ 5×10^4 个/mL之间(需要根据细胞的生长速度决定)，如果不知道生长数度，一般可以稀释到 1×10^4 个/mL。
5. 将足够量的细胞悬液转移到培养皿中(便于用排枪取样)。一个96孔板的MTT检测需要约20mL的细胞悬液。
6. 用排枪在96孔板除的第2-11列各孔正中央加入200 μ L细胞悬液(对正常细胞)。如果是肿瘤细胞，则加入100 μ L肿瘤细胞悬液和100 μ L培养基(总体积为200 μ L)。注意：一定要把细胞加在孔的正中，否则细胞会聚集在孔的角落处，影响试验。
7. 用排枪在96孔板除的第1和第12各孔中加入跟细胞悬液等体积的培养基。第1 列各孔将作为+培养基-细胞+MTT对照(用于测OD时调零)，第12列加培养基的作用是减少边缘效应对第11 列反应的影响。
8. 按常规细胞培养方法在37℃和5% CO₂条件下孵育1-3天，使细胞进入指数生长期。

(二)、药物处理

9. 用培养基将药物稀释到8个待测浓度(如果不知道待测浓度，则需要预试验确定)，一般一种药物需要做3块平行板。
10. 去除第2到第11列(共10列)各孔中的培养基(不要触动细胞)，保留第1 列和第12列各孔中的培养基。
11. 在第2和第11列(共2列)的各孔中加入200 μ L新鲜培养基，这些孔将作为+培养基+细胞-药物的对照。
12. 在第3到第10列(共8列)各孔中加入8个浓度梯度的待测药物，每列加入一个浓度的药物。
13. 按常规方法把96孔板继续放在在37℃和5% CO₂条件下孵育一定的时间，此段时间即为药物处理细胞的时间，由用户自己决定。
14. 处理结束后去除第2 到第11列(共10列，均含细胞)所有孔中的培养基，并再加入100 μ L新鲜培养基。
15. 每天换培养使细胞数量扩增2-3倍(所需时间随细胞不同而不同)。

(三)、存活细胞计数

16. 在生长末期，去除第1到第11列各孔中的培养基后，再加入100 μ L新鲜培养基和10 μ L溶液A(含MTT成分)，用锡箔包裹住96孔板后放在37℃和5% CO₂条件下继续培养4-8小时。注意：溶液A在低温情况下会凝固，使用前请室温放置或20-25℃水浴至全部溶解，摇匀后使用。MTT有致癌性，一定要带手套操作。
17. 小心吸弃孔内培养基(含溶液A)。由于培养基可能会影响光吸收，最好尽可能去除。
18. 每孔加入100 μ L溶液B，置摇床上低速振荡10分钟，使MTT形成的formazan结晶物充分溶解。

19. 由于产物不稳定，故需要立即在酶联免疫检测仪上选择490nm测定吸光度。

注意：用第1 列各孔(+培养基-细胞+MTT对照)调零。

20. 计数同样处理的各次重复的平均值。

21. 以药物浓度为横轴，以吸光度为纵轴绘制曲线。由于各处理吸光度绝对值差别很大，一般需将其转化成生长抑制率(以不加药物的第2和第11列各孔数据的平均数作为100%)，这样便于计算出IC50，用于各种药物处理效果的比较。注意：如果测生长曲线，则以时间为横轴。正常生长曲线一般呈现S型，具有促进作用的则斜率加大。