

产品概述

CCK-8 Cell Counting Kit, 简称CCK-8试剂盒, 是基于WST-8 (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检测的快速、高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。WST-8在电子耦合载体1-Methoxy PMS的作用下可被线粒体内的一些脱氢酶还原成高度水溶性的橙黄色甲臞染料(formazan), 生成的甲臞量与活细胞数成正比, 故可间接测定活细胞数量, 反映细胞增殖和细胞毒性情况。使用酶标仪在450 nm波长处测得吸光值, 吸光值越高代表生成的甲臞染料越多, 活细胞越多。本试剂盒的CCK-8 Solution为即用型试剂, 可直接加入到细胞样品中, 孵育一定时间后即可检测, 不需要预配各种成分。

产品组分

组 分	A311-01 500 rxns (10 μ l/rxn)	A311-02 1,000 rxns (10 μ l/rxn)
CCK-8 Solution	5 ml	10 ml

保存条件

2 ~ 8°C避光保存, 根据不同目的地调整运输方式。

适用范围

本产品适用于细胞增殖测试、细胞毒性测试和药物筛选等应用。

注意事项

1. 本试剂为皮粉色液体, 使用时需避光操作。
2. 首次实验时, 建议先摸索最佳的细胞接种数目以及最佳的CCK-8 Solution的孵育时间(常规孵育时间为1 - 4 h)。
3. 实验操作中避免产生气泡。
4. 本试剂盒的检测是依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原性物质以及氧化性物质均会干扰检测, 使用前请先去除干扰物质再加CCK-8 Solution进行检测。
5. 进行药物抑制实验时, 如果药物中含有金属(Pb²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺等)则会干扰CCK-8 Solution的显色反应, 最终导致检测的灵敏度降低。
6. 测定细胞数量时, 为保证单次实验结果的稳定性和重复性, 建议每次同时做标准曲线。

自备材料

多道移液器(100 - 200 μ l、10 μ l)、酶标仪(含450 nm滤光片)、96孔细胞培养板、CO₂细胞培养箱

实验流程

1. 接种细胞至96孔板, 终体积为100 μ l;
▲ 若无药物处理, 可在第1步之后直接跳到第5步。
2. 培养箱中预培养(时间根据具体实验需求来定, 推荐时间为18 - 24 h);
3. 加入相应药物到孔板中;
4. 37°C细胞培养箱培养;
5. 96孔板中加入10 μ l CCK-8 Solution(若不是96孔板, 则保证CCK-8 Solution加入量是细胞板中每孔培养基体积的10%即可);
6. 培养箱中孵育1 - 4 h(时间可调整);
7. 酶标仪检测450 nm处的吸光值。

1. 绘制标准曲线

- 收集培养可传代的细胞，确定细胞密度，然后接种细胞；
- 按比例(如1:2的比例)依次用培养基等比梯度稀释细胞，一般做5-7个细胞数梯度，每组3-6个重复，接种至96孔板中，每孔加入100 μl的细胞悬液；
- 每孔加入10 μl CCK-8 Solution，轻轻混匀，在37°C细胞培养箱中孵育一定时间(依不同的细胞种类而定，一般是1-4 h)。酶标仪测定450 nm处的吸光值，以细胞数为横坐标，吸光值为纵坐标绘制标准曲线。根据此标准曲线可测定未知样品的细胞数量。使用此标准曲线的前提是试验条件与此完全一致。

2. 细胞活性检测

- 接种细胞于96孔板中(100 μl/孔，避免气泡产生)预培养24 h，同时设置空白组和对照组；
- 向每孔加入10 μl CCK-8 Solution(建议沿细胞板壁加入，轻晃，避免气泡产生)；
- 在细胞培养箱中孵育一定时间；
- 酶标仪测定450 nm处的吸光值。

3. 细胞增殖—毒性检测

- 接种细胞于96孔板中(100 μl/孔，避免气泡产生)预培养24 h，同时设置空白组和对照组；
- 每孔分别加入不同浓度的待测药物，在培养箱中孵育一段时间(依据待测药物而定)；
- 向每孔加入10 μl CCK-8 Solution(建议沿细胞板壁加入，轻晃，避免气泡产生)，培养箱中孵育一定时间；
- 酶标仪测定450 nm处的吸光值。

4. 换算公式

细胞存活百分比=[(A-C)/(B-C)] × 100%

抑制百分比=[(B-A)/(B-C)] × 100%

A: 实验组吸光值(为含有培养基、细胞、待测药物和CCK-8 Solution的吸光值)

B: 对照组吸光值(为含有培养基、细胞、CCK-8 Solution的吸光值)

C: 空白组吸光值(为含有培养基、CCK-8 Solution的吸光值)

常见问题与解决方案

◇ 接种至96孔细胞板中的细胞数量应该是多少？

贴壁细胞至少1,000个/孔(100 μl培养基)，白细胞至少2,500个/孔(100 μl培养基)。建议实验前设定几个不同细胞数量的孔进行条件摸索。

◇ CCK-8 Solution对细胞有毒性吗？

CCK-8 Solution本身的细胞毒性很低，不会影响细胞的生长。因此，经过CCK-8 Solution处理的细胞可以弃去上清后再加入细胞培养液继续培养。

◇ CCK-8测定值的影响因素有哪些？

① 气泡；② 测试体系中存在氧化性或还原性物质使得测试结果对应减少和增加。

◇ 待测药物本身具有氧化性或者还原性时，如何进行操作？

如果待测药物本身具有氧化性或还原性，可在加入CCK-8 Solution之前更换新鲜的培养基，以去除待测药物的影响。当待测药物影响比较小时，可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入待测药物后的空白吸收值即可。

◇ 实验过程中可以加入CCK-8 Solution隔夜后第二天检测吗？

一般情况下，建议加入CCK-8 Solution后，37°C孵育2 h后检测。如果时间来不及可以向每孔加入1% SDS溶液，室温避光保存，24 h内检测，吸光值不会受到影响(加入1% SDS溶液的体积与加入CCK-8 Solution的体积相同)。

◇ 实验过程中，处理细胞用的不是96孔板，如何确定加入CCK-8 Solution的体积？

CCK-8 Solution的加入量是细胞板中每孔培养基体积的10%，按照该比例进行换算即可。如果是使用384孔板进行细胞增殖与活性的检测，建议先将CCK-8 Solution用ddH₂O稀释1倍后，加入细胞板中每孔培养基的20%体积即可。

◇ 如果测得的吸光值很低，如何解决？

① 增加细胞数量；② 延长加入CCK-8 Solution后的孵育时间。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。