CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒

产品概述

CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒，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）而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度的比色检测试剂盒。

检测原理为：WST-8 在电子耦合剂 1-Methoxy PMS 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水溶性的甲臜（formazan)，生成的甲臜的颜色深浅与细胞增殖成正比，与细胞毒性成反比。使用酶标仪在 450nm 波长处测定 OD 值，间接反映活细胞数量。

本试剂盒可用于细胞增殖测定，细胞毒性的检测，药物筛选，以及细胞生长抑制检测等。

产品信息

产品名称	货号	规格	组分
CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒	RCK001	500T	1ml×5

运输与保存

蓝冰运输。4℃保存一年有效，-20℃保存两年有效。
【注】：反复冻融会造成测定背景 OD 值升高。

使用方法

1. 所需材料

96 孔板
CO_2 培养箱
10μL，100-200μL 以及多通道移液器
酶标仪(450nm 滤光片)

2. 绘制标准曲线

a. 用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量。
b. 按比例依次用培养基等比稀释细胞悬液成一个浓度梯度，一般要做 5-7 个细胞浓度梯度， 每组 3-6 个复孔。然后接种细胞 。
c. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后每 100μL 培养基加入 10μL CCK-8 试剂培养一定时间（一般 0.5~2 h）后用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。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，根据此标准线可以测定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一致）。

3. 细胞活性检测

a.96 孔板中每孔接种 100μL 的细胞悬液，在细胞培养箱预培养 24 h(37℃，5% CO_2)。
b.向每孔加入 10μL CCK-8 溶液（注意不要产生气泡，轻轻混匀）。
c.将培养板在培养箱内孵育适当时间（一般 0.5~2 h）。
d.使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。

4. 细胞增殖/毒性检测

a.96 孔板中每孔接种 100μL 的细胞悬液，在细胞培养箱预培养 24 h(37℃，5% CO_2)。
b.向每孔加入 10μL 不同浓度的待测物质。
c.将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（依据待测药物而定，例如 6，12，24 或 48h）。
d.向每孔加入 10μL CCK-8 溶液（注意不要产生气泡，轻轻混匀）。
e.将培养板在培养箱内孵育适当时间（一般 0.5~2 h）。
f.使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。

5. 计算公式

细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%
抑制率=[(对照孔-实验孔)/(对照孔-空白孔)]×100%
实验孔(含有细胞、培养基、CCK-8、待测物质的孔的吸光度)
对照孔(含有细胞、培养基、CCK-8 的孔的吸光度，没有待测物质)
空白孔(含有培养基、CCK-8 的孔的吸光度，没有细胞和待测物质)

注意事项

1.本产品仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2.建议调试合适的接种细胞的数量和加入 CCK-8 溶液后培养的时间。当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞至少 1000 个/孔(100μL 培养基)，白细胞至少 2500 个/孔(100μL 培养基)。建议实验前设定几个不同细胞数量的梯度孔进行条件测试，细胞培养时间和处理方法根据实验情况而定，加入 CCK-8 溶液后（加入体积为每孔细胞培养液体积的 10%），在 37℃细胞培养箱中孵育，不同时间点后测 450nm 处的吸光度(CCK-8 敏感性高，一些细胞 0.5 h 后就可以测定第一次)。
3.CCK-8 试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化反应，如果待检测体系中有较多还原剂（或抗氧化剂）会造成背景 OD 值升高，干扰检测结果。如果实验中有还原剂，请检查背景的 OD 值，设法先去除还原剂干扰。例如：可在加入 CCK-8 溶液之前更换新鲜的培养基，以去除待测药物的影响。当待测药物影响比较小时，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。
4.进行药物抑制实验时，如果药物中含有金属，如 Pb^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}等金属会对 CCK-8 溶液的显色反应产生影响，从而导致检测的灵敏度降低。
5.如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加 CCK-8 检测。细胞培养基酚红不影响测定结果。
6.为使 CCK-8 试剂盒培养基充分混匀，减少 CCK-8 在移液器上的残留，建议加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂，混匀后加样。
7.若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 0.1 M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，室温避光保存，24 h 内检测，吸光度不会受到影响（加入 1% SDS 溶液的体积与加入 CCK-8 溶液的体积相同）。
8.如果吸光值很低，可以适当增加细胞数量或者延长加入 CCK-8 溶液后孵育的时间。