

## Cell Counting Kit-8 (cck-8) 试剂盒

### 1 产品清单

产品规格	产品名称	包装	保存条件
100 T	Cell Counting Kit-8	1 mL	4℃ 一年 -20℃ 两年 长期保存避光
500 T	Cell Counting Kit-8	5 mL	
1000 T	Cell Counting Kit-8	5 mL×2	
3000 T	Cell Counting Kit-8	5 mL×6	

### 2 产品概述

**Cell Counting Kit-8**, 简称 **CCK-8** 试剂盒, 是一种基于 **WST-8**(2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐)而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度、无放射性的检测试剂盒。

**CCK-8** 溶液可以直接加入到细胞样品中, 不需要预配各种成分。**WST-8** 是一种类似于 **MTT** 的化合物, 在电子耦合试剂 **1-Methoxy PMS** (1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯盐) 存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色高度水溶性的甲臞 **formazan** (参考图 1)。由于生成的甲臞量与活细胞数量呈线性关系, 因此可以通过这一特性来判断细胞增殖和毒性。细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。(参考图 2)

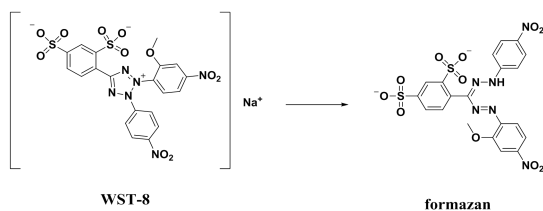


图 1 WST-8 和 WST-8 formazan 的结构式

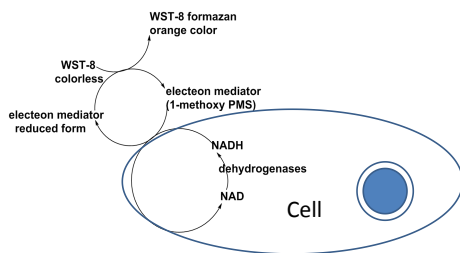


图 2 CCK-8 的原理图

该方法具有的优点:

**1** 同 **MTT** 相比, **WST-8** 被线粒体内的脱氢酶还原生成的 **formazan** 是水溶性的, 可以省去后续的溶解步骤。

**2** 同 **XTT** 和 **MTS** 相比, 还原生成的 **formazan** 溶解性更高, 更加稳定; 同时线性范围更宽, 检测结果更加精确。

**3** **WST-8** 对细胞无明显毒性, 加入 **CCK-8** 溶液显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 检测时间更加灵活, 便于确定最佳测定时间。

### 3 操作指导

1 制作标准曲线

a. 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;

b. 按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 5-7 个细胞浓度梯度, 每组 4-6 个复孔;

c. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后每 100 μL 培养基加 10 μL **CCK-8** 试剂培养一定时间后测定 **OD** 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标, **OD** 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。使用此标准曲线的前提条件是试验条件完全一致。

2. 细胞活性检测

a. 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μL/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;

b. 向每孔加入 10 μL 的 **CCK-8** 溶液 (注意不要产生气泡);

c. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;

d. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。



# BIOLUMINOR

## 3. 细胞增殖-毒性检测

- 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100  $\mu$ L/孔) , 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
- 向培养板加入不同浓度的待测药物;
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
- 向每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
- 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
- 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

## 4. 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:** 实验孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);

**Ac:** 对照孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物);

**Ab:** 空白孔吸光度(含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)。

**注:** 如果待测药物有氧化性或还原性, 可在加入 CCK-8 之前更换新鲜培养基, 去掉待测药物的影响。当待测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待测药物后的空白吸收即可。

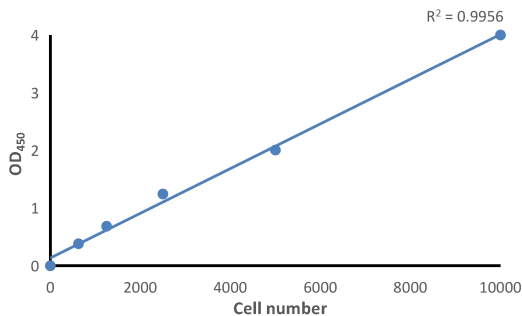


图 3 CCK-8 试剂盒检测细胞活性

## 4 常见问题

### 1. 一个孔中应接种多少个细胞?

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)。建议先做几个孔摸索细胞的数量。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积的 10% 加入 CCK-8 溶液。

### 2 CCK-8 与胸苷结合检测之间是否有相关性?

有, 而且由于 CCK-8 使用的检测原理与胸苷检测的不同, 因此结果可能不同。

### 3 哪些物质会影响 CCK-8 的测定?

还原剂 (例如一些抗氧化剂) 会干扰检测, 增加 O.D 值, 氧化剂存在减小 O.D 值; 加入药物中如含有金属, 对 CCK-8 显色有影响。

### 4 CCK-8 检测溶液对细胞是否有毒?

CCK-8 溶液自身因为高浓度的 1-Methoxy PMS 的存在而具有有一点毒性。但是, 加到培养基中的 CCK-8 是没有毒性的, 因为被稀释了 10 倍。因此, 长时间的培养, 如过夜或者培养数天是可以的。同一个细胞培养液在 CCK-8 检测后还可以用于其他细胞增殖检测, 如结晶紫检测, 中性红检测或者 DNA 荧光检测等。

### 5 如何设定空白对照?

在不含细胞的培养基中加入 CCK-8, 培养一定的时间, 测定 450 nm 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, 可在不含细胞, 加入药物的培养基中加入 CCK-8, 培养一定的时间, 测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。

### 6 如果没有 450 nm 的滤光片, 还可以使用哪些其他滤光片?

还可使用 450 nm 到 490 nm 之间的滤光片, 但是检测的灵敏度不如 450 nm 的滤光片。

### 7 CCK-8 能否对活细胞进行染色?

不能。因为 CCK-8 的主要成分是一种水溶性的四唑盐 (WST-8), 并通过电子载体 1-Methoxy PMS 将活细胞中的电子交换到培养基中的 WST-8 上。由于生成的甲臜也是高度水溶性的, 因此 CCK-8 不能对细胞进行染色。

### 8 CCK-8 能否检测细菌细胞

不能检测酵母细胞, 但是可以检测 E.coli, 向 100  $\mu$ L E.coli 培养液中加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 并培养 1-4 个小时或过夜。

### 9 CCK-8 是什么颜色?

粉红色。若颜色不一样, 有可能会影响测定。

### 10. 如何设定空白对照?

在不含细胞的培养基中加入 CCK-8, 培养一定的时间, 测定 450 nm 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, 可在不含细胞, 加入药物的培养基中加入 CCK-8, 培养一定的时间, 测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。

