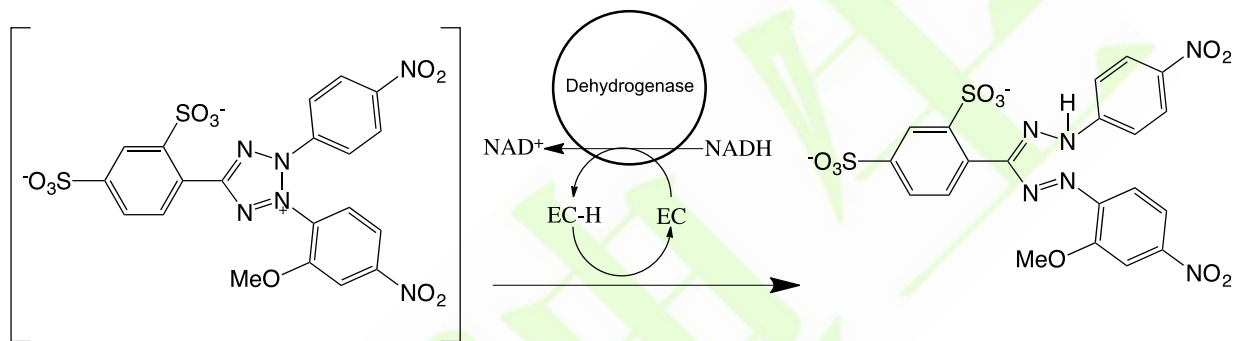


细胞增殖-毒性检测试剂盒

Cell Counting Kit-8(CCK-8)

水溶性四唑（2-（2-甲氧基-4 硝基苯）-3-（4-硝基苯）-5-（2,4-二硝基苯）-2H-四唑单钠盐），是一种类似于 MTT 的化合物，在电子耦合试剂存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臞染料 (formazan, 下图)，这种甲臞染料直接溶解在培养基中。水溶性四唑被细胞内脱氢酶生物还原后生成的甲臞能够。细胞增殖越多越快，则培养基的颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。正是利用这一特性开发的 CCK-8 试剂盒直接进行细胞增殖和毒性分析。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。



CCK-8 法与 MTT 比较：

CCK8 试剂盒提供了一种灵敏度高，操作简便，使用安全，重现性好的细胞增殖与活性检测方法。与传统的 MTT 相比无需有机溶剂和放射性同位素，步骤少，无损失，结果准确！本试剂盒检测非常便捷。试剂盒仅一管已经配制好的含有 WST-8 的 CCK-8 溶液，无须再进行任何配制等操作。无须使用同位素，所有的检测步骤仅在同一块 96 孔板内完成。不必洗涤细胞，不必收集细胞，也不必采用额外的步骤去溶解 formazan。可以用于大批量样品的检测。

- 1.MTT 实验生成的甲臞不是水溶性的，需要使用 DMSO 等有机溶剂溶解；而本方法产生的甲臞是水溶性的，不仅省去了溶解的步骤，更因此而减少了该操作步骤带来的误差。
- 2.与 MTT 方法相比，本方法线性范围更宽，灵敏度更高。
- 3.本方法对细胞无毒性，因此加入 WST-8 显色后，可以在不同时间反复用酶标仪读数多次测定从而找到最佳测定时间。
- 4.本方法所用试剂在培养基中比 MTT 更加稳定，实验效果重复性好。
- 5.MTT 具有毒性，同时其生成的甲臞需要有机溶剂溶解，会对操作人员身体造成危害。本试剂无毒，使用中无需有机溶剂，操作更加安全。
- 6.本试剂盒在 4℃ 避光可长期保存，使用无需配制，即开即用。
- 7.酚红和血清对 CCK 法的检测不会造成干扰（扣除空白孔即可）

CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲臞产物的水溶性	差 需要加 DMSO 溶解	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	一般	较高	较高	高
重现性	差	中等	好	非常好
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	非常差	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, 工作量大	便捷	便捷	非常便捷

用途:

CCK-8 试剂盒可以用于生物活性因子的活性检测, 抗肿瘤药物的筛选, 细胞增值的测定, 细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。本试剂盒使用方便, 试剂盒包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的 CCK-8 溶液, 即开即用, 无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞, 可直接使用 96 孔板或者 384 孔板在酶标仪上检测, 适合大规模, 高通量的样品检测。

保存条件:

CCK-8 溶液在避光, 0-5℃的条件下可以保存一年, 如长期保存, 可在-20℃下保存 2 年; 如需经常使用请将试剂存放在 0-5℃, 为防止背景值增加干扰实验结果, 请勿反复冻融。

CCK-8试剂使用方法

一、制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

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。

- 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,每组 3-6 个复孔。
- 3、接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁,然后加 CCK 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(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(适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 后的培养时间要一致)

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(在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的条件下)。
- 2、向每孔加入 10 μ L 的 CCK 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 450nm 处的吸光度。
- 5、如果暂时不测定 OD 值,打算以后测定的话,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。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

三、细胞增值-毒性检测

使用方法(以 96 孔板为例,其他规格培养板按实际情况安排):

1. 在 96 孔板中配置 100 μ l 的细胞悬液(通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ l 2000 个细胞,细胞毒性实验每孔加入 100 μ l 5000 个细胞。具体每孔所用的细胞的数目,需根据细胞的大小,细胞增殖速度的快慢等因素决定)。按照实验需要,进行培养(在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂的条件下)预培养 24 小时。
2. 向培养板加入 1-10 μ l 不同浓度的待测药物刺激。
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间(后面有具体细胞的建议时间,例如:6、12、24 或 48 小时)。
4. 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)。如果起始的培养体积为 200 μ l,则需加入 20 μ l CCK-8 溶液,其他情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作空白对照。如果担心所使用的药物会干扰检测,需设置加了相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。
5. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时,对于大多数情况孵育 1 小时就可以了。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等实验情况而定,初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 小时分别用酶标仪检测,然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。
6. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度,如无 450nm 滤光片,可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600nm 的波长,例如 650nm,作为参考波长进行双波长测定。
7. 如果暂时不测定 OD 值,打算以后测定的话,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。在 24 小时内吸光度不会发生变化。
8. 注意:如果待测物质有氧化性或还原性的话,可在加 CCK 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。

活力计算:

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

A(加药): 具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A(空白): 具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A(0 加药): 具有细胞、CCK 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

注意事项：

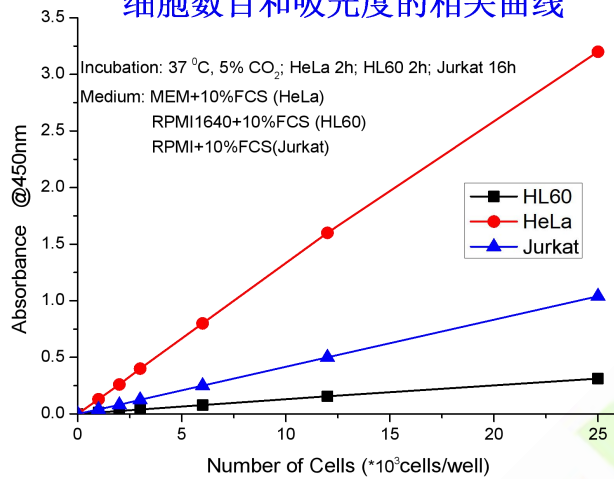
1. 由于使用 96 孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，一定要注意蒸发的的问题。一方面，由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发，可以采取弃用周围一圈的办法，改加 PBS，水或培养液；另一方面，可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。
2. CCK-8 检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应。任何待测体系中存在还原剂，例如一些抗氧化剂会干扰检测，需设法去除。如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基，去掉药物的影响。当然药物影响比较小的情况可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。
3. 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 试剂后的培养时间。
4. 建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。加入 CCK 试剂时，建议斜贴着培养板壁加，不要查到培养基液面下加样，溶液产生气泡，会干扰 OD 值读数。
5. 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（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 2500 个/孔，（100 μ l 培养基），且培养时间长一些。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。
6. 加入 CCK-8 溶液时，如果细胞培养时间较长，培养基颜色已变化或 PH 值变化。建议换用新鲜的培养基。
7. 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 滤光片的检测灵敏度最高。
8. 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. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

细胞增殖分析

设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪

方法	(3) 注意事项
制备细胞悬液	注 1: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时,不需要贴壁的话,可以省去这个步骤
↓	
接种到 96 孔培养板	注 2: 由于每孔加入的 CCK-8 量比较少,有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差,建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。
↓	
37℃培养箱中培养(注 1)	注 3: 细胞的种类不一样,形成的 Formazan 的量也不一样。
↓	如果显色不够的话,可以继续培养,以确认最佳条件。
加入 10ul 的 CCK-8(注 2)	特别是血液细胞形成的 Formazan 很少,需要较长的显色时间(5-6 小时)。
↓	注 4: 如果颜色不均匀的话,可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。
培养 1-4 小时(注 3、注 4)	
↓	
测定 450nm 吸光度(注 5)	注 5: 建议采用双波长进行测定,检测波长 450-490nm,参比波长 600-650nm

细胞数目和吸光度的相关曲线

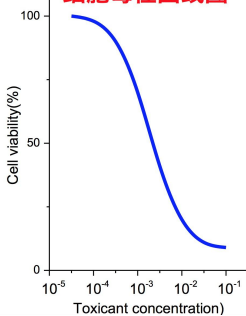


细胞毒性分析

设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪

方法	注意事项
制备细胞悬液	注 1: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时，不需要贴壁的话，可以省去这个步骤。
↓	
接种到 96 孔培养板	注 2: 加入毒性物质的培养时间，要看毒性物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的周期。
↓	
37°C 培养箱中培养(注 1)	注 3: 由于每孔加入的 CCK-8 量比较少，有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。
↓	
加入不同浓度的毒性物质	注 4: 细胞的种类不一样，形成的 Formazan 的量也不一样。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（5-6 小时）。
↓	
加入 10ul 的 CCK-8(注 2)	注 5: 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以混匀。
↓	
培养 1-4 小时（注 3、注 4）	注 6: 建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm, 参比波长 600-650nm
↓	
测定 450nm 吸光度（注 5）	

细胞毒性曲线图



细胞毒性曲线图

IC₅₀ 的计算方法:

按照以下公式计算细胞存活率，绘制成图表，细胞存活率 50% 的值即为 IC₅₀。

$$\text{细胞存活率 (\%)} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

A_s: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质)

A_c: 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有毒性物质)

A_b: 空白孔 (不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-8)