

Product Data Sheet

产品名称: Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

产品编号: GK10001

功能属性

- 应用:
- 1) 细胞增殖测定 - GlpBio 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 是水溶性的, 在培养中是稳定的, 并且是无毒的。
 - 2) 细胞活力测定 - 代谢活性和染料产生与改变的活力成比例地变化。
 - 3) 细胞因子测定 - 测量细胞因子诱导的增殖。如果需要, 可以在研究结束时回收细胞并扩增。
 - 4) 细胞毒性测定 - 来自细胞毒性化学物质的细胞死亡对颜色发展没有影响, 只有活细胞将试剂转化为比色指示剂。试剂本身具有可忽略的毒性, 并且通常对细胞是安全的。

运输方式: 蓝冰运输。

储存条件: 储存在 4° C 避光, 可稳定长达 12 个月。储存在 -20° C 避光, 可稳定长达 2 年。

实验参考方法

细胞数量确定

1. 将细胞悬浮液 (100µL/孔) 接种在 96 洞孔板中。将板在潮湿的培养箱中预孵育 (例如, 在 37°C, 5%CO₂ 下)。
2. 向板的每个孔中加入 10µL CCK-8 溶液。注意不要在孔洞中引入气泡, 因为它们会干扰 O.D. 读数。
3. 将培养板在培养箱中孵育 1-4 小时。
4. 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

细胞增殖和细胞毒性测定

1. 将种子细胞以 10³-10⁴ 个细胞/孔的密度在 96 孔板中在 100µL 培养基中培养。将细胞在 CO₂ 培养箱中于 37°C 培养 24 小时。
2. 将不同浓度的待测物质加入板中。
3. 将培养板在培养箱中孵育适当的时间 (例如, 6, 12, 24 或 48 小时)。
4. 使用重复移液器向板的每个孔中加入 10µL CCK-8 溶液。注意不要在孔洞中引入气泡, 因为它们会干扰 O.D. 读数。
5. 将培养板在培养箱中孵育 1-4 小时。
6. 在读取孔板之前, 重要的是在轨道振荡器上轻轻混合 1 分钟, 以确保颜色均匀分布。
7. 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

数据分析

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

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

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

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)。

制作标准曲线

1. 细胞计数板计数细胞悬液中的细胞数。
 2. 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。每孔中细胞悬液的体积应该是一致的。）
 3. 培养直至细胞贴壁（通常 2-4 小时），然后每 100 μ l 培养基加入 10 μ l CCK-8。继续孵育 1-4 小时，用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。制作出一条以细胞数为 X 轴坐标，O.D.值为 Y 轴坐标的标准曲线。
- 可以基于该曲线确定待测样品的细胞数。使用此标准曲线的先决条件是培养检测条件相同。

注意事项

1. 确保药物和 CCK-8 均匀分布在培养基中。
2. 细胞增殖越多, 颜色越深; 细胞毒性越强, 颜色越浅。
3. 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%。
4. 因为 CCK-8 测定是基于活细胞中的脱氢酶活性，影响脱氢酶活性的条件或化学物质可能导致实际活细胞数与使用 CCK-8 测定活细胞数之间有差异。
5. 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。
6. 孵育 2 小时后，背景 O.D.值一般为 0.1-0.2 单位。
7. 注意不要在孔中引入气泡，因为它们会干扰 O.D.值。
8. 如果您想对 CCK-8 溶液进行灭菌，请使用 0.2 μ m 的膜过滤溶液。
9. 孵育时间因孔中细胞的类型和数量而异。通常，白细胞着色较弱，因此可能需要较长的孵育时间（长达 4 小时）或大量细胞（~105 细胞/孔）。
10. 如果细胞悬液中存在高浊度, 测量并减去样品在 600nm 或更高波长的 O.D 值。
11. CCK-8 不能用于细胞染色。
12. 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。
13. 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。）
14. 该试剂盒可用于大肠杆菌，但不能用于酵母细胞。
15. 在读取平板之前，您可以在摇床上轻柔混匀。
16. 我们建议将细胞接种在靠近培养板中央的孔中，最外围一圈孔中的培养基容易蒸发，可以用 PBS，水或培养基填充这些孔。
17. 如果您没有 450 nm 滤光片。您也可以使用吸光度在 430 和 490 nm 之间的滤光片, 450 nm 滤光片具有最佳灵敏度。
18. 测量 450 nm 处的吸光度，如果您需要进行双波长测定，作为参考波长可以测定 650 nm 处的吸光度。
19. 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。

产品描述

细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 允许使用 WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-) 进行方便的分析四唑盐，一钠盐)，其在电子载体 1-甲氧基 PMS 存在下生物还原时产生水溶性甲 dye 染料。将 CCK-8 溶液直接添加到细胞中，不需要预先混合组分。WST-8 被细胞脱氢酶生物还原为可溶于组织培养基的橙色甲产物。产生的甲的量与活细胞的数量成正比。由于 CCK-8 溶液非常稳定并且几乎没有细胞毒性，因此可以进行更长的孵育，例如 24 至 48 小时。

细胞计数试剂盒-8 允许灵敏的比色测定法测定增殖和细胞毒性测定中活细胞的数量。检测灵敏度高于任何其他四唑盐，如 MTT，XTT 或 MTS。

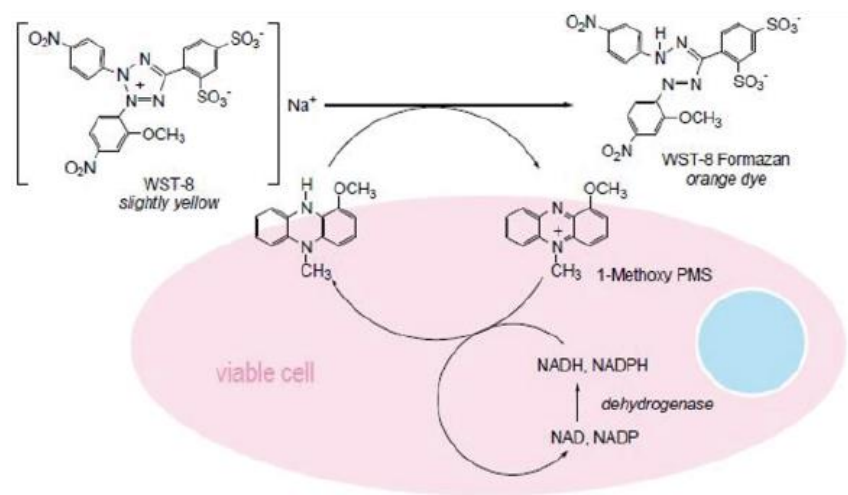


图 1: Cell Counting Kit-8 (CCK-8)的工作机制

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (626) 353-8530 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com
Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA