



۱۳ آبان سالروز شهادت ۵۶ دانش آموز و به گفته پروفیسور سربرنی (محقق انگلیسی) روز حمام خون گرامی باد

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

# تست سنجش MTT

دکتر سیده زهرا مطلوبی

دکتری ایمنی شناسی

استادیار دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

# مقدمه

یکی از پرکاربردترین تکنیک‌های آزمایشگاهی برای بررسی میزان پاسخ دهی سلول‌ها به ترکیبات و محرک‌های خارجی

## ● موارد استفاده :

- محاسبه میزان تکثیر سلول‌ها در پاسخ به محرک‌های رشد.
- محاسبه زمان دوبرابر شدن سلول‌ها.
- محاسبه میزان سمیت مواد و سایر محرک‌ها بر روی رده‌های سلولی مختلف
- تعیین نوع تاثیر یک ماده یا محرک مطالعه نشده بر روی رده‌های سلولی مختلف

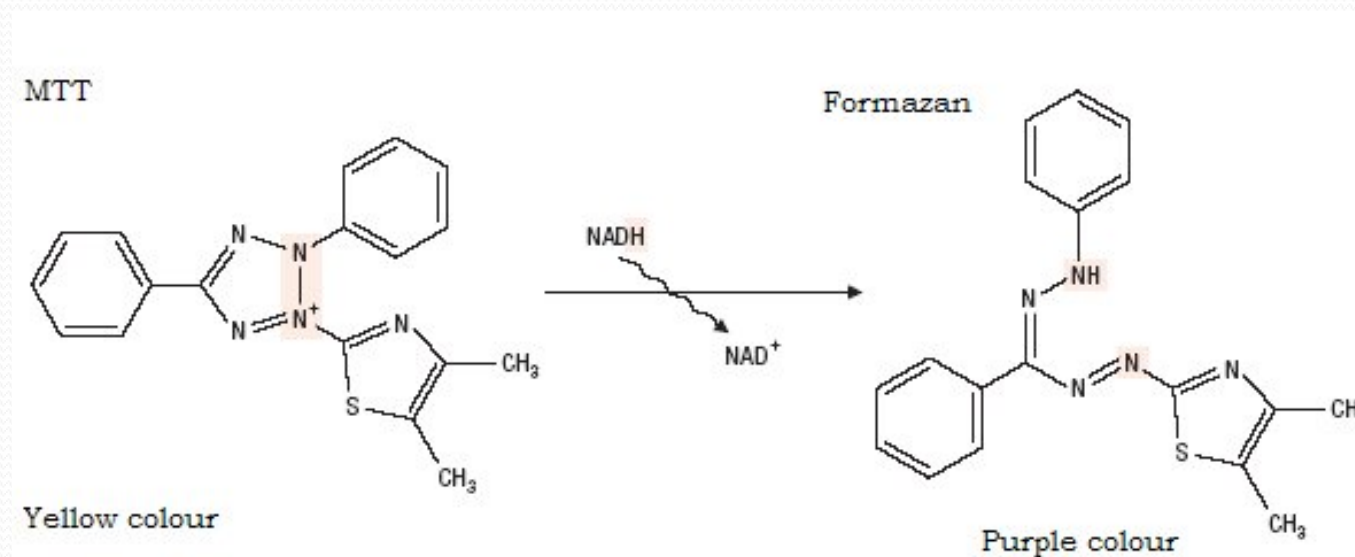
# مقدمه

## مزایا:

- با دقت و حساسیت بالاتر نسبت به استفاده از تریپان بلو.
- ایمن نسبت به روش هایی که در آن از ماده رادیواکتیو ( تیمیدین نشان دار) استفاده می کنند.
- ارزان، آسان و نسبتا سریع.

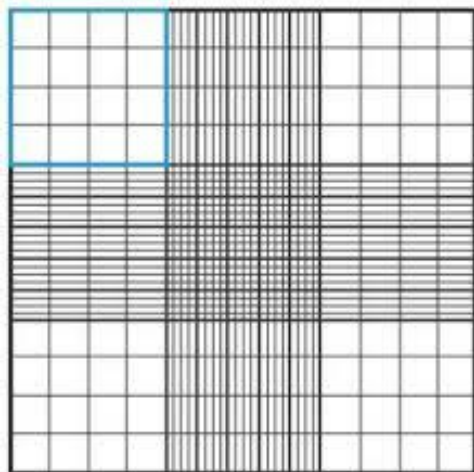
# اساس روش

احیا ماده زرد رنگ و محلول در آب MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری به بلور های بنفش رنگ و نامحلول فورمازان



# روش انجام

۱- ریختن سلولها (seed کردن) در پلیت ۹۶ خانه صاف.



تعداد سلول ها می بایست با توجه به مدت زمان تیمار و سرعت رشد سلول تعیین شود.

۲- تیمار سلول

باید توجه داشت که استرس ناشی از seed کردن برطرف شده باشد.

۳- افزودن محلول MTT

محلول MTT به صورت ۵ میلی گرم در یک میلی لیتر (سی سی) بافر فسفات تهیه می گردد.

به نسبت ۱۰٪ به محیط (ترجیحا فاقد سرم) اضافه می شود.

# روش انجام

۴- انکوباسیون جهت انجام واکنش و تشکیل بلور فورمازان

مدت انکوباسیون به میزان متابولیسم سلول بستگی دارد

۵- اضافه کردن حلال بلور های فورمازان

دی متیل سولفوکسید (DMSO) ، ایزوپروپانول، محلول 10% سدیم دودسیل سولفات (SDS) در اسید

کلریدریک 10 میلی مولار.

بسته به نوع سلول پاسخ دهی به حلال ها ممکن است متفاوت باشد.

# روش انجام

۶ - خوانش با الایزا ریدر

طول موج بین ۵۴۰ تا ۶۰۰ (بهترین ۵۷۰)

۷- محاسبه درصد سلول‌های زنده

$$\left( \frac{\text{میانگین جذب نوری سلول های گروه تیمار شده}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های گروه کنترل}} \right) \times 100$$



# روش انجام

نکات مهم

- ۱- بهترین محدوده میزان رنگ برای گروه کنترل بین ۰/۵ تا ۱/۵ است ( ۰/۷ تا ۱/۲۵ )
- ۲- جهت عدم برداشت بلورهای فورمازان تشکیل شده، پلیت را سانتریفیوژ کنید.
- ۳- توجه به کنترل منفی و مثبت.
- ۴- دقت در ضریب خطای بین چاهک‌ها.

# دیگر نمک‌های تترازولیوم جانشین MTT

**XTT** (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)

**XTT 492 nm**

**MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

**MTS 490 nm.**

**WST** (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)

**WST-1 420-480 nm.**

# هم‌کشتی سلول‌های ایمنی و سرطانی

- سرطانی کردن موش
- جدا کردن طحال
- شستشوی طحال با سرم فیزیولوژی و جداسازی لنفوسیت‌ها
- اضافه کردن لنفوسیت‌های جدا شده به نسبت ۱۰ به ۱ به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه محتوی سلول سرطانی
- قرار دادن در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت
- برداشت سوپ رویی برای بررسی سایتوکاین‌ها به روش الایزا

# هم‌کشتی سلول‌های ایمنی و سرطانی

- جدا کردن طحال موش سالم
- شستشوی طحال با سرم فیزیولوژی و جداسازی لنفوسیت‌ها
- اضافه کردن لنفوسیت‌های جدا شده به نسبت ۱۰ به ۱ به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه محتوی سلول سرطانی
- قرار دادن در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت
- انجام تست MTT برای این پلیت و پلیت محتوی سلول سرطانی و لنفوسیت‌های جدا شده از موش سرطانی و مقایسه نتایج جهت برآورد تکثیر سلول‌های ایمنی و مرگ سلول‌های سرطانی



# با دستور از توجبه شما

۱۳ آبان سالروز تسخیر لانه جاسوسی آمریکا توسط دانشجویان گرامی باد

