

服务热线:400-6169-114 020-84224925 网站:www.genesion.com.cn Email:whiga22@126.com

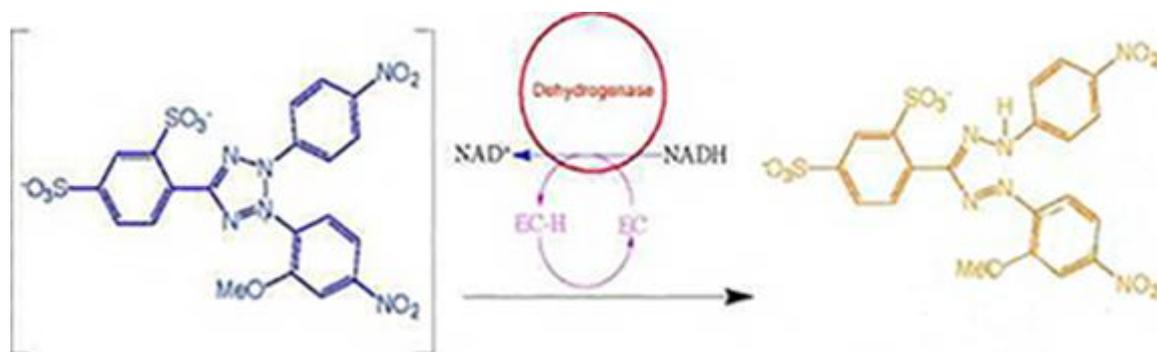
增强型CCK8 检测试剂盒(GenXion Enhanced Cell Counting kit-8)

产品名称: GenXion 增强型 CCK8 试剂盒

产品编号: GxECCK08-1000

包装规格: 1000 次 (10 mL)

水溶性四唑 (2-(2-甲氧基-4-硝基苯)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐), 是一种类似于 MTT 的化合物, 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臞染料(formazan, 下图), 这种甲臞染料直接溶解在培养基中。水溶性四唑被细胞内脱氢酶生物还原后生成的甲臞染料越多, 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。对于同样的细胞, 生成的甲臞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。正是利用这一特性开发的 CCK-8 试剂盒直接进行细胞增殖和毒性分析。CCK-8 法应用非常广泛, 可以用于生物活性因子的活性检测, 抗肿瘤药物的筛选, 细胞增值的测定, 细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。本试剂盒使用方便, 试剂盒包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的 CCK-8 溶液, 即开即用, 无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞, 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。



CCK-8 法与 MTT 比较:

CCK8 试剂盒提供了一种灵敏度高, 操作简便, 使用安全, 重现性好的细胞增殖与活性检测方法。与传统的 MTT 相比无需有机溶剂和放射性同位素, 步骤少, 无损失, 结果准确! 本试剂盒检测非常便捷。试剂盒仅一管已经配制好的含有 WST-8 的 CCK-8 溶液, 无须再进行任何配制等操作。无须使用同位素, 所有的检测步骤仅在同一块 96 孔板内完成。不必洗涤细胞, 不必收集细胞, 也不必采用额外的步骤去溶解 formazan。可以用于大批量样品的检测。

- 1 MTT 实验生成的甲臞不是水溶性的, 需要使用 DMSO 等有机溶剂溶解; 而本方法产生的甲臞是水溶性的, 不仅省去了溶解的步骤, 更因此而减少了该操作步骤带来的误差。
- 2 与 MTT 方法相比, 本方法线性范围更宽, 灵敏度更高。
本方法对细胞无毒性, 因此加入 WST-8 显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读数多次测定从而找到最佳测定时间。
- 3 本方法所用试剂在培养基中比 MTT 更加稳定, 实验效果重复性好。
- 4 MTT 具有毒性, 同时其生成的甲臞需要有机溶剂溶解, 会对操作人员身体造成危害。本试剂无毒, 使用中无需有溶剂, 操作更加安全。

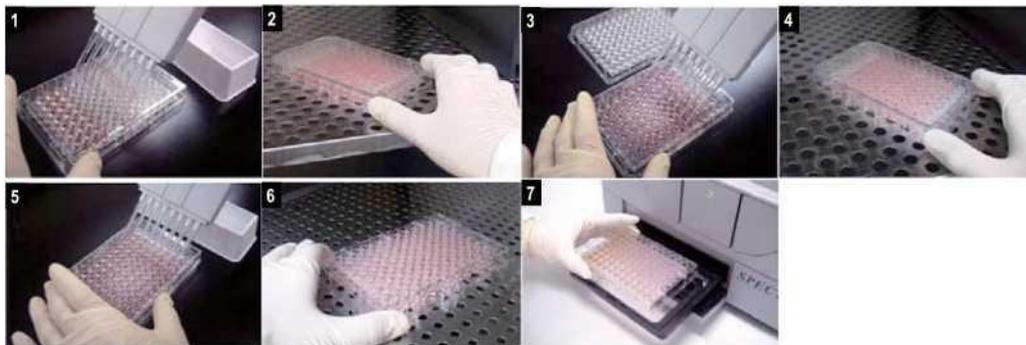
- 5 本试剂盒在 4° C 避光可长期保存, 使用无需配制, 即开即用。
- 6 酚红和血清对 CCK 法的检测不会造成干扰 (扣除空白孔即可)

CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲贍产物的水溶性	差 需要加 DMSO 溶解	好	好	好
产品性状	粉末	2 瓶溶液	溶液	1 瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	一般	较高	较高	高
重现性	差	中等	好	非常好
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高 细胞形态完全消失	很低 细胞形态不变	很低 细胞形态不变	很低 细胞形态不变
试剂稳定性	一般	非常差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般, 工作量大	便捷	便捷	非常便捷

保存条件: CCK-8 溶液在避光, 0-5° C 的条件下可以保存一年; -20° C 下保存 2 年; 如需经常使用请将试剂存放在 0- 5° C, 为防止背景值增加干扰实验结果, 请勿反复冻融。

CCK-8 试剂使用方法



一、通用操作步骤

1. 在 96 孔板每孔加入 100 μ L 细胞悬液; 2. 在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. 在培养箱中培养一段时间; 5. 向每孔加入 10 μ L 的 CCK 溶液; 6. 将培养板在培养箱内孵育 1~4 小 时(根据具体实验优化); 7. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

二、制作标准曲线(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 2-4 小时使细胞贴壁, 然后加 CCK 试剂培养一定时间后测定 OD 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标(X 轴), OD 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(用此标准曲线的前提条件是 实验的条件要一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK 后的培养时间)

三、细胞活性检测

- 1、在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (在 37°C, 5%CO₂ 的条件下)。
- 2、向每孔加入 10 μ L 的 CCK 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
- 3、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 4、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
- 5、如果暂时不测定 OD 值, 打算以迟测定的话, 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1M 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。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

四、细胞增殖-毒性检测

使用方法（以 96 孔板为例，其他规格培养板按实际情况安排）：

1. 在 96 孔板中配置 100 μL 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 0，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 $^{\circ}\text{C}$ ，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刺激。
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（彤面有具体细胞的建议时间，例如：6、12、24 或 48 小时）。
4. 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。如果起始的培养体积为 200 μl ，则需加入 20 μl CCK-8 溶液，其他情况以此类推。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. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时，对于大多数情况孵育 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。
6. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度，如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600nm 的波长，例如 650nm，作为参考波长进行双波长测定。
7. 如果暂时不测定 OD 值，打算以 C 测定的话，可以向每孔中加入 10MI0.1M 的 HCL 溶液或者 1%w/vSDS 溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。
8. 注意：如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK 之前更换新鲜培养基（除去培养基，并用培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基），去掉药物影响。当然药物影响比较小的情况下，可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空 0 吸收即可。

活力计算： 细胞活力* (%) = $\frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0 \text{加药}) - A(\text{空白})} \times 100$

A (加药)：具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

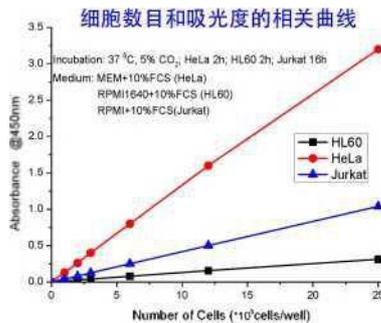
A (空白):具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A (0 加药)：具有细胞、CCK 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

方法	注意事项
制备细胞悬液	注 1:细胞接种后贴壁大约需要培养 24 小时，不需要贴壁的话，可以省去这个步骤
↓	
接种到 96 孔培养板	注 2:由于每孔加入的 CCK-8 量比较少，有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差， 建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。
↓	
37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养(注 1)	
↓	
加入 10 μL 的 CCK-8(注 2)	注 3:细胞的种类不一样，形成的 Formazan 的量也不一样。 如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。 特别是血液细胞形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。
↓	
培养 1-4 小时(注 3、注 4)	注 4:如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。
↓	
测定 450nm 吸光度(注 5)	注 5:建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm, 参比波长 600-650nm



细胞毒性分析

方法

制备细胞悬液

↓

接种到 96 孔培养板

↓

37°C 培养箱中培养(注 1)

↓

加入不同浓度的毒性物质

↓

加入 10 μ L 的 CCK-8(注 2)

↓

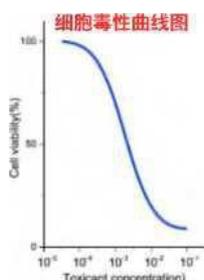
培养 1-4 小时(注 3、注 4)

↓

测定 450nm 吸光度(注 5)

注意事项

- 注 1:细胞接种后贴壁大约需要培养 24 小时, 不需要贴壁的话, 可以省去这个步骤。
- 注 2:加入毒性物质的培养时间, 要看毒性物质的性质和细胞的敏感性, 一般要根据细胞周期来决定, 起码要一代以上的周期。
- 注 3:由于每孔加入的 CCK-8 量比较少, 有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差, 建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。
- 注 4:细胞的种类不一样, 形成的 Formazan 的量也不一样。如果显色不够的话, 可以继续培养, 以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的 Formazan 很少, 需要较长的显色时间(5-6 小时)。
- 注 5:如果颜色不均匀的话, 可以轻轻敲击培养板以混匀。
- 注 6:建议采用双波长进行测定, 检测波长 450-490nm, 参比波长 600-650nm



细胞毒性曲线图

IC₅₀ 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 IG。

细胞存活率 (%) = $\frac{A_s - AbVdAb}{A_t - Ab} \times 100\%$

A_s: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质)

A_t: 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)

注意事项:

- 1 由于使用 96 孔板进行检测, 如果细胞培养时间较长, 一定要注意蒸发的的问题。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 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 CCK-8 检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应。任何待测体系中存在还原剂, 例如一些抗氧化剂会干扰检测, 需设法去除。如果待测物质有氧化性或还原性的话, 可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基, 去掉药物的影响。当然药物影响比较小的情况可以不更换培养基, 直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。
- 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 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, 溶液产生气泡, 会干扰 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 μ L 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 μ L 培养基), 且培养时间长一些。如果要使用 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。
- 7 如果没有 450nm 的滤光片, 可以使用吸光度在 430-490nm 之间的滤光片, 但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。
- 8 酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响。培养基中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。
- 9 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。