

产品组成:

规格	250T	500T	1000T
XTT 试剂	2.5ml	5ml	10ml

注意:

- 1、XTT 试剂短期存放于 2-8℃，长期存放请分装后-20℃避光保存。
- 2、避免反复冻融。
- 3、冻存后溶解时注意重新混匀。

储存条件:

- 2-8℃避光保存。
长期存放-20℃避光保存。

有效期:

一年。

注意事项:

1. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 避免皮肤或粘膜与试剂接触。
7. 需长时间保存可-20℃避光保存。避免反复冻融，否则将会增加空白吸收，从而影响检测结果。最好小剂量分装，用避光袋或是黑纸、锡箔纸包住避光。
8. 正式实验前，建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 XTT 试剂后的培养时间。在 1000-100000 之间摸细胞数量。部分药物可能对检测有影响，有影响时需换液后检测，无影响时直接检测。用培养基或 PBS 来配制待检测药物，加入 XTT 试剂，测药物溶液在 450 nm 处的吸光度。
9. 如果该吸光度与不含药物仅加 XTT 试剂的培养基或 PBS 吸光度差异不大，则可以直接加入 XTT，如果吸光度相对较大，则需要除去培养基，并用新鲜培养基洗涤细胞两次，然后加入新的 100u1 培养基和 10u1 XTT 进行检测。
10. 如果样品为高浑浊度的细胞悬液，或者为了去除其它颜色物质的影响，建议设定 600 nm (或 600 nm 以上) 作为参比波长，以 OD450 扣除参比波长的 O.D 值即可。

产品简介:

XTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒是应用二甲氧喹黄 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide 快速高灵敏度检测细胞增殖和细胞毒性的比色检测产品。XTT 在电子耦合试剂存在的情况下能够被线粒体内的一些与辅酶 II 相关的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的 Formazan, 生成的 Formazan 量与活细胞数量成正比。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数量呈线性关系。

本 XTT 试剂为配制好的即用型试剂, 直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分, XTT 试剂很稳定, 对细胞没有毒性, 可以长时间孵育细胞。XTT 法测定细胞增殖或毒性试验中活细胞数目的灵敏度高, 无放射性, 检测细胞增殖实验的灵敏度比其它方法如 MTT 高。

产品特点:

- 使用方便: 仅使用单一试剂;
- 灵敏度高, 数据可靠, 重现性好, 线性范围更宽;
- 结果稳定: 试剂本身稳定性高, 实验结果稳定可靠;
- 无需放射性同位素和有机溶剂, 对细胞毒性低;
- 适合于高通量药物筛选。

试剂盒以外自备试剂和仪器

PBS 纯水 移液器及吸头 96 孔培养板

CO₂ 培养箱 带有 450nm 滤光片的酶标仪

使用方法:

使用注意事项:

1. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
2. 接种时注意细胞悬液一定要混匀, 以避免细胞沉淀下来, 导致每孔中的细胞数量不等, 可以每接种几个孔就混匀一下。培养板周围一圈孔培养基容易挥发, 为了减少误差, 建议培养板的四边每孔只加培养基, 而不作为指标检测孔。
3. 培养时间根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。一般情况下, 白细胞较难染色, 因此需要较长的培养时间或增加细胞数量 (~105 个细胞/孔)。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难染色。对于悬浮细胞, 在培养 1-4 小时后, 可先从培养箱中取出, 目察染色程度或用酶标仪测定决定。若染色困难, 可将培养板放回培养箱, 继续培养数小时后再确定。染色的最佳时间可定为悬浮细胞的最佳培养时间。对于贴壁细胞, 培养时间一般为 1-4 小时, 但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察染色程度 (根据细胞种类而定, 需要摸索一下条件)。当使用标准 96 孔板时, 贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100 μ l 培养基)。检测白细胞时的灵敏度相对较低, 因此推荐接种量不低于 2,500 个/孔 (100 μ l 培养基)。如果要使用 24 孔板或 6 孔板实验, 请先计算每孔相应的接种量, 并按照每孔培养基总体积的 10% 加入 XTT 试剂。
4. 有条件的情况下建议采用多通道移液器, 可以减少平行孔间的差异。加 XTT 试剂时, 建议斜贴着培养板壁加, 不要插到培养基液面下加, 容易产生气泡, 会干扰 O.D 值读数。若细胞培养时间较长, 培养基颜色发生变化或 pH 发生变化, 建议更换新鲜的培养基后再加 XTT 试剂。含有酚红的培养基可用于本试剂盒做细胞活性的测定, 酚红不会影响检测。
5. 如果不是使用 96 孔板检测, XTT 试剂的用量相应等比例增加即可。

6. 本试剂盒可以用于细菌的检测，不可用于酵母检测。
7. XTT 试剂加样量较小时，也可以用培养基稀释 XTT 试剂后加样以减小误差。
8. 本试剂无细胞毒性，可以在检测后进行细胞培养，也可以再进行其他检测。
9. 某些细胞实验中吸光度值太高，可以减少细胞数量，或者缩短加入 XTT 后的培养时间。
10. OD 值在 0.8-1.5 之间较好。

细胞活性、细胞增殖- 毒性检测

- 1、收集细胞，加细胞悬液 100ul（约 5000-10000 个细胞）到 96 孔板（边缘孔用无菌水或 PBS 填充）。每板设对照（加 100 μ l 培养基）。
- 2、置 37°C，5% CO₂ 孵育过夜，倒置显微镜下观察。
- 3、每孔加入 10 ul 待检测药物溶液，37°C 孵育。
- 4、每孔加入 10 ul XTT 试剂，37°C 孵育 1-4 小时。
- 5、测定 450 nm 各孔的吸光值，如无 450nm 滤光片，可以使用 450-490nm 的滤光片。
- 6、同时设置空白孔（培养基和 XTT 试剂，无细胞），对照孔（不加药培养基和 XTT 试剂，有细胞），每组设定 3-5 复孔。

注：

- 如果暂时不测定 OD 值，打算以后测定的话，可以向每孔中加入 10ul 0.1M HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。
- 如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 XTT 试剂之前更换新鲜培养基，去掉药物的影响。当然药物影响比较小的情况可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。

细胞活力计算：

将各测试孔的 OD 值减去调零孔 OD 值或对照孔 OD 值。各重复孔的 OD 值取平均数。

细胞活力% = (加药细胞 OD - 空白 OD / 对照细胞 OD - 空白 OD) × 100

细胞数量测定

- 1、先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。
- 2、按比例（例如：1/2 比例）依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般要做 3-5 个细胞浓度梯度，每组 3-6 个复孔。
- 3、接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后加 XTT 试剂培养一定时间后测定 OD 值，制作出一条以细胞数量为横坐标 (X 轴)，OD 值为纵坐标 (Y 轴) 的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量（使用此标准曲线的前提条件是实验的条件要一致，便于确定细胞的接种数量以及加入 XTT 试剂后的培养时间）。