

Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)

Cat.No	产品名称	规格	储存条件	保质期
IMC-906-5 mL	Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)	500T	-20 °C	24 个月
IMC-906-25 mL	Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)	500T*5	-20 °C	24 个月

产品简介

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 (或 CCK8) 试剂盒, 是一种基于 WST-8 (化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐) 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测试剂盒。其检测原理在于, 在电子耦合试剂存在的情况下, 检测试剂中的 WST-8 化合物被活细胞内脱氢酶还原成具有水溶性的橙黄色甲臞化合物, 该物质在 450 nm 处有最大吸收峰。甲臞量与活细胞数成正比, 即细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品, 和 MTT 或其它 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先, MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶解液来溶解; 而 WST-8 和 XTT、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。其次, WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。再次, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更加稳定。另外, WST-8 和 MTT、XTT 等相比线性范围更宽, 灵敏度更高。WST-8 和 WST-1 相比, 检测灵敏度更高, 更易溶解, 并且更加稳定。

本试剂盒中 WST-8 对细胞无明显毒性, 可以用于外源细胞因子等诱导的细胞增殖检测, 以及药物等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测, 或一些药物诱导的细胞生长抑制检测, 是 MTT 检测方法的升级版。

本试剂盒使用便捷, 无需配制或稀释, 无需收集或洗涤细胞, 无需对甲臞化合物进行再次溶解, 对贴壁细胞及悬浮细胞均适用。且酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响。

使用说明

1. 制作标准曲线 (测定细胞具体数量)

(1) 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量, 然后接种细胞到培养板内。

(2) 按比例 (例如: 1/2 比例) 依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度, 一般要做 3-5 个细胞浓度梯度, 每个浓度建议 3-6 个复孔。

(3) 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后加 CCK-8 试剂培养一定时间后测定 OD 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标 (X 轴), OD 值为纵坐标 (Y 轴) 的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量 (使用此标准曲线的前提是实验的条件要一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间。)

2. 细胞活性检测

(1) 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔)。将培养板放在培养箱中预培养一段时间 (37°C, 5% CO₂)。

(2) 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。

(3) 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。

(4) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

(5) 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 小时内测定, 吸光度不会发生变化。

3. 细胞增殖-毒性检测

(1) 在 96 孔板中配制 100 μ L 的细胞悬液。将培养板放在培养箱预培养 24 小时 (37°C, 5% CO₂)。

(2) 向培养板加入 10 μ L 不同浓度的待测物质。

(3) 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 小时)。

(4) 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液 (注意不要再孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。

(5) 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。

(6) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

(7) 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 小时内测定, 吸光度不会发生变化。

注意: 如果待测物质有氧化性或还原性的话, 可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基 (除去培养基, 并用培养基洗涤细胞两次, 然后加入新的培养基), 去掉药物影响。当然药物影响比较小的情况下, 可以不更换培养基, 直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。

4. 活力计算:

细胞活力 (%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100$

A（加药）：具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：具有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

注意事项

1. 本试剂盒检测原理是依赖于脱氢酶催化的反应，样品中如有较多还原剂(例如一些抗氧化剂)会干扰检测，需设法去除。
2. 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 试剂后的培养时间。
3. 白细胞可能需要培养较长时间。
4. 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100 μ L 培养基)。检测白细胞时的灵敏度相对较低，因此推荐接种量不低于 2,500 个/孔 (100 μ L 培养基)。如果要使用 24 孔板或 6 孔板实验，请先计算每孔相应的接种量，并按照每孔培养基总体积的 10% 加入 CCK-8 溶液。
5. 如果没有 450 nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450 nm 检测灵敏度最高。
6. 培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去，因此不会对检测造成影响。
7. 由于使用 96 孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，一定要注意蒸发问题。一方面，由于 96 孔板周围一圈 最容易蒸发，可以采取弃用周围一圈的办法，改加相同量的 PBS、水或培养液；另一方面，可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。
8. 加检测试剂时避免产生气泡，否则会干扰检测结果。
9. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
10. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。