**MTT噻唑蓝**

货号：CT-MTT-1，内含1.0克MTT粉末。

储存：+4°C，避光

MTT全称为3-（4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide，汉语化学名为 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，是一种黄颜色的染料。在水中的溶解度为20 mM。

技术资料：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| CAS No | 分子量 | 分子式 | 纯度 |
| 298-93-1 | 414.32 | C18H16N5SBr | >98% |

MTT主要有两个用途：

1．药物（或其他处理方式，如放射线照射等）对体外培养的细胞毒性的测定；

2．细胞增殖及细胞活性测定。

**MTT实验的原理**：

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臢（Formazan），并沉积在细胞中，而死细胞不能进行这个反应。二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的甲臢，用酶标仪在570nm波长处(490nm -570nm之间都可以）测定其光吸收值，在一定细胞数范围内，MTT结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的吸光度值（OD值）来判断活细胞数量，OD值越大，细胞活性越强（如果是测药物毒性，则表示药物毒性越小）。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。

**MTT实验方法（供参考）**

1. MTT的配制

通常配制的MTT浓度为5mg/ml。可以称取MTT 0.5克，溶于100 ml的磷酸盐缓冲液（PBS）或无酚红的培养基中，用0.22μm滤膜过滤以除去溶液里的细菌，放4℃ 避光保存，两周内用完。也可分装后避光保存在-20℃长期保存，并避免反复冻融。在配制和保存的过程中，容器最好用铝箔纸包住。

二、实验步骤

A、贴壁细胞

1、收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，向96孔板每孔加入100ul铺板，调节待测细胞密度使每孔含1000-10000个细胞，边缘孔用无菌水或PBS填充。

2、在5%CO2，37℃条件下孵育。原则上，细胞贴壁后即可加药，或两小时，或半天时间，或过夜。一般常在前一天下午铺板，次日上午加药。一般设5-7个药物梯度，每孔100ul，一般设3个复孔即可，复孔越多结果越准确。同时设置调零孔（仅含培养基和药物溶解介质）和对照孔（仅含细胞和药物溶解介质）。

3、置于5%CO2，37℃条件下，孵育时间根据药物的作用特点来决定，一般24-72小时，中途可在倒置显微镜下观察细胞状况。

4、每孔加入20ul MTT溶液（5 mg/ml，即0.5% MTT），37℃继续培养3-4小时。若药物能够与MTT反应，可先离心后弃去培养液，小心用PBS洗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 ul二甲基亚砜，置摇床上低速振荡10分钟，使结晶物充分溶解。在570nm（可用630nm校准）测量各孔的吸光值。

B、悬浮细胞

1、收集对数期细胞，调节细胞悬液浓度1E6/ml，依次将①细胞悬液50ul（即5E4cell/孔），②待检测药物50ul，共100ul加入到96孔板（边缘孔用无菌水或PBS填充）。一般设5-7个药物梯度，一般设3个复孔即可，复孔越多结果越准确。同时设置调零孔（仅含培养基和药物溶解介质）和对照孔（仅含细胞和药物溶解介质）。

2、置于5%CO2，37℃条件下，孵育时间根据药物的作用特点来决定，一般24-72小时，中途可在倒置显微镜下观察细胞状况。

3、每孔加入10 ul MTT溶液（5 mg/ml，即0.5%MTT），37℃继续培养3-4 h。

4、离心（1000转x10min），小心吸掉上清，每孔加入150 ul二甲基亚砜，置摇床上低速振荡10 min，使结晶物充分溶解。在570nm（可用630nm校准）测量各孔的吸光值。

**注意事项**

1. MTT法只能用来检测细胞相对数和相对活力，但不能测定细胞绝对数。在用酶标仪检测结果的时候，为保证实验结果的准确，MTT 吸光值要控制在仪器的线性读取范围内。
2. MTT最好现用现配，配制成5mg/ml无菌过滤后，在4℃避光保存两周内有效，或在-20℃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。
3. 保存的MTT溶液需要无菌，MTT对菌很敏感；往96孔板加时不避光也没有关系，毕竟时间较短，不放心的话可以把操作台上的照明灯关掉。
4. 配制MTT时用PBS溶解,也有人用生理盐水配，可用60℃水浴助溶。
5. MTT的缺点：由于MTT经还原所产生的甲臢产物不溶于水，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，而且溶解甲臢的有机溶剂对实验者也有损害。
6. MTT有致癌性，用的时候小心，为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作，最好戴透明的薄膜PE手套。
7. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。