

细胞活性测定

细胞活性测定方法有台盼蓝染色法、克隆（集落）形成法、^{3H}放射性同位素掺入法、MTT法等。其中 MTT 法以其快速简便，不需要特殊检测仪器、无放射性同位素、适合大批量检测的特点而得到广泛的应用。但 MTT 法形成的 Formazan 为水不溶性的，需要加有机溶剂溶解，由于在去上清操作时会有可能带走小部分的 Formazan，故有时重复性略差。为了解决这个问题，研究人员又开发了很多种水溶性的四氮唑盐类：如 XTT、CCK-8（WST-8）等。

现就这三种四氮唑盐类方法作一个简单介绍：

1、MTT 法

MTT：化学名：3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐，商品名：噻唑蓝。检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的甲，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。它的特点是灵敏度高、经济。

缺点：由于 MTT 经还原所产生的甲产物不溶于水，需被溶解后才能检测。这不仅使工作量增加，也会对实验结果的准确性产生影响，而且溶解甲的有机溶剂对实验者也有损害。

2、XTT 法

XTT：化学名：2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide，作为线粒体脱氢酶的作用底物，被活细胞还原成水溶性的橙黄色甲产物。当 XTT 与电子偶合剂（例如 PMS）联合应用时，其所产生的水溶性的甲产物的吸光度与活细胞的数量成正比。

优点：

- 1、使用方便，省去了洗涤细胞；
- 2、检测快速；
- 3、灵敏度高，甚至可以测定较低细胞密度；
- 4、重复性优于 MTT。

缺点：XTT 水溶液不稳定，需要低温保存或现配现用。

3、CCK-8 法或称 WST-8 法

CCK-8 试剂中含有 WST-8：化学名：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐]，它在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪 硫酸二甲酯（1-Methoxy PMS）的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度

水溶性的黄色甲 产物（Formazan）。生成的甲 物的数量与活细胞的数量成正比。用酶联免疫检测仪在 450nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。该方法已被广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞增殖试验、细胞毒性试验以及药敏试验等。

优点：1、使用方便，省去了洗涤细胞，不需要放射性同位素和有机溶剂；2、检测快速；3、灵敏度高，甚至可以测定较低细胞密度；4、重复性优于 MTT；5、对细胞毒性小；6、为 1 瓶溶液，毋需预制，即开即用。

缺点:1、与 MTT 相比，CCK-8 和 XTT 的价格比较贵。2、CCK-8 试剂的颜色为淡红色，与含酚红的培养基颜色接近，不注意的话容易产生漏加或多加。

三种方法的比较

	MTT 法	XTT 法	CCK-8 法 (WST-8 法)
甲 产物水溶性	难溶性	水溶性	水溶性
检测波长	490 nm	450nm	450nm
性状	粉末	2 瓶溶液	1 瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	毋需预制
使用有机溶剂	DMSO 或其它溶剂	—	—
方便性	+	++	+++
检测速度	+	++	+++
重复性	+	++	++
稳定性	++	+	++
工作量	---	--	-
对细胞毒性	---	--	-
对人体毒性	---	-	-

XTT 比色法

【基本原理】

XTT 比色法有 Scudiero 等首次采用，用于检测细胞增殖。XTT 是异种与 MTT 类似的四唑氮衍生物，可被活细胞线粒体脱氢酶还原成水溶性的棕色甲 产物，当 XTT 与电子耦合剂共同使用时，甲 的生成量与细胞的增殖程度呈正相关。

【试剂及材料】

- (1) XTT：用 60℃ 预热培养液配制成 6.6mmol/L，过滤除菌，现配现用。
- (2) 吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）：用 PBS 配制成 220mmol/L，4℃ 避光保存 20 天。
- (3) XTT/PMS：XTT 与 PMS 按 1: 1 混合（临用时混合）。

【操作方法】

- (1) 刺激增殖反应同前；

- (2) 于终止培养前 2h, 每孔加入 XTT/PMS 20 μ l, 混匀后再培养 2h;
- (3) 在酶标仪上 450nm 处测定光吸光度, 参考波长为 655nm;

【结果分析】

计算 SI: $SI = \text{试验孔 OD 均值} / \text{对照孔 OD 均值}$

【注意事项】

- (1) 丝裂原的质量和活性是测定淋巴细胞增殖反应的关键因素。不同厂家的产品, 质量、活性不同, 其使用的最佳刺激量也不同, 因而在实验前, 应事先确定其最佳刺激量。
- (2) 检测 T 细胞增殖反应, 丝裂原用 PHA 或 ConA; B 细胞增殖反应用 LPS 或 SPA; T、B 细胞增殖反应则用 PWM。
- (3) 增殖反应的细胞应保持高活性, 一般应 $\geq 95\%$ 。应用单抗分离制备的反应细胞因保存剂 (如 NaN_3) 或抗体的直接作用可抑制细胞的增殖。此外, 增殖细胞的浓度过高或过低均不利于细胞生长。
- (4) 细胞培养液应无菌、无支原体污染, 特别是小牛血清应加热灭活补体, 避免 LPS 或其他能促进细胞增殖物的污染。因此, 实验前应选择本底低的小牛血清。用人 "AB" 型血清或自体血清也应加热灭活补体。

MTT 法实验步骤

贴壁细胞

- 1、收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 100 μ l, 铺板使待测细胞调密度至 1000-10000 孔, (边缘孔用无菌 PBS 填充)。
- 2、5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 至细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 加入浓度梯度的药物, 原则上, 细胞贴壁后即可加药, 或两小时, 或半天时间, 但我们常在前一天下午铺板, 次日上午加药。一般 5-7 个梯度, 每孔 100 μ l, 设 3-5 个复孔。建议设 5 个, 否则难以反应真实情况
- 3、5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16-48 小时, 倒置显微镜下观察。
- 4、每孔加入 20 μ l MTT 溶液 (5mg/ml, 即 0.5%MTT), 继续培养 4h。若药物与 MTT 能够反应, 可先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲 2-3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液。
- 5、终止培养, 小心吸去孔内培养液。
- 6、每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490nm 处测量各孔的吸光值。
- 7、同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜)

悬浮细胞

- 1、收集对数期细胞, 调节细胞悬液浓度 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 按次序将①补足的 1640 (无血清) 培养基 40 μ l ; ②加 Actinomycin D (有毒性) 10 μ l 用培养液稀释 1 μ g/ml, 需预试寻找最佳稀释度, 1:10-1:20; ③需检测物 10 μ l; ④细胞悬液 50 μ l (即 $5 \times 10^4 \text{ cell}/\text{孔}$), 共 100 μ l 加入到 96 孔板 (边缘孔用无菌水填充)。每板设对照 (加 100 μ l 储存液 100 1640)。
- 2、置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵育 16-48 小时, 倒置显微镜下观察。
- 3、每孔加入 10 μ l MTT 溶液 (5 mg/ml, 即 0.5%MTT), 继续培养 4 h。(悬浮细胞推荐使用 WST-1, 培养 4 h 后可跳过步骤 4), 直接酶联免疫检测仪 OD570nm (630nm 校准) 测量各孔的吸光值)

4、离心（1000 转 x10min），小心吸掉上清，每孔加入 100 ul 二甲基亚砷，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 OD570nm（630nm 校准）测量各孔的吸光值。

5、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

MTT 实验心得

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。

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。

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 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 10 ml）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，建议不要吝啬 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 后在摇床上震荡 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，最大吸收波长，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、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。