실험 제목	실험교사 성명
Hemacytometer를 이용한 적혈구 및 백혈구 수 측정	

학교명	반	번호	이름

1. 실험 목표

Hemacytometer의 사용법을 숙지하고 실험방법을 익혀서 실제 적혈구 및 백혈구의 수를 측정 할 수 있다. Hemacytometer를 사용하는 실험 분야들에는 어떤 것이 있는지 이해한다.

2. 배경 이론

1) 혈구 수 측정(Blood cell counting)

혈액은 세 종류의 세포들을 포함하고 있다. 적혈구(red blood cell 또는 erythrocyte)는 산소와 이산화탄소를 운반한다. 백혈구(white blood cell 또는 leukocyte)는 감염 및 침입생물과 싸운다. 혈소판(platelet 또는 thrombocyte)은 혈액의 손실을 막는다. 이 세포들이 적절한 기능을 수행하기 위해서는 초과되지 않는 범위 내에서 충분한 수가 존재해야 한다. 따라서 혈구 수를 측정하는 것은 중요한 기술로 혈액 세포의 기능을 수행 할 수 있는 능력을 확립하는 데 도움이 되고 나아가 세포배양 시 세포 수 측정에도 사용된다.

빈혈은 많은 경우 비정상적인 적혈구 감소가 원인이어서 조직으로 운반되는 산소가 부족하게 된다. 빈혈의 다른 원인으로는 적혈구 내 헤모글로빈의 감소, 적혈구 크기의 감소 및 출혈 등이 있다. 빈혈의 원인을 정확히 진단하기 위해서는 적혈구 용적률, 헤모글로빈, 적혈구 수, 적혈구 크기, 각 세포 당 헤모글로빈 및 다른 인자들을 시험해야 한다.

백혈구 수의 측정은 중요한 임상시험의 하나이지만 더 정확한 진단은 백혈구 종류별 각각의 수를 측정함으로써 얻어진다. 각 백혈구들은 감염에 대항 할 때 하나의 다른 기능을 수행하고 각 질병들은 백혈구에 의한 다른 반응들을 초래한다. 다양한 질병에서 백혈구 집단 내 변화의 몇 가지 예를 나타내었다(표 1).

표 1. 질병 또는 조건에 따라 발생하는 백혈구의 변화

질병 또는 조건	증상
원충감염, 영양실조, 재생불량성 빈혈	호중성구 감소증
격렬한 운동, 류마티스 열, 중증화상	호중성구 증가증
유행성 이하선염, 풍진, 백일해	림프구 증가증
성홍열, 기생충감염, 알레르기 반응	호산구 증가증
결핵, 백혈병 같은 만성질환	단핵구 증가증
글루코코르티코이드 약물의 처치	림프구 감소증

(1) 혈구 수의 정상수치

적혈구
남성 5,400,000 ± 800,000/mm^3
여성 4,800,000 ± 600,000/mm^3

백혈구
남성 7,000-9,000/mm^3
여성 5,000-7,000/mm^3

3. 실험 재료 및 기구

혈구계산기(hemacytometer), 광학현미경, trisodium citrate (trisodium citrate dihydrate), 포르말린, gentian violet, acetic acid, 수산화칼륨, 증류수, 에탄올, 100 ml 메스실린더, 100 ml 비커, 페니실린병, 란셋, 탈지면, 70% 알코올 분무기, 저울, 약수저, 유산지, washing bottle, 파라필름.

4. 실험 방법

실험 1> 적혈구 수 측정

1) Dacie's 용액의 제조

3% Trisodium citrate 99 ml + 포르말린 1 ml

2) 계산판(counting chamber)의 구조

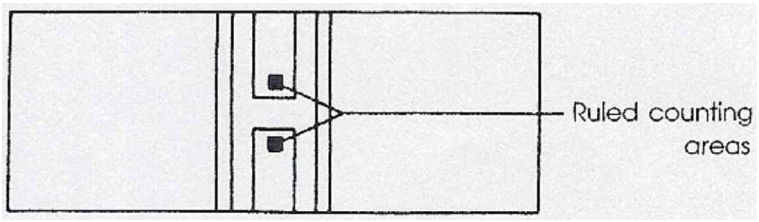


그림 1. Hemacytometer의 counting chamber.

- 양측에 높이 0.1 mm의 ⎍ 부분이 있음.

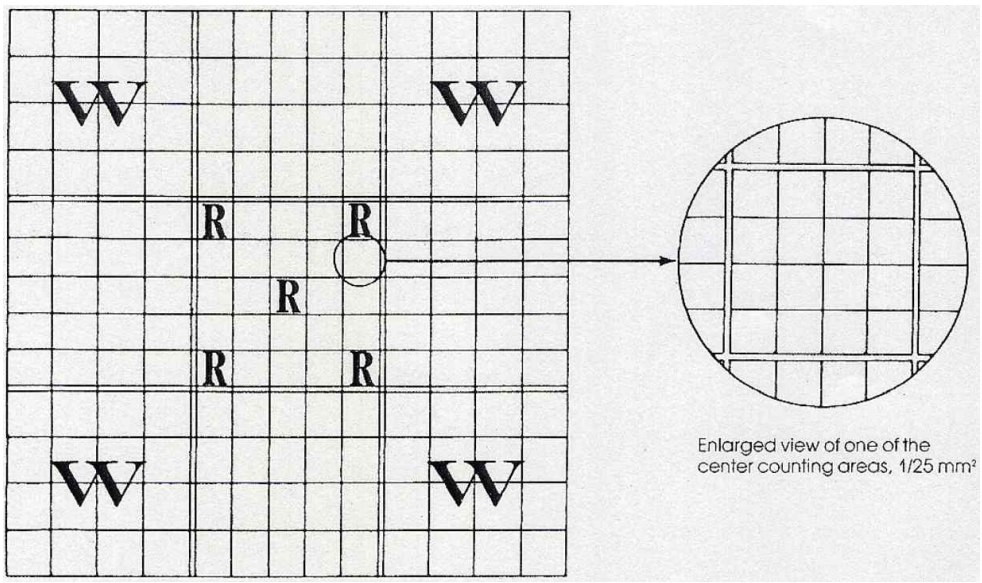


그림 2. 계산판(counting chamber)의 눈금.

- 중앙의 1 mm^2를 25개의 큰 정방형으로 나눔.
- 큰 정방형은 다시 16개의 작은 정방형으로 나눔.
- 작은 정방형은 1/400 mm^2의 넓이를 가진다.
- 계산판에는 0.1 mm의 공간이 있으므로 한 개의 작은 정방형 구획은 1/4,000 mm^3에 해당.

3) 혈구계산기(hemacytometer)의 준비 및 세척법

- Melangeur (dilution pipette)는 깨끗이 씻고 말린 다음 사용하여야 한다.
- KOH용액 또는 10% HCl-alcohol로 용해시켜 씻는다.
- 알코올로 씻어낸다.
- 에테르로 씻어낸다.(생략권고)
- 말린다.
- 건조여부는 팽대부(ampulla) 속에 있는 유리알의 움직임으로 판별 함.

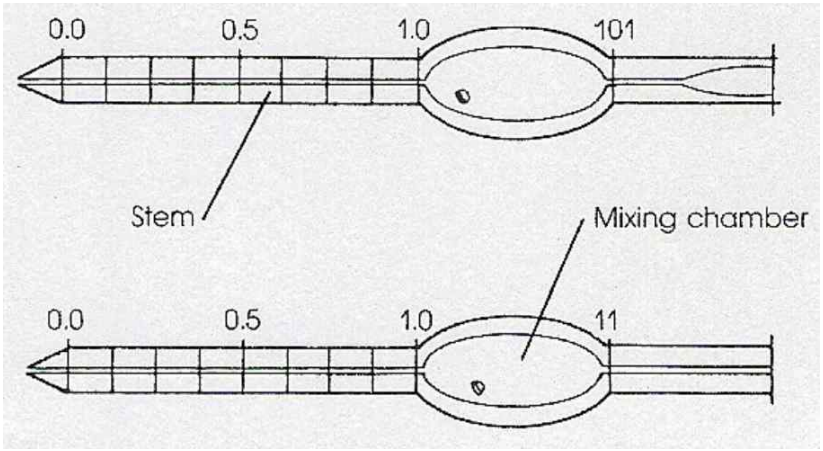


그림 3. Melangeur (dilution pipette).

4) 희석 방법

① 혈액은 0.5의 눈금까지 정확히 빨아들인 후 melangeur 끝 부분에 묻은 혈액은 솜으로 닦아낸다.

② 곧바로 Dacie's 용액을 101 눈금까지 정확히 빨아들인다.

③ 용액이 101까지 오면 혀끝으로 고무관을 막고 melangeur를 수평으로 하여 엄지와 검지로 melangeur 양끝을 막고 1-2분간 서서히 흔들어서 혈액과 희석액이 잘 혼합되도록 한다 → 200배 희석이 되는 셈이다.

※ 공기가 들어가지 않게 주의

④ Melangeur를 수직으로 잡고 처음 나오는 한 두 방울은 버린다.

⑤ 계산판 위를 cover glass로 덮고 그 틈새 주변에 melangeur의 끝을 대면 모세관 현상으로 cover glass와 계산판(counting chamber) 사이로 희석된 혈액이 스며들게 된다.

⑥ 3분 정도 방치→ 혈구가 counting chamber 바닥에 가라앉게 된다.

⑦ 400배로 확대하여 정방형 구획 속에 있는 혈구를 계산한다.

※ 이중 셈을 방지하기 위해 윗줄과 왼쪽 줄 위에 있는 것은 셈하고 아랫줄과 오른쪽 줄 위의 것은 셈하지 않는다.

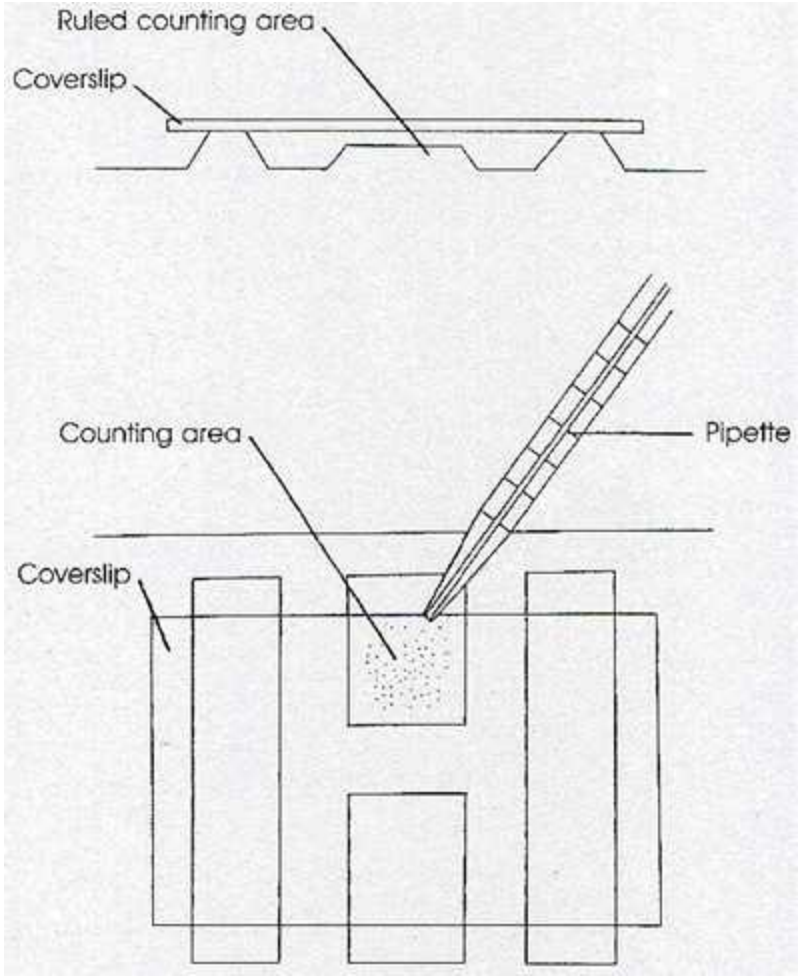


그림 4. 혈액의 loading 방법.

5) 계산 방법

혈액은 200배 희석됨(× 200)

계산판의 깊이는 0.1 mm (× 10)

[R]은 1 mm^2의 1/25에 해당(× 25)

따라서 200 × 10 × 25 = 50,000

측정된 평균 [R] 내의 적혈구 수 × 50,000 = (적혈구 수)/mm^3

예) [R] 내의 적혈구 수가 92개로 측정되었다면 4,600,000/mm^3

실험 2> 백혈구 수 측정

1) Türk's 용액의 제조

1% Gentian violet 1 ml + acetic acid 1ml + 증류수 100 ml

2) 희석 방법

① 일반적인 조작은 적혈구 계산 때와 같다.
→ 단지, 희석액과 희석 배수가 다르다.

② 백혈구용 melangeur는 팽대부가 작고 흰 유리알이 들어 있고 상단에 11이란 눈금이 있다.

③ 혈액을 1.0 눈금까지 빨고 Türk's 용액을 11 눈금까지 빤다.
→ 10배로 희석된 셈.

④ 적혈구는 희석액으로 용혈되어 현미경 시야에서는 보이지 않게 된다.

3) 계산 방법

혈액은 10배 희석됨(× 10)
계산판의 깊이는 0.1 mm (× 10)
[W]는 1 mm^2에 해당(× 1)
따라서 10 × 10 × 1 = 100
측정된 평균 [W] 내의 백혈구 수 × 100 = (백혈구 수)/mm^3

5. 실험 결과 및 고찰

1) 남성과 여성에서 평균 혈구 수를 측정하고 차이가 있으면 그 이유를 생각해 보자.

2) 혈구 수 측정 시 오차가 일어나는 경우는 무엇인지 생각해 보자.

3) 혈구 수 측정 방법이 이용될 수 있는 다른 실험 분야에 대하여 생각해 보자.

고찰이란?

실험을 통하여 결과를 얻었을 때, 실험 과정과 결과에 대해 생각하고 연구하는 것을 의미한다. 실험 결과가 좋던 나쁘던 관계없이 실험 과정에서 발생할 수 있는 오류에 대해 생각하여 기재하고, 실험 결과에 대해 전체적인 정리를 하고, 더 나아가 실험과정과 결과를 이용하여 더 깊이 연구할 수 있는 실험에 대해 생각하고, 어떤 분야에 응용할 수 있는지에 대해 생각해 보도록 하자.

6. 토론

혈액에 존재하는 세포들의 종류 및 기능에 대하여 토의하고 앞으로 더 해보고 싶은 혈액관련 실험들에 관하여 이야기 해 보자.

혈구 수가 증가 또는 감소하는 질병에는 어떤 것이 있는지 조사해 보고 그 원인에 관하여 토의해 본다.

7. 실험 후 느낀 점 및 배운 점