

## Cell Counting Kit-8

### 【产品参数】

产品名称: Cell Counting Kit-8 (CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒, 增强型

产品货号: KC0123

产品规格: 1000T、5000T、10000T

### 【产品简介】

Cell Counting Kit-8 (简称CCK-8), 是一种基于WST-8而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。

CCK-8试剂中含有WST-8 (化学名: 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐) 是一种类似于MTT的化合物, 它在电子耦合试剂1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯 (1-Methoxy PMS) 存在条件下, 可以被线粒体内的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲瓚产物Formazan (参考图1), 生成的Formazan数量与活细胞的数量成正比。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析, 细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。

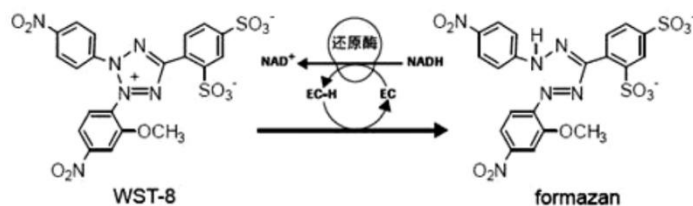


图1. CCK-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

GeneRun的CCK-8试剂盒具有灵敏度高、反应时间短、线性范围宽、数据可靠、重现性好等特点, 可以广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验。

### 操作步骤

#### 制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

1. 制备细胞悬液: 细胞计数。
2. 接种到 96 孔板中: 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 个重复孔。每孔 100  $\mu$ l 细胞悬液。
3. 37°C 培养箱中培养: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时, 如果不需要贴壁, 这步可以省去。
4. 每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 增强型溶液: 由于每孔加入 CCK-8 量比较少, 有可能因试剂沾在孔壁带来误差, 建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基, 以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡, 以免影响吸光度的检测。
5. 培养箱内孵育一定时间后测定 450nm 吸光度, 制作出一条以细胞数量为横坐标 (X 轴), 吸光度为纵坐标 (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的条件要一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间。)

### 细胞活性检测

1. 制备细胞悬液: 细胞计数。
2. 接种到 96 孔板中: 根据合适的铺板细胞数, 每孔 100  $\mu$ l 细胞悬液, 可设置 3 个重复孔。

- 37℃培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 24h 小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。
- 每孔加入 10 μl CCK-8 增强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。
- 培养箱内孵育 0.5-4 小时：细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不一样，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。
- 测定 450nm 吸光度：如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入 10 μl CCK-8 反应终止液，遮盖培养板避光保存在 2-8℃，在 7 天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入 10 μl 自己配制的 0.1M HCl 溶液或 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。

## 细胞增殖-毒性检测

- 制备细胞悬液：细胞计数。
- 接种到 96 孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔 100 μl 细胞悬液，可设置 3 个重复孔。
- 37℃培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 24h 小时，如果不需要贴壁，这步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。
- 每孔加入 0-10 μl 不同浓度的待测药物。
- 37℃培养箱中培养：加入待测药物的培养时间，要看该物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的时间。
- 每孔加入 10 μl CCK-8 增强型溶液：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配制含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。（注意：如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基，以去掉药物影响。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。）
- 培养箱内培养 0.5-4 小时：细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不一样，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。
- 测定 450nm 吸光度：建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm，参比波长 600-650nm。如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入 10 μl CCK-8 反应终止液，遮盖培养板避光保存在 2-8℃，在 7 天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入 10 μl 自己配制的 0.1M HCl 溶液或 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。

## 计算公式

$$\text{细胞存活率} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

As：实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

Ac：对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物）的吸光度

Ab：空白孔（不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8）的吸光度

## 注意事项

- 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 试剂后的培养时间。

2. CCK-8 反应时间的确定：一般情况下，白细胞显色比较困难，因此需要增加细胞数量和延长 CCK-8 反应时间。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色，因此悬浮细胞在加入 CCK-8 培养 0.5-4 小时后，可先从培养箱取出，目测或用酶标仪测定显色程度，若显色困难可以继续培养数小时后再确定。对于贴壁细胞，CCK-8 的培养时间一般为 0.5-4 小时，在培养 20 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度。
3. 每孔接种细胞数：当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1000 个/孔 (100  $\mu$ 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 2500 个/孔 (100  $\mu$ 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-8 溶液。
4. 设定空白对照：在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度即为空白对照。在做加药实验 (细胞毒性实验) 时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。
5. 影响 CCK-8 测定的物质：由于 CCK-8 检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应，所以如果待测体系中存在氧化还原物质则可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此应设法去除这些物质的影响。酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响，培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除只含有培养基的对照孔中本底吸光度而消除，因此不会对检测结果造成影响。
6. 测定波长：如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议采用双波长进行测定，检测波长 450nm，参比波长 600-650nm。如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490nm 之间的滤光片，但是 450nm 检测灵敏度最高。
7. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
8. 如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加 CCK-8 检测。
9. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套

### 【储存条件及保质期】

4℃ 保存，若长期不使用，将本产品置于 -20℃ 保存，可适当延长保存时间；有效期为 12 个月。

### 【声明】

本产品仅用于研究用途，不适用于人类、治疗或诊断应用