

Cell Counting Kit (CCK-8)试剂盒

原理介绍:

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-(2,4-二硝基苯)-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。

试剂盒规格: 500T

试剂盒货号: KE1090

储存温度: 4°C干燥避光保存,有效期一年(推荐)。长期建议-20°C干燥避光保存,有效期二年。

试剂盒组成:

名称	货号	规格(500T)	保存条件
Cell Counting Kit (CCK-8)	KE1090	即用型, 5ml	4°C干燥避光 长期-20°C干燥避光

CCK-8 方法的优势:

- 1) CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法相比操作简便,结果更加稳定可靠;
- 2) 酚红和血清对 CCK 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1-4h 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)

【注】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。

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、向培养板中加入 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】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

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) 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。
- 5) 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。
- 6) 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

实验示例:

96 孔板分别铺 25,000 12500 6250 3125 1550 0 个细胞,每个点两个复孔,加入本 CCK8 试剂,每孔 10 ul。置于细胞培养箱 1h 后 450nm 波长检测吸光度。

