

# Оценка пролиферации и жизнеспособности клеток с помощью ССК-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 ССК-8 прост в использовании и обладает меньшей токсичностью и большей чувствительностью, чем тесты на основе других солей тетразолия, такие как МТТ, ХТТ, МТЅ или WST-1.

ССК-8 (х1972) представляет собой полностью готовый к использованию раствор, содержащий соль тетразолия <u>WST-8</u> и медиатор электронов 1-Methoxy PMS в необходимых концентрациях.

Ниже описан пошаговый протокол работы с ССК-8.

Email: il@lumiprobe.com

#### Lumiprobe Co., Ltd.



#### 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<sub>2</sub>.
- 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.

## 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°С и 5% CO<sub>2</sub>.
- 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 ССК-8 в каждую лунку, избегая образования пузырьков.
- 6. (*Опционально*) Если исследуемое соединение обладает собственными окислительными или восстановительными свойствами, перед добавлением ССК-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 ССК-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 М 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:

Жизнеспособность клеток (%)  $= [A (обработанных) - A (пустых)] / [A (необработанных) - A (пустых)] <math>\times 100$ 

#### Где:

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

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

## Примечания и технические рекомендации

- Анализ методом ССК-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 ССК-8.
- Лейкоцитам и другим неадгезивным типам клеток может потребоваться более длительное время культивирования 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:

- Хранение при  $0-5^{\circ}C$ .
- ССК-8 стабилен в течение одного года при температуре 0-5°С в защищенном от света месте.
- Для более длительного хранения можно заморозить и хранить при температуре -20°C.
- Избегайте повторного размораживания и замораживания, поскольку это приводит к увеличению фонового уровня, что мешает результатам анализа.
- Срок годности: 12 месяцев с даты поставки.

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