



团 体 标 准

T/CSCB 0017—2024

细胞活率测定 台盼蓝染色法

Determination of cell viability—Tropan blue staining



2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂或材料 1

6 仪器设备 2

7 样本制备 2

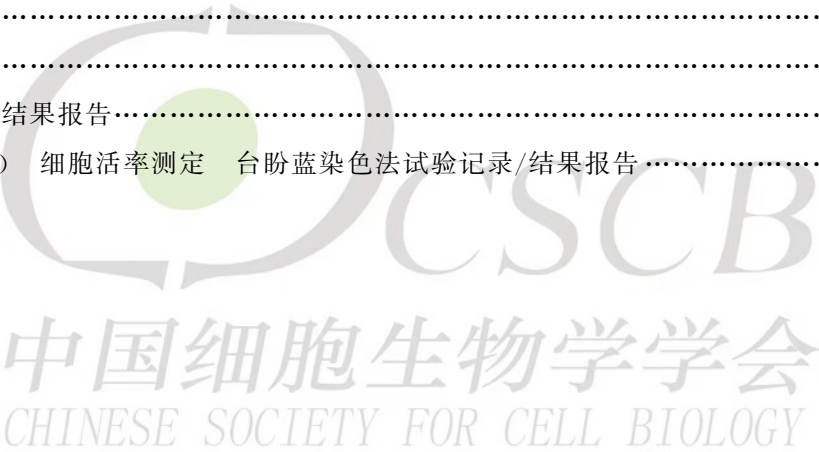
8 试验步骤 2

9 结果计算 3

10 方法确认 3

11 试验记录和结果报告 3

附录 A（资料性） 细胞活率测定 台盼蓝染色法试验记录/结果报告 4



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：中国计量科学研究院、中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、北京工商大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、上海睿钰生物科技有限公司。

本文件主要起草人：刘瑛颖、黄文锋、傅博强、王晶、王磊、曹佳妮、郝捷、赵同标、徐然然、马爱进、陈凯。



细胞活率测定 台盼蓝染色法

1 范围

本文件描述了台盼蓝染色测定细胞活率的方法,包括原理、试剂或材料、仪器设备、样本制备、试验步骤、结果计算、方法确认和结果报告。

本文件适用于来源于哺乳动物细胞系传代培养制成的单分散细胞悬浮液中的细胞活率测定。

本文件不适用于冻存复苏、原代组织解离的哺乳动物细胞。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞计数 cell counting

确定细胞数量的测量过程。

3.2

细胞活率 cell viability

细胞群体中活细胞数占总细胞数的百分比。

4 原理

台盼蓝是一种偶氮、亲水性酸性蓝色染料,可透过死亡细胞和濒死细胞的细胞膜,将其染成蓝色,而活细胞由于其细胞膜的完整性,可将台盼蓝排斥在外。基于此原理,通过颜色的差异即可将活细胞(活细胞呈透明无色)和死细胞(细胞呈蓝色)鉴别开来。通过计算同一测量区域的活细胞数量占总细胞数量的百分比,得到细胞活率。

5 试剂或材料

5.1 台盼蓝染料或台盼蓝染色液:

——台盼蓝染料:应为分析纯以上;

——台盼蓝染色液:0.2%~0.4%。

5.2 缓冲盐溶液:缓冲盐溶液不应造成待测细胞的破裂、形态严重改变或聚团,可使用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液。

5.3 容量瓶:体积 100 mL。

5.4 细胞过滤器:孔径 $40\ \mu\text{m}$ ~ $100\ \mu\text{m}$ 。

5.5 细胞计数板:

- 细胞计数板应清洁,无异物,无影响外观的痕迹、污渍和其他缺陷;
- 显微镜使用的细胞计数板应具有刻度计数方格,其计数方格体积允差 $\leq \pm 5\%$ 。

6 仪器设备

6.1 光学显微镜或细胞计数仪:

- 光学显微镜应具有明场视野,配置 10 倍或 20 倍物镜;
- 细胞计数仪应具有台盼蓝模式。

6.2 电子天平:分辨力最大为 1 mg。

6.3 离心机:转速 500 r/min~15 000 r/min。

6.4 涡旋振荡器:转速 0 r/min~3 000 r/min。

6.5 微量移液器:体积(0 μ L~20 μ L)/(0 μ L~200 μ L)/(0 μ L~1 000 μ L),经检定校准,满足试验需求。

7 样本制备

被测样本中的细胞应均匀分散成为单个个体,进行分析之前应进行单分散处理,获得单分散细胞悬液。宜使用孔径 40 μ m~100 μ m 的细胞过滤器过滤以保证满足要求。

样本采集制备后应立即进行染色和测量。

8 试验步骤

8.1 台盼蓝染色液配制

准确称取 0.2 g~0.4 g 台盼蓝染料,加入缓冲盐溶液 60 mL,充分溶解后再加入缓冲溶液定容至 100 mL,室温放置 1 d,10 000 r/min 离心 5 min~10 min 去除沉淀,取上清液待用。
也可使用市售的 0.2%~0.4% 的台盼蓝染色液。

8.2 样本稀释

显微镜测量:使用缓冲盐溶液将样本细胞稀释到 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL。

细胞计数仪测量:根据仪器厂商推荐的方法和浓度范围进行样本稀释。

8.3 样本染色

取稀释好的细胞悬液按照 1:1 比例与 0.2%~0.4% 台盼蓝染色液充分混匀,室温静置染色。建议染色时间为 2 min~10 min,或根据具体测量细胞类型进行调整优化。

8.4 样本测量

显微镜测量:完成染色的细胞样本充分混匀后,取经 8.3 处理的染色细胞 10 μ L~20 μ L 加入具有刻度计数方格的细胞计数板,静置 1 min 后于显微镜低倍物镜(10 倍或 20 倍)下进行细胞计数,分别计数计数方格内的蓝色细胞(即损伤细胞和死细胞)数量和透明无色细胞(活细胞)数量,建议单次测量的总细胞数量不少于 300 个。

细胞计数仪测量:完成染色的细胞样本充分混匀后,取经 8.3 处理的染色细胞 10 μ L~20 μ L 加入细胞计数仪配套的细胞计数板,静置 1 min 后将细胞计数板插入细胞计数仪中,选择台盼蓝模式并设定

稀释比例 1 : 1, 进行细胞计数和细胞活率测量。

为了提高细胞活率测量的准确性和重复性, 建议至少进行 3 次平行样本的测量。

9 结果计算

按照公式(1)计算细胞活率:

$$P = \frac{N_h}{N_s + N_h} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P —— 细胞活率;

N_h —— 透明的活细胞数量, 单位为个;

N_s —— 蓝色的死细胞数量, 单位为个。

10 方法确认

将方法首次应用于某种细胞样本前, 应对具体测量方法进行方法性能确认。方法性能参数包括准确度、重复性精密度、方法稳健性和再现性精密度(如操作者间、仪器间和日间变化)等。

应建立评估方法性能参数的方案 and 标准, 制定并保存相应的文件。

11 试验记录和结果报告

记录试验条件、测量结果和计算结果记录。试验记录与结果报告提供的信息应至少包括:

- a) 样本信息;
- b) 使用仪器信息;
- c) 试剂名称、品牌、批号;
- d) 测量结果;
- e) 数据分析程序;
- f) 备注。

记录模板可参考附录 A。

附 录 A
(资料性)

细胞活率测定 台盼蓝染色法试验记录/结果报告

试验日期：_____年_____月_____日 试验依据：_____

样本信息				
名称	批号	规格	用量	
试剂				
名称	批号	有效期至	品牌	
台盼蓝染色液				
缓冲盐溶液				
仪器设备				
名称	型号	出厂编号	品牌	
显微镜				
细胞计数仪				
测定步骤				
1. 样本制备:取待测细胞,轻轻混匀,吸取细胞悬液____μL,加至含有____μL 缓冲盐溶液中,稀释____倍,轻轻吹打混匀。按此法平行制备 3 管。				
2. 染色:取混匀后的待测样本溶液____μL,分别与等体积的台盼蓝染色液混合均匀后,各吸取____μL 加至细胞计数板孔中,共 3 孔。				
3. 检测及计算:将细胞计数板放入显微镜或细胞计数仪(台盼蓝模式,设定稀释比例 1 : 1),读取并记录活/死细胞数量和细胞活率,计算 3 孔测定结果的平均值、RSD 值。				
4. 原始数据保存路径。				
结果				
测定次数	1	2	3	平均值
活细胞数量				
死细胞数量				
细胞活率/%				
细胞活率 RSD<10%	☐ 是 ☐ 否			
结论:_____				
备注:_____				
检验人/日期_____		复核人/日期_____		