

Cell Counting Kit (CCK-8) CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒

产品信息:

产品名称: Cell Counting Kit (CCK-8) CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒

规格:

目录号	产品名称	规格
X11934	Cell Counting Kit (CCK-8) CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒	5ml (500T)
X11935	Cell Counting Kit (CCK-8) CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒	50ml (5×1000T)

产品说明:

保存	4°C保存, 有效期 2 年
运输	冰袋运输

检测原理

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 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。

WST-8 属于 MTT 的升级产品, 工作原理为: 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物 (formazan)。颜色的深浅与细胞的增殖成正比, 与细胞毒性成反比。使用酶标仪在 450nm 波长处测定 OD 值, 间接反映活细胞数量。

CCK-8 法应用非常广泛, 如药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测等。

CCK-8 方法的优势

1) 表 1 CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲臞产物的水溶性	差 (需加有机溶剂溶解后再检测)	好	好	好
产品性状	粉末	2 瓶溶液	溶液	1 瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	高	很高	很高	高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600 nm	420-480 nm	420-480 nm	430-490 nm
细胞毒性	高, 细胞形态完全消失	很低, 细胞形态不变	很低, 细胞形态不变	很低, 细胞形态不变
试剂稳定性	一般	较差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般	便捷	便捷	非常便捷

- 2) 酚红和血清对 CCK-8 法的检测不会造成干扰;
- 3) 细胞毒性非常低, 因此加入 WST-8 显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读数从而找到最佳测定时间。

CCK-8 试剂盒操作说明:

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。)

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 (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。

三. 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。

活力计算

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

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

*细胞活力: 细胞增殖活力或细胞毒性活力

注意事项:

- 1) 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。
- 2) 有条件的情况下建议采用多通道移液器,可以减少平行孔间的差异。加入 CCK-8 试剂时,建议斜贴着培养板壁加,不要插到培养基液面下加,容易产生气泡,会干扰 OD 值读数。
- 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 滤光片的检测灵敏度最高。
- 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。

本产品仅供科研使用,不可用于临床诊断应用或其他用途。