

## Cvičení 3: Počítání buněk

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. Počet buněk je nutné znát i při nasazování experimentů *in vitro*, například při zjišťování cytotoxicity nebo adheze a proliferace buněk na materiálech. 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.

Cílem cvičení je počítání buněk v suspenzi za použití Bürkerovy komůrky s následným ověřením pomocí automatického počítáče buněk.

### Bürkerova komůrka

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  $1 \text{ mm}^2$ ), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je  $0,04 \text{ mm}^2$ ) (obrázek č. 1 a tabulka č. 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) (obrázek č. 2). Tím se zabrání dvojímu počítání částic.

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

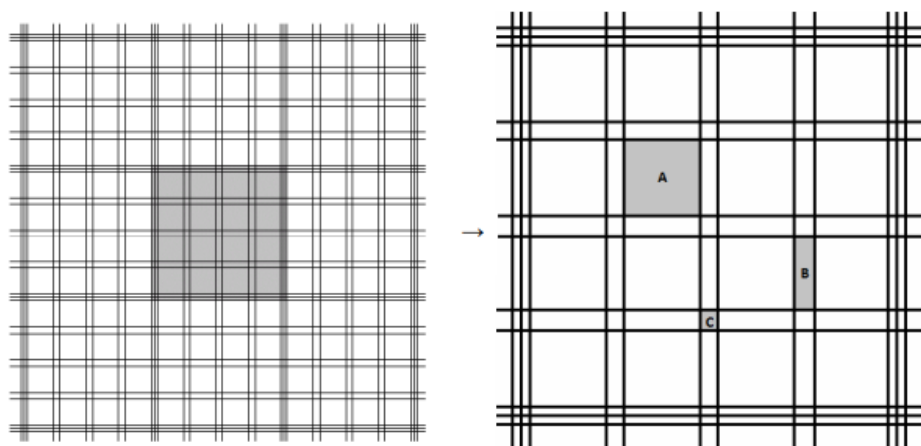
$$X = \frac{a \cdot 10^4}{n} \cdot \text{ředění}$$

X... koncentrace buněk v suspenzi

a... stanovený počet buněk

n... počet opakování (počet spočítaných čtverců)

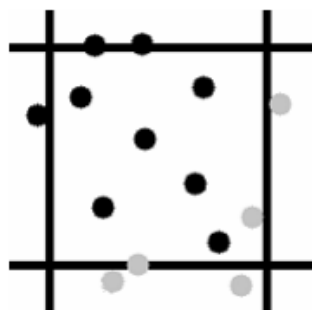
( $10^4$  v případě výpočtu z velkého čtverce, kde:  $1 \text{ mm}^3 = 0,001 \text{ ml}$  a  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ ml}$ )



Obrázek č. 1: počítací síť Bürkerovy komůrky

Tabulka č. 1: velikost útvarů v počítací síti Bürkerovy komůrky

|                      | <b>Rozměry</b> | <b>Plocha</b>          | <b>Hloubka</b> | <b>Objem</b>            |
|----------------------|----------------|------------------------|----------------|-------------------------|
| <b>Velký čtverec</b> | 1 x 1 mm       | 1 mm <sup>2</sup>      | 0,1 mm         | 0,1 mm <sup>3</sup>     |
| <b>Čtverec A</b>     | 0,2 x 0,2 mm   | 0,04 mm <sup>2</sup>   | 0,1 mm         | 0,004 mm <sup>3</sup>   |
| <b>Obdélník B</b>    | 0,05 x 0,2 mm  | 0,01 mm <sup>2</sup>   | 0,1 mm         | 0,001 mm <sup>3</sup>   |
| <b>Čtverec C</b>     | 0,05 x 0,05 mm | 0,0025 mm <sup>2</sup> | 0,1 mm         | 0,00025 mm <sup>3</sup> |



Obrázek č. 2: počítání částic v obrazci

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).

#### Postup výpočtu:

- 1) Opatrně očistěte krycí sklíčka a plochu B. komůrky hadříkem se 70% ethanolem.
- 2) Dobře zhomogenizujte buněčnou suspenzi pomocí vortexu.
- 3) Odeberte 10  $\mu$ l buněčné suspenze a smíchejte ji s 10  $\mu$ l trypanové modři. Odeberte 10  $\mu$ l vzniklé směsi.
- 4) Směs napipetujte na hranu krycího sklíčka Bürkerovy komůrky tak, aby suspenze rovnoměrně pokrývala celou počítací plochu komůrky.
- 5) Bürkerovu komůrku vložte do zorného pole mikroskopu a při malém zvětšení (10x) nejprve najděte počítací síť.



- 6) Poté spočítejte buňky alespoň ve 3 útvarech (vždy vynásobte počet 2x – ředění / tl. modří).
- 7) Vypočítejte průměrný počet buněk.
- 8) Stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.

### Luna – automatický počítáč buněk

Při automatizované analýze koncentrace buněk v suspenzi jsou využívány specializované přístroje. Princip měření buněk se u jednotlivých typů přístrojů liší.



Obrázek č. 3: automatický počítáč buněk Luna

#### Postup výpočtu:

- 1) Připravte 10  $\mu$ l zhomogenizované buněčné suspenze, kterou chcete spočítat a naředte ji 10  $\mu$ l trypanové modří.
- 2) Napipetujte 10  $\mu$ l takto připravené směsi do komůrky plastové destičky.
- 3) Destičku vložte do přístroje do druhé polohy.
- 4) Na přístroji zapněte automatické počítání a opište si počet živých i mrtvých buněk a celkovou viabilitu.
- 5) Toto počítání zopakujte minimálně dvakrát pro různá místa a spočtete průměr.
- 6) Porovnejte počet buněk zjištěný pomocí Bürkerovy komůrky s počtem buněk zjištěným pomocí automatického počítáče.

#### **Vypracování protokolu**

- 1) Formální stránka (úprava, hlavička, úvod, popis praktické části, závěr)
- 2) Faktická stránka (výpočet pomocí B. komůrky, výpočet pomocí automatického počítáče)
- 3) Úvod – zadání cvičení, praktická část – popis cvičení a jednotlivých kroků, závěr – shrnutí cvičení, komentář a odpověď na případné otázky