



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

آزمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

عنوان

شمارش سلولهای سلول های خونی در واحد حجم
و شمارش یاخته های مخمرها و رسم نمودار رشد

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. لام هموسیتومتر
۲. لامل سنگین
۳. پیت ملانژور سفید
۴. لوله پلاستیکی مکنده (حدود ۲۵ سانتی متر)
۵. محلول رقیق کننده مارکانو (شامل ۵/۰ گرم کلرور جیوه + ۵ گرم سولفات سدیم + ۱ گرم کلرور سدیم در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر)
۶. الکل ۷۰ درصد ضد عفونی
۷. محلول بنفش کریستال ویوله
۸. لانست
۹. میکروسکوپ
۱۰. شیشه ساعت
۱۱. شیکر
۱۲. مخمر
۱۳. پنبه

روش کار

در لام نئوبار مربع های بزرگ کناری که در چهار گوشه قرار دارند برای شمارش گلبول سفید و مربعی که در وسط قرار دارد و دارای مربع های متوسط و کوچک می باشد جهت شمارش گلبول های قرمز به کار می رود.

شمارش گلبول های سفید خون

ابتدا نوک انگشت را توسط الکل ضد عفونی کنید و توسط یک ضربه لانتست نوک انگشت را سوراخ کرده تا خون جریان یابد و توسط پی پت ملانژور خون را تا عدد ۱ به داخل بکشید (این پی پت برای رقیق کردن خون به کار می و روی پیپت سه عدد ۱/۵، صفر و ۱/۱ حک شده است). اگر خون در پی پت بالا نرفت توسط لوله پلاستیکی با مکش خون را بالا می کشیم. سپس چند میلی لیتر از محلول رقیق کننده مارکانو را در یک شیشه ساعت ریخته و آن را تا عدد ۱/۱ داخل ملانژور بکشید.

لوله لاستیکی را از ملانژور جدا کرده و سر و ته پیت را بین دو انگشت شست و سبابه نگه داشته و به مدت چند دقیقه با تکان ملایم مخلوط کنید. سپس به مدت ۵ دقیقه پیت را روی شیکر قرار داده و مجدداً مخلوط کنید. لام نئوبار تمیز را روی میز صاف و تراز قرار دهید و لامل سنگین تمیز را روی آن بگذارید. پیت ملانژور را به صورت عمودی نگه داشته و دو قطره اول آن را دور بریزید. نوک ملانژور را بین لام و لامل قرار داده به طوری که مخلوط خون و ماده رقیق کننده به منطقه ی شمارش نفوذ کند. اگر نمونه به درون شیارهای روی لام نفوذ کند باید لام را شسته، خشک کرده و مجدداً مورد استفاده قرار دهید. اگر نمونه را به روش صحیح بین لام و لامل بریزید به طوری که کمتر از حد لازم و یا بیشتر از حد لازم نباشد، سلول ها بایستی بی حرکت باشند و شناور نگردند. در این صورت لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و با عدسی ۱۰ مورد مطالعه قرار دهید و سلول های موجود در چهار مربع بزرگ واقع در چهار گوشه لام را شمارش کنید.

طول هر ضلع مربع بزرگ در لام نئوبار ۱ سی سی می باشد و فاصله لام و لامل ۱/۰ سی سی است. بنابراین حجم موجود در یک مکعب بزرگ ۱/۰ سی سی مکعب می باشد و چون گلبول های سفید را در چهار مکعب مستطیل شمارش کرده اید، حجم معادل ۴/۰ سی سی مکعب می باشد. ضریب رقت نیز به وسیله ی پیت ملانژور ۱/۲۰ است. یعنی خون به نسبت یک به بیست رقیق شده است. به عبارتی تعداد گلبول های سفید خون در حجمی برابر ۱/۵۰ سی سی مکعب شمرده شده است. در نتیجه واضح است که باید تعداد کل گلبول های سفید شمارش شده در ۴ منطقه را در ۵۰ ضرب کنید. برای مثال اگر تعداد گلبول های سفید شمارش شده در ۴ قسمت ۱۸۵ عدد باشد، تعداد گلبول های سفید خون ۹۲۵۰ عدد در سی سی مکعب می باشد. مقدار طبیعی گلبول سفید ۴۵۰۰ الی ۱۰۰۰۰ عدد در هر سی سی مکعب خون می باشد.

شمارش گلبول های قرمز خون

مشابه با روش شمارش گلبول سفید ابتدا خون را توسط پپت ملانژور با محلول رقیق کننده هایم رقیق کنید. فاکتور رقت در این حالت نیز ۱/۲۰ می باشد. سپس خون رقیق شده را به روش صحیح بین لام و لامل بریزید و با عدسی $\times 40$ گلبول های قرمز موجود در ۵ خانه از مربع های متوسط موجود در مربع بزرگ مرکزی را شمارش کنید. معمولاً چهار مربع کناری و مربع مرکزی موجود در مربع بزرگ مرکزی جهت شمارش استفاده می شوند. در این حالت چون ۵ مربع مورد استفاده قرار گرفته حجم آن معادل ۱/۵۰ می باشد. محاسبات را طبق روش قبل انجام دهید. مقدار طبیعی خون در زنان ۵/۵-۴ میلیون در سی سی مکعب و در مردان ۶-۵/۴ میلیون در سی سی مکعب می باشد.

شمارش یاخته های مخمر و رسم نمودار رشد آن ها

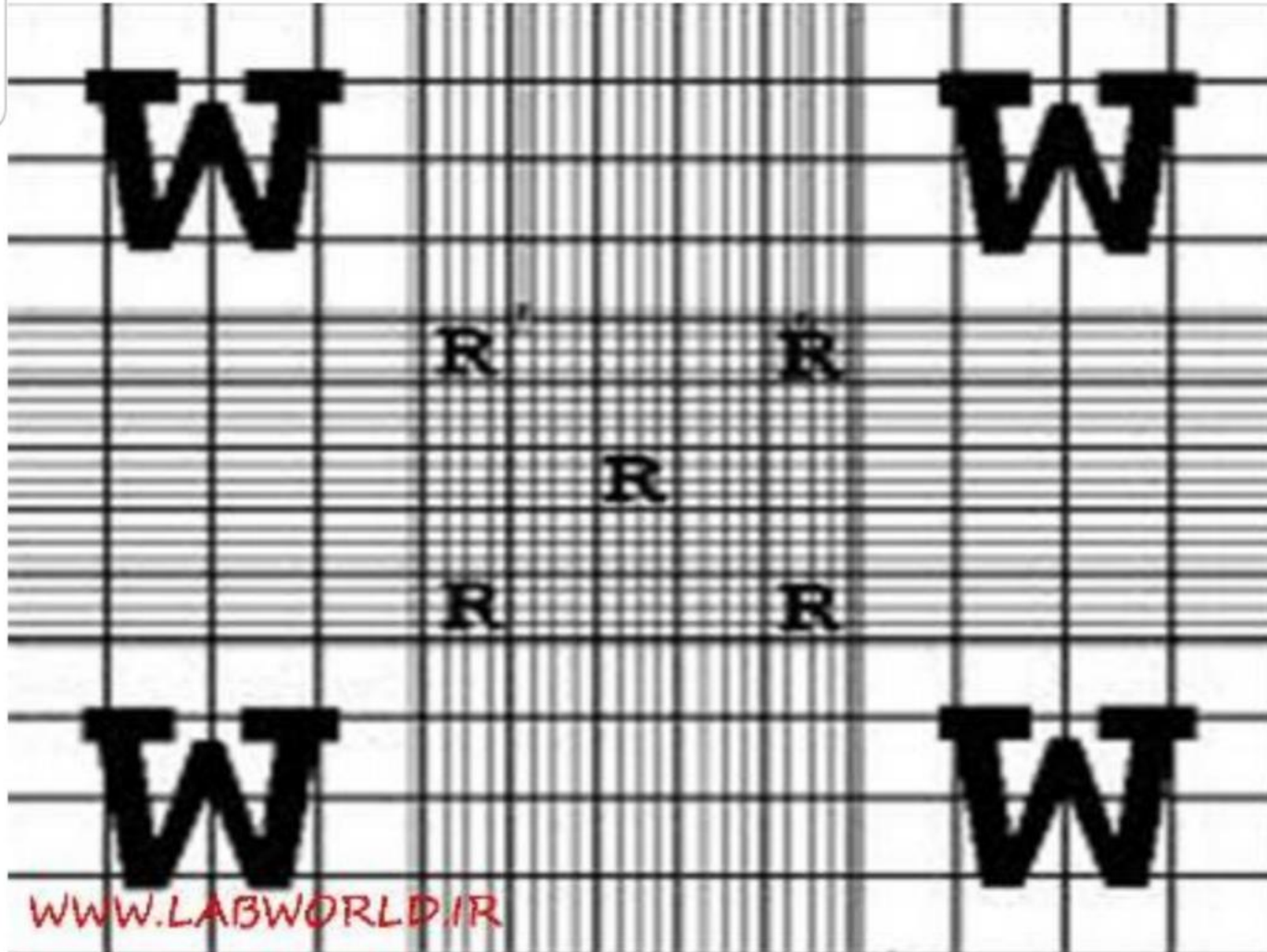
یک قطره از سوسپانسیون مخمر خالص را از محیط کشت آن برداشته و توسط محلول رقیقی از گلوکز استریل با رقت مناسب رقیق کنید و ضریب رقت را یادداشت نمایید. بقیه مراحل را مانند روش قبل انجام دهید. تعداد یاخته های مخمر را در ۲۴، ۴۸، ۱، ۵، ۱۰ و ۷۲ ساعت پس از اینکه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در اتوکلاو قرار داده شدند، شمارش کنید. سپس نمودار تغییر تعداد یاخته های مخمر را نسبت به زمان های اتو گذاری شده بر روی محور مختصات رسم نمایید.

یاد آوری می شود که اگر در هنگام مشاهده و شمارش مخمر ها به انواعی از آن ها برخورد کردید که در حال جوانه زدن می باشند، مخمری را که جوانه کامل و بزرگی از آن در حال جدا شدن است دو مخمر به حساب آورید.



آزمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

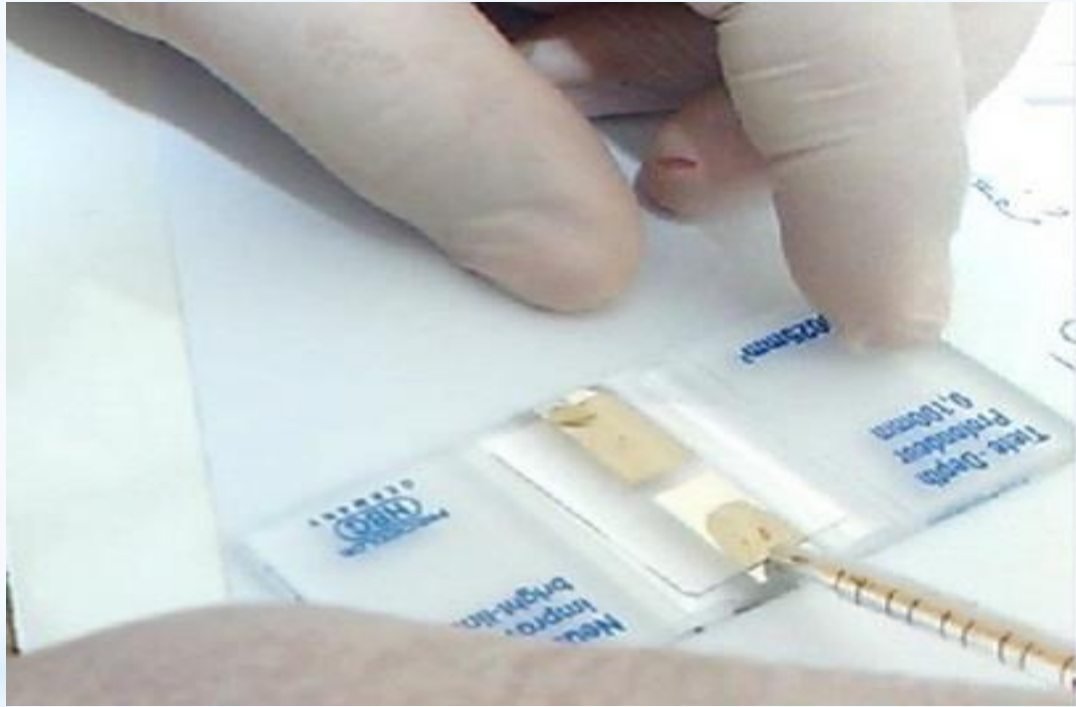
شمارش گلبول سفید - لام نوبار



آزمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

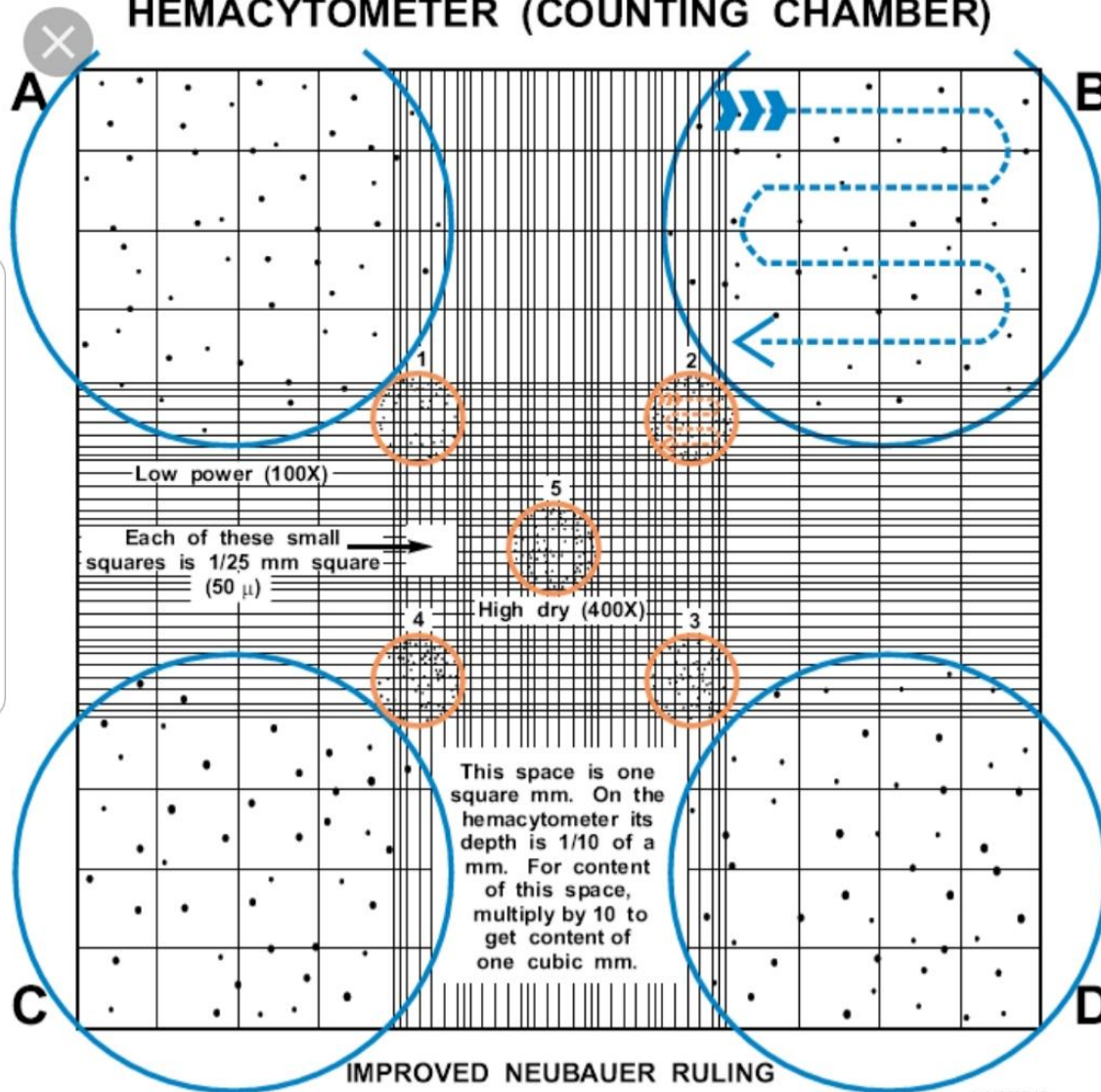


آزمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر



آزمایشگاه سلولی مولکولی-فرزانه فروهرفر

HEMACYTOMETER (COUNTING CHAMBER)



HM3107.16

A - B - C - D ARE FIELDS USED IN DOING THE WHITE BLOOD CELL COUNT.

1 - 2 - 3 - 4 - 5 ARE FIELDS USED IN DOING THE RED BLOOD CELL COUNT.