

产品说明书

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 细胞增殖试剂盒

货号: B2001 规格: 100T/500T/3000T/10000T/5x10000T

储存条件

4°C避光保存, 长期储存置于-20°C。

产品介绍

Cell Counting Kit-8 试剂盒, 是一种基于 WST-8 (化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐) 显色反应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。

工作原理: 在电子耦合试剂存在的条件下, 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。

CCK 法广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测等方面。

使用方法

1. 细胞活性检测

① 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 建议可以设置 8 个细胞浓度梯度, 每个浓度设置 6 个重复进行细胞铺板, 例如按照细胞个数 0/312.5/625/1250/2500/5000/10000/20000 cells/96 孔板进行铺板。将培养板放在培养箱中培养过夜 (37°C, 5% CO₂)。

② 向每孔加入 10 μ L CCK 溶液 (注意避免在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数), 如产品有析出, 可 37°C 水浴处理, 不影响使用。

③ 将培养板在培养箱内孵育 0.5 - 4 h。

初次实验可以在 0.5、1、2 和 4 h 后分别用酶标仪检测, 然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。

④ 用酶标仪测定在 450 nm 和 600 nm (消除孔板本底干扰) 处的吸光度。

⑤ 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并将培养板在室温条件下避光保存。24 h 内测定, 吸光度不会发生变化。

2. 细胞增殖-毒性检测

① 在 96 孔板中接种 100 μL 的细胞悬液，建议可以设置 8 个细胞浓度梯度，每个浓度设置 6 个重复进行细胞铺板，例如按照细胞个数 0/312.5/625/1250/2500/5000/10000/20000 cells/96 孔板进行铺板。将培养板放在培养箱中培养过夜（37°C, 5% CO_2 ）。

② 向培养板加入 1 - 10 μL 特定的药物刺激。

③ 于培养箱中孵育一段时间（例如：6、12、24 或 48 h）。

④ 向每孔加入 10 μL CCK 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。

注：如产品有析出，可 37°C 水浴处理，不影响使用。

⑤ 将培养板在培养箱内孵育 0.5 - 4 h。

注：初次实验可以在 0.5、1、2 和 4 h 后分别用酶标仪检测，然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。

⑥ 用酶标仪测定在 450 nm 和 600 nm（消除孔板本底干扰）处的吸光度。

⑦ 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的话，可在加 CCK 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。

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 白细胞可能需要培养较长时间。

③ 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 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 2,500 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 溶液。

④ 如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450nm 检测灵敏度最高。

⑤ 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。