



Faculty of Biological Science and Technology
Biotechnology Department
Cell Culture Laboratory

شمارش سلولی

By: Shirin Kashfi
Ph.D in Animal Development
Sh.kashfi@staf.ui.ac.ir



هدف از این آزمایش معلوم کردن تعداد سلول های زنده در حجم معینی از محیط کشت یا محیط نگهدارنده سلول ها است؛ به طور معمول تعداد سلول ها در یک میلیمتر مکعب (یا یک میکرولیتر) گزارش می شود

کاربرد شمارش سلولی

- ▶ برای ارزیابی سلامت سلول ها و ارزیابی نرخ تکثیر
- ▶ تعیین تعداد سلول ها برای هر گونه ارزیابی های بر پایه سلول
- ▶ تعیین تعداد سلول های استخراج شده از یک بافت
- ▶ تعیین تعداد سلول ها برای هم کشتی سلول های مختلف
- ▶ تعیین تعداد سلول ها برای ارزیابی مقدار محصول به دست آمده یا ارزیابی ماکرومولکول های استخراج شده از سلول ها
- ▶ تعیین تعداد سلول ها برای استفاده در سلول درمانی (دوز سلول منتقل شده)
- ▶ تعیین نسبت سلول های مرده به زنده برای ارزیابی میزان زنده مانی سلول ها



روش کار

- ▶ مواد و وسایل مورد نیاز:
- ▶ لام شمارش حجمی (لام هموسیتومتر)
- ▶ سمپلر و سر سمپلر مناسب
- ▶ لامل سنگین
- ▶ میکروسکوپ
- ▶ سانتریفوژ
- ▶ محیط مناسب
- ▶ تریپان بلو
- ▶ لوله اپندورف
- ▶ فالکون ۱۵



سمپلر (Sampler)

- ▶ برای برداشت مقدار مشخص از هر گونه محلول، سوسپانسیون سلولی، پیپتاژ کردن یا انتقال سوسپانسیون سلولی روی لام شمارش حجمی از سمپلر استفاده می شود
- ▶ برای این منظور از سمپلرهای ۱۰۰-۱۰۰۰ و ۰.۵-۱۰ میکرولیتر متغیر می توان استفاده نمود





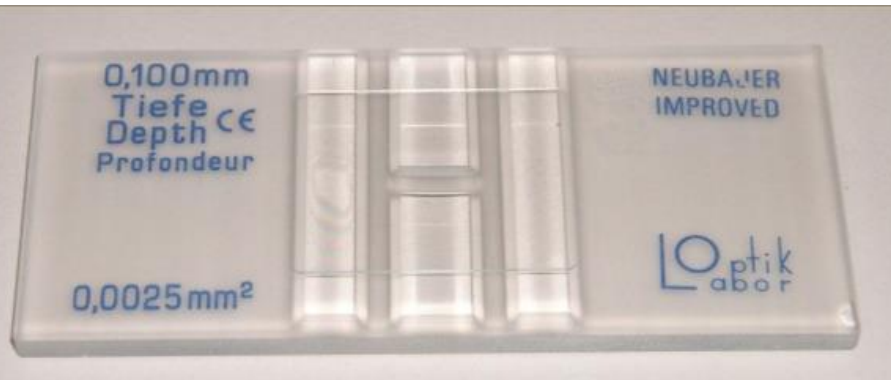
نحوه استفاده از سمپلر



- ▶ در صورتی که از سمپلرهای متغیر استفاده می شود، ابتدا حجم مورد نظر با استفاده از پیچ مخصوص در بالای سمپلر تنظیم می شود
- ▶ سمپلر مطابق با شکل روبرو در دست گرفته می شود
- ▶ سر سمپلر به سمپلر متصل می شود
- ▶ با فشار دادن شاسی سمپلر با شست به سمت پایین و تا توقف اول در سر سمپلر خلاء ایجاد می شود؛ سپس سر سمپلر کاملاً وارد محلول یا سوسپانسیون سلولی مورد نظر شده و به آرامی شاسی رها می شود تا سر سمپلر از حجم مورد نظر از محلول مورد نظر پر شود
- ▶ سر سمپلر در ظرفی که برای وارد کردن محلول در نظر گرفته شده وارد شده و شاسی تا توقف دوم به سمت پایین فشار داده می شود



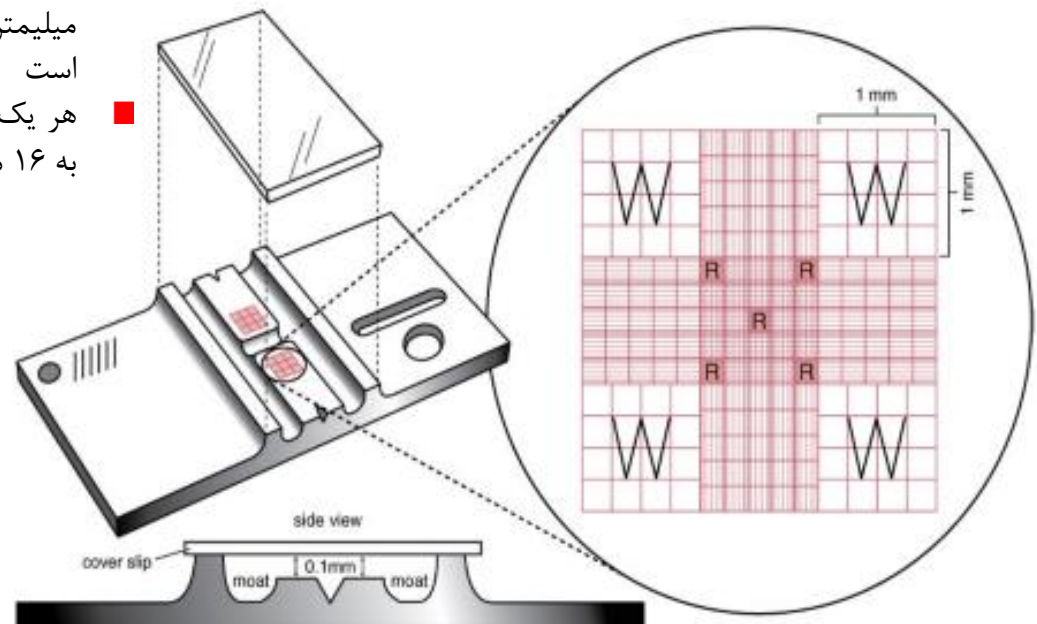
لام هموسیتومتر نئوبار اصلاح شده (Improved Neubauer Hemocytometer)



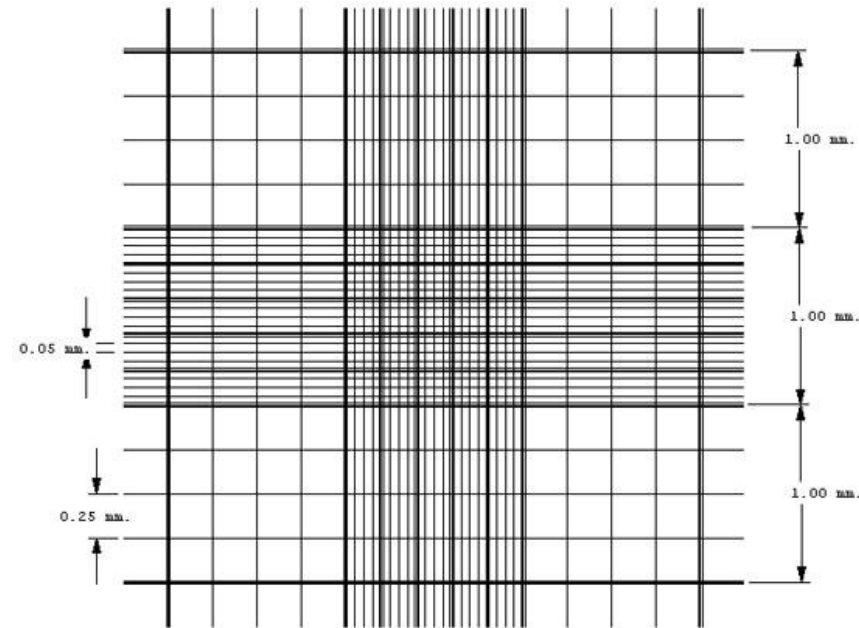
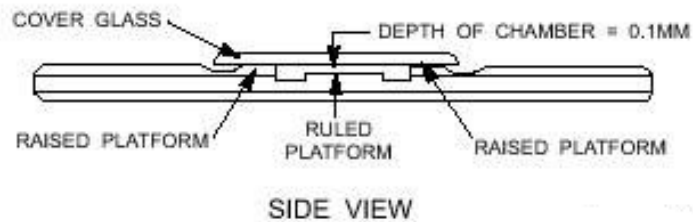
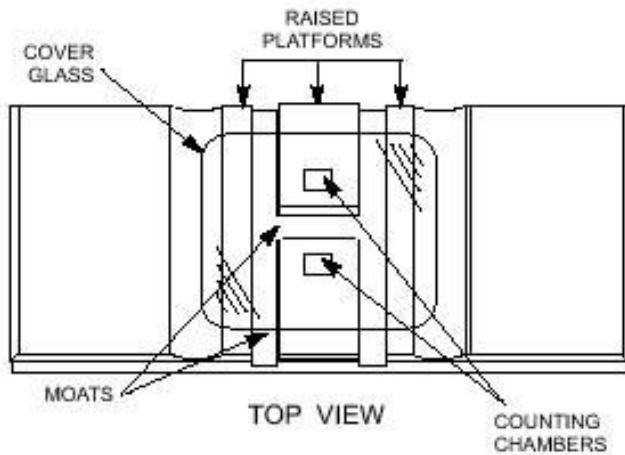
- لام هموسیتومتر لامی است که با استفاده از آن می توان تعداد یک نوع سلول را در حجم معینی از یک سوسپانسیون سلولی به دست آورد
- لام مورد استفاده لامل ویژه ای است که ضخیم تر از لامل های معمولی است و قابلیت انعطاف کمتری دارد؛ بنابراین تنش سطحی مایع تغییر شکلی در آن ایجاد نمی کند
- روی لام های هموسیتومتر دو ناحیه جهت شمارش سلولی به صورت مشبک طراحی شده است که محفظه شمارش (counting chamber) نام دارد و کار شمارش سلول را بسیار راحت می کنند

- محفظه شمارش مورد استفاده جهت شمارش سلولی از یک مربع ۳ در ۳ میلیمتر بزرگ تشکیل شده که به ۹ مربع ۱ در ۱ میلیمتر تقسیم شده است
- هر یک از مربع های ۱ در ۱ میلیمتر بزرگ که در چهار گوشه قرار دارند به ۱۶ مربع متوسط تقسیم شده اند

- مربع مرکزی در لام نئوبار اصلاح شده به ۲۵ مربع متوسط تقسیم شده که هر یک خود به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده اند
- لامی که روی نمونه گذاشته می شود در ارتفاع مشخصی قرار می گیرد که به طور استاندارد در همه انواع لام های هموسیتومتر ۰/۱ میلیمتر است



(From Rodak BF. Hematology: clinical principles and applications, ed 2. Philadelphia, 2002; Saunders.)



■ لام های هموسیتومتر ضخیم تر از لام های معمولی هستند؛ بنابراین هنگام کار با آنها مراقب باشید که عدسی شیئی به لام برخورد نکند

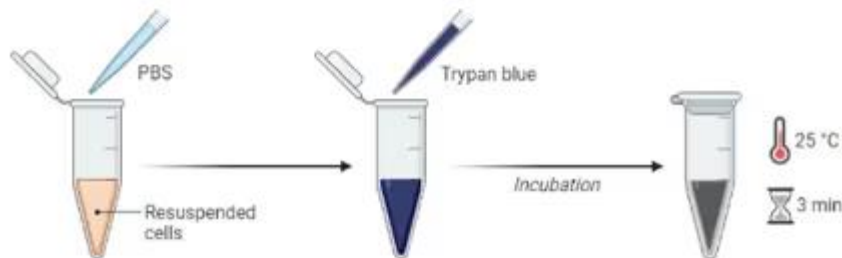


آماده کردن نمونه جهت شمارش

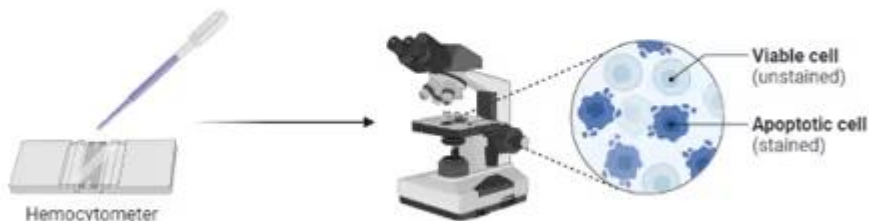
Step 1 Centrifuge the cell suspension and discard supernatant.



Step 2 Resuspend cell pellet in PBS and add trypan blue to the mix.



Step 3 Add sample to hemocytometer and analyze cell viability under a microscope.



سوسپانسیون سلولی را سانتریفوژ کنید و پس از آن مایع رویی را دور بریزید

پلت سلولی را دوباره در PBS یا محیط کشت به صورت سوسپانسیون درآورید

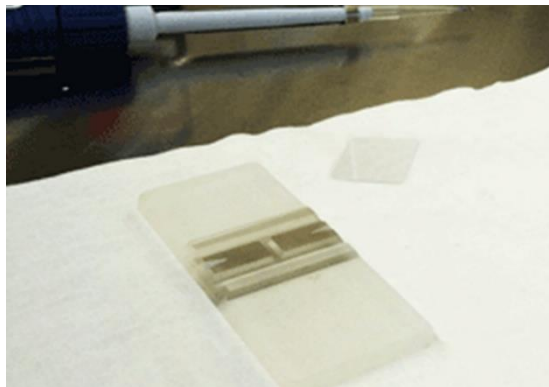
در صورتی که می خواهید نسبت سلول های مرده به زنده را به دست آورید به میزان برابر تریپان بلو به سوسپانسیون سلولی اضافه کنید. مخلوط حاصل را پیپتاژ کرده و به مدت سه تا پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید

نمونه را به روی لام هموسیتومتر منتقل کنید و شمارش را انجام دهید



آماده کردن لام و لامل جهت شمارش

▶ در صورت نیاز لام هموسیتومتر و لامل را با الکل اتانول ۷۰ درصد تمیز کنید



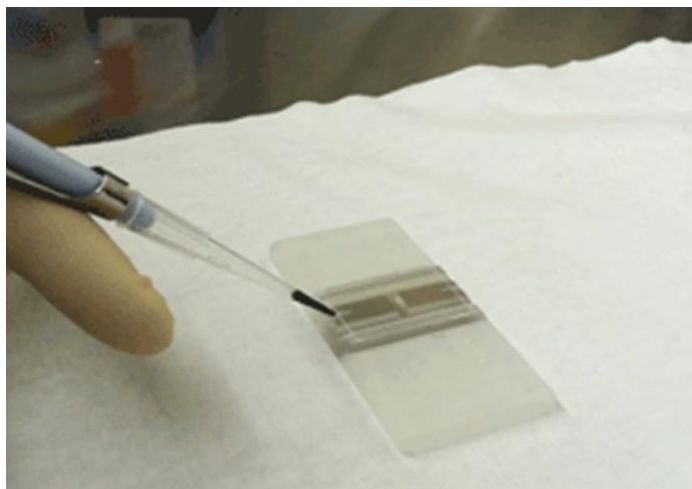
▶ لامل را روی محفظه هی شمارش روی لام هموسیتومتر قرار دهید

▶ لامل باید کاملاً روی محفظه های شمارش را بپوشاند در غیر اینصورت در شمارش خطا ایجاد می شود



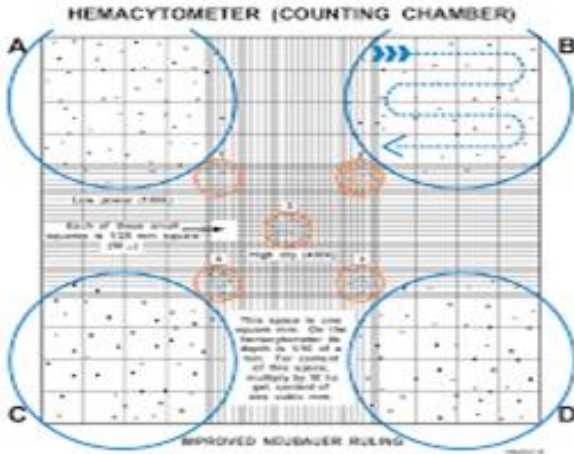
روش انتقال سوسپانسیون سلولی روی لام هموسیتومتر

- ▶ به آرامی سوسپانسیون سلولی مورد نظر را پیپتاژ کنید تا کاملاً همگن شود
- ▶ یک قطره (به میزان ۱۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون سلولی همگن شده را با کمک سمپلر مناسب بردارید
- ▶ نوک سمپلر را کنار لامل قرار داده و سوسپانسیون مورد نظر را کاملاً در زیر لامل و روی محفظه شمارش تخلیه کنید
- ▶ میزان سوسپانسیون سلولی برداشته شده باید به اندازه ای باشد که فقط روی سطح محفظه شمارش را پر کند و محلول اضافه ای برای سرریز در شیارهای لام وجود نداشته باشد
- ▶ در صورتی که هر مقدار از سوسپانسیون سلولی روی لامل بیاید باز هم شمارش اشتباه خواهد شد

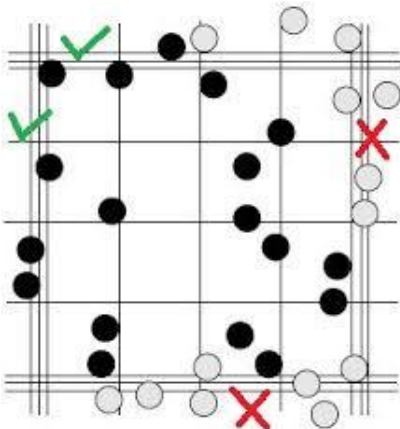


■ تراکم سلول ها نه باید زیاد و نه کم باشد. اگر تراکم زیاد باشد سلول ها همپوشانی داشته و شمارش مشکل می شود؛ اگر تراکم کم باشد خطای آماری ایجاد می شود و لازم می گردد که شمارش در تعداد بیشتری مربع انجام گیرد که کار زمانبری است

■ سلول ها باید بین مربع ها یکنواخت توزیع شده باشند



- ▶ با عدسی ۴ ناحیه شمارش روی لام هموسیتومتر را ببایید. از عدسی 10X برای شمارش استفاده کنید
- ▶ هنگام شمارش باید سلول ها کاملاً بی حرکت و مستقر شده باشند
- ▶ برای شمارش سلول ها می توان از مربع های ۱ در ۱ کناری استفاده می شود
- ▶ در هر مربع ۱*۱ میلی متر از مربع کوچک واقع در سمت چپ ردیف اول شمارش را شروع کرده و در آخرین مربع سمت چپ ردیف چهارم شمارش را خاتمه دهید
- ▶ فقط سلول هایی شمارش می شوند که کاملاً در داخل مربع ۱*۱ واقع شده باشند
- ▶ اگر از مربع وسط برای شمارش استفاده شود، پنج مربع متوسط (هر یک محتوی ۱۶ مربع کوچک) برای شمارش انتخاب می شوند؛ به صورتی که چهار مربع متوسط در گوشه ها و یک مربع در وسط
- ▶ در هنگام شمارش آن دسته از سلول هایی که روی خطوط مرزی قرار می گیرند نیازمند توجه ویژه ای هستند و فقط سلول هایی شمارش می شوند که روی خطوط بالا و سمت چپ قرار دارند. در صورت استفاده از لام هموسیتومتری که دارای خطوط سه گانه مرزی است خط وسط ملاک عمل است
- ▶ شمارش در هر دو محفظه شمارش روی لام هموسیتومتر باید انجام شود؛ اگر نتیجه نهایی خیلی باهم تفاوت داشت، نشان دهنده نمونه برداری نادرست است





روش محاسبه تعداد سلول ها در یک میلیمتر مکعب

- ▶ تعداد کل سلول های موجود در ۴ مربع کناری را شمارش کرده و میانگین آن را به دست آورید
- ▶ در صورتی که پلت سلولی را ۱۰۰۰ مرتبه رقیق کرده اید، عدد به دست آمده را در ۱۰۰۰۰ ضرب کنید تا تعداد سلول ها در یک میلی متر مکعب به دست آید
- ▶ به طور مثال اگر میانگین تعداد سلول های شمارش شده ۵۰۰ عدد باشد، خواهیم داشت:
$$۵۰۰ * ۱۰۰۰۰ = ۵۰۰۰۰۰ / \text{mm}^3$$

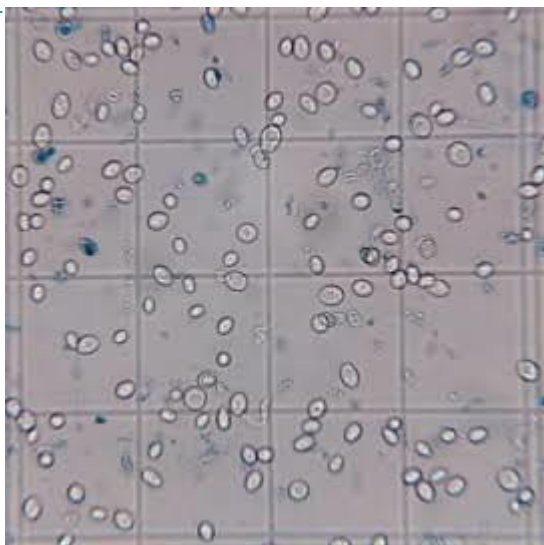
● چگونگی به دست آوردن ضریب ۱۰۰۰۰

چون سلول ها ۱۰۰۰ رقیق شده اند؛ بنابراین ضریب رقت ۱۰۰۰ است
چون حجم بین لام و لامل ۰/۱ میلیمتر مکعب (۱*۱*۰/۱) است، برای به دست آوردن تعداد سلول ها در یک میلیمتر مکعب باید تعداد را در ۱۰ ضرب کنید
پس داریم:

$$۱۰۰۰۰ = (\text{ضریب حجم}) * ۱۰ (\text{ضریب رقت})$$



تشخیص سلول های زنده از مرده با استفاده از تریپان بلو (Trypan Blue Exclusion)



- ▶ تریپان بلو وارد سلول های مرده می شود ولی قادر به عبور از غشای سلول های زنده نیست؛ بنابراین سلول های مرده به رنگ آبی دیده می شوند و از سلول های زنده متمایز می شوند
- ▶ در محفظه شمارش سلول های زنده و مرده را به طور جداگانه شمارش نمایید و تعداد کل سلول ها را به دست آوردید

محاسبه درصد سلول های زنده یا مرده

۱۰۰ * (تعداد کل سلول های شمارش شده / تعداد سلول های زنده) = درصد سلول های زنده
برای محاسبه درصد سلول های مرده هم می توان به همین ترتیب عمل کرد فقط به جای تعداد سلول های زنده از تعداد سلول های مرده استفاده کنید