

Version 1

Code No. AG51004

CytoDet 细胞活力检测试剂盒 (MTT)

CytoDet Cell Viability Assay Kit (MTT)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是一种基于 MTT [3- (4,5-二甲基-2-噻唑基) -2,5-二苯基四氮唑溴盐] 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的高灵敏度检测试剂盒。其检测原理是 MTT 能被活细胞内产生的还原性脱氢酶还原成蓝紫色的不溶性甲臞产物，可使用酶标仪在 570 nm 波长处进行吸光度检测，细胞活力越强甲臞生成的越多，颜色越深，一定范围内，吸光度与细胞活力成正比，因此可通过 MTT 进行细胞增殖和毒性分析。本产品操作简单，仅需将 MTT 检测试剂直接加入到细胞中，37°C 孵育 3 h 后加入增溶试剂，37°C 孵育一定时间，无需收集细胞，也无需洗涤细胞，直接使用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度即可。

本产品可广泛用于细胞增殖测定（例如对生长因子、细胞因子等细胞诱导增殖研究）；细胞毒性测定（例如对抗癌药物产生的细胞毒性研究）等。

➤ 产品组成

组分名称	AG51004 (100 rxns ^{*3})
MTT Reagent ^{*1}	1 ml
MTT Solvent Solution ^{*2}	10 ml

*1: MTT Reagent 需置于-20°C保存，并尽量避免反复冻融，可按照所需用量进行分装保存。

*2: MTT Solvent Solution 可能会生成沉淀，可放置于 37°C 水浴加热使沉淀完全溶解，充分混匀后即可使用；溶解后的溶液可置于 4°C 或室温保存 6 个月。

*3: 本产品反应次数按照 96 孔板一个孔使用 10 μl MTT Reagent 为 1 个反应计算。

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 避光保存

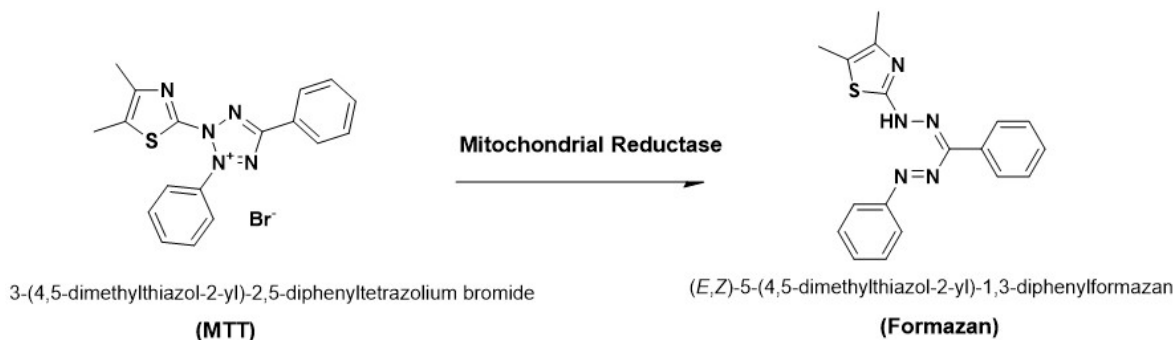
运输温度：-20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品操作简单，仅需将 MTT Reagent 加入到细胞培养基中孵育一定时间，再加入 MTT Solvent Solution 孵育即可；反应液均可直接加至细胞培养基中，无需收集细胞，也无需洗涤细胞。
2. 检测灵敏度高，线性范围广，例如使用 96 孔板可在 0~1X10⁵ Cell 范围内呈现良好的线性关系。
3. 本产品适用范围广，适用于多种贴壁细胞以及悬浮细胞的活力检测。
4. 酚红和血清对 MTT 检测无影响。

➤ 实验原理

MTT【3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐】被活细胞内产生的还原性脱氢酶还原成不溶的蓝紫色甲臞产物，在特定增溶剂作用下甲臞能够溶解，且甲臞在 570 nm 处有吸收，吸光度越高代表生成的甲臞染料越多，细胞活力越强。



➤ 实验前准备

1. 试剂&耗材:

可用于吸光度检测的 96 孔细胞培养板 (或其他细胞培养板)、细胞。

2. 仪器:

酶标仪(含 570 nm 滤光片)、CO₂ 培养箱、桌面离心机、振荡器、移液器等。

➤ 实验前注意事项

1. MTT Reagent 需避光保存，实验过程中注意避光操作。
2. MTT Solvent Solution 可能会生成沉淀，可放置于 37°C 水浴加热使沉淀完全溶解，充分混匀后即可使用；溶解后的溶液可置于 4°C 或室温保存 6 个月。
3. 初次实验，可参照标准曲线制作步骤，先摸索接种细胞的数量、加入 MTT Reagent 后的最佳孵育时间以及加入 MTT Solvent Solution 后的甲臞溶解时间。
4. 测定细胞活力时，为确保实验结果的准确性及可重复性，建议每次同时做标准曲线。
5. 推荐使用 570 nm 的滤光片检测，若没有，也可以在 560~600 nm 范围内检测。
6. 本产品的检测原理依赖于细胞产生的具有还原性的脱氢酶，如果体系中存在还原性或氧化性物质都可能会干扰检测结果，建议先去除干扰物质后再加 MTT 检测溶液进行检测。
7. 细胞培养板放在 CO₂ 培养箱中时，细胞培养板四周的孔有可能会存在培养基蒸发的情况，因此建议放在培养箱靠近水源的地方，减缓蒸发。

8. 进行药物抑制实验时，如果药物中含有金属(Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等)则会影响 MTT Reagent 的显色反应，最终导致检测的灵敏度降低。
9. 加入 MTT Reagent 以及 MTT Solvent Solution 时，沿着孔壁加，避免产生气泡，干扰后续吸光度检测。

➤ 操作方法（以 96 孔细胞培养板为例）

以下操作以 96 孔细胞培养板为例，若使用其他孔板进行实验，MTT Reagent 添加量按照培养基添加量的 10%，MTT Solvent Solution 添加量按照培养基添加量的 100%即可。

（注意：若直接进行检测，则需要确认使用的此 96 孔细胞培养板是否能够用于吸光度检测，若不能进行检测，则需要转移至可检测的板中）。

A. 标准曲线制作（可选）

初次实验，建议参照下述步骤摸索条件，例如摸索接种细胞的 $最佳数量$ 、加入 MTT 检测试剂后的 $孵育时间$ 等。不同种类细胞 $最佳接种数量$ 及 $孵育时间$ 可能会不同。

1. 按照一定的梯度将细胞接种于 96 孔细胞培养板中（如每孔 100 μ l 培养液中分别含 0，2000，4000，8000，16000，32000，64000，100000 个细胞），一般设置 5~8 个细胞数量梯度，每组做 3~6 个重复。
2. 每孔加入 10 μ l 的 MTT Reagent，混匀，37°C 孵育 3 h（若检测值偏低，可延长孵育时间至 4 h；若检测值偏高，可尝试缩短孵育时间至 2 h）。
3. 将培养板取出后加入 100 μ l 的 MTT Solvent Solution，混匀，在 37°C 孵育 4 h~过夜（也可以尝试在混匀后 1~3 h 内检测，若在此时间段内细胞数量与吸光度无法呈现良好的线性关系或检测值偏低，可适当延长孵育时间）。
4. 酶标仪测定 570 nm 处的吸光度。以细胞数量为横坐标，吸光度为纵坐标制作标准曲线，若细胞数量与吸光度呈现良好的线性关系，则可根据此标准曲线条件测定未知样品的细胞活力。（检测前需要确保孔内溶液混匀，且孔内无气泡）。

B. 细胞培养

1. 在 96 孔细胞培养板中接种一定数量的细胞（可根据标准曲线，选择呈现线性关系范围内的细胞数量，如细胞增殖实验可尝试每孔接种 2000 个细胞，细胞毒性实验可尝试每孔接种 5000 个细胞），放置在细胞培养箱（37°C，5% CO_2 ）中培养 24h，同时设置对照组及空白组（对照组与空白组可参照 D.结果分析进行设置）。
2. 加入适当浓度的药物对细胞进行处理（若无药物处理，直接进行步骤 C.细胞活力检测）。
3. 将 96 孔细胞培养板放置在细胞培养箱（37°C，5% CO_2 ）中孵育适当时间。

C. 细胞活力检测

1. 向各孔中加入 10 μ l 的 MTT Reagent, 混匀, 37°C 孵育 3 h (若检测值偏低, 可延长孵育时间至 4 h; 若检测值偏高, 可尝试缩短孵育时间至 2 h)。
2. 向各孔中加入 100 μ l 的 MTT Solvent Solution, 混匀后在 37°C 孵育 4 h~过夜 (12~16 h) (若检测值偏高, 可以尝试缩短时间, 在 1~3 h 内检测; 若检测值偏低, 可过夜孵育)。
3. 用酶标仪在 570 nm 处检测吸光度 (检测前需要确保孔内溶液混匀, 且孔内无气泡)。

D. 结果分析

1. 细胞活力计算:

$$\text{细胞活力}(\%) = (A - C) / (B - C) \times 100$$

$$\text{抑制率}(\%) = (B - A) / (B - C) \times 100$$

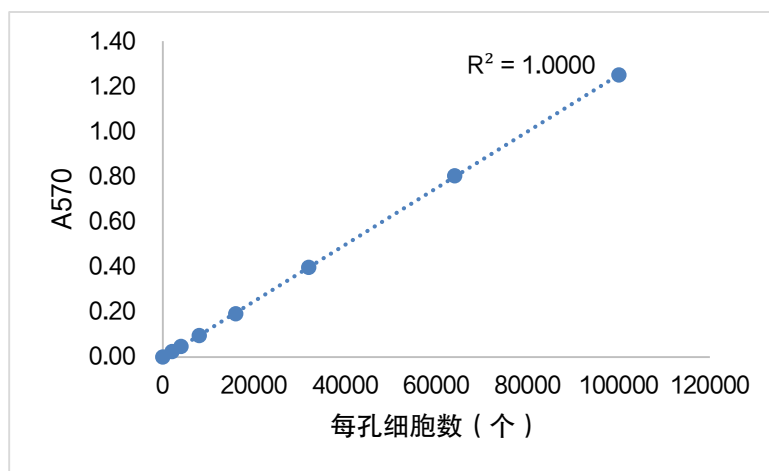
A 为实验组吸光度: 实验组含有特定药物处理的细胞、培养基、MTT Reagent 和 MTT Solvent Solution。

B 为对照组吸光度: 对照组含有不加药物处理的细胞、培养基、MTT Reagent 和 MTT Solvent Solution。

C 为空白组吸光度: 空白组不含细胞, 含有培养基、MTT Reagent 和 MTT Solvent Solution。

➤ 实验例

1. 按照每孔 100 μ l 培养液, 将 HL60 细胞按照不同数量 (0, 2000, 4000, 8000, 16000, 32000, 64000, 100000 Cells) 接种于 96 孔细胞培养板中, 向每孔加入 10 μ l 的 MTT Reagent, 37°C 孵育 3 h; 每孔加入 100 μ l 的 MTT Solvent Solution, 37°C 孵育过夜后在 570 nm 处测定吸光度, 结果如下图所示, 在 0~100000 细胞范围内呈现良好的线性关系。



▶ 产品注意事项

1. 防污染措施:

- ❖ 本产品用于检测细胞活力，进行检测反应时需要注意防止细菌或真菌污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要在生物安全柜中操作，避免讲话，且需要穿实验服，戴一次性口罩和手套等防止菌污染，细菌或真菌污染会影响检测结果。

2. 检测结果不理想:

- ❖ 在初次实验时可先摸索接种细胞的数量和加入 MTT Solvent Solution 后的最佳孵育时间。当使用标准 96 孔板时，每孔中接种的细胞数量应至少为 2000 个 (100 μ l); 如果要使用其它孔板进行实验，按照每孔培养基总体积的 10% 加入 MTT Reagent，按照每孔培养基总体积的 100% 加入 MTT Solvent Solution。
- ❖ 检测值过低可适当延长加入 MTT Reagent 或 MTT Solvent Solution 后孵育时间。
- ❖ 检测值过高可适当缩短加入 MTT Reagent 或 MTT Solvent Solution 后孵育时间。

3. 复孔间差异较大:

- ❖ 细胞培养液中加入 MTT Reagent 和 MTT Solvent Solution 后及检测前，均需充分混匀，避免不匀影响检测结果。
- ❖ 加入 MTT Reagent 和 MTT Solvent Solution 时，建议沿着孔壁添加，避免产生气泡影响吸光度检测。
- ❖ 检测前，确认细胞培养板孔中无气泡，避免影响吸光度检测。
- ❖ 加入细胞前，应确保细胞计数的准确性，计数不准可能会造成实验误差。