

## Cell Counting Kit-8

### (CCK-8 细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒)

#### 产品简介

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 (或 CCK8) 试剂盒, 是一种广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测试剂盒。其检测原理在于, 在电子耦合试剂存在的情况下, 检测试剂中的 WST-8 化合物被活细胞内脱氢酶还原成具有水溶性的橙黄色甲臞化合物, 该物质在 450 nm 处有最大吸收峰。甲臞量与活细胞数成正比, 即细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。本试剂盒中 WST-8 对细胞无明显毒性, 可以用于外源细胞因子等诱导的细胞增殖检测, 以及药物等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测, 或一些药物诱导的细胞生长抑制检测, 是 MTT 检测方法的升级版。

本试剂盒使用便捷, 无需配制或稀释, 无需收集或洗涤细胞, 无需对甲臞化合物进行再次溶解, 对贴壁细胞及悬浮细胞均适用。且酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响。

#### 储存与运输

冰袋 (wet ice) 运输; 2-8℃ 保存 12 个月有效; 长期不用也可 -20℃ 保存, 24 个月有效; 长期保存建议避光保存。

#### 组成

Component	数量
Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)	5 mL
说明书	1 份

#### 操作步骤

##### 1. 制作标准曲线 (测定细胞具体数量时进行此操作)

- 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。
- 按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。
- 接种后培养至细胞贴壁, 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 (X 轴), OD 值为纵坐标 (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 (试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)。

##### 2. 细胞活性检测

- 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100  $\mu$ L/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下)。
- 向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 将培养板在培养箱内孵育 2 小时。
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10  $\mu$ L 0.1M 的 HCl 或者 1%SDS (W/V) 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 h 内吸光度不会发生变化。



### 3. 细胞增殖-毒性检测

- A) 在 96 孔板中配置 100  $\mu$ L 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时（在 37  $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 的条件下）。
- B) 向培养板加入 10  $\mu$ L 不同浓度的待测物质。在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或 48 小时）。
- C) 向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基（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），去掉药物影响。
- D) 将培养板在培养箱内孵育 2 小时。
- E) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- F) 如果暂时不测定 OD 值，打算以后测定的话，可以向每孔中加入 10  $\mu$ L 0.1M 的 HCl 或者 1% SDS (W/V) 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。

### 4. 活力计算：

细胞活力 (%) =  $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100$

A (加药)：具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A (空白)：具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A (0 加药)：具有细胞、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

### 注意事项

1. 本试剂盒检测原理是依赖于脱氢酶催化的反应，样品中如有较多还原剂（例如一些抗氧化剂）会干扰检测，需设法去除。
2. 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。
3. 白细胞可能需要培养较长时间。
4. 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 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 2,500 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。
5. 如果没有 450 nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450 nm 检测灵敏度最高。
6. 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。
7. 加检测试剂时避免产生气泡，否则会干扰检测结果。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**产品仅供科研用途，不用于临床诊断！**

（产品包装升级中，以实物为准。）

