

Enhanced CCK-8 Cell Counting Kit

增强型CCK-8 细胞活力检测试剂盒

目录号

GS10020-100/500

产品组成

组分	规格 (100 次)	规格 (500 次)
增强型 CCK-8 溶液	1.0 mL	5 × 1.0 mL

保存条件

2~8°C 保存一年，-20°C 可保存两年。

产品简介

本产品是一种基于 WST-8 的 CCK-8 型的增强型细胞活力检测试剂盒，相对普通 CCK-8 检测试剂盒有更高的灵敏度和更广的检测范围，以及更低的细胞毒性。广泛用于细胞增殖和细胞毒性的检测，以及抗肿瘤药物的筛选、药敏等与细胞活性相关的实验。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。

检测原理

WST-8 (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)，在电子载体存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原生成水溶性的橙黄色产物甲瓩，生成甲瓩的数量与活细胞数成正比，即细胞增殖越多越快，则培养基的颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。通过检测在 450 nm 处的吸光度，可以间接计算活细胞数量及细胞活力。

注意事项

1. CCK-8 溶液为淡粉色，操作时注意避光；
2. 长期保存请放 -20°C，常规使用建议 2~8°C 保存。避免反复冻融；
3. 细胞接种时注意混匀，避免细胞沉降导致每孔中细胞数量不等；
4. 培养基中的酚红不会影响实验结果，酚红的吸光度在计算时，可扣除空白孔中本底的吸光度；
5. 加入的药物中若含有金属离子，对显色有影响。终浓度为 1 mM 氯化亚铁、氯化铁、硫酸铜会分别抑制 5%、15%、90% 的显色反应，使灵敏度降低。如果终浓度是 10 mM，将 100% 抑制；

本产品仅供科研使用

6. CCK-8 溶液本身的细胞毒性很低，不会影响细胞的生长。因此，经过 CCK-8 溶液处理的细胞可弃去上清后再加入细胞培养液继续培养。

实验操作步骤

一、制作标准曲线（需要测定细胞具体数量时制作）

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（如：1/2）依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般做3~5个细胞浓度梯度，每组3~6个复孔；
3. 每孔接种100 μ L细胞悬浮液，然后加10 μ L增强型CCK-8溶液培养一定时间（与实验组培养时间一致）；
4. 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度，参比波长600~650 nm。制作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计算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，尤其是加入增强型CCK-8后的培养时间）。

二、细胞活力/毒性检测

1. 按每孔100 μ L细胞悬液，将细胞接种于96孔板中（留2个孔作为空白对照，不加细胞，加入同体积的培养基），在细胞培养箱中预培养 24 h；

注意：

- 1) 当使用标准 96 孔板时，通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ L 约含 2000 个细胞；对白细胞的检测灵敏度相对较低，因此推荐接种量不低于 2500 个/孔（100 μ L 培养基），且延长培养时间；细胞毒性实验每孔加入 100 μ L 约含 5000 个细胞（具体每孔所用的细胞数目，需根据细胞的大小，细胞增殖速度的快慢等决定）；
- 2) 使用 96 孔板进行细胞培养时，需注意水分蒸发而带来的结果误差，建议弃用外围一圈的孔，改加同体积 PBS、水或细胞培养液，以防止水分蒸发，影响结果。另外，也可将 96 孔板置于培养箱中靠近水源的地方。
2. 按照实验需要，加10 μ L不同浓度的药物，在细胞培养箱中孵育一段时间（依据待测药物而定），如仅测定细胞活性，则不需要该步骤，直接进行第3步；
3. 每孔加入10 μ L的增强型CCK-8溶液，在细胞培养箱中继续孵育 0.5~4 h（孵育时间与细胞类型和细胞密度有关，大多数情况孵育 1 h 就可以了。初次实验时可在 0.5、1、2 和 4 h 后分别用酶标仪检测，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）；

注意：

本产品仅供科研使用

- 1) 建议根据实验需求进行预实验摸索最佳细胞数量和CCK-8孵育时间。细胞的种类不一样，形成的甲臞的量也不一样。特别是血液细胞形成的甲臞很少，需要较长的显色时间；
- 2) 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化反应，所以还原剂（抗氧化剂）会干扰检测，如果待检测系统中存在较多的还原剂，需设法除去。
- 3) 加入增强型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。
4. 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度，亦可测定420~480 nm处的吸光度。建议使用600~650 nm的波长作为参考波长进行双波长测定。

注意：

- 1) 为了保证实验结果的准确性，酶标仪检测 OD 时，确保孔内没有气泡，否则会干扰测定。另外，推荐使用多道移液器，以减小平行孔之间的差异；
- 2) 如果暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入10 μ L 0.1 M的 HCl 溶液或1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光室温保存，24 h内吸光度不会发生变化。

5. 结果计算：

$$\text{细胞增殖活力或细胞毒性活力}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100\%$$

OD_{sample}: 实验孔的 OD 值（含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液）

OD_{control}: 对照孔的 OD 值（含细胞、培养基、CCK-8 溶液，不含药物）

OD_{blank}: 空白孔的 OD 值（含培养基、CCK-8 溶液，不含细胞和药物）

注意：如果担心所使用的药物会干扰检测，需设置加了相应量培养基、药物和CCK-8溶液但没有加细胞的孔作为空白对照。

常见问题与解决办法

Q：吸光值太低？

A：

- 1) 适当增加细胞数量；
- 2) 延长加入增强型 CCK-8 溶液后的孵育时间。