فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا (س)
دوره ۳۶، شماره ۲، پیاپی ۷۶، تابستان ۱۴۰۲، ص ۱۴۰-۱۲۶
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2023.41521.1507

The Quarterly Scientific Journal Of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering. 76, Summer 2024, p. 133-147.
Article type: Research Paper

تأثیر روش نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلوروسانس در تشخیص لیپیدهای درون سلولی

زهره نوروزی مطلق[۱]، محمود اخوان مهدوی*[۲]، رضا قشلاقی[۳]

چکیده

مقدمه: *نایل رد یک رنگ فلورسنت است که برای تعیین میزان لیپید درون سلولی استفاده می‌شود. این روش می‌تواند با دقت بالا مقادیر بسیار کم لیپید درون سلولی را شناسایی کند. اما شدت فلورسانس نایل رد با زمان تغییر می‌کند و همین مساله استفاده از آن را برای مجموعه آنالیزهایی که در یک فاصله زمانی انجام می‌شوند با مشکل مواجه می‌کند. با توجه به اینکه استفاده از محلول نایل رد تازه برای تمام آنالیزها امکان پذیر نیست و باید از محلول‌های نگهداری شده در فریزر برای آنالیزها استفاده نمود، روش‌هایی برای حفظ شدت فلورسانس محلول نایل رد باید بکار گرفته شود تا بتوان از این معرف با اطمینان برای آنالیز لیپید استفاده نمود.* ***روش‌ها:*** *در این مطالعه محلول در دمای ۲۰ ℃- نگهداری شد و سپس شدت فلورسانس محلول نایل رد با توجه به دو عامل زمان و تعداد دفعات ذوب و انجماد بررسی شده است. برای بررسی اثر زمان نگهداری، پس از ۱۵، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای ۲۰ ℃- شدت فلورسانس محلول استوک قرمز نیل اندازه گیری شد.* ***نتیجه و بحث:*** *نتایج نشان داد که شدت فلورسانس محلول نایل رد در اثر انجماد کاهش می‌یابد. اما اگر محلول منجمد شده تا زمان استفاده منجمد باقی بماند و فقط در هنگام مصرف ذوب شود، می‌توان آن را برای ۱۲۰ روز نگهداری کرد و کاهش شدت فلورسانس کمتر از ۱۰درصد خواهد بود. اما اگر به دفعات ذوب و منجمد شود (۴ بار یا بیشتر) شدت فلورسانس تا حدود ۸۰ درصد کاهش می‌یابد که دیگر برای آنالیز مناسب نیست. به دلیل همین تغییرات شدت فلورسانس، برای هر مجموعه آنالیز غلظت بهینه نایل رد برای رنگ آمیزی لیپید باید تعیین شود. در صورتی که از معرف منجمد شده استفاده شود، برای محدوده غلظت لیپید (روغن زیتون) صفر تا ۴ میکروگرم بر میلی لیتر غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد مناسب است و لیپید را بدرستی شناسایی و غلظت آن را تعیین می‌کند.*

واژه‌های کلیدی: رنگ نایل رد، روغن زیتون، فلورسنت

[۱] دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[۲ و ۳] دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. *(نویسنده مسئول: mahdavi@um.ac.ir)

مقدمه

نایل رد (Nile red) یک معرف با خاصیت فلورسنت قوی است که برای تخمین و شناسایی میکروپلاستیک‌ها، شناسایی اثر انگشت بر روی سطوح و تولید حسگرهای شیمیایی تشخیص منواکسید کربن استفاده می‌شود (Shim *et al*., 2016; de la Hunty *et al*., 2014; Madea *et al*., 2020; Wase *et al*., 2017). یکی از شناخته شده ترین کاربردهای نایل رد اندازه‌گیری لیپیدهای خنثی درون سلولی است (Ahmad *et al*., 2015; Alemán-Nava *et al*., 2016). لیپیدها خود دارای خاصیت فلوروسانسی نیستند و با اتصال به نایل رد دارای خاصیت فلوروسانسی می‌شوند که با اندازه‌گیری شدت فلوروسانس، غلظت لیپید درون سلولی تعیین می‌شود. اندازه‌گیری لیپید به روش اسپکتروفلورومتری با استفاده از رنگ‌های فلورسانس روشی ارزان، آسان و سریع است. علاوه بر این، این روش به دلیل حساسیت بالا، بسیار دقیق است (Fam *et al*., 2018). بنابراین این روش برای پژوهشگرانی که بر روی تولید لیپیدهای درون سلولی تحقیق می‌کنند بسیار جذاب است.

برای تعیین صحیح و دقیق لیپیدهای درون سلولی با روش رنگ آمیزی با نایل رد توجه به عوامل مختلفی مانند زمان و دمای رنگ‌آمیزی، غلظت نایل رد، غلظت لیپید و طول موج‌های تحریک و انتشار اهمیت دارد. زیرا این عوامل بر شدت فلوروسانس و در نتیجه بر تعیین میزان لیپید تأثیر می‌گذارند. اولین قدم در استفاده از این روش، تعیین طول موج تحریک و انتشار با توجه به حلال و نوع لیپید است (Elsey *et al*., 2007; Greenspan & Fowler, 1985; Chen *et al*., 2011). طول موج تحریک و انتشار برای حلال‌های قطبی بالاتر از حلال‌های غیر قطبی است (Elsey *et al*., 2007; Greenspan *et al*., 1985). همچنین طول موج انتشار لیپیدهای قطبی مانند فسفاتیدیل کولین (۶۳۰ نانومتر) نیز بیش‌تر از طول موج انتشار لیپیدهای خنثی مانند تری گلیسرید (۵۷۰ نانومتر) است (Greenspan & Fowler, 1985; Chen *et al*., 2011). پس از تعیین طول موج تحریک و انتشار مناسب، انتخاب دما و مدت زمان رنگ آمیزی لیپید توسط نایل رد اهمیت دارد. دمای مناسب برای رنگ‌آمیزی لیپیدهای درون سلولی میکروارگانیسم‌ها، به نوع میکروارگانیسم بستگی دارد. به عنوان مثال دمای مناسب برای ریزجلبک‌های *Chlorella ellipsoidea* و *Chlorococcum infusionum* به ترتیب ۵۰-۴۰ °C و ۴۰-۳۰ °C است (Satpati & Satpati & Pal, 2015). به طور کلی شدت فلورسانس در دماهای زیر ۲۵ °C و بالای ۴۰ °C کاهش می‌یابد (Satpati & Pal, 2015; Chen *et al*., 2009). به همین علت اصولا" دما بین ۲۵ °C تا ۴۰ °C انتخاب می‌شود. زمان رنگ آمیزی نیز بین ۵ تا ۳۰ دقیقه در نظر گرفته می شود که مقدار دقیق آن به نوع حلال و سرعت نفوذ نایل رد به داخل سلول وابسته است. نفوذ نایل رد به درون سلول بستگی به نوع سلول و ضخامت دیواره سلولی دارد (Wu *et al*., 2014; Wong *et al*., 2014). به منظور دستیابی به نفوذ بیش‌تر می‌توان از حلالی استفاده کرد که نفوذ نایل رد را به درون سلول‌ها افزایش دهد (Doan & Obbard, 2011; Natunen *et al*., 2015). مشاهده شده است که هنگامی که از دی متیل سولفوکسید (DMSO) و گلیسرول به عنوان حلال استفاده شده است به ترتیب ۱۰ و ۵ دقیقه زمان برای نفوذ نایل رد به داخل سلول کافی بوده است (Martinez &

Henary, 2016). اما مهم‌تر از دما و زمان رنگ آمیزی و نوع حلال، غلظت نایل رد و لیپید است. اگر چه افزایش غلظت نایل رد باعث افزایش شدت فلورسانس می‌شود. اما افزایش بیش از حد آن نه تنها باعث افزایش شدت فلورسانس نمی‌شود (Huang *et al*., 2009; Bertozzini *et al*., 2011; Cooksey *et al*., 1987) بلکه در برخی موارد باعث کاهش آن نیز می‌گردد (Chen *et al*., 2009 & Genicot *et al*., 2005; Kimura *et al*., 2004).

برای تعیین صحیح لیپیدهای درون سلولی به روش فلوروسانس، تنها بهینه سازی موارد ذکر شده (موثر بر شدت فلوروسانس) کافی نیست. مهم‌ترین عامل در اندازه‌گیری لیپید به روش فلوروسانس با کمک معرف نایل رد، کیفیت معرف مورد استفاده است. این نکته‌ای است که بسیار مهم است و کم‌تر به آن پرداخته شده است. با توجه به توضیحات شرکت سازنده، کیفیت نایل رد در طول زمان تغییر می‌کند. در نتیجه، نگهداری نایل رد در دمای مناسب و مطالعه تغییرات خواص آن در طول زمان و تأثیر آن بر اندازه‌گیری لیپید بسیار مهم است. در برخی گزارش‌ها، محلول استوک نایل رد روزانه تهیه شده است (Orr & Rehmann, 2015; Liang *et al*., 2020). اما، به دلیل قیمت بالای آن، محلول استوک نمی‌تواند به صورت روزانه توسط همه افراد تهیه شود. صرف نظر از قیمت بالای این ماده، چون نایل رد باید در دمای ۲ °C تا ۸ °C نگهداری شود، حمل و نقل آن در فواصل طولانی دشوار است. بنابراین برای رسیدن به نتایج صحیح، باید راهی برای نگهداری صحیح ماده یافت به طوری که در مدت زمان نگهداری خواص ماده دچار کم‌ترین تغییرات ممکن شود. بسیاری از مطالعات گذشته به روش نگهداری نایل رد اشاره نکردند. برخی از محققان با نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای اتاق، توانستند تنها یک هفته پس از تهیه محلول استوک از آن استفاده کنند (Genicot *et al*., 2005; Carman *et al*., 1991; Johnson *et al*., 2017) که دوره نسبتاً کوتاهی است. البته با ذخیره استوک در دمای ۴- °C، این مدت تا ۴۵ روز افزایش یافت (Fernandes *et al*., 2013; Daban *et al*., 1991). در مطالعه حاضر، نایل رد در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد اما با روشی که تغییر در کیفیت و شدت فلورسانس به حداقل ممکن برسد. برای این منظور، شدت فلورسانس محلول استوک نایل رد در دو حالت اندازه‌گیری شد. حالتی که محلول استوک یک بار منجمد و سپس ذوب شد و حالتی که انجماد و ذوب شدن محلول استوک بیش از یک بار انجام شد. علاوه بر این، اثر زمان بر شدت فلورسانس نیز بررسی شد. همچنین غلظت مناسب نایل رد تازه و منجمد شده برای اندازه‌گیری لیپید تعیین شد. این در حالی است که بسیاری از مطالعات قبلی به تازه یا منجمد بودن نایل رد اشاره نکردند و اثر آن بر نتایج را در نظر نگرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

متانول و دی متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک و محلول نایل رد (با کد 19123) از شرکت سیگما خریداری شد. بقیه مواد لازم از فروشندگان محلی تهیه گردید.

آماده سازی محلول نایل رد

محلول استوک نایل رد با حل کردن ۱ میلی گرم نایل رد در۱۰ میلی لیتر DMSO تهیه شد. سپس در فریزر و در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد. برای هر آزمایش، ۷۵ میکرولیتر محلول استوک به ۴۲۵ میکرولیتر متانول اضافه شد. سپس ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرولیتر از این محلول برداشته شد و به آن‌ها ۳ میلی لیتر متانول اضافه شد. به طوری که غلظت نهایی نایل رد بین ۰/۰۵ تا ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول شد. پس از ۲۵ دقیقه در دمای اتاق، شدت فلورسانس با اسپکتروفلورومتر (PerkinElmer, LS-45) اندازه‌گیری شد. با توجه به اسکن اولیه، طول موج‌های تحریک و انتشار به ترتیب ۴۷۰ نانومتر و ۵۱۵ نانومتر انتخاب شدند.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس نایل رد

برای بررسی تغییرات شدت فلوروسانس نایل رد دو عامل بررسی شد. یکی مدت زمانی که محلول استوک در دمای ۲۰ °C- است و دیگری تعداد دفعاتی که محلول استوک منجمد شده و سپس برای انجام آزمایشات ذوب می‌شود. در ابتدا برای بررسی تعداد دفعاتی که محلول منجمد و ذوب می‌شود از یک محلول استوک استفاده شد. به طوری که محلول استوک ذوب شد و سپس برای استفاده در آزمایشات بعدی دوباره در دمای ۲۰ °C- قرار گرفت و منجمد شد. این کار ۴ بار تکرار شد. در آزمایشات دیگر، برای بررسی اثر گذشت زمان بر شدت فلوروسانس، از محلول استوکی استفاده شده که فقط یکبار ذوب شده بود. برای این منظور، محلول استوک تازه به بخش‌های کوچکی (میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتر) تقسیم شد و هر روز از یکی از میکروتیوب‌ها استفاده شد. شدت فلوروسانس محلول استوک تازه و محلولی که ۱۵، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای °C ۲۰- نگهداری شده بود اندازه‌گیری شد.

رنگ آمیزی لیپید با نایل رد

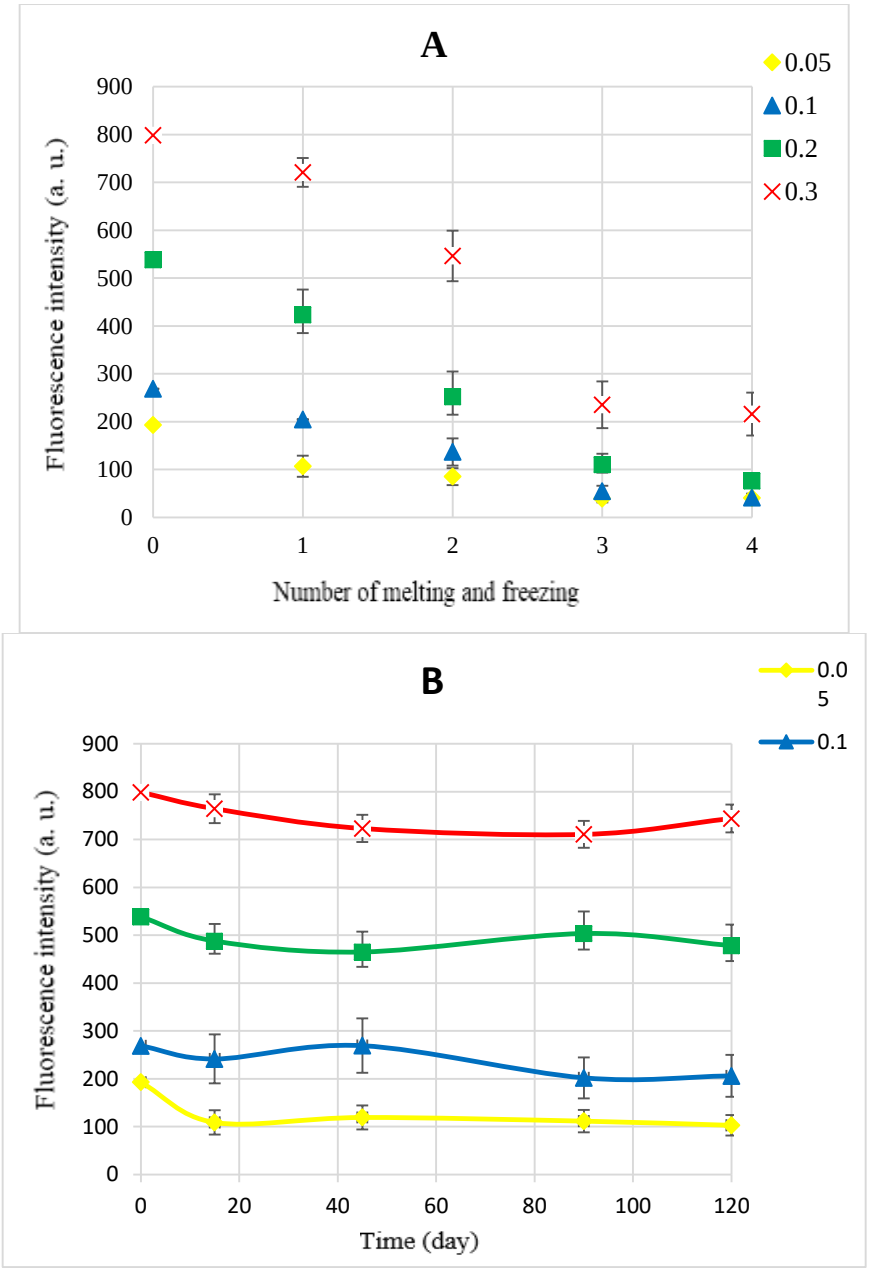
برای بررسی تاثیر تغییرات شدت فلورسانس نایل رد بر اندازه گیری لیپید، روغن زیتون به عنوان روغن مدل (لیپید درون سلولی) استفاده شد. برای رنگ آمیزی لیپیدها، ۷۵ میکرولیتر محلول استوک نایل رد به ۴۲۵ میکرولیتر متانول (محلول A) اضافه شد. سپس، با رنگ‌آمیزی روغن زیتون با غلظت‌های مختلف نایل رد، شدت فلورسانس بررسی شد. برای این منظور

غلظت‌های ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از روغن زیتون در کلروفرم تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظتی از نمونه‌های روغن با ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرولیتر محلول A ترکیب و در نهایت به تمام نمونه‌ها ۳ میلی لیتر متانول اضافه شد. بنابراین غلظت نهایی روغن زیتون و نایل رد به ترتیب بین ۰، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۰/۰۵ تا ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول بود. نمونه‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. این آزمایش دو بار انجام شد. در آزمایش اول از محلول استوک نایل رد تازه استفاده شد. در مرحله دوم، آزمایش پس از ۱۵ روز نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای ۲۰ °C- تکرار شد.

نتایج و بحث

اثر تعداد دفعات ذوب و انجماد بر شدت فلوروسانس محلول نایل رد

اثر ذوب و انجماد متوالی بر شدت فلوروسانس نایل رد در شکل ۱-الف نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که شدت فلورسانس با افزایش تعداد دفعات ذوب و انجماد کاهش می‌یابد و این رفتار مستقل از غلظت نایل رد است. در غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نایل رد، محلول تازه دارای شدت فلورسانس ۱۹۳ است که با یک بار ذوب به ۱۲۳ می‌رسد و با چهار بار ذوب و انجماد حدود ۷۶ درصد افت کرده و به ۴۷ می رسد. در غلظت‌های بالاتر از نایل رد نیز رفتار مشابهی دیده می‌شود به‌طوری‌که با شش برابر کردن غلظت نایل رد (غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پس از ۴ بار ذوب و انجماد شدت فلورسانس ۶۹ درصد افت کرده و به مقدار ۲۴۸ می‌رسد، در حالی‌که محلول تازه دارای بیش‌ترین شدت فلورسانس ۷۹۸ است. در غلظت‌های دیگر مورد مطالعه نیز میزان افت شدت فلورسانس بیش از ۸۰ درصد است. در مطالعه‌ای مشابه، محلول استوک نایل رد در دمای ۲۰ °C- ذخیره شد و توصیه شد که برای حفظ شدت فلورسانس محلول باید از ذوب و انجماد متوالی آن اجتناب کرد (Zalogin & Pick, 2014).



شکل ۱- تغییرات در شدت فلورسانس برای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نایل رد. (الف) اثر تعداد دفعات ذوب و انجماد بر شدت فلوروسانس محلول استوک نایل رد و (ب) اثر زمان نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلورسانس آن.

Figure 1. Changes in fluorescence intensity for 0.05, 0.1, 0.2 and 0.3 micrograms per milliliter of Nile red. (A) Effect of the number of melting and freezing times on the fluorescence intensity of the Nile red stock solution and (B) Effect of storage time of the Nile red solution on its fluorescence intensity.

اثر زمان نگهداری بر شدت فلورسانس محلول نایل رد

شکل ۱-ب اثر زمان نگهداری بر شدت فلوروسانس محلول نایل رد را نشان می‌دهد. حداکثر شدت فلوروسانس مربوط به محلول استوک تازه تهیه شده است. نتایج نشان می‌دهد که با نگهداری محلول نایل رد در حالت انجماد شدت فلورسانس در صورتی که فقط یک بار استفاده شود افت قابل توجهی نمی‌کند و تا ۱۲۰ روز (حداکثر زمانی که در این مطالعه

بررسی شده است) در حالت انجماد قابل نگهداری است. تفاوت های موجود بین شدت فلورسانس نمونه‌ها در غلظت‌های بالا از نایل رد، به‌طور متوسط کمتر از ۱۰ درصد است به‌طوری‌که در غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر، شدت فلورسانس بعد از ۱۵ روز نگهداری در فریزر ۱/۵ درصد ، بعد از ۴۵ روز ۶/۹ درصد، بعد از ۹۰ روز ۸/۵ درصد، و بعد از ۱۲۰ روز ۴/۲ درصد افت کرد. زمان‌های نگهداری پیوسته بود و نمونه یک بار و فقط در هنگام استفاده ذوب شد. در غلظت‌های کمتر از نایل رد، افت شدت فلورسانس پس از ذوب شدن (مستقل از زمان نگهداری) بیشتر از ۱۰ درصد بود به‌طوری‌که در غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نایل رد، شدت فلورسانس در زمان‌های نگهداری متفاوت (بین ۱۵ تا ۱۲۰ روز) بطور متوسط حدود ۳۴ درصد افت کرد. این مقادیر نشان می‌دهد که گرچه شدت فلورسانس معرف نایل رد منجمد شده نسبت به تازه کمتر است، اما پس از انجماد می‌توان آن را برای مدت طولانی بدون کاهش قابل ملاحظه در شدت فلورسانس نگهداری نمود به‌شرطی که فقط در همان زمان استفاده ذوب شود و تا قبل از آن از حالت انجماد خارج نشود.

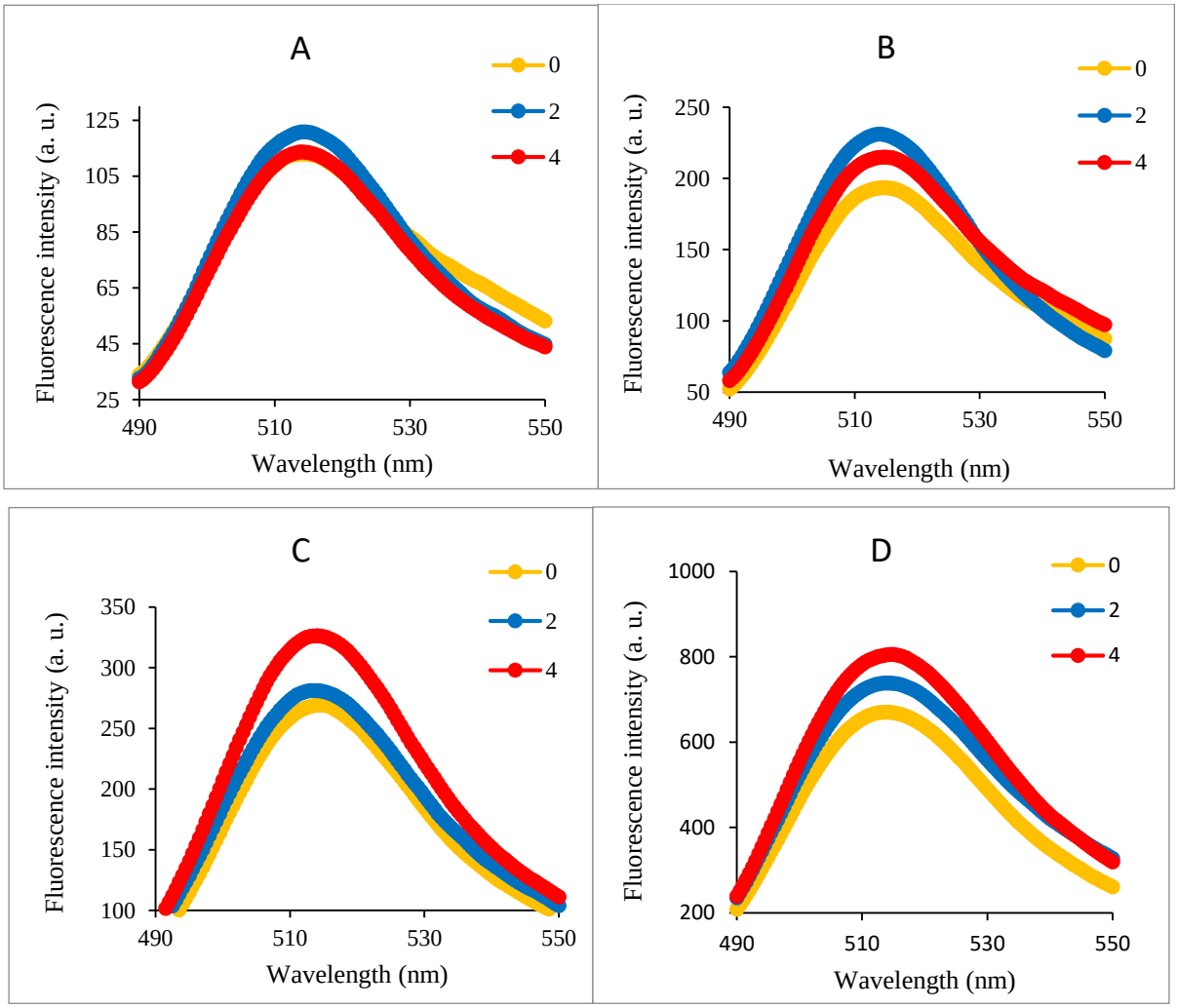
در بررسی‌های مشابه، با نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای اتاق توانستند تنها یک هفته پس از تهیه محلول استوک از آن استفاده کنند (Genicot *et al*., 2005; Carman *et al*., 1991; Johnson *et al*., 2017) که زمان کوتاهی است. البته با نگهداری محلول استوک در دمای ۴- °C، این مدت تا ۴۵ روز افزایش یافت (Fernandes *et al*., 2013; Daban *et al*., 1991). قابل ذکر است که برخی از محققان محلول نایل رد را در دمای ۲۰- °C قرار دادند اما مدت زمان نگهداری آن را ذکر نکردند (Zalogin & Pick, 2014; Sutter *et al*., 2007; Rumin *et al*., 2015). بر اساس نتایج بدست آمده، با اجتناب از ذوب و انجماد مکرر محلول استوک، می‌توان آن را تا حدود چهار ماه در دمای انجماد ۲۰- °C نگهداری کرد. نگهداری مناسب محلول نایل رد، ضمن حفظ کیفیت فلورسانس در آنالیزهای مربوط، باعث جلوگیری از پرداخت هزینه اضافی برای خرید مجدد این معرف می‌شود.

غلظت بهینه‌ی نایل رد در آنالیز لیپید

از آنجایی که شدت فلورسانس محلول تازه و منجمد شده نایل رد یکسان نیست، برای رنگ آمیزی لیپید با نایل رد، باید به تازه یا منجمد بودن آن توجه نمود و در هر حالت غلظت بهینه آن را تعیین نمود. شکل ۲ شدت فلورسانس نمونه های روغن زیتون (لیپید) با غلظت‌های مختلف رنگ آمیزی شده با معرف نایل رد تازه در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان طور که شکل نشان می‌دهد در غلظت‌های کم از نایل رد (شکل‌های ۲-الف و ۲-ب) شدت فلورسانس نایل رد در طول موج انتشار ۵۱۵ نانومتر توانایی تشخیص غلظت لیپید را ندارد به‌طوری‌که شدت فلورسانس نمونه با غلظت لیپید ۴ میکروگرم بر میلی لیتر کم‌تر از نمونه با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر و یا حتی نمونه شاهد (غلظت صفر از لیپید) است. هنگامی که غلظت معرف نایل رد در نمونه لیپید افزایش داده می‌شود (شکل‌های ۲-ج و ۲-د) روند تغییر شدت فلورسانس منطبق بر

تغییر غلظت لیپید می‌شود به‌طوری‌که بیش‌ترین شدت فلورسانس مربوط به نمونه با بیش‌ترین غلظت لیپید است و در غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد رابطه خطی $F_I = 34.25 \times C + 668.17$ $(R^2=1)$ بین شدت فلورسانس و غلظت لیپید بدست می‌آید که در آن F_I شدت فلورسانس اندازه گیری شده و C غلظت لیپید بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر است. نتایج نشان می‌دهد که در غلظت‌های نایل رد کم‌تر از ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر رابطه خطی بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس برقرار نیست. در نتیجه غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از معرف نایل تازه غلظت بهینه برای آشکار سازی غلظت لیپید درون سلولی در محدوده صفر تا ۴ میکروگرم بر میلی لیتر است.

در پژوهشی مشابه، ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از معرف نایل رد تازه به عنوان غلظت مناسب برای ۲/۵ تا ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول تریولئین (Triolein) انتخاب شد (Bertozzini *et al*., 2011). در پژوهش دیگری، از میان دو غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نایل رد، غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. زیرا در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، تفاوت بین شدت فلوروسانس برای غلظت‌های مختلف لیپید واضح‌تر بود (Shi *et al*., 2016). در یک مطالعه غلظت بهینه نایل رد طوری انتخاب شد که رابطه خطی بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس بدست آمد (Gao *et al*., 2014). در بسیاری از پژوهش‌های گذشته به این نکته اشاره شده است که غلظت بهینه نایل رد باید طوری انتخاب شود که شدت فلورسانس نمونه شاهد (نمونه بدون لیپید) کم‌تر از نمونه‌های حاوی لیپید باشد (Cooksey *et al*., 1987; Johnson *et al*., 2017).



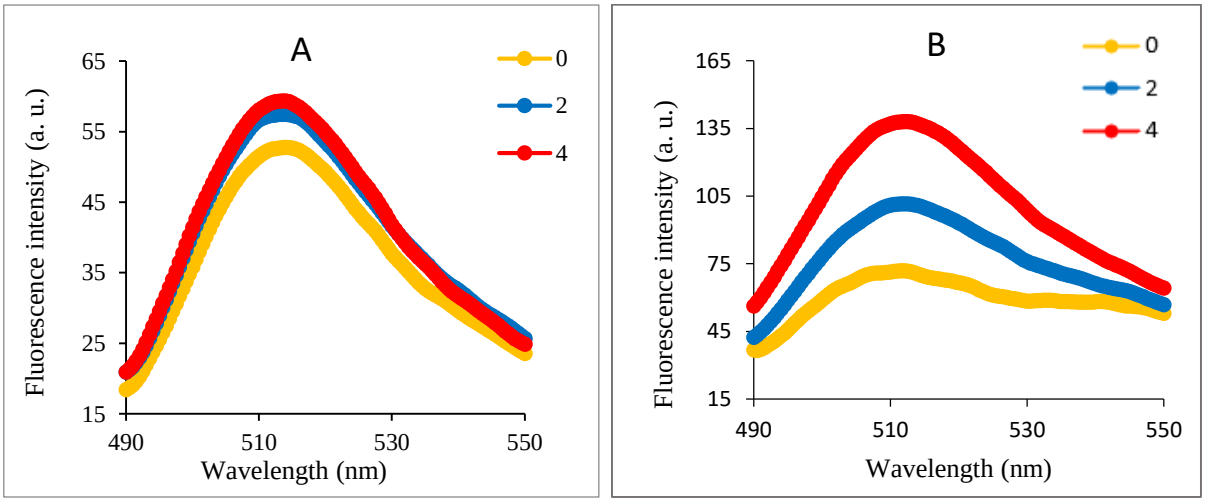
شکل ۲- شدت فلورسانس ۰، ۲ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر روغن زیتون رنگ آمیزی شده با محلول تازه تهیه شده‌ی نایل رد. در شکل A، B، C و D غلظت نهایی نایل رد به ترتیب ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

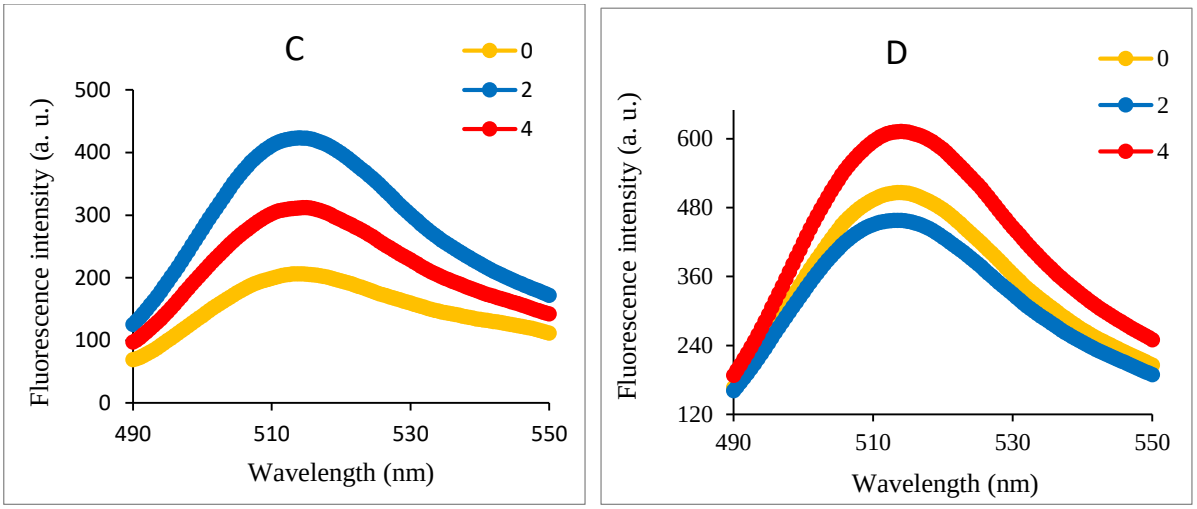
Figure 2. The fluorescence intensity of fresh Nile red with 0, 2, and 4 µg/ml of olive oil. Nile red concentration of A, B, C, and D are 0.025, 0.05, 0.1 and 0.25 µg/ml, respectively.

اما استفاده از محلول تازه نایل رد برای آنالیز لیپید درون سلولی به دلایل اقتصادی و تکنیکی همیشه امکان پذیر نیست. قیمت بالای این معرف و هم چنین مقدار مورد نیاز بسیار ناچیز آن برای هر آنالیز استفاده از آن را به صورت تازه غیر عملی می‌کند. به همین دلیل در بیش‌تر آنالیزها از معرف منجمد شده استفاده می‌شود. به دلیل افت شدت فلورسانس معرف منجمد شده نسبت به معرف تازه، غلظت بهینه معرف منجمد شده برای هر آنالیز لیپید درون سلولی باید تعیین شود. البته باید توجه داشت که بر اساس نتایج بدست آمده (بخش ۳-۲)، در صورتی که معرف نایل رد منجمد شده قبلا" ذوب نشده باشد نگهداری طولانی مدت آن در حالت انجماد تغییر چندانی در شدت فلورسانس آن ایجاد نمی‌کند و با اطمینان می‌توان آن را برای آنالیز استفاده کرد.

شکل ۳ شدت فلورسانس نمونه‌های روغن زیتون (لیپید) با غلظت‌های مختلف رنگ آمیزی شده با معرف نایل رد منجمد شده در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد (شکل ۳-الف)، معرف به دلیل غلظت پایین توانایی شناسایی لیپید و تشخیص غلظت‌های آن‌ها از یکدیگر در طول موج انتشار ۵۱۵ نانومتر را ندارد. با افزایش غلظت معرف (شکل ۳-ب)، رابطه خطی $F_I = 10.091 \times C + 71.405$ $(R^2 = 0.98)$ بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس نمونه بدست می‌آید که نشان دهنده مناسب بودن غلظت معرف نایل رد برای آنالیز لیپید است. با افزایش غلظت لیپید (شکل-های ۳-ج و ۳-د) پاسخ معناداری بدست نمی‌آید و تداخل بین شدت فلورسانس نمونه شاهد و نمونه‌های محتوی لیپید مشاهده شد. این تداخل در مطالعات دیگر هم مشاهده شده است و توصیه شده است برای اجتناب از این تداخل بهتر است از غلظت کم نایل رد استفاده شود (Bertozzini *et al.*, 2011).

نتایج نشان داد که در هنگام استفاده از نایل رد به صورت تازه به غلظت‌های بالاتر نیاز است و این درحالی است که علیرغم انتظار در استفاده از نایل رد منجمد شده، که دارای شدت فلورسانس کمتری است، به غلظت‌های پایین‌تر نیاز است. علت این مشاهده می‌تواند این باشد که هنگامی که نایل رد به صورت تازه استفاده می‌شود غلظت کم آن باعث می‌شود که شدت فلورسانس نمونه حاوی لیپید کم باشد و با فلورسانس نمونه شاهد که شدت فلورسانس بالا دارد تداخل کند و نتیجه معکوس شود. در غلظت‌های بالا به دلیل افزایش شدت فلورسانس نمونه‌های حاوی لیپید تداخل رفع شده و اندازه‌گیری‌ها روند منطقی پیدا می‌کند. اما هنگاهی که از معرف نایل رد منجمد شده استفاده می‌شود، به‌دلیل پایین بودن میزان شدت فلورسانس، تداخل شدت فلورسانس نمونه شاهد با نمونه‌های حاوی لیپید رخ نمی‌دهد و لذا نیازی به غلظت‌های بالا نیست و در همان غلظت‌های کم روند منطقی نتایج آنالیز مشاهده می‌شود.





شکل ۳- شدت فلورسانس ۰، ۲ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر روغن زیتون رنگ آمیزی شده با محلول منجمد شده‌ی نایل رد. در شکل A، B، C و D غلظت نهایی نایل رد به ترتیب ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

Figure 3. The fluorescence intensity of frozen Nile red with 0, 2, and 4 µg/ml of olive oil. Nile red concentration of A, B, C, and D are 0.025, 0.05, 0.1 and 0.25 µg/ml, respectively.

به طور کلی در پژوهش‌های مختلف، غلظت بهینه نایل رد متفاوت معرفی شده است. برخی از پژوهشگران معتقدند که، در هر مطالعه باید با توجه به نوع لیپید و سلول‌ها و تجهیزات مقدار بهینه تعیین شود (Wu *et al*., 2014; Priyanka *et al*., 2020; Kou *et al*., 2013). حتی برخی از محققان معتقدند که اندازه‌گیری یک نمونه در دو روز مختلف (به علت احتمال تغییر در شدت فلوورسانس نایل رد) ممکن است نتایج متفاوتی داشته باشد (Hicks *et al*., 2019). بنابراین در هر آنالیز باید غلظت بهینه نایل رد مشخص شود (Montalbo-Lomboy *et al*., 2014; Hicks *et al*., 2019; Wase *et al*., 2015). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که علاوه بر نوع لیپید و تجهیزات، روش نگهداری نایل رد نیز می‌تواند بر نتایج اثر بگذارد.

نتیجه‌گیری

نایل رد به عنوان یک معرف دارای خاصیت فلورسانس در شناسایی لیپیدهای درون سلولی کاربرد وسیعی دارد. اما تغییرات شدت فلورسانس این معرف با زمان و تاثیر شرایط نگهداری روی شدت فلورسانس کار با این معرف را مشکل می‌کند. نتایج نشان داد که استفاده از معرف تازه به دلیل شدت فلورسانس بالاتر بهتر است. اما به دلایل اقتصادی امکان استفاده تازه از این معرف همیشه فراهم نیست. در صورتی که معرف منجمد شده فقط برای یک بار استفاده ذوب شود می‌توان برای مدت طولانی آن را در فریزر نگهداری کرد بدون این‌که شدت فلورسانس آن کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. ذوب و انجماد متوالی معرف شدت فلورسانس را به شدت کم می‌کند و برای آنالیز لیپید مناسب نیست.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر فاضلی، مسئول شرکت زیست آزما به علت راهنمایی ایشان در خرید نایل رد تشکر می‌کنم.

عدم تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارندکه در رابطه با انتشار مقاله‌ی ارائه شده هیچگونه تعارض منافعی وجودندارد.

منابع

Ahmad, I., Sharma, A. K., Daniell, H., & Kumar, S. (2015). Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant biotechnology journal*, *13*(4), 540-550.

Alemán-Nava, G. S., Cuellar-Bermudez, S. P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B. E., & Parra, R. (2016). How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, *128*, 74-79.

Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of microbiological methods*, *87*(1), 17-23.

Carman, K. R., Thistle, D., Ertman, S. C., & Foy, M. (1991). Nile red as a probe for lipid-storage products in benthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 307-311.

Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource technology*, *102*(1), 135-141.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods*, *77*(1), 41-47.

Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A., & Callis, P. R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of microbiological methods*, *6*(6), 333-345.

Daban, J.-R., Bartolomé, S., & Samsó, M. (1991). Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, *199*(2), 169-174.

de la Hunty, M., Spindler, X., Chadwick, S., Lennard, C., & Roux, C. (2014). Synthesis and application of an aqueous nile red microemulsion for the development of fingermarks on porous surfaces. *Forensic science international*, *244*, e48-e55.

Doan, T.-T. Y., & Obbard, J. P. (2011). Improved Nile red staining of Nannochloropsis sp. *Journal of applied phycology*, *23*(5), 895-901.

Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, *68*(3), 639-642.

Fam, T. K., Klymchenko, A. S., & Collot, M. (2018). Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets. *Materials*, *11*(9), 1768.

Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Přibyl, P., Zachleder, V., & Vítová, M. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga Parachlorella kessleri. *Bioresource technology*, *144*, 268-274.

Gao, Y., Chen, G., & Weselake, R. J. (2014). A rapid Nile red fluorescence-based method for triacylglycerol content in microspore-derived cell suspension cultures of Brassica napus. *Lipids*, *49*(11), 1161-1168.

Genicot, G., Leroy, J., Van Soom, A., & Donnay, I. (2005). The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, *63*(4), 1181-1194.

Greenspan, P., and Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. *Journal of lipid research*, *26*(7), 781-789.

Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, *100*(3), 965-973.

Hicks, R. H., Chuck, C. J., Scott, R. J., Leak, D. J., & Henk, D. A. (2019). Comparison of Nile Red and Cell Size Analysis for High-Throughput Lipid Estimation Within Oleaginous Yeast. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *121*(11), 1800355.

Huang, G.-H., Chen, G., & Chen, F. (2009). Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and bioenergy*, *33*(10), 1386-1392.

Johnson, Z. I., Bidigare, R. R., Blinebry, S. K., Brown, S. L., Cullen, J. J., Loftus, S. E., Redalje, D. G., Swink, C., & Van Mooy, B. A. (2017). Screening for lipids from marine microalgae using nile red. *Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: production of fuels and chemicals, handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer International Publishing AG. USA*, 88-96.

Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of microbiological methods*, *56*(3), 331-338.

Kou, Z., Bei, S., Sun, J., & Pan, J. (2013). Fluorescent measurement of lipid content in the model organism Chlamydomonas reinhardtii. *Journal of applied phycology*, *25*(6), 1633-1641.

Liang, Y., Sun, Y., Fu, X., Lin, Y., Meng, Z., Meng, Y., Niu, J., Lai, Y., & Sun, Y. (2020). The effect of π-conjugation on the self-assembly of micelles and controlled cargo release. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *48*(1), 525-532.

Madea, D., Martínek, M., Muchova, L., Vana, J., Vitek, L., & Klán, P. (2020). Structural modifications of nile red carbon monoxide fluorescent probe: sensing mechanism and applications. *The Journal of organic chemistry*, *85*(5), 3473-3489.

Martinez, V., & Henary, M. (2016). Nile red and Nile blue: applications and syntheses of structural analogues. *Chemistry–A European Journal*, *22*(39), 13764-13782.

Montalbo-Lomboy, M., Kantekin, M. N., & Wang, T. (2014). Lipid Estimation of Surfactant-Extracted Microalgae Oil Using Nile Red. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *91*(4), 665-680.

Natunen, K., Seppälä, J., Schwenk, D., Rischer, H., Spilling, K., & Tamminen, T. (2015). Nile Red staining of phytoplankton neutral lipids: species-specific fluorescence kinetics in various solvents. *Journal of applied phycology*, *27*(3), 1161-1168.

Orr, V., & Rehmann, L. (2015). Improvement of the Nile Red fluorescence assay for determination of total lipid content in microalgae independent of chlorophyll content. *Journal of applied phycology*, *27*(6), 2181-2189.

Priyanka, P., Kinsella, G. K., Henehan, G. T., & Ryan, B. (2020). Nile Red assay development for the estimation of neutral lipids in Chlorella emersonii and Pseudokirchneriella subcapitata.

Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.-P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 1-16.

Satpati, G. G., & Pal, R. (2015). Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining—an improved technique. *Annals of Microbiology*, *65*(2), 937-949.

Shi, S., Ji, H., Siewers, V., & Nielsen, J. (2016). Improved production of fatty acids by Saccharomyces cerevisiae through screening a cDNA library from the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica. *FEMS yeast research*, *16*(1), fov108.

Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine pollution bulletin*, *113*(1-2), 469-476.

Sutter, M., Oliveira, S., Sanders, N. N., Lucas, B., van Hoek, A., Hink, M. A., Visser, A. J., De Smedt, S. C., Hennink, W. E., & Jiskoot, W. (2007). Sensitive spectroscopic detection of large and denatured protein aggregates in solution by use of the fluorescent dye Nile red. *Journal of fluorescence*, *17*(2), 181-192.

Wase, N., Tu, B., Allen, J. W., Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2017). Identification and metabolite profiling of chemical activators of lipid accumulation in green algae. *Plant physiology*, *174*(4), 2146-2165.

Wase, N., Tu, B., Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2015). Phenotypic screening identifies Brefeldin A/Ascotoxin as an inducer of lipid storage in the algae Chlamydomonas reinhardtii. *Algal Research*, *11*, 74-84.

Wong, D. M., Nguyen, T. T., & Franz, A. K. (2014). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) enhances intracellular lipid staining with Nile red in microalgae Tetraselmis suecica. *Algal research*, *5*, 158-163.

Wu, S., Zhang, B., Huang, A., Huan, L., He, L., Lin, A., Niu, J., & Wang, G. (2014). Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae Prorocentrum micans and Phaeodactylum tricornutum using Nile red and BODIPY 505/515. *Journal of applied phycology*, *26*(4), 1659-1668.

Zalogin, T. R., & Pick, U. (2014). Azide improves triglyceride yield in microalgae. *Algal Research*, *3*, 8-16.

The effect of the storage method of Nile red solution on the fluorescence intensity in the detection of intracellular lipids

Zohreh Noruzi Motlagh[1], Mahmood A. Mahdavi[2]*, Reza Gheshlaghi[3]

Received: 2022.10.02
Accepted: 2022.05.21

Abstract:

Introduction: Nile red is a fluorescent dye that is used to detect and measure intracellular lipids. This method can detect very low amounts of intracellular lipid with high accuracy. However, the intensity of Nile red fluorescence changes over time, and this makes it difficult to use for analyzes that are performed in a time intervals. Hence, it is very important to understand the changes of Nile red florescent intensity at frozen state and its effect on lipid detection results.

Methods: For study of the number of melting and freezing times effect, the stock solution was melted and then frozen for a later use. For study of the effect of storage time, fluorescence intensity of Nile red stock solution was measured after 15, 45, 90 and 120 days at -20 ℃.

Result and discussions: In this study, by storing Nile red at -20 °C, the fluorescence intensity decreased. However, if the solution remains frozen until use, the decrease in fluorescence intensity will be less than 10%. The results show that in this condition, storage time could be prolonged to 120 days. If the stock solution is repeatedly melted and frozen (4 times or more), the fluorescence intensity decreases nearly 80%, which is no longer suitable for analysis. When the frozen stock solution is used for lipid (olive oil) concentration range of 0 to 4 μg/ml, the concentration of 0.05 μg/ml of Nile red was suitable and it identified the lipid and determined its concentration accurately.

Key words: Fluorescent, Nile red dye, olive oil

[1]PhD student, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[2 & 3] Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran *(corresponding author: mahdavi@um.ac.ir)