

血球计数板的使用及问题讨论

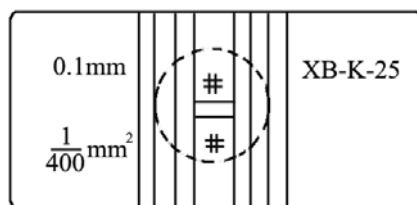
测定细胞数目的方法有显微镜直接计数法、平板菌落计数法、光电比浊法等，教材采用的是较为简便、快速、直观的显微镜直接计数法。因此，学会使用血球计数板进行准确计数，是该实验成功与否的关键。

虽然不同版本的教材推荐使用的血球计数板的规格不同，人教版建议使用 $2\text{mm}\times 2\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 方格，苏教版推荐使用 $1\text{mm}\times 1\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 方格，但是血球计数板的使用原理和方法是相同的。笔者通过近年来对该实验的摸索，对血球计数板的使用和命题方面存在的一些问题进行了分析总结。

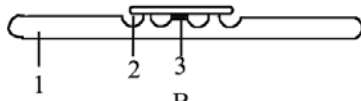
一、血球计数板的使用原理

显微镜直接计数法是将小量待测样品的悬浮液置于一种特别的具有确定面积和容积的载玻片上（又称计菌器），于显微镜下直接计数，然后推算出含菌数的一种方法。血球计数板是常用的计菌器之一。

血球计数板是一种专门用于计算较大单细胞微生物的一种仪器，由一块比普通载玻片厚的特制玻片制成的玻片中有四条下凹的槽，构成三个平台。中间的平台较宽，其中间又被一短横槽隔为两半，每半边上面刻有一个方格网。方格网上刻有 9 个大方格，其中只有中间的一个大方格为计数室。这一大方格的长和宽各为 1mm ，深度为 0.1mm ，其容积为 0.1mm^3 ，即 $1\text{mm}\times 1\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 方格的计数板；大方格的长和宽各 2mm ，深度为 0.1mm ，其容积为 0.4mm^3 ，即 $2\text{mm}\times 2\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 方格的计数板。在血球计数板上，刻有一些符号和数字（见图一），其含义是：XB-K-25 为计数板的型号和规格，表示此计数板分 25 个中格； 0.1mm 为盖上盖玻片后计数室的高； $1/400\text{mm}^2$ 表示计数室面积是 1mm^2 ，分 400 个小格，每小格面积是 $1/400\text{mm}^2$ 。



A

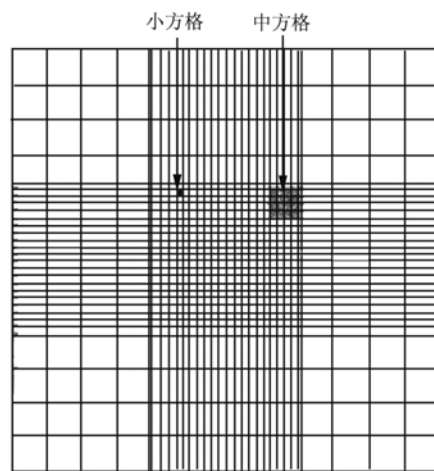


B

血细胞计数板构造（一）

A. 正面图；B. 纵切面图

1. 血细胞计数板；2. 盖玻片；3. 计数室



16×25

血细胞计数板构造（二）

放大后的方网格，中间大方格为计数室

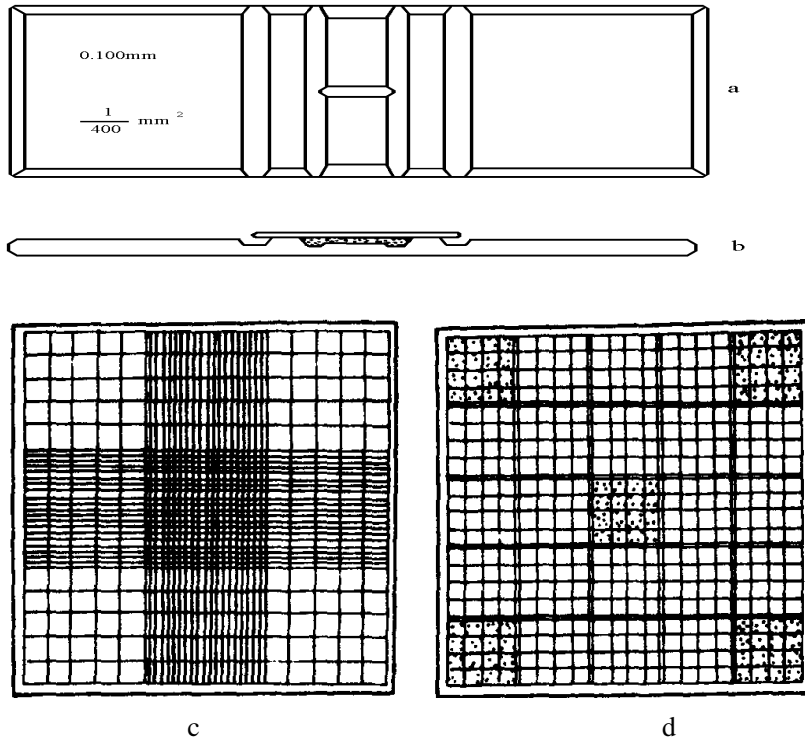
计数室通常也有两种规格：一种是 16×25 型，即大方格内分为 16 中格，每一中格又分为 25 小格；另一种是 25×16 型，即大方格内分为 25 中格，每一中格又分为 16 小格。但是不管计数室是哪一种构造，它们都有一个共同的特点，即每一大方格都是由 $16\times 25=25\times 16=400$ 个小方格组成。

1. 16×25 型的计数板 将计数室放大，可见它含 16 中格，一般取四角：1、4、13、16 四个中方格（100 个小方格）计数（见图二）。将每一中格放大，可见 25 个小格。计数重复 3 次，取其平均值。计数完毕后，依下列公式计算：

$$\text{酵母细胞个数} / 1\text{mL} = 100 \text{ 个小方格细胞总数} / 100 \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$$

2. **25×16 型的计数板** 中央大方格以双线等分成 25 个中方格，每个中方格又分成 16 个小方格，供细胞计数用（见图三）。一般计数四个角和中央的五个中方格（80 个小方格）的细胞数。计数重复 3 次，取其平均值。计数完毕后，依下列公式计算：

$$\text{酵母细胞个数} / 1\text{mL} = 80 \text{ 个小方格细胞总数} / 80 \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$$



血球计数板的构造（三）（25×16）

a. 顶面观 b. 侧面观 c. 放大后的网格 d. 放大后的计数室

二、血球计数板的使用方法步骤

使用血球计数板计数时，按照如下的实验步骤进行：

1. 镜检计数室。在加样前，先对计数板的计数室进行镜检。若有污物，则需清洗，吹干后才能进行计数；

2. 加样品。将清洁干燥的血球计数板的计数室上加盖专用的盖玻片，用吸管吸取稀释后的酵母菌悬液，滴于盖玻片边缘，让培养液自行缓缓渗入，一次性充满计数室，防止产生气泡，充入细胞悬液的数量以不超过计数室台面与盖玻片之间的矩形边缘为宜。多余培养液可用滤纸吸去；

3. 计数。稍待片刻（约 5min），待酵母菌细胞全部沉降到计数室底部后，将计数板放在载物台的中央，先在低倍镜下找到计数室所在位置后，再转换高倍镜观察、计数并记录。

三、血球计数板的使用注意事项

每天采用抽样检测法使用血球计数板对酵母菌进行计数，在计数时应从以下几方面注意。

1. 每天同一时间，各组取出本组的试管，用血球计数板计数酵母菌个数，并作记录，连续观察 7 天。

2. 从试管中吸出培养液进行计数之前，要将试管轻轻震荡几下，这样使酵母菌分布均匀，防止酵母凝聚沉淀，提高计数的代表性和准确性，求得的培养液中的酵母菌数量误差小。

3. 如果一个小方格内酵母菌过多, 难以数清, 应当对培养液进行稀释以便于酵母菌的计数。具体方法是: 摇匀试管, 取 1mL 酵母菌培养液, 加入成倍的无菌水稀释, 稀释 n 倍后, 再用血球计数板计数, 所得数值乘以稀释倍数。以每小方格内含有 4—5 个酵母细胞为宜。特别是在培养后期的样液需要稀释后计数。

4. 活酵母有芽殖现象, 若芽体达到母细胞大小的一半时, 即可作为两个菌体计数, 若芽体小于母细胞一半时为 1 个酵母细胞。

5. 对于压在方格界线上的酵母菌应当计数同侧相邻两边上的菌体数, 一般可采取“数上线不数下线, 数左线不数右线”的原则处理, 另两边不计数。计数时, 如果使用 16 格 \times 25 格规格的计数室, 要按对角线位, 取左上、右上、左下、右下 4 个中格(即 100 个小格)的酵母菌数; 如果规格为 25 格 \times 16 格的计数板, 除了取其 4 个对角方位外, 还需再数中央的一个中格(即 80 个小方格)的酵母菌数。

6. 计数一个样品要从两个计数室中计得的平均数值来计算, 对每个样品可计数三次, 再取其平均值。计数时应不时调节焦距, 才能观察到不同深度的菌体。按公式计算每 1ml (或 10mL) 菌液中所含的酵母菌个数。

7. 血球计数板的清洁

血球计数板使用后, 用自来水冲洗, 切勿用硬物洗刷, 洗后自行晾干或用吹风机吹干, 或用 95% 的乙醇、无水乙醇、丙酮等有机溶剂脱水使其干燥。通过镜检观察每小格内是否残留菌体或其他沉淀物。若不干净, 则必须重复清洗直到干净为止。

四. 细胞计数要点:

1. 进行细胞计数时, 要求悬液中细胞数目不低于 10⁴ 个/ml, 如果细胞数目很少要进行离心再悬浮于少量培养液中;

2. 要求细胞悬液中的细胞分散良好, 否则影响计数准确性。

3. 取样计数前, 应充分混匀细胞悬液, 尤其时多次取样计数时更要注意每次取样都要混匀, 以求计数准确;

4. 数细胞的原则是只数完整的细胞, 若细胞聚集成团时, 只按照一个细胞计算。如果细胞压在格线上时, 则只计上线, 不计下线, 只计右线, 不计左线。

5. 操作时, 注意盖片下不能有气泡, 也不能让悬液流入旁边槽中, 否则要重新计数。

五. 初学者易犯的错误:

1. 计数前未将待测悬液吹打均匀。

2. 滴入细胞悬液时盖玻片下出现气泡。

3. 滴入悬液时的量太多, 至使细胞悬液流入旁边的槽中。

六. 本实验特殊试剂的配制:

4% 台盼蓝母液: 称取 4 克台盼蓝, 加入少量蒸馏水研磨, 加双蒸水至 100 毫升, 用滤纸过滤, 4℃ 保存。

使用液: 使用时, 用 PBS 稀释母液至 0.4% 即可。