

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01065

产品规格

100T、500T、3000T、10000T

产品介绍

增强型 CCK-8 细胞增殖试剂盒，是一种基于 WST-8（化学名：2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐）显色反应的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品，和 MTT 或 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先，MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的甲臜不是水溶性的，需要有特定的溶解液来溶解；而 WST-8、XTT 和 MTS 产生的甲臜都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤，WST-8 产生的甲臜比 XTT 和 MTS 产生的甲臜更易溶解，WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更加稳定，WST-8 与 MTT、XTT 相比线性范围更宽，灵敏度更高。

WST-8 在电子耦合试剂存在的条件下，可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臜产物（formazan）。颜色的深浅与细胞的增殖成正比，与细胞毒性成反比。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值，间接反映活细胞数量。工作原理见图 1。

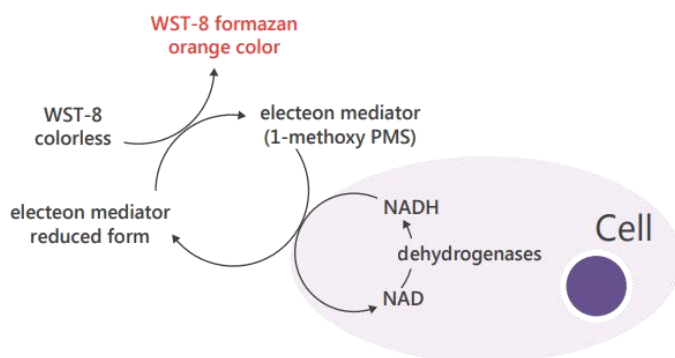


图 1 CCK-8 原理示意图

应用范围

药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测

储运条件

4 °C 避光保存，长期储存置于 -20 °C，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

线性好： 本产品在高细胞数量下和低细胞数量下都具有良好的线性；

毒性低： 本产品对细胞造成很低的毒性，不会影响后续实验；

即用型： 本产品开盖即用，无需做梯度稀释。

注意事项

- 1.使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
- 2.使用 96 孔进行细胞铺板，如果培养时间较长，一定要注意蒸发问题。建议采取弃用周围一圈的办法，改加相同量的 PBS 水或者培养液。
- 3.用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡，否则会干扰测定。
- 4.若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 10 μ L 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液，并将培养板在室温条件下避光保存。24 h 内测定，吸光度不会发生变化。
- 5.若细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化或 pH 发生变化，建议更换新鲜的培养基后再加 CCK-8 试剂。含有酚红的培养基不影响本试剂盒做细胞活性的测定。
- 6.如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议设定 600 nm (或 600 nm 以上) 作为参比波长，扣除参比波长的 OD 值即可。
- 7.CCK-8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深，OD 值不断增加（注：活细胞内的脱氢酶是持续产生的），一般推荐的孵育时间是 0.5~4 h。
- 8.本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 9.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材：96 孔细胞培养板
- 2.试剂：细胞样本

操作步骤

1.标准曲线设立

- (1) 先用细胞计数板/细胞计数仪计数所制备的细胞悬液中的细胞数量，然后接种细胞。
- (2) 按比例依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔)，建议可以设置 8 个细胞浓度梯度，每个浓度设置 6 个重复进行细胞铺板，例如按照细胞个数 0/312.5/625/1250/2500/5000/10000/20000 cells/96 孔板进行铺板。
- (3) 接种后培养 2~4 h 使细胞贴壁，然后每 100 μ L 培养基加 10 μ L 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横坐标，OD 值为纵坐标的标准曲线。

2.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 24 h。
- (2) 向每孔加入 10 μ L 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）。

注：如产品有析出，可 37 $^{\circ}$ C 水浴处理，不影响使用。

- (3) 将培养板在培养箱内孵育 0.5~4 h。

注：初次实验可以在 0.5、1、2 和 4 h 后分别用酶标仪检测，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。

- (4) 用酶标仪测定在 450 nm 和 600 nm （消除孔板本底干扰）处的吸光度。

图 2 为示意图：

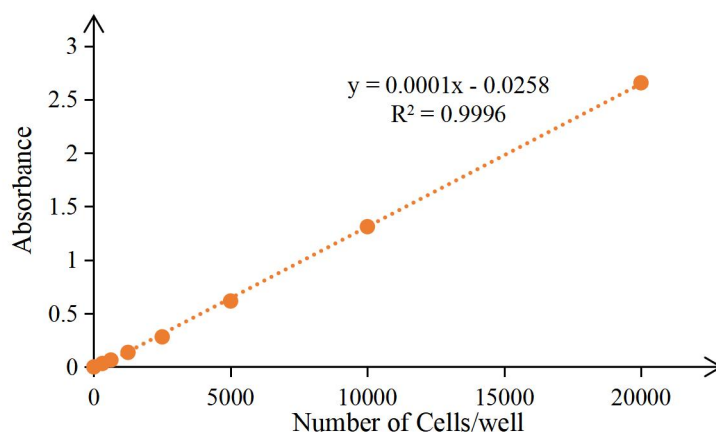


图 2 CCK 8 检测 HeLa 细胞活性

3.细胞增殖-毒性检测

- (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 24 h。
- (2) 向培养板加入 1~10 μ L 特定的药物刺激。
- (3) 于培养箱中孵育一段时间 (例如: 6、12、24 或 48 h) 。
- (4) 向每孔加入 10 μ L 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) 。
- (5) 将培养板在培养箱内孵育 0.5~4 h。
- (6) 用酶标仪测定在 450 nm 和 600 nm (消除孔板本底干扰) 处的吸光度。

注: 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 (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白吸收即可。

4.计算公式

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

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

As: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物) 的吸光度。

Ac: 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物) 的吸光度。

Ab: 空白孔 (不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8) 的吸光度。