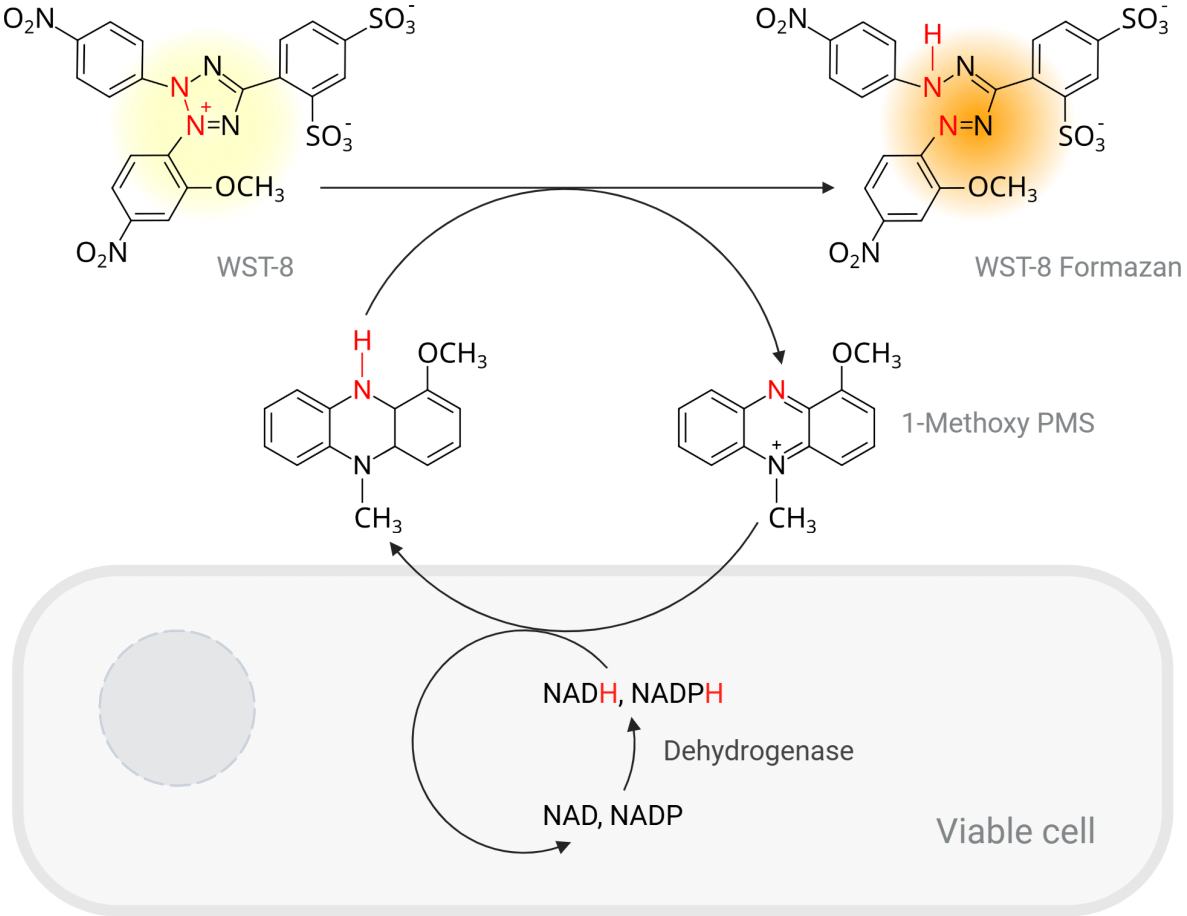
Оценка пролиферации и жизнеспособности клеток с помощью CCK-8

CCK-8 (Cell Counting Kit 8) — высокочувствительный колориметрический метод, применяемый для определения жизнеспособности клеток, их пролиферации и цитотоксичности.

Принцип работы основан на использовании водорастворимой тетразольной соли WST-8. В живых клетках эта соль восстанавливается внутриклеточными дегидрогеназами до водорастворимого формазанового красителя оранжевого цвета. Интенсивность окраски, измеряемая с помощью ридера для микропланшетов при определенной длине волны (около 450 нм), прямо пропорциональна количеству метаболически активных клеток.



Метод CCK-8 прост в использовании и обладает меньшей токсичностью и большей чувствительностью, чем тесты на основе других солей тетразолия, такие как MTT, XTT, MTS или WST-1.

CCK-8 (x1972) представляет собой готовую к применению лиофилизированную смесь, содержащую соль тетразолия WST-8 и медиатор электронов 1-Methoxy PMS в необходимых концентрациях.

Ниже описан пошаговый протокол работы с CCK-8.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Восстановление раствора

1. Добавьте в емкость с лиофилизированной смесью (**23972**, 100 тестов) 1 мл деионизованной воды и перемешайте содержимое в течение 1 мин на вортексе.

   Добавьте в емкость с лиофилизированной смесью (**33972**, 500 тестов) 5 мл деионизованной воды и перемешайте содержимое в течение 1 мин на вортексе.

   Добавьте в емкость с лиофилизированной смесью (**43972**, 1000 тестов) 10 мл деионизованной воды и перемешайте содержимое в течение 1 мин на вортексе.

2. Восстановленный раствор можно хранить при 4°C не более 1 месяца.

Определение числа клеток

Перед началом экспериментов с количественным определением абсолютного числа необходимо построить стандартную кривую, коррелирующую оптическую плотность (ОП) с числом клеток в постоянных экспериментальных условиях.

1. Подсчитайте число клеток в суспензии с помощью цитометра. Посейте клетки в 96-луночный планшет с рассчитанной плотностью.
2. Последовательно разбавляйте клеточную суспензию в культуральной среде для создания градиента концентраций клеток. Рекомендуется использовать минимум 3–5 различных концентраций; каждую реплицировать в 3–6 лунках.
3. Культивируйте клетки до их адгезии к стенкам. Затем добавьте реагент ССК-8 в каждую лунку и инкубируйте в течение заданного времени.
4. Измерьте поглощение при 450 нм.
5. Постройте стандартную кривую, откладывая среднее значение ОП (ось Y) в зависимости от соответствующего известного числа посеянных клеток (ось X). Эта кривая позволяет определить количество клеток в неизвестном образце, культивируемом в идентичных экспериментальных условиях.

Анализ жизнеспособности клеток

1. Посейте суспензию клеток (100 мкл/лунку) в 96-луночный планшет.
2. Инкубируйте планшет в течение 24 часов в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2.
3. Добавьте по 10 мкл реагента ССК-8 в каждую лунку, избегая попадания пузырьков воздуха, так как они могут повлиять на показания поглощения.
4. Инкубируйте планшет дополнительно 2 часа.
5. Измерьте поглощение при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера.
6. (Опционально) Если измерения невозможно провести немедленно, реакцию можно стабилизировать, добавив в каждую лунку по 10 мкл 0,1 М HCl или 1% (вес/объём) раствора SDS. Затем планшет следует накрыть и хранить в темноте при комнатной температуре. Значения поглощения в этих условиях остаются стабильными до 24 часов.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

Анализ пролиферации клеток и цитотоксичности

1. Посейте суспензию клеток (100 мкл на лунку) в 96-луночный планшет.
2. Инкубируйте планшет в течение 24 часов в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2.
3. Добавьте по 10 мкл исследуемого соединения в различных концентрациях в соответствующие лунки.
4. Инкубируйте клетки в планшете в течение необходимого времени.
5. Добавьте по 10 мкл реагента CCK-8 в каждую лунку, избегая образования пузырьков.
6. (*Опционально*) Если исследуемое соединение обладает собственными окислительными или восстановительными свойствами, перед добавлением CCK-8 следует заменить питательную среду на свежую, без лекарственного препарата, чтобы избежать артефактов. Для этого аспирируйте старую среду, дважды промойте лунки PBS или свежей средой, а затем добавьте 100 мкл новой среды перед добавлением CCK-8.
7. Инкубируйте планшет в течение 2 часов и измерьте поглощение при длине волны 450 нм.
8. (*Опционально*) Если поглощение невозможно измерить немедленно, реакцию можно стабилизировать, добавив в каждую лунку по 10 мкл 0,1 M HCl или 1% (вес/объем) раствора SDS. Затем планшет следует накрыть и хранить в темноте при комнатной температуре. Значения поглощения остаются стабильными до 24 часов в этих условиях.

Расчет жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток выражается в процентах и рассчитывается по следующей формуле:

$$\textit{Жизнеспособность клеток (\%)} = [A\ (\textit{обработанных}) - A\ (\textit{пустых})] / [A\ (\textit{необработанных}) - A\ (\textit{пустых})] \times 100$$

Где:

- *A (обработанных)* — это поглощение в лунке, содержащей клетки, CCK-8 и тестируемое соединение.
- *A (пустых)* — это поглощение в лунке, содержащей только среду и CCK-8 (без клеток).
- *A (необработанных)* — это поглощение в лунке, содержащей только клетки и CCK-8 (без тестируемого соединения).

Данный расчет дает значение, отражающее либо пролиферативную активность клеток, либо цитотоксическую жизнеспособность.

Примечания и технические рекомендации

- Анализ методом CCK-8 основан на реакции восстановления, катализируемой ферментом дегидрогеназой. Поэтому восстановители и антиоксиданты, присутствующие в образце, могут искажать результаты и должны быть удалены перед анализом.
- Настоятельно рекомендуется провести предварительные эксперименты для оптимизации ключевых параметров, таких как плотность посева клеток и время инкубации после добавления к клеткам реагента CCK-8.
- Лейкоцитам и другим неадгезивным типам клеток может потребоваться более длительное время культивирования

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

для получения адекватного сигнала.

- Для адгезивных клеток в стандартном 96-луночном планшете рекомендуется минимальная плотность посева 1000 клеток на лунку в 100 мкл среды. В связи с меньшей чувствительностью метода при анализе лейкоцитов плотность посева должна быть минимум 2500 клеток на лунку.
- При использовании планшетов разных форматов (например, 24-луночных или 6-луночных) пропорционально масштабируйте количество клеток и объем реагента ССК-8, сохраняя объем ССК-8 на уровне 10% от общего объема среды в лунке.
- Хотя оптимальный максимум поглощения WST-8 составляет 450 нм, допустимы фильтры в диапазоне 430–490 нм, хотя и с пониженной чувствительностью.
- Фоновое поглощение, вносимое феноловым красным в питательную среду, автоматически учитывается и вычитается на этапе расчета с помощью контрольных пустых лунок.
- Наличие пузырьков воздуха в лунках значительно искажает результаты измерений поглощения, поэтому они должны быть удалены перед считыванием данных с планшета.
- Используйте стандартные средства индивидуальной защиты (СИЗ), включая защитные очки, перчатки, и лабораторный халат, во время всей процедуры анализа.

Условия хранения:

- Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре.
- Хранение: при при температуре -20°C в защищенном от света и влаги месте.
- Срок годности: 24 месяца с даты поставки.

Lumiprobe Corporation
115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com

Lumiprobe Limited
Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD
2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.
10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinwen Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com