

## 细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8), 增强型

## 【产品编码】

210817/210818

## 【包装规格】

产品组成	210817/500T	210818/1000T
CCK-8 增强型溶液	5 mL	10 mL
说明书	1份	1份

## 【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-甲基吩嗪磺酸二甲酯(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瓩产物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。

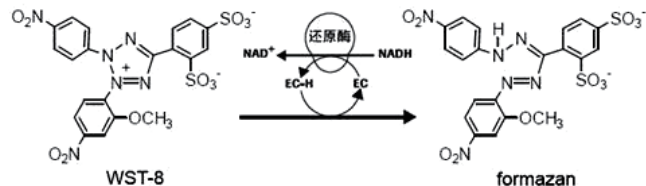


图1. CCK-8检测原理图(EC=electron coupling reagent,即电子耦合试剂)

CCK-8与以往的增殖/毒性测定试剂相比,具有明显优点(参考表1)。耐思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。

表1. 增殖/毒性测定试剂的比较

产品组成	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲瓩产物的水溶性	差(需加有机溶剂溶解)	好	好	好
检测灵敏度	高	很高	很高	最高
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
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

## 【操作步骤】

## 一、制作标准曲线(测定细胞具体数量)

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 μL细胞悬液。
3. 37℃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, 这一步可以省去。
4. 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。
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)。

## 二、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 μL细胞悬液, 可设置3个重复孔。
3. 37℃培养箱中培养: 细胞接种后贴壁大约需要培养24小时, 如果不需要贴壁, 这一步可以省去。也可以根据实验要求不同, 培养相应的时间。
4. 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。

仅供科研使用

## 细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8), 增强型

5. 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)。

6. 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。

### 三、细胞增殖-毒性检测

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 μL细胞悬液, 可设置3个重复孔。

3. 37℃培养箱中培养: 细胞接种后贴壁大约需要培养24小时, 如果不需要贴壁, 这一步可以省去。也可以根据实验要求的不同, 培养相应的时间。

4. 每孔加入0-10 μL不同浓度的待测药物。

5. 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。

6. 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)。

7. 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)。

8. 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。

### 四、计算公式

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

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

### 【储存条件及有效期】

4℃避光保存, 一年有效。-20℃可以储藏更久, 但反复冻融会增加背景值, 干扰实验测定, 因此请将经常使用的试剂保存在4℃。

### 【注意事项】

1. 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 μL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 μL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450nm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450nm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。

### 【基本信息】

生产企业: 无锡耐思生命科技股份有限公司

生产地址: 无锡市新吴区梅村工业园锡达路530号

售后服务单位: 无锡耐思生命科技股份有限公司

售后地址: 无锡市新吴区梅村工业园锡达路530号

联系方式: +86-510-68006788

邮箱: info@nest-wuxi.com