

细胞增殖-毒性检测试剂盒 (简称 CCK-8)

货号: NG025S 1ml

NG025M 5ml

储存条件: CCK 溶液在避光, 0-5°C的条件下可以保存一年, 如长期保存, 可在-20°C下保存 2 年, 如需经常使用请将试剂存放在 0-5°C, 为防止背景值增加干扰实验结果, 请勿反复冻融。

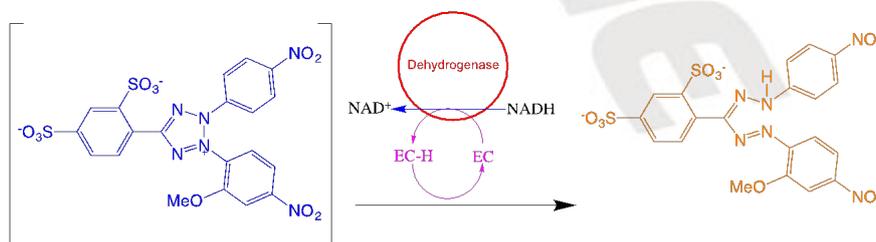
产品简介:

Cell Counting Kit-8(CCK)细胞增殖与活性检测试剂盒是一种基于 WST-8 (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), WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物, 在电子耦合试剂存在的条件下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的水溶性的甲臞染料 ((formazan,参考图 1)。WST-8 被细胞内脱氢酶生物还原后生成的甲臞能够直接溶解在培养基中。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析。

产品特点:

1. 无需 DMSO 等有机溶剂溶解; 而本方法产生的甲臞是水溶性的, 不仅省去了溶解的步骤, 更因此而减少了该操作步骤带来的误差。
2. 与 MTT 方法相比, 本方法线性范围更宽, 灵敏度更高。
3. 本方法对细胞无毒性, 可以多次测定, 选取最佳测定时间。
4. 本方法所用试剂在培养基中比 MTT 更加稳定, 实验效果重复性好。
5. MTT 具有毒性, 同时其生成的甲臞需要有机溶剂溶解, 会对操作人员身体造成危害。本试剂无毒, 使用中无需有机溶剂, 操作更加安全。
6. 本试剂盒在 4°C 避光可长期保存, 使用无需配制, 即开即用。

本试剂盒可以用于生物活性因子的活性检测, 抗肿瘤药物的筛选, 细胞增殖的测定, 细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。本试剂盒使用方便, 试剂盒包含一管已经配制好的含有 WST-8 的 CCK 溶液, 即开即用, 无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞, 可直接使用 96 孔板或者 384 孔板在酶标仪上检测, 适合大规模, 高通量的样品检测。



注意事项:

1. 由于使用 96 孔板进行检测, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发的的问题。一方面, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用周围一圈的办法, 改加 PBS, 水或培养液; 另一方面, 可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方, 以缓解蒸发。
2. CCK 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。任何待测体系中存在还原剂, 例如一些抗氧化剂会干扰检测, 需设法去除。

3. 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK 试剂后的培养时间。
4. 建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。加入 CCK 试剂时，建议斜贴着培养板壁加，不要查到培养基液面下加样，溶液产生气泡，会干扰 OD 值读数。
5. 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)。检测白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)，且培养时间长一些。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 溶液。
6. 加入 CCK 溶液时，如果细胞培养时间较长，培养基颜色已变化或 PH 值变化。建议换用新鲜的培养基。
7. 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 滤光片的检测灵敏度最高。
8. 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，通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去，因此不会对检测造成影响。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

CCK-8 与 MTT 方法对比

	CCK 法	MTT 法
1	还原后的 Formazan 是水溶性的 (不需要溶解)	还原后的 Formazan 是非水溶性的 (需要加有机溶剂溶解)
2	重现性好	重复性差
3	操作简单	操作繁琐
4	测定波长: 450~490nm	测定波长: 550~600nm
5	为 1 瓶溶液, 毋需预制, 即开即用	由于需要加有机溶剂溶解, 工作量大

操作步骤:

以 96 孔板为例:

1. 在 96 孔板中配置 100 μ l 的细胞悬液 (通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ l 2000 个细胞, 细胞毒性实验每孔加入 100 μ l 5000 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)。按照实验需要, 进行培养 (在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 的条件下) 预培养 24 小时。
2. 向培养板加入 1-10 μ l 不同浓度的待测药物刺激。
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (后面有具体细胞的建议时间, 例如: 6、12、24 或 48 小时)。
4. 每孔加入 10 μ l CCK 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。如果起始的培养体积为 200 μ l, 则需加入 20 μ l CCK 溶液, 其他情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和 CCK 溶液但没有加入细胞的孔作空白对照。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 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。
5. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时, 对于大多数情况孵育 1 小时就可以了。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等实验情况而定, 初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 小时分别用酶标仪检测, 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 450nm 处的吸光度, 如无 450nm 滤光片, 可以使用 420-480nm 的滤光片。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。
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 μ l 0.1M 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。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

注意: 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。