

细胞活力检测试剂盒

Cell Counting Kit-8

产品简介:

本 **CCK-8** 细胞活力检测试剂盒含有 **WST-8 (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)**，在电子载体存在的情况下 **WST-8** 被细胞内脱氢酶氧化还原后生成水溶性的橙黄色甲臞染料能够溶解在组织培养基中，生成的甲臞量与活细胞数量成正比。**CCK-8** 法是用于测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的一种高灵敏度，无放射性的比色检测法，可替代传统的 **MTT** 法。

试剂盒组份: 1ML--100Tests, 5ML--500Tests, 10×5ML--5000Tests

试剂盒以外自备仪器和试剂: 低速离心机、酶标仪 (450nm 波长)、平板摇床、微量移液器、96 孔培养板、CO₂ 培养箱

操作步骤:

1. 通常细胞增殖实验每孔加入 **100ul** (**2000** 个细胞)，细胞毒性实验每孔加入 **100ul** (**10000** 个细胞) (具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小、细胞增殖速度的快慢等因素决定)。将培养板在培养箱预培养 **24** 小时 (在 **37℃**，**5% CO₂** 的条件下)
2. 按照实验需要，进行培养并给予 **0-10ul** 特定的药物刺激
- 3 将培养板在培养箱继续培养一段适当的时间 (例如: **24** 小时或 **48** 小时)
- 4 每孔加入 **10ul CCK-8** 溶液。如果起始的培养体积为 **200ul**，则需加入 **20ul CCK-8** 溶液，其它情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和 **CCK-8** 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。如果担心所使用的药物会干扰检测，需设置加了相应量细胞培养液、药物和 **CCK-8** 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。(尽量不要在孔中生成气泡)
- 5 将培养板在培养箱内孵育 **1-4** 小时
- 6 用酶标仪测定在 **450 nm** 处的吸光度
- 7 如果暂时不测定 **OD** 值，打算以后测定的话，可以向每孔中加入 **10 μl 0.1 M 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。在 **24** 小时内吸光度不会发生变化

结果判断:

(1) 细胞的存活率: 将各测试孔的 **OD** 值减去本底 **OD** 值 (完全培养基加 **CCK-8**，无细胞)，各重复孔的 **OD** 值取均数±SD

细胞的存活率以 **T/C%** 表示，**T** 为加药细胞的 **OD** 值，**C** 为对照细胞的 **OD** 值。



细胞存活率% = (加药细胞 OD/对照细胞 OD) × 100

(2) 求出 T/C = 50% 时的药物浓度(IC50)或 T/C = 10%时的药物浓度(IC90)

保存条件: 4℃避光, 一年有效

注意事项:

1. 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等, 可以每接种数孔即混匀一下。培养板周围一圈孔培养基容易挥发, 为了减少误差, 建议培养板的四边每孔只加培养基或无菌 PBS, 而不作为指标检测孔。
2. CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。第一次做实验时, 建议先做数孔摸索接种细胞的最佳数量和加入 CCK-8 试剂后的最佳孵育时间。一般情况下, 白细胞较难显色, 因此需要较长的 CCK-8 反应时间或增加细胞数量 (~105 个细胞/孔)。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于悬浮细胞, 在加入 CCK-8 孵育 1-4 小时后, 可先从培养箱中取出, 目测染色程度或用酶标仪测定决定 CCK-8 最佳孵育时间。若显色困难, 可将培养板放回培养箱, 继续培养数小时后再测定。对于贴壁细胞, CCK-8 的孵育时间一般为 1-4 小时, 多数细胞在培养 30 分钟左右即可肉眼观察到明显的显色反应, **培养 2-4 小时左右检测效果最佳。**
3. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 如果待检测体系中存在较多的还原剂, 例如一些抗氧化剂会干扰检测, 需设法去除。含有酚红的培养基不影响本试剂盒做细胞活性的测定。
4. 如何判定待测溶液是否有还原性? 不含细胞的待测溶液孔中加入 CCK-8 溶液 10μl, 孵育 1-4 小时, 测定在 450 nm 处的空白吸光度。如果该吸光度很小, 说明待检测体系中存在较少的还原剂, 正式检测时即可直接加入 CCK-8 ; 如果该吸光度相对较大, 说明待检测体系中存在较多的还原剂, 正式检测时则需要除去培养基, 并用培养基洗涤细胞两次, 然后加入新的培养基和 10 μl CCK-8 进行检测。
5. 如果样品为高浑浊度的细胞悬液, 建议设定 600 nm (或 600 nm 以上) 作为参比波长, 扣除参比波长的 O.D 值即可。
6. 请穿实验服并戴一次性手套操作



