**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | MTT细胞增殖/毒性检测 |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

详见实验方案

# 2 仪器、试剂及实验细胞系

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 二氧化碳培养箱 | 3111 | Thermo |
| 全自动细胞计数仪 | Countess II | Thermo |
| 荧光倒置显微镜 | Ts2R-FL | NIKON |
| 成像系统 | DP73 | OLYMPUS |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |
| 多功能酶标仪 | SpectraMax M5 | Molecular Devices |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| MCDB131培养基（不含L-谷氨酰胺） | L681KJ | 上海源培生物科技股份有限公司 |
| M199培养基（含酚红和L-谷氨酰胺，不含HEPES） | L640KJ | 上海源培生物科技股份有限公司 |
| 0.25％Trypsin Solution | SH30042.01 | HyClone |
| Penicillin-Streptomycin Solution | SV30010 | HyClone |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | Solarbio |
| 胎牛血清（FBS） | 10091148 | Gibco |
| MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 | C0009S | 碧云天 |

## 2.3 主要细胞系

输卵管细胞：MCDB131和M199基础培养基1:1混合+10%血清+20ng/mL EGF

# 3 实验方法

# 3.1细胞复苏（原代细胞和干细胞不适用）

3.1.1从液氮中取出细胞冻存管 (注意：佩戴防爆管面具)，快速将其置入37℃水浴中解冻， 直至冻存管中无结晶，然后用 75%的酒精擦拭冻存管外壁；

3.1.2将冻存管中的细胞移至含 5mL 完全培养基的 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.1.3弃上清，沉淀用5mL 完全培养基重悬，接种 T25 培养瓶，于 37℃，5%CO2 细胞培养箱中培养；

3.1.4第二天，换用新鲜完全培养基继续培养。

# 3.2细胞传代（原代细胞和干细胞不适用）

3.2.1细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.2.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.2.3弃上清，沉淀细胞用 1-2mL 完全培养基重悬，然后按 1:2 比例进行分瓶传代 (两个 T25)，补充新的完全培养基至 5-8mL/瓶，最后放入 37℃，5%CO2 细胞培养箱中培养；

## 3.3 细胞冻存

3.3.1细胞生长至覆盖培养瓶的80%面积时，弃 T25 培养瓶中的培养液，用 PBS 清洗细胞一次；

3.3.2添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1mL 至培养瓶中，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5mL 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15mL 离心管中，1000rpm 离心 5min；

3.3.3弃上清，沉淀细胞加入 1mL/支的无血清冻存液，混匀后加入冻存管中。 (如：冻一支，加入 1mL 无血清冻存液)

3.3.4将冻存细胞直接放入－80℃冰箱即可；如后期要将细胞转入液氮罐中，需在-80℃冰箱存放 24 小时以上。

## 3.4 细胞增殖-毒性检测

3.4.1 取生长状态良好的细胞，调整细胞密度，按每孔 100μL 细胞悬液接种于 96 孔板中，同时设空白孔（不加细胞但是加入同体积的培养基）。

注：通常细胞增殖实验每孔加入 100μL 约含 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100μL 约含 5000个细胞（具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小，细胞增殖速度的快慢等决定）。

3.4.2 根据实验设计对细胞进行培养和处理。

3.4.3 每孔加入 10μL 的 MTT 工作液。继续孵育 1~4 h，使 MTT 还原为甲臜。

注：MTT 孵育条件与细胞培养条件相同。

3.4.4 每孔加入 100μL 的 DMSO 使甲臜溶解，用平板摇床摇匀。

3.4.5 用酶标仪测定在 570 nm 处的吸光度。

## 3.6 活力计算

细胞存活率(%) =（ODsample − ODblank）/（ODcontrol − ODblank）× 100%

抑制率(%) =（ODcontrol − ODsample）/（ODcontrol − ODblank）× 100%

[注]:ODsample: 实验孔的 OD 值

ODcontrol: 对照孔的 OD 值

ODblank: 空白孔的 OD 值

## 3.7 实验结果

实验结果见附件EXCEL表。