

## CCK8 细胞增殖检测试剂盒操作指南

### 1、产品包装和保存条件

货号	产品名称	产品规格	产品包装
HB-CCK-8-5	CCK-8细胞增殖检测试剂盒	500次	5 ml
HB-CCK-8-10	CCK-8细胞增殖检测试剂盒	1000次	10 ml
HB-CCK-8-30	CCK-8细胞增殖检测试剂盒	3000次	30 ml
HB-CCK-8-100	CCK-8细胞增殖检测试剂盒	10000次	100 ml

4℃干燥避光保存，有效期一年（推荐）。-20℃干燥避光保存，有效期二年。

**注：**做完细胞增殖检测一般还会做细胞凋亡检测，汉恒还提供 **Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒**。

### 一、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。

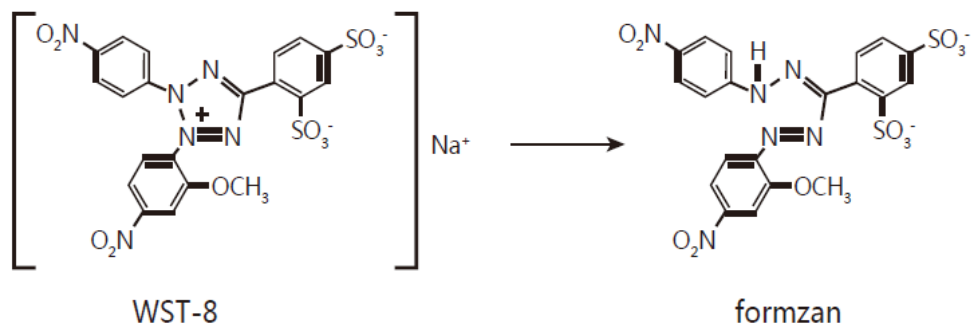


图1. WST-8和WST-8甲攢结构图

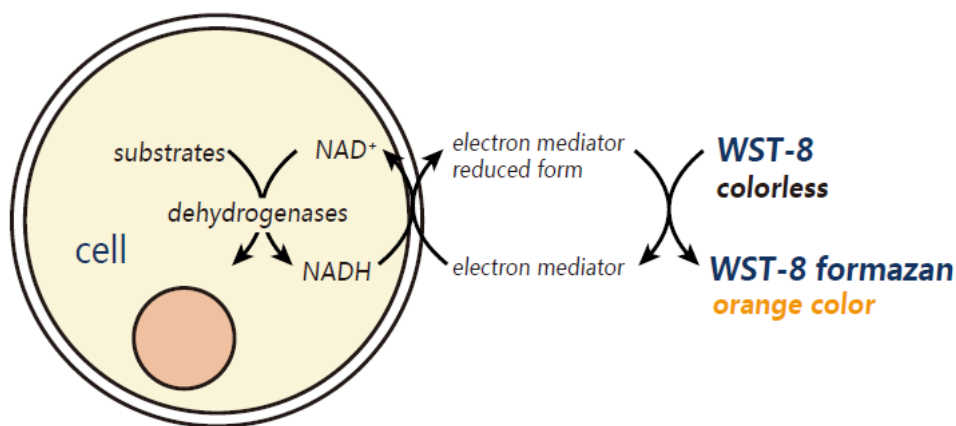


图2. CCK-8检测细胞活性原理

## 二、CCK-8 方法的优势

表 1 CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

货号	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	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

注: 1、酚红和血清对 CCK-8 法的检测不会造成干扰;

2、本试剂盒细胞毒性非常低, 因此加入 WST-8 显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读数从而找到最佳测定时间。

### 三、细胞活性检测

- 1、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一段时间 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。
- 2、向每孔加入 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

### 四、细胞增殖-毒性检测

- 1、在 96 孔板中接种细胞悬液 (100  $\mu$ l)。将培养板放在培养箱预培养 24 小时 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。
- 2、向培养板加入 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

### 五、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：

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

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