

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

货号: Cat.No.C6005 Size: 5 ml (500T) ; Cat.No.C6030 Size: 5 ml X 6 (3000T)

产品介绍

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒, 是 MTT, XTT 等的替代方法, 一种基于 WST-8 (水溶性四唑盐, 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。CCK-8 溶液可以直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 Formazan。对于同样的细胞, 颜色的深浅(生成的 Formazan 量)和细胞数目呈线性关系。可用于药物筛选、细胞增殖和毒性测定、肿瘤药敏等试验。

操作步骤

一. 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;
2. 按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 4-7 个细胞浓度梯度, 每组 3-6 个复孔;
3. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后加入 CCK-8 试剂 (按每 100 μ L 培养基加 10 μ L CCK-8) 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, OD 值为纵坐标的标准曲线。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条件是试验条件完全一致)

二. 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;
2. 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡, 它们会影响 OD 值的读数);
3. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
4. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

三. 细胞增殖-毒性检测

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 24 小时;
2. 向培养板加入不同浓度的待测药物;
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
4. 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
5. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
6. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

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。

四. 活力计算

$$\text{细胞存活率} * (\%) = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

$$\text{抑制率} * (\%) = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

As: 实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);

Ac: 对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物);

Ab: 空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)。

保存条件

4℃避光保存，有效期 12 个月；-20℃避光保存，有效期 24 个月

实验应用

1. 细胞增殖测定：CCK-8 是水溶性的，在培养基中稳定且无毒。
2. 细胞活性分析，包括细胞毒性：代谢活性以及染料的形式与细胞的活性和损伤成比例。
3. 细胞因子分析：测定细胞因子诱导的增殖，必要时，可在试验结束时回收和扩增细胞

注意事项

1. CCK-8 的培养时间一般为 1-4 小时，但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度，根据细胞种类而定，需要摸索条件，CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。
2. 使用 96 孔板进行检测时，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。
3. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应，所以还原剂（例如一些抗氧化剂）会干扰检测，如果待检测体系中存在较多的还原剂，需设法去除。用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡，否则会干扰测定。
4. 加入药物中如含有金属，对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%, 15%, 90% 的显色反应，使灵敏度降低。如果终浓度是 10mM 的话，将会 100% 抑制。
5. 培养基中的酚红不会影响实验结果，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。
6. 本产品可以检测革兰氏阴性细菌，但不能检测革兰氏阳性细菌和酵母细胞。向 100 μL 培养液中加入 10 μL CCK-8 溶液，并培养 1-4 小时或过夜。
7. CCK-8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深，OD 值不断增加（注：活细胞内的脱氢酶是持续产生的）。
8. 要测定细胞的具体数量，建议同时做标准曲线。
9. 建议采用多通道移液器，以减小平行孔间的差异。
10. 以下方法可以终止 CCK-8 反应(96 孔板)：(a). 在显色反应后，将培养板放置 4° C 冰箱内。(b). 每孔加 10 μL 0.1M HCl 溶液。(c). 每孔加 10 μL 1% (w/v) 的 SDS（十二烷基硫酸钠）溶液。注意：反应停止后，应在 24 小时内测定。
11. 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。
12. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。