

培养板单层贴壁细胞的原位计数方法

朱海林 彭彬 吴晶晶 徐倩 朱文彪 汪保和*

(湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081)

摘要 本文报道一种使用网格对培养板单层贴壁细胞进行原位计数的方法。自行设计和制作了培养板底贴膜网格和4单元方格目镜网格。培养板底贴膜网格用于细胞计数区的定位,用目镜网格计数细胞。目镜网格单元方格的平均细胞计数除以方格的面积,再乘培养孔底面积,计算出一个孔的细胞总数。比较实验和统计学分析证明了这一方法的准确度、精密度和线性范围,而且本方法简便易行、低耗实用。数码显微照相技术的结合应用进一步增强了本计数方法的适用性。

关键词 网格; 单层贴壁细胞; 细胞计数; 数码显微照相术

在培养器皿原位计数单层贴壁细胞,具有直接、简易的优点。已有不少作者采用目镜网格进行单层贴壁细胞原位计数,但是如何恰当地选择计数区位置和数目,以精确、快捷地进行细胞计数,目前还没有很好的解决方法^[1,2]。我们设计和制作了用于细胞计数区选择的培养板底部贴膜网格,结合使用目镜网格,建立了单层贴壁细胞原位计数的一种方法,并可结合应用数码照相技术。本方法不仅适用于贴壁细胞染色后的原位计数,而且适用于贴壁细胞培养过程中的实时计数。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人视网膜色素上皮细胞株-19 (ARPE-19)细胞由本院细胞生物学研究室惠赠,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为天津 TBD 生物工程公司产品,DMEM 培养基(低糖, D5523)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品。

1.2 培养板底贴膜网格的制作与粘贴

1.2.1 全孔网格 全孔网格是指覆盖培养板孔全部底面积的网格。制作方法:按培养板孔的大小,用 Microsoft Word 软件或其它计算机工具画出网格,其单元方格的边长为 0.5 mm,网格线粗细 0.1 磅。然后复制画好的网格,按培养板孔的数目和距离排列,将网格打印在透明胶片上。图 1 是 24 孔培养板全孔网格。按同样方法制作其它规格培养板的全孔网格。

1.2.2 取样网格 对应培养孔的若干个位置有一定数目单元方格的网格,称为取样网格。制作方法:按培养板孔的大小,用计算机工具画一圆圈,在圆内画出水平直径线和垂直直径线。距水平线(或垂直

线)逆时针和顺时针 45 度再画两根直径线。绘制一个边长为 1.5 mm 的正方框,等分为 9 个边长为 0.5 mm 的单元方格,称之为 9-格方框(9-subdivision square)。通过复制共得到 12 个这样的方框。在水平直径线和垂直直径线上,各放置 2 个 9-格方框,每一方框的中心重合于半径线中 1/3 与外 1/3 的交界点。在另外两根直径线上,共放置 8 个 9-格方框,其中 4 个方框的中心也重合于半径线中 1/3 与外 1/3 的交界点,另 4 个的中心重合于半径线中 1/3 与内 1/3 的交界点。同样将网格打印在透明胶片上。图 2 是 24 孔培养板取样网格。同法制作 6、12、48 孔培养板的取样网格。在 96 孔板取样网格中,正方框的位置和数目与上述相同,但由 4 个单元方格组成,称之为 4-格方框(4-subdivision square),单元方格的边长亦为 0.5 mm。

1.2.3 培养板底贴膜网格的粘贴 取全孔网格或取样网格,在打印面上各孔网格周边的空隙粘上双面胶,贴于培养板底部,保证各孔网格与培养板孔完全吻合。

1.3 目镜网格的制作与安装

取透明胶片,剪成大小恰能放入目镜镜筒的圆片,在其正中区用尖锋尽可能细的钢针画一 4 格网格,其边长依所用物镜的放大倍数而定,即网格边长 = 物镜放大倍数 × 4 格网格在培养孔底的对应边长。4 格网格在视场中应位于培养板底贴膜网格的单元方格之内,且两者的边线不会太靠近,以免影响细胞计数。为了确保目镜网格尺寸的准确,可在体视显微镜下绘

收稿日期: 2009-05-20 接受日期: 2009-08-27

湖南省教育厅科研项目资助(No.07A036)

* 通讯作者。Tel: 0731-88872526, E-mail: baohewang@126.com

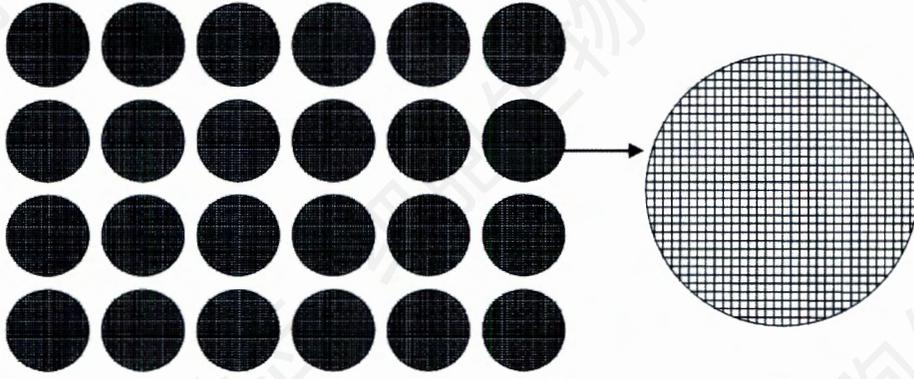


Fig.1 An entire-well grid for 24-well plate and the arrow points to an amplified grid of one well

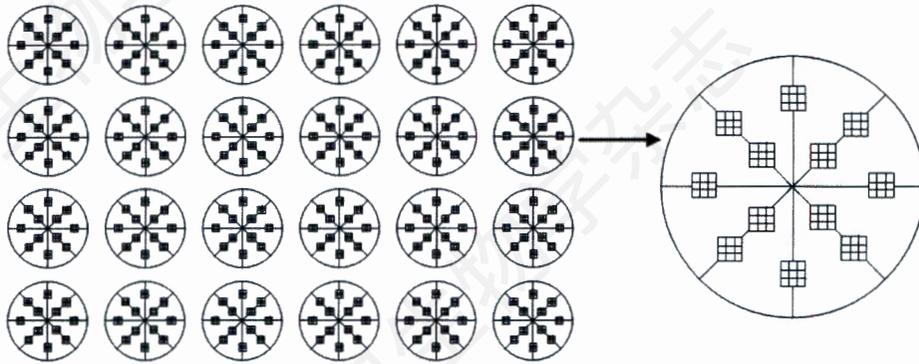


Fig.2 A sampling grid for 24-well plate and the arrow points to an amplified grid of one well

制,然后在倒置显微镜下,与细胞计数板的计数池方格比对。如图3所示,在10×物镜视场中,边长为2 mm的4格目镜网格与计数池中央大方格的一个中方格相吻合,则2 mm在培养孔底的对应长度为0.2 mm。将目镜网格放入显微镜目镜筒,使其位于厂家设定的平面上,保证网格片不倾斜、不凹凸。

1.4 数码照片网格的绘制

数码照片网格是指细胞单层数码照片上标定计数取样区的网格,相当于目镜网格。制作方法:拍摄置有测微尺的细胞计数显微视场的数码照片,将照片输入计算机,根据测微尺用计算机软件绘制所需尺寸的网格;或者用显微测微尺测定细胞单层上标志点之间的距离,根据数码照片上所测距离绘制网格,存盘备用。将网格覆盖在照片上进行细胞计数时,如照片放大倍数有变,应注意网格在照片上的对应尺寸要与真实情况相符。

1.5 单层贴壁细胞培养

ARPE-19细胞种于Costar培养板,培养基为含10% FBS的DMEM,于35℃、10% CO₂、饱和湿

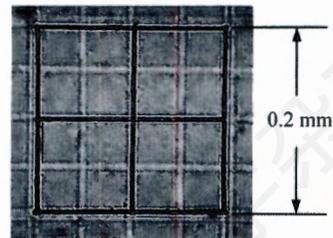


Fig.3 An ocular grid fitting a 0.04 mm² square of hemocytometer chamber in a microscope field

度的环境下培养。各项实验的细胞种植密度、培养时间见后(结果部分)。

1.6 原位细胞计数方法

1.6.1 显微镜下细胞计数 在倒置显微镜下,看到目镜网格位于待作细胞计数的培养板底贴膜网格内,调焦后计数目镜网格内的细胞,压边线细胞按“数上不数下、数左不数右”的原则计数。如细胞密集,计数4格网格中一个单元方格的细胞;细胞稀疏,则计数整个4格网格的细胞。

1.6.2 数码拍摄细胞计数 同样在倒置显微镜下,

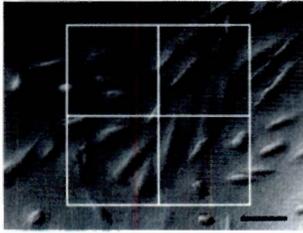


Fig.4 A digital phase-contrast microphotograph of the ARPE-19 cell monolayer covered with the grid (scale bar: 50 μm)

将待作细胞计数的培养板底贴膜单元网格移到相机取景框内,调焦看清细胞后拍照(必要时加用相差显微技术)。照片输入计算机,用“粘贴”工具将保存的数码照片网格覆盖在原始尺寸照片的中央区(图4),按1.6.1所述进行细胞计数。

1.6.3 全孔细胞数的计算

$$\text{全孔细胞数} = \frac{\text{计数单元方格的平均细胞数} \times \text{培养孔底的面积}}{\text{计数单元方格对应的孔底面积}}$$

式中:①计数单元方格的平均细胞数,等于一个培养板孔中实际数出的细胞总数除以数出细胞的目镜单元方格(或数码照片单元方格)总数;

②计数单元方格对应的孔底面积,是指一个目镜单元方格或数码照片单元方格对应的培养孔底面积(单位一般为 mm^2);

③培养孔底的面积,是指一个培养板孔的底面积(与计数单元方格对应的孔底面积用相同的单位)。

1.7 计数板细胞计数方法

用胰蛋白酶法将 ARPE-19 细胞从培养板上消化下来,打散成单细胞悬液,在细胞计数板(上海求精生化试剂仪器公司)充池4次,每次充池前均使细胞充分混匀。共计数16个大方格的细胞,求得平均值,再计算出培养孔的平均细胞数。

1.8 MTT 比色试验

ARPE-19 细胞种于24孔培养板,培养6h,见细胞贴壁稳定,每孔加入50 μl 5 mg/ml MTT,继续培养4h,弃上清液,加入300 μl DMSO,振荡10 min,在酶标仪(Bio-Tek, TLx800)上以490 nm 波长检测吸光度A值。

1.9 统计学分析

为了检验不同目镜网格单元方格数取样细胞计数的准确度,对各孔数培养板、高或低种植细胞密度、随机选区或定点选区,按细胞计数所用目镜网格单元方格数的分组,用SPSS 16.0做非参数Kruskal-Wallis 检验,组间比较用Dunn法。为了评价不同网

格单元方格数取样细胞计数的精密度,用全孔网格所有单元方格计数的标准差 s_T ,以48、12、8、4个单元方格数为样本含量 n ,计算总体均数的95%置信区间半宽度(CI_{95} 半宽度)。为了比较原位细胞计数、计数板细胞计数和MTT比色试验的线性范围,作各方法检测值与倍比贴壁细胞数的直线相关分析。

2 结果

2.1 随机或定点取不同数目单元方格的细胞计数

用6孔板、24孔板、96孔板培养ARPE-19细胞,各培养板的细胞种植密度均有两种:250个/ mm^2 孔底面积、25个/ mm^2 孔底面积,每种密度3个复孔。培养2天,Wright-Giemsa染色,在倒置显微镜下,10 \times 25放大倍数,计数细胞。对高密度种植孔,在全孔网格所有单元方格内计数1个目镜单元方格(4格格左上单元格)的细胞;对低密度种植孔,在全孔网格所有单元方格内计数4个目镜单元方格(整个4格格)的细胞。取全部单元方格的细胞计数数据、随机或按取样网格定点取48、12、8、4个单元方格的数据,用上述全孔细胞数计算式求各孔的细胞总数,然后分别计算出各培养板每一种种植密度的每孔细胞均数和标准差($\bar{x} \pm s$),结果见表1。

为了评估不同网格单元方格数取样细胞计数的精密度,用下式计算总体均数的95%置信区间半宽度(CI_{95} 半宽度):

$$CI_{95} \text{ 半宽度} = 1.96s_T / \sqrt{n}$$

式中 s_T 为全孔网格所有单元方格计数的标准差, n 为取样细胞计数的单元方格数(分别为48、12、8、4),结果见表2。

2.2 倍比数目细胞贴壁后的原位计数、计数板计数和MTT检测结果

将ARPE-19细胞按每孔 8×10^4 、 4×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 、 0.5×10^4 个细胞分组种入24孔培养板,每组9孔。培养6h,见细胞贴壁稳定,每组分别做取样网格原位细胞计数、计数板细胞计数和MTT比色检测,各法均取3个孔。

在 8×10^4 、 4×10^4 个/孔组,计数9-格方框正中单元格的细胞,即每孔计12格;在 2×10^4 、 1×10^4 、 0.5×10^4 个/孔组,计数9-格方框四角单元格的细胞,即每孔计48格。用全孔细胞数计算式求得的各孔细胞数,算出不同种入细胞数组的每孔平均细胞数,并分别算出 8×10^4 个/孔组与其它4组之间每孔平均细胞数的倍数(表3)。

Table 1 Cell count per well using various number of ocular grid units by random- or fixed-location sampling over the entire-well grid^a

| Sum number of OG units ^b | 6-well plate | | 24-well plate | | 96-well plate | |
|--|---------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| | L-density | H-density ^c | L-density | H-density | L-density | H-density |
| Total number of EWG units or $\times 4$ ^d | 4.734±0.073 | 47.134±0.307 | 0.944±0.007 | 9.515±0.070 | 0.158±0.003 | 1.565±0.050 |
| 48 random units ^e | 4.981±0.174 | 47.236±0.412 | 0.924±0.015 | 9.632±0.082 | 0.162±0.006 | 1.558±0.017 |
| 48 fixed units ^f | 4.750±0.131 | 46.974±0.524 | 0.947±0.025 | 9.474±1.390 | 0.156±0.002 | 1.549±0.065 |
| 12 random units | 4.750±0.198 | 47.234±1.210 | 0.924±0.060 | 9.606±2.417 | 0.164±0.014 | 1.538±0.086 |
| 12 fixed units | 4.684±0.412 | 46.906±1.994 | 0.947±0.079 | 9.500±0.419 | 0.160±0.017 | 1.564±0.055 |
| 8 random units | 5.047±0.297 | 47.500±1.188 | 0.990±0.091 | 9.658±0.137 | 0.163±0.012 | 1.547±0.101 |
| 8 fixed units | 4.849±0.453 | 45.917±2.472 | 0.970±0.068 | 9.738±0.238 | 0.157±0.064 | 1.560±0.144 |
| 4 random units | 3.942±0.302** | 49.083±4.944 | 1.306±0.518 | 8.233±0.726 | 0.127±0.064 | 1.680±0.166 |
| 4 fixed units | 5.740±0.342** | 54.625±2.375 | 1.227±0.069 | 10.925±0.475* | 0.207±0.115 | 1.387±0.185 |

a: data shown are the cell number $\times 10^4$ cells/well. $n=3$. b: "sum number of OG units" means the sum number of ocular grid (OG) units used to enumerate cells per culture well. c: L-density and H-density denote low-density plating and high-density plating of cells respectively. d: "total number of EWG units or $\times 4$ " means that the sum number of OG units used to enumerate cells per culture well was equal to total number of the entire-well grid units at H-density or the total number multiplied by 4 at L-density. As a result, the sum numbers of OG units used to enumerate cells per culture well were equivalently 3 740, 760 and 110 at H-density, and 14 960, 3 040 and 440 at L-density for 6-, 24- and 96-well plates respectively. e: "48 random units" was referred to as 48 OG units which were used to enumerate cells per culture well in a random-location manner, and 12, 8 and 4 random units can be deduced by analogy. The random sampling was performed by doing the matching between the random numbers from the RAND function of Microsoft Office Excel and the serial numbers of EWG units. f: "48, 12, 8 and 4 fixed units" was referred to as 48, 12, 8 and 4 OG units respectively, which were used to enumerate cells per culture well in a fixed-location manner by using the sampling grid. (1) 48 OG units were placed in the microscope fields of four corner units of the 9-subdivision squares for 6- and 24-well plates, or the all units of the 4-subdivision squares for 96-well plates. (2) 12 OG units were placed in the microscope fields of the central units of the 9-subdivision squares for 6- and 24-well plates, or the upper-left corner units of the 4-subdivision squares for 96-well plates. (3) 8 OG units were placed in the microscope fields of the central units of the 9-subdivision squares which are the four ones on the horizontal and vertical diameter lines, and the four ones near the center of well on the other diameter lines for 6- and 24-well plates, or the upper-left corner units of the 4-subdivision squares at the corresponding locations for 96-well plates. (4) 4 OG units was a half of "8 fixed units", namely, sampling a numerical value of cell counts from one grid unit on every diameter line. * $P<0.05$, compared with "Total number of EWG units or $\times 4$ " group. ** $P<0.01$, compared with "Total number of EWG units or $\times 4$ " group.

Table 2 Effect of cell counting using various numbers of grid units on the half width of 95% confidence interval of mean^a

| Sum number of OG units ^b | 6-well plate | | 24-well plate | | 96-well plate | |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | L-density $s_T=0.887$ | H-density ^c $s_T=1.951$ | L-density $s_T=1.014$ | H-density $s_T=2.121$ | L-density $s_T=0.997$ | H-density $s_T=2.234$ |
| 48 | 0.279 | 0.552 | 0.287 | 0.600 | 0.282 | 0.632 |
| 12 | 0.558 | 1.104 | 0.574 | 1.200 | 0.564 | 1.264 |
| 8 | 1.368 | 2.704 | 1.405 | 2.939 | 1.382 | 3.096 |
| 4 | 1.934 | 3.824 | 1.987 | 4.157 | 1.954 | 4.379 |

Notes of a, b, and c are the same to table 1.

用胰蛋白酶将细胞分组消化下来,打散成单细胞悬液,用细胞计数板计数。根据悬液总体积,计算出各组每孔平均细胞数,同样分别算出 8×10^4 个/孔组与其它 4 组之间每孔平均细胞数的倍数(表 3)。

测定各组的 MTT 比色试验吸光度 A_{490} 值,也分别算出 8×10^4 个/孔组与其它 4 组之间每孔平均 A_{490} 值的倍数(表 3)。

各组细胞原位计数、计数板计数和 MTT 检测值分别对应每孔种入细胞数作相关分析,结果见图 5。

2.3 原位细胞计数绘制的细胞生长曲线

用 48 孔板培养 ARPE-19 细胞, 1.5×10^4 个/孔,共 3 孔,每天在 10×25 倒置显微镜下,拍摄 4-格方框左上角单元格细胞的数码照片,每孔共拍 12 格。通过数码照片细胞计数、全孔细胞数计算,再求得各时间点的每孔细胞平均数,绘出细胞生长曲线(图 6)。

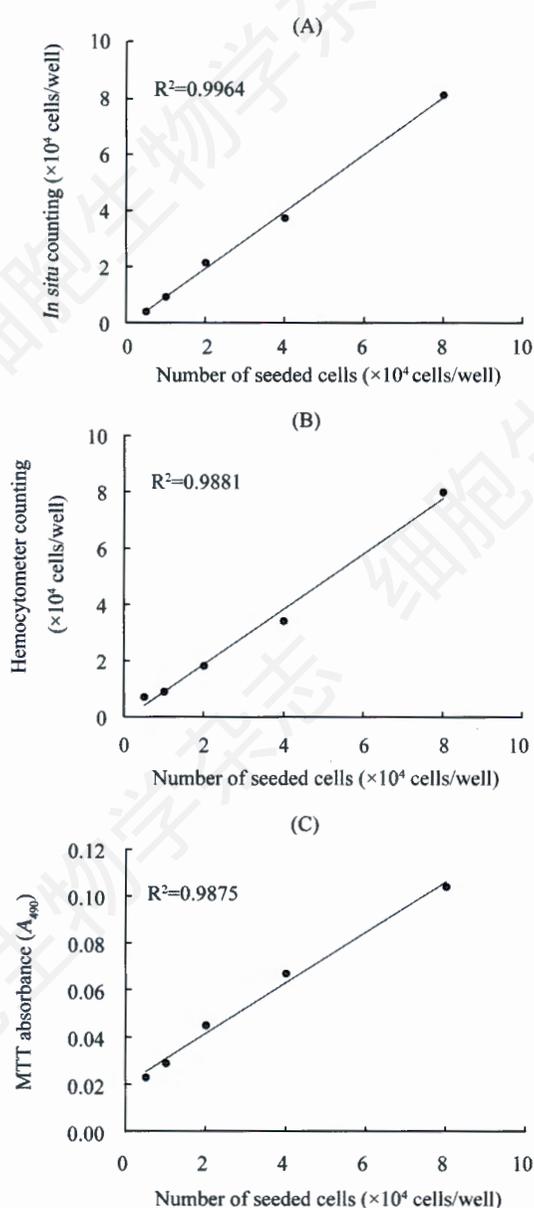
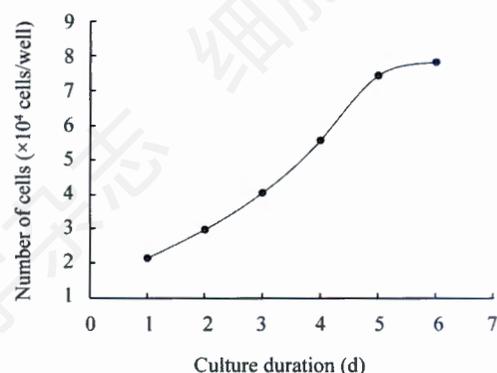
3 讨论

细胞计数是评定体外培养条件下细胞增殖水平的直接手段,目前常用细胞计数仪或计数板做细胞计数。这两种方法计数培养板贴壁生长的细胞,需使

Table 3 Cell counts of the *in situ* counting and the hemocytometer counting, and the MTT absorbance of proportional number of cells attached to the culture plate

| Number of seeded cells ($\times 10^4$ cells/well) | <i>In situ</i> counting ($\times 10^4$ cells/well) | Hemocytometer counting ($\times 10^4$ cells/well) | MTT assay (A_{490}) |
|---|--|---|----------------------------|
| 8.0 | 8.128 \pm 0.111 | 7.979 \pm 0.344 | 0.104 \pm 0.003 |
| 4.0 (2) | 3.747 \pm 0.258 (2.2) | 3.417 \pm 0.237 (2.3) | 0.067 \pm 0.003 (1.6) |
| 2.0 (4) | 2.151 \pm 0.056 (3.8) | 1.812 \pm 0.108 (4.4) | 0.045 \pm 0.002 (2.3) |
| 1.0 (8) | 0.927 \pm 0.060 (8.8) | 0.896 \pm 0.130 (8.9) | 0.029 \pm 0.003 (3.6) |
| 0.5 (16) | 0.406 \pm 0.026 (20.0) | 0.708 \pm 0.260 (11.3) | 0.023 \pm 0.005 (4.5) |

Data were expressed as mean \pm SD, $n=3$. The number in parenthesis is a specific value of the mean of 8×10^4 /well group divided by the mean of this group for each test method.

**Fig.5** The correlation analysis between cell counts of the *in situ* counting (A) and hemocytometer counting (B), or MTT absorbance (C) and the numbers of seeded cells**Fig.6** The growth curve of the cells

细胞从孔底脱离下来, 往往还需离心和重悬细胞, 再上机或充池计数, 产生误差的环节多, 而且操作费时费力。当细胞较少时, 包括使用小孔培养板、细胞生长初期、细胞增殖抑制或死亡等情况下, 细胞计数仪或计数板计数更不适用^[3]。原位计数贴壁细胞能避免这些问题。不少研究者^[1,4]在培养孔底随机取数个视野进行细胞计数, 然而按随机法则寻取计数区并不简便。韩露^[5]设计刻有网格的玻璃片, 可置于培养板内用于细胞计数。Buehring 等^[6]用金刚石笔在培养板底画线, 以标定细胞计数区, 利用目镜网格做细胞计数。Xue 等^[2]以培养孔中心为起点, 沿一个方向等距离取 3 个区, 用目镜网格计数细胞, 再计算全孔细胞数。这些方法未重视培养孔大小和细胞密度不同的计数区分布和面积问题, 把握度缺乏比较研究和统计学证明。

近年来, 数码照相技术和分析软件为显微图像中细胞的计数提供了自动化手段^[7]。目前对于染色质量较高的标本和对比度较强的显微图像, 计算机分析技术的细胞计数效果较好。然而, 如果图像本底噪声较强或其它干扰信号较多, 图像分析细胞计数则不令人满意^[8]。对于培养器皿上贴壁生长的活细胞层, 数码拍摄图像的对比度往往较小, 自动化计数技术尚

待提高^[9]。图像分析细胞计数也需要解决照相区的取样问题。

Nunc 公司和 Corning 公司有皿底 2 mm×2 mm 网格的培养皿, 可用于细胞集落计数。RPI 公司^[10]有 32、50、70、100 个方格的网格透明胶片(商品名 PetriSticker), 可贴于 Petri 培养皿, 也能用于细胞集落计数。至今, 尚未见培养板底贴膜网格的产品或设计。

本文的工作设计和制作了培养板底贴膜网格, 可随细胞计数、形态学观察和拍照的需要而贴上或取下。因为网格平面与培养孔底内表面不在同一水平面, 调焦而看清细胞时, 网格线粗且模糊, 所以贴于培养板底贴膜网格不适于直接计数细胞, 而用于细胞计数区的定位。在此基础上, 使用目镜网格, 计数培养板底贴膜网格内的细胞。通过全孔网格计数, 计算出全孔细胞数, 作为一个孔的真实细胞数的代表值。从全孔网格计数的数据中, 随机或按一定位点取数据, 用这些数据计算的全孔细胞数与代表值比较。结果表明, 适宜的定位(经多种定位模式取样计数细胞而选择), 一定的计数网格单元方格数(依细胞密度不同而异), 取样计数能达到合乎要求的准确度和精密度。

根据全孔网格计数数据抽样分析的结果, 在保证准确度、精密度和简易实用的前提下, 确定了取样网格的在培养板孔底的对应位置和单元方格数。使用取样网格, 能快捷地寻取细胞计数区。取样网格设计成 9-格方框或 4-格方框组合、目镜网格设计成 4-格网格, 为细胞较稀或较密时所需计数方格的多少提供了选择。方格尺寸的大小便于准确、快速地计数细胞。

倍变数目细胞计数的结果显示, 原位细胞计数具有较宽的线性范围, 能满足绝大多数情况下单层贴壁细胞培养实验的需要。网格原位细胞计数、计数板细胞计数和 MTT 检测值随细胞数倍变而变化的结果及其相关分析还表明, 在细胞数低值范围内, 原位计数法对细胞数变化的反映性更好。如果细胞十分稀少, 还可用全孔网格作计数。因此, 网格原位计数法也能解决细胞计数仪、计数板和 MTT 法不适于细胞数过少的问题^[3,11]。网格原位计数用于细胞生长曲线绘制, 进一步说明了本计数方法的实用性。

借助数码拍摄技术进行网格原位细胞计数, 能减少直接观察细胞的时间, 对细胞生长无明显的影响, 能在培养过程中动态检查同一细胞群的增殖水平。细胞被计数后, 还能在保持活力的状态下用于其它相关指标的检测, 使实验具有严格的对照性, 结果更有说服力。而且本细胞计数方法能节约细胞用量, 对来源希贵或培养困难的细胞尤有优越性^[12]。

参考文献(References)

- [1] Lai JY, Chen KH, Hsu WM, *et al.* Bioengineered human corneal endothelium for transplantation, *Arch Ophthalmol*, 2006, 124 (10): 1441-1448
- [2] Xue Y, Williams TL, Li T, *et al.* Type II pneumocytes modulate surfactant production in response to cigarette smoke constituents: restoration by vitamins A and E, *Toxicol In Vitro*, 2005, 19(8): 1061-1069
- [3] Ricardo R, Phelan K. Counting and determining the viability of cultured cells, *J Vis Exp*, 2008, (16). <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=752>
- [4] Crowston JG, Chang LH, Daniels JT, *et al.* T lymphocyte mediated lysis of mitomycin C treated Tenon's capsule fibroblasts, *Br J Ophthalmol*, 2004, 88(3): 399-405
- [5] 韩露. 细胞培养板: 中国, ZL 200520009644.3[P/OL]. 2006.10.25[2009-3-30]. [http://search.sipo.gov.cn/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN200520009644.3&leixin=syxx&title=细胞培养板&ipc=C12M3/04\(2006.01\)I](http://search.sipo.gov.cn/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN200520009644.3&leixin=syxx&title=细胞培养板&ipc=C12M3/04(2006.01)I)
- [6] Buehring GC, Jensen HM. Lack of toxicity of methylene blue chloride to supravivally stained human mammary tissues, *Cancer Res*, 1983, 43(12 Pt 1): 6039-6044
- [7] 吕宏升, 朱庆生, 王军, 等. 全自动显微镜及图像分析系统处理免疫组化图像, *中国体视学与图像分析*, 2004, 9(1): 37-40
- [8] 张士岭, 王淑秋, 李晓捷, 等. 计算机图像分析与人工计数方法在癫痫脑组织 GFAP 免疫组化中的对比研究, *中国体视学与图像分析*, 2008, 13(3): 185-187
- [9] Hirneiss C, Schumann RG, Grüterich M, *et al.* Endothelial cell density in donor corneas: a comparison of automatic software programs with manual counting, *Cornea*, 2007, 26(1): 80-83
- [10] RPI Corp. Microbiology Accessories (PetriStickers™) [EB/OL]. [2009-05-18] http://www.rpicorp.com/products/prod_info.html?products_front_id=967&catid=5&cat_id=70
- [11] Givens KT, Kitada S, Chen AK, *et al.* Proliferation of human ocular fibroblasts. An assessment of *in vitro* colorimetric assays, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990, 31(9): 1856-1862
- [12] Warger WC 2nd, Newmark JA, Warner CM, *et al.* Phase-subtraction cell-counting method for live mouse embryos beyond the eight-cell stage, *J Biomed Opt*, 2008, 13(3): 034005

A Counting Method for Monolayer Cells Attached to Culture Plate *in Situ*

Hai-Lin Zhu, Bin Peng, Jing-Jing Wu, Qian Xu, Wen-Biao Zhu, Bao-He Wang*
(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract This article presents a newly developed method for counting monolayer cells attached to the culture plate wells *in situ* by means of grids. The culture-plate grid and the 4-subdivision ocular grid were designed and prepared. The film of culture-plate grid was pasted to the bottom of the culture plate and used to mark the fields of cell monolayer. In the selected fields cells were enumerated using the ocular grid under an inverted microscope. The average cell number of the ocular grid units for a well of culture plate was divided by the area of an ocular grid unit to calculate the cell count per unit area, which was multiplied by surface area of a culture well to result in the total number of cells of a culture well. The comparative experiments and the statistical analysis verified the accuracy, precision and linear range of this method. Furthermore, it is simple, convenient and cost-saving. This cell-counting method gains an enhanced applicability with the aid of digital microphotography.

Key words grid; adherent cell monolayer; cell counting; digital microphotography

Received: May 20, 2009 Accepted: August 27, 2009

This work was supported by the Foundation of Hunan Provincial Education Department (No.07A036)

*Corresponding author. Tel: 86-731-88872526, E-mail: baohewang@126.com