

SmartBuffers® Cell Counting Kit (CCK-8)

CCK-8 检测试剂盒

SmartBuffers® Cell Counting Kit (CCK-8) 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-(2,4-二磺基苯)-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。

CCK-8 溶液可以直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分, 酚红和血清对检测不会造成干扰。WST-8 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。

WST-8 对细胞无明显毒性。加入 CCK-8 溶液显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 检测时间更加灵活, 便于确定最佳测定时间。

本试剂盒尤其适用于药物筛选、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, 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。

产品特点:

- 比 MTT, MTS 或 WST-1 更敏感, 数据可靠, 重复性好
- 无需放射性同位素和有机溶剂, 对细胞毒性低
- 即开即用, 操作更简单, 无需有机溶剂, 省时省力
- 稳定性高, 2-8°C 避光保存有效期长达 3 年

Order Information 订货信息:

Art.No.	Product Name	Product Description	Pack.
目录编码	产品名称	产品描述	产品包装
CCK-0001	CCK-8 检测试剂盒	100T	1mL/管
CCK-0005	CCK-8 检测试剂盒	500T	5mL/瓶
CCK-0100	CCK-8 检测试剂盒	10,000T	100mL/瓶

存储条件:

-20°C 干燥避光冻存, 有效期长达五年。

2-8°C 干燥避光保存, 有效期至少三年。

反复冻融会导致背景增加, 干扰您的检测。如果频繁使用, 请将试剂盒存放在 2-8°C。

操作步骤:

1. 制作标准曲线

- 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;
- 按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 5-7 个细胞浓度梯度, 每组 4-6 个复孔;
- 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后每 100 μ L 培养基加 10 μ L 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, OD 值为纵坐标的标准曲线。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条件是试验条件完全一致。

2. 细胞活性检测

- 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 24 小时;
- 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);

- 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

3. 细胞增殖-毒性检测

- 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 24 小时;
- 向培养板加入不同浓度的待测药物;
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
- 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
- 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

4. 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: 实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);

Ac: 对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物);

Ab: 空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)。

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孔吸收入即可。

注意事项及重要提醒:

- CCK-8 的培养时间一般为 1-4 小时, 但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度, 根据细胞种类而定, 需要摸索条件, CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。
注意: 白细胞可能需要培养较长时间。
- 使用 96 孔板进行检测时, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发问题。一方面, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用周围一圈的办法, 改加相同量的 PBS、水或培养液; 另一方面, 可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方, 以缓解蒸发。
- 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原剂 (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。用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡, 否则会干扰测定。
- 加入药物中如含有金属, 对 CCK-8 显色有影响。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。
- 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。
- 本产品可以检测 E.coli, 但不能检测酵母细胞。向 100 μ L E.coli 培养液 中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 并培养 1-4 小时或过夜。
- CCK-8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深, OD 值不断增加 (注: 活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。
- 要测定细胞的具体数量, 建议同时做标准曲线。
- 建议采用多通道移液器, 以减小平行孔间的差异。
- 以下方法可以终止 CCK-8 反应 (96 孔板):
 - 在显色反应后, 将培养板放置 4°C 冰箱内。
 - 每孔加 10 μ L 0.1 M HCl 溶液。
 - 每孔加 10 μ L 1% (w/v) 的 SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液。注意: 反应停止后, 应在 24 小时内测定。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题解答 (FAQs)

1) Q: 每个孔需要接种的细胞数量是多少?

A: 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%。

2) Q: CCK-8 对细胞的毒性大小如何?

A: 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, 不推荐把 CCK-8 测定过的细胞用于其它实验。)

3) Q: 怎么设置空白对照?

A: 在不含有细胞的培养基中加入 CCK-8, 酶标仪检测 450 nm 的吸光度; 若做药物刺激实验, 可在不含细胞、含药物的培养基中加入 CCK-8。酶标仪检测 450 nm 的吸光度作为空白对照。

4) Q: CCK-8 能否用于细胞染色?

A: CCK-8 不能用于细胞染色, CCK-8 检测原理是高水溶性的四唑盐 WST-8 在电子耦合试剂存在下还原产生水溶性 formazan 形式的染料, WST-8 及 formazan 是高度水溶性的, 不会进入细胞内对细胞进行染色。

5) Q: 没有 450 nm 的滤光片, 能否使用其他滤光片?

A: 如果您没有 450 nm 滤光片。您也可以使用吸光度在 430 nm 和 490 nm 之间的滤光片, 450 nm 滤光片具有最佳灵敏度。

6) Q: 哪些物质会干扰 CCK-8 的测定?

A: 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) 会增加 OD 值; 若存在氧化性物质则会抑制 CCK-8 测定反应, 减小 OD 值; 此外, 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。

7) Q: 在做药物刺激实验时, 药物对测定是否有影响?

A: 如果药物有还原性, 则会与 CCK-8 发生反应, 影响吸光度; 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。

8) Q: 如果吸光度值太低, 可以采取什么办法?

A: 适当增加细胞数量或延长加入 CCK-8 溶液后的孵育时间。

9) Q: 如果吸光度值太高, 可以采取什么办法?

A: 适当减少细胞数量 (建议正式实验前优化细胞数量与荧光值之间的关系) 或缩短加入 CCK-8 溶液后的孵育时间。