



رنگ پروپیدیوم یدید - ۱ میلی لیتر - ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر

پروپیدیوم یدید (PI یا Propidium Iodide) یک رنگ فلورسنت است که در زیست‌شناسی سلولی به طور گسترده‌ای برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده می‌شود. این رنگ قادر به عبور از غشای سلولی سلول‌های زنده نیست، اما به راحتی وارد سلول‌هایی با غشای آسیب‌دیده، مرده یا تثبیت شده می‌شود و با DNA موجود در هسته پیوند برقرار می‌کند.

در نتیجه، سلول‌های مرده یا سلول‌هایی که غشای آن‌ها در طی فرآیند تثبیت باز شده است، با شدت بالا فلورسنت قرمز رنگ در نتیجه تهیج حاصل از رنگ آبی از خود نشان می‌دهند. به همین دلیل، PI اغلب به عنوان یک نشانگر برای تعیین زنده‌مانی سلول (viability) یا به عنوان رنگ زمینه (counterstain) در کنار رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی دیگر (مانند رنگ‌آمیزی IF) استفاده می‌شود تا ساختار سلولی کلی و سلول‌های مرده مشخص شوند.

محدود تهیج رنگ پروپیدیوم یدید در محدوده آبی (طول موج ۵۲۷ تا ۵۵۳ نانومتر) می‌باشد.

روش رنگ‌آمیزی سلول‌های کشت داده شده با PI

مواد لازم:

۱. سلول‌های کشت داده شده
۲. بافر فسفات سالین PBS
۳. فرمالین ۳.۷٪ یا تثبیت کننده‌های توصیه شده
۴. محلول رنگ PI (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر)
۵. لام میکروسکوپ و لامل (Microscope slides and coverslips)

مراحل:

۱. آماده‌سازی نمونه:

- سلول‌های کشت داده شده را در ظروف مناسب (مانند پلیت‌ها یا روی لام) آماده کنید.

- محیط کشت را از سلول‌ها جدا کنید.

- سلول‌ها را با PBS شستشو دهید.

۲. فیکساسیون (تثبیت):

- سلول‌ها را با فیکساتیو مناسب، مانند فرمالین ۳.۷٪ برای مدت زمان مشخص (معمولاً ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق) فیکس کنید. توجه داشته باشید که فرمالین برای رنگ‌آمیزی‌های ایمونوفلورسانس که نیاز به حفظ آنتی‌ژن‌ها دارند، مناسب‌تر است. الکل نیز می‌تواند DNA را تثبیت کند و غشای سلولی را نفوذپذیرتر کند.

- پس از فیکساسیون، سلول‌ها را مجدداً با PBS شستشو دهید تا بقایای فیکساتیو پاک شود.

۳. رنگ‌آمیزی اصلی (در صورت نیاز):

- اگر قصد دارید از رنگ‌آمیزی اختصاصی دیگری (مانند ایمونوفلورسانت با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با فلوروکروم دیگر) استفاده کنید، این مرحله را طبق پروتکل مربوطه انجام دهید. پس از اتمام رنگ‌آمیزی اصلی، سلول‌ها را مجدداً شستشو دهید.

۴. رنگ‌آمیزی با PI:

- **آماده‌سازی محلول کاری PI:** محلول PI (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) را با استفاده از بافر رقیق‌سازی (مانند PBS) به غلظت نهایی مورد نظر رقیق کنید. غلظت نهایی رایج برای PI معمولاً بین ۱ تا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. بنابراین، برای رسیدن به غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، باید آن را ۵۰ برابر رقیق کنید (مثلاً ۱ حجم از محلول PI را با ۴۹ حجم بافر مخلوط کنید).

- **اعمال رنگ:** رنگ PI رقیق شده را روی سلول‌ها بریزید. میزانی از محلول رنگ اضافه شود که یک لایه کامل سلول‌ها را بپوشاند.

- **انکوباسیون:** نمونه را برای مدت زمان کوتاه (معمولاً ۱ تا ۵ دقیقه) در دمای اتاق و دور از نور انکوبه کنید.

۵. شستشو و مشاهده:

- پس از اتمام زمان انکوباسیون، محلول رنگ PI را به آرامی از روی سلول‌ها بردارید.

- سلول‌ها را یک بار دیگر با PBS شستشو دهید تا رنگ اضافی پاک شود.

- نمونه را زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده کنید. PI در طول موج تحریک حدود ۵۲۷ تا ۵۵۳ نانومتر و نشر فلورسانت در حدود ۶۱۷ نانومتر (قرمز) قابل مشاهده است. سلول‌هایی که DNA آن‌ها توسط PI رنگ‌آمیزی شده است (معمولاً سلول‌های مرده یا آسیب‌دیده) را با فلورسانس قرمز مشاهده خواهید کرد.