

CCK-8 Cell Counting Kit {CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒}

货号: RM02823

规格: 100 T / 500 T / 2×500 T

◆ 产品简介

本产品 Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 或 CCK8。CCK-8 试剂盒是一种基于 WST-8 广泛应用于细胞活性和细胞毒性检测的快速、高灵敏度试剂盒。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 (甲臜)。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值, 可间接反映活细胞数量。

◆ 保存条件

4 °C 保存 2 年, -20 °C 保存 3 年有效。

◆ 使用方法

1. 所需设备和材料

酶标仪 (450 nm 滤光片)、96 孔板、10 μL、100-200 μL 多通道移液器, 细胞 CO₂ 培养箱。

2. 绘制标准曲线

(a) 使用细胞计数板统计细胞悬液中的细胞数;

(b) 使用培养基, 等比稀释细胞悬液, 通常需要 5-7 个浓度梯度, 每组几个复孔。然后接种细胞 (注意每孔的细胞数量, 如果您将细胞悬液稀释在管中, 在加入培养板的孔之前, 请小心再次混匀细胞, 每孔中细胞悬液的体积需一致);

(c) 培养细胞至细胞贴壁 (通常 2-4 小时), 然后每 100 μL 培养基加入 10 μL CCK-8。继续孵育 1-4 小时, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。制作出一条以细胞数为 X 轴坐标, O.D. 值为 Y 轴坐标的标准曲线。

***可以基于该曲线确定待测样品的细胞数。使用此标准曲线的先决条件是培养检测条件相同。**

3. 细胞活性检测

(a) 将细胞悬液 (100 μL/孔) 接种在 96 孔板中。在潮湿的培养箱中预培养一定时间 (例如 37°C, 5%CO₂)。

(b) 向板的每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液。注意不要向孔中引入气泡, 否则会干扰 OD 值检测。

(c) 将培养板放在培养箱中孵育 1-4 小时。

(d) 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

***如非立刻测量吸光度, 可在每个孔中加入 10 μL 1%w/v SDS 或 0.1M HCl, 盖好并在室温下保存。24 小时内不会观察到吸光度变化。**

4. 细胞增殖/毒性检测

(a) 在 96 孔板中每孔接种 100 μL 细胞悬 (约 5000 个细胞/孔)。将板在潮湿的培养箱中预培养 24 小时 (例如 37°C, 5%CO₂)。

(b) 向孔中加入 10 μL 不同浓度的待测物质。

(c) 将培养板在培养箱中孵育适当的时间长度 (例如 6, 12, 24 或 48 小时)。

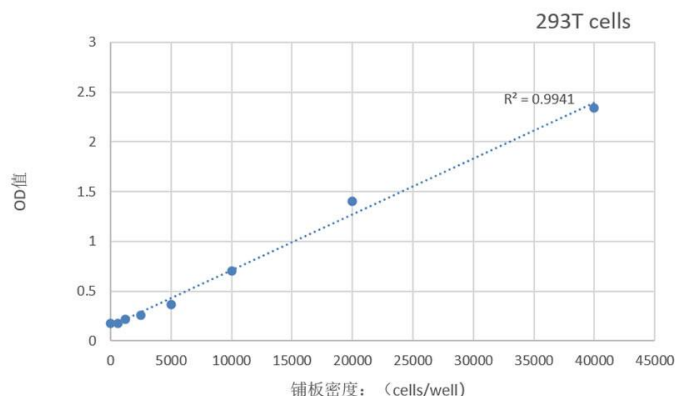
(d) 向培养板的每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液。注意不要向孔中引入气泡, 否则会干扰 OD 值检测。

(e) 将培养板在培养箱中孵育 1-4 小时。

(f) 在读取平板之前, 可以在摇床上轻柔的混匀, 然后使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

***如非立刻测量吸光度, 可在每个孔中加入 10 μ L 1%w/v SDS 或 0.1M HCl, 盖好并在室温下保存。24 小时内不会观察到吸光度变化。**

5. 计算公式



统计分析有几种方法, 您可以选择使用 O.D.值或细胞数量, 我们提供其中一种方法。

细胞存活率(%)=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]x100; 抑制率(%)=[(Ac-As)/(Ac-Ab)]x100;

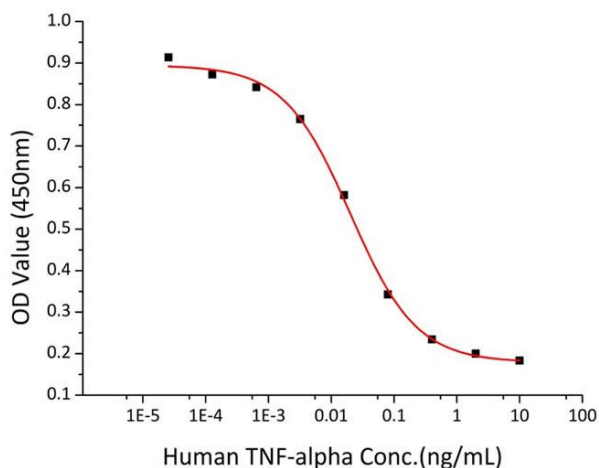
As=实验孔吸光度 (含有细胞, 培养基, CCK-8 和待测化合物的孔的吸光度);

Ab=空白孔吸光度 (含有培养基和 CCK-8 的孔的吸光度);

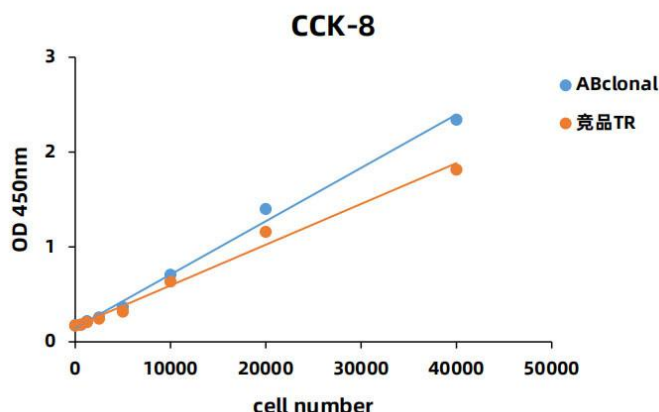
Ac=对照孔吸光度 (含有细胞, 培养基和 CCK-8 的孔的吸光度);

(a)293T 细胞, 96 孔板铺置不同密度的细胞, 12 小时后, 使用 CCK-8Kit 产品进行测试, 酶标仪读取 OD 值, 计算出 R^2 值。EC₅₀ 为 20pg/mL, R2=0.997。

(b)L929 细胞, 96 孔板铺置不同密度的细胞, 12 小时后, 加入 TNFa 试剂和放线菌素 D 处理细胞, 24 小时后, 使用 CCK-8Kit 产品进行测试, 酶标仪读取 OD 值, 计算出 EC₅₀ 值和 R^2 值。



293T 细胞, 96 孔板铺置不同密度的细胞, 12 小时后, 分别使用不同品牌 CCK-8Kit 进行测试, ABclonalCCK8 试剂盒灵敏度优于竞品 TR。



◆ 注意事项

1. 试剂盒反复冻融会导致背景增加, 干扰检测结果。如需频繁使用, 请将试剂盒储存在 0-5°C。
2. 第一次做实验时, 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入试剂后的培养时间。
3. 对于贴壁细胞, 每孔至少需要 1000 个细胞 (100 μ L 培养基)。对于白细胞, 由于灵敏度较低, 每孔至少需要 2500 个细胞 (100 μ L 培养基)。推荐的 96 孔板每孔最大细胞数为 25000。如果使用 24 孔或 6 孔板进行该检测, 请计算相应的每孔的细胞数, 并调整 CCK-8 的体积, 使其为每孔总液体体积的 10%。
4. 由于 CCK-8 测定依赖于活细胞中的脱氢酶活性, 影响脱氢酶活性的条件或化学物质可能导致实际活细胞数与测定活细胞数之间存在差异。
5. WST-8 可能与还原剂反应生成 WST-8 formazan。如果使用还原剂 (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。
6. 孵育 2 小时后, 背景 OD 值一般为 0.1-0.2 单位。
7. 条件许可的情况下采用多通道移液器减少平行孔间的差异, 建议斜贴着培养板壁加 CCK-8, 不要插到培养基液面下加液, 容易产生气泡, 会干扰 OD 值。
8. 孵育时间因孔中细胞的类型和数量而异。通常白细胞着色较弱, 因此可能需要较长的孵育时间 (长达 4 小时) 或大量细胞 ($\sim 10^5$ 细胞/孔)。
9. 如果细胞悬液中存在高浊度, 测量并减去样品在 600 nm 或更高波长的 OD 值。
10. 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。
11. CCK-8 的毒性非常低, 在 CCK-8 测定完成后, 相同的细胞可用于其他细胞增殖测定, 例如结晶紫测定, 中性红测定或 DNA 荧光测定 (除非细胞极为稀少, 不推荐)。
12. 该试剂盒可用于大肠杆菌, 但不能用于酵母细胞。
13. 接种细胞和添加 CCK-8 均要混匀, 防止加量不一致。
14. 为防止培养液挥发, 将细胞接种在靠近培养板中央的孔中, 最外围一圈孔中只加培养基。
15. 450 nm 滤光片具有最佳灵敏度, 如果您没有 450 nm 滤光片, 也可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片。
16. 测量 450 nm 处的吸光度, 如果您需要进行双波长测定, 作为参考波长可以测定 650 nm 处的吸光度。
17. 药物中金属离子的存在可能会影响 CCK-8 的灵敏度。终浓度为 1 mM 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 10 mM 的话, 将会 100% 抑制。