



CCK-8

(细胞增殖实验或药物毒性测试)

CAT. NO. ZJ0025

保存条件: 2-8°C for 12 months

产品组成:

Component	ZJ0025/ZJ0025L
CCK-8	5mL/5mL × 5

产品说明:

Cell Counting Kit-8, 简称CCK-8试剂盒, 是一种基于WST-8而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。CCK-8溶液可以直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分。WST-8在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲瓚产物(formazan) (参考图1)。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 (生成的formazan量) 和细胞数目呈线性关系 (图2)。

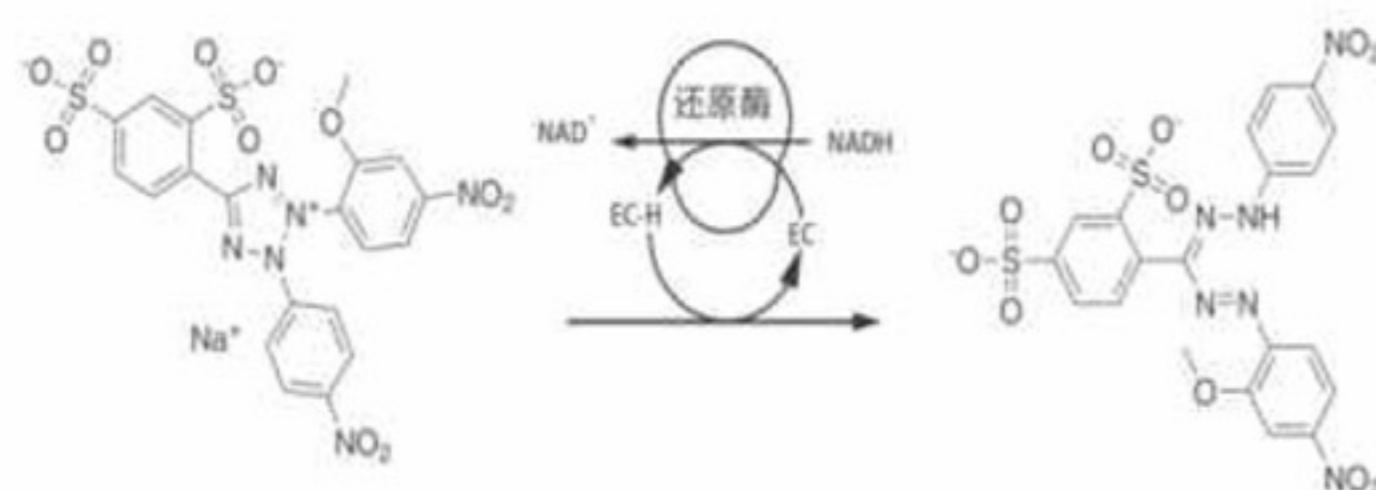


图1 WST-8和WST-8 formazan的结构式

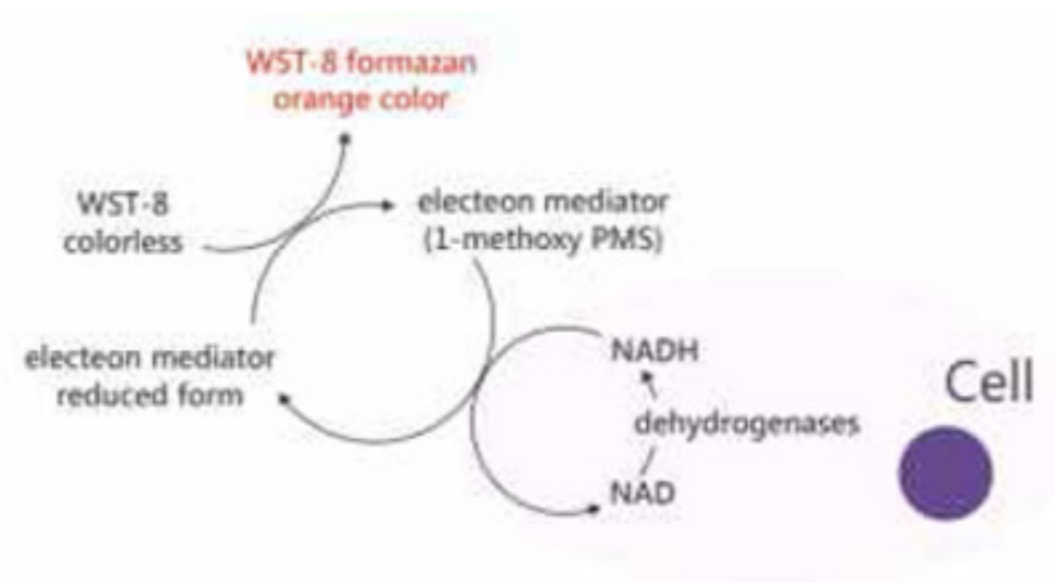


图2 CCK-8的原理图

WST-8是MTT的一种升级替代产品, 和MTT或其它MTT类似产品, 如XTT、MTS等相比有明显的优点:

- 第一, MTT被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的formazan不是水溶性的, 需用特定的溶剂溶解后检测, 而WST-8和XTT、MTS产生的formazan都是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤;
- 第二, WST-8产生的formazan比XTT和MTS产生的formazan更易溶解;
- 第三, WST-8比XTT和MTS更稳定, 实验结果更可靠;
- 第四, WST-8和MTT、XTT等相比线性范围更宽, 灵敏度更高, 并且更加稳定。WST-8对细胞无明显毒性。加入CCK-8溶液显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 检测时间更加灵活, 便于确定最佳测定时间。

操作说明:

本试剂盒可以用于细胞因子等诱导的细胞增殖检测，也可以用于抗癌药物等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测，或一些药物诱导的细胞生长抑制检测。

1. 制作标准曲线

- 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；
- 按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5-7个细胞浓度梯度，每组4-6个复孔；
- 接种后培养2-4小时使细胞贴壁，然后每100 μ L培养基加10 μ L CCK-8 试剂培养一定时间后测定OD值，制作出一条以细胞数量为横坐标，OD值为纵坐标的标准曲线。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试验条件完全一致。

2. 细胞活性检测

- 在96孔板中接种细胞悬液(100 μ L/孔)，将培养板放在培养箱中预培养24小时；
- 向每孔加入10 μ L的 CCK-8溶液 (注意不要产生气泡)；
- 将培养板置于培养箱内孵育1-4小时；
- 用酶标仪测定在450nm处的吸光度。

3. 细胞增殖-毒性检测

- 在96孔板中接种细胞悬液(100 μ L/孔)，将培养板放在培养箱中预培养24小时；
- 向培养板加入不同浓度的待测药物；
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间；
- 向每孔加入10 μ L的CCK-8溶液(注意不要产生气泡)；
- 将培养板置于培养箱内孵育1-4小时；
- 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

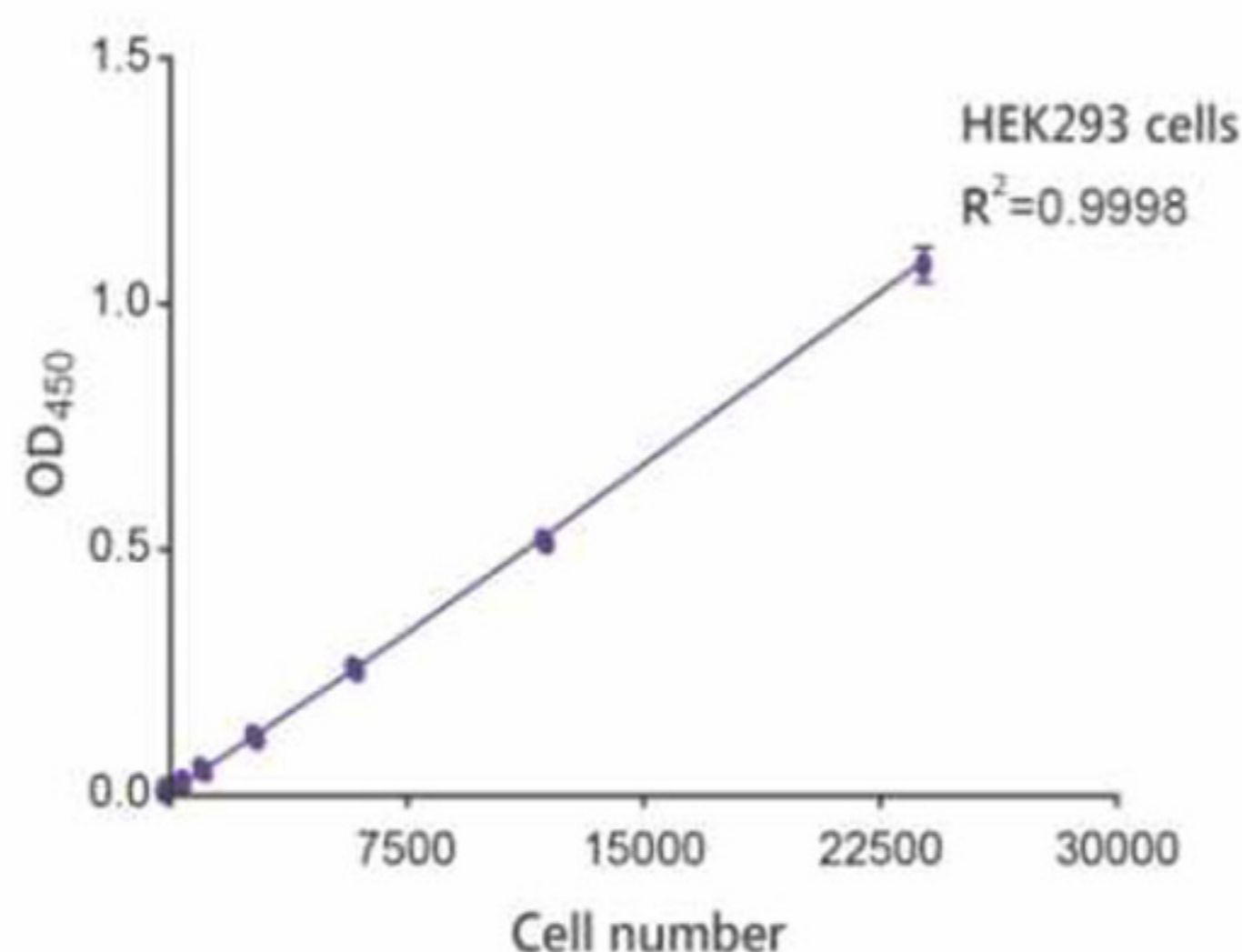


图3 CCK-8 试剂盒检测细胞活性

Cell line: HEK293; Medium: DMEM, 10% FBS; Incubation: 37°C, 5% CO₂, 2 hour

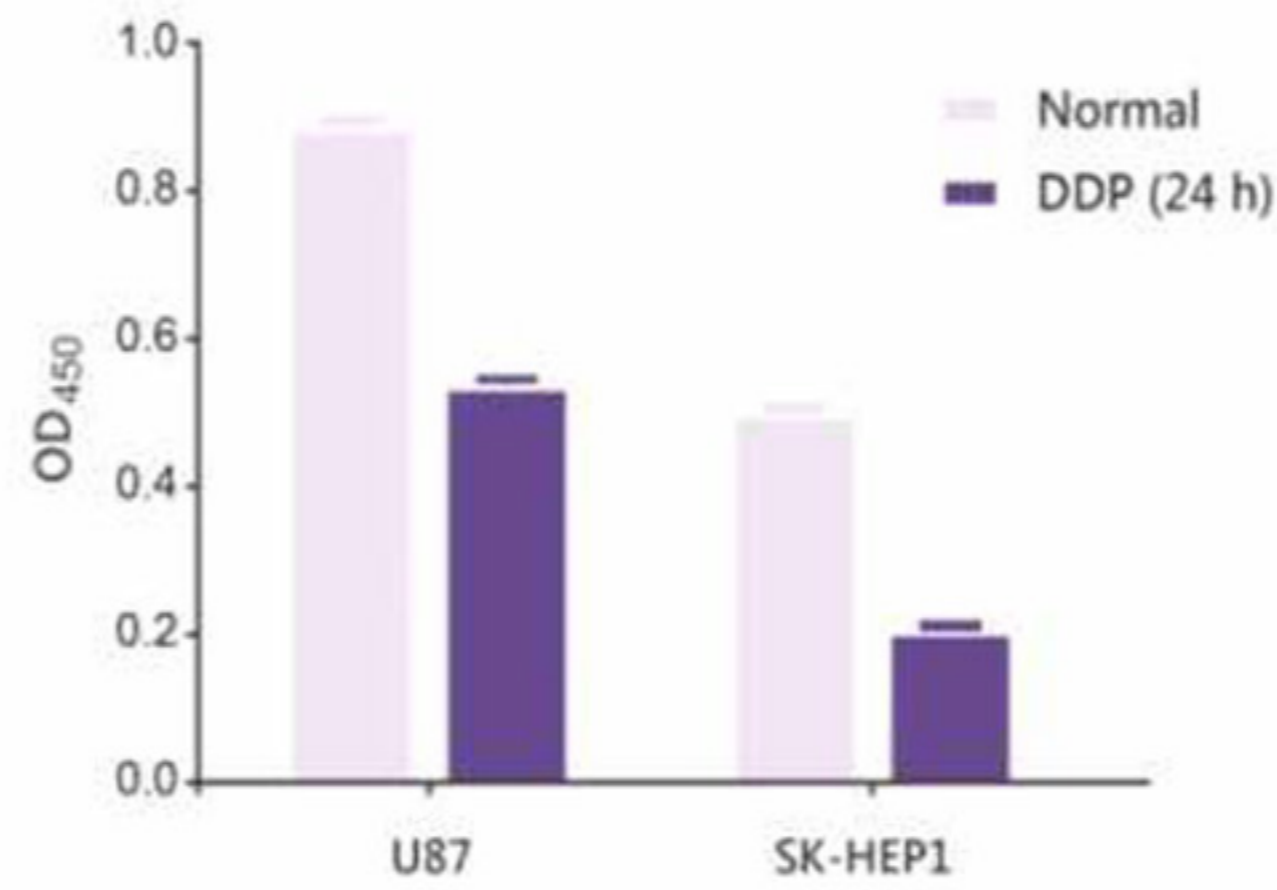


图4 CCK-8 试剂盒检测 DDP 细胞毒性

Cell line: U87, SK-HEP1; Medium: DMEM, 10% FBS; Chemicals: 200 μ M Cisplatin (DDP); Incubation: 37°C, 5% CO₂, 2 hours

注:如果待测药物有氧化性或还原性,可在加入CCK-8之前更换新鲜培养基,去掉待测药物的影响。

当待测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待测药物后的空白吸收即可。

注意事项

1. CCK-8 的培养时间一般为 1-4 小时,但在培养30分钟左右即可取出肉眼观察显色程度。根据细胞种类而定,需要摸索条件,CCK-8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准;
2. 使用96孔板进行检测时,如果细胞培养时间较长,一定要注意蒸发问题。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,改加相同量的 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;
3. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应,所以还原剂(例如一些抗氧化剂)会干扰检测。如果待检测体系中存在较多的还原剂,需设法去除。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. 加入药物中如含有金属,对CCK-8显色有影响。终浓度为1mM的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制5%、15%、90%的显色反应,使灵敏度降低;如果终浓度是10mM的话,将会100%抑制;
5. 培养基中的酚红不会影响实验结果,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;
6. 本产品可以检测*E.coli*,但不能检测酵母细胞。向100 μ L*E.coli*培养液中加10 μ LCCK-8溶液;并培养1-4小时或过夜;
7. CCK-8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深,OD值不断增加(注:活细胞内的脱氢酶是持续产生的);
8. 要测定细胞的具体数量,建议同时做标准曲线;
9. 建议采用多通道移液器,以减小平行孔间的差异;
10. 以下方法可以终止CCK-8反应(96孔板):
 - (a). 在显色反应后,将培养板放置4°C冰箱内;
 - (b). 每孔加10 μ L0.1MHCl溶液;
 - (c). 每孔加10 μ L1%(w/v)的SDS(十二烷基硫酸钠)溶液。