تریپان بلو (محلول ٪۰/۴)
فقـط بـرای کـارهای تحقیقـاتی

شمـاره کاتالوگ: BI-1803

توصیـف محصـول

تریپان بلو یک نوع رنگ آزو است که از تولوئیدین مشتق می‌شود. این رنگ به نام‌های دیامین بلو و نیاگارا بلو هم شناخته می‌شود. تریپان بلو به عنوان یک رنگ حیاتی برای تمایز سلوهای زنده از سلول‌های غیر زنده بکار می‌رود. این رنگ بطور انتخابی بافت‌ها و سلول‌های مرده را به رنگ آبی در می‌آورد. بواسطه انتخابی بودن شدید غشا، سلول‌ها و بافت‌های زنده که غشاء سلولی آنها سالم است رنگ نمی‌گیرد، زیرا این رنگ نمی‌تواند از غشاء آنها عبور کرده و وارد آنها شود و بدین ترتیب تریپان بلو بوسیله سلول‌های زنده جذب نمی‌گردد. در مقابل، این رنگ از غشاء سلولی سلول‌های مرده عبور کرده و سلول‌های مرده بعد از رنگ آمیزی با این رنگ در زیر میکروسکوپ به رنگ آبی (و قابل شمارش) دیده می‌شوند. از آنجاکه سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند این روش تحت عنوان "Dye exclusion method" نیز شناخته می‌شود. تریپان بلو همچنین بطور شایعی برای شمارش سلولی با میکروسکوپ نیز بکار می‌رود. این محصول، محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو در بافر فسفات سالین دالبکو است. به منظور حذف دبری‌ها، این محصول از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده می‌شود.

ویژگی‌ها

- ظاهر: مایع آبی رنگ تیره
- pH: ۷/۸ – ۷
- استریلیته: تأیید شده
- عمر مفید: ۱۲ ماه
- نگهداری: ۲۵–۲۰ درجه سانتیگراد

روش استفاده

۱. یک سوسپانسیون معادل تقریباً ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر آماده کنید. مطمئن شوید که نمونه بطور کامل مخلوط شده است.

توجه: سلول‌های متصل باید در ابتدا با تریپسین تیمار شوند تا یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت ایجاد شود. غلظت ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر، به طور میانگین، منجر به قرارگیری ۵۰ سلول در هر گوشه از گرید هوموسایتومتر می‌شود که تعدادی منطقی از نظر دقت و صحت است. غلظت کمتر از ۱×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر، سبب کاهش دقت تخمین تعداد سلول است. در اینصورت می توان از طریق سانتریفوژ قبل از شمارش، سوسپانسیون سلولی را تلغیظ نمود. از طرفی نیز غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول در میلی‌لیتر نیز بسیار بیشتر از حد لازم برای شمارش دقیق است و باید قبل از شمارش رقیق شود.

۲. یک مخلوط ۱:۱ از سوسپانسیون سلولی و محلول تریپان بلو آماده کنید. حجم نمونه می‌تواند از ۱۰ میلی‌لیتر تا چندین میلی‌لیتر باشد. به آرامی مخلوط کنید و بگذارید برای ۵ دقیقه در دمای اتاق بماند.

توجه: برای جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از سمیت تریپان بلو، نباید سلول‌ها بیش از ۱۵ دقیقه در داخل تریپان بلو بمانند.

توجه: تریپان بلو یک عامل موتاژن بالقوه است. با احتیاط با آن کار کنید و مطابق با دستورالعمل‌های استاندارد، در داخل سطل زباله ایمنی دور بریزید.

۳. قبل از استفاده، هوموسایتومتر را با اتانول ۷۰ درصد بشویید و صبر کنید تا خشک شود.

۴. کاوراسلیپ را با اتانول ۷۰ درصد بشویید و صبر کنید تا خشک شود. سپس آن را بالای اتاقک شمارش هوموسایتومتر قرار دهید.

۵. مقدار ۱۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی را روی لبه اتاقک شمارش بین کاوراسلیپ و شکاف V شکل در اتاقک شمارش قرار دهید. اجازه دهید سوسپانسیون سلولی با عمل کاپیلاری به داخل اتاقک شمارش کشیده شود.

۶. اجازه دهید ۲–۱ دقیقه بماند و سپس شمارش کنید.

توجه: اگر بیش از ۱۰ درصد سلول‌ها بهم چسبیده و کلوخ بنظر می‌رسند، کل فرایند را تکرار کنید تا مطمئن شوید از طریق پیپت کردن شدید در سوسپانسیون سلولی اولیه) همانند مخلوط سوسپانسیون سلولی تریپان بلو) سلول‌ها به خوبی از هم جدا شده‌اند. اگر کمتر از ۲۰۰ یا بیشتر از ۵۰۰ سلول (یعنی ۵۰–۲۰ سلول در هر مربع) در ۱۰ مربع مشاهده شوند، فرایند را تکرار کنید تا یک فاکتور رقت مناسب بدست آید.

۷. درصد سلول‌های زنده را بر اساس فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\text{viable cells}(\%) = \frac{(\text{total number of viable cells per mL of aliquot})}{(\text{total number of cells per mL of aliquot})} \times 100$$

برای محاسبه تعداد کل سلول‌های زنده در هر میلی لیتر از الیکوت، تعداد کل سلول‌های زنده را در ۲ ضرب کنید (فاکتور رقت تریپان بلو). برای بدست آوردن تعداد کل سلول‌ها در هر میلی لیتر از الیکوت، تعداد کل سلول‌های زنده و غیرزنده را با هم جمع کرده و سپس دو برابر کنید.

منـابع

1. Olivares-Reyes, Jesús Alberto, et al. "Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk 2 and ERK1/2." Biochimica et Biophysica Acta 2013 (1830): 4650-4659.
2. Ha-Duong, Nguyêt-Thanh, Miryana Hémadi, and Jean-Michel El Hage Chahine. "Transferrin receptor-1 iron-acquisition pathway—Synthesis, kinetics, thermodynamics and rapid cellular internalization of a holotransferrin–maghemite nanoparticle construct." Biochimica et Biophysica Acta 2013 (1830): 4254-4264.
3. Strober, W. 1997. Current Protocols in Immunology. A.3B.1-A.3B.2.
4. Kristine S. Louis and Andre C. Siegel, Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods.