سنجش تکثیر یا فعالیت (تست MTT)

برای بررسی قابلیت زیستی (Viability) و تکثیر یا تزاید سلولی (Cell proliferation) در پاسخ سلولی به عوامل خارجی در آزمایشگاه‌های سلولی روش‌های متعددی مورد استفاده قرارمی گیرند. ازاین بین، روش‌های غیرمستقیم با استفاده از نشانگرهای فلورسنت یا رنگ‌زا (کروموژن)، نسبت به روشهای مستقیم (مثلا شمارش سلول با میکرسکپ) روش‌هایی سریع برای آزمایش در تعداد زیاد هستند و سنجش بقای سلولی به روش MTT پرکاربردترین روش محسوب می شود. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم (MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در سلول‌های فعال (به لحاظ متابولیکی)، می باشد. دهیدروژنازهای میتوکندریایی در سلول‌های زنده، حلقهٔ تترازولیوم را شکسته و با تولید NADH و NADPH منجر به تشکیل رسوب نامحلول ارغوانی رنگ به نام فورمازان می‌شوند. این رسوب می‌تواند توسط ایزوپروپانل یا دی متیل سولفواکسید (DMSO) حل شود. هر چه سلول‌ها فعالتر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. شدت رنگ تولید شده، در طول موج ۵۷۰ تا ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود و به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است و در صورتی که سلول تکثیر نشده ولی سطح فعالیت متابولیک آن تغییر کند نیز معمولا قابل استفاده هستند. در این روش بر خلاف سایر روش‌ها، مراحل شستشو و جمع آوری سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها و افزایش خطای کار می شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت با فتومتر، در یک میکروپلیت انجام می شوند لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است.

چند نمونه از کاربردهای مهم این روش عبارتند از :

- **اندازه‌گیری تکثیر سلولی در پاسخ به عوامل رشد، سایتوکاین‌ها، میتوژن‌ها و مواد مغذی**
- **تجزیه و تحلیل ترکیبات کشندهٔ سلول یا متوقف کنندهٔ رشد سلول مانند داروهای ضد سرطان، سموم، آلاینده‌های محیط زیست و سایر عوامل دارویی**
- **ارزیابی واسطه‌های فیزیولوژیک و آنتی‌بادی‌های مهار کنندهٔ رشد سلولی**
- **کشف دارو، غربالگری داروهای سمی و ضد سرطان**
- **مطالعهٔ فعالیت سلول و بررسی اتصالات سلولی**
- **مطالعات سمیّت شیمیایی**
- **امکان تمییز سلول آلوده به انگل با سلول فاقد انگل در بررسی‌های میکربی**

مزایای مهم این روش عباتند از:

- **آنالیز آسان و سریع**
- **روشی مطمئن و کم هزینه**
- **حساسیت و دقت بالا در صورت انجام کار به روش صحیح**
- **بازدهی بالایی برای اندازه‌گیری تکثیر، بقاء و مرگ و میر سلولی**
- **در روش اجرا بدون نیاز به مراحل وقت گیر شستشو و انتقال از یک پلیت به پلیت دیگر**

تهیه محلول‌ها:

محلول MTT –پودر MTT را توزین نموده و از آن غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال PBS به میزان مورد نیاز تهیه کنید، پس از حل شدن کامل جهت استریل نمودن، محلول ر ادر شرایط استریل از فیلتر ۰,۲ میکرون عبور دهید. در صورت نیاز به نگهداری محلول را در ظروف استریل تقسیم نموده در فریزر ۷۰- قرار دهید.

ایزوپروپانول اسیدی: برای خواندن نهایی لازم است ایزوپروپانول (۲- پروپانول) که بصورت مایع است اسیدی شود. برای اسیدی نمودن آن از HCL استفاده می شود. میزان اسید استفاده شده به میزانی است که غلظت اسید در ایزوپروپانول به ۰,۰۴ نرمال برسد.

انجام تست:

در شرایط استریل به چاهک های حاوی سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی، بسته به حجم محیط داخل چاهک‌ها ۲۰ یا ۲۵ میکرولیتر (به ترتیب برای ۲۰۰ یا ۲۵۰ میکرولیتر محیط رویی سلول یعنی به طور کلی ۰/۱ حجم محیط) از محلول MTT استریل شده اضافه نموده و پلیت را به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار دهید.

پس از این مدت محیط روی سلولها را کاملا خارج کنید (در صورتیکه سلول ها چسبنده نباشند بهتر است پلیت را قبل از خارج کردن محیط از چاهک‌ها سانتریفیوژ نمایید).

به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی اضافه نمایید و با همزدن ملایم، کریستال های کف چاهک را حل نمایید، تا مایع رنگی یکنواختی به دست آید.

جذب نوری چاهکها در ۵۴۰ نانومتر قرائت نمایید.

- **نیازی به اضافه کردن محرک در کار آزمایشی ندارید**

سنجش نیتریک اکساید (نیتریت) به روش گریس

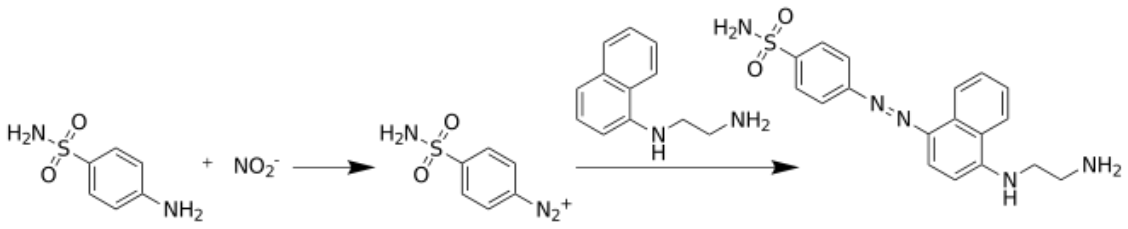
نیتریک اکساید (NO) یک مولکول کوچک هیدروفوب است که از غشاهای سلولی بدون کانال یا گیرنده همانند مولکول اکسیژن و دی اکسید کربن عبور می‌کند. هیدروفوب بودن نیتریک اکساید باعث می شود که در غشاهای چربی، سریعتر انتشار یابد، در نتیجه غشاهای سلولی سدی برای آن محسوب نمی شود. عملکرد فیزیولوژیک شناخته شده نیتریک اکساید در مغز شامل دخالت در حافظه، تنظیم جریان خون مغزی و تشکیل مایع مغزی نخاعی است. نیتریک اکساید علاوه بر نقش یادشده، طی پاسخهای ایمنی و التهابی نیز تولید و در ایمنی ذاتی به عنوان یک ماده توکسیک به دنبال عفونت با ارگانیسمهای عفونی و در حضور سایتوکاینهای خاص ایجاد می شود و می‌تواند علاوه بر نقش ضدمیکربی مرگ و عملکرد سلول‌های میزبان را نیز تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین تنظیم کننده ایمنی اختصاصی است. تولید نیتریک اکساید در سلولهای ایمنی به شکل القائی است (نه مداوم) و انزیم سازنده آن iNOS (یا نیتریک اکساید سنتاز القایی می‌باشد.

اندازه‌گیری نیتریک اکساید در نمونه های بیولوژیکی، مستلزم توجه به یک نکته خاصی است مبنی بر اینکه نیتریک اکساید به وسیله اکسیژن، به سرعت به نیتریت و سپس نیترات اکسید می‌شود. میزان نیتریک اکساید را می توان با تعیین غلظت های نیترات و نیتریت و یا نیتریت کل تخمین زد. (نیتریت کل از تبدیل نیترات موجود در نمونه به نیتریت بوسیله محلول استونیتریل بدست می آید.) متداولترین روش جهت تعیین میزان نیتریت روش Griess می باشد.

تهیه محلولهای لازم برای واکنش:

- **سولفانیل آمید ۱٪ در اسید فسفریک ۵٪ – از پودر سولفانیل آمید به میزان لازم برداشته محلول ۱٪ تهیه میکنیم و حلال در این محلول اسید فسفریک ۵٪ است (در صورتیکه آماده نیست ابتدا اسید فسفریک ۵٪ تهیه شود)**
- **NEDA (N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride) ۱٪ در اسید فسفریک ۵٪**

نیتریت با این ترکیبات به شرح زیر واکنش داده و محصول رنگی ایجاد میشود



- **تهیه غلظت‌های استاندارد نیتریت: برای تهیه استانداردها در این تست از پودر نیتریت سدیم NaNO2 استفاده می‌گردد. معمولا بالاترین غلظت استفاده شده در هنگام سنجش غلظت ۱۰۰ نانومول بر میلی‌لیتر بوده و در آزمایشگاهها یک استوک چند برابر تهیه و در هر بار سنجش برای تهیه استانداردها رقت‌سازی صورت می‌گیرد. در روش گریس معمولا غلظت ۲۰۰ برابر یعنی ۲۰۰۰۰ نانو مول بر میلی لیتر بعنوان استوک در نظر گرفته می شود.**

در هنگام سنجش ابتدا استوک ۲۰۰ بار رقیق شده (به ۱۰۰ نانومول بر میلی‌لیتر میرسد) و استانداردها با غلظتهای مختلف طبق جدول زیر در ستون اول پلیت ۹۶ خانه ته صاف تهیه می‌گردد:

نکته ۱: برای حلال سعی میشود از مایع پایه نمونه‌ها استفاده شود. نمونه سرم حلال PBS یا سالین، نمونه کشت محیط استفاده شده (RPMI ،DMEM و...)

غلظت	مقدار حلال	مقدار استاندارد ۱/۲۰۰
۰	۵۰	۰
۵	۲/۵	۴۷.۵
۱۰	۵	۴۵
۲۰	۱۰	۴۰
۳۰	۱۵	۳۵
۴۰	۲۰	۳۰
۶۰	۳۰	۲۰
۱۰۰	۵۰	۰

سنجش نمونه‌ها: ۵۰ میکرولیتر از نمونه ها را در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ته صاف (از ستون دوم به بعد) بریزید.

پنجاه میکرولیتر محلول سولفانیل آمید اسیدی که قبلا تهیه شد و بعد از مخلوط شدن به خوبی، ۵۰ میکرولیتر محلول NEDA به چاهکها (استانداردها و نمونه‌ها) اضافه کرده حداکثر بعد از ۵ دقیقه میزان جذب نوری آنها را در طول موج ۴۹۲ نانومتر بخوانید.

محاسبه غلظت نمونه‌ها: با استفاده از میزان جذب نوری بدست آمده برای استانداردها و غلظت مشخص آنها (طبق جدول فوق) نمودار استاندارد رسم نموده و سپس از روی نمودار استاندارد رسم شده و با استفاده از میزان جذب نوری بدست آمده برای نمونه‌ها غلظت آنها را بدست آورید.

الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays-ELISA)

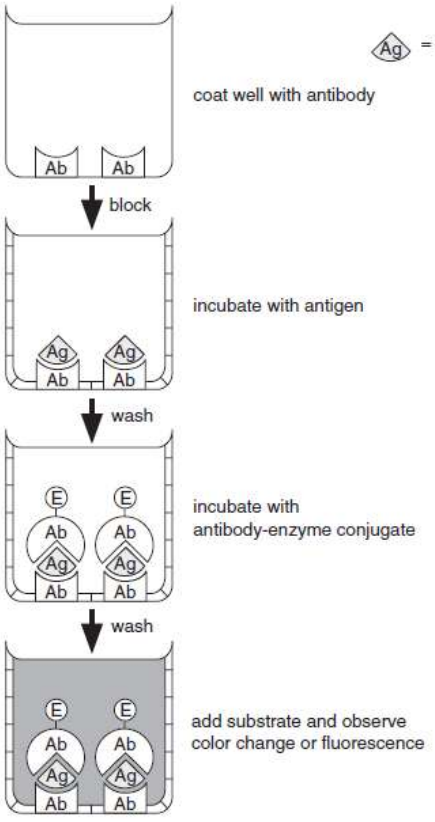
هدف این تست معمولا سنجش آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و ملکول‌های مختلف است. در پلیت‌های دارای ۹۶ چاهک انجام میشود و دارای مراحل انکوباسیون و شستشوی متعدد است، نهایتا رنگ ایجاد شده در چاهکها سنجیده میشود. انواع مختلفی دارد و سه نوع رایج آن به اختصار ذکر می‌شود.

Table 2.1.1 Summary of ELISA Protocols

ELISA protocol	Uses	Required reagents	Comments
Indirect	Antibody screening; epitope mapping	Antigen, pure or semipure: test solution containing antibody; enzyme conjugate that binds Ig of immunized species	Does not require the use of preexisting specific antibodies; requires relatively large amounts of antigen
Direct competitive	Antigen screening; detect soluble antigen	Antigen, pure or semipure; test solution containing antigen; enzyme-antibody conjugate specific for antigen	Rapid assay with only two steps; excellent for measuring antigenic cross-reactivity
Antibody-sandwich	Antigen screening; detect soluble antigen	Capture antibody (purified or semi-purified specific antibody); test solution containing antigen; enzyme-antibody conjugate specific for antigen	Most sensitive antigen assay; requires relatively large amounts of pure or semi-pure specific antibody (capture antibody)

الایزا غیرمستقیم (INDIRECT ELISA)

برای جستجوی آنتی‌بادی مناسب است، در صورتیکه مقادیر مناسب از آنتی‌ژن نسبتا خالص داشته باشیم (در حد میلی‌گرم). در الایزای غیرمستقیم، کف چاهکها با آنتی‌ژن پوشانده شده و در مرحله بعد، نمونه حاوی آنتی‌بادی به آن اضافه می‌شود. بعد از شستن آنتی‌بادی‌های اضافه (غیر متصل)، محلول حاوی آنزیم اضافه میگردد. این انزیم باید با ملکول مناسب برای اتصال به آنتی‌بادی همراه باشد (مثلا انزیم الکالین فسفاتاز متصل به پروتئین A که به آنتی‌بادی نمونه وصل می‌شود یا انزیم متصل به آنتی‌بادی که علیه آنتی‌بادی موجود در نمونه است). پس از شستشو و حذف انزیمهای غیر متصل، سوبسترا افزوده شده و رنگ تولید شده با اسپکتروفوتومتر (الایزا ریدر) بررسی میگردد. طول موج مناسب دستگاه، به سوبسترای استفاده شده بستگی دارد.



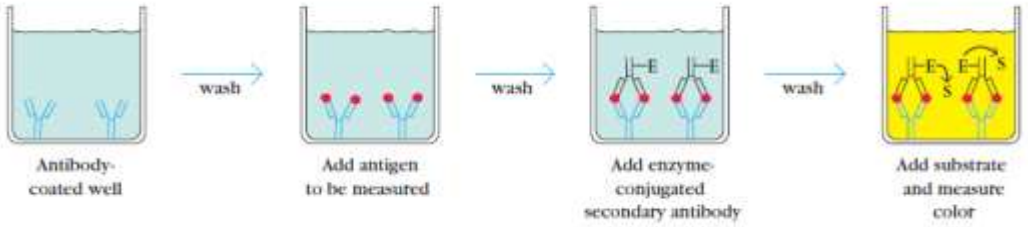
- پلیت پس از پوشانده شدن با آنتی‌ژن اصطلاحا باید بلاک شود یعنی فضاهای خالی باقیمانده پر شود که مانع از اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی گردد.
- در هر مرحله اضافه کردن محلول‌ها هم، انکوباسیون مناسب خود را لازم دارد.
- در مرحله نهائی بعد از گذشت زمان مناسب از اضافه کردن سوبسترا، از متوقف کننده واکنش (مثل اسید سولفوریک) استفاده می‌شود.

الایزا ساندویچ (ANTIBODY-SANDWICH ELISA ELISA)

این مناسب برای سنجش آنتی‌ژن‌های مختلف و بسیار حساس است. در این روش چاهکها با آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن مورد نظر پوشانده می‌شوند (آنتی‌بادی اول). پس از انکوباسیون و بلاک کردن فضاهای خالی و شستشو، نمونه حاوی آنتی‌ژن به چاهکها اضافه وو انکوبه

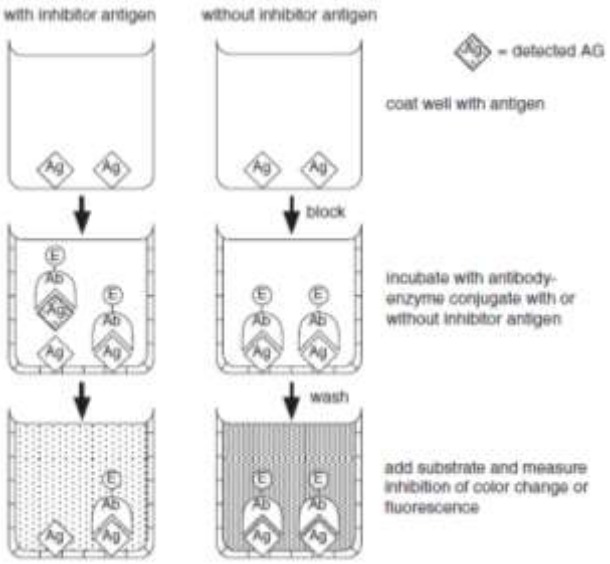
می‌شود. شستشوی بعدی، ملکول‌های غیر متصل را حذف می‌کند. آنتی‌بادی دوم هم علیه آنتی‌ژن است ولی با آنتی‌بادی اول متفاوت بوده، به انزیم نیز متصل است (آنتی‌بادی کونژوگه) یا ممکن است ملکول بیوتین به آنتی‌بادی دوم متصل باشد و در مرحله بعد انزیم متصل به اویدین به آن اضافه گردد. مرحله نهائی بعد از شستشو، اضافه کردن سوبسترا و بررسی رنگ تولید شده خواهد بود.

- تهیه نمونه‌های استاندارد آنتی‌ژن با غلظت‌های مناسب و رسم منحنی استاندارد، برای محاسبه غلظت دقیق آنتی‌ژن در هر چاهک لازم است.



الایزا مستقیم رقابتی (DIRECT COMPETITIVE ELISA)

در الایزای رقابتی، پلیت‌ها با آنتی‌ژن پوشانده میشود. آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن که کونژوگه (متصل به انزیم) است به نمونه‌های حاوی آنتی‌ژن محلول اضافه می‌شوند. در صورت وجود آنتی‌ژن در نمونه‌ها، از اتصال آنتی‌بادی کنژوگه به آنتی‌ژن متصل به پلیت جلوگیری میشود و نهایتا شستشو و اضاف کردن سوبسترا و بررسی رنگ تولید شده انجام میشود. چون آنتی‌ژن موجود در نمونه، نقش مهاری دارد پس مقدار آن با مقدار رنگ تولید شده، نسبت عکس خواهد داشت.



منابع:

1. Hornbeck PV. Current Protocols in Immunology. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. 2015, 110:2.1.1–23