

Yuanye Cell Counting Kit-8

细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8),增强型

产品编号: R22305 规格: 100T/ 500T/ 10000T/ 2000T

产品内容

产品组成	R22305-1 100T	R22305-2 500T	R22305-3 10000T	R22305-4 2000T
CCK-8 增强型溶液	1 ml	5 ml	10 ml×10	5 ml×4
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

产品简介

Cell Counting Kit-8 (简称CCK-8), 是一种基于WST-8而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。

CCK-8试剂中含有WST-8 (化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐) 是一种类似于MTT的化合物, 它在电子耦合试剂1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯(1-Methoxy PMS)存在条件下, 可以被线粒体内的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲瓖产物Formazan (参考图1), 生成的Formazan数量与活细胞的数量成正比。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析, 细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。

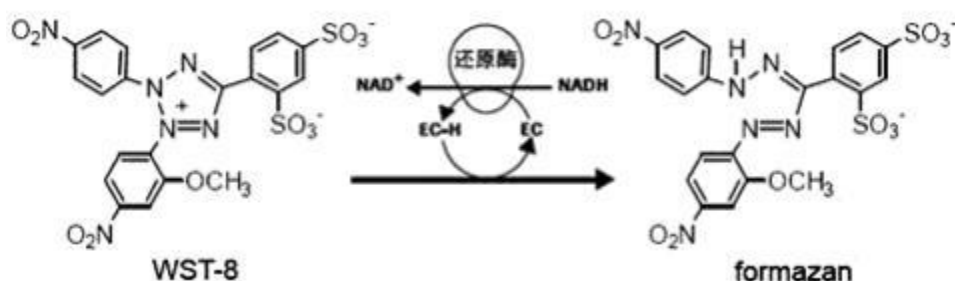


图1. CCK-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

CCK-8与以往的增殖/毒性测定试剂相比，具有明显优点(参考表1)。源叶CCK-8试剂盒具有灵敏度高、反应时间短、线性范围宽、数据可靠、重现性好等特点，可以广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验。

表 1. 增殖/毒性测定试剂的比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲瓚产物的水溶性	差(需加有机溶剂溶解)	好	好	好
检测灵敏度	高	很高	很高	最高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高, 细胞形态完全消失	很低, 细胞形态丌变	很低, 细胞形态丌变	很低, 细胞形态丌变
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

操作步骤

制作标准曲线(测定细胞具体数量时)

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到 96 孔板中：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，每组 3-6 个重复孔。每孔 100 μ l 细胞悬液。
3. 37℃培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。

4. 每孔加入 10 μ l CCK-8 增强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。

5. 培养箱内孵育一定时间后测定 450nm 吸光度，制作出一条以细胞数量为横坐标(X 轴)，吸光度为纵坐标(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。)

细胞活性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到 96 孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔 100 μ l 细胞悬液，可设置 3 个重复孔。
3. 37℃ 培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 24h 小时，如果不需要贴壁，这一步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。
4. 每孔加入 10 μ l CCK-8 增强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。
5. 培养箱内孵育 0.5-4 小时：细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不同，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间(5-6 小时)。
6. 测定 450nm 吸光度：如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入 10 μ l CCK-8 反应终止液(源叶货号：MA0225)，遮盖培养板避光保存在 2-8℃，在 7 天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入 10 μ l 自己配制的 0.1M HCl 溶液或 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在 24 小时内吸光度不会发生变化。

细胞增殖-毒性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。

2. 接种到 96 孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔 100 μ l 细胞悬液，可设置 3 个重复孔。
3. 37℃培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 24h 小时，如果不需要贴壁，这一步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。
4. 每孔加入 0-10 μ l 不同浓度的待测药物。
5. 37℃培养箱中培养：加入待测药物的培养时间，要看该物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的时间。
6. 每孔加入 10 μ l CCK-8 增强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。（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，以去掉药物影响。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。）
7. 培养箱内培养 0.5-4 小时：细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不同，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间(5-6 小时)。
8. 测定 450nm 吸光度：建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm，参比波长 600-650nm。如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入 10 μ l CCK-8 反应终止液(源叶货号：MA0225)，遮盖培养板避光保存在 2-8℃，在 7 天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入 10 μ l 自己配制的 0.1M HCl 溶液或 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在 24 小时内吸光度不会发生变化。

计算公式

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

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

As：实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物) 的吸光度

Ac：对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物) 的吸光度

Ab：空白孔(不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8) 的吸光度

保存条件

4℃避光保存，一年有效。-20℃可以储藏更久，但反复冻融会增加背景值，干扰实验测定，因此请将经常使用的试剂保存在4℃。

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. CCK-8 反应时间的确定：一般情况下，白细胞显色比较困难，因此需要增加细胞数量和延长 CCK-8 反应时间。悬浮细胞不贴壁细胞相比较难显色，因此悬浮细胞在加入 CCK-8 培养 0.5-4 小时后，可先从培养箱支出，目测或用酶标仪测定显色程度，若显色困难可以继续培养数小时后再确定。对于贴壁细胞，CCK-8 的培养时间一般为 0.5-4 小时，在培养 20 分钟左右即可支出肉眼观察显色程度。
3. 每孔接种细胞数：当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1000 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 2500 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。
4. 设定空白对照：在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度即为空白对照。在做加药实验(细胞毒性实验)时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。
5. 影响 CCK-8 测定的物质：由于 CCK-8 检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应，所以如果待测体系中存在氧化还原物质则可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此应设法去除这些物质的影响。酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响，培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除只含有培养基的对照孔中本底吸光度而消除，因此不会对检测结果造成影响。
6. 测定波长：如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议采用双波长进行测定，检测波长 450nm，参比波长 600-650nm。如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490nm 之间的滤光片，但是 450nm 检测灵敏度最高。

7. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
8. 如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加 CCK-8 检测。
9. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。