

MTT 比色法在细胞生物学实验教学中的实验安排与效果分析

薛雅蓉^(✉), 庄重, 钟昭昭, 高倩倩

南京大学生命科学学院, 南京, 210093

摘要: MTT 比色法是一种检测细胞增殖与细胞活力的最常用方法。但因该方法用时偏长, 无法在高校基础细胞生物学实验课完成。为了解决这一难题, 以小鼠腹水瘤细胞为材料, 建立了“权宜之 MTT 比色法”。该法通过调整向细胞悬液中加入 MTT 溶液的时间, 使实验可以在 3 h 内完成。结果显示, “权宜之 MTT 比色法”可以替代常规 MTT 比色法用于基础细胞生物学实验教学。

关键词: MTT 法, 权宜之 MTT 比色法, 细胞生物学实验, 教学

The Arrangement and Effect of MTT Assay in Teaching Class of Cell Biology Experiments

XUE Ya-rong^(✉), ZHUANG Zhong, ZHONG Zhao-zhao, GAO Qian-qian

School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

针对细胞的研究中, 经常需要进行细胞增殖 (proliferation) 和细胞活力 (cell viability) 检测。因此, 有必要让学生对相关检测方法有所了解并掌握最常用的检测方法。

目前应用最为广泛的细胞增殖与细胞活力检测方法为 MTT 比色法 (MTT assay)。该法最早由 Tim Mosmann 于 1983 年创立^[1]。其中的 MTT 即 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 简称噻唑蓝。检测原理是: 活细胞的线粒体脱氢酶可以将黄色的 MTT 溶液转化为紫色甲臜 (formazan) 颗粒, 其被溶解后的溶液在一定波长下比色, 吸光值与活细胞数量及代谢活性成正比。由于其在测定细胞增殖活性时与直接反映 DNA 复制的³H-TdR 掺入法结果平行^[2], 并且无同位素污染、操作简单、快速, 因而得到广泛的

应用^[3]。主要用于检测细胞本身的增殖与活性^[4-8]及各种理化因素对细胞增殖与活性的影响及对细胞的毒性作用^[9-14]。现在也常用于微生物生长检测^[15]及抗微生物活性产物筛选^[16]等方面。应用领域涵盖了细胞生物学、免疫学、基础医学、临床医学、药理学、农学、畜牧水产等学科。该法也被我国药典^[17]收录用于一些药物的促细胞增殖活性和细胞毒性检测。与一些近年应用的新的噻唑盐比色法 (比如 CCK8 法) 相比, 该方法还有检测成本低的优点^[18,19]。

因此, 在高校细胞生物学实验教学中开展 MTT 比色法实验教学对于引导学生了解掌握细胞增殖与活力检测方法很有意义。

1 常规 MTT 比色法应用在实验教学中的不足

MTT 法的常规操作流程是^[17]: 计数细胞调浓度→将细胞悬液加样于 96 孔细胞培养板→(加药刺激)→加 MTT 反应→溶解甲臜→测定溶液吸光值。其中,

收稿日期: 2015-04-20; 修回日期: 2015-07-27

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目 (J1103512)

通讯作者: 薛雅蓉, E-mail: xueyr@nju.edu.cn

MTT 与细胞作用时间一般为 4 h 或更长, 其超过了日常一次实验课的 3 h。因此, 如按照常规操作, 只能在时间比较宽裕、但往往只有部分学生参与的开放综合实验教学中开展, 而不能用于所有学生都受益的基础实验教学。

2 “权宜之 MTT 比色法” 实验教学内容及安排

考虑到本实验的重要性, 我们经过反复考虑, 设计了一种可用于日常教学的“权宜之 MTT 比色法”。利用该法, 以小鼠腹水瘤细胞为材料, 开展了“MTT 比色法检测的细胞活力与细胞数量的关系”实验, 操作流程是: MTT 与细胞作用→计数细胞调浓度→将细胞悬液加样于 96 孔细胞培养板→溶解甲臞→测定溶液吸光值。与常规实验操作相比, 最大的变化是, MTT 可由教师或实验辅助人员在学生实验前添加, 学生无需在实验课等待 4 h 的 MTT 作用时间, 只需在其作用期间或作用后完成实验其他操作直至看到检测结果。这样的话, 3 h 的学生实验课时就能够开展该实验。具体实验安排如下:

(1) 上课前 2 h, 教师或实验辅助人员按要求浓度将 MTT 加入到抽取的腹水瘤小鼠腹腔液中, 并将加有 MTT 的腹腔液放入 37℃ 培养箱温育。

(2) 上课后, 教师按常规进行讲解及实验安排, 然后让学生先取少量前述细胞悬液, 用血细胞计数板计数并计算细胞浓度, 剩余细胞样品依然置 37℃ 培养箱中。

(3) 学生根据自己检测的细胞浓度, 计算将细胞调整为不同数量级 (10^6 个/mL、 10^5 个/mL、 10^4 个/mL) 系列浓度 ($8 \times$ 、 $4 \times$ 、 $2 \times$ 、 $1 \times$ 、 $0.5 \times$)、每浓度 3 个重复孔、每孔加 100 μ L 细胞悬液所需的原始细胞样品总体积。一般需要稍微多准备一些。

(4) 学生吸取所需量的原始细胞样品, 用加有正常检测浓度 MTT 的 RPMI1640 培养液或 PBS 缓冲液按实验设计调整细胞悬液浓度, 然后将不同浓度的细胞悬液依次加入 96 孔细胞培养板, 每浓度加 3 个重复孔。加样结束, 若 MTT 作用时间还不够 4 h, 则将 96 孔细胞培养板放入 37℃ 培养箱中继续温育到需要时间。需要注意的是, 这一步所用细胞稀释液中必须添加正常浓度的 MTT, 以保证稀释后的细胞悬液与稀释前有相同浓度的 MTT。

(5) 根据所用甲臞溶解液的要求溶解甲臞, 在酶标仪 570 nm 波长处测出各孔的吸光值 D 。

(6) 课后, 学生分析吸光值 D 与细胞浓度之间的关系, 找出线性关系范围, 并查阅资料了解影响 MTT 测定结果的因素。

3 “权宜之 MTT 比色法” 可能存在的问题

上述操作中, 与常规方法有两点不同: ①加 MTT 前的细胞浓度不确定。②学生调节细胞浓度及加样期间 (一般不超过 1 h) 细胞处于室温条件, 低于实验要求的温度 (37℃)。这两点不同可能会影响测定结果的绝对值, 原因是: ①相对于按正常浓度加入的 MTT 量有可能存在细胞浓度偏大的问题, 导致细胞转化 MTT 的能力不能充分发挥而致测定值偏小; ②短时间的温度下降可能会降低细胞线粒体酶的活性, 导致转化形成的紫色甲臞量减少。因此, 该权宜之法不适用于用在科研检测中。这一点教师在对学生讲解时应加以说明或让学生进行分析。

4 “权宜之 MTT 比色法” 的教学效果

由于“权宜之 MTT 比色法”的上述误差为系统误差, 不改变细胞数量与吸光值的关系规律 (图 1), 因此, 也不影响学生对该方法的学习与掌握。学生通过这一实验可以了解: ①通过检测细胞酶的活性可检测细胞增殖与活力。②MTT 法吸光值与细胞浓度正相关, 且在一定的细胞浓度范围内, 吸光值与细胞浓度呈线性关系; 偏离浓度范围会导致线性关系不佳。③有多种因素影响比色结果。这些因素包括稀释细胞用液、细胞裂解前是否离心培养板弃除部分培养液、裂解液种类及作用条件、比色孔中是否因操作导致气泡产生等。

综上所述, 可以得出两个结论: ①MTT 法是检测细胞增殖与活性的常用方法, 在基础实验教学中开展此实验非常有意义, 可以使所有学生都有机会了解对这类方法有所了解和掌握。尽管学生只接触了完整实验的一部分, 但这部分却是本实验方法的核心, 前期的细胞准备及其他工作另有实验内容涉及, 并不影响学生对整个方法的掌握。②本文所述“权宜之 MTT 比色法”用于基础细胞生物学实验教学是可行的, 能够达到应有的教学效果。

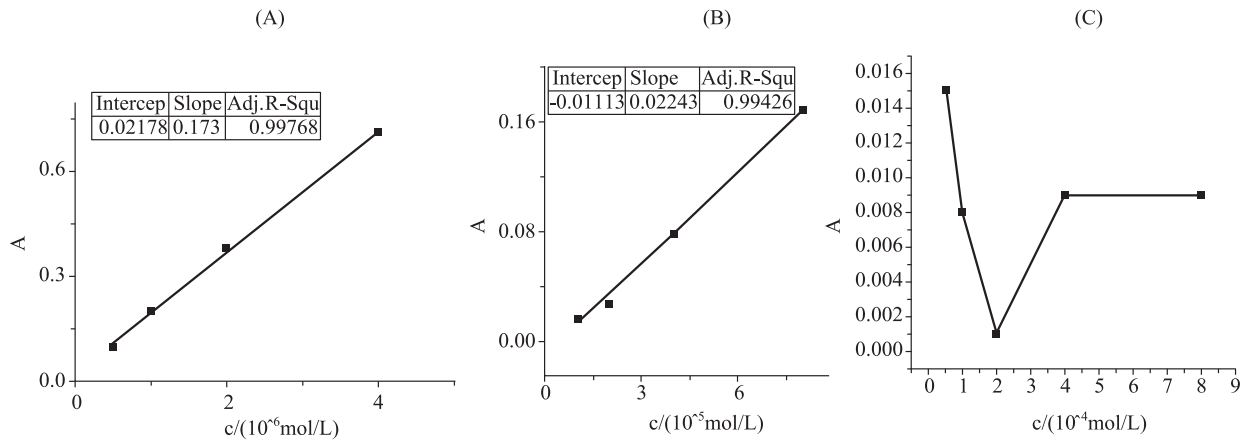


图1 细胞密度与 MTT 法测定的吸光值之间的关系图 (来源于学生实验报告)

(A)、(B)、(C) 分别显示细胞浓度在 $0.5 \sim 4 \times 10^6$ 、 $0.5 \sim 8 \times 10^5$ 、 $0.5 \sim 8 \times 10^4$ 个/mL 范围内细胞密度与吸光值之间的关系。前两个浓度范围线性关系较好, 后一个浓度范围未显示线性关系

参考文献

- [1] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65 (2): 55-63.
- [2] 方佳, 陈常庆. MTT 比色法与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法测定 rhIL-3 和 rhEPO 生物学活性的比较 [J]. *上海免疫学杂志*, 1996, 16 (2): 110-111.
- [3] 李上标, 裴淑艳, 蒋超, 等. MTT 比色法研究应用进展 [J]. *西南民族大学学报 (自然科学版)*, 2013, 34 (91): 68-73, 91.
- [4] 郝新保, 张利朝, 殷纛, 等. MTT 比色法测定细胞生长曲线 [J]. *第四军医大学学报*, 1997, 18 (4): 390-391.
- [5] 李正伟, 卞红强, 罗正利, 等. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞的原代培养与鉴定 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2012, 41 (5): 585-588.
- [6] Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1986, 94 (1-2): 57-63.
- [7] Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair [J]. *Toxicology in vitro*, 2015, 29: 314-319.
- [8] 张冰冰, 赵魁, 贺文琦, 等. 羔羊外周血单个核细胞转化 MTT 比色法最佳检测条件的筛选 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (3): 65-68.
- [9] Fotakis G, Timbrell J A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride [J]. *Toxicology Letters*, 2006, 160: 171-177.
- [10] Scherließ R. The MTT assay as tool to evaluate and compare ex-
- [11] Buch K, Peters T, Nawroth T, et al. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay-A comparative study [J]. *Radiation Oncology*, 2012, 7: 1-6.
- [12] 沈立军, 韩莲花, 朱华亭, 等. 抗人 CD80 单链抗体对不同肿瘤细胞膜型 CD80 分子的识别与体外增殖的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28 (10): 1081-1087.
- [13] 周珏, 刘冉, 李晓波, 等. 微囊藻毒素 LR 对 PC12 细胞氧化性损伤作用的实验研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2012, 24 (5): 349-351.
- [14] Boncler M, Rozdski M, Krajewska U, et al. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cell viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on endothelial cells [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2014, 69: 9-16.
- [15] Li N, Xiao K J, Pang H, et al. Effect of oligo-chitosan on the growth of intestinal microorganisms as determined by MTT assay [J]. *Food Science*, 2012, 33 (3): 101-104.
- [16] 钟灵允, 王兰, 单体江, 等. 多孔板 MTT 比色法评价植物与微生物代谢产物的抗真菌活性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24: 20-24.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (三部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 72-74.
- [18] 石淙, 万腊根. 细胞增殖的检测方法 [J]. *实验与检验医学*, 2012, 30 (20): 153-155.
- [19] 金诚, 宿连征, 刘汗青, 等. 四唑盐细胞活力指示剂研究进展 [J]. *化学试剂*, 2012, 34 (4): 333-336, 381.

(责编 高新景)