KIAZIST Life Sciences

کیت ارزیابی سمیت و Viability سلول

MTT Assay Kit

KMTT-500

اصول کار

MTT یکی از مشتقات نمک تترازولیوم می باشد که به سلول های زنده نفوذ کرده و توسط آنزیم های NAD(H)P دهیدروژنازها احیا شده و تولید ماده رسوبی Formazan می کند. کریستال های Formazan پس از حل شدن توسط حلال خود، تولید رنگ بنفش کرده و در طیف 550-600 nm جذب دارند. افزایش میزان جذب رابطه مستقیم با میزان بقا سلول دارد که این نیز به نوبه خود با میزان سمیت سلولی در ارتباط می باشد.

کاربردها:

- ارزیابی تکثیر سلولی در پاسخ به عوامل رشد، سایتوکین ها و ....
- ارزیابی سمیت سلولی و رشد سلول در مواجهه با داروهای ضد سرطان و مواد گیاهی
- ارزیابی اثر آنتی بادی ها و میانجی های فیزیولوژیک بر مهار رشد سلول

اطلاعات کلی و محتویات

نگهداری و حمل:

در دمای 20°C- و در تاریکی نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می شود.

مقدار نمونه پیشنهادی

نمونه	حداکثر	مطلوب
Cells	400000	2000-30000

محتویات کیت

شماره	ماده	مقدار/تعداد
1	MTT Reagent	5 mL
2	Solubilizer	50 mL
3	Protocol Booklet	1 PCs

موارد مورد نیاز اضافی

- سمپلر ۸ کاناله متغیر
- سرسمپلر مناسب
- هود لامینار
- انکوباتور $37^{\circ}C$ به همراه CO_2
- سانتریفیوژ
- محیط و مواد کشت سلول مورد نظر
- آب دیونیزه
- فویل آلومینیومی

نکته: قبل از شروع با یک نمونه جهت مشخص ساختن مقدار نمونه به صورت پایلت (Pilot) انجام شود

*قبل از انجام تست کل پروتکل را بخوانید

آماده سازی نمونه

سلول های چسبنده (متفاوت بسته به نوع سلول):

۱- پس از تریپسینه کردن سلول و شمارش آنها، به میزان مورد نیاز در هر چاهک (۱۰۰۰-۱۲۰۰۰) سلول کاشته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه کنید تا به درجه اشباع ۸۰ تا ۹۰٪ برسند.

۲- در ادامه، محیط رویی را خارج کرده سپس مداخله خود را شروع کنید و در هر چاهک حجم نهایی محیط کشت کامل را به 200 µL برسانید. سپس به مرحله انجام آزمایش مراجعه کنید.

سلول های معلق (متفاوت بسته به نوع سلول):

۱- پس از سانتریفیوژ سلول ها، سوپرناتانت را دور ریخته و سلول شمارش کنید. به میزان مورد نیاز در هر چاهک (۱۰۰۰-۱۲۰۰۰) سلول ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه کنید تا به درجه اشباع ۸۰ تا ۹۰٪ برسند.

۲- در ادامه، مداخله خود را شروع کنید و در هر چاهک حجم نهایی محیط کشت کامل را به 200 µL برسانید. سپس به مرحله انجام آزمایش مراجعه کنید.

آماده سازی کیت و استاندارد

MTT Reagent:

محلول آماده به کار می باشد. دمای مناسب برای عمر بلند مدت (حداقل یک سال) 20˚C- می باشد. از همین رو توصیه می شود پس از آب کردن محلول برای اولین بار، باقیمانده را تقسیم بندی کرده (Aliquot) و در دمای 20˚C- مجددا فریز کنید.

Solubilizer:

محلول آماده به کار می باشد. از آب شدن محلول و عدم وجود رسوب اطمینان حاصل شود در دمای 4˚C به مدت یک سال پایدار می باشد.

نحوه انجام آزمایش

توجه: رنگ فنول رد و FBS موجود در محیط کشت بر آزمایش به میزان کمی تاثیر گذار است.

- برای سلول های چسبنده محیط کشت را خالی کرده سپس µL 100 محیط کشت مناسب بدون وجود سرم (FBS) به آن اضافه کنید.

- برای سلول های معلق در صورت امکان پلیت ۹۶ خانه را سانتریفیوژ کنید و سوپرناتانت را دور بریزید و سپس µL 100 محیط کشت مناسب بدون وجود سرم (FBS) به آن اضافه کنید. در صورت عدم امکان، به مرحله بعد بروید.

بلانک محیط کشت: جهت حذف اثر پس زمینه به دو چاهک بدون سلول از محیط کشت مورد استفاده µL 100 اضافه کنید.

- هر نمونه حداقل به صورت دوتایی (Duplicate) انجام شود.

۱- به هرچاهک پس از آماده سازی نمونه µL 10 از محلول MTT Reagent اضافه کنید و خوب هم بزنید (Shaking).

۲- سپس در دمای ایده آل سلول مورد نظر (معمولا 37˚C، 5% CO_2) به مدت ۳ تا ۴ ساعت بسته به فعالیت دهیدروژنازی سلول انکوبه کنید.

۳- پس از این زمان، محتویات چاهک را خالی کرده و µL 100 از محلول Solubilizer اضافه کرده و روی آنرا با فویل آلمنیومی بپوشانید و با اوربیتال شیکر به مدت ۱۵ دقیقه خوب هم بزنید (Shaking) تا ذرات Formazan حل شوند.

۴- جذب پلیت در طول موج ۵۹۰-۵۵۰ نانومتر خوانده شود.

نحوه محاسبه

- مقدار میانگین جذب بلانک محیط کشت را از هر نمونه کم کنید.

- رسم منحنی رشد سلولی: با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل میانگین جذب را در محور Y ها و غلظت سلولی را در محور X ها قرار دهید.

- رسم منحنی پاسخ-دوز: با استفاده از یک نرم افزار مناسب مانند اکسل میانگین جذب را در محور Y ها و دوز ماده یا دارو مورد نظر را در محور X ها قرار دهید.

*بهترین غلظت مورد نظر در جذب ۰/۷۵ تا ۱/۲۵ منحنی رشد سلولی می باشد.

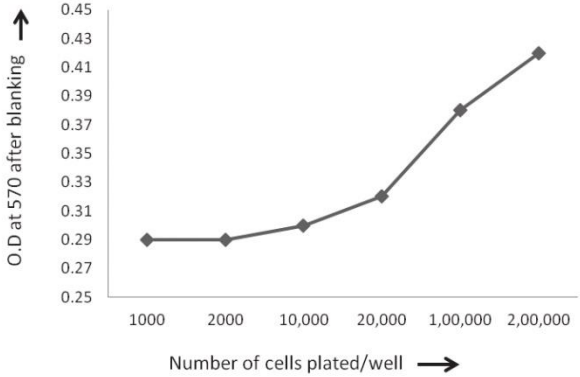
**LC50 در فاز لگاریتمی منحنی دوز-پاسخ می باشد.

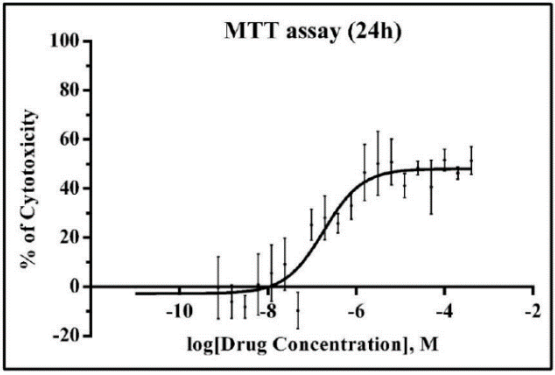
*** سمیت ماده مورد مداخله نیز قابل محاسبه می باشد.

نحوه محاسبه سمیت سلولی:

$$\% \, Cell \, Toxicity = \frac{(100 \times (control - Sample))}{Control}$$

نمونه منحنی استاندارد و تست





مشکل یابی

مشکل	علت	راه حل
عدم کارکرد آزمایش	-استفاده از مواد با دمای یخی -خوانش در طول موج اشتباه	-مواد را گرم کنید -طول موج درست را انتخاب و از کارکرد درست فیلتر مطمئن شوید
نتایج متناقض	-خراب شدن مواد -حل نشدن کریستال های فورمازان -زمان ناکافی جهت حل شدن -باقیماندن محیط	-تاریخ کیت تمام شده و نیاز به تعویض دارد -ماده Solubilizer خراب شده است. می توان از DMSO به عنوان جایگزین استفاده کرد. -حلال را مدت زمان دهید بیشتری در معرض قرار تمامی محیط کشت را در سلول چسبنده خارج کنید و در سلول معلق ۵۰ میکرولیتر باقی بگذارید

KIAZIST

www.Kiazist.com

081-3450 8267
0930 402 4884

Info@Kiazist.com