

Cell Counting Kit-8 (500 次)

产品信息

货号 ABK0011C-5 mL

规格 5 mL

储存条件 4°C

产品简介

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 试剂盒或 CCK8 试剂盒, 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。WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物, 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 (参考图 1)。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。脱氢酶产生的 formazan 的量与活细胞的数量呈直接的线性关系。

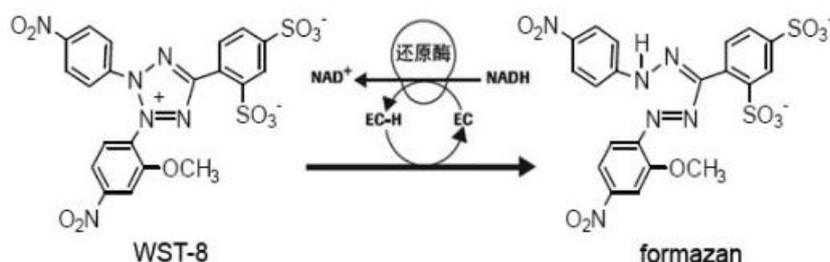


图1. WST-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

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

CCK-8 的检测灵敏度高于其他四唑盐, 可以用于细胞因子等诱导的细胞增殖检测, 也可以用于抗癌药物等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测, 或一些药物诱导的细胞生长抑制检测。CCK-8 试剂操作简单便捷, 在检测过程中无需洗涤细胞、收集细胞, 也无需用到有机溶剂来溶解 formazan, 对于细胞无明显毒性。

细胞活性检测



1. 将细胞悬液均匀铺板于 96 孔板中（100 μ l /孔），于培养箱中培养一段时间，待细胞稳定，即可进行实验。
2. 向 96 孔板的每个孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液。在这个过程中尽量不要引入气泡，减少气泡带来的 OD 值干扰；
3. 将加样后的 96 孔培养板放在培养箱中孵育 1-4 小时。
4. 孵育结束后，用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

细胞增殖/毒性检测

1. 将细胞悬液均匀铺板于 96 孔板中（100 μ l /孔，约 5000 个细胞/孔），于培养箱中培养 24 小时待用。
2. 向孔中加入 10 μ l 不同浓度的待测物质。
3. 将加样后的 96 孔培养板放在培养箱中孵育适当的时间长度（例如，6, 12, 24 或 48 小时）。
4. 加完样的孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液。在这个过程中尽量不要引入气泡，减少气泡带来的 OD 值干扰；
5. 将培养板在培养箱中孵育 1-4 小时。
6. 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度（在读取平板之前，可以在摇床上温柔的混匀）。

数据分析

不同的指标统计，数据分析不同，以下是推荐的一种方法。

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

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

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）

制作标准曲线

1. 细胞计数板计数细胞悬液中的细胞数
2. 使用培养基，等比稀释细胞悬液为一个浓度梯度，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应该是一致的。）
3. 培养直至细胞贴壁（通常 2-4 小时），然后每 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8。继续孵育



1-4 小时，用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。制作出一条以细胞数为 X 轴坐标，OD 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。

注意事项

1. 确保药物和 CCK-8 均匀分布在培养基中。
2. 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%。
3. CCK-8 测定是基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使用 CCK-8 测定活细胞数之间有差异。
4. 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。
5. 孵育 2 小时后，背景 OD 值一般为 0.1-0.2 单位。
6. 注意不要在孔中引入气泡，因为它们会干扰 OD 值。
7. 如果您想对 CCK-8 溶液进行灭菌，请使用 0.2 μ m 的膜过滤溶液。
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 600nm 或更高波长的 OD 值。
10. 该试剂盒可用于大肠杆菌，但不能用于酵母细胞。
11. 将细胞接种最外围一圈孔中的培养基容易蒸发，可以用 PBS，水或培养基填充周围这些孔。
12. 如果您没有 450 nm 滤光片。您也可以使用吸光度在 430 和 490 nm 之间的滤光片，450 nm 滤光片具有最佳灵敏度。
13. 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。
14. 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。