

超强型 CCK-8 试剂盒

产品编号: MA0225 规格: 100T / 500T / 1000T / 1000T×10

产品内容

产品组成	MA0225 -1	MA0225-2	MA0225-3	MA0225-4
CCK-8 超强型溶液	1ml	5ml	10ml	10ml×10
说明书	一份	一份	一份	一份

产品简介

超强型CCK-8试剂盒（Super-Enhanced Cell Counting Kit-8）是一种基于WST-8用于细胞活力、增殖和细胞毒性的超快速、超高灵敏度检测的试剂盒。

CCK-8超强型溶液中含有WST-8（2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐），是一种类似于MTT的化合物，它在电子耦合试剂1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯（1-Methoxy PMS）存在条件下，可以被线粒体内的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲瓚产物Formazan，生成的Formazan数量与活细胞的数量成正比。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析，细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。

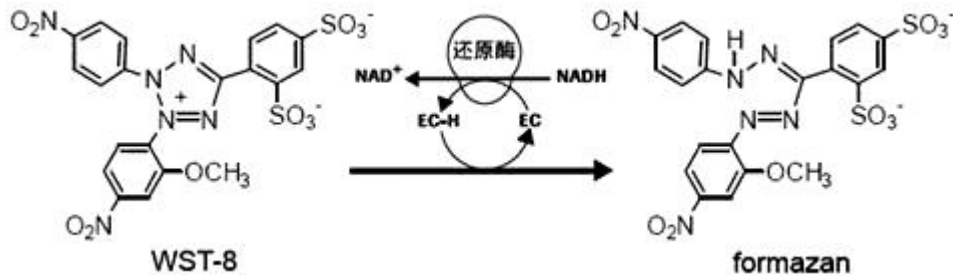


图1. WST-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

美仑超强型CCK-8试剂盒和普通或增强型CCK-8试剂盒相比，检测速度更快、灵敏度更高、线性范围更宽，仅需0.5至1小时即可完成检测，尤其适用于悬浮细胞。同时保持数据可靠、重现性好、稳定性好的特点，可以广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验。

操作步骤:

➤ 制作标准曲线（测定细胞具体数量时）

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到96孔板中：按比例（例如：1/2 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 个重复孔。每孔100μl 细胞悬液。
3. 37℃培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养2-4 小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。



4. 每孔加入10 μ l CCK-8超强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含10% CCK-8的培养基，以换液的形式加入。【注】不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。

5. 培养箱内孵育一定时间后测定450nm 吸光度，制作出一条以细胞数量为横坐标（X 轴），吸光度为纵坐标（Y 轴）的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量（使用此标准曲线的前提是实验的条件要一致，便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间）。

➤ 细胞活性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。

2. 接种到96孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔100 μ l细胞悬液，可设置3个重复孔。

3. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养24h小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。

4. 每孔加入10 μ l CCK-8超强型溶液：由于每孔加入CCK-8量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含10% CCK-8的培养基，以换液的形式加入。【注】不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。

5. 培养箱内孵育0.5-2小时：细胞种类不同，形成的Formazan的量也不一样，对于大多数情况孵育1小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是免疫细胞形成的Formazan很少，需要较长的显色时间（1-2小时）。

6. 测定450nm吸光度。如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入10 μ l 0.1M HCl溶液或1% w/v SDS溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在24小时内吸光度不会发生变化。

➤ 细胞增殖-毒性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。

2. 接种到96孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔100 μ l细胞悬液，可设置3个重复孔。

3. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养24h小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。

4. 每孔加入0-10 μ l不同浓度的待测药物。

5. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：加入待测药物的培养时间，要看该物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的时间。

6. 每孔加入10 μ l CCK-8 超强型溶液：由于每孔加入CCK-8量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。【注】如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8之前除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基，以去掉药物影响。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。

7. 培养箱内培养0.5-2小时：细胞种类不同，形成的Formazan的量也不一样，对于大多数情况孵育1小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是免疫细胞形成的Formazan很少，需要较长的显色时间（1-2小时）。



8. 测定450nm吸光度：建议采用双波长进行测定，检测波长450-490nm，参比波长600-650nm。如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入10 μ l 0.1M HCl 溶液或 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在 24 小时内吸光度不会发生变化。

➤ 计算公式：

$$\text{细胞存活率} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = [(A_c - A_s) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

As: 实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

Ac: 对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物）的吸光度

Ab: 空白孔（不含细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

保存条件：

2-8 $^{\circ}$ C避光保存，自生产之日起12个月有效。-20 $^{\circ}$ C可以储藏更久，但反复冻融会增加背景值，干扰实验测定，因此请将经常使用的试剂保存在2-8 $^{\circ}$ C。

注意事项：

1. 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. CCK-8 反应时间的确定：一般情况下，免疫细胞显色比较困难，因此需要增加细胞数量和延长 CCK-8 反应时间。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色，因此悬浮细胞在加入 CCK-8 培养 0.5-1 小时后，可先从培养箱取出，目测或用酶标仪测定显色程度，若显色困难可以继续培养数小时后再确定。对于贴壁细胞，CCK-8 的培养时间一般为 0.5 小时，在培养 20 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度。
3. 每孔接种细胞数：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 μ l 培养基）。检测免疫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 μ l 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 溶液。
4. 设定空白对照：在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度即为空白对照。在做加药实验（细胞毒性实验）时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。
5. 影响 CCK-8 测定的物质：由于 CCK-8 检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应，所以如果待测体系中存在氧化还原物质则可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此应需设法去除这些物质的影响。酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响，培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除只含有培养基的对照孔中本底吸光度而消除，因此不会对检测结果造成影响。
6. 测定波长：如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议采用双波长进行测定，检测波长 450nm，参比波长 600-650nm。如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490nm 之间的滤光片，但是 450nm 检测灵敏度最高。



7. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
8. 如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加 CCK-8 检测。
9. CCK-8 超强型溶液对细胞的毒性较低，细胞在检测后仍然可以正常生长，但为了避免 CCK-8 超强型溶液可能带来的对于后续检测的影响，除非该细胞极难获得，否则不推荐将检测后的细胞用于其它实验。
10. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

