

细胞增殖/凋亡检测试剂盒（CCK-8）

名称：细胞增殖/凋亡检测试剂盒

英文名称：Cell Counting Kit-8（CCK-8）

目录号：QYR018

规格：100 test, 500 test

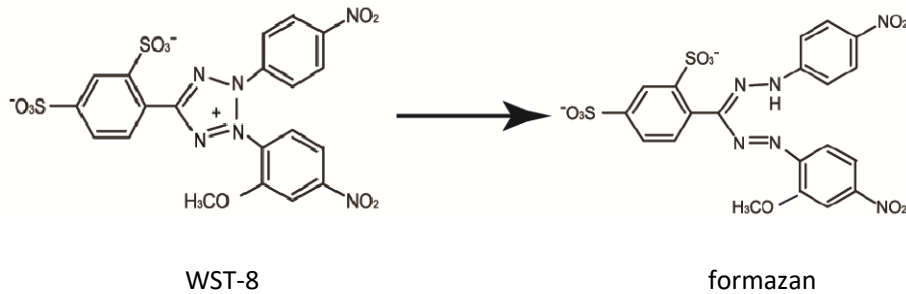
保存条件：4℃，避光保存

保质期：1年

产品描述：

Cell Counting Kit-8，简称 CCK-8 试剂盒，是一种检测细胞增殖和细胞毒性的高灵敏度试剂盒。本试剂盒使用方便，易上手，细胞毒性极低。本试剂盒广泛应用于药物活性评价、细胞毒性测定、细胞增殖等试验。

细胞线粒体内的一些脱氢酶能在电子偶联剂存在的条件下，能将水溶性的 WST-8 还原成橙黄色的 formazan，生成的 formazan 的量与活细胞的数量成正比。一般来说，细胞增殖越快，则颜色越深；若细胞毒性越大，细胞数量越少，则颜色越浅。同种细胞颜色的深浅与细胞数目呈线性关系。



细胞增殖/凋亡检测实验流程

细胞活性检测：

1. 在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的细胞悬液。(tip: 孔板最外面一圈加入 100 μL PBS 溶液，以减少因培养液挥发引入的误差)
2. 在 37 °C 5%的 CO₂ 培养箱中预培养 (tip: 时间根据实验条件 and 需求而定，如 6, 12, 24 h)。
3. 向每个细胞孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂盒溶液。(tip: 加入时动作要轻，注意不要产生气泡，气泡会影响检测时的 OD 值)。
4. 将 96 孔板放到二氧化碳培养箱中孵育 1-4 小时。(tip: 孵育时间一般根据细胞的类型和细胞的密度有

关，孔中细胞数量较多时一般控制在 2 小时内为宜，细胞数量较少时可适当延长至 4 小时。)

5. 用酶标仪读取吸光度，检测波长为 450 nm。

计算公式:

$$\text{细胞存活率} = [(At - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

其中:

At: 实验孔 (含有细胞的培养液、CCK-8、待测物质或其它干预条件)

Ac: 对照孔 (含有细胞的培养液、CCK-8、未给予待测物质或其它干预条件)

Ab: 空白孔 (含有与实验孔相同体积的培养液、CCK-8, 但不含细胞)

细胞增殖抑制或细胞毒性检测:

1. 在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的细胞悬液 (tip: 孔板最外面一圈加入 100 μL PBS 溶液, 以减少因培养液挥发引入的误差)
2. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5%的 CO_2 培养箱中预培养 (tip: 培养时间根据实验设计而定, 一般选择 6, 12 或 24 小时)
3. 向检测细胞孔中加入等体积不同浓度的待测物质 (tip: 加入体积一般不超过 10 μL)。
4. 将培养板放入培养箱中培养一段时间 (tip: 培养时间根据实验设计而定, 例如 24, 48 或 72 小时)。
5. 向每个细胞孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂盒溶液 (tip: 加入时动作要轻, 注意不要产生气泡, 气泡会影响检测时的 OD 值)。
6. 将 96 孔板放到二氧化碳培养箱中孵育 1-4 小时。(tip: 孵育时间一般根据细胞的类型和细胞的密度有关, 孔中细胞数量较多时一般控制在 1-2 小时为宜, 细胞数量较少时可适当延长至 3-4 小时。)
7. 用酶标仪读取吸光度, 检测波长为 450 nm。

计算公式:

$$\text{抑制率} = [(Ac - At) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

其中:

At: 实验孔 (含有细胞的培养液、CCK-8、待测物质)

Ac: 对照孔 (含有细胞的培养液、CCK-8、未加待测物质)

Ab: 空白孔 (含有与实验孔相同体积的培养液、CCK-8, 但不含细胞)

试剂盒检测结果的线性评估:

将不同浓度的肝癌 HepG2 细胞按照每孔 100 微升培养液接种到 96 孔板中, 培养至细胞贴壁充分后, 每孔加入 10 微升的 CCK-8 溶液孵育不同时间后测定 A_{450} 的吸光度, 结果显示试剂盒检测结果线性良好 (图 1, 2, 3)。

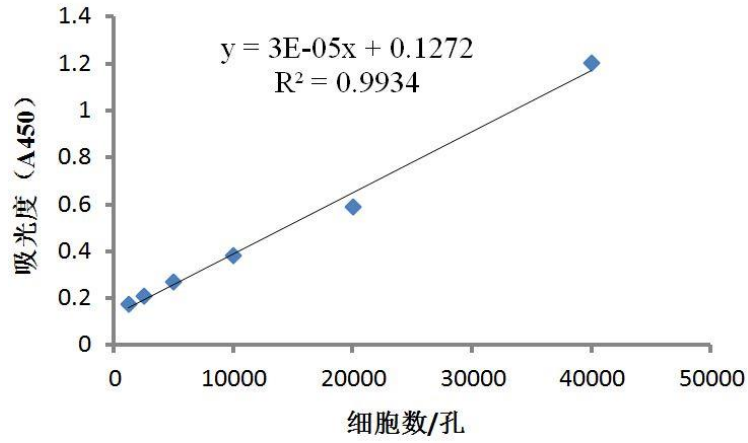


图1 CCK-8 作用 HepG2 细胞 1 小时的检测效果

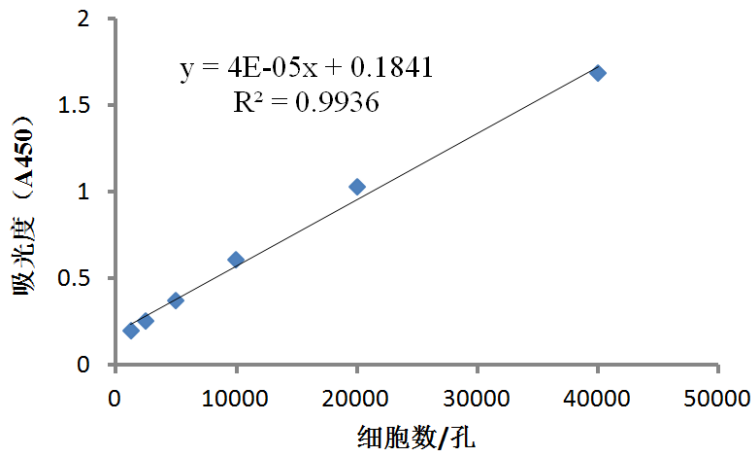


图2 CCK-8 作用 HepG2 细胞 2 小时的检测效果

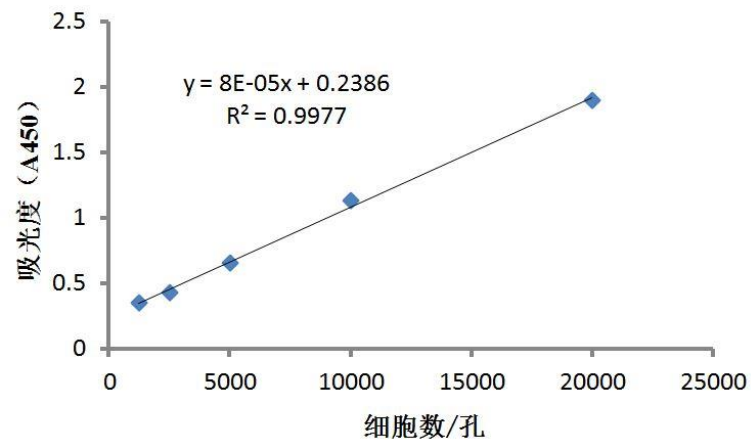


图3 CCK-8 作用 HepG2 细胞 4 小时的检测效果

注：上述线性检测效果仅供参考，实际不同实验检测中存在差异。当细胞数量过多的时候，CCK-8 加入后的孵育时间不宜太长，一般控制在 2 小时以内。

注意事项：

1. 关于空白对照设定，一般是在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，测定 450 nm 的吸光度即为空白对照。
2. 在做加药实验时，还应考虑药物本身的吸收对实验结果的影响。如果待测药物在 450 nm 处有强吸收，则需在不含细胞，加入药物的培养基中再加入 CCK-8，测定 450 nm 的吸光度即为加药实验时的空白对照。另外，也可采用换用新鲜培养基的方法，去除干扰后再加入 CCK-8 进行检测。
3. 本试剂盒的检测依赖于线粒体脱氢酶催化的反应，当待测物质具有很强抗氧化能力的时候会对干扰检测，故应想办法除去再加入 CCK-8 进行检测。例如：可以通过换新鲜培养基的方法，去除干扰后再加入 CCK-8 进行检测。
4. 如果检测 OD 值太低，可以适当延长 CCK-8 加入后的孵育时间；也可以增加种板时细胞的数量。
5. 如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但 450nm 检测灵敏度最高。