کیت MTT

فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-2004

توصیـف محصـول

یک کیت حساس برای اندازه گیری تکثیر سلولی بر پایه احیای MTT است. اساس این تست، احیای MTT به ماده رنگی نامحلول فرمازان از فعالیت گلیکولیتیک در داخل سلول است و به حضور NADH و NADPH بستگی دارد (بنابراین با فعالیت متابولیک میتوکندری ارتباط دارد). در سلول‌های بطور فعال تکثیرشونده، افزایش تبدیل MTT از طریق اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می‌شود. مقایسه این مقدار با مقدار بدست آمده از یک کنترل فاقد تیمار، باعث افزایش نسبی تکثیر سلولی می‌شود که ناشی از فاکتورهای تروفیک، مهارکننده‌های رشد، یا القا کننده‌ها /مهارکننده‌های آپوپتوزیس بوده و قابل اندازه گیری است. بطور معکوس، در سلول‌هایی که دچار آپوپتوزیس می‌شوند، احیای MTT کاهش می‌یابد که بیانگر مرگ سلولی است.

محتویات کیت

۱. پودر MTT: یک ویال حاوی ۲۵ میلی گرم پودر MTT
۲. حلال: یک بطری حاوی ۳۰ میلی لیتر محلول DMSO
۳. فیلترسرنگی: ۱ عدد
۴. میکروتیوب امبر: ۵ عدد
۵. محیط RPMI ۱۶۴۰: ۱۰۰ میلی لیتر محلول آماده مصرف

آماده‌سازی محلول کیت

۱. با افزودن ۵ میلی لیتر از محیط RPMI1640 (موجود در کیت) به ویال ۲۵ میلی گرمی پودر MTT، محلول استوک MTT ۱۲ میلی مولار بسازید.
۲. با ورتکس یا سونیکاسیون مخلوط کنید تا حل شود.
۳. پارتیکل ها را از طریق فیلتراسیون یا سانتریفوژ حذف کنید.
۴. از محلول آماده شده به میزان برابر در ۵ ویال امبر تقسیم کنید.
۵. هر ویال MTT معرف لازم برای ۱۰۰ تست را دارد (۱۰ لاندا از محلول استوک برای هر چاهک).
۶. پس از تهیه، محلول کاری MTT را می‌توان برای ۴ هفته در ۴ درجه سانتیگراد و دور از نور نگهداری کرد. مابقی استوک‌ها را در ۲۰- درجه نگهداری کنید.

روش استفاده (توصیه)

برخی داروها و عصاره‌های گیاهی ممکن است با تست MTT تداخل کنند. قبل از آغاز آزمایش از این موضوع اطمینان حاصل کنید.

تعیین تعداد بهینه سلول

این کار برای هر نوع سلول تنها باید یکبار انجام شود.

تلقیح اولیه سلول

۱. سلول‌ها تا تقریباً ۸۰ درصد کانفلوانسی در یک فلاسک یا پلیت کشت سلولی کشت دهید.
توجه: برای دستیابی به نتایج بهتر، از تعداد پاساژ کم استفاده کنید.

۱. سلول‌های معلق را با سانتریفوژ جمع کنید (۵ دقیقه در g ۲۰۰). سلول‌های چسبیده باید بوسیله ترپسینه کردن یا تراشیدن آزاد شوند. سپس، با سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با دور g ۵۰۰ در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد، سلول‌ها را رسوب دهید و مایع رویی را دور بریزید.

۲. سلول‌ها را با سوسپانسه کردن مجدد در ۵ میلی لیتر PBS (فاقد کلسیم و منیزیم) یا محیط کشت سلولی شستشو دهید. سپس، با سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با دور g ۵۰۰ در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد، سلول‌ها را رسوب دهید و مایع رویی را دور بریزید.

۳. سلول‌ها را با غلظت ۱۰۶ × ۵ سلول در میلی لیتر در محیط کشت حل کنید. به اندازه‌ای سلول بردارید و شستشو دهید که بتوانید تعداد کافی سلول برای تهیه ۱۰–۸ رقت دو برابر متوالی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر سلول در هر چاهک در سه تکرار داشته باشید

۴. با استفاده از لوله‌های کشت ۵ میلی لیتری، سلول‌ها را بصورت سریال رقیق کنید. رقت از $۱۰^{۶}$ × ۵ تا $۱۰^{۳}$ × ۵ سلول در میلی لیتر باید برای اکثر انواع سلول‌ها مناسب باشد. به عنوان مثال، ۱۰ رقت دو برابری از ۱۰۶ × ۵ سلول در میلی لیتر منجر به غلظت‌های از $۱۰^{۶}$ × ۲/۵ تا $۱۰^{۳}$ × ۴/۸۸ سلول در میلی لیتر می‌شود (به جدول زیر مراجعه کنید). برای این مورد، باید ۰/۸ میلی لیتر از سلول‌های با غلظت $۱۰^{۶}$ × ۵ سلول در میلی‌لیتر را برای رسیدن به تعداد $۱۰^{۶}$ × ۴ سلول بردارید (به جدول مراجعه فرمایید).

	Label Tubes (cells/mL)	Add Cell Culture Medium	Add Cells
1	5.00×10^6	___	400 µL of 5.00×10^6 cells/mL stock
2	2.50×10^6	100 µL	400 µL of 5.00×10^6 cells/mL stock
3	1.25×10^6	100 µL	400 µL of 2.50×10^6 cells/mL stock
4	6.25×10^5	100 µL	400 µL of 1.25×10^6 cells/mL stock
5	3.13×10^5	100 µL	400 µL of 6.25×10^5 cells/mL stock
6	1.56×10^5	100 µL	400 µL of 3.13×10^5 cells/mL stock
7	7.81×10^4	100 µL	400 µL of 1.56×10^5 cells/mL stock
8	3.91×10^4	100 µL	400 µL of 7.81×10^4 cells/mL stock
9	1.95×10^4	100 µL	400 µL of 3.91×10^4 cells/mL stock
10	9.77×10^3	100 µL	400 µL of 1.95×10^4 cells/mL stock
11	4.88×10^3	100 µL	400 µL of 9.77×10^3 cells/mL stock
12	Medium Control	100 µL	----

۵. سلول‌ها را به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک کشت دهید. سه چاهک کنترل تنها حاوی محیط کشت سلول باشد.

توجه: برای به حداقل رساندن edge effect، توصیه می‌شود که اولین و آخرین چاهک را با محیط کشت پر کنید تا رطوبت برای اولین و آخرین چاهک حفظ شود.

توجه: از پلیت ۹۶ چاهک ته گرد برای سلول‌های غیرچسبیده به بستر و پلیت ۹۶ چاهک ته صاف برای سلول‌های چسبیده به بستر استفاده کنید.

۶. سلول‌ها را برای ۶ تا ۴۸ ساعت انکوبه کنید. سلول‌ها ریکاوری و اتصال مجدد به بستر (در صورت چسبنده بودن) به زمان نیاز دارند. این زمان برای هر نوع سلول متفاوت است. به طور کلی، ۱۲ تا ۱۸ ساعت کافی است.

رنگ‌آمیزی MTT

۱. ده میکرولیتر محلول استوک MTT به هر چاهک اضافه کنید.

۲. پلیت را ۴–۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کنید. با استفاده از یک میکروسکوپ، بصورت مداوم سلول‌ها را برای بروز نقاط رسوب داخل سلولی بررسی کنید. برخی از انواع سلول‌ها به زمان بیشتری حتی تا ۲۴ ساعت نیاز دارند.

۳. با مشاهده رسوب واضح ارغوانی زیر میکروسکوپ، ۱۰۰ میکرولیتر معرف دترجنت (DMSO) به هر چاهک از جمله چاهک کنترل اضافه کنید. نیاز به برداشتن MTT یا محیط قبل از افزودن حلال نیست. به هیچ وجه تکان ندهید (شیکینگ نکنید).

۴. پلیت را با کاور بپوشانید و برای دست کم ۲ ساعت تا یک شبانه روز در ۲۴–۱۸ درجه سانتیگراد قرار دهید. می‌تواند جذب نمونه‌ها را پس از ۲ ساعت قرائت کرد اما اگر جذب پایین بود و هنوز کریستال باقی مانده بود پلیت را به تاریکی برگردانده و برای مدت بیشتری انکوبه کنید. انکوباسیون در دمای اتاق (۲۴–۱۸ درجه) کافی است اما انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه زمان حل شدن را کاهش می‌دهد.

جمع آوری داده، محاسبه، و تفسیر

۱. کاور روی پلیت را بردارید و جذب چاهک‌ها از جمله بلانک را در طول موج ۵۷۰ نانومتر با طول موج رفرانس ۶۵۰ نانومتر اندازه گیری کنید. اگر فیلتر ۵۷۰ نانومتر در دسترس نبود، جذب می‌تواند با هر فیلتر دیگری در طول موج ۵۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر خوانده شود. بلانک ها باید جذب نوری ۰,۱ ۰ بدهند.

۲. میانگین خوانش های سه گانه را تعیین کنید و آن را میانگین بدست آمده برای بلانک کم کنید. نمودار جذب در محور y را علیه تعداد سلول در میلی لیتر در محور x رسم کنید. تعداد سلولی انتخاب کنید که جذب ۰/۷۵ تا ۱/۲۵ داده و در ناحیه خطی منحنی قرار گیرد.

آزمون MTT برای نمونه‌های آزمایشگاهی

تلقیح اولیه سلول

۱. سلول‌ها را با غلظت بهینه تعیین شده در مرحله قبل کشت دهید. برای هر متغیر، سه چاهک، هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر کشت دهید. مطمئن شوید که آنقدر چاهک کشت داده‌اید که کنترل‌های بر پایه سلول و سه چاهک برای محیط کشت خالی داشته باشید.

توجه: به طور کلی، سلول‌هایی که با تراکم ۵۰۰۰ تا ۱۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک تلقیح شده‌اند ظرف ۴۸– ۷۲ ساعت به تراکم جمعیت مطلوب خواهند رسید.

۲. سلول‌ها را انکوبه کنید تا ریکاوری شده و دوباره به بستر متصل شوند (در صورت چسبنده بودن) و با توجه به پروتکل آزمایشگاهی ست آپ شده خود، آن‌ها را تیمار کنید.

تیمار

۳. برای سلولهای چسبیده به بستر، محیط را بردارید، با PBS شستشو دهید و با محیط آماده مصرف RPMI1640 (موجود در کیت) جایگزین کنید.

در مورد سلول‌های غیرمتصل به بستر، میکروپلیت را سانتریفوژ کنید و سلول‌ها را رسوب دهید. با دقت و تا حد ممکن محیط را بردارید و آن را با ۱۰۰ میلی لیتر محیط RPMI1640 جایگزین کنید.

توجه: حضور فنول قرمز در آزمایش نهایی بشدت بر نتایج تأثیر می‌گذارد. در صورت امکان اکیداً توصیه می‌شود سلول‌ها در محیط فاقد فنول قرمز (موجود در کیت) کشت شود.

۴. سلول‌ها را با غلظت‌های مختلف ترکیب مورد نظر برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور CO_2 تیمار کنید.

رنگ آمیزی MTT

۵. ۱۰ لاندا معرف MTT به هر چاهک از جمله چاهک‌های کنترل اضافه کنید.

توجه: اگر بیش از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلول برای هر چاهک استفاده شد میزان MTT را به همان نسبت افزایش دهید. برای مثال برای ۲۵۰ میکرولیتر محیط، ۲۵ میکرولیتر معرف MTT استفاده کنید.

توجه: بطور جایگزین، انکوباسیون نهایی با MTT را می‌توان پس از تعویض سلول‌ها با یک محیط فاقد فنل رد انجام داد.

توجه: یک کنترل منفی آماده کنید (۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT اضافه شده به ۱۰۰ میکرولیتر محیط خالی).

۶. پلیت را حدود ۴–۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کنید. با استفاده از یک میکروسکوپ، بصورت مداوم سلول‌ها را برای بروز نقاط رسوب داخل سلولی بررسی کنید.

برخی از انواع سلول‌ها به زمان بیشتری حتی تا ۲۴ ساعت نیاز دارند. در غلظت‌های خیلی بالا (مانند بالاتر از ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک) زمان انکوباسیون تا ۲ ساعت کوتاه می‌شود.

۷. با مشاهده رسوب واضح ارغوانی زیر میکروسکوپ، ۱۰۰ میکرولیتر معرف دترجنت (DMSO) به هر چاهک از جمله چاهک کنترل اضافه کنید. نیاز به برداشتن MTT یا محیط قبل از افزودن حلال نیست. به هیچ وجه تکان ندهید (شیکینگ نکنید).

۸. پلیت را با کاور بپوشانید و برای دست کم ۲ ساعت تا یک شبانه روز در ۲۴–۱۸ درجه سانتیگراد قرار دهید. می‌تواند جذب نمونه‌ها را پس از ۲ ساعت قرائت کرد اما اگر جذب پایین بود و هنوز کریستال باقی مانده بود پلیت را به تاریکی برگردانده و برای مدت بیشتری انکوبه کنید. انکوباسیون در دمای تاق (۲۴–۱۸ درجه) کافی است اما انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه زمان حل شدن را کاهش می‌دهد.

۹. کاور روی پلیت را بردارید و جذب چاهک‌ها از جمله بلانک را در طول موج ۵۷۰ نانومتر با طول موج رفرانس ۶۵۰ نانومتر اندازه گیری کنید. اگر فیلتر ۵۷۰ نانومتر در دسترس نبود، جذب می‌تواند با هر فیلتر دیگری در طول موج ۵۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر خوانده شود. بلانک ها باید جذب نوری ۰/۱ بدهند.

توجه: شما می‌توانید رنگ تبدیل شده را با ۲ میلی لیتر ایزوپروپانول اسیدی حل کنید (اسید هیدروکلریک ۰/۰۴ مولار در ایزوپروپانول مطلق با نسبت ۱:۱۰۰، بویژه زمانی که رنگ MTT تداخل با تیمار تداخل می‌کند. چندین بار پیپت کنید تا مطمئن شوید که رنگ تبدیل شده کاملاً حل شده است. برای ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید، به آرامی مخلوط کنید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

جمع آوری داده، محاسبه، و تفسیر

۱. میانگین خوانش های سه گانه را تعیین کنید و آن را میانگین بدست آمده برای بلانک کم کنید. نمودار جذب در محور y را علیه تعداد سلول در میلی لیتر در محور x رسم کنید. تعداد سلول انتخاب شده باید در ناحیه خطی منحنی قرار گیرد و جذب ۰/۷۵ تا ۱/۲۵ بدهد.

توجه: شرایط کشت سلولی می‌تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد و بنابراین در هنگام تجزیه و تحلیل داده‌ها باید مورد توجه قرار گیرد. عمر محیط کشت، تعداد پاساژها، و جزئیات محیط رشد هر یک می‌تواند عامل مهمی باشد. بعلت اختلاف طبیعی در احتیاجات و سرعت رشد رده‌های سلولی مختلف، نمی‌توان دستورالعمل واحدی برای آماده سازی همه سلول‌ها فراهم کرد.

توجه: نمودار بدست آمده از روش اول (تعیین تعداد سلول بهینه) باید یک منحنی فراهم کند که دارای یک بخش خطی است. انتخاب تعداد سلولی که در بخش خطی منحنی قرار بگیرد (یعنی مقادیر بین ۰/۷۵ تا ۱/۲۵) امکان اندازه گیری هم تحریک و هم مهار تکثیر سلولی را فراهم می‌کند.

توجه: اگر مقدار جذب نمونه‌های آزمایشگاهی بیشتر از سلول‌های کنترل منفی باشد، نشان دهنده افزایش تکثیر سلولی است. بطور جایگزین، اگر میزان جذب نمونه‌های آزمایشگاهی کمتر از کنترل منفی باشد، نشان دهنده کاهش میزان تکثیر سلولی یا کاهش میزان کلی حیات سلولی است.

توجه: در بعضی موارد نادر، افزایش تکثیر سلولی ممکن است با مرگ سلول جبران شود. بنابراین، علایم مرگ سلولی را می‌توان از تغییرات مورفولوژیکی استنباط کرد.

۲. مقادیر جذب کمتر از سلولهای کنترل نشان دهنده کاهش میزان تکثیر سلولی است. در مقابل، میزان جذب بالاتر نشان دهنده افزایش تکثیر سلولی است. به ندرت، ممکن است افزایش تکثیر با مرگ سلول جبران شود.

نگهداری

پس از تحویل، کیت در ۴ درجه سانتیگراد و دور از نور نگهداری شود. در صورت نگهداری صحیح، محتویات کیت برای ۱۲ ماه پایدار می‌ماند.

منـابع

1. van de Loosdrecht, A.A., et al. J. Immunol. Methods 174: 311-320, 1994.
2. Ferrari, M., et al. J. Immunol. Methods 131: 165-172, 1990.
3. Gerlier, D., and N. Thomasset. J. Immunol. Methods 94: 57-63, 1986.
4. Alley, M.C., et al. Cancer Res. 48: 589-601, 1988.
5. Mosmann, T. J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983.
6. Zangani, Danilo, et al. "Adipocyte–Epithelial Interactions Regulate thein VitroDevelopment of Normal Mammary Epithelial Cells." Experimental Cell Research 247.2 (1999): 399-409.
7. Razavi, Shahnaz, et al. "Extremely low-frequency electromagnetic field influences the survival and proliferation effect of human adipose derived stem cells." Advanced biomedical research 3 (2014).

ارجـاعـات

1. Sattary, Mansoureh, et al. "Incorporation of nanohydroxyapatite and vitamin D3 into electrospun PCL/Gelatin scaffolds: The influence on the physical and chemical properties and cell behavior for bone tissue engineering." Polymers for Advanced Technologies 29.1 (2018): 451-462.
2. Dianat, S., et al. "ctDNA binding affinity and in vitro antitumor activity of three Keggin type polyoxotungestates." Journal of Photo chemistry and Photobiology B: Biology 124 (2013): 27-33.
3. Dianat, Somayeh, et al. "In vitro antitumor activity of free and nano-encapsulated Na5 [PMo10V2O40]• nH2O and its binding prop erties with ctDNA by using combined spectroscopic methods." Journal of inorganic biochemistry 152 (2015): 74-81.
4. Poormontaseri, Maryam, et al. "The effects of probiotic Bacillus subtilis on the cytotoxicity of Clostridium perfringens type a in Caco-2 cell culture." BMC microbiology 17.1 (2017): 150.

5. Amini-Sarteshnizi, Nematallah, et al. "Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line." Journal of HerbMed Pharmacology 4 (2015).
6. Simonian, Miganoosh, et al. "Evaluation of miR-21 Inhibition and its Impact on Cancer Susceptibility Candidate 2 Long Noncod ing RNA in Colorectal Cancer Cell Line." Advanced biomedical research 7 (2018).
7. Teimouri, Aref, et al. "Anti-Toxoplasma activity of various molecular weights and concentrations of chitosan nanoparticles on tachyzoites of RH strain." International journal of nanomedicine 13 (2018): 1341.
8. Ebadi, Parimah, and Mehdi Fazeli. "Anti-photoaging potential of propolis extract in UVB-irradiated human dermal fibroblasts through increasing the expression of FOXO3A and NGF genes." Biomedicine & Pharmacotherapy 95 (2017): 47-54.
9. Mohammadian-Hafshejani, A., et al. "In vitro evaluation of antiviral activity of essential oil from Zataria multiflora Boiss. against Newcastle disease virus." Journal of HerbMed Pharmacology 4 (2015).
10. Nourmohammadi, Jhamak, et al. "Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications." Materials Science and Engineering: C 76 (2017): 951-958.