

## CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒

说明书修订日期：2018.11.08

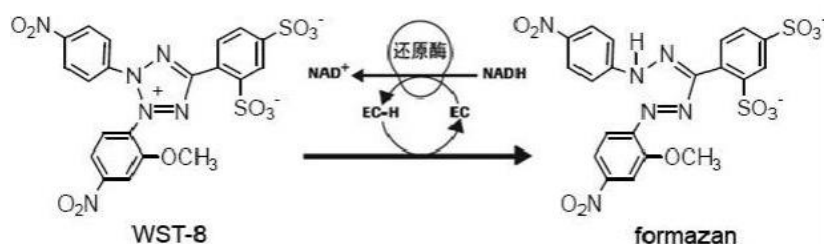
Cat number: KGA317

Store at 4°C for 12 months, 避光

For Research Use Only (科研专用)

### 一、试剂盒说明

CCK-8 试剂的主要成分为 WST - 8 和 PMS，WST-8 化学名为 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，它在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二甲酯（1-Methoxy PMS）的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄橙色甲贍产物（Formazan），在 OD 450nm 处可以读取这些甲贍复合物的浓度，从而用于细胞活性、细胞增殖或毒性等试验中测定活细胞数目。



凯基 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒是用于测定活细胞数目的一种高灵敏度，无放射性的比色检测法。CCK-8 实验的灵敏度比其它如 MTT、XTT 或 MTS 高。由于本产品相当稳定，并且对细胞没有毒性，可直接加入到细胞样品中长时间孵育。

### 二、试剂盒组份

组份	Cat: KGA317 500 assays	储存条件
CCK-8 检测液	5 mL	4°C，一年有效

### 三、试剂盒以外自备仪器和试剂

低速离心机、酶标仪（450nm 波长）、CO<sub>2</sub> 培养箱、微量移液器、96 孔板

### 四、注意事项

1. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应，如果待检测体系中存在较多的还原剂，例如一些抗氧化剂会干扰检测，需设法去除。
2. CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。由于不同细胞的显色程度不一致，首次实验时，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。
3. 一般情况下，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（约  $1 \times 10^5$  个细胞/孔）。悬浮细胞比贴壁细胞难显色。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决定。若显色困难，可将培养板放回培养箱，继续培养数小时后再确认。

4. 如果待测溶液有还原性，测定不含细胞，但含有 CCK-8 检测溶液在 450 nm 处的空白吸光度。如果该吸光度很小，则可以直接加入 CCK-8 检测溶液，如果吸光度相对较大，则需要除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的 100  $\mu$ l 培养基和 10  $\mu$ l CCK-8 溶液进行检测。
5. 用酶标仪检测前请确保孔内没有气泡，否则会干扰测定。
6. 如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议设定 600 nm（或 600 nm 以上）作为参比波长，扣除参比波长的 OD 值即可。
7. 含有酚红的培养基不影响 CCK-8 做细胞活性的测定，但需要在结果计算时，扣除空白孔的本底值。
8. 孵育 2 小时后，空白孔 O.D.值一般为 0.1-0.2 单位。
9. CCK-8 可用于大肠杆菌的检测，但不能用于酵母细胞。
10. 我们建议将细胞接种在靠近培养板中央的孔中，最外围一圈孔中的培养基容易蒸发，可以用 PBS，水或培养基填充这些孔。
11. 药物中金属离子的存在可能会影响 CCK-8 的灵敏度。终浓度为 1 mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90% 的显色反应，使灵敏度降低。如果终浓度是 10 mM 的话，将会 100% 抑制。
12. 为保证您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 五、操作方法

### (一) 针对细胞活性检测

1. 96 孔板加入细胞 100 $\mu$ L/孔（约  $1 \times 10^4$ ），置 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 小时。
2. 向各孔中加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 检测溶液。（注：不要引入气泡，以免干扰 OD 值检测）
3. 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1~4 小时。（注：CCK-8 的最佳反应时间以细胞具体显色程度为准）
4. 读数前可在摇床上轻柔混匀，酶标仪在 450nm 波长处检测每孔的吸光度。

### (二) 针对细胞增殖/毒性检测

1. 96 孔板加入细胞 100 $\mu$ L/孔（约  $1 \times 10^4$ ），置 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 小时。
  2. 加入适当浓度的受试化合物。
  3. 将 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C，含 5% CO<sub>2</sub> 空气及 100%湿度的细胞培养箱中孵育适当时间。（注：时间可设置为 6, 12, 24, 48 h 等）
  4. 向各孔中加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 检测溶液。（注：不要引入气泡，以免干扰 OD 值检测）
  5. 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1~4 小时。（注：CCK-8 的最佳反应时间以细胞具体显色程度为准）
  6. 读数前可在摇床上轻柔混匀，酶标仪在 450nm 波长处检测每孔的吸光度。
- 注：如果不能立刻测量吸光度，可将培养板置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱，或每个孔中加入 10  $\mu$ l 1% w/v SDS 或 0.1 M HCl，盖好并在室温下避光保存。24 小时内检测。

### (三) 结果分析

您可以选择使用 O. D. 值或细胞数量来进行结果分析，我们提供以下方法供参考。

$$1. \text{ 细胞存活率 (\%)} = [ (As - Ab) / (Ac - Ab) ] \times 100$$

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

注：各重复孔的 OD 值取均数 $\pm$ SD。

As = 实验孔吸光度（含有细胞，培养基，CCK-8 和受试化合物的孔的吸光度）

Ab =空白孔吸光度（含有培养基和 CCK-8 的孔的吸光度）

Ac =对照孔吸光度（含有细胞，培养基和 CCK-8 的孔的吸光度）

2. 抑制率= 50% 时的药物浓度(IC50)及 抑制率= 10%时的药物浓度(IC90)。

#### (四) 制作标准曲线

可以基于该曲线确定待测样品的细胞数，使用此标准曲线的先决条件是培养检测条件一致。

1. 细胞计数板计数细胞悬液中的细胞数，接种细胞。
2. 使用培养基等比稀释细胞悬液为一个浓度梯度，通常需要 5-7 个浓度梯度，每组 3 个复孔。然后接种细胞。（注意每孔的细胞数量。如果您将细胞悬液稀释在管中，在加入培养板的孔之前，请小心再次混匀细胞。每孔中细胞悬液的体积应该是一致的。）
3. 培养直至细胞贴壁（通常 2-4 小时），然后每 100  $\mu$ l 培养基加入 10  $\mu$ l CCK-8。继续孵育 1-4 小时，用酶标仪测量 450nm 处的吸光度。制作出一条以细胞数为 X 轴坐标，O.D.值为 Y 轴坐标的标准曲线。

### 凯基相关产品（详见凯基网站 [www.keygentec.com.cn](http://www.keygentec.com.cn)）

#### 细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

- 人类肿瘤细胞株
- 鼠肿瘤细胞株
- 正常细胞株
- 肿瘤耐药细胞株
- 细胞培养相关产品

#### 细胞凋亡

##### 一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase 系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

##### 二、细胞凋亡相关抗体

##### 三、凋亡诱导剂、抑制剂

##### 四、氧化应激损伤检测试剂盒

##### 五、细胞凋亡研究辅助试剂

#### 细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

- 凯基细胞周期检测试剂盒
- MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒
- XTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂
- WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒
- CFSE 细胞增殖与示踪检测试剂盒

#### 细胞染色产品

- 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒 (AO/EB 法. 荧光显微镜)
- 凯基细胞凋亡形态学检测试剂盒
- 罗丹明 123 染色试剂盒
- DAPI 染色试剂盒
- Hoechst 33258 染色试剂盒
- Hoechst 33342/PI 双染试剂盒
- 吖啶橙染色试剂盒
- PI 染色试剂盒
- 7-AAD 染色试剂盒

**亚细胞组分制备**

- 细胞核制备试剂盒
- 线粒体提取试剂盒
- 细胞悬液制备试剂盒 (组织消化试剂盒)