

CCK8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)

【包装规格】

Catalog Number	Size
• NB168-01	500T
• NB168-05	5 x 500T
• NB168-10	10 x 500T

【产品简介】

本试剂盒是一种基于 WST(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便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臌染料, 甲臌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, 生成的甲臌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。

本试剂盒是预制即用型 CCK-8 溶液, 使用十分便捷, 无需其它准备步骤。可直接使用 96 孔板或 384 孔板在酶标仪上检测, 非常适合大规模、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 O.D. 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标, O.D. 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 (100μl/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (37°C, 5% CO₂)。
2. 向每孔加入 10μl 的 CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 以免影响 O.D. 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 O.D. 值, 可以向每孔中加入 10μl 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 100μl 的细胞悬液 (通常细胞增殖实验每孔加入 100μl 约 2000 个细胞, 细胞毒性实验每孔加入 100μl 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 1-10μl 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 10μl 的 CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 以免影响 O.D. 读数)。如果起始的培养液体积为 200μl, 则需加入 20μl 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 O.D. 值, 可以向每孔中加入 10μl 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* (%) = [A (加药) - A (空白)] / [A (0 加药) - A (空白)] × 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)] × 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 O.D. 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，ANEWBiosystems® 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℃，两年有效；4℃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，形成的甲臆的量也不一样。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臆很少，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。