

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

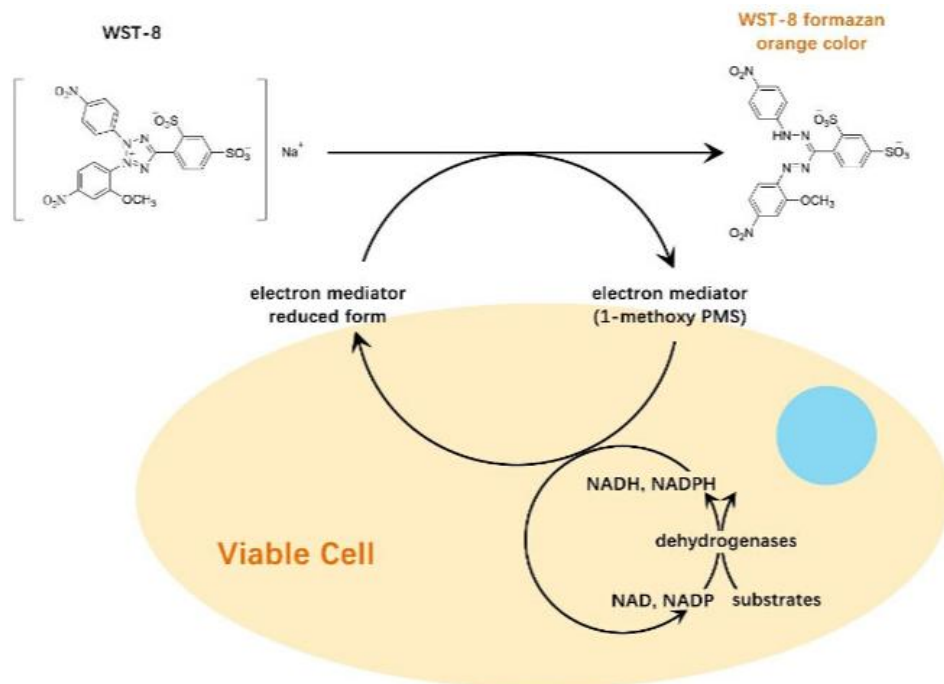
【产品简介】 ◇Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 是一种基于WST-8而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的方法, 相较于传统的MTT、XTT等具有更加宽的线性范围和更高的灵敏度。

◇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, 可被线粒体的一些脱氢酶还原生成橙黄色的formazan。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

【货 号】 C2011

【规 格】 500T (5ml)

【反应原理】



【保存条件】 -20℃避光保存, 有效期 1 年。

【使用方法】 1、细胞活性检测:

- 将细胞悬液(100u1/孔)接种在 96 孔板中。在细胞培养箱中预培养一定时间。
- 向板的每个孔中加入 10u1 CCK-8 溶液。
- 将培养板放在细胞培养箱中继续孵育 1~4 小时。
- 使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。(如不需要立刻测量吸光度, 可在每个孔中加入 10u1 1%SDS 或 0.1M HCl, 盖好并在室温下避光保存。在 24 小时内不会有明显的吸光度变化。)

2、细胞增殖/毒性检测

- 在 96 孔板中每孔接种 100u1 细胞悬液(约 5000 个细胞/孔)。将板置于细胞培

养箱中预培养 24 小时。

- B. 向孔中加入 10u1 不同浓度的待测物质。
- C. 将培养板置于细胞培养箱中孵育适当的时间长度(如: 6, 12, 24 或 48 小时)。
- D. 向 96 孔板的每个孔中加入 10u1 CCK-8 溶液。
- E. 将培养板置于细胞培养箱中孵育 1~4 小时。
- F. 在读取平板数值之前, 可以在摇床上轻柔的摇匀。随后使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。(如不需要立刻测量吸光度, 可在每个孔中加入 10u1 1%SDS 或 0.1M HCl, 盖好并在室温下避光保存。在 24 小时内不会有明显的吸光度变化。)

3、数据分析

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

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)

4、制作标准曲线

- A. 细胞计数板计数细胞悬液中的细胞数。
- B. 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。保证每孔中细胞悬液的体积一致。)
- C. 培养直至细胞贴壁(通常 2~4 小时), 然后每 100u1 培养基加入 10u1 CCK-8。继续孵育 1~4 小时, 用酶标仪测 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。
- D. 在培养检测条件相同时, 可以基于该曲线确定待测样品的细胞数。

【注意事项】

- ◆如果您想对 CCK-8 溶液进行灭菌, 请使用 0.22um 的膜过滤溶液。
- ◆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 1mM 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 10mM, 将会完全抑制
- ◆如果您没有 450nm 滤光片。您也可以使用吸光度在 430~490nm 之间的滤光片, 450nm 滤光片具有最佳灵敏度。如果您需要进行双波长测定, 可用 650nm 处的吸光度作为参考波长。
- ◆本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原剂会干扰检测, 如果待检测体系中存在较多的还原剂, 需设法去除。
- ◆如果吸光值过低可以适当增加细胞数量或者延迟孵育时间, 过高反之, 建议正式实验前优化细胞数量与荧光值之间的关系。
- ◆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。
- ◆为了您的身体安全及健康, 请穿实验服及佩戴一次性手套操作。
- ◆本产品仅限于科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。