

Cell Counting Kit (CCK 试剂盒)

产品简介：

Cell Counting Kit 简称 CCK 试剂盒，为 MTT 法的替代方法，是一种基于 WST (水溶性四唑盐，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)，广泛应于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。

产品优势：

细胞计数方法	CCK 法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法
形成的 formazan 的水溶性	好	差	好	好
产品性状	1 瓶溶液	粉末	2 瓶溶液	溶液
使用方法	无需预制	配成溶液后使用	现配现用	无需预制
检测灵敏度	高	高	很高	很高
检测时间	最短	较长	较短	较短
检测波长	430-490nm	560-600nm	420-480nm	420-480nm
细胞毒性	很低,细胞形态不变	高,细胞形态完全消失	很低,细胞形态不变	很低,细胞形态不变
试剂稳定性	很好	一般	较差	一般
大批量样品检测	非常适合	可以	非常适合	非常适合
便捷程度	非常便捷	一般	便捷	便捷

产品用途：

药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验

储存条件：

4℃干燥避光，可保存 12 个月。

使用方法：

A. 制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

- 1) 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。
- 2) 按比例 (如：1/2 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 3-5 个细胞浓度梯度，每组 3-6 个复孔。
- 3) 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后加 CCK 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 (X 轴)，OD 值为纵坐标 (Y 轴) 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是实验条件的一致性，便于确定细胞接种数量以及加入 CCK 后的培养时间。)

B. 细胞活性检测

- 1) 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 (在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下)。
- 2) 向每孔加入 10 μ L 的 CCK 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 3) 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 4) 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
- 5) 如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

C. 细胞增值-毒性检测

- 1) 在 96 孔板中配置 100 μ L 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时 (在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下)。
- 2) 向培养板加入 10 μ L 不同浓度的待测物质。
- 3) 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 小时)。
- 4) 向每孔加入 10 μ L CCK 溶液 (注意不要再孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 5) 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 6) 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
- 7) 如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

注意事项:

如果待测物质有氧化性或还原性, 可在加 CCK 之前更换新鲜培养基 (除去培养基, 并用培养基洗涤细胞两次, 然后加入新的培养基), 去掉药物影响。当然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药物后的空白吸收即可。

特别提示:

①建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK 试剂后的培养时间。

②有条件的情况下建议采用多通道移液器, 可以减少平行孔间的差异。

加入 CCK 试剂时, 建议斜贴着培养板侧壁, 不要插到培养基页面下加, 容易产生气泡, 会干扰 OD 值读数。

③白细胞可能需要培养较长时间。

④当使用标准 96 孔板时, 贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100 μ L 培养基)。

检测白细胞时的灵敏度相对较低, 因此推荐接种量不低于 2,500 个/孔 (100 μ L 培养基)。

如果要使用 24 孔板或 6 孔板实验, 请先计算每孔相应的接种量, 并按照每孔培养基总体积的 10% 加入 CCK 溶液。

⑤如果没有 450nm 的滤光片, 可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片, 但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。

⑥培养基中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。

活力计算：

细胞活力* (%) = [A(加药)-A (空白)]/[A (0 加药) -A (空白)] ×100

A (加药) : 具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A (空白) : 具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A (0 加药) : 具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

*细胞活力：细胞增殖活力或细胞毒性活力

***本试剂仅供实验室研究使用**