

ССК-8 - жизнеспособность и цитотоксичность

Артикулы Servicebio: G4103-1ML, G4103-5ML

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО / ПОДГОТОВКА И РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ

Что подготовить

Понадобятся культура клеток, среда, прозрачный планшет и фотометр с каналом 450 нм. Составьте карту планшета до посева. Разделите время воздействия исследуемого вещества и время реакции с ССК-8: это разные этапы, и оба должны быть указаны в протоколе. Проверьте, не окрашивает ли сам препарат среду.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПО ИНСТРУКЦИИ SERVICEBIO

Для какой задачи

Колориметрическая оценка метаболической активности живых клеток с WST-8. Подходит для исследований пролиферации и цитотоксичности. Показатель зависит от активности клеток; для определения их числа нужна калибровка.

Ключевые условия

Для 96-луночного планшета: 100 мкл клеточной суспензии и 10 мкл реагента; инкубация 2 ч, измерение при 450 нм. В опыте с препаратами сначала проводят заданное воздействие, затем добавляют ССК-8.

Расчёт

Жизнеспособность, % = $(A_{\text{опыт}} - A_{\text{фон}}) / (A_{\text{контроль}} - A_{\text{фон}}) \times 100$. Контроль содержит клетки без исследуемого препарата; фон - среду и ССК-8 без клеток.

Что влияет на результат

Подберите плотность посева и время инкубации в предварительном опыте. Удалите пузырьки перед измерением. Восстановители и антиоксиданты могут исказить реакцию; производитель предусматривает смену среды для устранения влияния исследуемого вещества.

Хранение

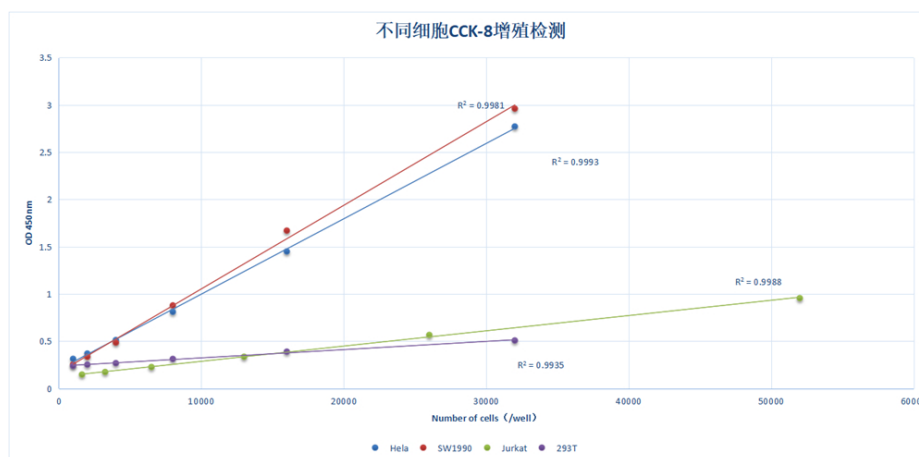
2-8 °C - 12 месяцев; при длительном хранении -20 °C - 24 месяца. Защищать от света.

Как спланировать постановку • рекомендации Молекулаб

Для первой постановки предлагаем подобрать плотность клеток на отдельном небольшом опыте. Контрольная группа должна давать измеримый сигнал без насыщения. Предусмотрите технические повторы и независимые повторения эксперимента; несколько лунок из одной суспензии сами по себе не являются независимыми биологическими повторениями. При использовании растворителя включите соответствующий контроль.

Результат и контроль качества

Пояснения к методу и практические рекомендации Молекулаб



Servicebio: зависимость A450 от числа клеток разных линий. Наклон различается; чужая калибровка не заменяет собственную.

Что означает результат

Изменение A450 отражает восстановительную активность клеток. Снижение сигнала может сопровождать уменьшение числа клеток или изменение их метаболизма; само по себе оно не определяет механизм гибели. ССК-8 не показывает расположение отдельных живых клеток, поскольку окрашенный продукт находится в растворе. Для вывода об апоптозе нужен отдельный метод.

Какие контроли нужны

Помимо клеток без воздействия и стандартного фона, для окрашенного или химически активного вещества полезна проба «среда + вещество + реагент» без клеток. Она проверяет помеху, но не заменяет клеточный контроль. Если фоновый вклад меняется с дозой, способ коррекции следует проверить до расчёта всей серии.

Если результат вызывает вопросы

Контроль почти не отличается от фона	Проверьте число и состояние клеток; проведите предварительную оптимизацию.
Результат выше 100%	Это относительный сигнал, а не доля живых клеток при прямом подсчёте; проверьте метаболический эффект и фон.
Большой разброс лунок	Проверьте однородность посева, пузырьки и интервалы внесения реагента.

Что сохранить в лабораторном журнале

Сохраняйте карту планшета, исходные A450, состав контрольных лунок, плотность посева, длительность воздействия и реакции. Итог формулируйте как относительную метаболическую активность при заданных условиях.