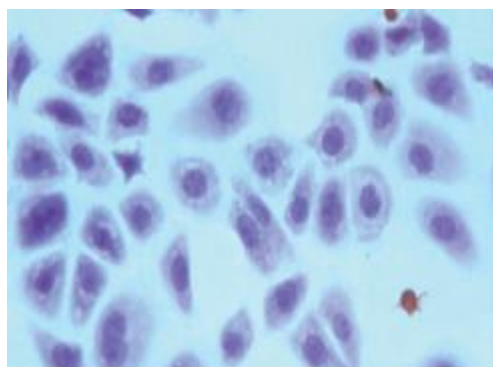


细胞生长曲线绘制-MTT 法

摘要：通过 MTT 法可以得到细胞的生长曲线，也可对瞬时转染后的细胞进行检测，本文主要介绍了 MTT 的作用原理及实验操作要点。

MTT 全称 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐，商品名为：噻唑蓝。是一种黄颜色的染料。MTT 主要有两个作用：① 药物（或其他处理方式如放射线照射）对体外培养的细胞毒性的测定（如[细胞瞬时转染表达](#)后可对细胞进行 MTT 检测）② 用于细胞增殖及细胞活性的测定，可以制得细胞生长曲线。

MTT 法检测细胞存活和生长的主要机理是：活细胞中的某些物质（线粒体中的琥珀酸脱氢酶）能够和 MTT 反应，使 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖（图 1）并沉积在细胞中，而死细胞没有此功能。DMSO（二甲基亚砜）能够将此结晶（蓝紫色甲瓖）溶解，在酶联免疫检测仪 490nm 波长处测定其吸光值，能够间接的反应活细胞的数量。一定范围内，蓝紫色结晶沉淀的数量与细胞数成正比。目前 MTT 法因其灵敏度高，经济快速等优势被广泛的运用于细胞毒性试验，肿瘤药物的筛选、放射敏感性测定和对某些生物活性因子的活性检测等方面。MTT 法也有自身的缺点，如 MTT 检测生产的蓝紫色产物（甲瓖）不溶于水，需被溶解后才能检测。一方面使得工作量增加，另一方面对实验结果的准确性产生一定的影响，且用于溶解甲瓖的有机溶剂对人体有一定的危害。细胞瞬时转染表达后的细胞也可做 MTT 实验，多数人不知道是先转染再做 MTT，还是先做 MTT 再进行瞬时转染，这里建议是先做转染，培养一段时间后（24/48h），重新接种至 96 孔板，加药两天左右，再进行 MTT 检测。



水不溶性的蓝紫色甲瓖

实验准备

1. 仪器：酶联免疫检测仪，血球计数板，96 孔板，离心管等

2. 试剂：MTT 溶液，胰蛋白酶，DMSO（二甲基亚砷），血清培养基

3. MTT 溶液的配制

用 PBS 缓冲液溶解 MTT 粉末。PBS (pH=7.4) 配置：NaCl (8g) + KCl (0.2g) + Na₂HPO₄ (1.44g) + KH₂PO₄ (0.24g) 调 pH 7.4,定容至 1L。

此处 MTT 的浓度为：5mg/ml。称取 0.5 克 MTT 粉末，溶于 100 ml 的磷酸缓冲液（PBS）中，用 0.22 μm 滤膜过滤除去溶液里的细菌。在配制和保存的过程中，最好避光。如在超净台中配置该溶液，可将日光灯关掉操作，同时容器用铝箔纸包住(避光)，4℃ 避光保存即可。使用勿超过两周，一旦 MTT 变色，即刻停止使用。建议是 MTT 最好现用现配，分装一定量的 MTT 粉末在 EP 管中，用的时候现配直接加到细胞培养板中操作方便也避免浪费。

此外，MTT 具有致癌性，无论是配置还是实验都要注意做好防护准备。MTT 对菌敏感，配置或保存的时候要保证无菌，且要避光。

在进行实验时，由于实验作用时间较短，因此可不避光，但是要将超净台的日光灯关掉，效果会更好。

实验操作

1. 常规消化细胞，离心收集细胞沉淀，用血清培养基悬浮细胞，制成单细胞悬液，并用进行细胞计数
2. 接种细胞：稀释细胞浓度至 1×10^4 /ml。吸取 200ul 的细胞悬液加入到 96 孔板中（注意设置空白对照组）
3. 对于瞬时转染的细胞，转染后 24h 消化细胞，重新接种至 96 孔板，培养 18h 加药两天后进行 MTT 检测
4. 细胞培养：常规培养细胞，每两天换一次液
5. 呈色：从细胞培养第二天开始，即可每天按照固定时间取出 96 孔板并加入 MTT 溶液 20ul，37℃培养 4h 后，将孔中上清小心的吸去，加入 150ul 的 DMSO，震荡 10min，使沉淀充分溶解
6. 在酶联免疫检测仪上设置 490nm 波长测定吸光值，进行检测并记录结果（取平均值）
7. 每天取出 96 孔板重复操作，并记录结果
8. 以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线

结果分析

绘制结果应当如图 2 所示，呈现 S 形。与细胞培养计数法获得的生长曲线接近。前三天左右为停滞期，随后细胞进入对数生长期，最后进入稳定生长时期。

因为在相同体积内细胞数与吸光度成正比，所以在对数生长时期，曲线越倾斜（斜率越大），细胞的群体倍增时间越短。

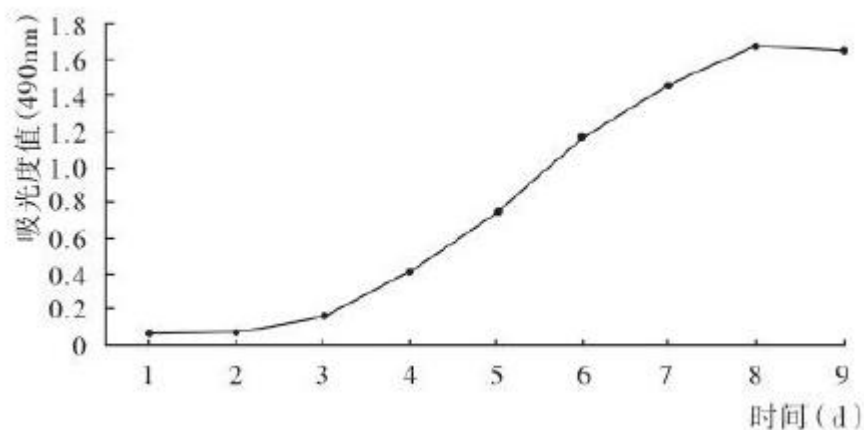


图 2 MTT 法实验结果

操作要点

实验设置空白对照组，步骤保持一致，一组只加培养基不加细胞，比色以空白调零

MTT 实验吸光度最后在 0-0.7 之间，超出这个范围则不是直线关系

加 DMSO 之前要尽量去掉培养液，便于 DMSO 溶解甲瓚颗粒进行比色测定

实验中使用各培养基的量，按照说明书操作（根据经验适时调整）

每孔细胞浓度维持在 20 个/uI，加 20uI MTT，作用四小时后洗掉上清液。注意不要将甲瓚洗掉，然后每孔

加 150uI DMSO，振荡 10 分钟，然后测吸光值

细胞瞬转 MTT 检测，转染 6h，24h 或 48h 消化细胞进行重新接种，此时间根据细胞生长状态决定，一般

在加药 2 天后进行 MTT 检测

利用细胞计数法也可以绘制生长曲线，具体的实验操作及结果分析方法请查看：[细胞计数法绘制生长曲线](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

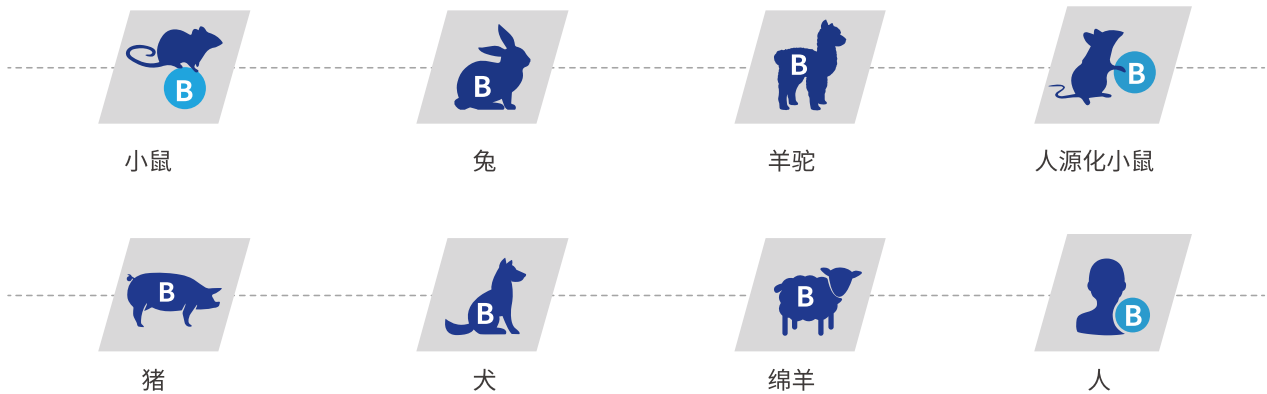
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

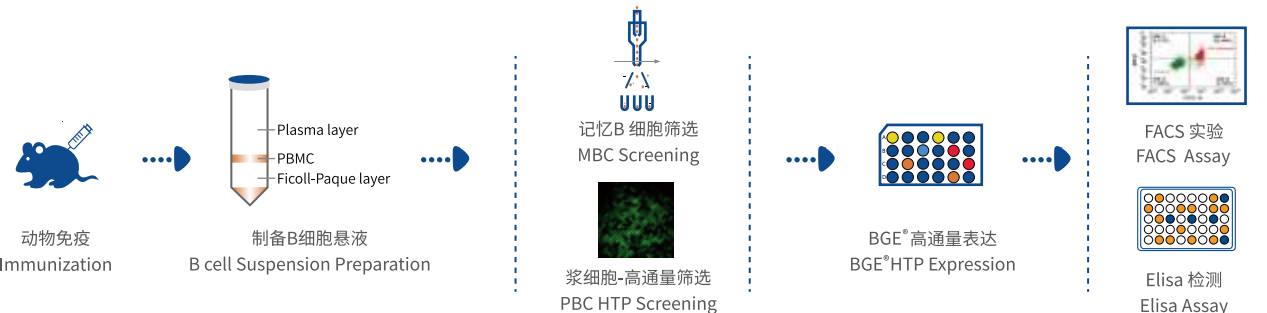
平台优势

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫 | 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性 |
| 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失 | 重轻链天然配对,亲和力更优 |
| 高通量,周期短,单抗发现快至29天 | ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证 |

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

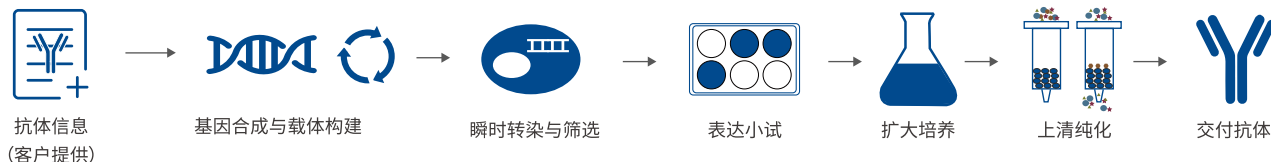
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

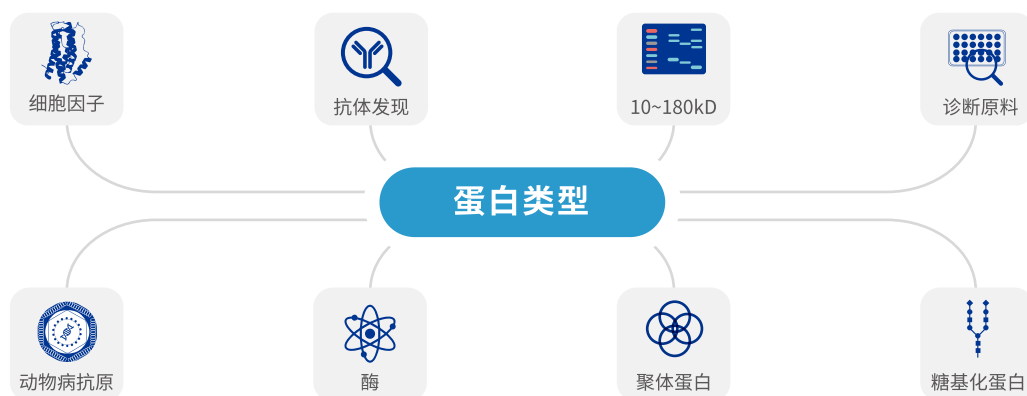


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

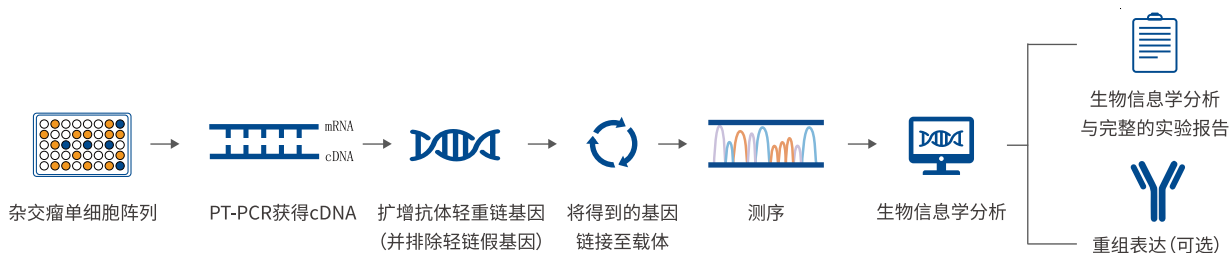
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

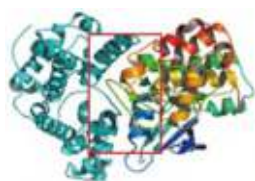


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



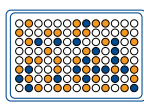
基因合成&质粒抽提



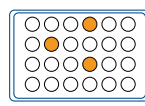
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L