

Cell Counting Kit (CCK 试剂盒)

● 产品规格:

目录号	产品名称	规格	包装
025	Cell Counting Kit	100 次	1mL
026	Cell Counting Kit	500 次	5mL
027	Cell Counting Kit	1000 次	10mL
028	Cell Counting Kit	3000 次	30mL

● 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) 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。

CCK 法与其它检测方法之间的比较:

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

CCK 用途: 药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验

● 操作说明:

一、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 (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 (试用此标准曲线的前提是实验的条件要一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK 后的培养时间。)

二、细胞活性检测

- 1、在 96 孔板中接种细胞悬液 (100μL/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (在 37°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。

三、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：如果待测物质有氧化性或还原性的话，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。

备注：

- 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，可以减少平行孔减的差异。加入 CCK 试剂时，建议斜贴着培养板壁加，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

保存条件： 4℃干燥避光保存，有效期一年。