

## 细胞增殖毒性检测(CCK-8)

规格：微量法 96 样

检测波长：450nm

编号：ml052166

### 注 意：

- 1、正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定；
- 2、为了您的安全和健康，请佩戴好防护用具；

### 测定意义：

Cell Counting Kit-8，简称 CCK-8 试剂盒，是一种基于 WST-8 而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。可以用于细胞因子等诱导的细胞增殖检测，也可以用于抗癌药物等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测，或一些 药物诱导的细胞生长抑制检测。

### 测定原理：

CCK-8 溶液可以直接加入到细胞样品中，不需要预配各种成分。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下，可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan。

细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，颜色的深浅（生成的 formazan 量）和细胞数目呈线性关系。

### 自备仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、细胞培养箱、震荡仪、细胞计数板

### 试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏
CCK-8 溶液	1mL	x1	4°C, 避光

### 实验准备：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 450nm，蒸馏水调零；
- 在 96 孔板中接种细胞悬液(100uL/孔)。将培养板放在培养箱预培养。

### 测定操作：

#### 一、绘制标准曲线

- 先用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量；
- 按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 5-7 孔细胞浓度梯度，可做 3-6 个复孔，每孔接种 100uL 细胞悬液和 10uL CCK-8 溶液。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为空白对照管；

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白对照管 (只做一管)
细胞悬液	100	
对应培养基		100
CCK-8 溶液	10	10
培养箱内孵育 0.5-4h 后，于 450nm 处测定吸光值 记为 A, $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白对照管}}$ 。		

- 在细胞培养箱内继续孵育 0.5-4 小时，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 小时后分别用酶标仪检测于 450nm 处测定吸光值，然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点绘制标曲用于后续实验。
- 绘制出一条孵育特定时间下以细胞数量为横坐标 (x)，以其对应的吸光值差值 ( $\Delta A$ ) 为纵坐标 (y) 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。使用此标准曲线的前提条件是试验条件完全一致。

## 二、细胞增殖毒性-检测

- 1、在 96 孔板中待测定的细胞悬液依次操作
- 2、向培养板加入 10uL 不同浓度的待测物质。
- 3、将培养板在培养箱培养一段适当的时间 (例如:6,12,24 或 48 小时)。
- 4、向每孔加入 10uL CCK-8 溶液(注意不要在孔中生成气泡，它们会影响吸光值的读数)。
- 5、将培养板在培养箱内培养 0.5-4 小时。
- 6、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

## 三、细胞活性检测

- 1、在 96 孔板待测定的细胞悬液中依次操作
- 2、向每孔加入 10uL 的 CCK-8 溶液(注意不要在孔中生成气泡，它们会影响吸光值的读数)。
- 3、将培养板在培养箱内培养 0.5-4 小时。
- 4、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度

### 注意：

- 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，改加相同量的 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、本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应，所以还原剂(例如一些抗氧化剂)会干扰检测，如果待检测体系中存在较多的还原剂，需设法去除。
- 3、WST-8 对细胞无明显毒性。加入 CCK-8 溶液显色后，可以在不同时间反复用酶标仪读板，使检测时间更加灵活，便于找到最佳测定时间。
- 4、培养基中的酚红不会影响实验结果，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。
- 5、每孔加 10 $\mu$ L 0.1M HCl 溶液或 1%SDS(W/V)溶液可以终止 CCK-8 试剂反应，避光条件下在 24 小时内吸光度不会发生变化。
- 6、如果吸光值太低，可以适当增加细胞的数量，或者延长 CCK-8 试剂反应的时间。

## 结果计算：

细胞存活率  $=[(As-Ab)/(Ac-Ab)] \times 100\%$

抑制率  $=[(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100\%$

As：实验孔吸光度（含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液）；

Ac：对照孔吸光度（含细胞、培养基、CCK-8 溶液，不含药物）；

Ab：空白孔吸光度（含培养基、CCK-8 溶液，不含细胞、药物）。

### 预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。