

Tipps zum Zählen von Zellen mit der neuen Einweg-Zählkammer C-Chip

Biochrom AG Information

Die Einweg-Zählkammer C-Chip aus Kunststoff sieht genauso aus wie die bekannte Neubauer „improved“-Zählkammer. Zellen der unterschiedlichsten Größen können damit ausgezählt werden: Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, aber auch Bakterien, Pilzsporen und Pflanzenpollen. Vorteil des C-Chip gegenüber der bekannten Zählkammer aus Glas: Das mühsame Aufbringen von Deckgläschen und die Reinigung entfallen. Gleichzeitig ist eine höhere Sicherheit im Umgang gewährleistet, denn der Kontakt mit infektiösem Material ist praktisch ausgeschlossen. Die Tiefe der Kammern ist fest vorgegeben, dadurch sind Zählungen jederzeit reproduzierbar.

Kleinste Fehler bei der Zählung von Zellen resultieren durch Verdünnungsschritte in großen Differenzen der Zellzahlen und verfälschen dadurch Versuchsergebnisse. Tipps im Umgang mit der auf dem C-Chip abgebildeten Neubauer „improved“-Zählkammer und zum Zählen von unterschiedlichen Zelltypen mit dem C-Chip finden Sie nachfolgend.

1 Eigenschaften des C-Chip

Der C-Chip ist eine hochpräzise Einmal-Zählkammer aus hochwertigem Kunststoff zur manuellen Bestimmung der Zellzahl. Er enthält zwei getrennte Zählkammern mit separaten Injektionsöffnungen für jeweils eine Probe. Deckgläschen sind nicht nötig. Die Tiefe der Kammern ist fest vorgegeben. Dadurch ist die Einweg-Zählkammer hochpräzise und Auszählungen sind jederzeit reproduzierbar. Die Zählkammern entsprechen der Neubauer „improved“-Zählkammer.

Der C-Chip ist für den einmaligen Gebrauch konzipiert und sollte direkt nach Öffnen der Verpackung verwendet werden. Durch einmalige Benutzung besteht keine Notwendigkeit zur Reinigung des Chip sowie zur Unterbrechung der Arbeitsabläufe. Für alle gängigen automatischen Counter ist der C-Chip einsetzbar.

Im Einsatz reduziert der C-Chip das Infektionsrisiko durch minimierte Exposition zu biologisch aktiven, infektiösen Materialien.



Abb. 1: Separate Verpackung des C-Chips

2 Neubauer „improved“-Zählkammer

2.1 Aufbau der Neubauer „improved“-Zählkammer

Das Zählnetz der Zählkammer besteht aus:

- 9 Großquadraten (3 x 3)
- 4 Eckquadraten L (Kästchen Nr. 1, 3, 7, 9)

Die Eckquadrate (L) sind unterteilt in 16 Quadrate (4 x 4).

Das zentrale Quadrat Nr. 5 ist unterteilt in 5 x 5 Quadrate (E).

Die Quadrate (E) sind in 4 x 4 Unterquadrate unterteilt.

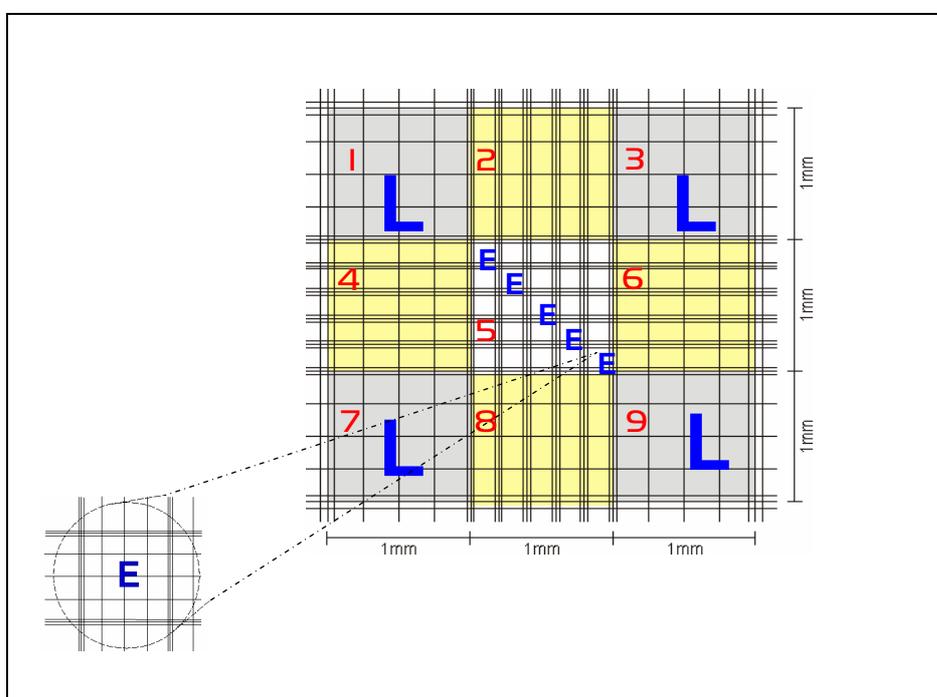


Abb. 2: Aufbau der Neubauer „improved“-Zählkammer

Angaben zum Volumen in den L-Quadraten:

Die Fläche der L-Quadrate ergibt sich aus den Kantenlängen:

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

Bei einer Kammertiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen in den L-Quadraten von $0,1 \text{ mm}^3$ (Umrechnung: $0,1 \text{ mm}^3$ entsprechen $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ oder 10^{-4} ml).

2.2 Zähltechniken

Je nach Zelltyp der auszuzählenden Zellen werden jeweils unterschiedliche Gruppen von Quadraten ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet. Das Auszählen der Zellen setzt genaue Kenntnisse zur Zähltechnik und im Umgang mit den Grenzlinien voraus:

- Um keine Zellen doppelt zu zählen oder zu vergessen, wird mäanderförmig gezählt:

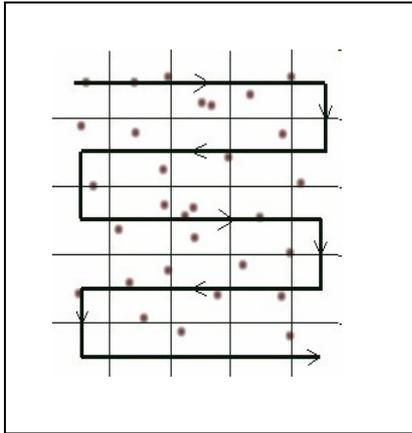


Abb. 3: Mäanderförmige Zähltechnik

- Bei der Zählung müssen die Begrenzungslinien genau beachtet werden: Vorteil der Neubauer „improved“-Zählkammer sind die dreifachen Begrenzungslinien der Gruppenquadrate (die mittlere Linie ist die tatsächliche Grenzlinie), was die jeweilige Entscheidung nach der genauen „Lage“ einer Zelle vereinfacht. Bitte beachten: Es werden nur Zellen von zwei Grenzlinien gezählt, zum Beispiel oben und links.

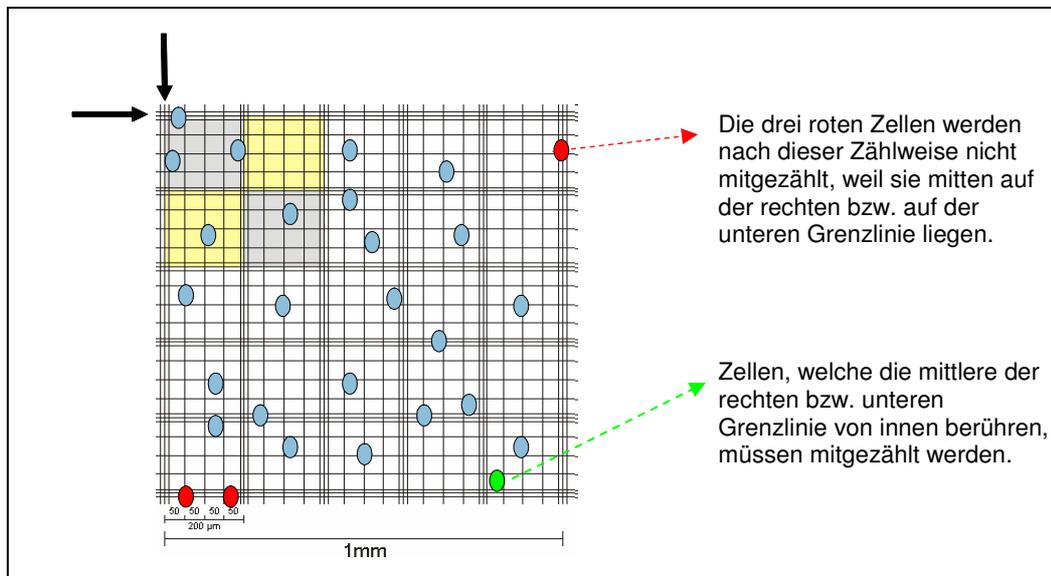


Abb. 4: Zählung von Zellen

Beachtet man diese Vorgehensweise nicht, verfälschen sich die tatsächlichen Zellzahlen im fünf- oder sogar im sechsstelligen Bereich. Eine Reproduktion der Versuche ist schwierig, und weitere qualitative Aussagen werden falsch vorgenommen.

2.3 Berechnung der Zellzahl am Beispiel von HeLa-Zellen und Erythrozyten

2.3.1 HeLa-Zellen

In den L-Eckquadraten Nr. 1, 3, 7, 9 werden zusammen 84 Zellen gezählt.

Ermittlung der durchschnittlichen Zellzahl je L-Eckquadrat:
 $84:4=21$

HeLa pro ml = 21 Zellen
 $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ (Volumenfaktor in einem L-Eckquadrat)

Daraus ergeben sich 210.000 Zellen/ml.

Werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt (Trypanblaufärbung 1:10), muss ein zusätzlicher Verdünnungsfaktor einberechnet werden:

HeLa pro ml = 21 Zellen
 $\times 10$ (Verdünnungsfaktor)
 $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ (Volumenfaktor in einem L-Eckquadrat)

Daraus ergeben sich 2.100.000 Zellen/ml oder $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml.

2.3.2 Erythrozyten

Erythrozyten werden im zentralen Quadrat Nr. 5 (Abb. 6) gezählt, das unterteilt ist in 5×5 kleinere Quadrate (E). Die einzelnen E-Quadrate sind in 4×4 Kleinstquadrate unterteilt.

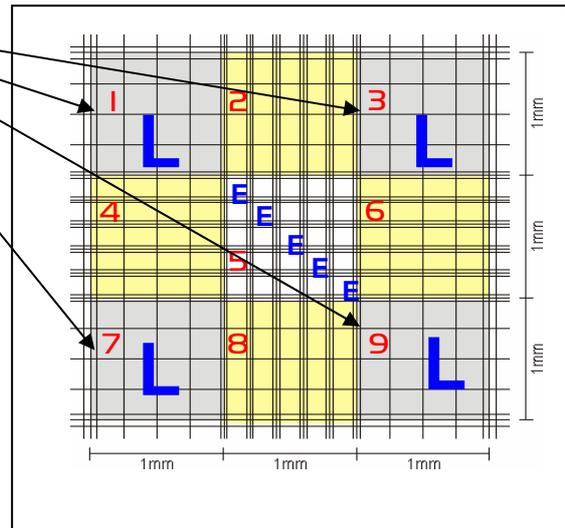


Abb. 5: Zählen von HeLa-Zellen in den 4 Eckquadraten Erythrozyten im zentralen Quadrat Nr. 5

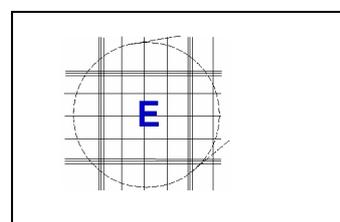


Abb. 6: 4×4 Kleinstquadrate zum Zählen der Erythrozyten

Berechnungsbeispiel:

Zellzahl in den fünf E-Quadraten: 420
Verdünnung der Erythrozyten 1 : 200

Erythrozyten pro ml = 420 Zellen
x 5 (Hochrechnung der Zellzahl auf das gesamte zentrale Quadrat Nr. 5)
x 200 (Verdünnungsfaktor)
x 10^4 ml⁻¹ (Volumenfaktor in einem L-Quadrat)

Daraus ergeben sich 4.200.000.000 Zellen/ml oder $4,2 \times 10^6$ Zellen/ μ l.

In der nachfolgenden Tabelle 1 finden Sie die allgemeinen Berechnungen für Leukozyten, Erythrozyten und eukaryotische Zellen.

Tab. 1: Allgemeine Berechnung der Zellzahl für verschiedene Zelltypen und Vorgehen

Leukozyten (Verdünnung 1 : 20)	Zellzahl Leukozyten
<ol style="list-style-type: none"> 1. Blut mit laborüblichen Methoden verdünnen 2. 10 μl der Probe in die Injektionsöffnung pipettieren 3. Zellen in den 4 großen Eck-Quadraten unter dem Mikroskop auszählen 	Leukozyten pro ml = (Zellzahl in 4 großen Quadraten/4) x 20 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 (Volumenfaktor)
Eukaryotische Zellen	Zellzahl eukaryotische Zellen
<ol style="list-style-type: none"> 1. Adhärente Zellen mit Trypsin-EDTA lösen und pelletieren, Suspensionenzellen pelletieren 2. Überstand vorsichtig abpipettieren (ohne Pellet zu zerstören), Zellen in einem entsprechenden Volumen Medium bzw. PBS auf die ungefähre Dichte von 5×10^3 bis zu 5×10^6 einstellen (optimaler Bereich für verlässliche Zellzählungen) 3. Zellen durch Pipettieren sorgfältig resuspendieren (bis keine Klumpen oder Zellverbände mehr sichtbar sind) 4. 10 μl der Probe in die Injektionsöffnung pipettieren 5. Zellen in 4 großen Quadraten unter dem Mikroskop auszählen 	Zellen pro ml = (Zellzahl in 4 Quadraten/4) x Verdünnungsfaktor x 10^4 (Volumenfaktor)
Erythrozyten (Verdünnung 1 : 200)	Zellzahl Erythrozyten
<ol style="list-style-type: none"> 1. Blut mit laborüblichen Methoden verdünnen 2. 10 μl der Probe in die Injektionsöffnung pipettieren 3. Zellen in 5 kleinen Quadraten des zentralen Quadrats unter dem Mikroskop auszählen (diagonal wie in Abb. 5) 	Erythrozyten pro ml = Zellzahl in 5 kleinen Quadraten x 5 x 200 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 (Volumenfaktor)

3 Anwendung

3.1 Aufbau des C-Chip

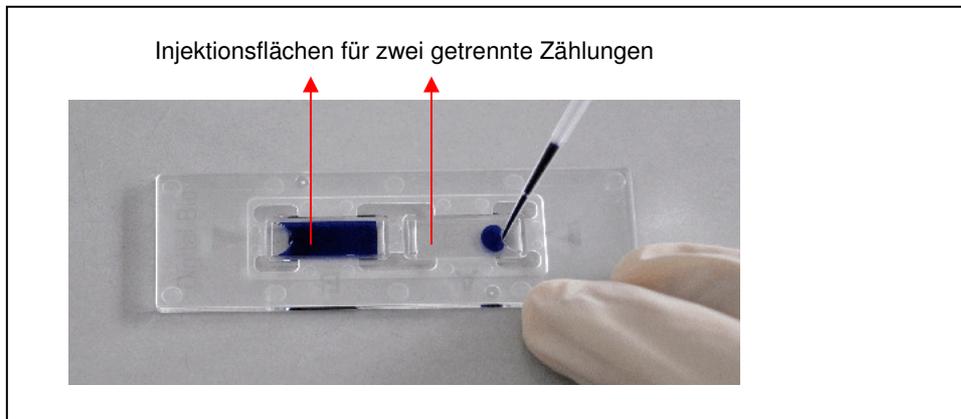


Abb. 6: Aufbau des C-Chip und Injektion einer zweiten Probe

3.2 Vorgehen

Der C-Chip ist einfach anwendbar. Im Allgemeinen gilt folgender Ansatz:

1. Probe gut mischen und eventuell verdünnen
2. 10 µl vorsichtig in die Injektionsöffnung pipettieren
3. Kapillarkräfte saugen Probe in die Zählkammer
4. Zellen wie gewohnt auszählen (Mikroskop)

Tipp: Vor der Auszählung die gesamte Zählkammer mit einer geringen Vergrößerung betrachten und überprüfen, ob die Zellen gleichmäßig verteilt sind. Andernfalls die Probe erneut mischen.

Für das Zählen spezieller Zelltypen empfiehlt die Biochrom AG die Zählung gem. Tab. 1, Seite 5.

4 Fehleranalyse

- Probe vorsichtig injizieren und die Bildung von Luftblasen vermeiden
- Eventuell vorhandene Staubpartikel entfernen
- Einstellung und Fokussierung des Mikroskops prüfen
- Bei zu hoher Zelldichte: Verdünnen und den neuen Verdünnungsfaktor in der Berechnung berücksichtigen
- Die Differenz der Zellzahlen in den einzelnen Quadraten sollte nicht mehr als 10 betragen, ansonsten die Probe durchmischen und erneut zählen

5 Produktdetails des C-Chip

Parameter	Einwegzählkammer C-Chip
Kat. Nr.	P DHC-N01
Einheiten	1 Box enthält 50 C-Chip mit jeweils 2 Tests
Lagerung	Raumtemperatur (RT)
Rohmaterial	Kunststoff
Anwendung	Zum Zählen von allen Zelltypen geeignet
Hinweis	➤ „ready to use“

- Zum Produkt im Online-Shop: <http://www.biochrom.de/produkte/zellkultur-plastik/zaehlkammer/>
- Ein kostenloses Muster erhalten Sie unter dieser E-Mail: info@biochrom.de