

# Stanovení počtu buněk a jejich viability

Trypanová modř 0,4 % v izotonickém fosfátovém pufru pH 7,4 ⚠ Trypanová modř je jed!

## Princip

Trypanová modř je z živých buněk aktivně transportována přes buněčnou membránu. Po smísení buněčné suspenze s roztokem tohoto barviva proto živé buňky zůstávají světlé, zatímco mrtvé se obarví na modro.

## Postup

1. K 0,5 ml dobře promíchané buněčné suspenze se přidá 0,5 ml roztoku trypanové modři.
2. Po 5 až 15 minutách se suspenze dobře promíchá a pomocí 50 µl automatické pipety se jí naplní obě poloviny Bürkerovy komůrky. Je třeba aplikovat takové množství vzorku, aby se komůrka právě naplnila, roztok nesmí přetékat do okolních žlábků.
3. Pod světelným mikroskopem se při nejmenším zvětšení počítají zvlášť živé (bezbarvé) a mrtvé (modré) buňky. Počítá se nejprve 5 čtverců (4 rohové a středový) 1 × 1 mm v jedné polovině komůrky. Je-li celkový počet buněk menší než 100, počítají se buňky i v dalších 5 čtvercích ve druhé polovině komůrky. Za hranici čtverce se považuje prostřední linka z trojitě čáry. Z buněk, které leží na okraji čtverce, se počítají ty, které se i jen dotýkají levého nebo horního okraje, a naopak se nepočítají buňky, které se i jen dotýkají pravého nebo dolního okraje.
4. Počet buněk se vypočítá podle vzorce  $P = \frac{N \cdot D \cdot 1000}{H \cdot S}$ , kde:
  - P je počet buněk na 1 ml suspenze
  - N je celkový počet buněk
  - D = 2 (ředění suspenze)
  - H = 0,1 (hloubka komůrky v mm)
  - S je počet čtverců
5. Vypočítá se podíl živých buněk v procentech.

## Odkazy

### Zdroj

- VEJRAŽKA, M.: *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. Praha, 2004.