

کیت سنجش سیتوتوکسیسیته سلول

Cell cytotoxicity assay kit

(Cat-No: SK1163)

مقدمه:

در مطالعات آزمایشگاهی و *in vitro* یکی از مهمترین بررسی های ارزیابی های سیتوتوکسیسیته می باشد. از جمله بررسی های *in vitro* می توان به بررسی اثرات داروها، آفت کش ها و سایر مواد شیمیایی بر روی سلول ها اشاره کرد. برای درک و تعیین اثرات زیستی و مخرب آنها و بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیته و زنده مانی سلولی، به یک کیت ارزان قیمت، مطمئن و تکرارپذیر و ساده می باشد. طیف وسیعی از سنجش های سیتوتوکسیسیته در زمینه توکسیکولوژی، فارماکولوژی و بیولوژی مولکولی وجود دارد که از آنها می توان به سنجش های رد رنگ، سنجش های کالریمتری، سنجش های فلوریمتری و لومینومتری اشاره کرد. انتخاب روش مناسب از میان روش های فوق برای دستیابی به داده های دقیق، مطمئن و تکرارپذیر حائز اهمیت است. در انتخاب ارزیابی های سیتوتوکسیسیته و زنده مانی سلولی پارامترهای مختلفی از قبیل در دسترس پذیری، مکانیسم تشخیص، حساسیت و اختصاصیت در نظر گرفته می شود.

کیت حاضر به دلیل ارزان، سادگی، و تکرارپذیری برای چهار ارزیابی شامل سنجش های رد رنگ **تریپان بلو** (Trypan blue dye exclusion)، بررسی زنده بودن سلول ها توسط روش **MTT**، بررسی سمیت توسط **نوترال رد (NR)** و بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول با استفاده از **اکریدین ارنج / اتیدیوم برماید** (Acridine orange/ Ethidium bromide) توسط کارشناسان شرکت **آرسام فرا زیست** طراحی و بهینه سازی شده است.



محتویات کیت

ردیف	شماره کاتالوگ	نام ماده	مقادیر
۱	S1125	PBS-5X-Steriled	۱۰۰ میلی لیتر
۲	S1154	Trypan blue (0.4%)	۱ میلی لیتر
۳	S1153	MTT (5 mg/ml)	۵ میلی لیتر
۴	S1198	Formazan Solubilizing Solution	۵۰ میلی لیتر
۵	S1162	Neutral red (0.3%)	۵ میلی لیتر
۶	S1199	NR Solubilizing Solution	۵۰ میلی لیتر
۷	S1160	Ethidium bromide (0.01%)	۱ میلی لیتر
۸	S1159	Acridine orange (0.01%)	۱ میلی لیتر

نگهداری کیت: تمامی محتویات کیت بجز MTT (20°C -)، در دمای 4°C درجه سانتی گراد نگهداری شود.

الف) تریپان بلو

اساس: یکی از قدیمی ترین و متداول ترین روش ها برای سنجش میزان بقای سلولی استفاده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو می باشد. تریپان بلو یک ترکیب آزو است که نسبت به غشای سلول های سالم نفوذ ناپذیر می باشد بنابراین فقط به سلول هایی دارای غشای سلولی آسیب دیده وارد می شود. با ورود تریپان بلو به درون سلول و با اتصال به پروتئین های درون سلولی رنگ سلول ها را به آبی تغییر می دهد. این روش امکان تشخیص مستقیم و شمارش سلول های زنده (شفاف و بدون رنگ) و سلول های مرده (آبی رنگ) را در یک جمعیت سلولی فراهم می آورد.

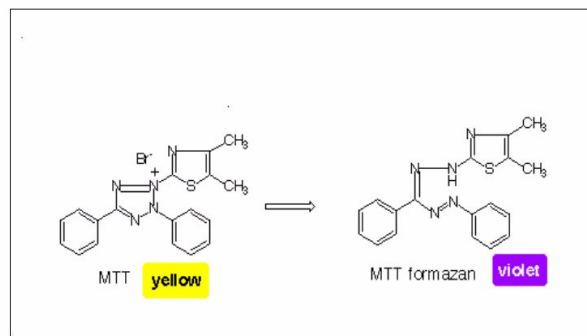
روش کار: در این روش ده میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به نسبت یک به یک با محلول تریپان بلو مخلوط شده و بر روی لام نئوبار قرار داده و شمارش زیر میکروسکوپ نوری انجام می شود. برای شمارش سلول ها، سلول های موجود در چهار مربع گوشه های قسمت مدرج لام نئوبار را شمارش نموده و طبق معادله زیر تعداد سلول ها در یک میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید.

$$500 \times \text{تعداد کل سلولهای شمارش شده در } 4 \text{ مربع} = \text{تعداد سلولها در یک میلی لیتر}$$



ب) بررسی زنده مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT

روش MTT یک روش رنگ سنجی بر اساس فعالیت متابولیکی سلول می باشد. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) می باشد این ماده قادر به عبور از غشا سلول ها می باشد و با ورود به سلول چون سلول های سالم دارای آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی می باشند قادرند حلقه تترازولیوم MTT را شکسته و آن را به فورمازان نامحلول و آبی رنگ در بیاورند در حالیکه سلول های مرده از این عمل ناتوان هستند. شکل زیر واکنش تبدیل MTT به فورمازان را نشان می دهد.



روش کار: سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت و با غلظت‌های مختلف دارو تیمار شدند. چهار ساعت قبل از برداشتن سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۱۰٪ حجم محیط کشت) به سلول‌ها اضافه گردد. بعد از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول حل کننده متوقف می شود. به علاوه این محلول باعث حل شدن رسوب فورمازان بنفش رنگ در سلول‌ها می شود. سرانجام میزان جذب توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

ج) رنگ آمیزی با اکریدین ارنج / اتیدیوم برماید جهت مشاهده مورفولوژیکی آپوپتوز

اساس: آکریدین ارنج (AO) یک رنگ حیاتی است که به DNA سلول و با تمایل کمتر به RNA متصل می‌شود. اتیدیوم برماید (EtBr) فقط سلول‌هایی را رنگ می‌کند که تمامیت غشاء خود را از دست داده باشند. سلول‌های زنده در اثر AO رنگ سبز یکنواخت می‌گیرند. سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند (early apoptotic)، رنگ سبز به خود می‌گیرند و دارای نقاط روشن در هسته هستند که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند. سلول‌هایی که در مراحل آخر آپوپتوز هستند (late apoptotic) رنگ اتیدیوم برماید را از خود عبور داده و بدین ترتیب رنگ نارنجی به خود می‌گیرند. در مقایسه با سلول‌های آپوپتوز شده انتهایی که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند، سلول‌های نکروز شده نیز به رنگ نارنجی در می‌آیند با این تفاوت که کروماتین آن‌ها متراکم و قطعه قطعه نمی‌شود.

روش کار:

نسبت حجمی ۱:۱ از دو محلول تهیه و در موقع آزمایش استفاده شود. یک میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با یک میکرولیتر از محلول آماده شده اکریدین ارنج - اتیدیوم برماید مخلوط کرده و سپس سلول‌ها را بر روی لام قرار داده و روی آن را با لامل پوشانده و سپس با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شود. برای تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده، بایستی حداقل ۴۰۰ الی ۶۰۰ سلول شمارش شوند.



د) سنجش توکسیسیتی با روش نوترال رد

اساس:

نوترال رد یکی از روش های معمول در بررسی سلول های زنده و تعیین سمیت دارویی و انواع توکسین ها می باشد. اصول این روش بر پایه جذب رنگ نوترال رد توسط سلول های سالم استوار است. در شرایط pH فیزیولوژیک نوترال رد بار نزدیک به خنثی دارد و به همین دلیل براحتی می تواند از غشای سلولی عبور کند. پس از ورود به سلول از طریق انتقال فعال در درون لیزوزوم تجمع پیدا می کند. در لیزوزوم تحت تاثیر pH اسیدی، باردار شده و به ترکیبات آنیونی و گروههای فسفات اتصال پیدا کرده و نمی تواند از لیزوزوم خارج شود. پس از ورود رنگ، سلول ها شستشو داده شده و رنگ وارد شده در یک محلول الکلی اسیدی حل می گردد. میزان رنگ ایجاد شده رابطه مستقیمی با تعداد سلولهای زنده و سمیت دارویی دارد و هر گونه تغییر در وضعیت فیزیولوژیکی بر جذب رنگ توسط سلول زنده اثر خواهد گذاشت. از اینرو با این روش تمایز بین سلول های سالم و سلول های آسیب دیده و مرده بر اساس توانایی برداشت رنگ توسط لیزوزوم امکان پذیر خواهد شد.

روش نوترال رد برای بررسی سمیت دارویی

سلول ها در پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شده و با ماده موردنظر در انکوباتور 37°C و $5\% \text{ CO}_2$ انکوبه شوند. پس از طی زمان انکوباسیون، محلول نوترال رد به هر چاهک مقدار 10% حجم محیط کشت سلولی موجود اضافه گردد. میکروپلیت ها را به مدت ۲-۴ ساعت (بسته به به تراکم سلولی) در انکوباتور نگهداری کنید. سپس محیط رویی سلول های چسبنده را به آرامی دور ریخته و با 200 میکرولیتر محلول PBS 1X شستشو داده شود. مرحله شستشو تا حد امکان بایستی به دقت و به آرامی صورت گیرد. در نهایت 200 میکرولیتر محلول حل کننده نوترال رد را به هر چاهک اضافه کنید و برای حل شدن کامل آنرا روی شیکر قرار دهید. توجه: در مورد سلول های سوسپانسی، میکروپلیت را سانتریفیوژ کرده و سپس محیط رویی را بدقت بردارید. و پس از شستشو با 200 میکرولیتر محلول PBS 1X محلول حل کننده نوترال رد را اضافه کنید. جذب نمونه ها را در فاصله زمانی یکساعت با دستگاه الایزا ریدر در 540 نانومتر خوانده شود و برای حذف جذب چاهک های میکروپلیت، جذب 690 از جذب 540 کم گردد.

نکته ۱: شرایط کشت و سلول های به کار رفته از جمله تعداد پاساژ سلول های به کار رفته، محتویات محیط کشت سلولی بر نتایج بدست آمده تاثیر بسزایی دارد که همگی بایستی در آنالیز داده ها مورد توجه قرار گیرند.

نکته ۲: محلول های رنگ آمیزی ممکن است در طی نگهداری رسوب کنند که می توان با فیلتر کردن یا حل کردن رسوب با پیپتاژ مورد استفاده گردد.

نکته ۳: محلول حل کننده فورمازان طی نگهداری در یخچال ممکن است رسوب کند که نیم ساعت قبل از استفاده در دمای آزمایشگاه قرار داده شود یا در 37°C حل شود.

در صورت بروز هر گونه ابهام، مشکل یا اشتباه با کارشناسان پشتیبانی فنی آرسام فرا زیست در میان بگذارید. کارشناسان ما با شماره تلفن ۷۱-۵۷۴-۷۱-۰۹۱۴ از طریق تلگرام و یا ایمیل ArсамFaraZist@gmail.com برای ارائه راهنمایی و رفع مشکل حاضر هستند.