

# CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒

## 用户手册

### Cell Counting Kit-8

### User Manual

#### 产品简介:

- CCK-8试剂盒，是一种基于WST-8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是一种类似于MTT的化合物，在电子耦合试剂1-Methoxy PMS存在的情况下，可以被还原生成橙黄色水溶性的甲贍（Formazan）（图1）。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，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

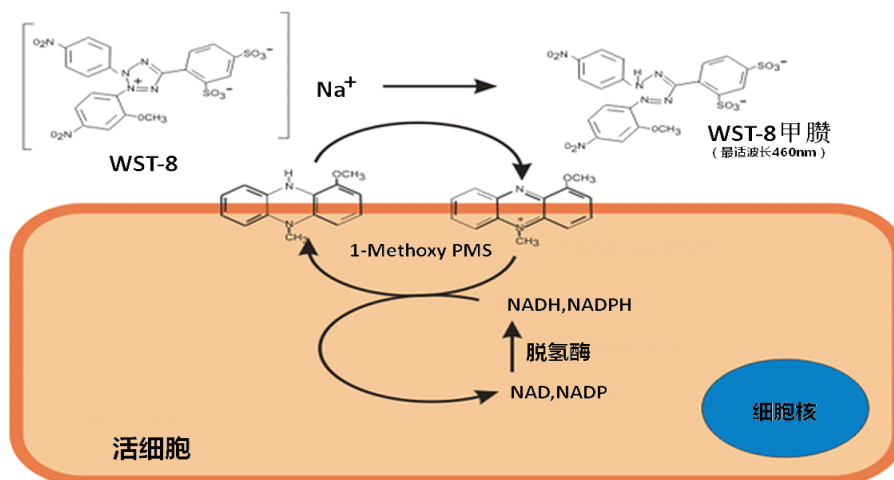


图 1. WST-8 分子结构式及其检测原理

本产品仅供研究使用

**This product is for research use only. Not for human or diagnostic use.**



## 产品优势:

本试剂盒提供了一种灵敏度高、操作简便、使用安全的细胞增殖与毒性检测方法。与传统的 MTT 实验相比具有明显的优势:

- CCK-8 法是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等与细胞活性和增殖相关的实验的一种高灵敏度,无放射性的比色检测法。
- CCK-8 法对细胞无毒性,可以多次测定选取最佳测定时间,与 MTT 方法相比线性范围更宽,灵敏度更高。
- CCK-8 溶液不需配制,可以直接加入到细胞样品中,即开即用,比 MTT 更加稳定,实验结果重复性好,适合大规模,高通量的样品检测。
- MTT 实验生成的 formazan 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 formazan 是水溶性的,不仅省去了溶解步骤,更因此而减少了该操作步骤带来的误差。

## 产品包装:

产品货号	规格	数量
D002-1	50 次	0.5ml×1 管
D002-2	500 次	1ml×5 管
D002-3	10000 次	25ml×4 瓶

## 贮藏条件:

CCK-8 溶液在避光、0-5℃的条件下可以保存 1 年,若长期不用可在-20℃下避光保存 2 年。建议分装后保存于-20℃,使用时提前于 4℃解冻,请避免反复冻融,否则增加背景值,干扰实验结果。



## 所需的设备及耗材:

- 10ul、100-200 ul 以及多通道移液器
- 酶标仪（带有 450 nm 滤光片）
- 96 孔培养板
- CO<sub>2</sub> 培养箱

## 使用方法:

1. 在96孔板中接种细胞悬液 (100 ul /孔 ), 通常细胞增殖实验每孔约2000个细胞, 细胞毒性实验每孔约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)。
2. 按照实验需要, 进行培养并给予0-10ul特定的药物刺激, 处理一段适当的时间 (例如: 6,12, 24或48小时)。
3. 每孔加入10ul CCK-8溶液。如果起始的培养体积为200ul, 则需加入20ul CCK-8溶液, 以此类推。可以用加相应量细胞培养基和CCK-8但不加细胞的孔作为空白对照, 若担心所使用的药物会干扰检测, 需设置加相应量细胞培养液、药物和CCK-8溶液但不加细胞的孔作为空白对照。
4. 在细胞培养箱内继续孵育1-4小时, 具体时间可以通过预实验确定。预实验时可以在0.5、1、2和4小时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。
5. 用酶标仪测定在450 nm处的吸光值, 若无450nm滤光片, 可以使用420-480nm的滤光片。如果样品为高浑浊度的细胞悬液, 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。
6. 如果需要暂时不测定O.D值, 可以向每孔中加入10ul 0.1M HCl溶液或者1% w/v的SDS溶液, 避光保存在室温, 24小时内吸光度不会发生变化。



## 注意事项:

1. 使用 96 孔板进行检测时, 如果细胞培养时间较长, 请注意蒸发问题。可将 96 孔板外围一圈加培养基、水或 PBS 保湿。同时, 可以把 96 孔板置于培养箱内靠近水盘的位置以缓解蒸发。
2. 培养时间根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而不同。在正式实验前, 建议先做预实验摸索铺板的细胞数量以及加入 CCK-8 试剂后的培养时间。
3. 铺板时请注意保证每个孔细胞数量均匀, 建议铺板过程中注意时常混匀, 防止因细胞沉淀造成不均匀。加入 CCK-8 后请前后左右轻轻晃动培养板数次, 使培养基和 CCK-8 溶液充分混匀。
4. 本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 如果待测物质有氧化性或还原性, 可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基, 去掉药物的影响。若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。
5. 加入 CCK-8 时, 如果细胞培养时间较长, 培养基颜色或 pH 值已变化, 建议换用新鲜的培养基。
6. 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。
7. 本试剂盒系无菌灌装生产。在使用过程中, 请在生物安全柜内无菌操作, 避免污染。
8. 为了您的健康和安​​全, 请穿着实验服并戴一次性手套或乳胶手套操作。

## 参考文献:

1. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Mosmann T (1983).Journal of Immunological Methods. 65: 55-63.
2. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, Talanta, 44, 1299-1305, 1997.
3. A Vital Role for Ape1/Ref1 Protein in Repairing Spontaneous DNA Damage in Human Cells, Molecular Cell, 17, 463-470, 2005.
4. Efficacy of RNAi-induced down-regulation of wild-type FLT3 on NF-kB pathway in THP-1 cell line. Lu J, Yue BH, Wang CM, Bai ST, Sheng GY. Life Science Journal. Vol.5,No.2, 2008.