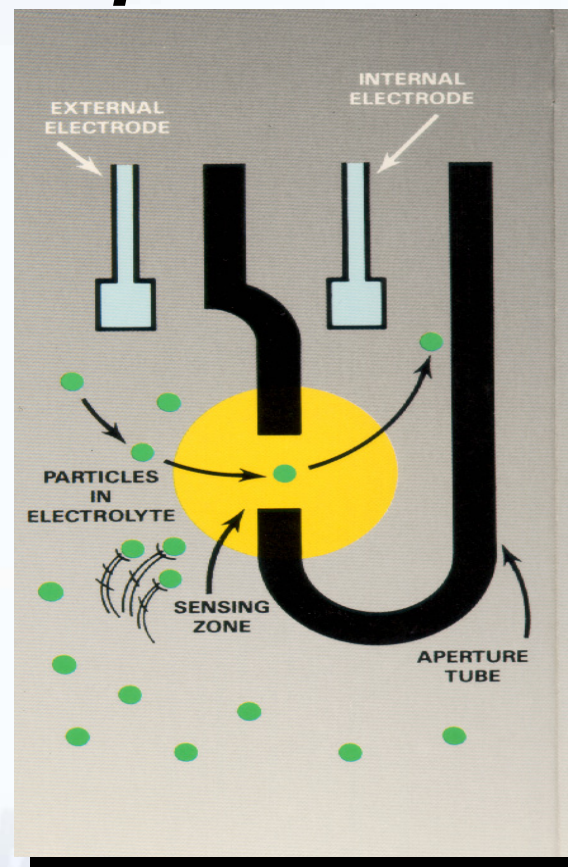


Coulterova metoda – stanovení velikosti a počtu buněk

Martin Polčík
Beckman Coulter

Multisizer 4: Coulterův princip



Aplikace Coulterova principu

Přehled vlastností

**Velikosti částic a koncentrace
SE MĚŘÍ, NIKOLI POČÍTÁJÍ**

- Objem částic je vyjádřen v μm^3 nebo fL.
- Velikost částic je vyjádřena ekvivalentním sférickým průměrem.
- Koncentrace částic je určena pomocí přesného měření analyzovaného objemu.
- Výsledky nezávisí na barvě nebo indexu lomu.

Coulterův princip

- Částice ve slabém elektrolytu procházejí malou štěrbinou, která je pod napětím. Tím vznikne v její oblasti tzv. “měřící zóna.”
- Procházející částice zaplní část objemu štěrbinu.
- Tím se změní vodivost elektrolytu, což se projeví napěťovým pulzem.
- Jeho velikost je úměrná objemu částice.

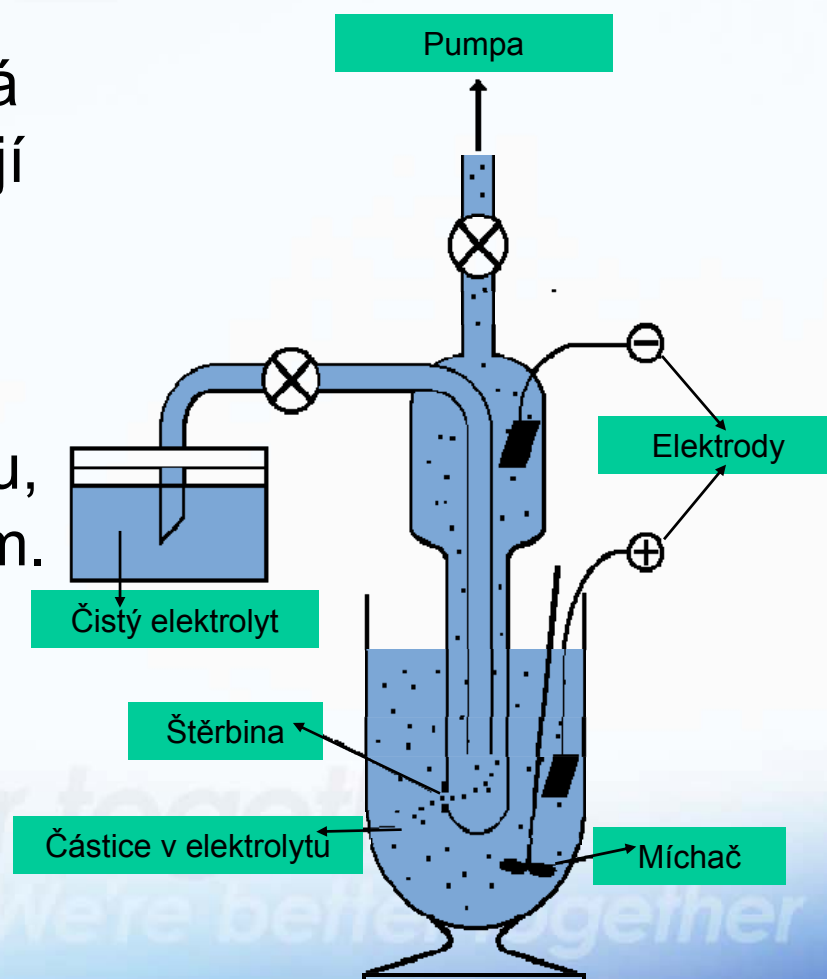
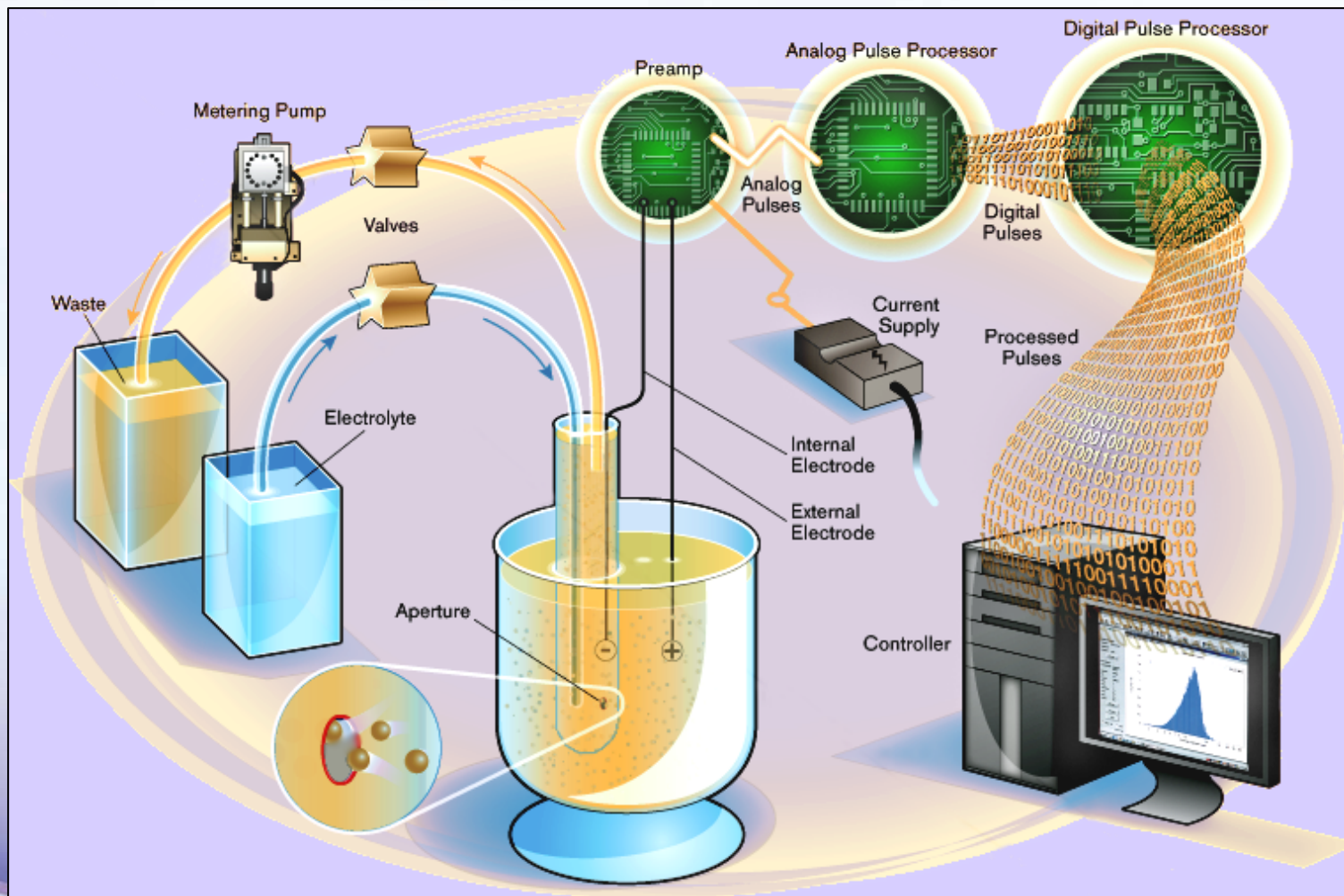
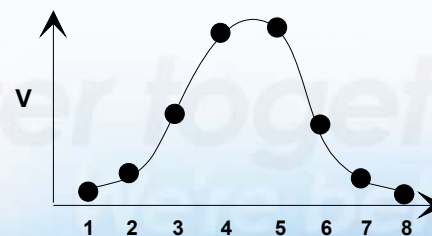
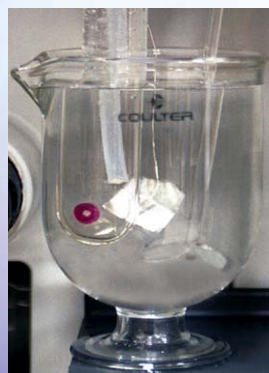
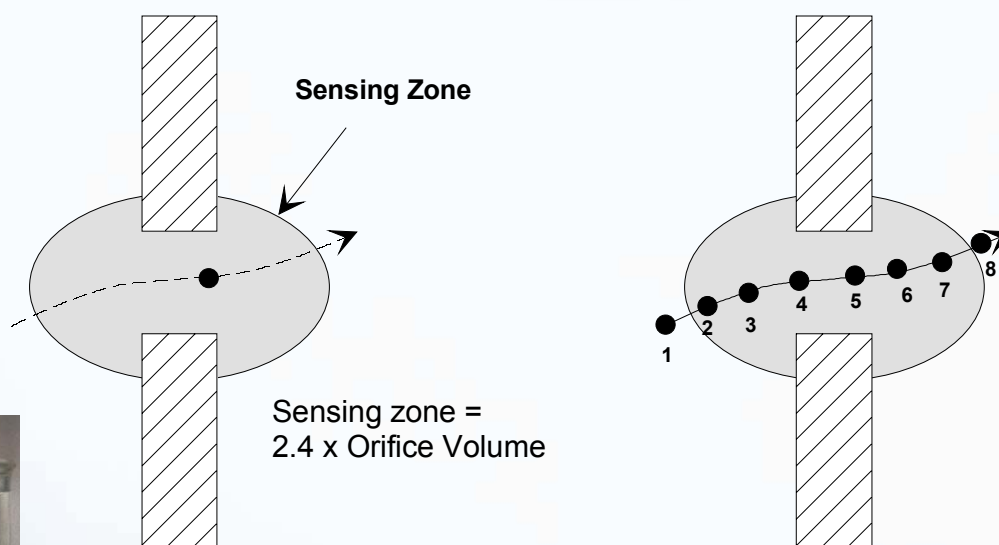


Schéma měření

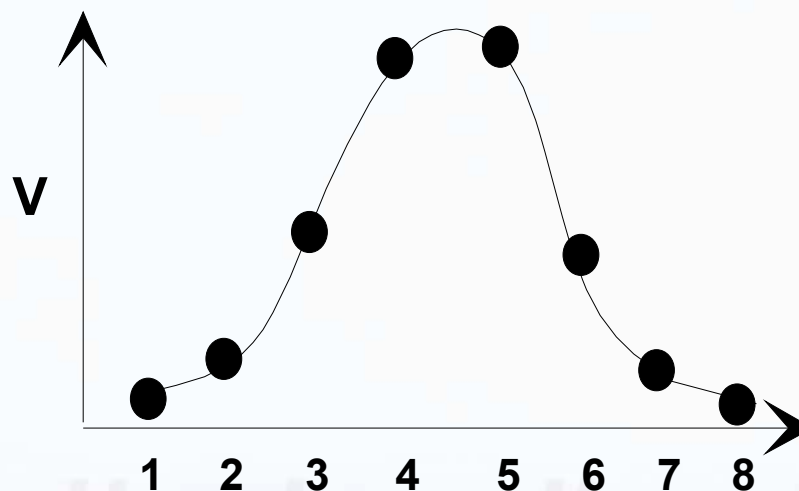


Vznik pulzu



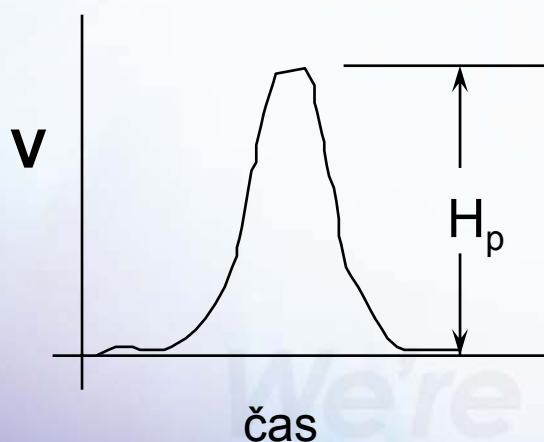
Tvar pulzu

- částice
 - objem
 - tvar
 - vodivost
 - porosita
- štěrbinina
 - proud
 - velikost
- elektrolyt



Analýza pulzu

Částice procházející štěrbinou způsobí změnu vodivosti úměrnou objemu částice. Tato změna je měřena jako napěťový pulz.

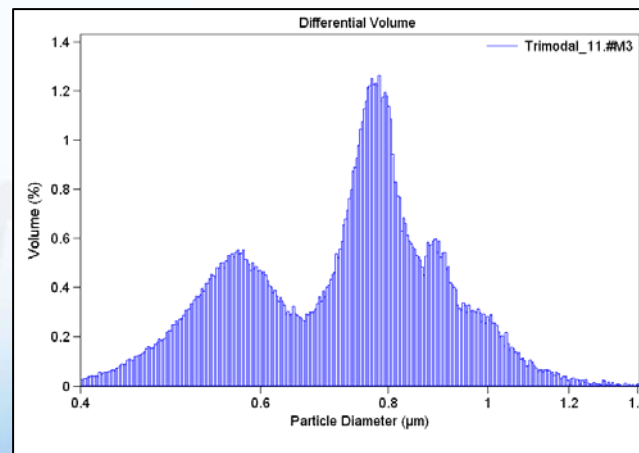
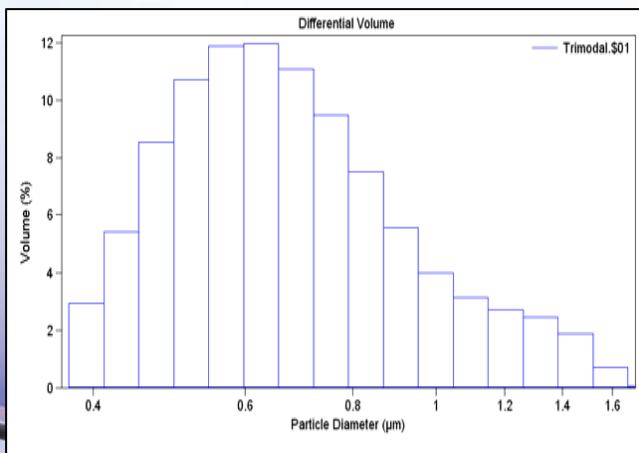
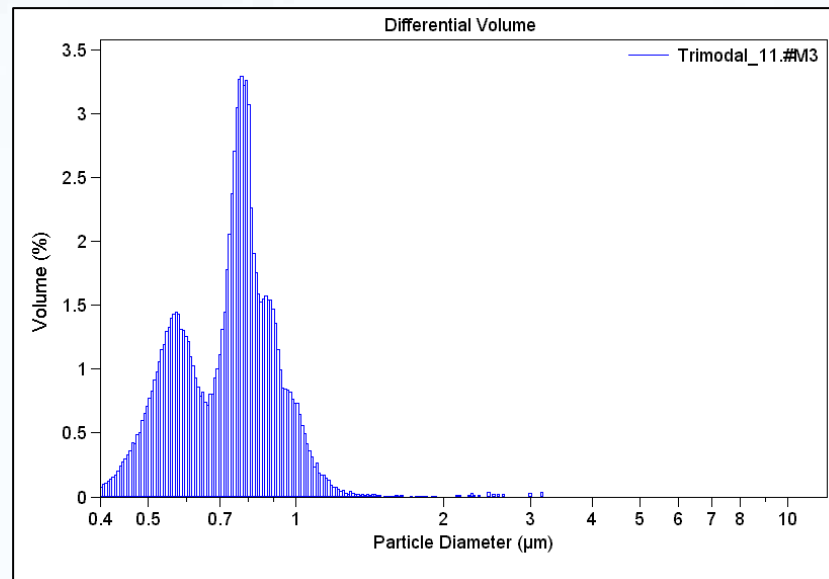
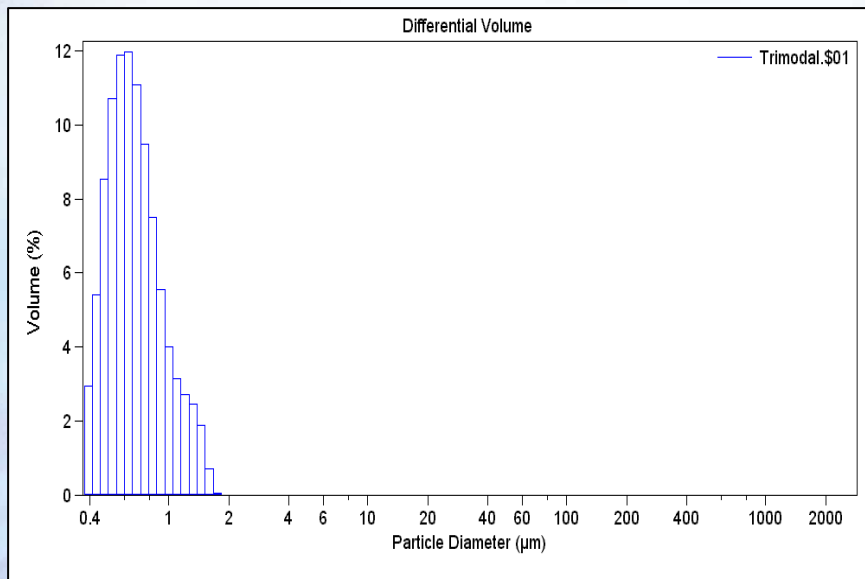


$$H_p = \frac{V\rho if}{\pi^2 R^4}$$

kde:

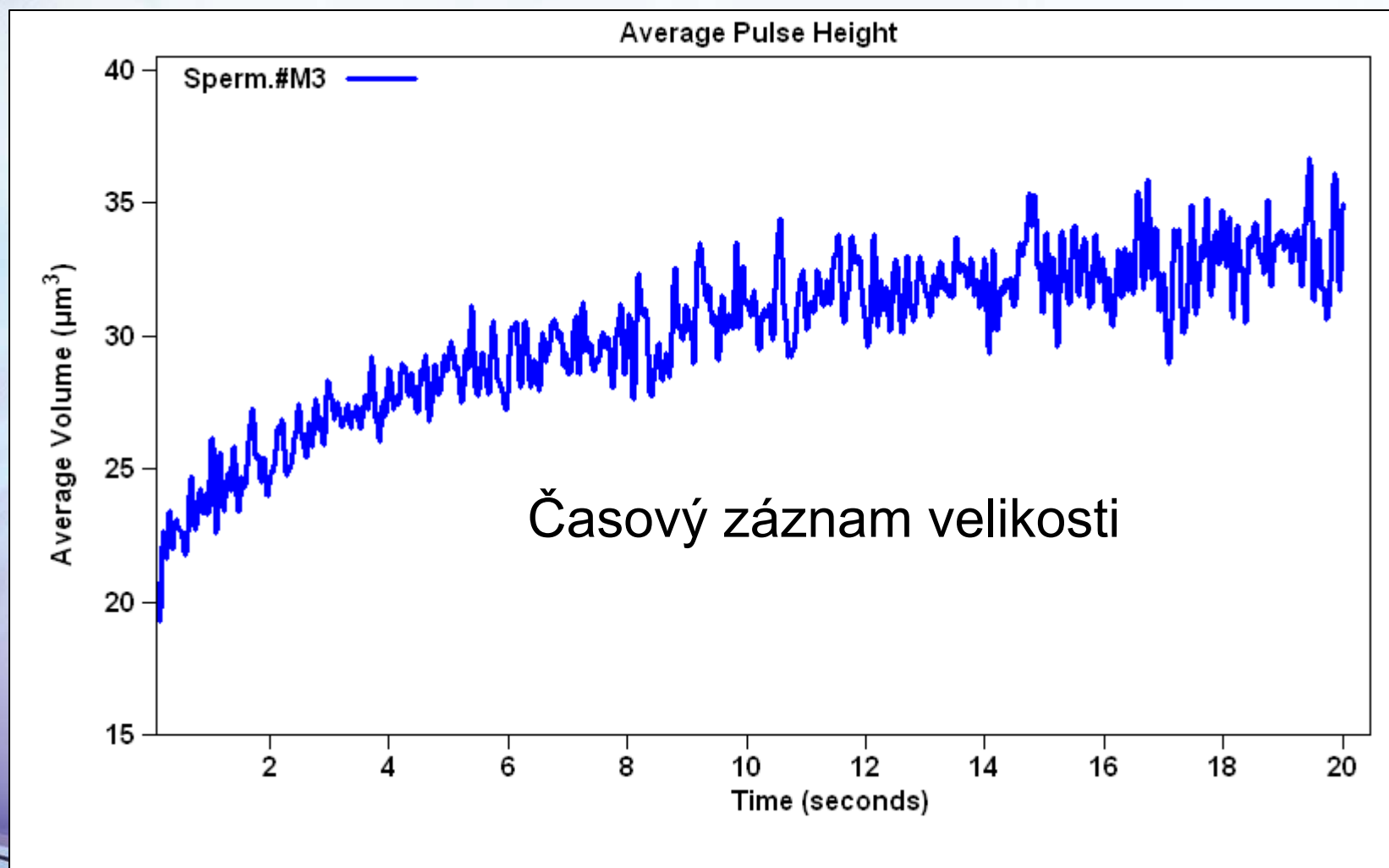
V = objem částic
 ρ = vodivost
i = proud
f = kalibrační faktor
R = průměr štěrbin

Vysoké rozlišení

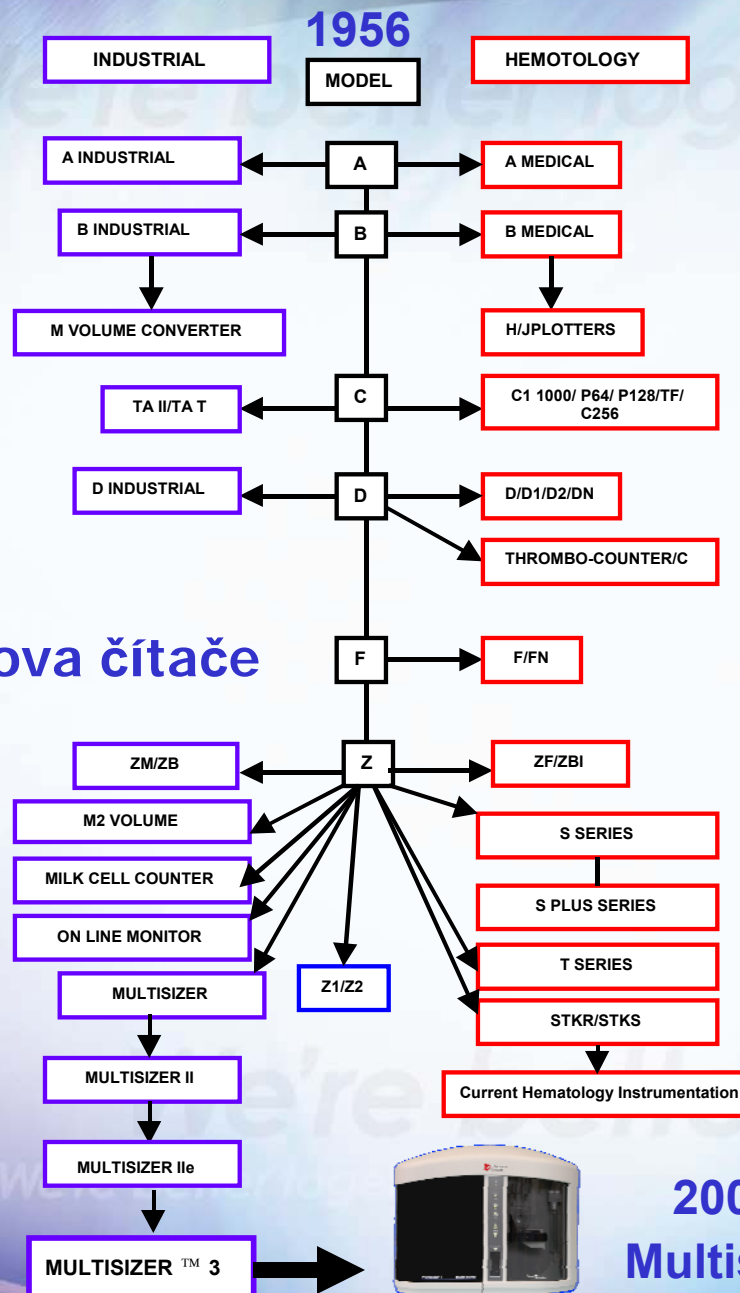


Individuální čítání – časové rozlišení

We're better together



Vývoj Coulterova čítače



**Model A
1956**



**Wallace Coulter
ve 40. letech**



**Wallace Coulter
v 90. letech**



**2008
Multisizer 4**

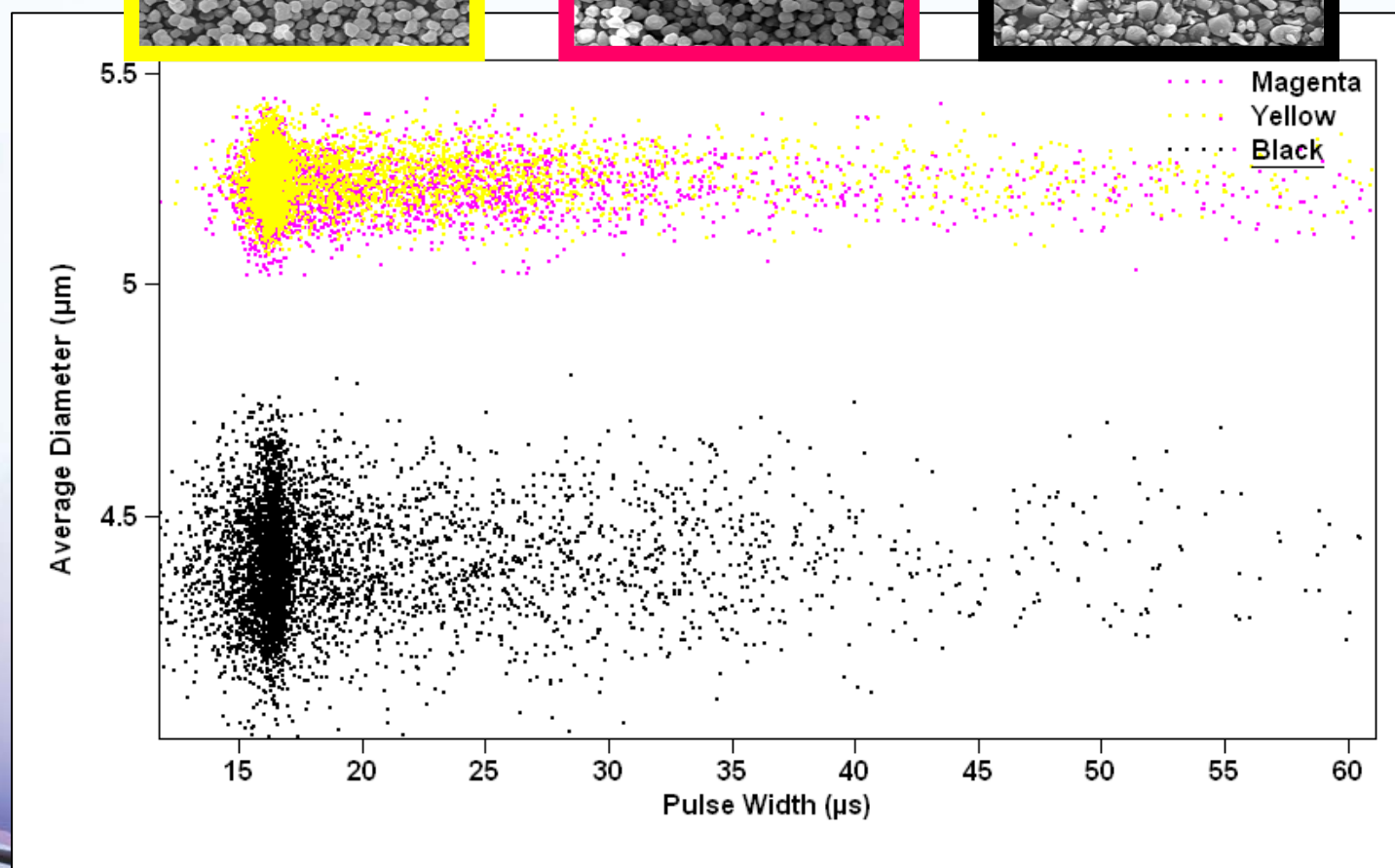
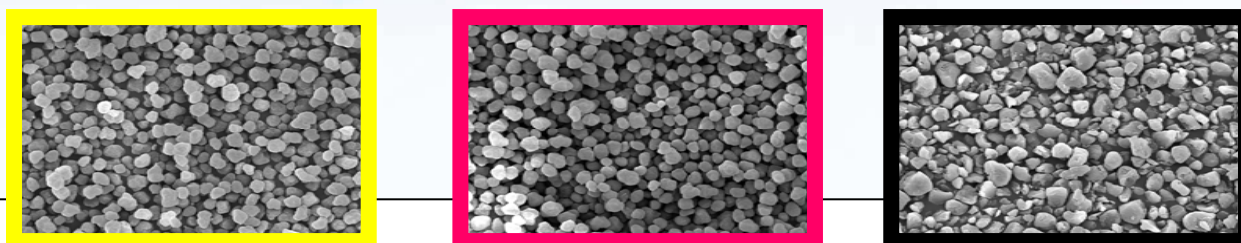
Beckman Coulter Multisizer™ 4 COULTER COUNTER®



Multisizer 4

- rozsah měřených velikostí
 - 0.4-1600 μm průměr nebo 0.034-2144.66 $\times 10^6$ fl objem
- dynamický rozsah
 - 1:40 v průměru nebo 1:64,000 v objemu
- rozsah pro štěrby: 2% až 80% průměru štěrby
- optimalizovaný pro malé štěrby
- zdokonalená možnost polohování vzorku
 - poloha nádoby
 - optimalizace míchání
- kontrola reagentů
- čtečka čárového kódu
- časový záznam (Pulse Time Stamp)
- automatická detekce blokace

Částice tonerů



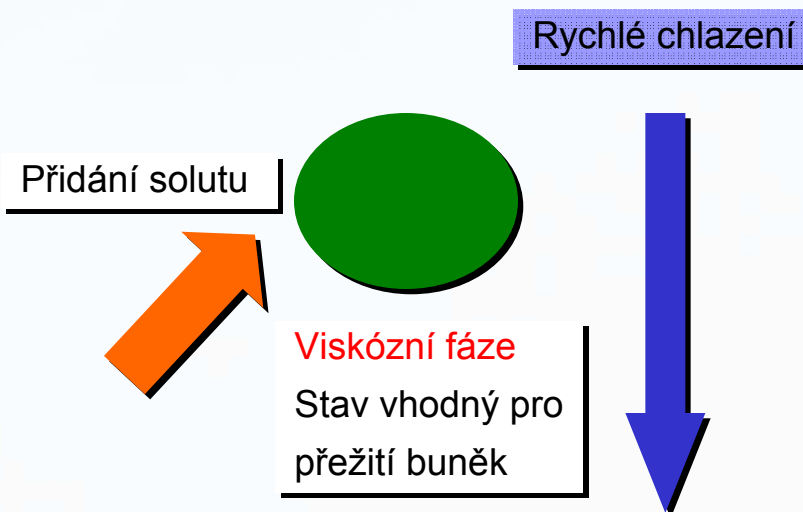
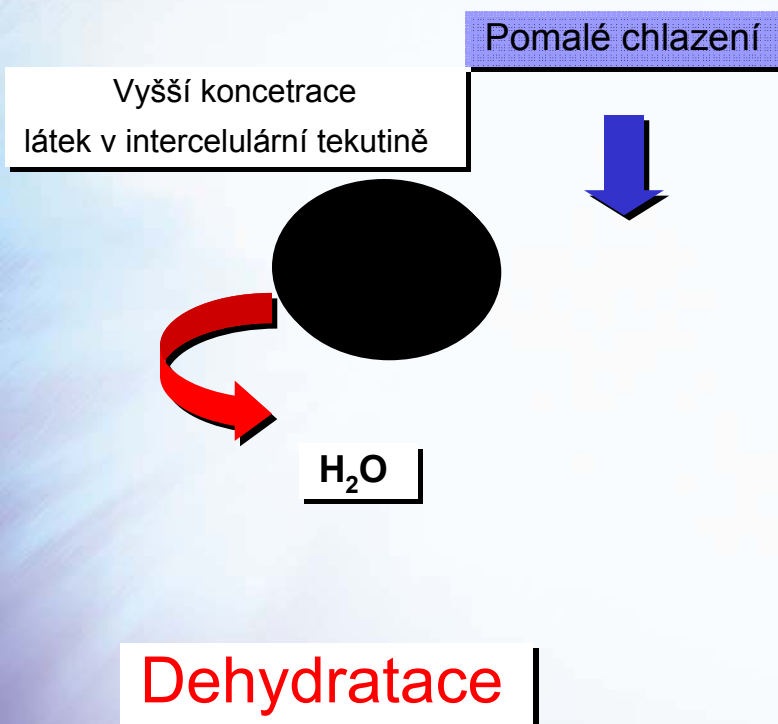
Aplikace – buněčná biologie

Změna objemu buněk je důležitý faktor v mnoha biologických procesech:

- buněčný růst
- buněčný cyklus
- apoptóza
- kompenzace osmotického stresu
- patogeneze.

Multisizer umožňuje detekovat statické a dynamické změny buněčných objemů.

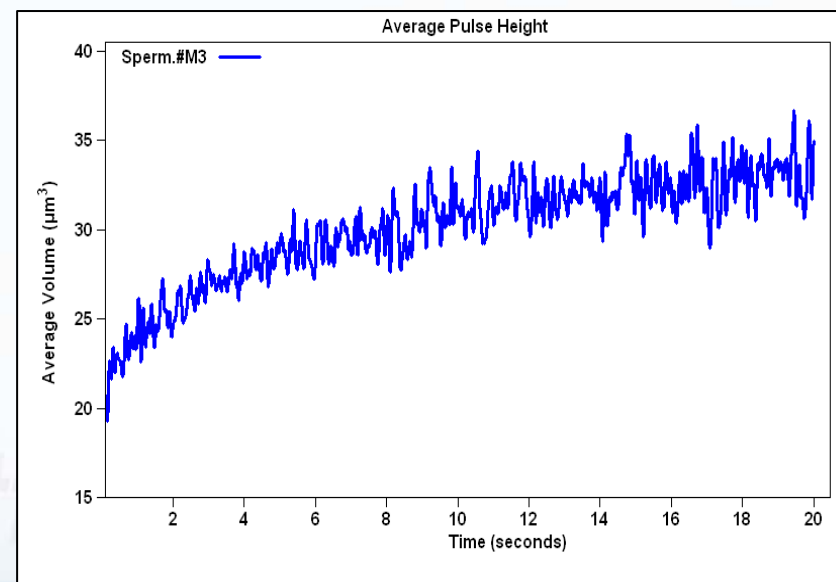
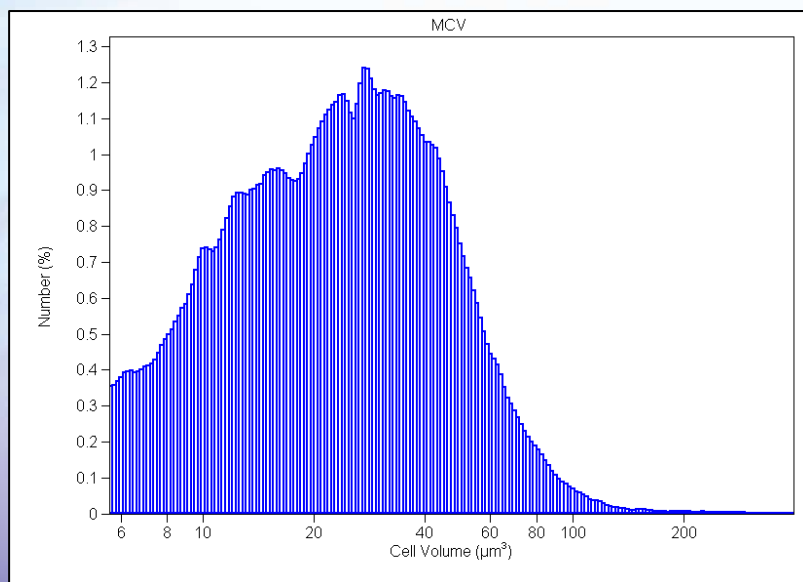
Vitrifikace



Důležité: znalost průchodnosti membrán

Změna objemu buněk pomocí MS4

Na obrázcích je vidět rozdělení velikostí buněk (sperma makaka) a závislost maxima rozdělení na čase. V rámci kryogenického studia byla měřena změna velikosti buněk v důsledku změny osmotického stresu.



Informace o průchodnosti membrán