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

عنوان
شمارش اجسام میکروسکوپی در واحد حجم

اهداف مورد بررسی در این آزمایش عبارتند از:

آشنایی با لام توما یا هموسیتومترو طرز استفاده از آن طبق قوانین استاندارد شمارش اجسام میکروسکوپی

محاسبه تعداد اجسام میکروسکوپی دریک سوسپانسیون سلولی واحد حجم

برای تعیین تعداد یاخته‌های یک جمعیت، مانند شمارش جمعیت یاخته‌ای باکتریها، جلبک‌های تک سلولی، مخمرها و سلول‌های خونی و شمارش اسپرم ها در مراحل تشخیصی ناباروری از روش شمارش میکروسکوپی استفاده میشود.

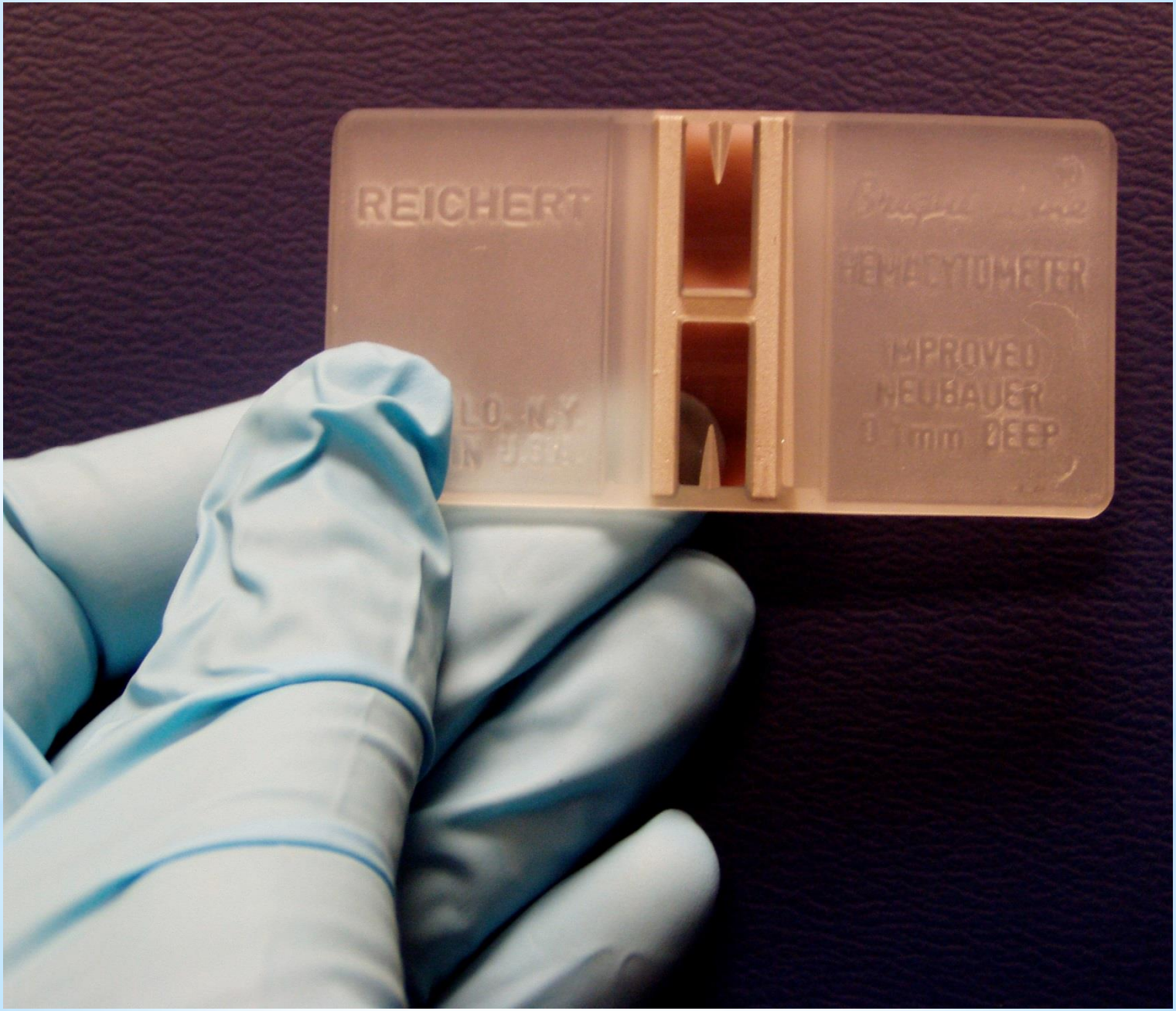
در این روش نمونه مورد شمارش ابتدا بایستی با رقت مناسب در محلول رقیق کننده مناسب تهیه شود.

محلول رقیق کننده حتماً بایستی متناسب با شرایط نمونه تهیه گردد که می‌تواند محلول نمکی ایزوتونیک، یک مایع تثبیت کننده، محیط کشت مناسب، گلوکز استریل و غیره باشد تا شرایط طبیعی نمونه را حفظ کند و نمونه دچار آسیب و تغییرات شیمیایی و فیزیکی نگردد.

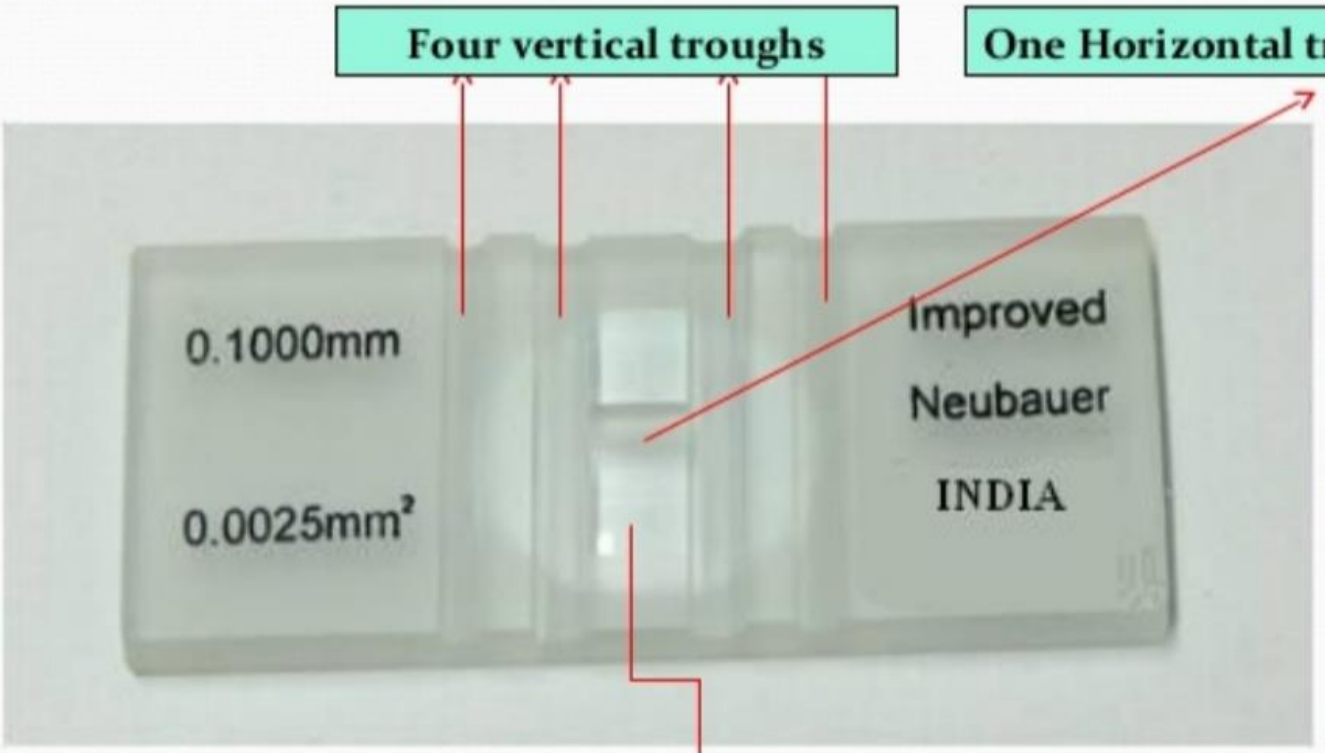
جهت شمارش یاخته‌های میکروسکوپی از لام مخصوصی به نام لام توما(Toma)یا نئوبار(Neobar) یا هموسیتومتر(Hemocytometer)یا محفظه شمارش(Counting Chamber) استفاده می کنیم.

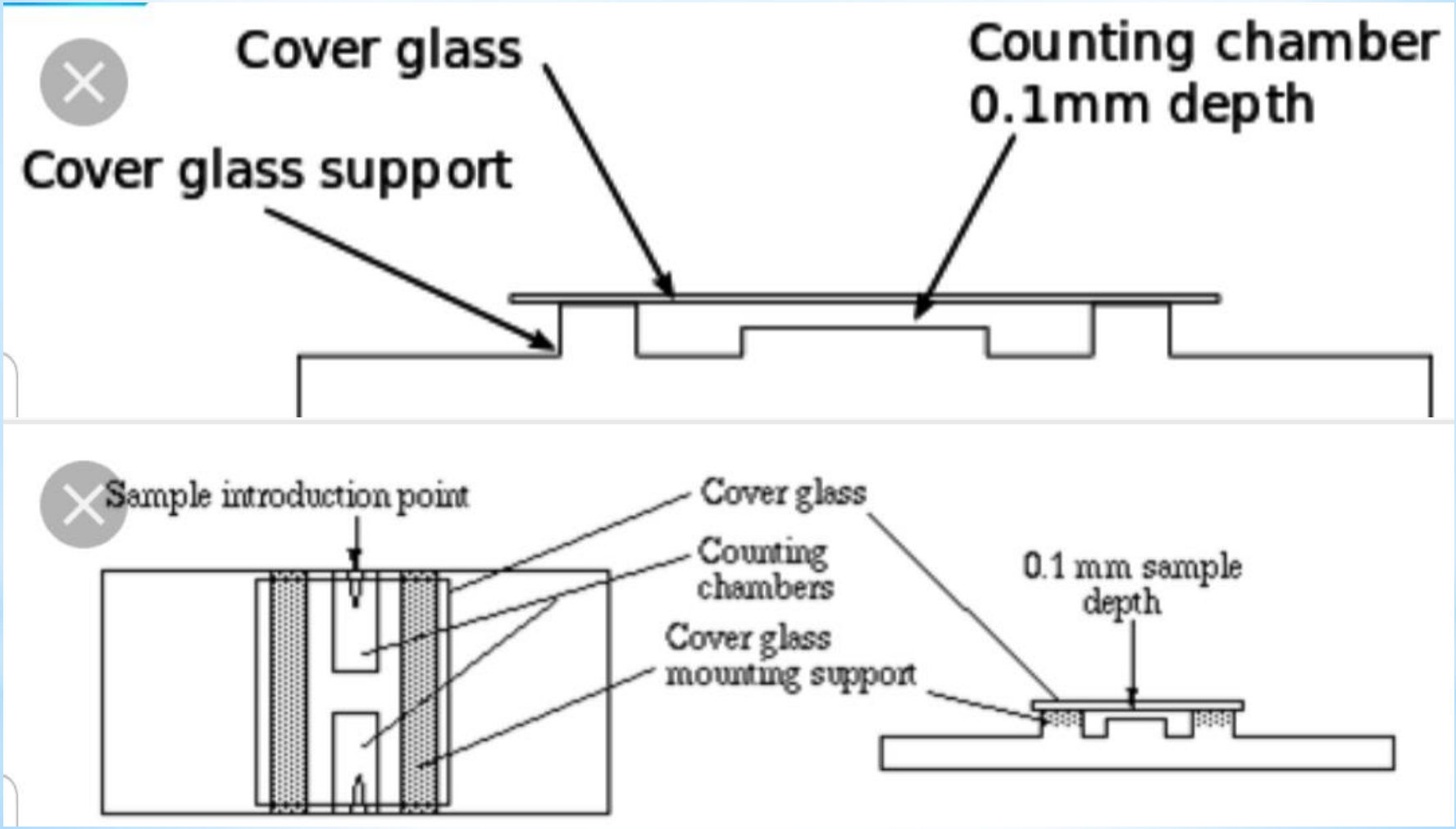
این لام خصوصیات ویژه‌ای دارد که می‌تواند حجم ثابتی از سوسپانسیون مورد نظر را درون خود نگه دارد و جهت شمارش تعداد یاخته‌ها در واحد حجم به کار می‌رود.

REF 0650010
Zählkammer
Counting chamber
Cámara de recuento
Cellule à numération globulaire
Neubauer-improved
In-vitro diagnostica
LOT 608154
Tiefe · Depth
Profondeur
0,100mm
0,0025 mm²


REICHERT
IMPROVED
NEUBAUER

COUNTING CHAMBER

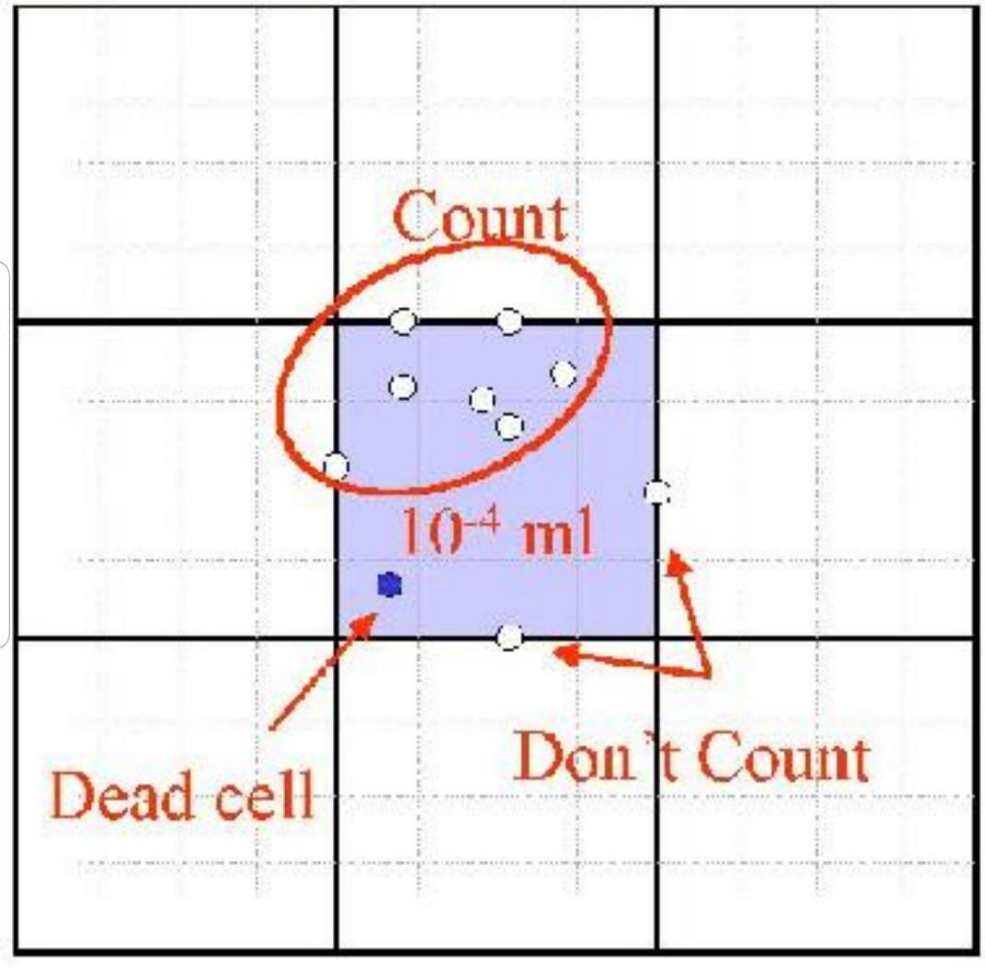


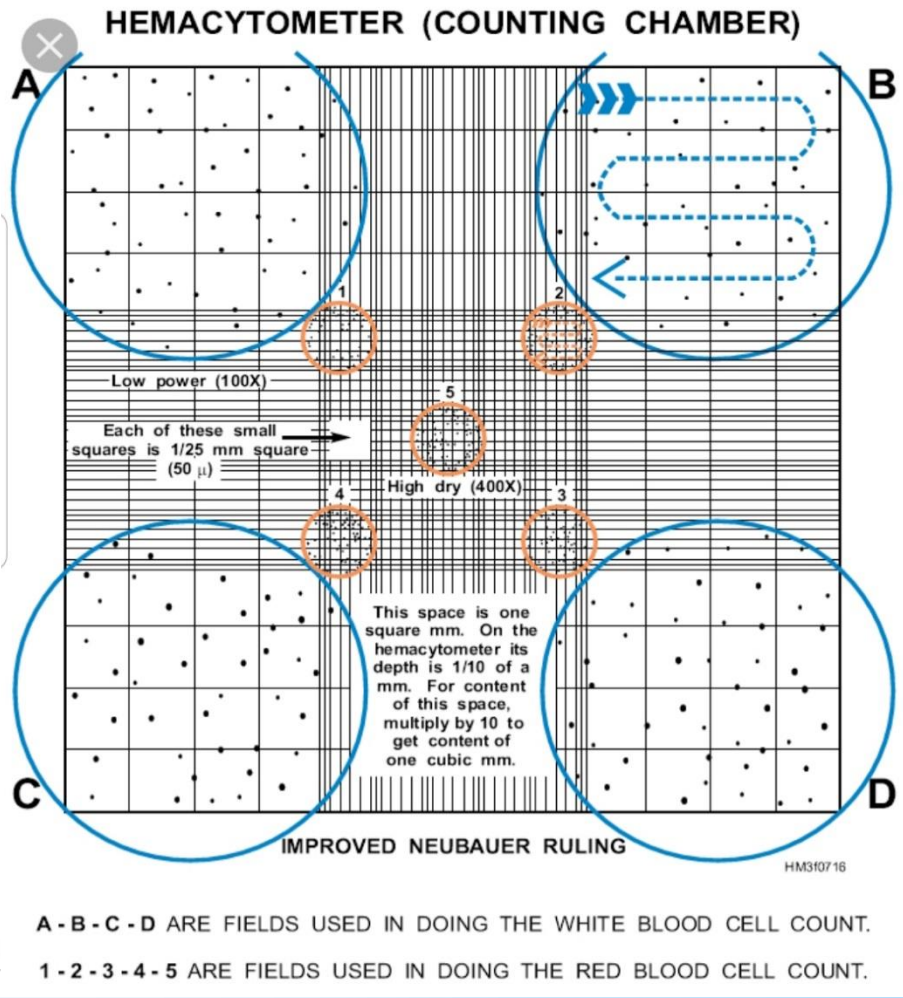

Cover glass
Counting chamber
0.1mm depth
Cover glass support
Sample introduction point
Cover glass
Counting
chambers
Cover glass
mounting support
0.1 mm sample
depth

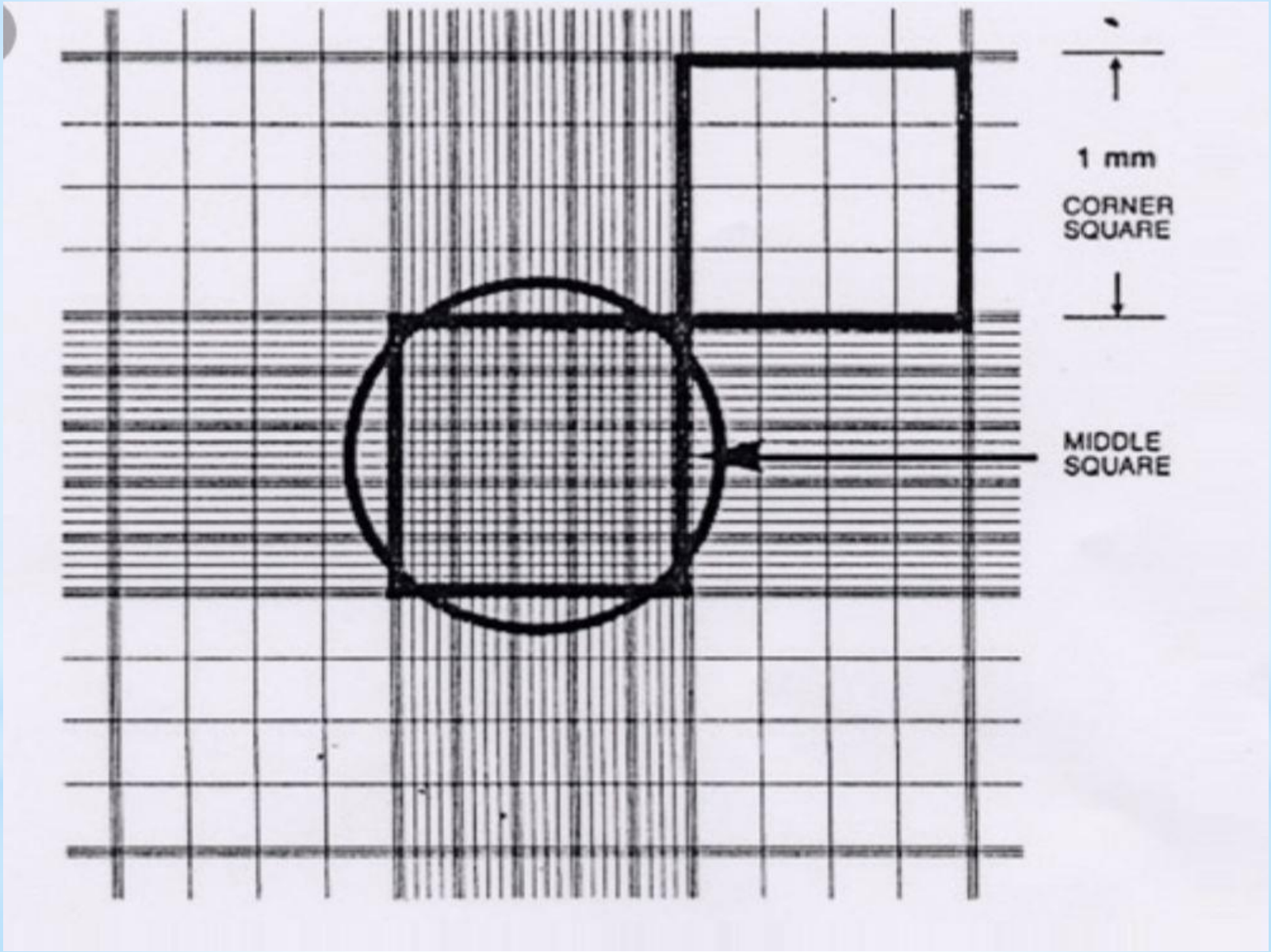
مشخصات ویژه در لام توما

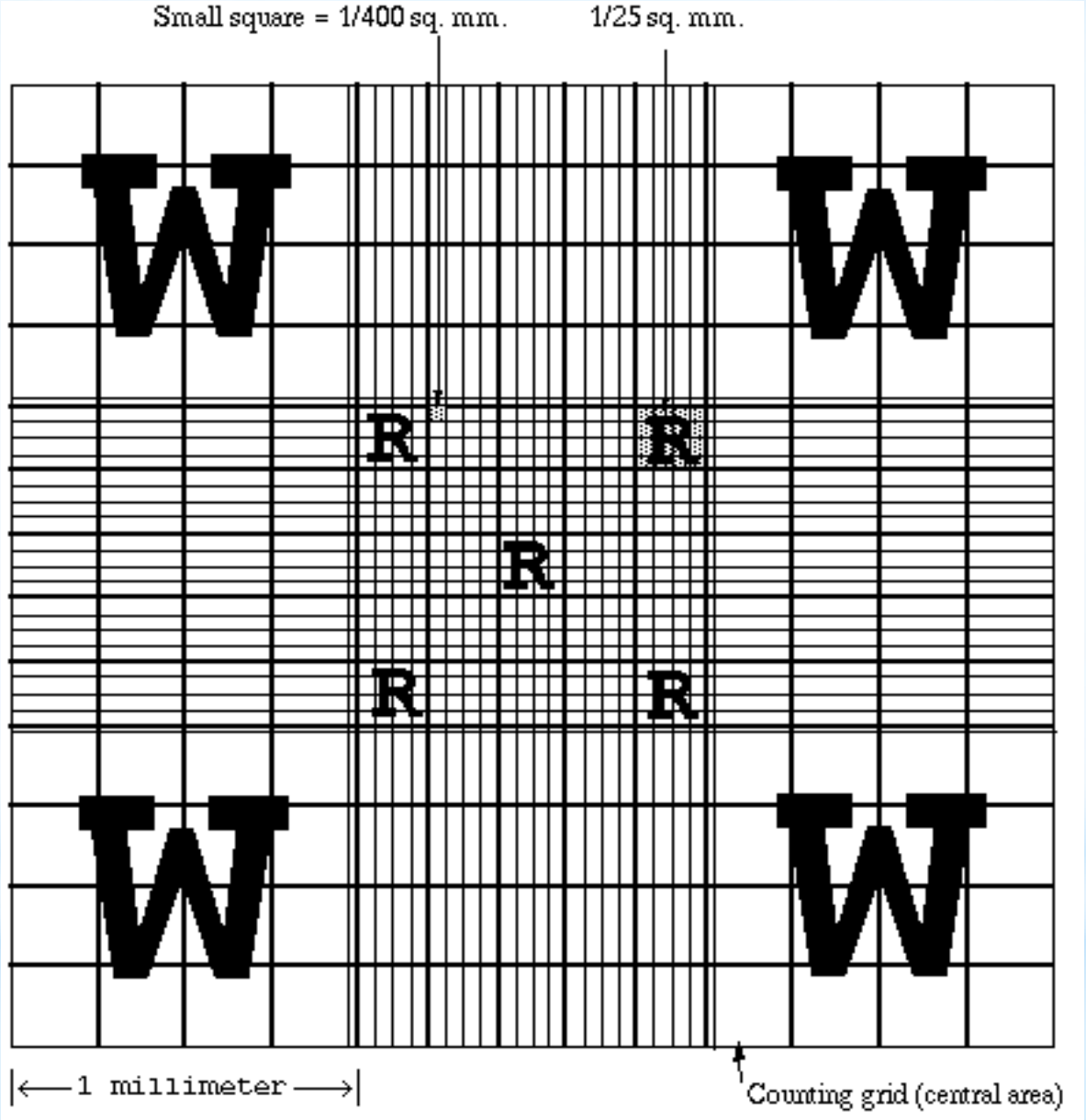
بخش مدرج خانه بندی شده لام شامل ۵ مربع بزرگ با ابعاد مساوی ۱ در ۱میلی‌متر است. عمق (Deep)نیز در تمام قسمتهای خانه بندی شده لام توما یکسان و معادل ۰.۱ میلی‌متر است.
لام توما شامل تعدادی مربع است که مربع بزرگ میانی در مرکز لام به ۲۵ مربع متوسط تقسیم شده و مربع‌های بزرگ کناری به ۱۶ مربع متوسط مساوی تقسیم بندی شده‌اند.
هر یک از مربع‌های متوسط مربع بزرگ مرکزی خود به ۱۶ مربع کوچک تقسیم شده است .

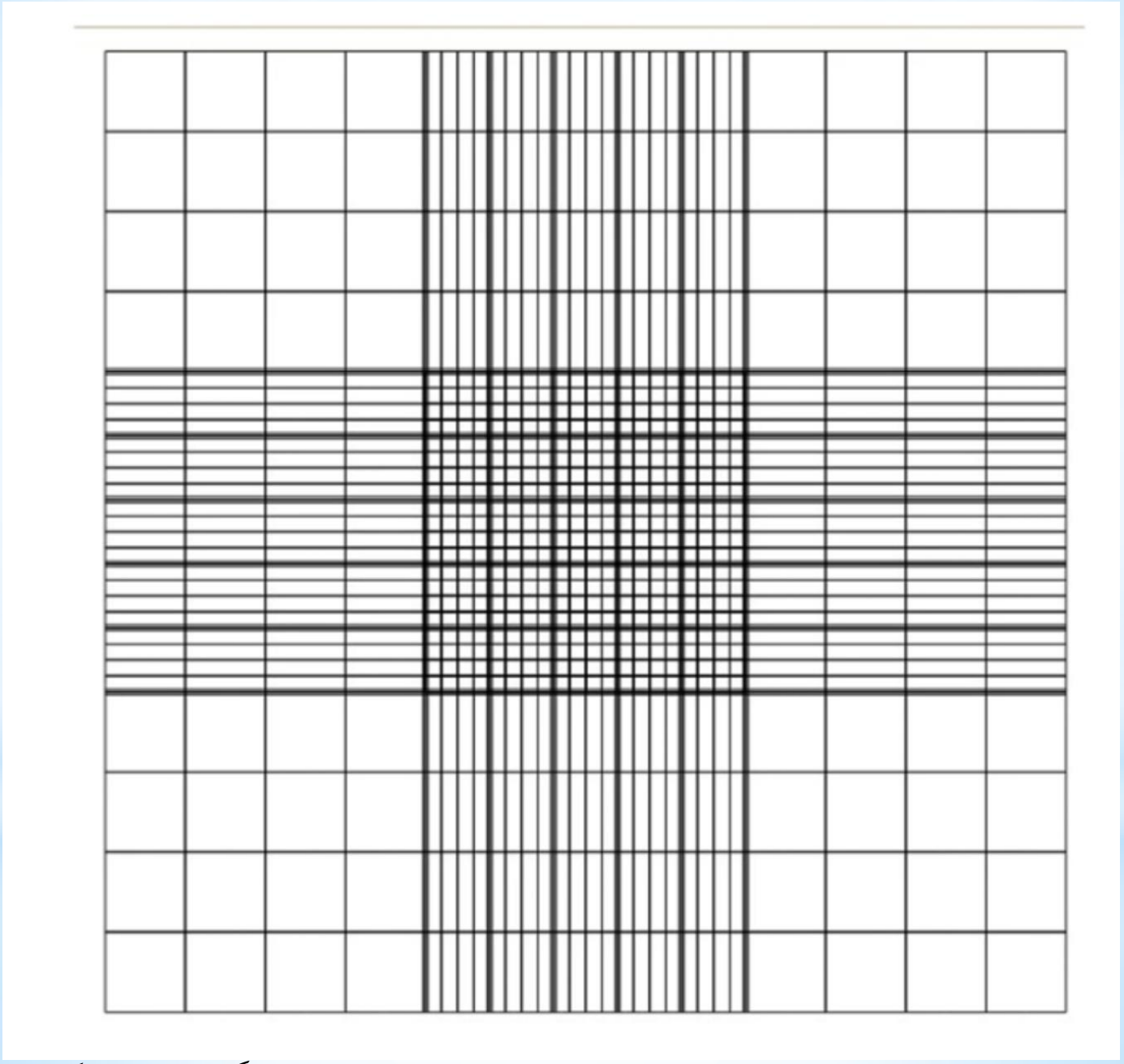
الگوی خانه بندی لام توما


Count
10^{-4} ml
Dead cell
Don't Count


HEMACYTOMETER (COUNTING CHAMBER)
A
B
C
D
1
2
3
4
5
Low power (100X)
Each of these small squares is 1/25 mm square (50 μ)
High dry (400X)
This space is one square mm. On the hemacytometer its depth is 1/10 of a mm. For content of this space, multiply by 10 to get content of one cubic mm.
IMPROVED NEUBAUER RULING
HM3f0716
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.


1 mm
CORNER SQUARE
MIDDLE SQUARE


Small square = 1/400 sq. mm.
1/25 sq. mm.
1 millimeter
Counting grid (central area)



طول مربع‌ها عبارت‌اند از:

مربع بزرگ: ۱ میلی‌متر، مربع متوسط: $\frac{1}{5}=0.2$ میلی متر

و مربع کوچک: $\frac{1}{20}=0.05$ میلی‌متر.

با توجه به عمق ۰/۱ میلی‌متری حجم به روش زیر قابل محاسبه است:

مساحت مربع بزرگ

$$=1\times1=1mm^2$$

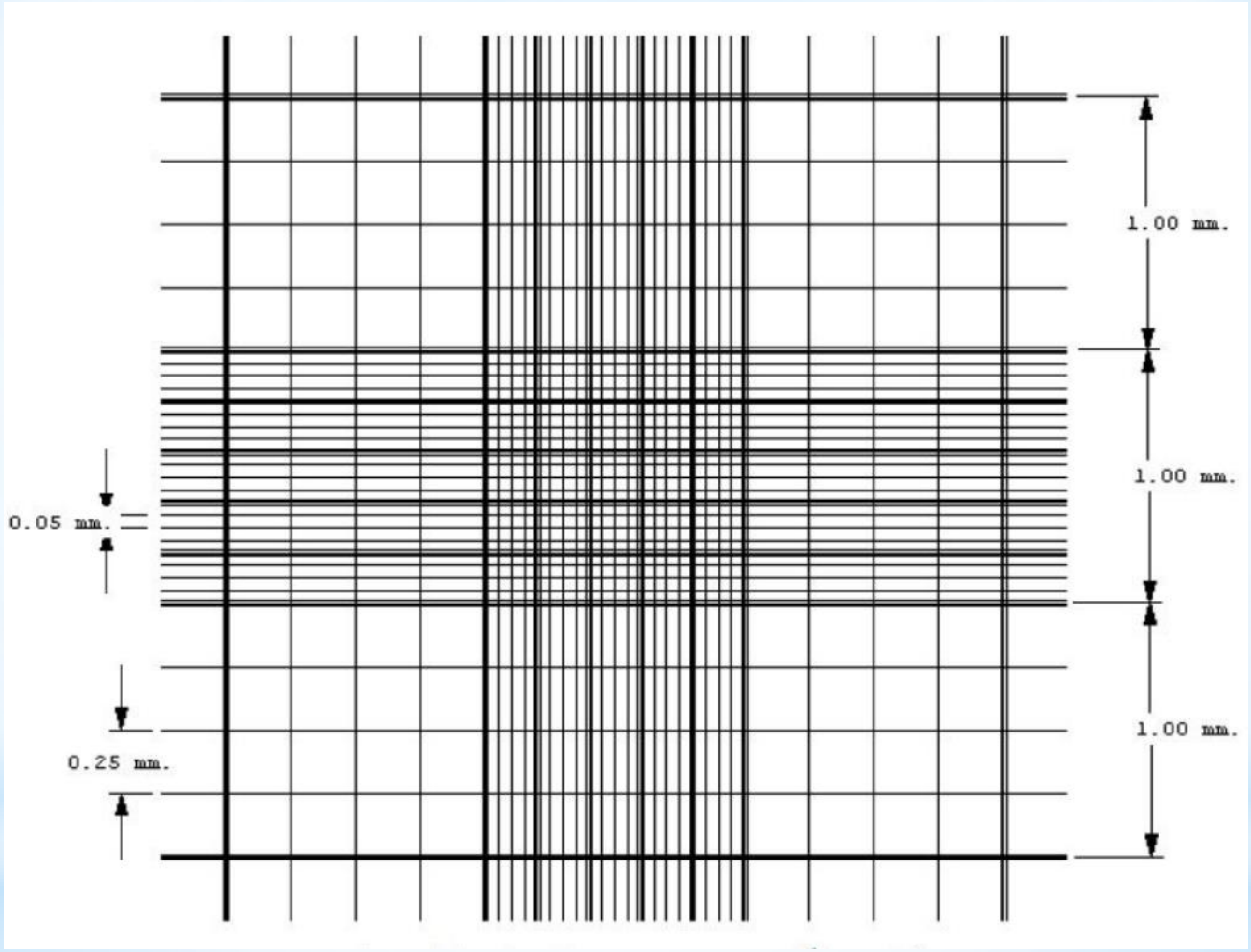
$$\text{مساحت مربع متوسط}=\frac{1}{5}\times\frac{1}{5}=\frac{1}{25}=0.04mm^2$$

$$\text{مساحت مربع کوچک}=\frac{1}{20}\times\frac{1}{20}=\frac{1}{400}=0.0025mm^2$$

$$\text{حجم مربع بزرگ}\quad=1\times\frac{1}{10}=\frac{1}{10}=0.1mm^3$$

$$\text{حجم مربع متوسط}\quad=\frac{1}{25}\times\frac{1}{10}=\frac{1}{250}=0.004mm^3$$

$$\text{حجم مربع کوچک}\quad=\frac{1}{400}\times\frac{1}{10}=\frac{1}{4000}=0.00025mm^3$$


1.00 mm.
1.00 mm.
1.00 mm.
0.05 mm.
0.25 mm.

قوانین استانداردی که در رابطه با شمارش اجسام میکروسکوپی در لام توما یا نئوبار بایستی رعایت گردد:

۱. در صورت شمارش یاخته‌ها از طریق مربع بزرگ می‌توان ۴ یا ۵ مربع را انتخاب کرد، یاخته‌ها را شمرده و میانگین بگیرید و سپس با استفاده از حجم مربع بزرگ و با در نظر گرفتن تبدیل واحد تعداد را محاسبه کنید.

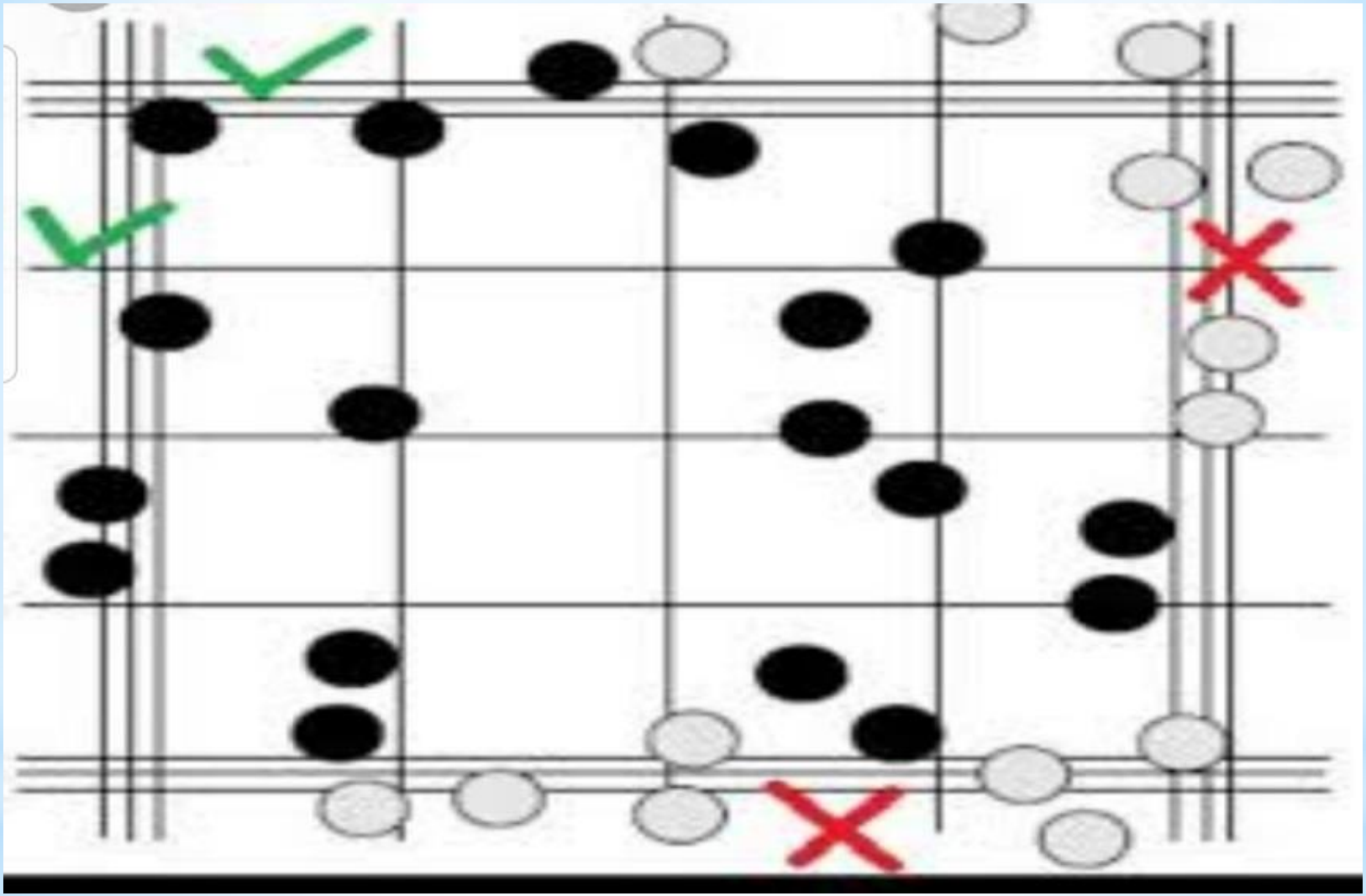
۲. در صورت شمارش یاخته‌ها از طریق مربع متوسط نبایستی هر ۲۵ مربع متوسط را شمرد بلکه ۵ مربع مشخص شده را باید انتخاب کرد که در راستای قطر مربع بزرگ قرار دارند. سپس میانگین تعداد یاخته‌های مورد شمارش در آن خانه ها را حساب و با استفاده از حجم مربع متوسط تعداد را محاسبه کنید.

در هر حالت تعداد بایستی تعداد در عدد فاکتور رقت ضرب شود تا تعداد واقعی نمونه در ۱ واحد از محیط زیست آن محاسبه گردد.

قانون استاندارد سه خطی

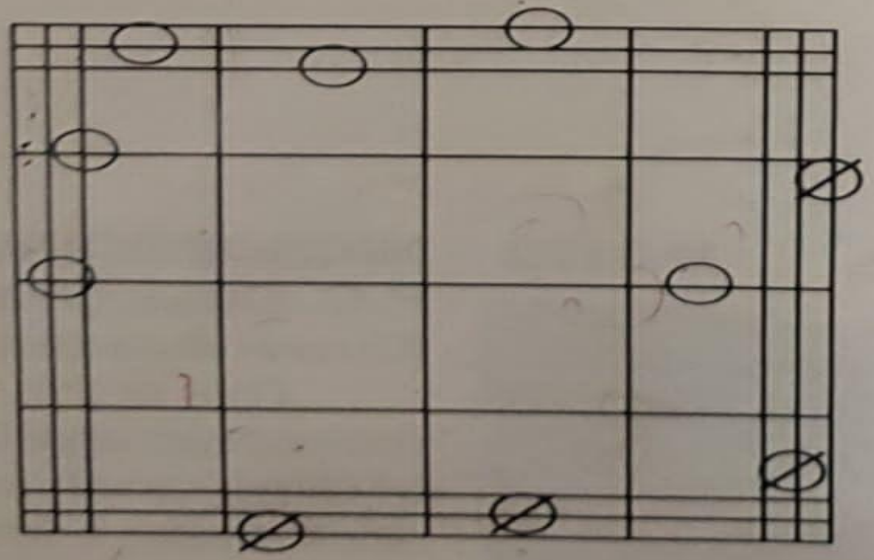
۳. اگر به طور دقیق به خانه بندی های لام توما در زیر میکروسکوپ دقت شود، مشاهده می‌کنید که اضلاع دور مربع‌های متوسط ۳ خطی هستند، به این دلیل است که نمونه‌های روی اضلاع مربع‌ها دو بار شمرده نشوند و از قانون خاصی استفاده می‌شود، به این ترتیب که:

۴ . خط دور مربع‌های متوسط از خارج به داخل عبارت اند از: خط خارجی (Outer line)، خط میانی(Middle line) و خط داخلی(Inner line). یاخته‌های موجود در خانه مورد نظر شمارش می‌شوند و اگر یاخته‌ای بر روی خط میانی بالا و سمت چپ قرار گرفته باشد، به طوریکه حتی کوچکترین بخش سلول خط را لمس کند برای خانه مورد نظر شمارش می‌شود، اما اگر بر روی خط میانی پایین و سمت راست قرار گرفته‌باشد در شمارش به حسابنمی‌آیند. بدیهی است که در خانه‌های مجاور شمرده می‌شوند.به این ترتیب یک نمونه بیش از دو بار شمرده نمی‌شودو خطای شمارش حداقل می‌گردد.



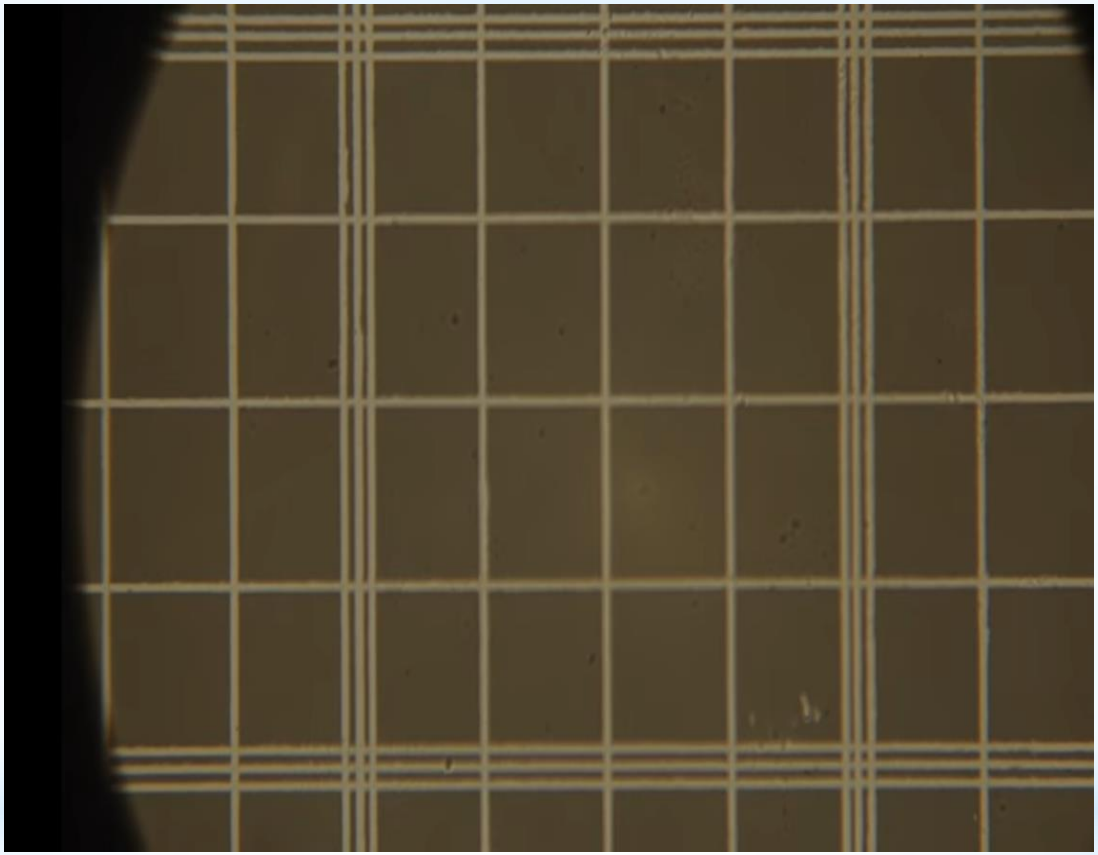
نحوهٔ شمارش نمونه‌های میکروسکوپی بر روی اضلاع مربع‌های متوسط

DIAGRAM II
CORNER SQUARE
(ENLARGEMENT)



Count cells on top and left touching middle line (○).

Do not count cells touching middle line at bottom and right (∅).



توجه ۱:

در مطالعات میکروسکوپی اجسام یاخته‌ای، نبایستی بیش از ۱۰ درصد یاخته‌ها به هم چسبیده و به حالت لخته باشند. در این‌صورت قبل از شمارش بایستی لام را شسته، خشک کنید و مجدداً نمونه را روی لام بریزید.

توجه ۲:

یاخته‌های کوچک تازه تقسیم شده را در بزرگنمایی های بالاتر به دقت بررسی کنید و در شمارش به حساب آورید.

با در نظر گرفتن و رعایت کلیه اصول و موارد فوق در شمارش اجسام میکروسکوپی خطا در شمارش حداقل و اعداد واقعی در رابطه با نمونه‌های بیولوژیکی به‌دست خواهدآمد.

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. محلول رقیق کننده مناسب نمکی

۲. محیط کشت جلبک دانیلا (Daniella)

۳. لام توما و لامل استاندارد

۴. سمپلر

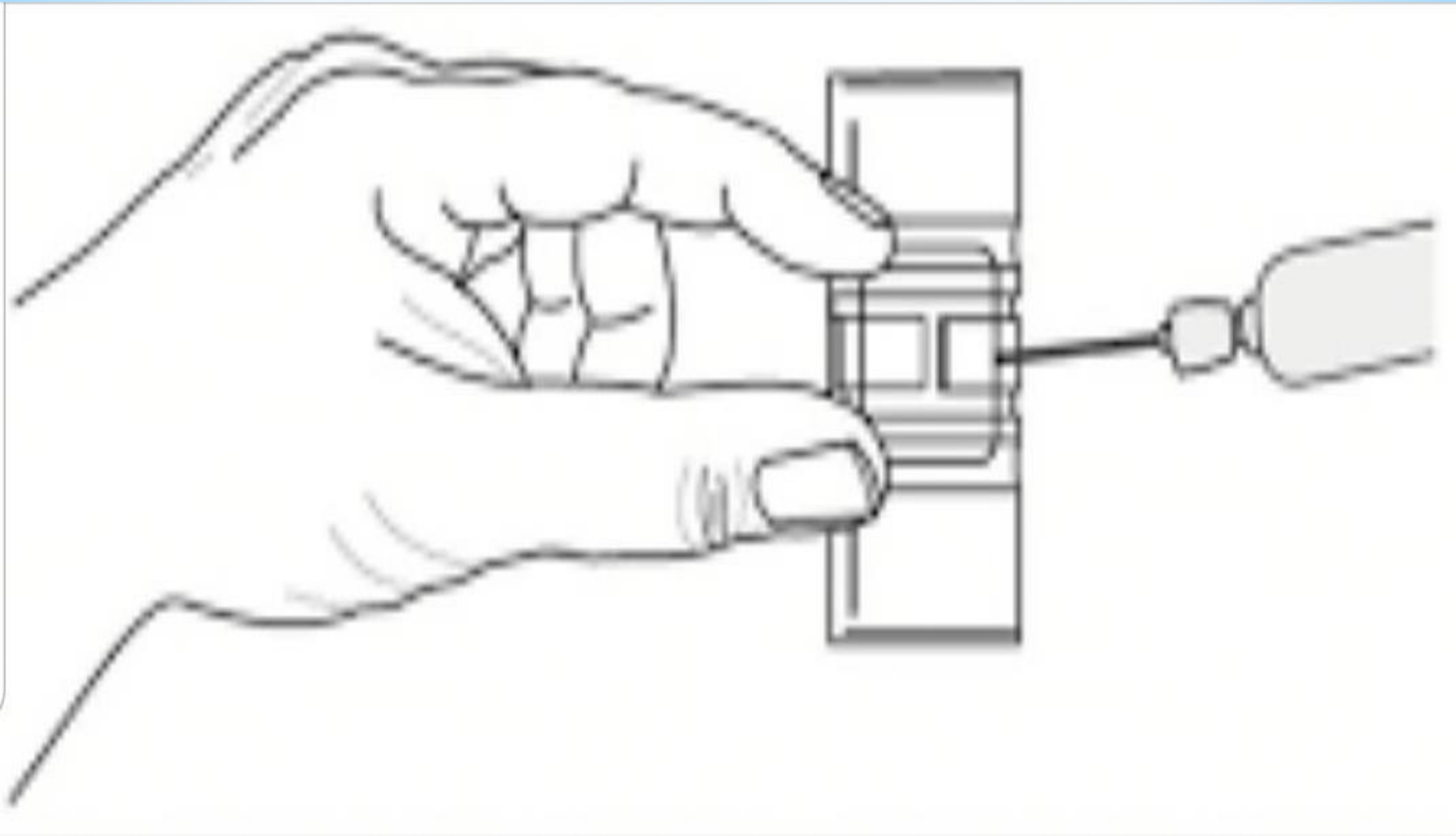
۵. میکروسکوپ نوری

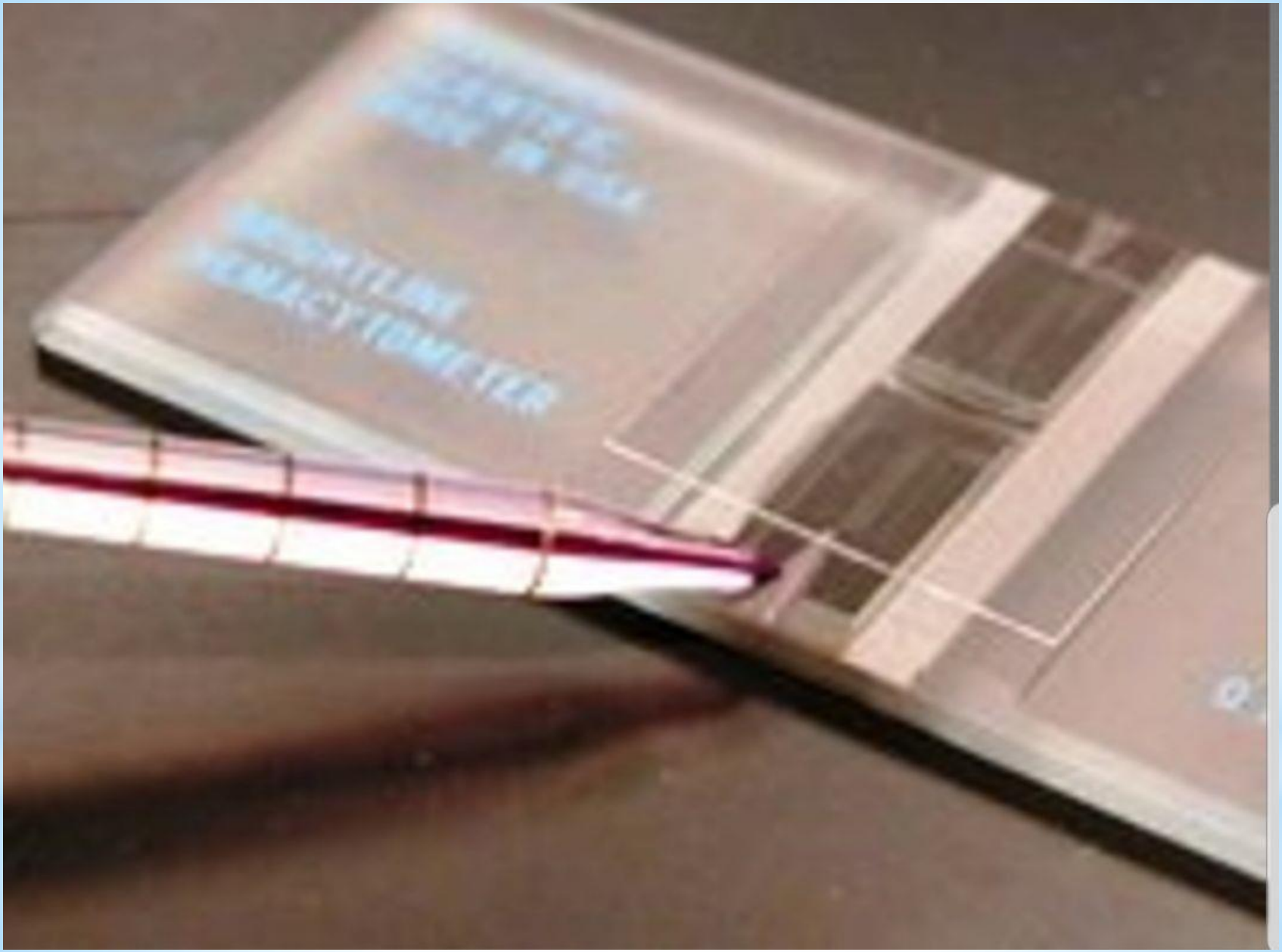
۶.محلول رنگی تریپان بلو جهت تشخیص سلولهای زنده از مرده

روش کار

پیش از شروع کار اطمینان حاصل کنید که لام توما و لاملی که روی آن قرار می‌گیرد،عاری از هر نوع آلودگی باشند. لامل استفاده شده بر روی هموساتومتر ضخیم تر از لامل‌های معمول به کار رفته در سنجش‌های میکروسکوپی است، تا بتوانند بر کشش سطحی یک قطره مایع غلبه کنند.
مطمئن شوید که پیش از قرار دادن سوسپانسیون سلولی، لامل را بر روی سطح شمارش‌کننده قرار دهید ؛ سپس نوک سمپلر حاوی نمونه جلبک‌های تک‌سلولی دانیلا که از محیط زیست آن‌ها، توسط محلول رقیق کنندهٔ مناسب به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده است را از شیارهای کناری موجود در لام توما تخلیه کنید. ناحیه زیر لامل با کمک نیروی مویینه پر خواهد شد. این مقدار حدوداً ۱۰ میکرومتر است.

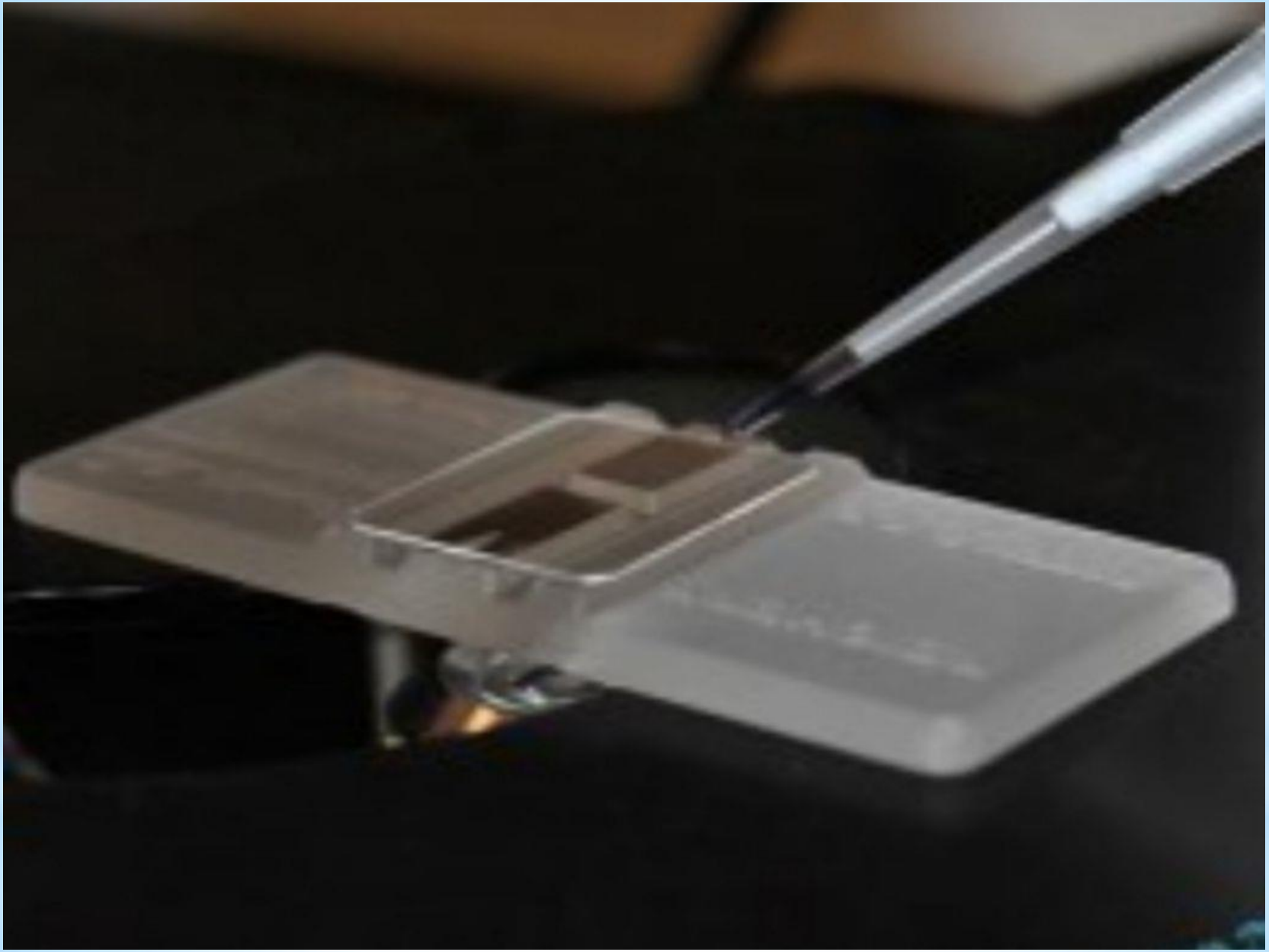
دقت شود برای رقیق کردن نمونه ابتدا از جمعیت یاخته‌ای توسط ۱۰سی‌سی برداشته و از محلول رقیق کننده مناسب ۱۰ سی‌سی به آن اضافه می‌کنیم، در این صورت فاکتور رقت ۲ می‌باشد. نمونه را زیر میکروسکوپ مشاهده می‌کنیم. اگر باز هم تراکم سلولها زیاد بود و احتمال شمارش نمونه‌ها با خطا وجود داشت، می‌توان نمونه را چند برابر دیگر رقیق کرد. در صورت نیاز می‌توان فاکتور رقت را افزایش، و نهایتاً در محاسبات آن را تأثیر داد.



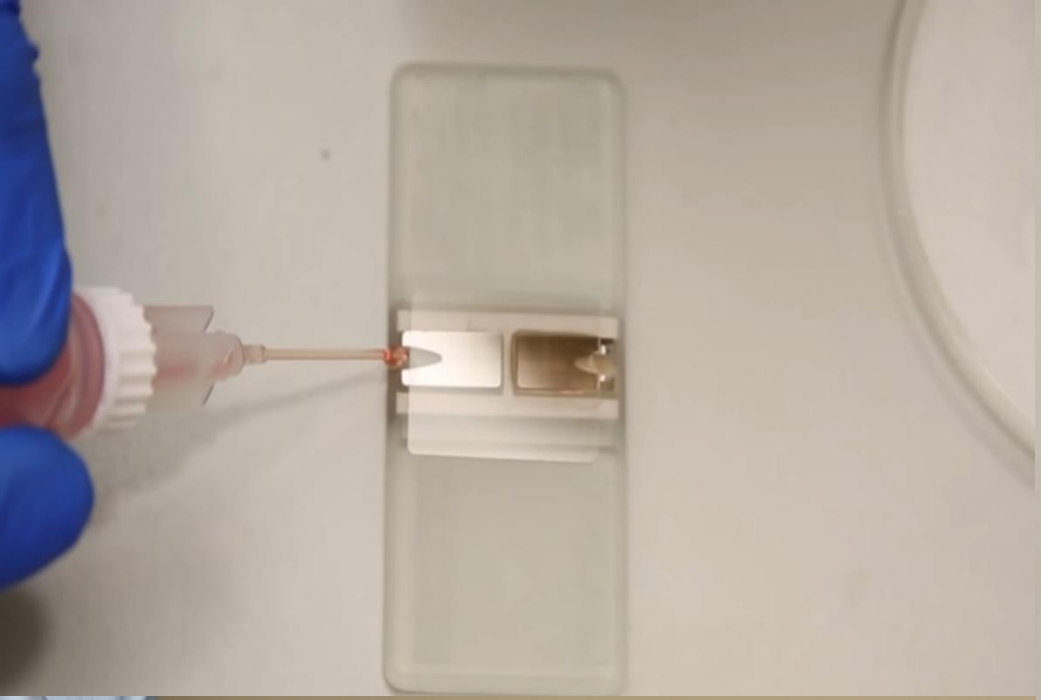


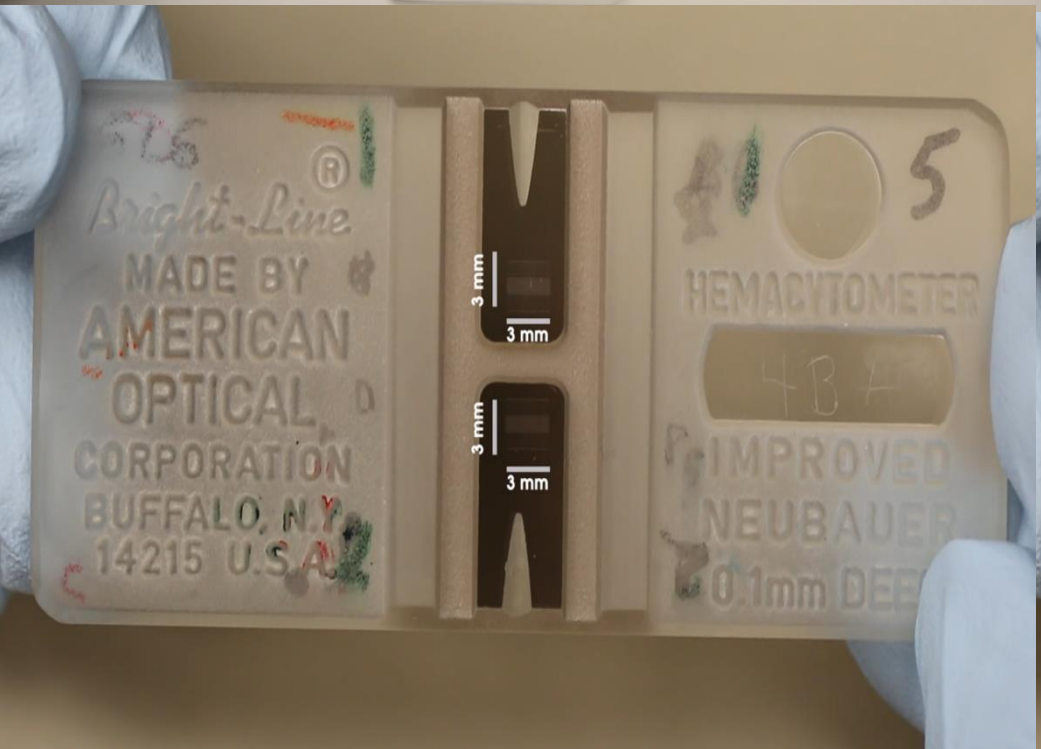
آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

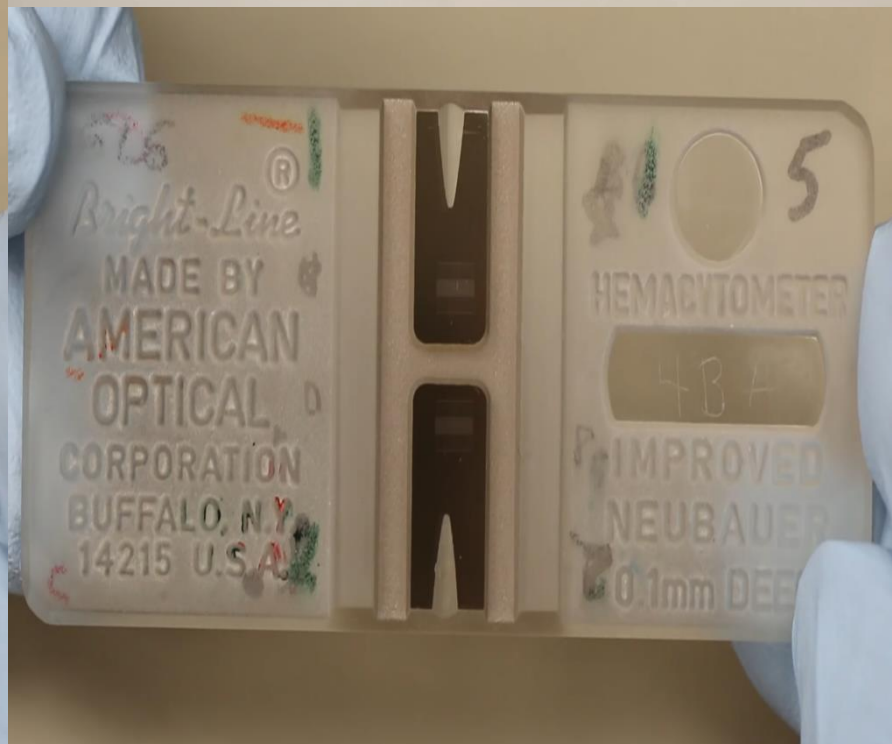
Tiefe · Depth
Profondeur
0.100mm
Neubauer
improved
0.0025 mm²
MARIENFELD



آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر



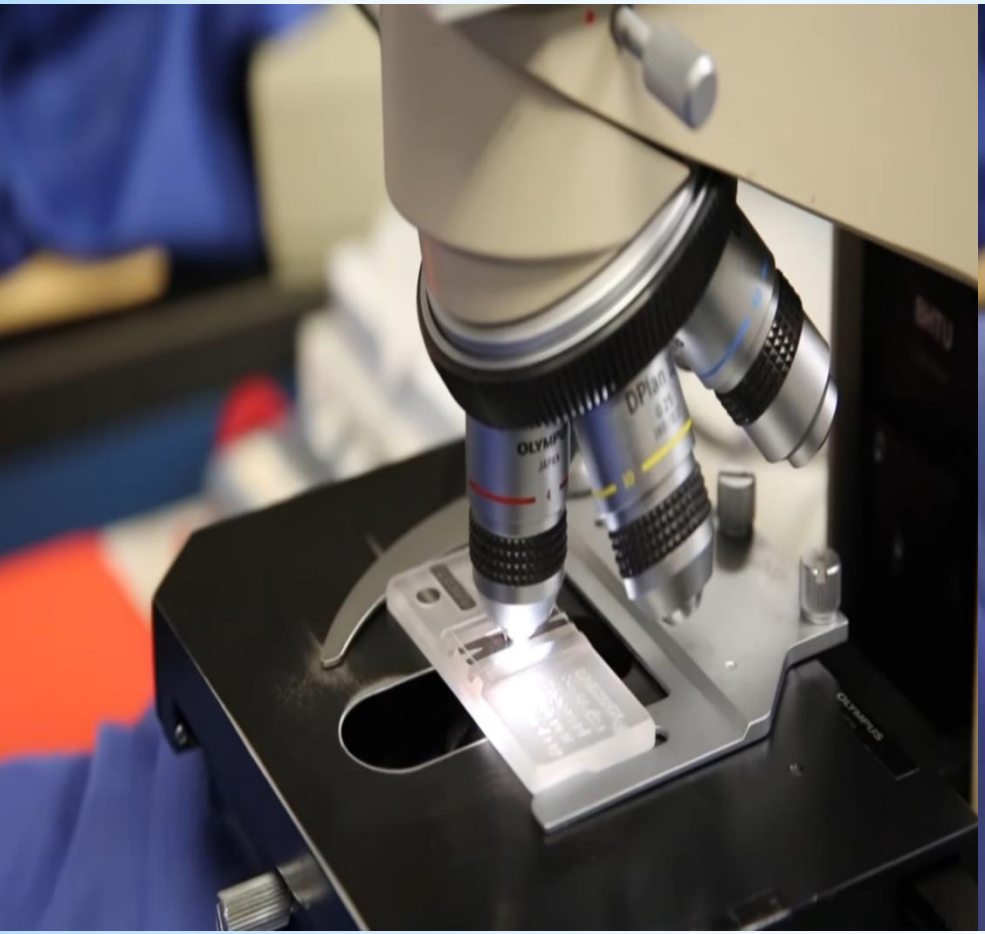

Bright-Line
MADE BY
AMERICAN
OPTICAL
CORPORATION
BUFFALO, N.Y.
14215 U.S.A.
3 mm
3 mm
3 mm
3 mm
HEMACYTOMETER
IMPROVED
NEUBAUER

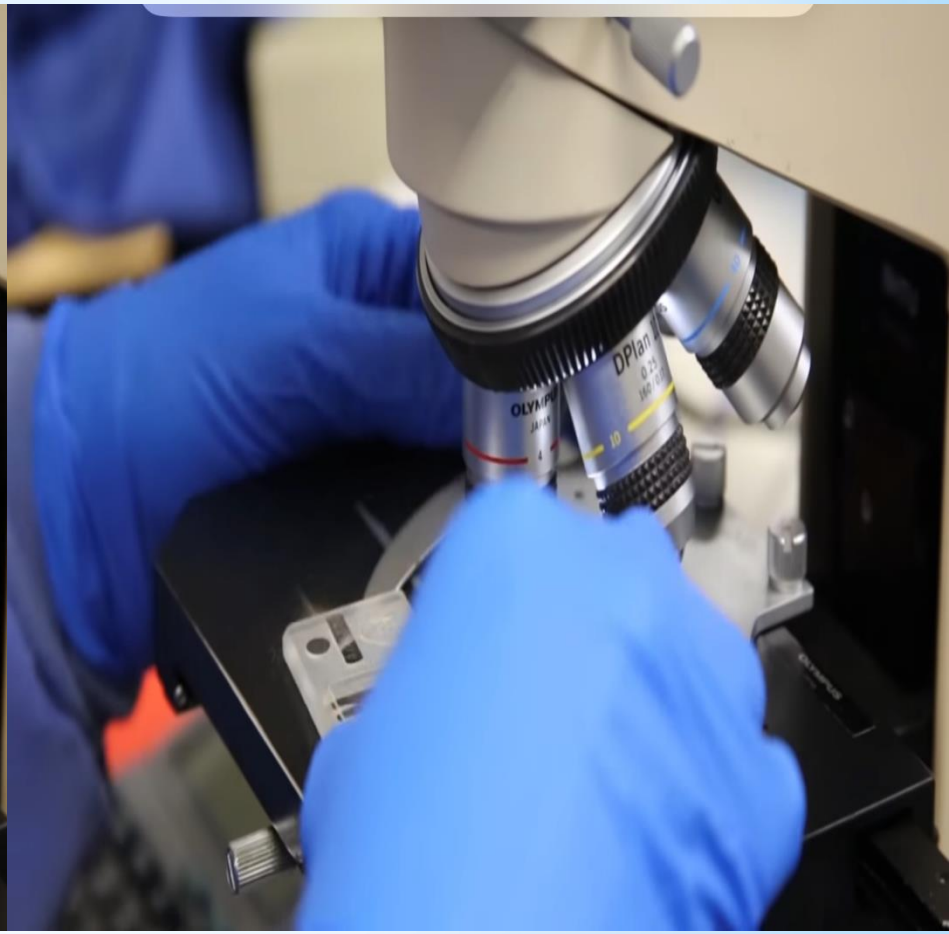

Bright-Line
MADE BY
AMERICAN
OPTICAL
CORPORATION
BUFFALO, N.Y.
14215 U.S.A.
HEMACYTOMETER
IMPROVED
NEUBAUER

با کم کردن نور و تنظیم کنتراست، خانه‌ها و نمونه‌های مورد شمارش را در بزرگنمایی ۱۰ یا ۴۰ به دقت مورد بررسی قرار دهید.

برای شمارش، از خانه های متوسط که در راستای قطر مربع بزرگ میانی قرار دارند استفاده کنید. میانگین تعدادیاخته ها را به دست آورید.

سپس با استفاده از حجم مربع متوسط تعداد یاخته‌ها را در ۱ واحد از محیط زیست آن‌ها حساب کرده و در عدد فاکتور رقت ضرب کنید. دقت کنید، در روی لام در قسمت آینه مانند ۲ خانه بندی مشابه در بالا و پایین تکرار شده است.

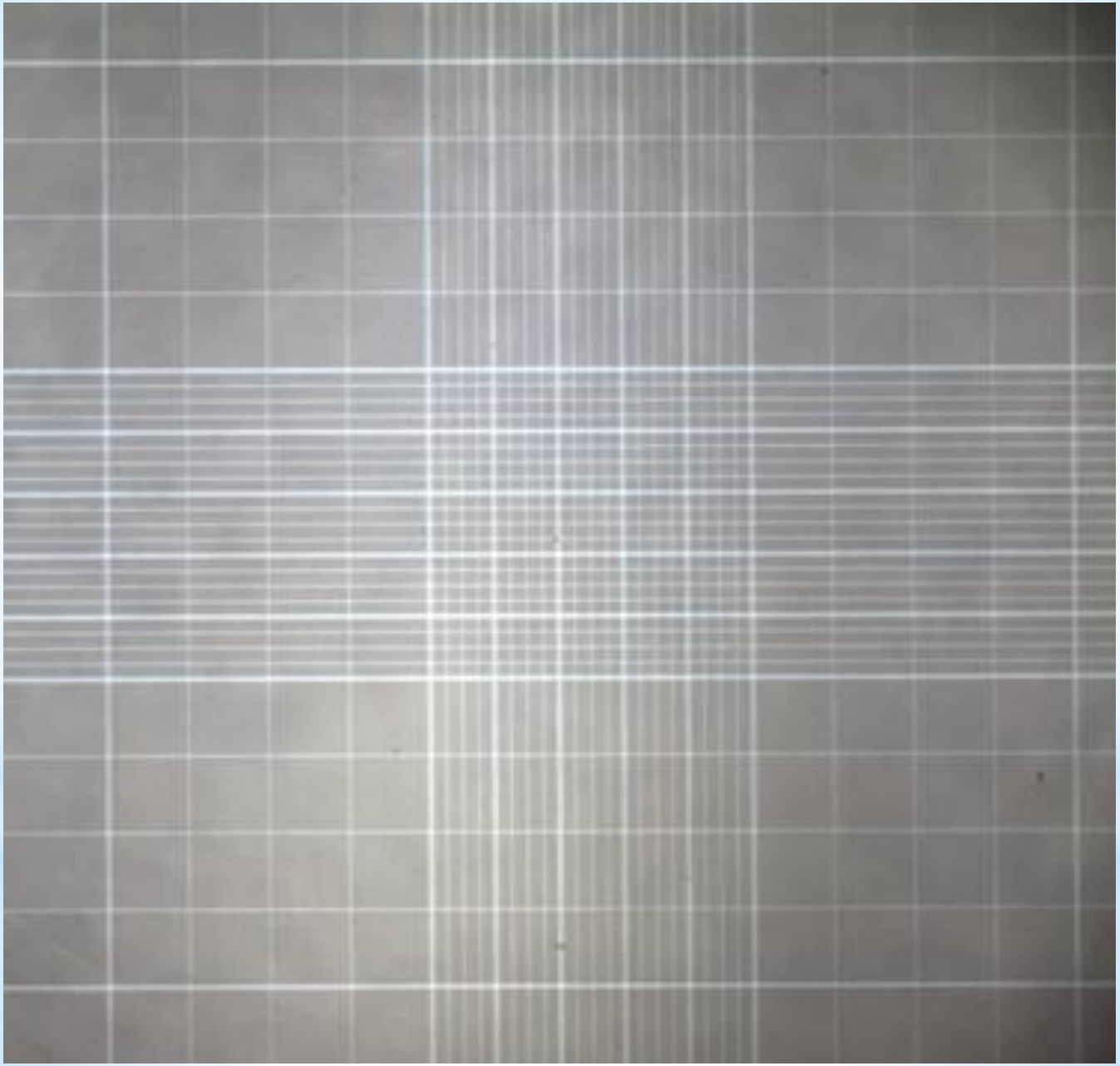




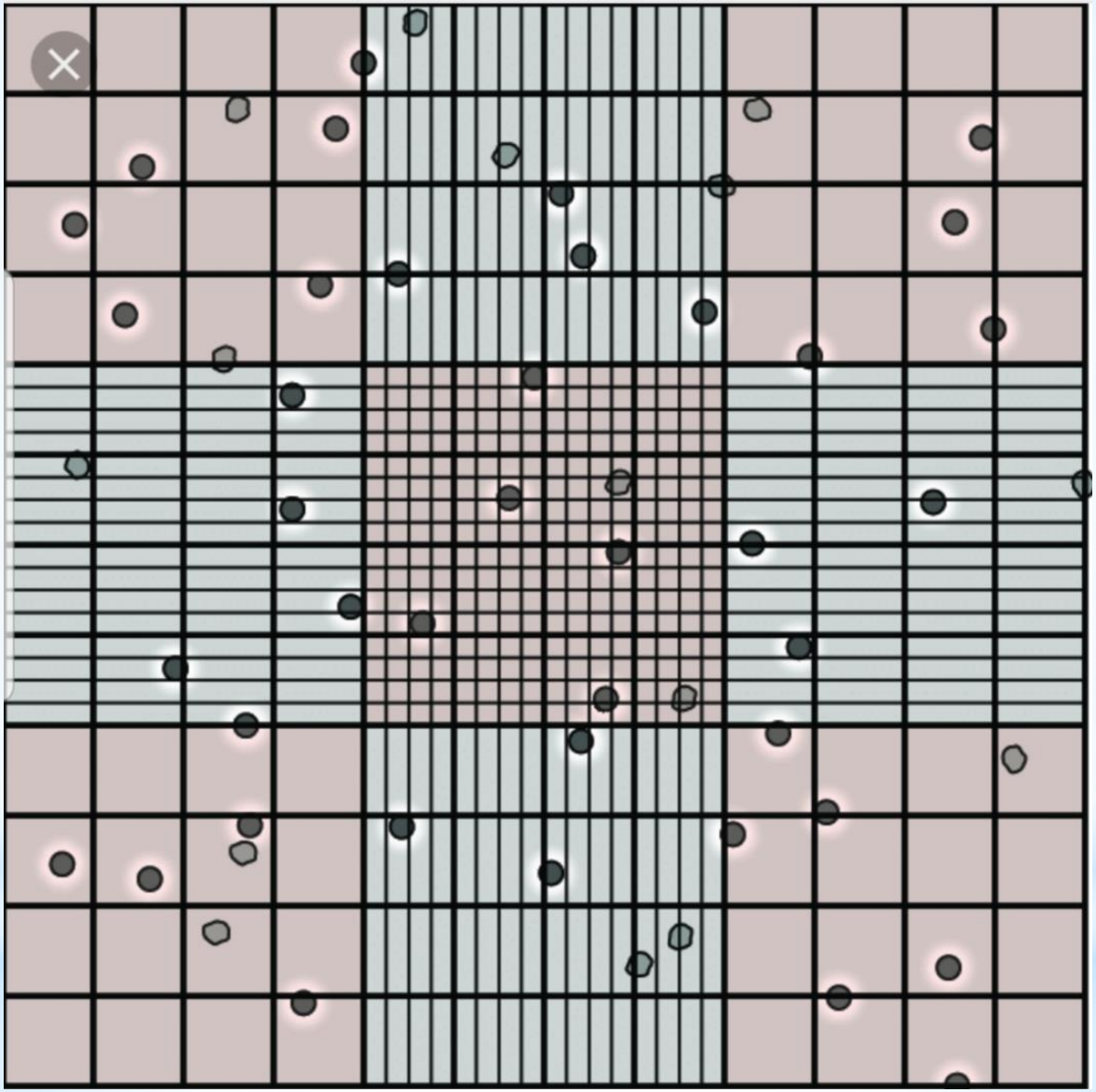
آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

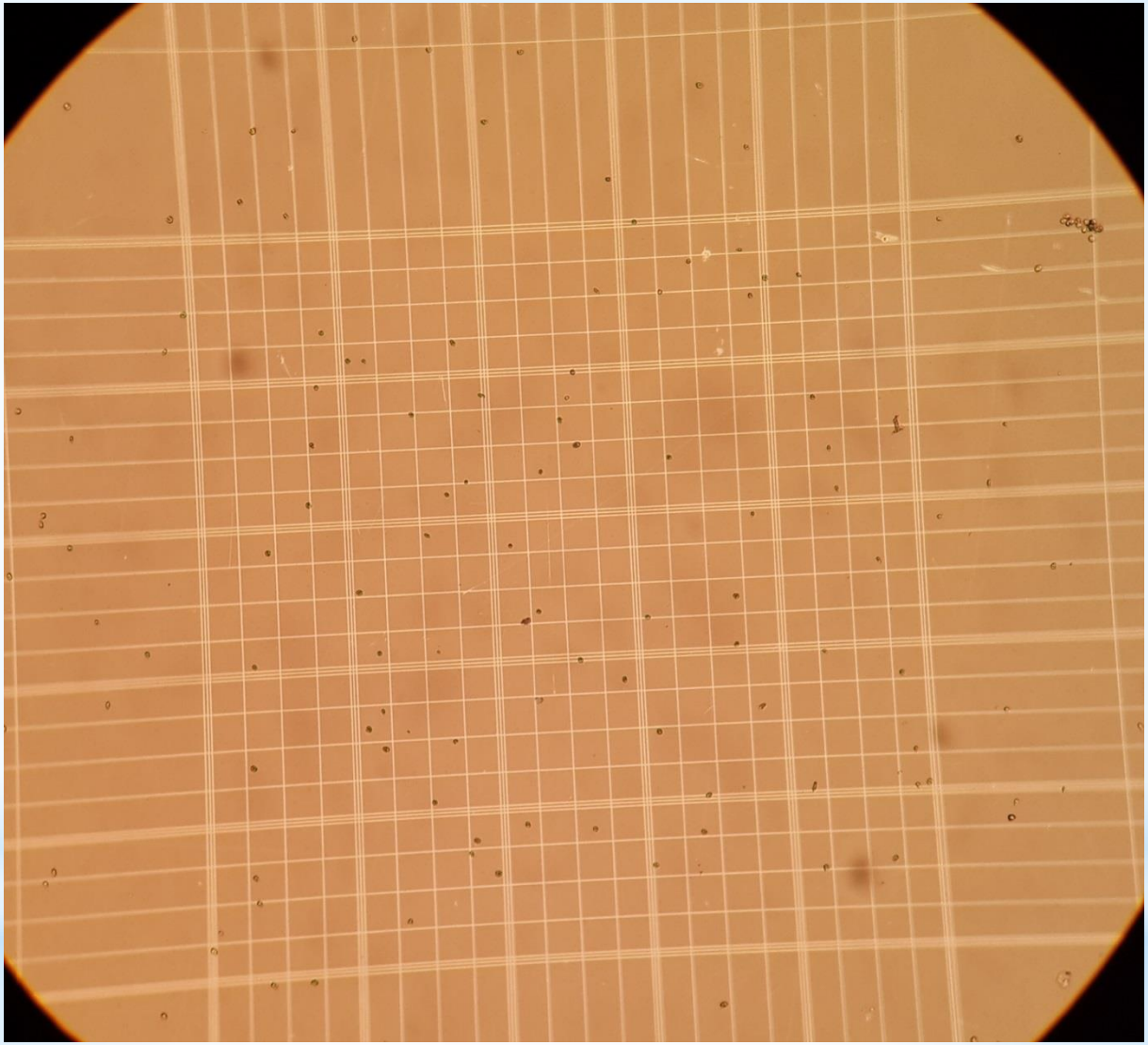
40/0,65
160/0,17

آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

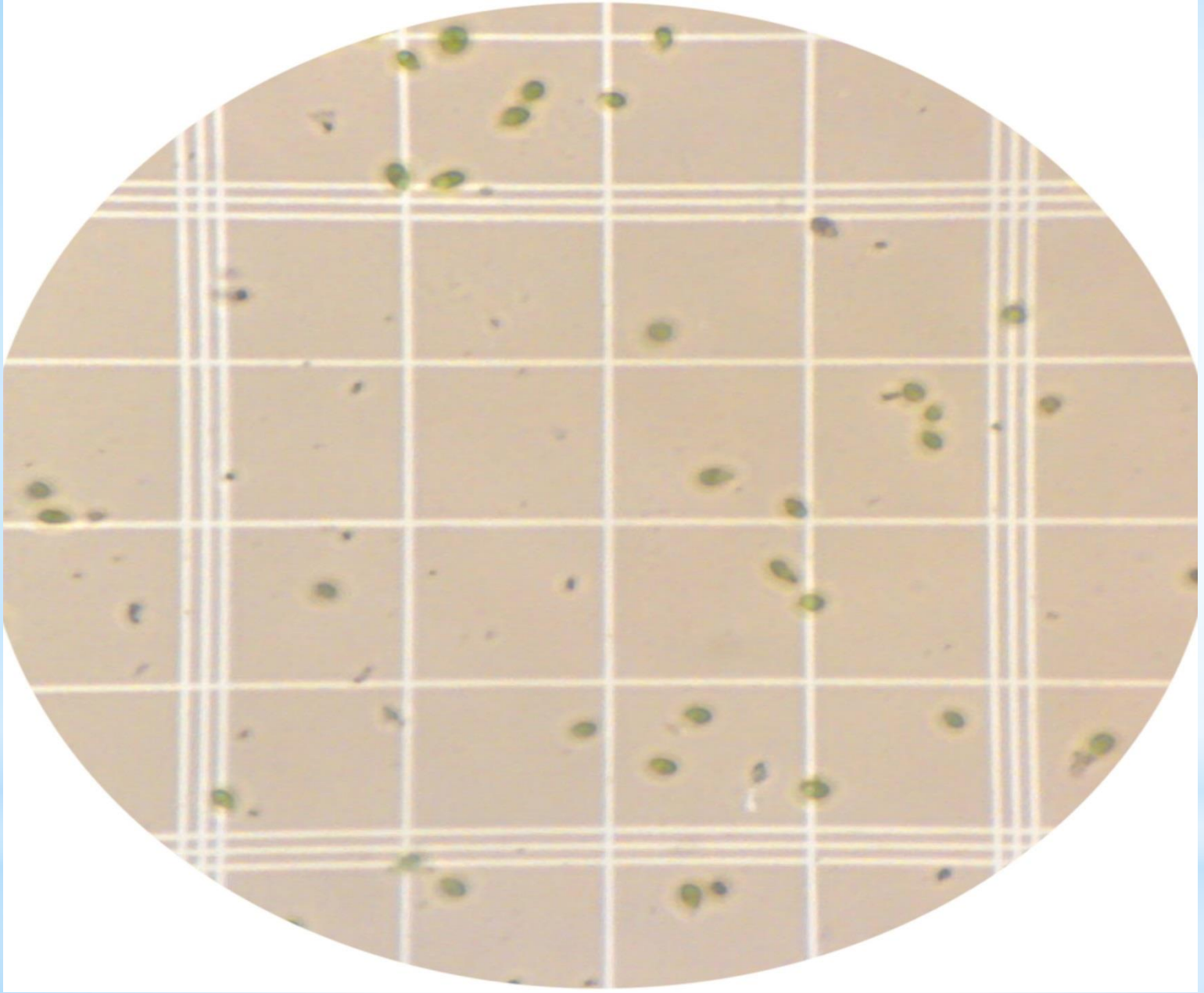


آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

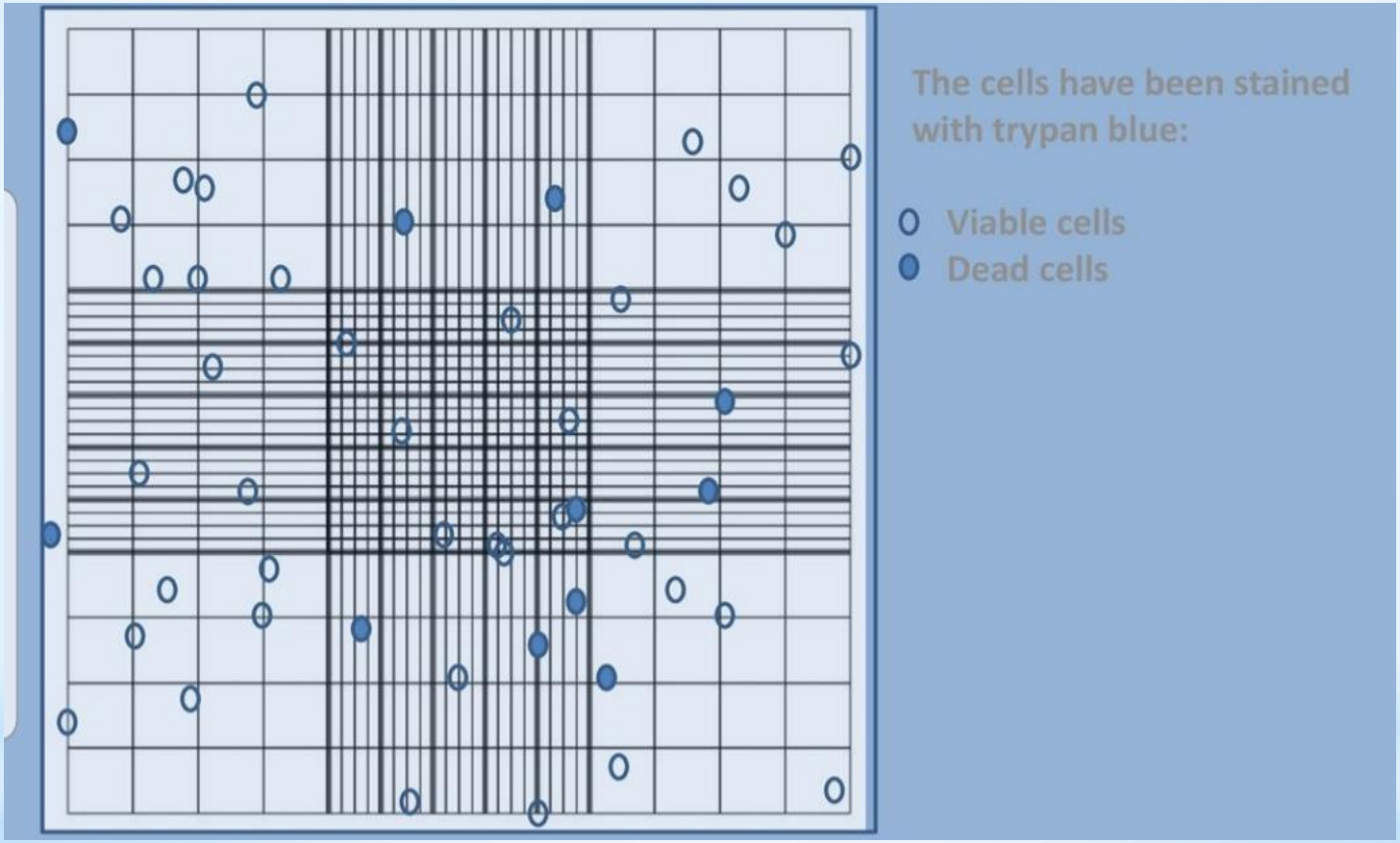


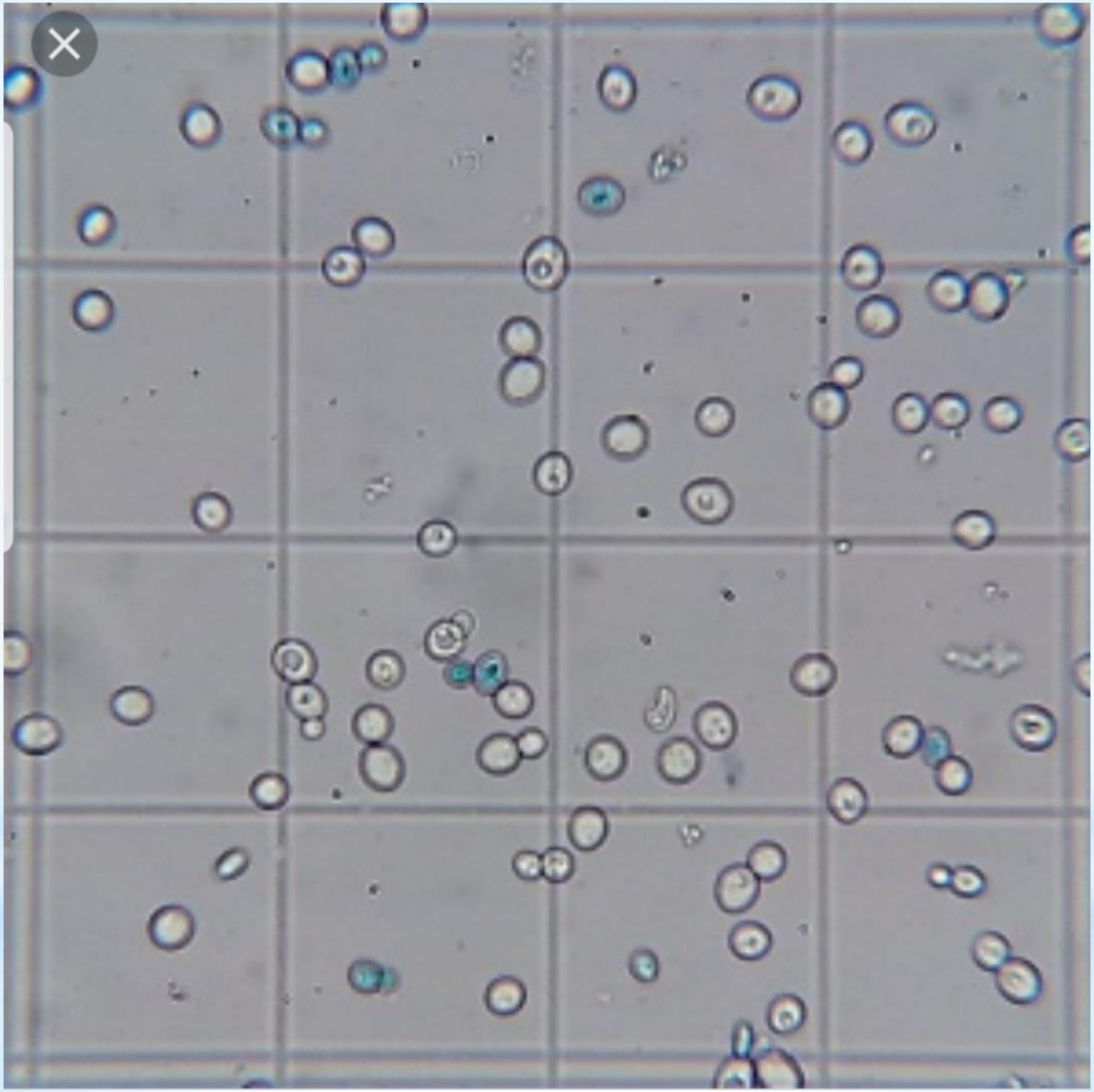


آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

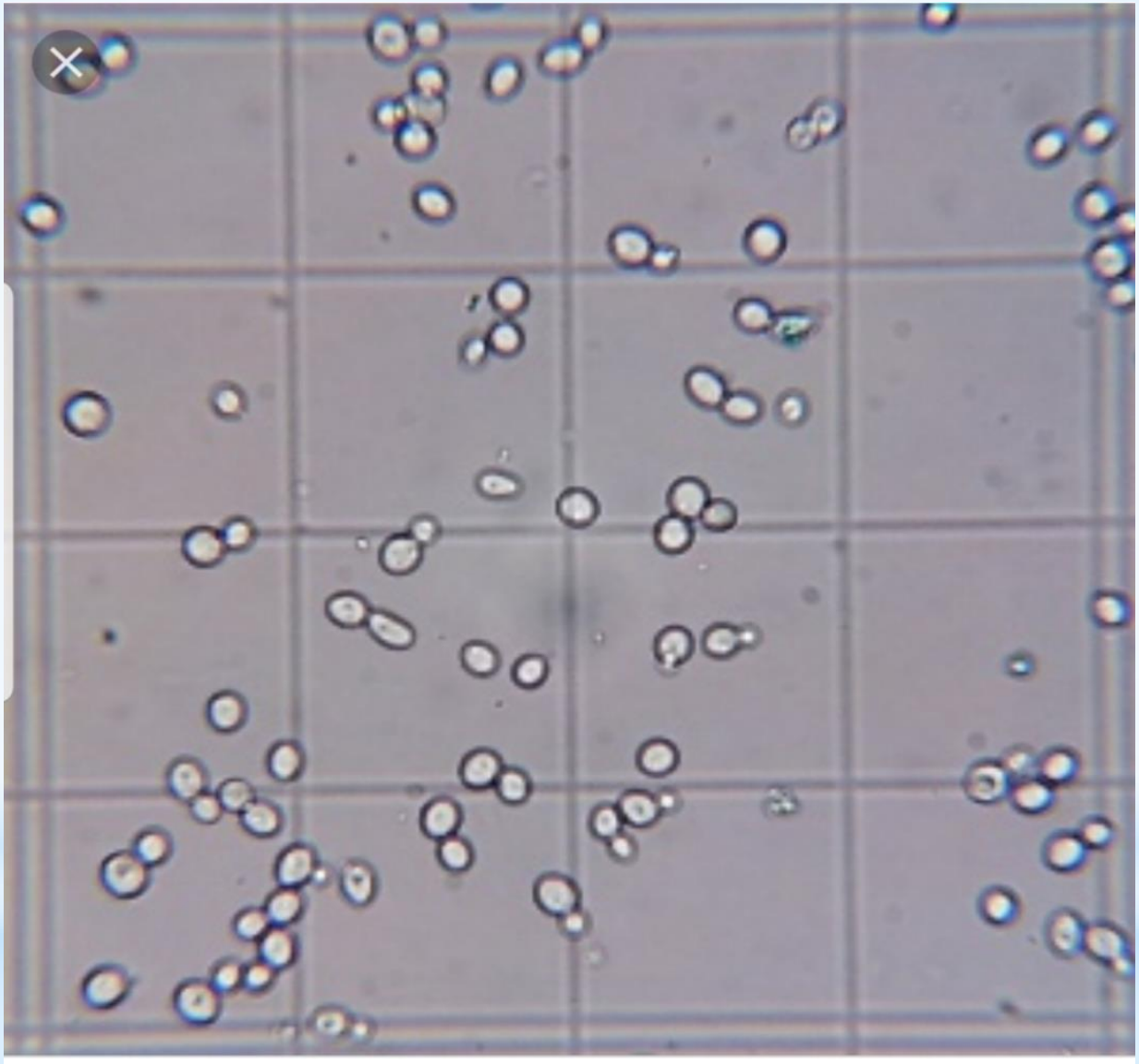


آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

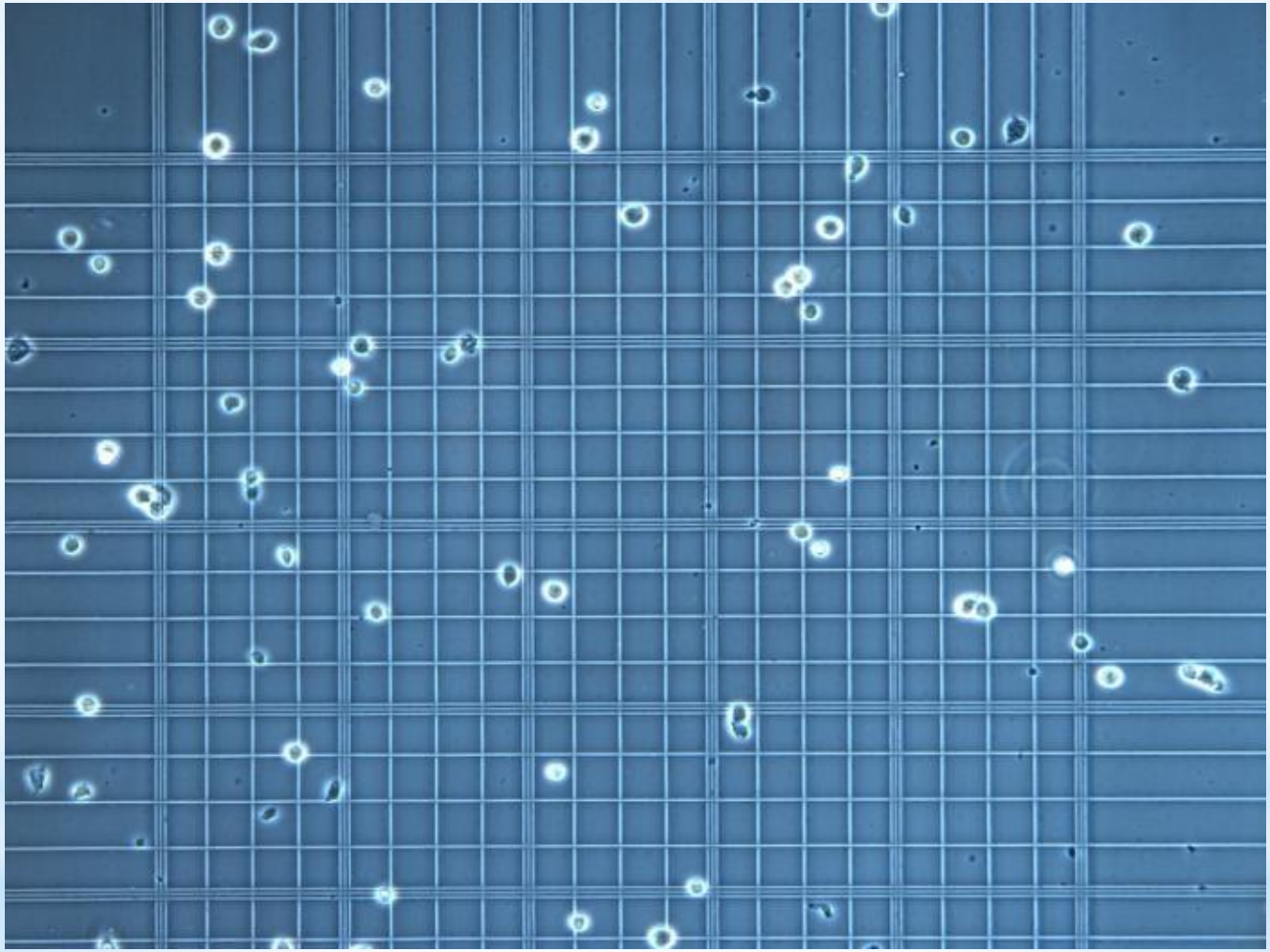

The cells have been stained with trypan blue:
Viable cells
Dead cells

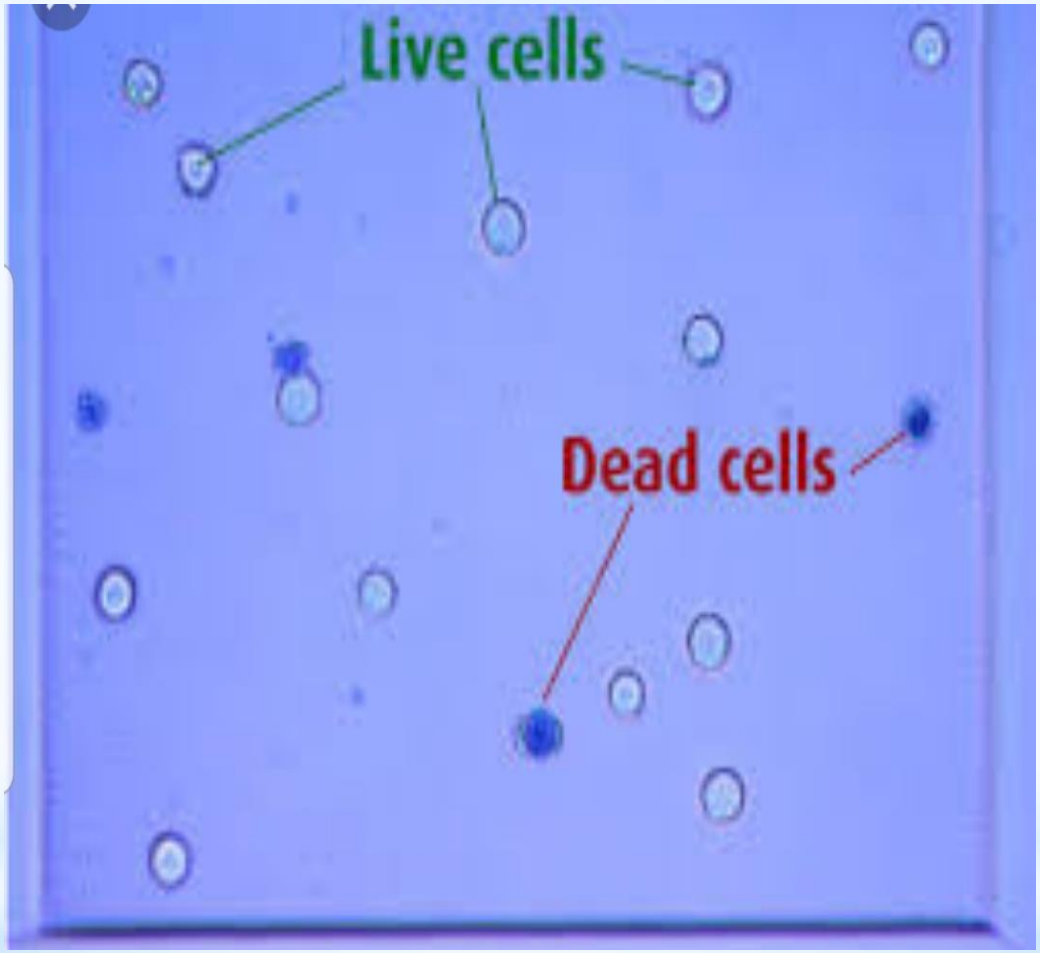


آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر




Live cells
Dead cells

تمیز کردن لام شمارش

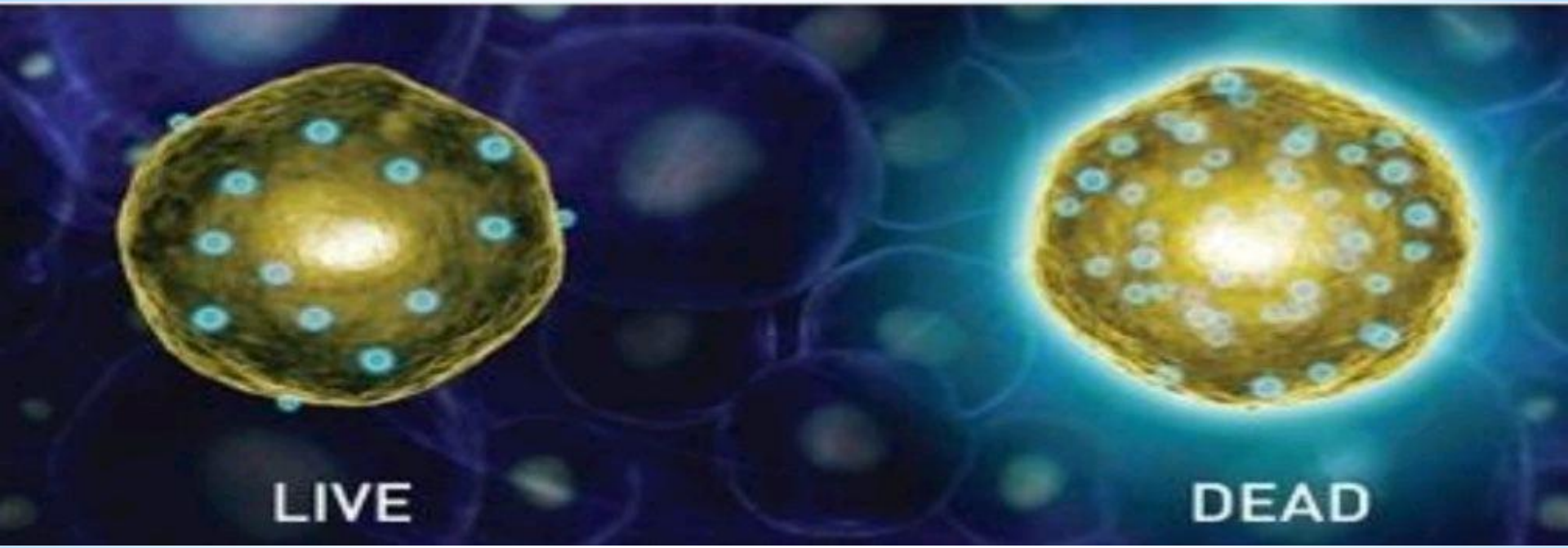
پس از پایان کار لام را در ظرف آب قرار دهید در صورتی که نمونه مورد بررسی روی لام خشک نشده باشد تمیز کردن لام آسان خواهد بود لام های شمارش آغشته به مواد چسبناک را در آب نگهداری نکنید می توانید از یک شوینده به همراه دستمال نرم برای نظافت استفاده کنید در ادامه،لام را به خوبی شسته و در نهایت با آب مقطر آبکشی کنید برای خشک کردن لام را روی دستمال کاغذی به یک ظرف قرار دهید

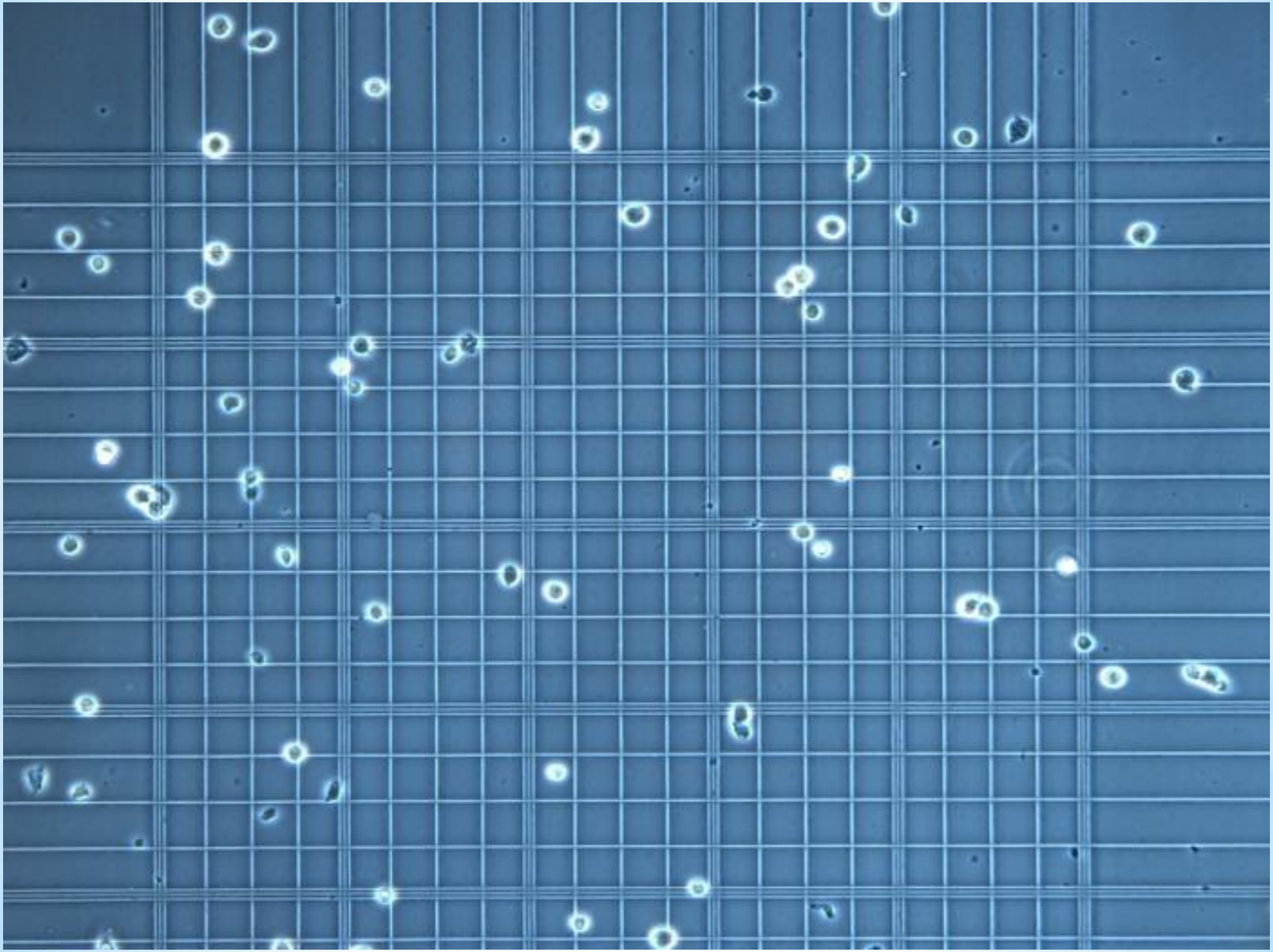
کار برد های لام توما در علوم مختلف

مطالعاتی که نرخ رشد میکروارگانیسمها را آزمایش می کنند نیازمند شمارش سلول ها هستند.

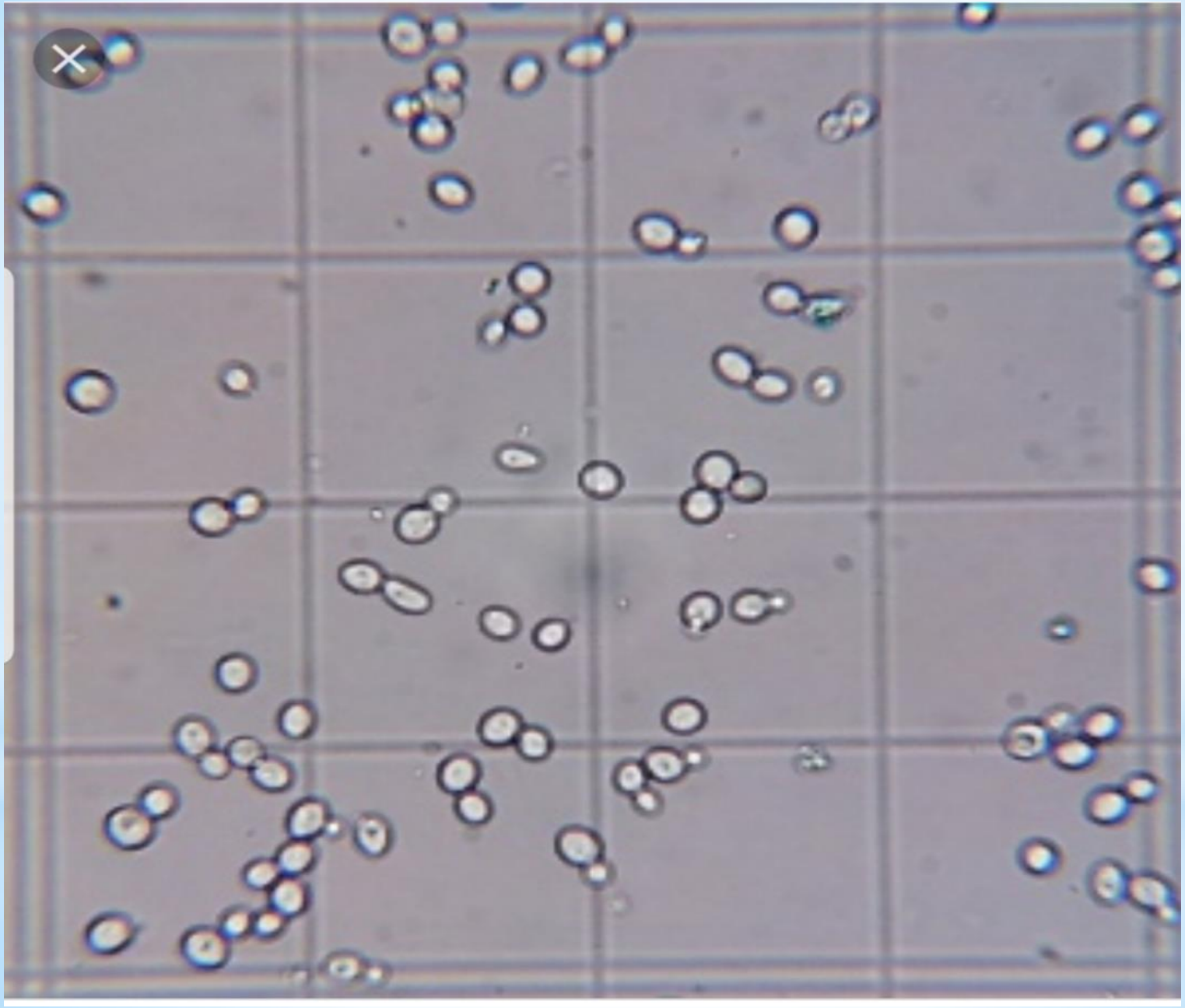
میزان رشد جمعیت باکتری ویروسها و دیگر عوامل بیماریزا در خون یا دیگر سیالات بدن می تواند اطلاعاتی درباره پیشرفت یک بیماری عفونی و همچنین اطلاعاتی درباره موفقیت سیستم ایمنی در مهار عفونت را فراهم کند.

اندازه گیری میزان زنده بودن سلول،یعنی اندازه گیری و محاسبه نسبت سلولهای مرده به سلول های زنده،برای مثال تعداد سلولهایی که در معرض سم قرار گرفته اند شمارش وبررسی های تکمیلی انجام شود.





آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر



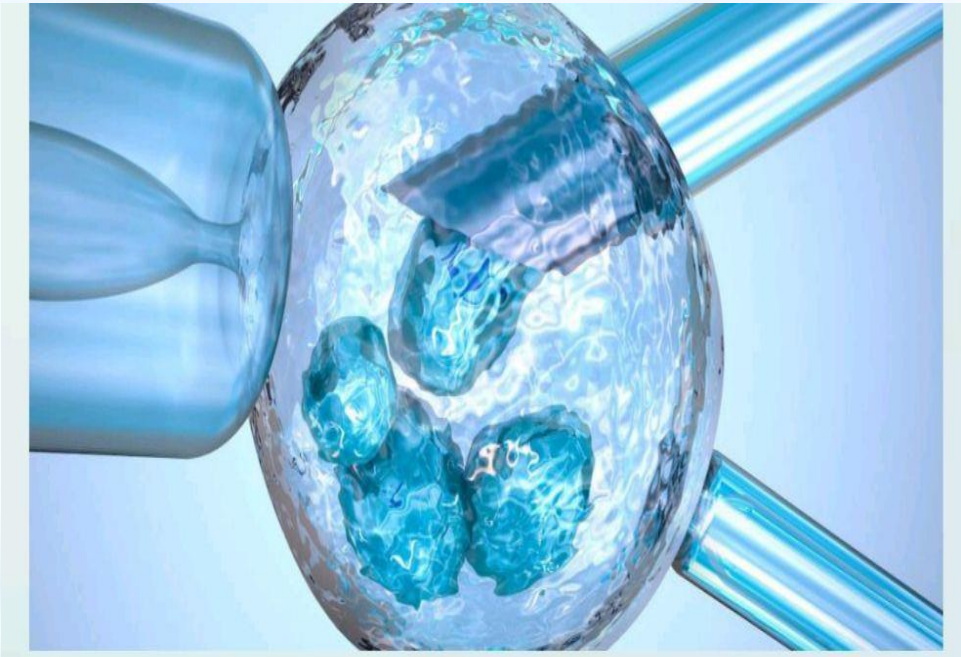
آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر

در بسیاری از روش های زیستی مانند میکروبیولوژی، کشت سلولی، کار با خون و بسیاری از تکنیک های دیگر که از سلول ها استفاده می کنند نیاز داریم که غلظت سلول ها را در آزمایش بدانیم

در پزشکی ،غلظت سلول های مختلف خونی، مانند سلول های قرمز و سلول های سفید خون، می تواند اطلاعات حیاتی در مورد وضعیت سلامتی شخص به پزشک بدهد.

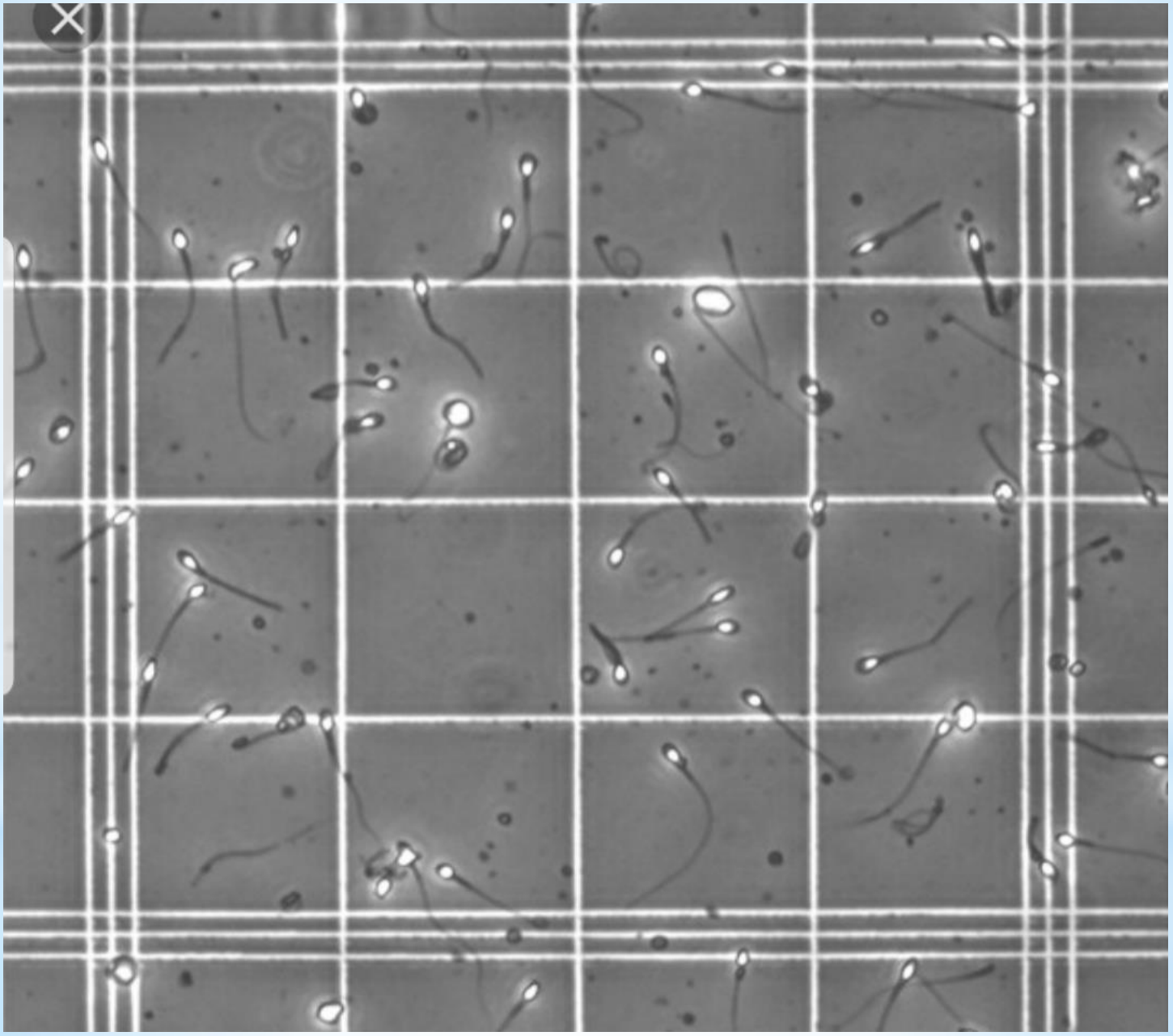
شمارش کامل سلول های خون در سلول درمانی،برای کنترل دوز سلولهای تجویز شده برای برای بیمار بسیار موثر است.

در آزمایشات زیست شناسی ملوکولی نیاز است تا غلظت سلول مشخص شود،تا طبق آن مقدار عوامل شیمیایی و واکنش دهنده در آزمایش اعمال شوند

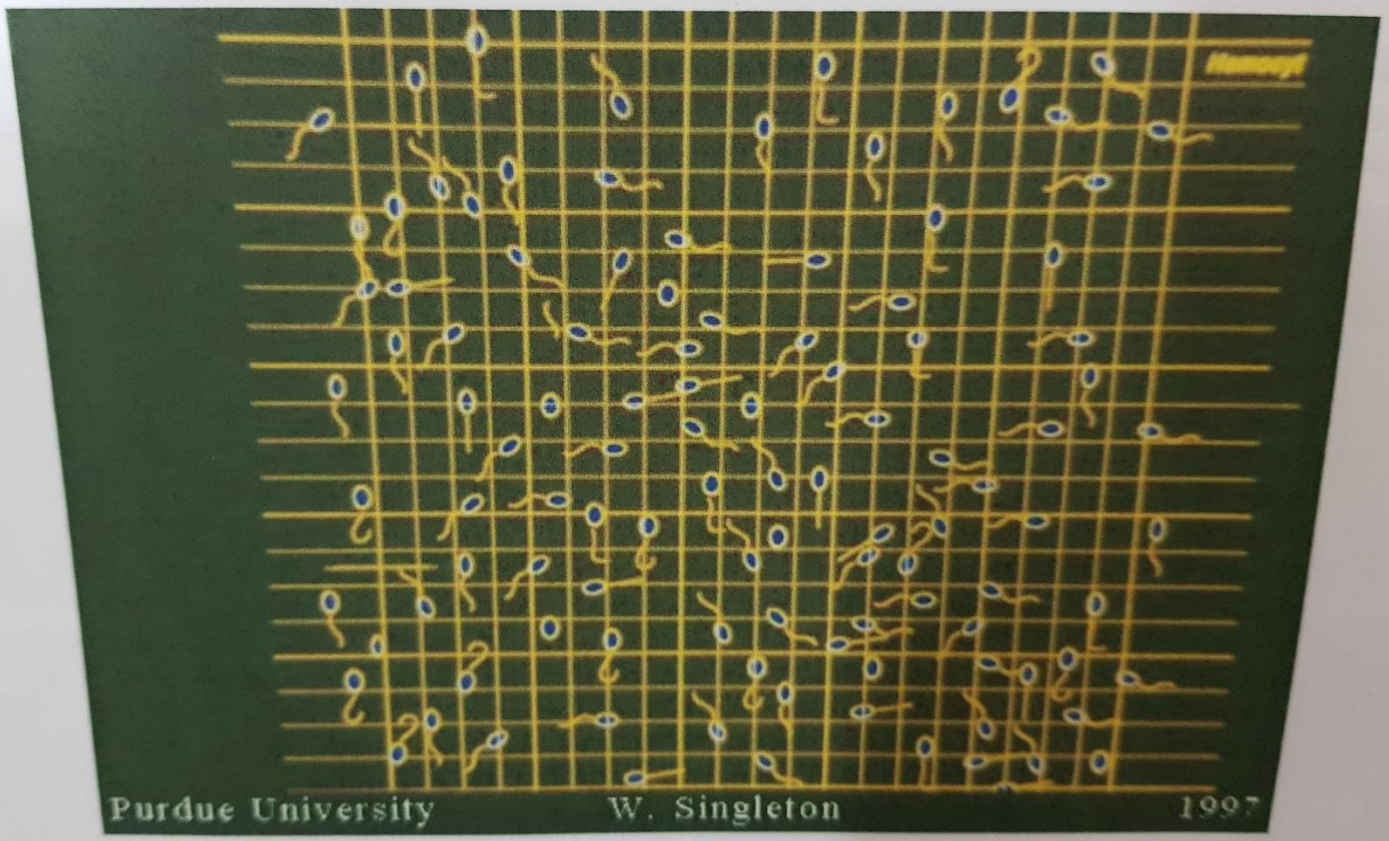


شمارش اسپرم ها در درمان ناباروری

درمان ناباروری



آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر



آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر