

描述: Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒, 是一种基于 WST-8 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度无放射性的比色检测试剂盒, 是代替 MTT 法检测细胞生长密度的最好方法。该试剂盒利用水溶性四唑盐 -WST[®]-8 (2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2, 4-二磺基)-2H-四唑单钠盐), 它在电子载体 1-Methoxy PMS 存在的情况下能够被还原成水溶性的甲臞染料, 生成的甲臞量与活细胞数量成正比。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, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

应用: 细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测。

储存: -20℃ 避光可保存 2 年, 融化后 4℃ 避光放置可保存 1 年。反复解冻和冷冻会增加背景值。

操作方法

A. 细胞计数测定

1. 96 孔培养板中贴壁或悬浮细胞 100 μ l / 孔培养体积 (>2000 个细胞/孔)。

2. 向每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 O.D 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-8 溶液。

注意: 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。

3. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。

4. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

5. 如果暂时不测定 O.D 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 μ l 1% w/v SDS 溶液或者 0.1M HCl 溶液, 并遮盖培养板避光保存。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

B. 细胞增殖实验和细胞毒性检测

1. 96 孔培养板中贴壁或悬浮细胞 100 μ l / 孔培养体积 (>5000 个细胞/孔)。

2. 向培养板加入 10 μ l 不同浓度的待测药物。

3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6, 12, 24 或 48 小时)。

4. 向每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 O.D 值的读数)。

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 O.D 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 μ l 1% w/v SDS 溶液或者 0.1M HCl 溶液, 并遮盖培养板避光保存。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

C. 制作标准曲线 (需要测定细胞绝对数量时)

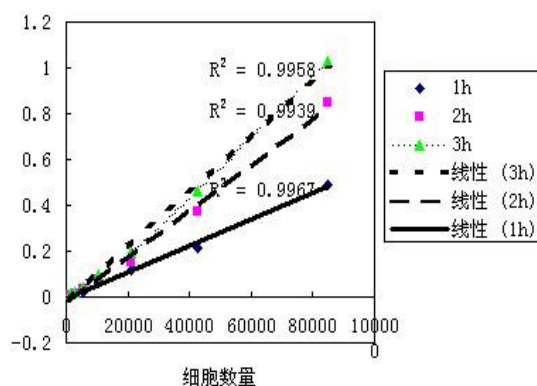
1. 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量, 然后接种细胞。

2. 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 个复孔。

3. 接种后培养使细胞贴壁, 然后加 CCK-8 试剂培养一定时间后测定 O.D 值, 制作出一条以细胞数量为 X 轴, O.D 值为 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条件是实验的条件要一致)。

实例

接种 96 孔板 293T 细胞, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 混合均匀, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 酶标仪读取不同培养时间的 OD 值, 做标准曲线。



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，可以每接种几个孔就混匀一下。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 PBS，而不作为指标检测孔。
2. 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。
3. 用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡，否则会干扰测定。
4. 培养时间根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。一般情况下，白细胞较难染色，因此需要较长的培养时间或增加细胞数量 ($\sim 10^5$ 个细胞/孔)。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难染色。对于悬浮细胞，在培养 1-4 小时后，可先从培养箱中取出，目察染色程度或用酶标仪测定决定。若染色困难，可将培养板放回培养箱，继续培养数小时后再确定。染色的最佳时间可定为悬浮细胞的最佳培养时间。对于贴壁细胞，培养时间一般为 1-4 小时，但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察染色程度 (根据细胞种类而定，需要摸索一下条件)。
5. 若细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化或 pH 发生变化，建议更换新鲜的培养基后再加 CCK-8 试剂。