



رنگ آکریدین اورنج / پروپیدیوم یدید (AO/PI) - ۱ میلی لیتر

آکریدین اورنج/پروپیدیوم یدید (Acridine Orange/Propidium Iodide یا AO/PI) یک ترکیب رنگ فلورسنت دوگانه است که در زیست‌شناسی سلولی به طور گسترده برای ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها، شمارش سلول‌های زنده و مرده و بررسی وضعیت غشای سلولی استفاده می‌شود. آکریدین اورنج یک رنگ نفوذپذیر به غشای سلولی است و می‌تواند وارد سلول‌های زنده و مرده شود. این رنگ به اسیدهای نوکلئیک متصل شده و در سلول‌های زنده، معمولاً فلورسانس سبز رنگ ایجاد می‌کند.

پروپیدیوم یدید قادر به عبور از غشای سالم سلول‌های زنده نیست، اما به راحتی وارد سلول‌هایی با غشای آسیب‌دیده، مرده یا در حال مرگ می‌شود و به DNA و RNA متصل می‌گردد. در حضور هر دو رنگ، PI جایگزین یا غالب بر فلورسانس آکریدین اورنج در سلول‌های دارای غشای آسیب‌دیده می‌شود؛ بنابراین، سلول‌های زنده با فلورسانس سبز و سلول‌های مرده یا آسیب‌دیده با فلورسانس نارنجی تا قرمز مشاهده می‌شوند. به همین دلیل، رنگ‌آمیزی AO/PI روشی سریع و کاربردی برای تعیین درصد زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سلولی و نمونه‌های سوسپانسیونی است.

آکریدین اورنج معمولاً با نور آبی تحریک شده و فلورسانس سبز در محدوده حدود ۵۲۵ نانومتر منتشر می‌کند. پروپیدیوم یدید نیز در محدوده نور سبز تا زرد تحریک شده و فلورسانس قرمز در محدوده حدود ۶۱۷ نانومتر ایجاد می‌کند. مشاهده نمونه‌ها معمولاً با میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلترهای مناسب سبز و قرمز یا فیلتر دوگانه انجام می‌شود.

روش رنگ‌آمیزی سلول‌های کشت داده شده با AO/PI

مواد لازم:

۱. سلول‌های کشت داده شده یا سوسپانسیون سلولی
۲. بافر فسفات سالین PBS
۳. محلول رنگ آکریدین اورنج/پروپیدیوم یدید (AO/PI)
۴. لام میکروسکوپ و لامل (Microscope slides and coverslips)
۵. میکروسکوپ فلورسنت مجهز به فیلتر مناسب

مراحل:

۱. آماده‌سازی نمونه:

- سلول‌های کشت داده شده را در ظروف مناسب، مانند پلیت، فلاسک یا لوله، آماده کنید.

- در صورت چسبندگی بودن سلول‌ها، محیط کشت را خارج کرده و سلول‌ها را با PBS شستشو دهید.
- در صورت نیاز، سلول‌ها را با استفاده از تریپسین یا روش مناسب دیگر از سطح جدا کرده و به صورت سوسپانسیون سلولی تهیه کنید.
- غلظت سلولی مناسب برای شمارش و مشاهده، معمولاً در محدوده 10^5 تا 10^6 سلول در میلی‌لیتر است.

۲. آماده‌سازی رنگ AO/PI:

- محلول AO/PI را پیش از مصرف به آرامی مخلوط کنید و از قرار دادن طولانی‌مدت آن در معرض نور جلوگیری نمایید.
- در صورت نیاز به تهیه محلول کاری، رنگ را مطابق غلظت توصیه‌شده برای محصول و کاربرد مورد نظر با PBS یا محیط مناسب رقیق کنید.
- محلول رنگ را ترجیحاً بلافاصله پیش از استفاده آماده کنید.

۳. رنگ‌آمیزی با AO/PI:

- حجم مساوی از سوسپانسیون سلولی و محلول AO/PI را با یکدیگر مخلوط کنید؛ برای مثال، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ مخلوط نمایید.
- مخلوط را به آرامی پیپتاژ کنید تا رنگ به صورت یکنواخت با سلول‌ها تماس پیدا کند.
- نمونه را برای مدت کوتاه، معمولاً ۱ تا ۵ دقیقه، در دمای اتاق و دور از نور انکوبه کنید.
- از انکوباسیون طولانی‌مدت خودداری کنید؛ زیرا ممکن است شدت رنگ‌آمیزی و نتایج زنده‌مانی تحت تأثیر قرار گیرد.

۴. انتقال نمونه به لام:

- پس از انکوباسیون، ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر از مخلوط سلول و رنگ را روی لام میکروسکوپ قرار دهید.
- لام را با دقت روی قطره قرار دهید تا از ایجاد حباب جلوگیری شود.
- نمونه را بلافاصله یا در کوتاه‌ترین زمان ممکن زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی کنید.

۵. مشاهده و تفسیر نتایج:

- سلول‌های زنده با غشای سالم، عمدتاً فلورسانس سبز نشان می‌دهند؛ زیرا آکریدین اورنج وارد سلول شده و به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شود.

- سلول‌های مرده، آسیب‌دیده یا دارای غشای نفوذپذیر، به علت ورود پروپیدیوم یدید، با فلورسانس نارنجی تا قرمز مشاهده می‌شوند.
- برای تعیین درصد زنده‌مانی، تعداد سلول‌های سبز رنگ و قرمز/نارنجی را شمارش کنید. درصد زنده‌مانی از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد زنده‌مانی} = \frac{\text{green cells (alive cells)}}{\text{تعداد کل}} \times 100$$

- رنگ AO/PI برای سلول‌های زنده و تازه مناسب است و معمولاً برای نمونه‌های فیکس‌شده توصیه نمی‌شود؛ زیرا فیکساسیون می‌تواند نفوذپذیری غشای سلولی را تغییر داده و تفسیر زنده‌مانی را مختل کند.