

CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒使用说明书

描述: Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒基于WST-8试剂, 可对细胞增殖和细胞毒性进行快速高度灵敏的检测。

WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物, 其在电子耦合试剂 1-Methoxy-PMS 存在的情况下, 可以被活细胞线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色水溶性的 Formazan。然后用酶标仪在 450 nm 波长附近 (430~490nm)测定光吸收值, 可反映活细胞的数量和代谢活力, 并由此反映细胞的存活、增殖、生长和毒性等状态。例如加入细胞生长因子后, 增殖生长旺盛的细胞能够还原生成更多的 Formazan, 并具有较高的光吸收度; 反之, 抗增殖抗肿瘤或细胞毒药物处理后, 细胞生长变慢或毒性变大, 光吸收度下降。而对于同种类型的细胞而言, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。与传统的 MTT 或其他类似的方法相比, 本试剂盒生成的 Formazan 是水溶性的, 而且更加稳定, 其检测的线性范围更宽、灵敏度也更高。

特点:

- ◆简单快捷、即开即用, 可进行大规模样品检测
- ◆与其他方法相比, 检测线性范围更宽, 灵敏度更高
- ◆对细胞无明显毒性, 可在不同时间进行多次测定, 便于寻找最佳测定时间

适用: 可用于细胞增殖和细胞毒性相关的检测, 如: 细胞因子等诱导的细胞增殖检测; 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等。

组成与储存: CCK-8试剂: 2mL, 5mL, -20℃ 避光保存2年, 4℃ 避光保存1年, 反复冻融可能会增加背景值。

所需仪器: 酶标仪, 96孔培养板。

使用方法:

1. 使用与酶标仪相匹配的 96 孔培养板。通常进行细胞增殖实验时, 每孔加 100 微升 2000 个细胞, 而测定细胞毒性时, 每孔加 100 微升 5000 个细胞, 应根据所用的细胞类型、增殖速度进行调整。注意设置 2-3 个重复孔, 分别为接受处理的细胞组, 未处理的细胞对照组和无细胞培养基的对照组。37℃ 培养细胞 24-48 小时, 然后给予特定的药物或物理化学因素刺激。
2. 处理结束后, 向每孔每 100 μl 培养基中加入 10 μl CCK-8 试剂 (注意在加入的过程中不要产生气泡, 否则会影响 OD 值的读取), 37℃ 培养箱内孵育 1-4 小时, 培养时间的长短依据细胞种类、数量、活力等情况而定。初次实验者, 可以选择几个不同的培养时间点如 1h, 2h, 4h 用酶标仪进行检测, 以便选择出适宜的吸光度范围进行实验。
3. 在 450nm 测定 OD 吸光度并进行计算。如无 450nm 滤光片可用 430-490nm 范围内的滤光片。注意: 若样品为浑浊的细胞悬液时, 可以选用大于 600nm 的波长, 如 650nm 作为参比波长进行双波长测定。
4. 结果判断: 细胞增殖或毒性 = 100% × (OD_{实验} - OD_{本底}) / (OD_{对照} - OD_{本底})。

其中, OD_{实验}是接受处理细胞组的 OD 值, OD_{对照}是未处理细胞对照组的 OD 值, OD_{本底}是无细胞培养基的对照组 OD 值。处理后细胞增殖或毒性变化表示为未处理对照的百分数。

说明 :

1. 在进行培养或检测反应时, 为避免培养基蒸发体积减少, 可用封口膜部分封闭培养板。
2. 为减少由于 CCK-8 试剂在枪头上或孔壁上的残留所带来的误差, 可以在加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂混匀后再进行加样。
3. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶的催化反应, 因此当检测体系中有还原性物质如葡萄糖、维生素 C 等存在时, 会干扰测定。
4. 可在非 96 孔板进行 CCK-8 测定, 但需要成比例加大反应体系。反应后用比色杯测定 OD。
5. 用酶标仪检测之前, 要确保每个孔内没有气泡, 否则会影响测定。
6. 加入 CCK-8 试剂后, 培养时间要根据不同的细胞种类、数量和细胞状态来确定。通常情况下, 相同的培养时间, 悬浮细胞和贴壁细胞相比, 吸光度较低, 可以延长培养时间或者增加细胞数量。此外, 白细胞可能也需要较长的培养时间。
7. 培养基中含有酚红时, 可以通过扣除培养基背景本底的吸光度去除酚红的影响, 而不会对检测产生影响。

参考文献:

- Maaria Iknoen, Pinchas Cohen et al. PNAS, 2003, 100: 13042-13047
Sachiko Sakon, Hiroyasu Nakano et al. The EMBO Journal, 2003, 22: 3898-3909
Akihhide Takeuchi, Ken-ichi Isobe et al. Nature Genetics, 2003, 33: 172-176
Mohammed A. S. Khan, Earl R. Stadtman et al. PNAS, 2004, 101: 11560-11565