

## 细胞增殖及毒性检测试剂盒（CCK-8）增强型

### 一. 产品简介:

Cell Counting Kit-8（简称CCK-8），是一种基于WST-8而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测的试剂盒。

CCK-8试剂中含有WST-8（化学名：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐）是一种类似于MTT的化合物，它在电子耦合试剂1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯（1-Methoxy PMS）存在条件下，可以被线粒体内的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲瓏产物Formazan（参考图1），生成的Formazan数量与活细胞的数量成正比。因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析，细胞增殖越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。

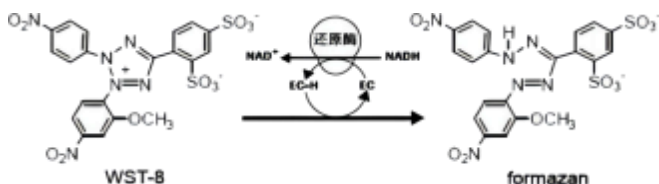


图1. WST-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent, 即电子耦合试剂)

WST-8与以往的增殖/毒性测定试剂相比，具有明显优点（参考表1）。诺思CCK-8试剂盒具有灵敏度高、反应时间短、线性范围宽、数据可靠、重现性好等特点，可以广泛应用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验。

表 1. 增殖/毒性测定试剂的比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK8 法
甲瓏产物的水溶性	差（需加有机溶剂溶解）	好	好	好
检测灵敏度	高	很高	很高	最高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高，细胞形态完全消失	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变	很低，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

### 二. 操作步骤

#### • 制作标准曲线（测定细胞具体数量时）

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到96孔板中：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个重复孔，每孔约100μL细胞悬液。
3. 37°C培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养2-4h，如果不需要贴壁，这步可以省去。
4. 每孔加入10μL CCK-8增强型溶液：由于每孔加入CCK-8量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配置含10% CCK-8的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。

5. 培养箱内孵育一定时间后测定450nm吸光度，制作出一条以细胞数量为横坐标(X轴)，吸光度为纵坐标(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。）

## • 细胞活性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到96孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔约100 $\mu$ L细胞悬液，可设置3个重复孔。
3. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养2-4h，如果不需要贴壁，这一步可以省去。
4. 每孔加入10 $\mu$ L CCK-8增强型溶液：由于每孔加入CCK-8量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配置含10% CCK-8的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。
5. 培养箱内孵育0.5-4h：细胞种类不同，形成的Formazan的量也不一样，对于大多数情况孵育1h即可。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Formazan很少，需要较长的显色时间（5-6h）。
6. 测定450nm吸光度：如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入10 $\mu$ L CCK-8反应终止液，遮盖培养板避光保存在2-8 $^{\circ}$ C,在7天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入10 $\mu$ L配制的0.1M HCl溶液或1%w/v SDS溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在24h内吸光度不会发生变化。

## • 细胞增殖-毒性检测

1. 制备细胞悬液：细胞计数。
2. 接种到96孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔约100 $\mu$ L细胞悬液，可设置3个重复孔。
3. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：细胞接种后贴壁大约需要培养2-4h，如果不需要贴壁，这一步可以省去。也可以根据实验要求的不同，培养相应的时间。
4. 每孔加入0- 10 $\mu$ L不同浓度的待测药物。
5. 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养：加入待测药物的培养时间，要看该物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的时间。
6. 每孔加入10 $\mu$ L CCK-8增强型溶液：由于每孔加入CCK-8量比较少，有可能因试剂沾在孔壁带来误差，建议加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。或者直接配置含10% CCK-8的培养基，以换液的形式加入。注意不要在孔中生成气泡，以免影响吸光度的检测。（注意：如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加CCK-8之前除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基，以去掉药物影响。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。）
7. 培养箱内培养0.5-4h：细胞种类不同，形成的Formazan的量也不一样，对于大多数情况孵育1h即可。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Formazan很少，需要较长的显色时间（5-6h）。
8. 测定450nm吸光度：建议采用双波长进行测定，检测波长450-490nm，参比波长600-650nm。如果暂时不测定吸光度，可以向每孔中加入10 $\mu$ L CCK-8反应终止液，遮盖培养板避光保存在2-8 $^{\circ}$ C,在7天内吸光度不会发生变化；或者可以向每孔中加入10 $\mu$ L配制的0.1M HCl溶液或1% w/v SDS溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，在24h内吸光度不会发生变化。

## • 计算公式

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

抑制率 =  $[(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$

As: 实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

Ac: 对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物）的吸光度

Ab: 空白孔（不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8）的吸光度

## 三. 保存条件

4℃避光保存，一年有效-20℃可以储藏更久，但反复冻融会增加背景值，干扰实验测定，因此请将经常使用的试剂保存在4℃。

## 四. 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. CCK-8反应时间的确定：一般情况下，白细胞显色比较困难，因此需要增加细胞数量和延长CCK-8反应时间。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色，因此悬浮细胞在加入CCK-8培养0.5-4h后，可先从培养箱取出，目测或用酶标仪测定显色程度，若显色困难可以继续培养数小时后再确定。对于贴壁细胞，CCK-8的培养时间一般为0.5-4h，在培养20min左右即可取出肉眼观察显色程度。
3. 每孔接种细胞数：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(100μL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(100μL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。
4. 设定空白对照：在不含细胞的培养基中加入CCK-8，培养一定的时间，测定450nm的吸光度即为空白对照。在做加药实验（细胞毒性实验）时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入CCK-8，培养一定的时间，测定450nm的吸光度作为空白对照。
5. 影响CCK-8测定的物质：由于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，所以如果待测体系中存在氧化还原物质则可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此应设法去除这些物质的影响。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，通过扣除只含有培养基的对照孔中本底吸光度而消除，因此不会对检测结果造成影响。
6. 测定波长：如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议采用双波长进行测定，检测波长450nm，参比波长600-650nm。如果没有450nm的滤光片，可以使用吸光度在430-490nm之间的滤光片，但是450nm检测灵敏度最高。
7. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
8. 如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加CCK-8检测。
9. 为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。