

# Cell Counting Kit-8

## 说明书

**Cat. No.: EZB-CK8**

### 一、产品简介

Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8, 是一款基于 WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐)的用于测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。WST-8 在电子载体 1-Methoxy PMS 存在的情况下能够被细胞内的脱氢酶还原成高水溶性的橙黄色甲臞染料, 生成的甲臞量与活细胞数量成正比, 故通过测量甲臞染料在 450 nm 波长处的吸光值, 即可测出活细胞的数量。本试剂盒的 CCK-8 Reagent 为即用型试剂, 可以直接加入到细胞样品中, 孵育一定时间后即可检测, 无需预配各种成分。

### 二、保存条件

本试剂盒建议置于 2 ~ 8°C 避光保存。过期日期详见产品标签的有效期信息。

### 三、产品组分

产品组分	EZB-CK8-S (100 rxns, 10 µl/rxn)	EZB-CK8 (500 rxns, 10 µl/rxn)	EZB-CK8-L (2500 rxns, 10 µl/rxn)
CCK-8 Reagent	1 ml	5 ml	25 ml

### 四、注意事项

- 第一次做实验时, 建议做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 Reagent 后的孵育时间(常规孵育时间为 1~4 h)。
- 实验操作中避免产生气泡。加 CCK-8 Reagent 时, 建议斜贴着培养板壁加, 不要插到培养基液面下加。
- 本试剂盒的检测是依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原性物质以及氧化性物质均会干扰检测, 使用前请先去除干扰物质再加 CCK-8 Reagent 进行检测。
- 进行药物抑制实验时, 如果药物中含有金属(如氯化铅、氯化铁、硫酸铜等)则会影响 CCK-8 Reagent 的显色反应, 最终导致检测的灵敏度降低。
- 如果要测定细胞的具体数量, 建议先做一个标准曲线。

### 五、自备材料

多通道移液器 (10 µl、100 ~ 200 µl)、带有 450 nm 滤光片的酶标仪、96 孔细胞培养板、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱

## 六、操作步骤

### 1、制作标准曲线

- (1) 制备的细胞悬液，确定细胞密度，然后接种细胞。
- (2) 按比例（如 1:2 的比例）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 个细胞浓度梯度，每组 3~6 个复孔，接种至 96 孔板中，每孔加入 100  $\mu$ l 的细胞悬液。
- (3) 接种后培养 2~4 h 使细胞贴壁，然后每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 Reagent，轻轻混匀，在 37°C 培养箱中孵育一定时间（依不同的细胞种类而定，一般是 1-4 h）后，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值，制作出一条以细胞数量为横坐标(X 轴)，吸光值为纵坐标(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（使用此标准曲线的前提条件是实验的条件要一致）。

### 2、细胞活性检测

- (1) 在 96 孔板中接种细胞悬液（100  $\mu$ l/孔）。将培养板放在培养箱预培养（在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的条件下），同时设置对照组和空白组。
- (2) 向每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 Reagent（建议沿壁加入，避免产生气泡），轻轻混匀。
- (3) 将培养板放在培养箱中孵育一定时间。
- (4) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。

### 3、细胞增殖-毒性检测

- (1) 在 96 孔板中接种细胞悬液（100  $\mu$ l/孔）。将培养板在培养箱预培养 24 h（在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的条件下），同时设置对照组和空白组。
- (2) 向培养板中加入 10  $\mu$ l 不同浓度的待测物质。
- (3) 将培养板放在培养箱中孵育一段适当的时间。
- (4) 向每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 Reagent（建议沿壁加入，避免产生气泡），轻轻混匀。
- (5) 将培养板放在培养箱中孵育一定时间。
- (6) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。

### 4、计算公式

细胞存活率 =  $[(A-C) / (B-C)] \times 100\%$

抑制率 =  $[(B-A) / (B-C)] \times 100\%$

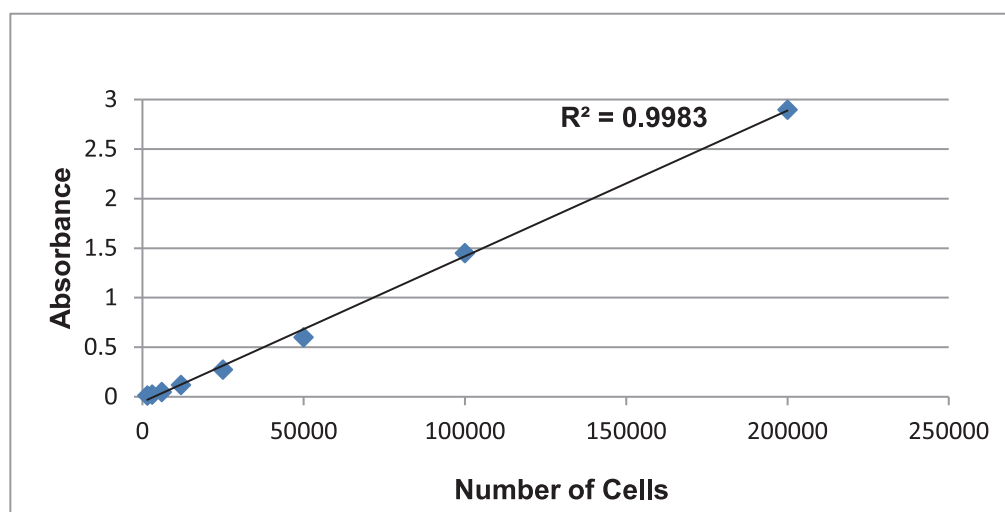
A: 实验组吸光值（为含有细胞的培养基、CCK-8 Reagent、待测物质的吸光值）

B: 对照组吸光值（为含有细胞的培养基、CCK-8 Reagent、没有待测物质的吸光值）

C: 空白组吸光值（为含有培养基、CCK-8 Reagent 的吸光值）

## 七、代表性实验结果

图 1. 吸光值与活细胞数量成正比。在 96 孔板中接种 293T 细胞悬液 (100  $\mu$ l /孔), 将培养板放在培养箱中预培养 4 h, 然后向每孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8 Reagent, 将培养板放在培养箱中孵育 1 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。



## 八、常见问题及解决方法

### 1、每孔中应接种多少细胞?

当使用 96 孔培养板时, 贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100  $\mu$ l 培养基)。检测白细胞时接种量不低于 2,500 个/孔 (100  $\mu$ l 培养基)。

### 2、CCK-8 Reagent 对细胞有毒性吗?

CCK-8 Reagent 本身的细胞毒性很低, 不会影响细胞的生长。因此, 同样的细胞在 CCK-8 法检测后还可用于其他的检测实验, 如中性红法或结晶紫法。

### 3、实验过程中, 处理细胞用的不是 96 孔板, 加入 CCK-8 Reagent 的体积是多少?

CCK-8 Reagent 的加入量是细胞板中每孔培养基体积的 10%, 按照该比例进行换算即可。如果使用 384 孔板进行实验建议先将 CCK-8 Reagent 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 1 倍后, 加入细胞板中每孔培养基的 20% 体积即可。

### 4、哪些物质会影响 CCK-8 的测定?

当有还原性物质存在时会影响 CCK-8 的测定, 增加吸光值; 在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生, 减小吸光值; 在有酚红存在的情况下, 会增加空白吸收, 但不影响测定, 扣除空白吸收即可。

### 5、在做加药实验时, 药物对测定是否有影响? 如何解决?

有时会有影响。如果药物具有还原性, 会和 CCK-8 Reagent 发生显色反应, 增加吸光值。解决办法: 首先要确认药物是否有吸收, 在含有药物的培养基中加入 CCK-8 Reagent, 测定 450 nm 的吸光值, 如果它的吸光值比不含药物的培养基 (加 CCK-8 Reagent) 的吸光值高, 则证明药物有影响, 那么可在加 CCK-8 Reagent 之前更换培养基, 去掉药物的影响。

### 6、实验过程中可以加入 CCK-8 Reagent 隔夜后第二天检测吗?

一般情况下, 建议加入 CCK-8 Reagent 后, 37°C 孵育 2 h 后检测。如果时间来不及可以向每孔加入 1% SDS 溶液, 室温避光保存, 24 h 内检测, 吸光值不会受到影响 (加入 1% SDS 溶液的体积与加入 CCK-8 Reagent 的体积相同)。

### 7、如果测得的吸光值很低, 如何解决?

一是适当增加细胞数量; 二是延长加入 CCK-8 Reagent 后的孵育时间。