

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ
الرَّحِيمِ

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

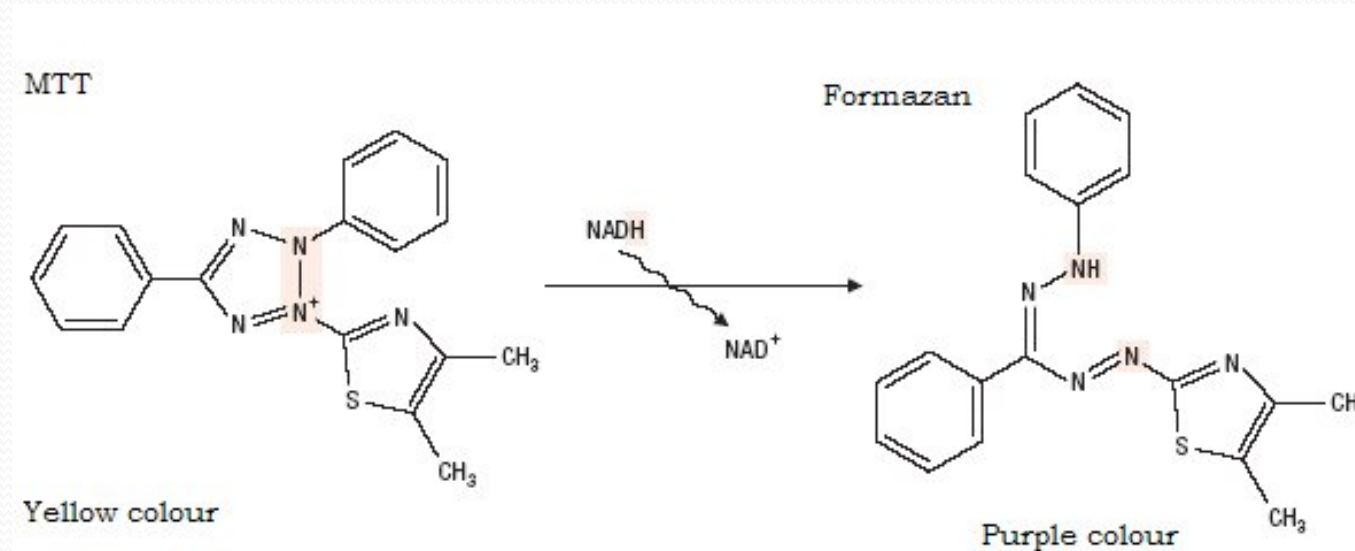
مقدمه

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 نسبتاً سریع.

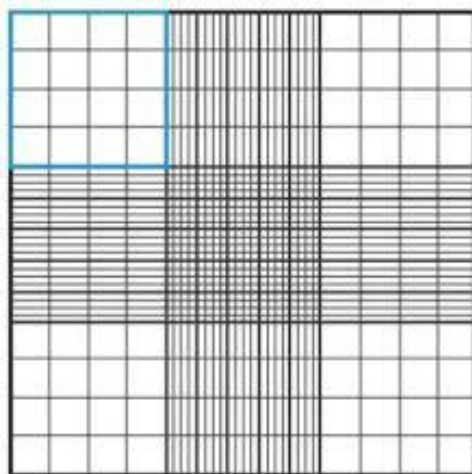
اساس روش

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.

محاسبه IC50

• IC50=Half maximal inhibitory concentration

• مفهوم و کاربرد

با شکر از تو به شما

