



Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒) 说明书

一、产品描述

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 试剂盒, 是一种基于水溶性四唑 (WST-8) 类似于 MTT 的化合物。WST-8 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。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下, 被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臞 (Formazan) 染料直接溶解在培养基中。细胞增殖越多越快, 则培养基的颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。因此, CCK-8 试剂盒可以直接进行细胞增殖和毒性分析。试剂盒使用方便, 包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的 CCK-8 溶液, 即开即用, 无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞, 可直接使用 96 孔板或者 384 孔板在酶标仪上检测, 适合大规模高通量的样品检测。

二、保存条件

CCK-8 溶液在避光, 0-5°C 的条件下可以保存 1 年; -20°C 下保存 2 年; 如需经常使用请将试剂存放在 0-5°C, 为防止背景值增加干扰实验结果, 请勿反复冻融。

三、使用方法

(一) 通用操作步骤

1. 在 96 孔板每孔加入 100 μ l 细胞悬液;
2. 在培养箱中预培养细胞;
3. 向培养板中加入药物 (如果不加药物, 直接进行第五步操作);
4. 在培养箱中培养一段时间;
5. 向每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液;
6. 将培养板在培养箱内孵育 1~4 h (根据具体实验优化);
7. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

(二) 制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

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 (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。
3. 接种后培养 2-4 h 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 (用此标准曲线的前提条件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)。

(三) 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 (37°C、5% CO₂)。
2. 向每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 否则会影响 OD 值读数)。
3. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 h, 然后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。
4. 如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 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, 并使培养板室温避光保存。在 24 h 内吸光度不会发生变化。

(四) 细胞增殖-毒性检测

使用方法 (以 96 孔板为例, 其他规格培养板按实际情况安排):

1. 在 96 孔板中配置 100 μ l 的细胞悬液 (通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ l 2000 个细胞, 细胞毒性实验每孔加入 100 μ l 5000 个细胞。具体每孔所用的细胞的数目, 需根据细胞的大小, 细胞增殖

速度的快慢等因素决定)。按照实验需要,进行预培养 24 h (37°C、5% CO₂)。

2. 向培养板加入 1-10 μl 不同浓度的待测药物刺激。

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 h)。

4. 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液。如果起始的培养体积为 200 μl,则需加入 20 μl CCK-8 溶液,其他情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作空白对照。如果担心所使用的药物会干扰检测,需设置加了相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。

5. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 h,通常孵育 1 h 就可以用酶标仪检测。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等实验情况而定,初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 h 分别用酶标仪检测,然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。

6. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,如无 450 nm 滤光片,可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600 nm 的波长,例如 650 nm,作为参考波长进行双波长测定。

7. 如果暂时不测定 OD 值,打算以后测定的话,可以向每孔中加入 10 μl 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液,并使培养板室温避光保存。在 24 h 内吸光度不会发生变化。

8. 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 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A(空白): 具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A(0 加药): 具有细胞、CCK 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

五、细胞增殖分析

方法: 制备细胞悬液 → 接种到 96 孔培养板 → 37°C 培养箱中培养(注 1) → 加入 10 μl 的 CCK-8(注 2) → 培养 1-4 h(注 3、注 4) → 测定 450 nm 吸光度(注 5)

注 1: 细胞接种后,贴壁需要培养 2-4 h,不需要贴壁的话,可以省去这个步骤。

注 2: 由于每孔加入 CCK-8 量比较少,有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差,建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。

注 3: 细胞的种类不一样,形成的 Formazan 的量也不一样。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 h)。

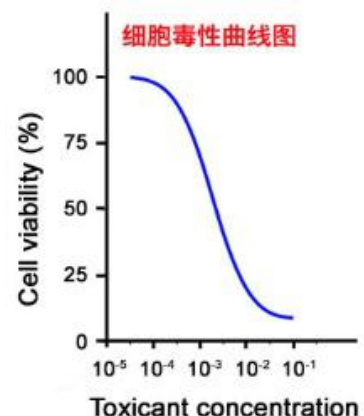
注 4: 如果颜色不均匀的话,可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。

注 5: 建议采用双波长进行测定,检测波长 450-490 nm,参比波长 600-650 nm。

六、细胞毒性分析

方法: 制备细胞悬液 → 接种到 96 孔培养板 → 37°C 培养箱中培养(注 1) → 加入不同浓度的毒性物质 → 加入 10 μl 的 CCK-8(注 2) → 培养 1-4 h(注 3、注 4) → 测定 450 nm 吸光度(注 5)。注 1-5 同上描述。

细胞毒性曲线图





南京善本生物技术有限公司

Nanjing Sciben Biotech Co., Ltd.

IC50 的计算方法: 按照以下公式计算细胞存活率, 绘制成图表, 细胞存活率 50% 的值即为 IC50。
细胞存活率 (%) = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$

A_s: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质)

七、注意事项

1. 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。任何待测体系中存在还原剂, 例如一些抗氧化剂会干扰检测, 需设法去除。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, 去掉药物的影响。当然药物影响比较小的情况可以不更换培养基, 直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。

2. 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。

3. 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, 不要查到培养基液面下加样, 溶液产生气泡, 会干扰 OD 值读数。

4. 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 μl 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 μl 培养基), 且培养时间长一些。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 试剂。

5. 加入 CCK-8 试剂时, 如果细胞培养时间较长, 培养基颜色已变化或 pH 值变化。建议换用新鲜的培养基。

6. 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。

7. 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, 通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去, 因此不会对检测造成影响。

9. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

南京善本生物科技有限公司

网址: <http://www.sciben.com>

电话: 025-85390309; 25-85300038

产品订购: sales@sciben.com

技术支持: support@sciben.com

产品编号: MR1003

生产批号:



善本生物网站



微信公众号