Superbrilliant® CCK8 细胞增殖与毒性检测试剂盒（增强型）

Superbrilliant® Cell Counting Kit-8

Cat.No.: ZS-C31006

组分

编号	组 分	ZS-C-31006S (100T)	ZS-C-31006M (500T)	ZS-C-31006L (1000T)
102032	Cell Counting Kit-8	1 ml	5 ml	10 ml
	说明书	1 份	1 份	1 份

储存： Cell Counting Kit-8 溶液在-20℃避光下保存 2 年；融化后请在 4℃避光放置，可保存一年，防止反复冻融增加背景值干扰实验结果。

简介：Superbrilliant® Cell Counting Kit-8，简称 CCK-8 试剂盒，基于 WST-8 水溶性四唑（2-（2-甲氧基-4 硝基苯）-3-(4-硝基苯)-5-（2,4-二磺基苯）-2H-四唑单钠盐）一种类似于 MTT 的化合物进行检测。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臜染料，这种甲臜染料能够直接溶解在培养基中。随着细胞增殖越多越快，培养基的颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，生成的甲臜物的数量与活细胞的数量成正比，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系，试剂盒可直接进行细胞增殖和细胞毒性的分析。

本试剂盒使用方便，包含已配制好的含有水溶性四唑的 CCK-8 溶液，随开即用，直接使用 96 孔板或 384 孔板在酶标仪上检测，不需要溶解甲臜。使用 CCK-8 法可作用于生物活性因子的活性检测，抗肿瘤药物的筛选，细胞增殖的测定，细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖等相关的大规模高通量型实验。

应用：细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测。

操作方法

A. 细胞计数测定

1. 在 96 孔培养板中加入 100 µl /孔贴壁或悬浮细胞培养悬液(>2000 个细胞/孔)；
2. 培养箱中预培养细胞；
3. 向培养板中加入药物(如果不加药物，直接进行第五步操作)；
4. 培养箱中培养一段时间；
5. 向每孔加入 10 µL 的 CCK-8 溶液(注意不要产生气泡，影响 OD 值的读数)；

6. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时(根据具体实验调整孵育时间)；

7. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度；

8. 如果暂时不测定 OD 值，可向每孔中加入 10 μL 0.1 M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，24 h 内吸光度不会产生变化。

B. 制作标准曲线（需要测定细胞具体数量时）

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(例如:1/2 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 3-5 个细胞浓度梯度，每组 3-6 个复孔；

3. 接种后培养使细胞贴壁，然后加 CCK-8 试剂培养一定时间后测定 OD 值，制作出一条以细胞数量为 X 轴，OD 值为 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(用此标准曲线的前提条件是实验的条件要一致)。

C. 细胞增殖-毒性检测

1. 96 孔培养板中配置 100 μl /孔的细胞悬液(通常细胞增殖实验每孔加入 100 μl 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100 μl 5000 个细胞。具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小，细胞增殖速度的快慢等因素决定）。按照实验需要，进行培养（在 37℃，5%CO_2，的条件下）预培养 24 小时；

2. 向培养板加入 1-10 μl 不同浓度的待测药物；

3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或 48 小时）；

4. 加入 10 μl /孔的 CCK-8 溶液（注意不要产生气泡，影响 OD 值读数）；

注：如起始的培养体积为 200 μl，则需加入 20 μl CCK-8 溶液，其他添加量同理。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空白对

照。如果担心所使用的药物会干扰检测，需设置加了相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。

5. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时，具体时间长短根据不同的细胞类型和密度等实验情况而定，可在 0.5、1、2 和 4 小时处分别用酶标仪检测，选取吸光度范围较适宜的时间点进行后续实验；

6. 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度，如无 450 nm 滤光片，可以使用 420-480 nm 的滤光片。可以使用大于 600 nm 的波长，例如 650 nm，作为参考波长进行双波长测定；

7. 如果暂时不测定 OD 值，可向每孔中加入 10 μL 0.1 M 的 HCL 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，24 h 内吸光度不会产生变化。

注：如待测物质有氧化性或还原性，可在添加 CCK-8 溶液前去除培养基并用培养基洗涤细胞两次，重新加入新培养基，去除药物的影响造成实验误差。如添加药物影响较小时，可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收。

活力计算：

细胞活力*（%）=[A（加药）-A（空白）] / [A（0 加药）-A（空白）] ×100

A（加药）：包含细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：包含培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：包含细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

*细胞活力：细胞增殖活力或细胞毒性活力

细胞增殖分析及细胞毒性分析注意事项：

1. 制备细胞悬液，接种到 96 孔培养板中，在 37℃培养箱中进行培养。细胞接种后贴壁大约需要培养 24 小时，如无需贴壁则可省去此步。

2. 在做细胞毒性分析时，加入不同浓度的毒性物质后，细胞的培养时间具体要看毒性物质的性质和细胞敏感性，一般根据细胞周期而定，起码要一代以上的周期。

3. 因每孔加入 10 μl 的 CCK-8 溶液量较少，因试剂粘附在孔壁产生一定误差，建议在添加试剂后轻敲培养板以帮助混匀。

4. 培养细胞的时间在 1-4 小时，具体可根据细胞的种类决定，其形成的 Formazan 量也不同。如显色不够可继续培养，以确定最佳培养条件。应特别注意是，血液细胞形成的 Formazan 很少，需 5-6 小时的较长显色时间。如颜色显示不均匀，可轻敲培养板以帮助混匀。

5. 测定 450 nm 吸光度时，建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490 nm，参比波长 600-650 nm。

细胞毒性分析 IC_{50} 的计算方法：

按照以下公式计算细胞存活率，绘制成图表，细胞存活率 50%的值即为 IC_{50}

细胞存活率（%）=$[(A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100\%$

A_s：实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质）

A_c：对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有毒性物质）

A_b：空白孔（不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-8）

其他注意事项：

1. 接种时应注意细胞悬液一定要混匀，以避免细胞沉淀下来，导致每孔中的细胞数量不等，可以每接种几个孔就混匀一下。培养板周围一圈孔培养基容易挥发，为了减少误差，可以采取弃用周围一圈的办法，在培养板的四边每孔只加培养基、水或 PBS，而不作为指标检测孔。同时，可把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

2. CCK-8 检测细胞活性依赖于脱氢酶催化的反应，如待检测体系中存在较多还原剂，例如一些抗氧化剂会干扰检测，需设法去除。

3. 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 试剂后的培养时间。

4. 建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。加入 CCK-8 试剂时，建议斜贴着培养板壁加，不要查到培养基液面下加样造成气泡的出现，干扰 OD 值读数。

5. 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1000 个/孔（100 μl 培养基）。检测白细胞时的灵敏度相对较低，因此推荐接种量不低于 2500 个/孔（100 μl 培养基），且培养时间长一些。如要使用 24 孔板或 6 孔板实验，请先计算每孔相应的接种量，并按照每孔培养基总体积的 10%加入 CCK-8 溶液。

6. 加入 CCK-8 溶液，如细胞培养时间较长，培养基颜色已变化或 PH 值变化时，建议换用新鲜的培养基。

7. 如果没有 450 nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450 nm 滤光片的检测灵敏度最高。

9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题及解答：

Q1. 为什么要设定参比波长？

A1. 不一定要设定。在参比波长处 CCK-8 试剂没有吸光度，设定参比波长是为了去除因样品浑浊而带来的吸收。

Q2. 什么物质存在时会影响 CCK-8 的测定？

A2. 当有还原性物质存在时会影响 CCK-8 的测定，增加 OD 值；在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生，减小 OD 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；血清不影响测定。

Q3. 如何减少由于 CCK-8 试剂在枪头或者孔壁上的残留所带来的误差？

A3. 可以在加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂 1 倍，混匀后每孔加 20 μl 使用。

Q4. 在 CCK-8 显色过程中，如何终止反应？

A4. 可以每孔加 10 μl 0.1 M HCl 溶液；或在显色反应后，将培养板放入 4℃冰箱内；或者每孔加 10 μl 1%(w/v)的 SDS（十二烷基磺酸钠）溶液。需要注意的是反应停止后，应在 24 小时内测定。

Q5. 必须预培养细胞吗？

A5. 不一定，预培养细胞可以保持细胞的最好状态。如不做细胞的预培养，细胞内的脱氢酶可能不稳定，需要在做标准曲线和检测时统一检测条件。

Q6. 药物中含有金属对结果有什么影响？

A6. 金属对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1 mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90%的显色反应，使灵敏度降低。如终浓度为 10 mM，会 100%抑制。

Q7. 不同细胞，CCK-8 的灵敏度是否一样？

A7. 不同细胞的脱氢酶活性不一样，显色程度不一样，灵敏度也不一样。

Q8. 悬浮细胞和贴壁细胞在接种数量上有何区别？

A8. 大部分悬浮细胞相比贴壁细胞比较难显色，OD 值偏低。贴壁细胞显色比较容易，若细胞数量过大，有时吸光度会超过酶标仪的读数。

Q9. 测定的 OD 值在什么范围比较合适？

A9. 一般情况下 OD 值在 0.1-2.0 范围内都可以，在 1.0 附近较好。如 OD 值偏低可适当增加细胞数量，或延长加入 CCK-8 试剂后的反应时间。

Q10. 做悬浮细胞的实验时，检测几天比较合适？

A10. 因长时间培养，培养基中的氧气和营养会流失影响细胞状态。建议在 4-5 天左右，并确定细胞数量是否已饱和。如果需长时间培养，应弃用周围一圈孔。

Q11. 药物毒性实验时药物对细胞有抑制作用，但检测结果为什么 OD 值升高？

A11. 很可能药物和 CCK-8 试剂发生了反应，可以做一个只加药物的空白对照，如果 OD 值确实比正常的空白对照 OD 值高很多，则说明药物和 CCK-8 试剂发生了反应，可以通过更换培养基清洗掉药物的办法解决。

Q12. CCK-8 对细胞有毒性么？

A12. CCK-8 对细胞的毒性相当低，而添加到培养基中的 CCK-8 被稀释了 10 倍，不会影响细胞的生长。 因此，可以过夜或长时间培养。同一个细胞培养液在 CCK-8 检测后还可以用于其他细胞增殖检测，如结晶紫检测、中性红检测或者 DNA 荧光检测等。由于每种细胞对于 CCK-8 的耐受力都不同，因此在需要进行长时间培养时，先检测一下细胞在加入 CCK-8 培养后的活力。