

Cell Counting Kit-8 Plus (500 次)

产品信息

货号	ABK0036C-5 mL
规格	5 mL
储存条件	-20°C 避光, 12 个月

产品简介

Cell Counting Kit-8 Plus, 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、高灵敏度检测的试剂盒。WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物, 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。脱氢酶产生的 formazan 的量与活细胞的数量呈直接的线性关系。

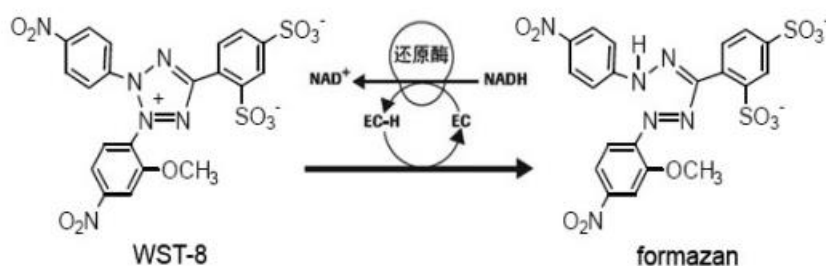


图1. WST-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

图 1. WST-8 检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

CCK-8 plus 经优化后灵敏度高于普通的 CCK-8 试剂, 仅需要 0.5-1h 的孵育时间即可进行检测, 大大缩短了检测的时间。该试剂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。CCK-8 Plus 试剂操作简单便捷, 在检测过程中无需洗涤细胞、收集细胞, 也无需用到有机溶剂来溶解 formazan, 对于细胞无明显毒性。

细胞活性检测



1. 将细胞悬液均匀铺板于 96 孔板中（100 μ l /孔），于培养箱中培养一段时间，待细胞稳定，即可进行实验。
2. 向 96 孔板的每个孔中加入 10 μ l CCK-8 Plus 溶液。在这个过程中尽量不要引入气泡，减少气泡带来的 OD 值干扰；
3. 将加样后的 96 孔培养板放在培养箱中孵育 0.5-3h（大多数情况，孵育 0.5-1h 足够，具体孵育时间以具体实验进行调整）。
4. 孵育结束后，混匀，用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度（如果不立刻检测，可每个孔加入 10 μ L 1% W/V SDS 或 0.1M HCl，盖好盖子并在室温下避光保存，24h 内不会观察到吸光度变化 注：建议加完及时检测）。

细胞增殖/毒性检测

1. 将细胞悬液均匀铺板于 96 孔板中（100 μ L /孔，约 5000 个细胞/孔），于培养箱中培养 24h 待用。
2. 向孔中加入 10 μ L 不同浓度的待测物质。
3. 将加样后的 96 孔培养板放在培养箱中孵育适当的时间长度（例如：6，12，24 或 48h）。
4. 加完样的孔中加入 10 μ L CCK-8 Plus 溶液。在这个过程中尽量不要引入气泡，减少气泡带来的 OD 值干扰；
5. 将培养板在培养箱中孵育 0.5-3h。
6. 混匀，使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度（如果不立刻检测，可每个孔加入 10 μ L 1% W/V SDS 或 0.1M HCl，盖好盖子并在室温下避光保存，24h 内不会观察到吸光度变化 注：建议加完及时检测）。

数据分析

不同的指标统计，数据分析不同，以下是推荐的一种方法。

$$\text{细胞存活率 (\%)} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

$$\text{抑制率 (\%)} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100$$

As = 实验孔吸光度（含有细胞，培养基，CCK-8 Plus 和待测化合物的孔的吸光度）

Ab = 空白孔吸光度（含有培养基和 CCK-8 Plus 的孔的吸光度）

Ac = 对照孔吸光度（含有细胞，培养基和 CCK-8 Plus 的孔的吸光度）

制作标准曲线

1. 细胞计数板计数细胞悬液中的细胞数



2. 使用培养基, 等比稀释细胞悬液为一个浓度梯度, 通常需要 5-7 个浓度梯度, 每组至少三个复孔, 然后接种细胞。(注意每孔的细胞数量。如果您将细胞悬液稀释在管中, 在加入培养板的孔之前, 请小心再次混匀细胞。每孔中细胞悬液的体积应该是一致的。)

3. 培养直至细胞贴壁(通常 2-4h), 然后每 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 Plus。继续孵育 0.5-3h, 混匀, 用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。制作出一条以细胞数为 X 轴坐标, OD 值为 Y 轴坐标的标准曲线。

可以基于该曲线确定待测样品的细胞数。使用此标准曲线的先决条件是培养检测条件相同。

注意事项

1. 避免反复冻融, 冻融后可能有少量沉淀产生, 可以平衡至室温冰尽量使沉淀溶解。如果短期频繁使用, 建议放 4 $^{\circ}$ C 保存, 并尽量在 2 周内用完。
2. 对于贴壁细胞, 每孔至少需要 1000 个细胞 (100 μ L 培养基)。对于白细胞, 由于灵敏度较低, 每孔至少需要 2500 个细胞 (100 μ L 培养基), 推荐的 96 孔板每孔最大细胞数为 25000。如果使用 24 孔或 6 孔板进行该检测, 请计算相应的每孔的细胞数, 并调整 CCK-8 Plus 的体积, 使其为每孔总液体体积的 10%。
3. CCK-8 Plus 测定是基于活细胞中的脱氢酶活性, 影响脱氢酶活性的条件或化学物质可能导致实际活细胞数与使用 CCK-8 Plus 测定活细胞数之间有差异。
4. CCK-8 Plus 可能与还原剂反应生成 WST-8 formazan。如果使用还原剂 (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。
5. 注意不要在孔中引入气泡, 因为它们会干扰 OD 值。
6. 如果您想对 CCK-8 Plus 溶液进行灭菌, 请使用 0.2 μ m 的膜过滤溶液。
7. 如果细胞悬液中存在高浊度, 测量并减去样品在 600nm 或更高波长的 OD 值。
8. 该试剂盒可用于大肠杆菌, 但不能用于酵母细胞。
9. 将细胞接种最外围一圈孔中的培养基容易蒸发, 可以用 PBS, 水或培养基填充周围这些孔。
10. 如果没有 450 nm 滤光片, 也可以使用吸光度在 430 和 490 nm 之间的滤光片, 450 nm 滤光片具有最佳灵敏度。
11. 药物中金属离子的存在可能会影响 CCK-8 Plus 的灵敏度。终浓度为 1 mM 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 10 mM 的话, 将会 100% 抑制。