

## CCK-8 试剂盒产品说明书

### 产品编号:

FY600001-1ML

FY600001-5ML

FY600001-10ML

### 存储条件:

2-8 °C 保存, 有效期12个月;

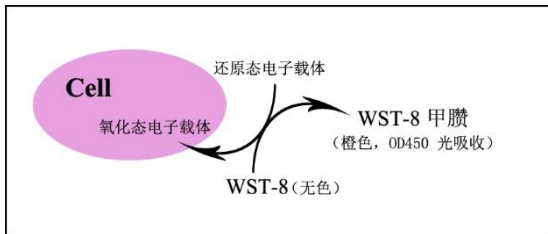
-20 °C 保存, 有效期24个月或更久;

避免反复冻融。

### 产品简介:

CCK-8试剂盒基本成分是水溶性的WST-8, 广泛应用于细胞增殖与毒性的快速检测, 对细胞无毒害。WST-8是类似于MTT的化合物, 与MTT不同的是WST-8具有很好的水溶性, 因此检测过程不需要破坏细胞, 细胞可以继续应用于其他实验。

WST-8可以被细胞内的脱氢酶氧化成水溶性的橙黄色的甲臃染料, 生成的甲臃量与细胞的数量和活力成正比。因此可以用甲臃在450nm处的光吸收表征细胞的活力。



### 自备耗材和设备:

10  $\mu$ l 移液器或者多通道移液器

100-200  $\mu$ l 移液器或者多通道移液器

带450 nm滤光片的酶标仪

平底96孔细胞培养板

CO<sub>2</sub>培养箱

### 适用实验与操作过程:

#### 1. 细胞计数

制备细胞悬液, 计数。

按比例 (如1:2) 用培养基稀释细胞悬液。一般需要做3-5个细胞浓度梯度, 每梯度至少做3孔重复, 每孔100  $\mu$ l培养基。

接种细胞4 h之后 (贴壁细胞待细胞贴壁, 悬浮细胞待细胞适应), 加入10  $\mu$ l CCK-8试剂/孔。培养1-4 h后检测OD450。

以OD450值作纵坐标, 接种细胞数作横坐标绘制标准曲线。

待测细胞接种处理方式同标准曲线, 检测的OD250值带入标准曲线公式, 计算得到细胞数。

#### 2. 细胞活性检测

在96孔板中接种细胞悬液, 每孔100  $\mu$ l, 至少做3孔重复。将细胞培养板37 °C, 5% CO<sub>2</sub>预培养一段时间。

每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂。

培养板在培养箱中培养1-4 h。

酶标仪检测OD450吸光值。

若不能立即测定, 可每孔加入10  $\mu$ l 0.1M HCl或者1%SDS, 室温避光保存。在24 h内测定。

根据OD值判断细胞活性, OD值与细胞活性成正比。

#### 3. 细胞增殖与毒性检测

在96孔板中接种细胞悬液, 每孔100  $\mu$ l, 至少做3孔重复。将细胞培养板, 按照实验设计预培养一段时间 (例如多数情况为24 h)。

在培养板中每孔加入一定量待测药物 (化学药、生物药、生物材料等, 按照对数或线性浓度梯度进行设置分组)。

在培养箱中培养适当的时间 (例如6 h, 12 h, 24 h, 48 h等, 具体时间根据实验内容确定)。

药物培养结束, 每孔加入10  $\mu$ l CCK-8试剂。

酶标仪检测OD450。

若不能立即测定, 可每孔加入10  $\mu$ l 0.1M HCl或者1%SDS, 室温避光保存。在24 h内测定。

根据OD值判断药物对细胞增殖或毒性的影响, OD值与细胞活性和数量成正比, 与药物毒性成反比。

如果药物本身具有氧化性或者还原型, 或者药物在OD450处有光吸收, 加入CCK-8前要更换新鲜培养基以去除药物, 避免药物对CCK-8试剂有影响, 或者增加背景。

## 常见问题:

### 1. 每孔应当接种多少细胞?

96孔板, 每孔细胞接种量一般不低于1000个(100  $\mu$ l培养基), 推荐6000-10000个细胞。生长缓慢的细胞, 如白细胞、神经细胞等, 接种量不低于3000个, 最高可接种于100000个。推荐进行预实验确定最佳细胞接种量。若用24孔板或者12孔板等细胞培养板做实验, CCK-8的使用量等比例放大, 即CCK-8加入量为培养基体积的1/10。

### 2. 如何确定CCK-8孵育的时间?

通常加入CCK-8后1-4 h之间测OD450。OD值在0.3-1.2之间为佳。细胞接种量大, 细胞生长快, 可以减少孵育时间, 反之增加孵育时间。可以每隔半个小时测一次OD450, 确定最佳孵育时间。

### 3. OD值太低怎么办?

增加细胞接种量或者增加CCK-8孵育时间。

### 4. 如何设定空白对照?

不接种细胞的100  $\mu$ l培养基, 加入10  $\mu$ l CCK-8, 测得OD450的值即为空白对照。加药物的实验中, 如果药物在OD450有光吸收, 则空白对照为100  $\mu$ l培养基, 加10  $\mu$ l药物, 10  $\mu$ l CCK-8, 测得的OD450的值为空白对照。

### 5. 如何设定参比波长?

一般情况下不需要设定参比波长, 当样品浑浊时, 设600-650 nm的参比波长, 消除浑浊因素造成光吸收。

### 6. 哪些物质对OD值测定有影响?

如果培养基中的物质(如酚红)在OD450处也有光吸收, 会影响OD测定, 此时可以用空白对照去除测定的影响。

如果待测药物在OD450处有光吸收, 此时的空白对照中应当包含待测药物。

如果待测药物具有氧化性或者还原性, 那么药物对OD450测定也有影响。一般来说, 还原性的物质会增加OD值, 氧化性的物质会降低OD值。可以在加CCK-8之前换新鲜的培养基, 去除药物的影响。

### 7. CCK-8对细胞有毒害作用吗?

CCK-8对细胞的毒性非常低, 检测结束, 细胞还可以继续用于其他实验。

### 8. CCK-8的保质期为多久?

4 $^{\circ}$ C避光保存, 至少可以12个月, -20 $^{\circ}$ C保存至少2年。保存时间稍长会使实验中背景值变高, 但不影响使用。

### 9. 检测时必须用OD450吗?

CCK-8检测时的甲臞产物在430-490 nm之间都有光吸收, 所以可以选择430-490 nm之间的其他检测波长, 但是在450 nm时检测最灵敏。

## 案例比较:

