

Téma: Počítání buněk

Úvod:

Přesné stanovení počtu buněk ve vzorku je v biologických a medicínských oborech pro řadu postupů nezbytné. Své nezastupitelné místo nachází například v hematologii při stanovování zastoupení jednotlivých krevních elementů ve vzorku krve. Pro určení koncentrace buněk v suspenzi se využívají dva základní přístupy. První využívá speciálních počítacích komůrek ve spojení se světelnou mikroskopií, druhý přístup využívá automatizovaného počítání za pomoci speciálních přístrojů.

Počítací komůrky jsou tvořeny silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou. Jednou z nejčastěji využívaných počítacích komůrek je Bürkerova komůrka. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci (každý o ploše 1 mm²), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je 0,04 mm²) (Obr. 1 a Tab. 1). Při počítání buněk pomocí počítací komůrky je nejprve nanesen malý objem testované suspenze mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka se vloží do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se může přistoupit k samotnému počítání částic. Při počítání mikroskopických částic pomocí počítacích komůrek se započítávají pouze ty, které se nacházejí uvnitř čtverce a částice, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran (např. horní a levá) (Obr. 2). Tím se zabrání dvojímu počítání částic.

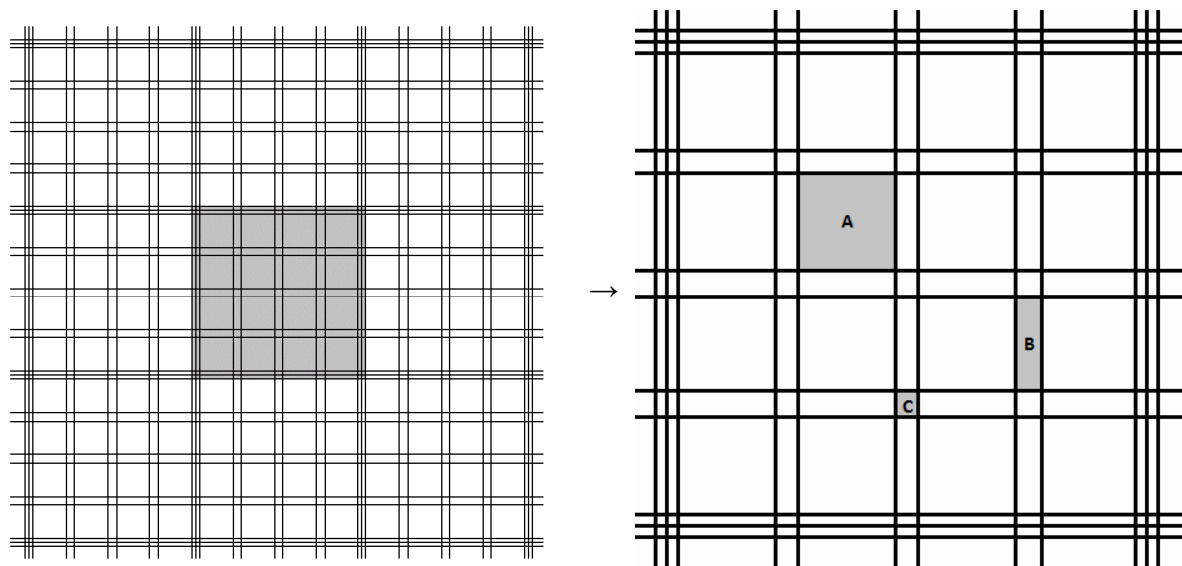
Pro stanovení koncentrace částic v 1 ml suspenze se používá výpočet:

$$X = \frac{a \cdot 10^4}{n}$$

X... koncentrace buněk v suspenzi

a... stanovený počet buněk

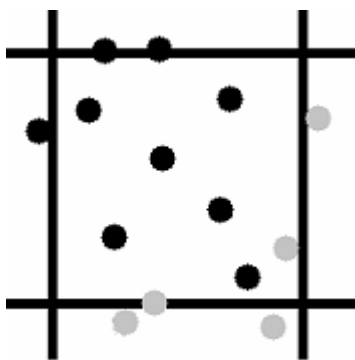
n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)



Obr. 1: Počítací síť Bürkerovy komůrky.

Tab. 1: Velikost útvarů v počítačí síti Bürkerovy komůrky:

	Rozměry	Plocha	Hloubka	Objem
Velký čtverec	1 x 1 mm	1 mm ²	0,1 mm	0,1 mm ³
Čtverec A	0,2 x 0,2 mm	0,04 mm ²	0,1 mm	0,004 mm ³
Obdélník B	0,05 x 0,2 mm	0,01 mm ²	0,1 mm	0,001 mm ³
Čtverec C	0,05 x 0,05 mm	0,0025 mm ²	0,1 mm	0,00025 mm ³



Obr. č. 2.: Pravidlo pro počítání částic v počítačí komůrce. Do celkového počtu částic se započítávají pouze ty, které leží nebo se dotýkají 2 zvolených stran, v tomto případě horní a levá (označeny černě). Částice dotýkající se pravé a spodní strany nezapočítáváme (označeny šedě).

Při automatizované analýze koncentrace buněk v suspenzi jsou využívány specializované přístroje. Princip měření buněk se u jednotlivých typů přístrojů liší. Příkladem může být elektronické počítání částic, které je založeno na nasávání přesného objemu buněčné suspenze ve slabém elektrolytu úzkou štěrbinou mezi dvěma elektrodami. Průchod buňky způsobí zvýšení odporu, což vyvolá elektrický impuls, který je přístrojem zaznamenán.

Úkol: Stanovení koncentrace buněk v suspenzi

Biologický materiál: suspenze buněčné linie SF9

Chemikálie: PBS

Pomůcky: vortex, Bürkerova komůrka, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop

Postup:

1. Dobře zhomogenizujte buněčnou suspenzi pomocí vortexu.
2. Napipetujte 15 µl buněčné suspenze na hranu krycího skla Bürkerovy komůrky tak, aby suspenze rovnoměrně pokrývala celou počítačí plochu komůrky.
3. Bürkerovu komůrku vložte do zorného pole mikroskopu a při malém zvětšení (4x) nejprve najděte počítačí síť.
4. Při větším zvětšení (20x) potom spočítejte buňky v 10 čtvercích (čtverec A).
5. Vypočítejte průměrný počet buněk v 10 čtvercích.
6. Stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.
7. Poté buněčnou suspenzi 5x zředte přidáním PBS a stejným způsobem napipetujte 15 µl buněčné suspenze i do prostoru druhé počítačí sítě.
8. Spočítejte buňky v 10 čtvercích, stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.

9. Výsledky obou počítání porovnejte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	celkem
Počet buněk I.											
Počet buněk II.											

Průměrný počet buněk v 10 čtvercích:

I.:

II.:

Výpočet koncentrace buněk v 1 ml suspenze:

I.:

II.:

Otázky:

1. Jaké další typy počítacích komůrek znáte? Uveďte několik příkladů.