

# 一种改良的细胞计数方法\*

李 树 民 赵 晓 虹

(中国科学院动物研究所)

库尔特计数器 (Coulter Counter) 是国内实验室较为常用的仪器,多用于血细胞计数,也可做其它细胞或颗粒的计数。库尔特计数器工作的基本原理是将需要计数的颗粒或细胞悬浮在可导电的介质溶液中,并将测定管浸于此悬浮液。测定管下端有一微孔,管内充满同种介质溶液。管的内外各有一电极(见图1)。测定时外加一定的真空度,从而迫使一定量的细胞悬浮液通过测定管上的微孔流入测定管内。每当有一个颗粒流经微孔,就使两个电极之间的电阻产生一个变化,并产生一个电脉冲。颗粒越大,产生的电脉冲越高。测定时需选定一个阈

值,所有高于阈值的电脉冲均被仪器自动计数。因此使用库尔特计数器作细胞计数,若要结果准确,首要条件是细胞的大小要均匀一致<sup>1)</sup>。例如红血细胞就满足这一条件。

库尔特计数器用于其它细胞计数时。在测定过程中会产生细胞碎片,同时又常常出现几个细胞没有完全分散而粘附在一起的现象(见图2)。由于所测定的物体大小不一,给细胞计

---

\* 本工作承王焕葆教授关怀并提出宝贵意见曹守珍同志放大照片,特此致谢!

1) 英格兰电动计数有限公司 1984 "Instruction manual for the Coulter Counter® model ZF".

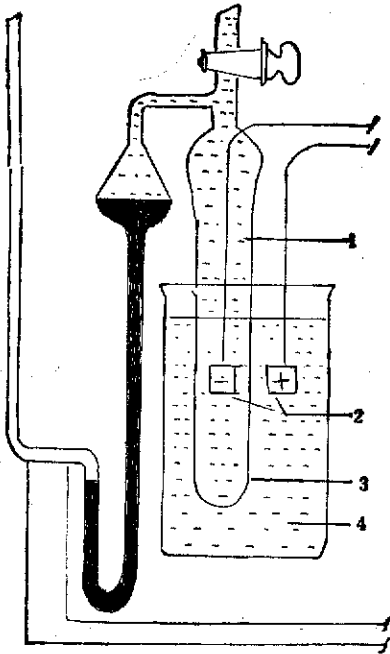


图1 库尔特计数器

1. 介质溶液; 2. 正负电极; 3. 微孔; 4. 细胞悬浮液

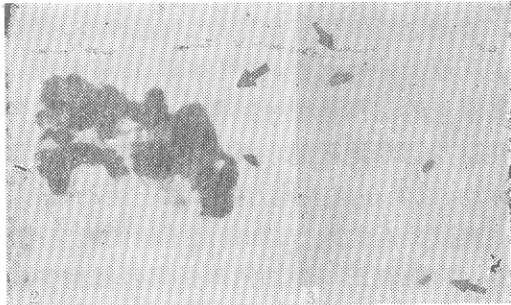


图2 仅用胰酶消化的培养细胞, 细胞没完全分散;  
图3 经胰酶消化后, 又以曲拉通(Triton)×100处理培养的细胞, 质膜和胞质溶解, 核清晰可见。“↑”示细胞核的位置

数带来困难。首先由于部分细胞破碎, 使我们难于选到合适的阈值。阈值低, 使一些细胞碎片也被计入细胞总数; 而阈值高, 又使某些由于部分破碎而体积变小的细胞得不到计数。其次由几个细胞粘附在一起的细胞团, 只能计数一次, 造成计数的误差, 当细胞块较大时, 还会堵塞微孔。

为了克服以上所述计数时出现的偏差, 我们经过多次实验发现用细胞核计数来代替整个细胞的计数, 可以避免这一困难, 并且由于处理过程中细胞膜和细胞质的溶解, 不会出现几个

细胞成团的现象。细胞核的大小均匀一致, 容易得到准确的计数结果(见图3)。现将实验方法和结果介绍如下:

100 毫升北京瓶贴壁生长的人胚肺成纤维细胞(2BS)经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 倾出胰酶溶液, 加入 4 毫升 0.5% 曲拉通 ×100 水溶液, 用移液管吹打细胞不超过一分钟。细胞很快破碎, 分别取 0.25 毫升细胞悬浮液各加入 1.0 毫升的 0.1mol/L 柠檬酸溶液和 1.0 毫升的 1/1000 结晶紫染色液(用 0.1mol/L 柠檬酸溶液配制)中。

5 分钟后, 取结晶紫细胞悬液涂于载玻片上, 于显微镜下观察, 见细胞核着蓝紫色, 为长卵圆形, 结构完整, 形态大小均一。

取结晶紫细胞悬液滴于血球计数板上, 在显微镜下计数细胞核。结果为  $2.425 \times 10^5$  个/毫升结晶紫细胞悬液。

取 0.5 毫升柠檬酸细胞悬液, 经生理盐水稀释 100 倍后, 于库尔特计数器上计数, 结果为  $2.345 \times 10^5$  /毫升柠檬酸细胞悬液。

细胞在结晶紫液(板计数)和柠檬酸溶液(库尔特计数)中的稀释度是相同的, 在操作中可能存在误差。再考虑到计数板计数和库尔特计数器计数均存在着随机性误差, 所以可以认为细胞在结晶紫液和柠檬酸液中的计数结果相符合<sup>[3]</sup>。

讨论 本细胞计数方法的特点是以细胞核计数代替细胞计数, 所以除用常规的 0.25% 胰酶消化, 又加 0.5% 曲拉通 ×100 水溶液处理外, 然后立即加入 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液中。在曲拉通中不能吹打时间过长(以不超过 1 分钟为宜), 否则细胞会全部溶解。因为柠檬酸有保护细胞核结构的作用<sup>[2]</sup>, 所以应将细胞悬液立即加入其中, 以利细胞核计数。

由于正在分裂的细胞, 其细胞核分散成为染色体, 没有圆形细胞核结构, 这种对细胞群体计数的影响是值得注意的。但一般说来, 在细胞周期中细胞分裂期(M期)所占时间较短。因此, 不同步细胞群中某一时刻正在分裂的细胞

(下转第53页)

(上接第 37 页)

只占细胞总数的一个很小部分。细胞周期较长的细胞尤其如此。例如中国仓鼠成纤维细胞的细胞周期为 11 小时，其中 M 时只占 0.4 小时。小鼠成纤维细胞的细胞周期为 22 小时，M 期为 0.7 小时<sup>[2]</sup>。在这两种细胞的不同步细胞群中，某时刻正在分裂的细胞分别占细胞总数的 3.6% 和 3.1%。在实际测定中，这样的误差大致相当于，甚至小于库尔特计数器本身的误差。

但对短周期或同步细胞群，在用细胞核计数代替细胞计数之前，应该考虑这一问题。

### 参 考 文 献

- [1] 北京大学生物系遗传学教研室编 1983 遗传学实验方法和技术 高等教育出版社，49—50。
- [2] 郑国锷著 1980 细胞生物学 人民教育出版社 227。
- [3] 俞纯山等 1979 电子血细胞计数仪使用的初步报告 新医学 10(1): 28—30。