

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

货号: C101**保存条件:** 4℃避光存放**产品介绍:**

Cell Counting Kit-8, 简称CCK-8试剂盒, 广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速检测。本品含有WST-8, 在电子耦合载体1-Methoxy PMS的作用下可被线粒体内的脱氢酶还原成高度水溶性的橙黄色甲臞(formazan)。颜色的深浅与活细胞的数量成正比, 因而可间接测定活细胞数量。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越多, 活细胞数量越多。对于同一种细胞, 在一定细胞数量范围内, 吸光值和活细胞数量呈线性关系。

产品组成:

组分	C101-01	C101-03	C101-05
CCK-8 Solution	1 mL	10 x 1 mL	100 x 1mL

温馨提示:

- 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);
- 本试剂盒的检测依赖于细胞内脱氢酶催化, 使用前请排除培养基中还原性物质以及氧化性物质的干扰;
- 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 Solution时, 建议斜贴着培养板壁加, 避免产生气泡;
- 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;
- 金属离子 (Pb²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺等) 会对CCK-8 Solution的显色反应产生影响, 从而导致检测的灵敏度降低;

产品使用:**A. 绘制标准曲线**

- 1) 收集可传代培养的细胞, 确定细胞密度, 准备接种细胞;
- 2) 用培养基等比(如1: 2)梯度稀释细胞, 建议做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 稀释好的细胞悬液;
- 3) 每孔加入10 μL CCK-8 Solution, 轻轻混匀, 在37℃细胞培养箱中孵育一定时间(依不同的细胞种类而定, 常规是1 - 4 h)。使用酶标仪测定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。

注: 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)。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 Solution。

B. 细胞活性测定

- 1) 于96孔板接种细胞悬液(100 μL/孔)预培养24 h, 同时设置空白组和对照组;
- 2) 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);
- 3) 置于细胞培养箱中孵育1-4 h;
- 4) 酶标仪测定450 nm处的吸光值。

注: 若暂时不测定OD值, 可以向每孔中加入10 μL 0.1 M的HCl溶液或1% SDS溶液, 避光室温保存。24小时内测定, 吸光度不会发生变化。

C.细胞增殖—毒性检测

- 1) 于96孔板接种细胞悬液(100 μL/孔)预培养24 h, 同时设置空白组和对照组;
- 2) 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);
- 3) 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);
- 4) 置于细胞培养箱中孵育1-4 h;
- 5) 酶标仪测定450 nm处的吸光值。

D.计算公式

细胞存活百分比= $[(A-C)/(B-C)] \times 100\%$

抑制百分比= $[(B-A)/(B-C)] \times 100\%$

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)

常见问题及解决方案:

问题	解决方案
CCK-8 Solution对细胞有毒性吗?	CCK-8 Solution的细胞毒性很低, 不会影响细胞的生长。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。但为了避免CCK-8 Solution可能带来的对于后续检测的影响, 除非该细胞极难获得, 否则不推荐把CCK-8 Solution孵育过的细胞用于其它实验。
CCK-8测定值的影响因素有哪些?	检测体系中存在还原性或氧化性的物质; 加入的药物中存在金属离子 (pb ²⁺ 、Fe ²⁺ 、Cu ²⁺ 等); 检测体系中存在气泡, 请沿细胞板壁加入液体。
待测药物本身具有氧化性或者还原性时, 如何进行操作?	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。若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, 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的加入量是每孔培养基体积的10%。
如果测得的吸光值很低, 如何解决?	适当增加细胞数量; 延长加入CCK-8 Solution后的孵育时间。