

# CCK-8 细胞增殖检测试剂盒操作说明



Version: HBRG-CCK-8-001

## 产品信息

产品名称	CCK-8 细胞增殖检测试剂盒
货号	HB-CCK-8-500T
存储及运输条件	-20°C保存，冰袋运输
规格	5mL
有效期	2年

## 实验原理

CCK-8 细胞增殖检测试剂盒是一种基于 WST-8（化学名：2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐）的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性检测的快速灵敏度试剂盒。

WST-8 属于 MTT 的升级产品，工作原理为：在电子耦合试剂存在的情况下，WST-8 可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物 (formazan) (图 1-2)，其颜色的深浅与存活细胞数目的增殖成正比，与细胞毒性成反比。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值，可以间接反映活细胞的数量。

CCK-8 法应用非常广泛，如药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测等。

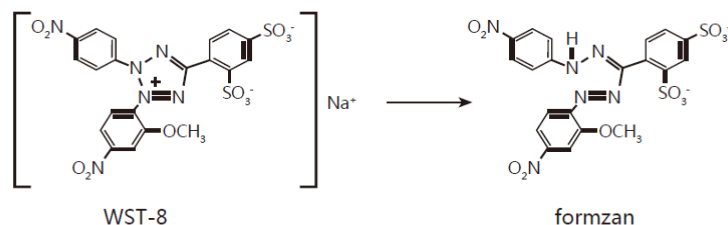


图1. WST-8和WST-8甲臞结构图

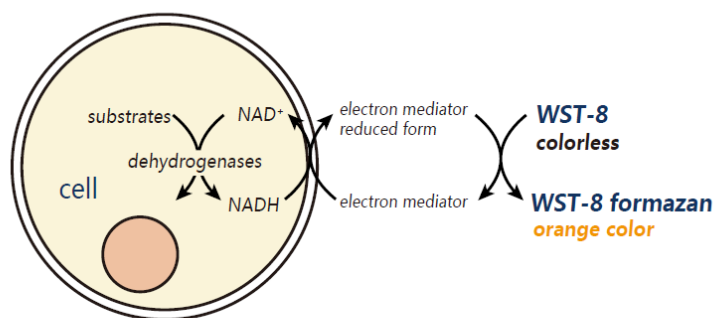


图2. CCK-8检测细胞活性原理

## 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一段时间（37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ）。
- 2、向每孔加入 10  $\mu\text{l}$  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）。
- 3、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 4、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 5、若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 10  $\mu\text{l}$ -0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 小时内测定，吸光度不会发生变化。

## 细胞增殖-毒性检测

- 1、在 96 孔板中接种细胞悬液（100  $\mu\text{l}$ ）。将培养板放在培养箱预培养 24 小时（37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ）。
- 2、向培养板加入 10  $\mu\text{l}$  不同浓度的待测物质。
- 3、将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或 48 小时）。
- 4、向每孔加入 10  $\mu\text{l}$  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）。
- 5、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 6、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 7、若暂时不测定 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，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 小时内测定，吸光度不会发生变化。

注：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。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。

## 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、有条件的情况下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，容易产生气泡，会干扰 OD 值读数。
- 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 滤光片的检测灵敏度最高。
- 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。

## 活力计算

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

A (加药)：具有细胞、CCK-8 溶液 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 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