

Version 1

Code No. AG51005

# *CytoDet* 细胞活力检测试剂盒 ( XTT )

## *CytoDet* Cell Viability Assay Kit ( XTT )

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 XTT【2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺】的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测试剂盒。其检测原理是 XTT 能在电子偶联剂 1-甲氧基 PMS 的作用下，被活细胞内产生的还原性脱氢酶还原成水溶性的橙黄色甲臞产物，可使用酶标仪在 450 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 XTT 进行细胞增殖和毒性分析。本产品操作简单，仅需将 XTT 检测溶液与 1-甲氧基 PMS 配制成的工作溶液直接加入到细胞中，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 450 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                                    | AG51005 ( 100 rxns <sup>*2</sup> ) |
|---|------------------------------------|
| XTT Reagent <sup>*1</sup>               | 5 ml                               |
| Electron Coupling Reagent <sup>*1</sup> | 50 $\mu$ l                         |

\*1: 此 2 种溶液均需置于 -20°C 避光保存，并尽量避免反复冻融，可按照所需用量进行分装保存。

\*2: 本产品反应次数按照 96 孔板一个孔使用 50  $\mu$ l XTT 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

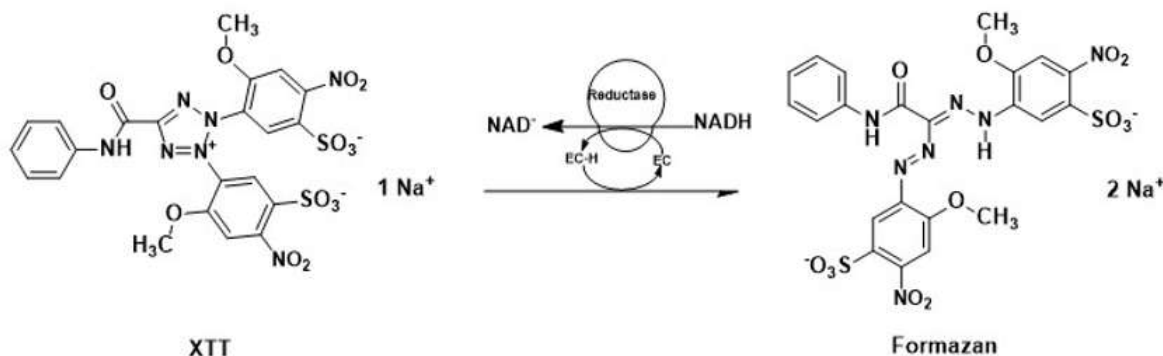
## ➤ 产品优势

1. 本产品操作简单，先将 XTT Reagent 与 Electron Coupling Reagent 按照 100 : 1 的比例混合，配制成工作溶液（现配现用），混匀后即可使用；该工作液可直接加至细胞培养液中，无需收集细胞，也无需洗涤细胞。
2. 本产品对细胞无毒性，经 XTT 检测工作液处理的细胞，弃去上清后，加入细胞培养基可继续培养使用。同时，加入 XTT 检测工作液后，可在不同时间点连续用酶标仪检测，对多个时间点进行分析，也使检测时间更加灵活。

3. 检测灵敏度高，线性范围广，例如使用 96 孔板可在  $0\sim 1\times 10^5$  Cell 范围内呈现良好的线性关系。
4. 检测速度快，反应时间短，1~4 h 内即可获得检测结果。
5. 酚红和血清对 XTT 检测无影响。
6. 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。

## ➤ 实验原理

XTT【2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺】在电子偶联剂 1-甲氧基 PMS 的作用下，被活细胞内产生的还原性脱氢酶还原成水溶性的橙黄色甲贍产物，甲贍在 450 nm 处有吸收，吸光度越高代表生成的甲贍越多，活细胞越多。



## ➤ 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 450 nm 滤光片)、CO<sub>2</sub>培养箱、桌面离心机、振荡器、移液器等。

## ➤ 实验前注意事项

1. XTT Reagent 与 Electron Coupling Reagent 需避光保存，实验过程中注意避光操作。
2. 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和加入 XTT 试剂后的最佳孵育时间。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。
3. 推荐使用 450 nm 的滤光片检测，若没有，也可以在 430~490 nm 范围内检测。
4. 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，因此建议先去除干扰物质后再加 XTT 检测溶液进行检测。

5. 细胞培养板放在 CO<sub>2</sub> 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内靠近水源的地方，减缓蒸发。
6. 加入 XTT 工作液时，沿着孔壁加，避免产生气泡，干扰后续吸光度检测。
7. 进行药物抑制实验时，如果药物中含有金属(Pb<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>等)则会影响 XTT 检测试剂的显色反应，最终导致检测的灵敏度降低。

## ➤ 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，XTT 检测工作液的添加量按照培养基体积的 50%添加即可。

（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，例如接种细胞的最佳数量、加入 XTT 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 μl 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. XTT 检测工作液配制：将 XTT Reagent 与 Electron Coupling Reagent 按照 100 : 1 的比例混合，配制成工作溶液（例如 1 ml XTT Reagent 加入 10 μl Electron Coupling Reagent），充分混匀，放置在冰上备用（注意 XTT 检测工作液需现配现用）。
3. 每孔加入 50 μl 的 XTT 检测工作液，混匀（若检测值偏低，可尝试增加 XTT 检测工作液至 100 μl；若检测值偏高，可以减少 XTT 检测工作液至 25 μl）。
4. 在 37°C 培养箱中孵育 1~4 h（初次实验可以每隔 1 h 用酶标仪检测吸光度，选取标准曲线呈良好线性关系的时间点用于后续的实验）。
5. 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。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，如细胞增殖实验每孔接种 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔接种 5000 个细胞），放置在细胞培养箱（37°C，5% CO<sub>2</sub>）中培养 24 h，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）。

- 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）。
- 将 96 孔细胞培养板放置在细胞培养箱（37°C，5% CO<sub>2</sub>）中孵育适当时间。

### C. 细胞活力检测

- XTT 检测工作液配制：将 XTT Reagent 与 Electron Coupling Reagent 按照 100 : 1 的比例混合，配制成工作溶液（例如 1 ml XTT Reagent 加入 10 μl Electron Coupling Reagent），充分混匀，放置在冰上备用（注意 XTT 检测工作液需现配现用）。
- 向每孔中加入 50 μl 的 XTT 检测工作液，混匀（若检测值偏低，可尝试增加 XTT 检测工作液至 100 μl；若检测值偏高，可以减少 XTT 检测工作液至 25 μl）。
- 混匀后 37°C 孵育 1~4 h（初次实验可以每隔 1 h 用酶标仪检测吸光度，选取吸光度数值较为适宜的时间点用于后续的实验）。
- 用酶标仪在 450 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：

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

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

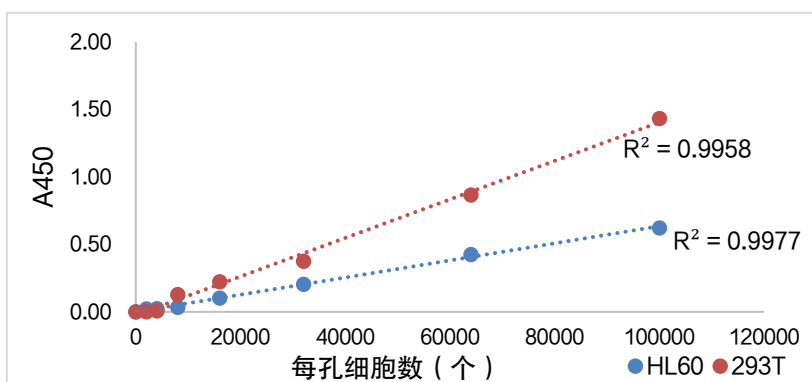
**A 为实验组吸光度：**实验组含有特定药物处理的细胞、培养基、XTT 检测工作液。

**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、XTT 检测工作液。

**C 为空白组吸光度：**空白组不含细胞，含有培养基、XTT 检测工作液。

### ➤ 实验例

- 按照每孔 100 μl 培养液，将 HL60 细胞和 293T 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 50 μl 的 XTT 检测工作液，37°C 孵育 2 h 后在 450 nm 处测定吸光度，结果如下图所示，均在 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 XTT 检测工作液之后的最佳孵育时间。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  $\mu$ 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 50%加入 XTT 检测工作液。
- ❖ 检测值过低可适当延长孵育时间或适当增加 XTT 检测工作液用量。
- ❖ 检测值过高可适当缩短孵育时间或减少 XTT 检测工作液用量。

### 3. 复孔间差异较大:

- ❖ 细胞培养液中加入 XTT 检测工作液后需充分混匀，避免不匀影响检测结果。
- ❖ 加入 XTT 检测工作液时沿孔壁添加，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。