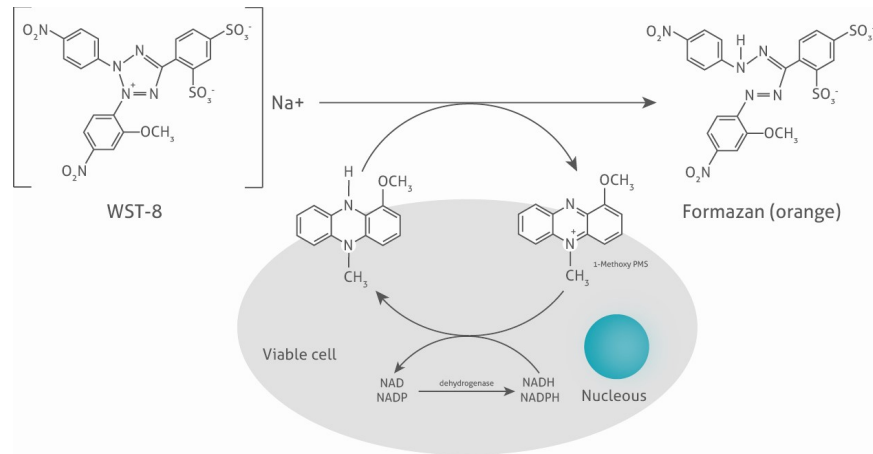


产品介绍:

Cell Counting Kit-8 简称 CCK8 (或 WST-8) 试剂盒, 是一种基于 WST-8 (化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二硝基苯)-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。

WST-8 工作原理: 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。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值, 间接反映活细胞数量。



WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品, 和 MTT 或其它 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先, MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的, 需要有特定的溶解液来溶解; 而 WST-8 和 XTT、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。其次, WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 相比更易溶解。再次, WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定, 使实验结果更加稳定。另外, WST-8 和 MTT、XTT 等相比线性范围更宽, 灵敏度更高。CCK 法应用非常广泛, 如药物筛选、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。

包装规格:

100T/500T/3000T/6000T

储存条件:

4°C 避光保存一年有效, -20°C 避光保存两年有效。

使用方法:

1. 制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

- 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 3-5 个细胞浓度梯度, 每组 3-6 个复孔。
- 接种后培养 2-4 h 使细胞贴壁, 然后加 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, 根据此标准线可以测定未知样品的细胞数量 (使用此标准曲线的前提条件是实验条件一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间)。

2. 细胞活性检测

- 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μL/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (37°C, 5% CO₂)。
- 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 将培养板在培养箱内孵育 1-4 h。
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μL 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内测定, 吸光度不会发生变化。

3. 细胞增殖-毒性检测

- 在 96 孔板中配置 100 μL 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 h (37°C, 5% CO₂)。
- 向培养板加入 1-10 μL 不同浓度的待测物质。
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 h)。
- 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 将培养板在培养箱内孵育 1-4 h。
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μL 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内测定, 吸光度不会发生变化。

注: 如果待测物质有氧化性或还原性, 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吸收即可。

计算公式:

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

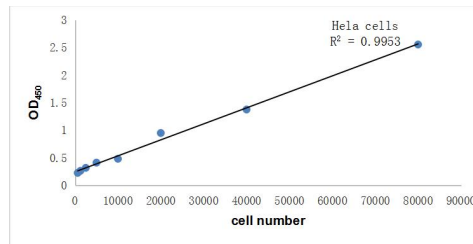
抑制率 = $[(Ac-As) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

As: 实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质)吸光度

Ac: 对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测物质)吸光度

Ab: 空白孔(不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8)吸光度

数据展示:



细胞系: HeLa cell line

培养基: DMEM+10%FBS

培养条件: 37°C, 5%CO₂, 加入CCK-8试剂2h后450nm读数R²=0.9953

注意事项:

1. 第一次做实验时, 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入CCK-8试剂后的培养时间。
2. 接种时注意细胞悬液一定要混匀, 以避免细胞沉淀下来, 导致每孔中的细胞数量不一致。
3. 培养板周围一圈孔培养液容易挥发, 为减少误差, 建议培养板周围的四边每孔只加培养基。
4. 建议采用多通道移液器, 减少平行孔间的误差, 加CCK-8时, 建议斜贴着培养板壁加, 不要插到培养基液面下加, 容易产生气泡, 干扰OD值。
5. 若细胞培养时间较长, 培养基颜色或pH发生变化, 建议更换培养基后再加CCK-8, 含有酚红的培养基不影响测定。
6. CCK-8对细胞的毒性非常低, 其他的实验, 例如中性红法或结晶紫法, 也可在CCK-8法检测完后继续进行。
7. 可以使用大于600nm的波长, 例如650nm, 作为参考波长进行双波长测定, CCK-8在参比波长处没有吸光度, 设定参比波长的目的是为了去除由于样品浑浊所带来的吸收。
8. 如果实验中待测物质有氧化还原剂, 在不含细胞的培养基中加入药物, 然后加入CCK-8试剂在一定时间内检测, 和不加药物的培养基进行比较(只加CCK-8试剂), 如果OD值明显偏高, 则说明有反应。
9. 加CCK-8试剂时速度要快, 减少试剂在移液器上的残留, 加入CCK-8试剂后轻轻震培养板, 为了避免加样时由于CCK-8残留在枪头上所带来的误差, 可以在加样前用培养液稀释CCK-8试剂并混匀后加样。
10. CCK-8反复冻融会增加背景值, 干扰实验测定。