

细胞增殖/毒性检测 CCK8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)

包装清单

产品编号	产品名称	包装
KF-CCK08	细胞增殖/毒性检测 CCK8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)	500T
	说明书	1 份

产品描述

本试剂盒是一种基于 WST-8（水溶性四唑盐，一种类似于 MTT 的化合物）的细胞增殖与活性/毒性检测试剂盒，是用于细胞增殖和细胞毒性的迅捷极高灵敏度检测试剂盒。在电子耦合试剂存在的情况下，WST 被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臞染料，甲臞染料直接溶解在培养基中。细胞增殖越多越快，则培养基的颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

本试剂盒使用十分便捷，试剂盒包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的即用型 CCK-8 溶液，，无需其它准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞，可直接使用 96 孔板或者 384 孔板在酶标仪上检测，亦十分适合大规模，高通量的样品检测。

产品应用

- 用于生物活性因子的活性检测、抗肿瘤药物的筛选、细胞增殖的测定、细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。
- 用于大规模，高通量的样品检测。

使用方法

一、制作标准曲线（测定细胞具体数量）

1. 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。
2. 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 个复孔。
3. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后加 CCK-8 试剂培养一定时间后测定 OD 值，制作出一条以细胞数量为横坐标，OD 值为纵坐标的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量（适用此标准曲线的前提是实验的条件要一致，尤其加入 CCK-8 后的培养时间要一致）。

二、细胞活性检测

1. 在 96 孔板中接种细胞悬液（ $100 \mu\text{l}$ /孔）。将培养板放在培养箱中预培养（ 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ ）。
2. 向每孔加入 $10 \mu\text{l}$ 的 CCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，以免影响 OD 的读数）。

3. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。4. 用酶标仪测定 450nm 处的吸光度。5. 如果暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 $10\ \mu\text{l}$ 的 0.1M 的 HCl 溶液或 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光室温保存，24 小时内吸光度不会发生变化。

三、细胞增殖-毒性检测（以 96 孔板为例）

1. 在 96 孔板中配置 $100\ \mu\text{l}$ 的细胞悬液（通常细胞增殖实验每孔加入 $100\ \mu\text{l}$ 约 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 $100\ \mu\text{l}$ 约 5000 个细胞。具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小、细胞增殖速度的快慢等因素决定）。按照实验需要，进行预培养。

2. 向培养板加入 1- $10\ \mu\text{l}$ 不同浓度的待测药物刺激。

3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（后面有具体细胞的建议时间，例如：6、12、24 或 48 小时）。

4. 每孔加入 $10\ \mu\text{l}$ 的 CCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，以免影响 OD 读数）。如果起始的培养体积为 $200\ \mu\text{l}$ ，则需加入 $20\ \mu\text{l}$ CCK-8 溶液，其他情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作空白对照。如果担心所使用的药物会干扰检测，需设置加了相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。

5. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时（对于大多数情况孵育 1 小时就可以）。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等情况而定，初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 小时分别用酶标仪检测，然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。

6. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。可以使用大于 600nm 的波长，例如 650nm，作为参考波长进行双波长测定。

7. 如果暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 $10\ \mu\text{l}$ 0.1M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光室温保存，24 小时内吸光度不会发生变化。

注意：如果待测物质有氧化或还原特性，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基（先用培养基洗涤细胞两次），去掉药物影响。如果药物影响比较小，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。

数据分析

一、增殖分析

细胞活力* (%) = $\frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0\ \text{加药}) - A(\text{空白})} \times 100$

A (加药): 含有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度;

A (空白): 含有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度;

A (0 加药): 含有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

*细胞活力: 细胞增殖活力或细胞毒性活力。

二、毒性分析

IC50 的计算方法按照以下公式计算细胞存活率，绘制成图表，细胞存活率 50% 的值即为 IC50%。

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

As: 实验孔 (含有细胞、培养基、CCK-8、毒性物质)

Ac: 对照孔 (含有细胞、培养基、CCK-8, 无毒性物质)

Ab: 空白孔 (含有培养基、毒性物质、CCK-8, 无细胞)

注意事项

1. 由于使用 96 孔板进行检测, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发的的问题。一方面, 由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用周围一圈的办法, 改加 PBS, 水或培养液; 另一方面, 可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方, 以缓解蒸发。

2. 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。任何待测体系中存在还原剂, 例如一些抗氧化剂会干扰检测, 需设法去除。

3. 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。

4. 建议采用多通道移液器, 可以减少平行孔间的差异。加入 CCK-8 试剂时, 建议斜贴着培养板壁加, 不要插到培养基液面下加样, 溶液产生气泡, 会干扰 OD 读数。

5. 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 μ 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 μ l 培养基), 且培养时间长一些。如果要使用 24 孔板或 6 孔板实验, 需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。

6. 加入 CCK-8 溶液时, 如果细胞培养时间较长, 培养基颜色已变化或 pH 值变化, 建议换用新鲜的培养基。

7. 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, 通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去, 因此不会对检测造成影响。

8. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

产品声明

本产品仅供科学研究用途使用。如遇确认产品质量出现问题时, 承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。

储存条件

避光保存: -20 $^{\circ}$ C, 两年有效; 4 $^{\circ}$ C 保存, 一年有效。避免反复冻融。

常见问题解答

1. CCK-8 溶液对细胞的毒性大小如何？

答：CCK-8 溶液对细胞的毒性非常低。细胞在 CCK-8 法检测后仍然可以正常生长，并可以用于其它的细胞实验。但为了避免 CCK-8 溶液可能带来的对于后续检测的影响，除非该细胞极为珍贵，否则不推荐把 CCK-8 溶液孵育过的细胞用于其它实验。

2. 细胞接种后需要培养多久加入 CCK-8 溶液？

答：细胞接种后，贴壁细胞大约需要培养 2-4 小时贴壁，悬浮细胞则可省去该步培养。

3. 加入药物的培养时间是多少？

答：要看药物的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的周期。

4. 如果吸光度值太低，可以采取什么办法解决？

答：细胞的种类不一样，形成的甲贍的量也不一样。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甲贍很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。

5. 颜色不均匀的话，怎么办？

答：如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。

6. 没有 450nm 滤光片怎么办？

答：如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 450-490nm 之间的滤光片，但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。（建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm，参比波长 600-650nm。）

如果样品为高浑浊度的细胞悬液，可以使用大于 600nm 的波长，例如 650nm，作为参考波长进行双波长测定。