



Cell Counting Kit-8 (500T)细胞增殖/存活检测试剂盒

试剂盒反应原理简介:

Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒, YBK-001, 500T) 是检测细胞增殖、细胞存活和细胞毒性的试剂盒, 是一种基于水溶性四唑盐的广泛应用快速高灵敏度检测试剂盒, 为 MTT 法的替代方法, 试剂盒中采用水溶性四唑盐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 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, 颜色的深浅和细胞数目呈良好线性关系。

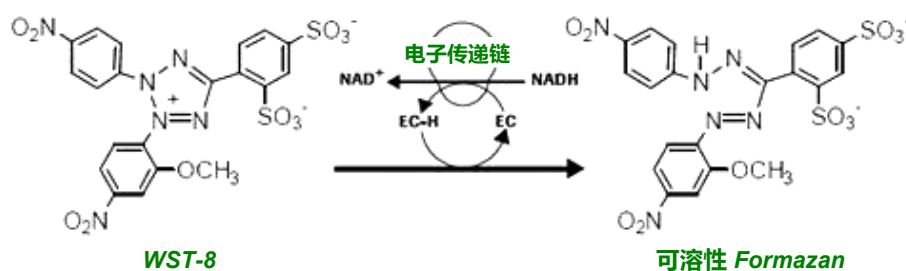


图 1. WST-8 化学结构和反应原理图

CCK-8 和 MTT 或其它 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点:

- ★ 检测灵敏度更高, 更易溶解, 并且更稳定;
- ★ 一次性加入, 减少操作误差, 方便快捷;
- ★ 水溶性, 无需换液, 尤其适合于悬浮细胞, 减少离心丢失细胞的烦恼;
- ★ 无需放射性同位素和有机溶剂, 细胞毒性低;
- ★ 酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响;
- ★ 无需预制, 即开即用;
- ★ 特别适于高通量药物筛选。

试剂盒使用说明:

1. 接种细胞悬液于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 每孔细胞数>1000 个(如采用其他 24/48 孔板, 培养体系中的溶液量和细胞数目按照比例扩大)。将培养板在培养箱预培养 (在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下过夜稳定或>5 小时)。
2. 做细胞数目测定时, 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液 (采用 24/48 孔板, 加入 CCK-8 溶液的量按比例增加, 如 400 μ l 细胞培养体系中加入 40 μ L CCK-8 溶液), 本步注意不要生成气泡, 气泡折光影响 O.D 值)。

3. 将培养板在二氧化碳培养箱内孵育 1.0-4.0 小时（可间歇在酶标仪上测定，选择最佳的时间点），大部分细胞 1-2 小时（37℃，5% CO₂ 的条件下）合适。



Yiyuan Biotechnologies.

Guangzhou • China

•Phone: 020-38882231 •Mobile:13631373865 email. yiyuanbiotech@126.com

4. 用酶标仪测定在 450-490 nm 处的吸光度（OD 值）以 600-650nm 为参考(参比波长)。
5. 如果暂不测定 O.D 值，打算以后测定的话，向每孔中加入 1% w/v SDS 溶液或 0.1 M HCl 溶液 10μL，并避光保湿室温条件下无菌保存 24-36 小时内有效。

注意事项：

- ◆ 使用 96 孔板检测培养时间较长需考虑蒸发的问题。由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发，采取弃用周围一圈的办法，改加 PBS，无菌水或培养液；也可把孔板置于湿度充分的地方缓解蒸发。
- ◆ 如细胞因培养时间较长，pH 发生变化而培养基的颜色变化，建议加 CCK-8 试剂前更换新培养基。
- ◆ 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，例如抗氧化剂会干扰检测，需设法去除后测定。
- ◆ 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。
- ◆ 如要计算细胞具体数目，需做标准曲线，其方法是将密度较高(不超过 10⁷/μL 数量级)的细胞按比例（一般是 1/2, 1/3）稀释后，一般要做 6-10 个细胞浓度梯度（最低的浓度细胞数目不低于每 1000 个，即 104/ml），然后按照 OD 值绘制标准曲线。此法也可用来检验试剂质量：
详：将状态良好的贴壁细胞消化终止后（悬浮细胞直接用），保持浓度适中（可通过终止消化时加入完全培养基的毫升数决定），在 96 孔板上加入 0,1, 2,4,8,16,32,64, 80, 100 ul 细胞（为一组），不足 100ul 的孔加培养基补足到 100ul（原理同蛋白定量），做三到四组减少操作误差。将培养板在培养箱内孵育 1.0-4.0 小时（间歇在酶标仪上测定，选择最佳时间点），大部分细胞 1-2 小时合适。最大的 OD 值在 0.5-2.0 之间，OD 值低于 0.5 表明细胞数（密度）偏低，大于 2.0 细胞数偏高，需调整细胞浓度重新做。
- ◆ 细胞存活（Cell viability）计算方法为： $\text{Cell viability}(\%) = (\text{加药处理组的 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ ，空白组 OD 值是指含有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度。
- ◆ 凋亡率的计算方法： $(\text{对照组 OD 值} - \text{加药处理组的 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ 。
- ◆ 增殖率的计算方法： $(\text{加药处理组的 OD 值} - \text{对照组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ 。
- ◆ 培养基中的酚红或普通血清可以增加空白 OD 值但对实验不会产生影响(以上的计算扣除空白 OD 值)。
- ◆ 为了您的健康和安，请穿实验服并戴一次性手套进行上述操作。

保存条件：

4℃避光保存一年有效。-20℃下避光可以保存 2 年。如需要长期保存，推荐在-20℃储藏。

公司网址：www.yiyuanbiotech.com

联系电话：020-38882231

地址：广州市越秀区中山二路 74 号

E-mail: yiyuanbiotech@126.com