



UUBIO™ Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 细胞增殖/毒性检测试剂盒使用说明书

· 产品描述

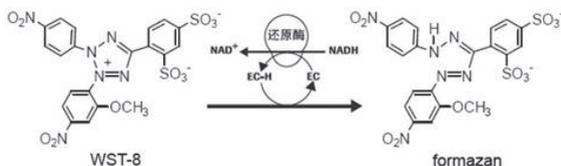
产品名称	产品编号	规格	储存条件
Cell Counting Kit (CCK-8)	U10014A	500T (5 mL)	4℃
Cell Counting Kit (CCK-8)	U10014B	3000T (30 mL)	4℃

Cell Counting Kit (CCK-8) 是一种基于水溶性四唑盐-WST-8 (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), 它在电子载体1-Methoxy PMS存在的情况下能够被还原成橙黄色水溶性的甲臍 (formazan) 染料, 广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速检测。

WST-8为MTT的升级产品。反应产物颜色的深浅与活细胞的数量成正比。使用酶标仪在450nm波长处测定OD值, 间接反映活细胞数量。

CCK-8溶液可直接加入到细胞样品中, 不需要预先配置各种成分。WST-8被细胞内脱氢酶氧化还原后生成的橙黄色甲臍染料能够溶解在培养基中, 广泛应用于细胞增殖测定、细胞毒性测定、药物筛选、生物因子的活性检测等。

图1. CCK8细胞活性检测原理



· 保存方法

4℃避光保存, 有效期一年。-20℃避光保存, 有效期三年。反复冻融会增加背景值, 干扰实验测定。如需经常使用请将试剂存放在0-5℃条件下。

· 操作说明

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, 然后接种细胞到培养板内。



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,每个浓度建议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1-4小时后测定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(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。)

[注]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 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2,500 个/孔 (100 μ 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。

二. 细胞活性检测

- 1.在96孔板中接种细胞悬液(100 μ L/孔)。将培养板放在培养箱中预培养一段时间(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。
- 2.向每孔加入10 μ 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 μ 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。

三. 细胞增殖-毒性检测

- 1.在96孔板中配制100 μ L的细胞悬液。将培养板放在培养箱预培养24小时(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。
- 2.向培养板中加入10 μ 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 μ L CCK-8溶液(注意不要再孔中生成气泡,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 μ 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,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),去除药物影响。若药物影响比较小,可不更换培养基,直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。

四. 活力计算



- 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。

· 产品优势

表1: CCK-8法与其他细胞增殖/毒性检测方法的比较

检测方法	MTT法	XTT法	WST-1法	CCK-8法
甲臜产物的水溶性	差 (需加有机溶剂溶解后再检测)	好	好	好
产品性状	粉末	2瓶溶液	溶液	1瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	高	很高	很高	高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600 nm	420-480 nm	420-480 nm	430-490 nm
细胞毒性	高, 细胞形态完全消失	低, 细胞形态不变	低, 细胞形态不变	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

· 注意事项

1. 第一次做实验时, 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. 接种时细胞悬液一定要混匀, 避免每孔中的细胞数量不等, 可以每接种几个孔就混匀一下。培养板周围一圈培养基容易挥发, 为了减少误差, 建议培养板的四边每孔只加培养基。
3. 培养时间根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。由于悬浮细胞较难显色, 在加入CCK-8培养1-4小时后, 可先从培养箱中取出, 目测染色程度或用酶标仪测定。若显色困难, 可将培养板放回培养箱内, 继续培养后再做检测。白细胞较难显色, 因此需要较长的CCK-8反应时间或增加细胞数量 (-10^5 个细胞/孔)。对于贴壁细胞, CCK-8反应时间为1-4小时, 可在培养30分钟左右取出肉眼观察显色程度, 摸索最佳反应时间。
4. 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。
5. 加CCK-8试剂时速度要快, 减少试剂在移液器上的残留。加入CCK-8后轻轻振荡培养板充分混匀。
6. CCK-8会与某些还原剂反应, 如果要检测药物是否有还原性, 可在不含细胞的培养基中加入药物然后加入CCK-8, 试剂在一定时间内检测, 和不加药物只加CCK-8的培养基进行比较, 如果OD值明显偏高, 则说明有反应。
7. 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。

8.若细胞培养时间较长,培养基颜色或pH发生变化,建议更换新鲜培养基后再加入CCK-8。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。

9.CCK-8试剂对细胞的毒性非常低,如后续做其它实验,例如中性红法或结晶紫法,也可在CCK-8法检测完成后继续进行。

10.若要测定细胞的数量,建议先做标准曲线。