CCK-8 细胞增殖与活性检测试剂盒

试剂盒使用说明书

本试剂盒只能用于科学研究，不得用于医学诊断

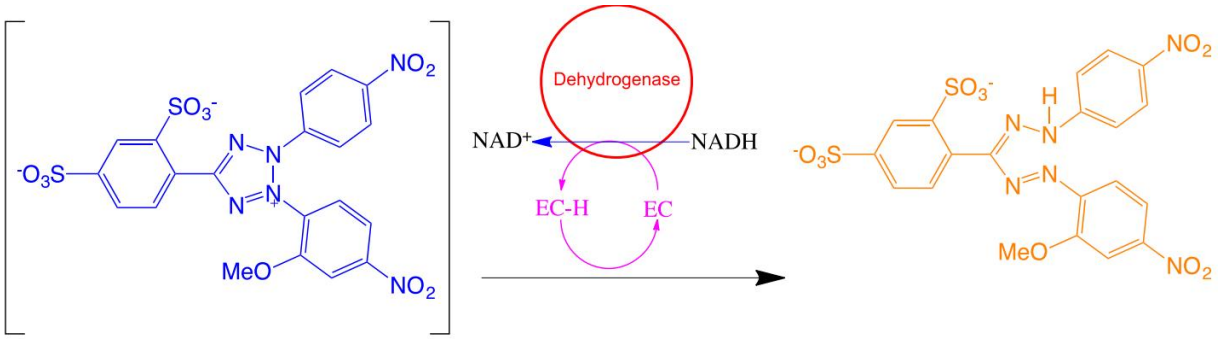
产品包装

货号	名称	规格
TS-K058	CCK-8 细胞增殖与活性检测试剂盒	500T/1000T

产品简介

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，psaitong 产品编号:W10010），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臜染料(formazan,下图)， 这种甲臜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臜。细胞增殖越多越快，则培养基的颜色越深；细胞毒性越大，反之，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。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，如药物筛选、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等。

CCK-8 试剂盒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臜，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。



使用方法：(供参考)

一、通用操作步骤
1. 在96孔板每孔加入100uL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 μL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（100μL/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 μL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，打算以后测定的话，可以向每孔中加入10 μL 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100μl的细胞悬液（通常细胞增殖实验每孔加入100μl2000个细胞，细胞毒性实验每孔加入100 μl5000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 °C，5%CO2,，的条件下）预培养24小时。

2、向培养板加入1-10μl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（后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 10μlCCK-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200μl，则需加入20μl 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小时候分别用酶标仪检测，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，打算以后测定的话，可以向每孔中加入10μl 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。

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白吸收即可。

▶ 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）：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

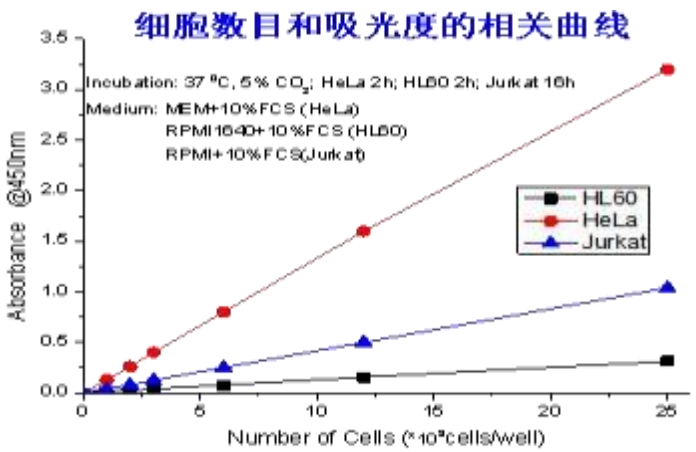
▶ 注意事项

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（100μl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，（100μl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。

▶ 细胞增殖分析

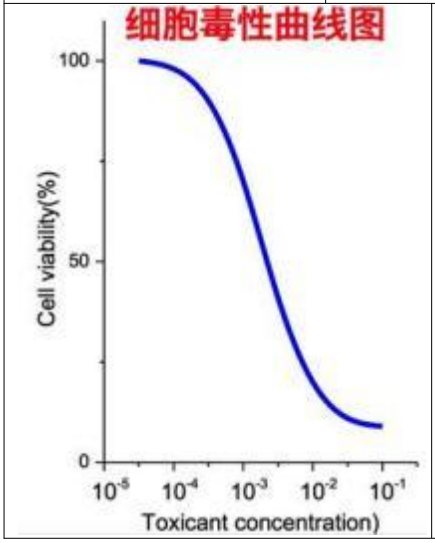
设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪	
制备细胞悬液 ↓	
接种到96孔培养板 ↓	
37℃培养箱中培养(注1) ↓	细胞接种后贴壁大约需要培养2-4小时,不需要贴壁的话，可以省去这个步骤。
加入10ul的CCK-8 ↓	由于每孔加入的CCK-8量比较少，有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。

培养1-4小时 ↓	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）。 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	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

设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪	
制备细胞悬液 ↓	
接种到96孔培养板 ↓	
37℃培养箱中培养 ↓	细胞接种后贴壁大约需要培养2-4小时，不需要贴壁的话，可以省去这个步骤。
加入不同浓度的毒性物质 ↓	
加入 10ul的CCK-8 ↓	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，
培养1-4小时 ↓	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。 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）。

测定450nm吸光度	如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以混匀。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 IC50. 细胞存活率（%）=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100% As:实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质） Ac：对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有毒性物质） Ab：空白孔（不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-8）

储存：-20℃ 避光保存,两年,避免反复冻融。