

MTT方法评价微生物细胞活性的探讨

杨翠云^{1,2} 刘永定¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所, 烟台 264003)

摘要:对 MTT 比色法用于评价微生物细胞活性进行了探讨。本文以大肠杆菌为模式菌株,研究了不同浓度 MTT、不同用量、在不同时间对试验结果 OD₅₇₀ 值的影响,结果表明细菌数在 4.9×10^7 — 4.9×10^8 个/mL 范围内测出的 OD₅₇₀ 值与细菌浓度呈良好的正相关,0.5 mg/mL MTT 用量 20 μ L,反应时间 20 min 时效果最佳,其相关回归方程为 $y = 0.1769x + 0.03$, $R^2 = 0.9983$ 。

关键词:MTT 比色法;大肠杆菌;细胞活性

中图分类号:Q-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)04-0577-04

在研究外源污染物对微生物的毒性机理中常需要表征微生物细胞的活性或活的微生物细胞数量,及时反应微生物细胞的生长状况,常用活的细胞数来表示。常规的方法有平板倾注法或平板涂布法、自动菌数测定仪法、浊度法、菌体干重法、生物荧光法等^[1-4]。平板倾注法或平板涂布法过程繁琐、耗时长、重复性差,不能及时反映菌体生长情况,不适合做大批量的实验。而其他几种方法不能区分细胞死活,并且容易受到培养基、代谢产物等的影响。而近年来发展起来的 TTC(氯化三苯基四氮唑)和 MTT(四甲基偶氮唑盐)比色法是借鉴于植物、动物细胞活性检测的一种细菌活性检测的方法。TTC 比色法的原理是细菌能将 TTC 还原成红色甲臅,国内多见于食品、水卫生微生物学等方面的应用^[5-7],而报道表明 MTT 的敏感性高于 TTC,测定微生物细胞活性的效果优于 TTC^[6,8]。

MTT 比色分析法是由 Mosmann 在 1983 年首创,其原理是活细胞内的线粒体脱氢酶可以将 MTT(一种淡黄色的四甲基偶氮唑盐)还原成蓝紫色甲臅,而且形成的物质在 560—610 nm 下的光吸收值与细胞活性成正比关系^[9],而多数报道表明甲臅在 570 nm 下的光吸收值与细胞活性成正比关系最佳,以此选取 570 nm 测定吸光值^[10,11]。此方法具有简单、快速、灵敏、稳定的特点,克服了常规方法的不足

之处。MTT 方法目前大多用于免疫细胞及其他动物细胞的活性检测^[12-14],而在微生物细胞的活性检测中少见报道。本文以典型微生物革兰氏阴性大肠杆菌为代表,探讨了 MTT 比色法用于细菌细胞活性检测的可行性及实验条件。

1 材料与方法

1.1 菌株 将大肠杆菌菌株(HB101,武汉大学微生物实验室提供)培养于营养肉汤培养基中,37 恒温培养箱培养 18—24 h,5000 r/min 离心 10 min 去培养液,用 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS(磷酸缓冲液)洗涤两次后,将菌体溶于同样的 PBS 中,测定 OD₆₀₀ 约为 0.9 左右,稀释成 10 种不同的浓度梯度备用。

1.2 试剂 MTT(四甲基偶氮唑盐)溶于 0.1 mol/L pH 7.4 PBS 中,配制成浓度 0.5 mg/mL 和 5 mg/mL 的溶液,过滤除菌,4 冰箱避光保存。

1.3 MTT 比色法测定 将不同浓度的大肠杆菌稀释液加入 96 孔板中,每孔 200 μ L,各做三个平行,然后在每孔中加入 20 μ L 或 40 μ L 0.5 mg/mL MTT 或 5 mg/mL MTT,37 恒温箱中培养,10、20、30 min 后取出,用酶标仪测定 570 nm 下的吸光值。

1.4 数据分析 所有实验结果至少重复三次,取平均值,利用 origin 7.0 对其进行线性回归相关性分析。

收稿日期:2007-11-07;修订日期:2009-02-28

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2003CB716801)资助

作者简介:杨翠云(1979—),女,河南安阳人;博士;主要从事环境微生物学方面的研究。E-mail: yangcy29@163.com

通讯作者:刘永定, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

2 结果

2.1 不同浓度细菌细胞悬浮液选择

根据配制的 10 种不同浓度梯度的菌悬液,利用传统的平板倾注法测定细菌浓度,随后加入不同浓度 MTT 后,测定其 OD₅₇₀ 值,选取吸光值在 0—1.5 左右,舍弃吸光值大于 2 的浓度梯度。综合选取确定细胞悬浮液的浓度为 4.9 × 10⁷—4.9 × 10⁸ 个 /mL 范围,进一步确定 MTT 的用量及作用时间。

2.2 0.5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对结果的影响

图 1 显示了在细菌浓度为 4.9 × 10⁷—4.9 × 10⁸ 个 /mL 范围内,0.5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对 OD₅₇₀ 值的影响。其中图 1A 是 MTT 用量为 20 μL,反应时间分别在 10、20、30 min 时的 OD₅₇₀ 值,其均成明显的正相关关系,相关回归方程分别为: a: $y = 0.2239x - 0.0614$ $R^2 = 0.9558$; b: $y = 0.1769x + 0.03$ $R^2 = 0.9983$; c: $y = 0.2588x - 0.0225$ $R^2 = 0.9726$ 。图 1B 是 MTT 用量为 40 μL,反应时间分别在 10、20、30 min 时的 OD₅₇₀ 值,其均成明显的正相关关系,相关回归方程分别为: a: $y = 0.184x + 0.0408$ $R^2 = 0.9759$; b: $y = 0.2551x + 0.0632$ $R^2 = 0.9769$; c: $y = 0.3128x + 0.072$ $R^2 = 0.9804$ 。

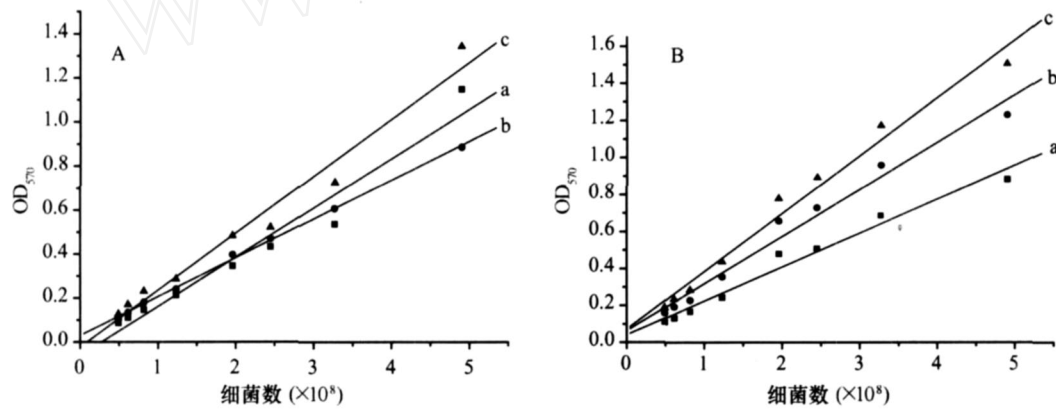


图 1 0.5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对 OD 值的影响
Fig. 1 The effect of 0.5 mg/mL MTT on OD₅₇₀ under different time and dosage
A: MTT 20 μL; B: MTT 40 μL; a: 10min; b: 20min; c: 30min

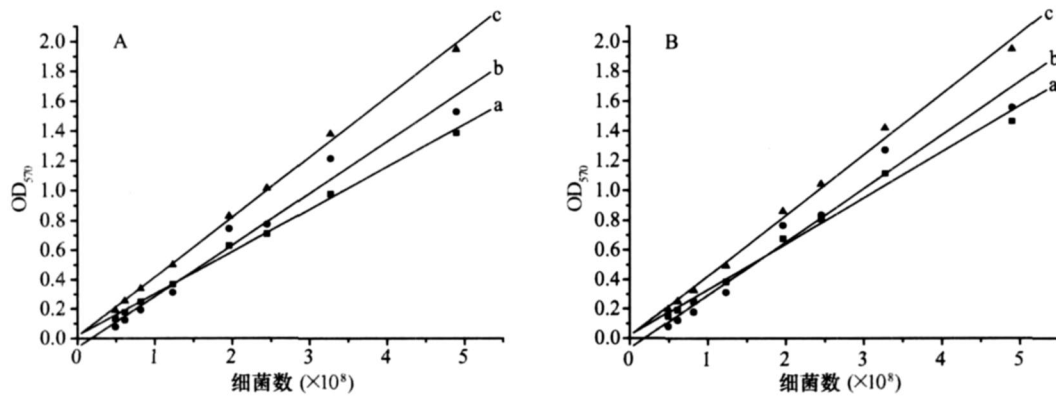


图 2 5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对 OD₅₇₀ 值的影响
Fig. 2 The effect of 5 mg/mL MTT on OD₅₇₀ under different time and dosage
A: MTT 20 μL; B: MTT 40 μL; a: 10min; b: 20min; c: 30min

2.3 5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对结果的影响

图 2 显示了在细菌浓度为 4.9 × 10⁷—4.9 × 10⁸ 个 /mL 范围内,5 mg/mL MTT 不同用量不同时间对 OD₅₇₀ 值的影响。其中图 2A 是 MTT 用量为 20 μL,

反应时间分别在 10、20、30 min 时的 OD₅₇₀ 值,其均成明显的正相关关系,相关回归方程分别为: a: $y = 0.2852x + 0.0187$ $R^2 = 0.9962$; b: $y = 0.3476x - 0.0623$ $R^2 = 0.9736$; c: $y = 0.4032x + 0.0143$ $R^2 = 0.998$ 。图 2B 是 MTT 用量为 40 μL,反应时间

分别在 10、20、30min 时的 OD_{570} 值,其均成明显的正相关关系,相关回归方程分别为: a: $y = 0.3097x + 0.0218$ $R^2 = 0.9896$; b: $y = 0.36x - 0.0666$ $R^2 = 0.9681$; c: $y = 0.4082x + 0.016$ $R^2 = 0.9951$ 。

3 讨 论

在有关微生物的工作中对其生长及活性的评价是非常重要的,比如说,外源复合物对微生物抗菌活性效应的评价。根据以往的报道及研究趋势表明,MTT方法对评价生物细胞活性具有快速、灵敏、稳定的特点,但目前为止,在动物学上的应用较为普遍,微生物学上的应用极少^[8, 15]。基于此,本实验选取了常用的和活细胞数量有良好线性关系的 MTT在 570 nm 波长、37 °C 培养下的吸光值探讨其对微生物细胞活性的效应,以期 MTT在微生物活性评价中提供参考依据^[6, 9, 15]。

影响 MTT评价微生物细胞活性的因素主要有:细胞悬浮液的浓度、MTT的用量及作用时间等。本实验在预期的工作中表明,细胞悬浮液浓度在 4.9×10^7 — 4.9×10^8 个/mL 范围内使其在 570nm 下具有良好的吸光值,在此范围内可以满足一般的检测需要。

试验选取常用的两个浓度梯度 0.5 和 5 mg/mL MTT在不同用量 (20、40 μ L) 不同时间 (10、20、30min) 对活细菌数评价效果的影响。实验表明在选用的细胞浓度范围内,所有选择 MTT用量在选择时间内其 OD_{570} 和细胞密度成良好的相关性, R^2 值均大于 0.9。对于 0.5 mg/mL MTT 浓度而言,用量 20 μ L 反应时间 20min 时 OD_{570} 和细胞密度的相关性最好, R^2 值为 0.9983,而其他反应时间以及 40 μ L 用量的选择反应时间内其 OD_{570} 和细胞密度的相关性回归显示 R^2 值均小于 0.99。对于 5 mg/mL MTT 浓度而言,用量 20 μ L 反应时间 10、30min 时 OD_{570} 值和细胞密度的相关性 R^2 值以及用量 40 μ L 反应时间 30min 时 OD_{570} 值和细胞密度的相关性 R^2 值均大于 0.99,具有良好的线性相关性,但均小于 0.9983。只有其中用量 20 μ L 反应时间 30min 时 OD_{570} 值和细胞密度的相关性 R^2 值为 0.998,接近 0.9983。这说明相同用量情况下使用 MTT 浓度增加时相应反应时间较长为好。

综上所述,试验结果表明 细菌浓度在 4.9×10^7 — 4.9×10^8 个/mL 范围内时, OD_{570} 值与活菌数呈良好的正相关。此测定范围完全可满足一般检测需要。 MTT 浓度 0.5 mg/mL、用量 20 μ L 反应时

间 20min 或 MTT 浓度 5 mg/mL、用量 20 μ L 反应时间 30min 时其 OD_{570} 值与活菌数间的相关性最好, R^2 值分别为 0.9983、0.998。此法经济、简便、快速、稳定、灵敏度高,且结果显示为活菌数量或微生物细胞的活性,具有传统细菌计数法所无法比拟的优点。前人的研究报道也表明 MTT 在进行细胞活性评价时优于其他比色方法,如 TTC、NT、XTT、刃天青等^[8],故在评价微生物细胞活性或进行活菌计数时可适当应用。

参考文献:

- [1] Brock TD, Madigan M T, Martinko J M, *et al* Biology of Microorganisms Prentice-Hall International, Englewood Cliffs 1994
- [2] Gellert G Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2000, 45: 87—91
- [3] Gellert G, Stommel A. Influence of microplate material on the sensitivity of growth inhibition tests with bacteria assessing toxic organic substances in water and waste water [J]. *Environ Toxicol*, 1999, 14: 424—428
- [4] Fuller M E, Streger S H, Rothmel R K, *et al* Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4486—4496
- [5] Shao Y. Application of TTC for colony enumeration of Bacteria in food [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 1996, 12(2): 121—122 [邵越. TTC 营养琼脂培养基在检测食品菌落总数中的应用. 预防医学情报杂志, 1996, 12(2): 121—122]
- [6] L Ü J L, Han D. Application of MTT and TTC for colony enumeration of *Lactobacillus acidophilus* [J]. *China Dairy Industry*, 2007, 35(4): 23—25 [吕嘉楠, 韩迪. MTT 和 TTC 在嗜酸乳杆菌菌落计数中的应用. 中国乳品工业, 2007, 35(4): 23—25]
- [7] Wang Z C, Ma X L. Application of TTC for colony enumeration of bacteria in food [J]. *Guangxi Journal of Preventive Medicine*, 2003, 9(1): 45 [王占成, 马晓莉. TTC 在食品菌落总数测定中的应用. 广西预防医学, 2003, 9(1): 45]
- [8] Jenny G, Mark H, Anna J, *et al* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50: 63—73
- [9] Mosmaan T. Colorimetric assay cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1): 55
- [10] Xing M L, Chen J P, Wang X F, *et al* Effect of okadaic acid on apoptosis in human amnion cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(4): 607—609 [邢鸣鸾, 陈加平, 王晓峰, 等. 大田软海绵酸对人胚胎羊膜细胞 FL 凋亡的影响. 水生生物学报, 2007, 31(4): 607—609]

- [11] Tan F X, Wang M, Wang W M. Optimization of MTT assay for the determination of cytotoxicity of Cd^{2+} and Cr^{6+} in kindy cell line of grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (3): 371—374 [谭凤霞, 王敏, 王卫民. 利用草鱼 C K细胞和 MTT法测定镉和铬毒性试验的优化. 水生生物学报, 2006, **30** (3): 371—374]
- [12] Adam B. In vitro effects of staphylococcal leukocidin LukE/Luk-Don the proliferative ability of lymphocytes isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**: 656—659
- [13] Beatriz M, Ricardo P T. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells [J]. *Life Sciences*, 2001, **68**: 2025—2036
- [14] Piia P, Jukka P, Kati H, et al. Interactions between *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* can induce apoptosis and cell cycle arrest in mouse RAW264. 7 macrophages [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **202**: 278—288
- [15] Camichael J, DeGraff W, Gazdar A, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing [J]. *Cancer Res*, 1987, **47**: 936—942

EVALUATION OF MTT METHOD FOR QUANTIFICATION OF MICROBIAL CELL VIABILITY IN MICROPLATES

YANG Cui-Yun^{1,2} and LIU Yong-Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003)

Abstract: In the study of microbiology, the activity and the number of microbial cells are often determined to reflect the growth of microbial cells. The conventional methods usually include plate culture method, the cell number of automatic analyzer, turbidity, dry cell weight and biological fluorescence method, and so on. Among these conventional methods, the plate culture method is cumbersome, time-consuming and poor reproducibility, and most importantly, it can not truly reflect the growth of bacteria, furthermore, it is not suitable for bigger quantities experiment. For the other conventional methods, they even could not distinguish between live and dead cells, and the number and activity of cells are vulnerable to the medium and metabolites. In recent years, MTT colorimetric method is used to evaluate the microbial cell activity, which is more simple, rapid, sensitive and stable compared with the conventional methods. The principle is that the living cells can reduce MTT to a blue-violet matter by mitochondrial dehydrogenase in cells, the matter has the optical absorption value from 560 nm to 610 nm, and most reports indicate that blue-violet matter have the best optical absorption value at 570 nm. MTT colorimetric method was always used to detect the activity of immune cells and other animal cells, but it was rarely reported in the detection of the activity of the microbial cells. In this paper, MTT colorimetric method for quantification of microbial cell viability or cell growth in microplates was discussed. *Escherichia coli* was employed to determine the conditions of assay, which included the feasibility, reaction periods, microbial cell number, the concentration of MTT and so on. It was found that MTT had a high correlation between the values of OD_{570} and the microbial cell number, which was from 4.9×10^7 cells/mL to 4.9×10^8 cells/mL. The correlation was the best when bacteria was treated with MTT 0.5 mg/mL of 20 μL for 20 min, and the correlation and regression equation was $y = 0.1769x + 0.03$, $R^2 = 0.9983$; when bacteria was treated with MTT 5 mg/mL of 20 μL for 30 min, the correlation and regression equation was $y = 0.4032x + 0.0143$, $R^2 = 0.998$. MTT colorimetric method is economic, simple, fast, stable, high sensitive, and the results can show the number of live micro-organisms or cells activity clearly. Previous studies also showed that MTT colorimetric method was superior to other color, such as the TTC, NT, XTT, blade, etc. among evaluation methods of cell viability.

Key words: MTT colorimetry; *Escherichia coli*; Viability