

细胞增殖-毒性检测试剂盒 (CCK-8)

使用说明书

(2019 版)

产品货号: SK2060-500T

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。

产品内容:

产品名称	500T	10000T
CCK-8 (Cell Counting Kit-8)	5 × 1mL	100mL
说明书	1 份	

产品说明: 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. 本试剂无毒, 使用中无需有机溶剂, 操作更加安全。
2. 酚红和血清对 CCK 法的检测不会造成干扰 (扣除空白孔即可)。

一: 通用操作步骤

6. 在 96 孔板每孔加入 100uL 细胞悬液;
7. 在培养箱中预培养细胞;
8. 向培养板中加入药物(如果不加药物, 直接进行第五步操作);
9. 在培养箱中培养一段时间;
10. 向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液;
11. 将培养板在培养箱内孵育 1~4 小时(根据具体实验优化);
12. 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)

7. 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;
8. 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;
9. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 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

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 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的条件下）；
2. 向每孔加入 10 μ L 的 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）；
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 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：细胞增值-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 μ l 的细胞悬液(通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ l 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100 μ l 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 $^{\circ}$ C，5%CO₂，的条件下）预培养 24 小时；
2. 向培养板加入 1-10 μ l 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 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)。如果起始的培养体积为 200 μ l，则需加入 20 μ l 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 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；
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。

五：活 计算

细胞活力* (%) = [A(加药)-A(空白)]/[A(0 加药)-A(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

六：细胞增殖分析

1. 制备细胞悬液；

2. 接种到 96 孔培养板；

3. 37℃培养箱中培养：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；

4. 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；

5. 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；

6. 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。

七：细胞毒性分析

1. 制备细胞悬液；

2. 接种到 96 孔培养板；

3. 37℃培养箱中培养: 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；

4. 加入不同浓度的毒性物质；

5. 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,一般要根据细胞周期来决定,起码要一代以上的周期；

6. 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；

7. 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；

8. 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)

八：注意事项

5. 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;

6. 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;

7. 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;

8. 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;

9. 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；

10. 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；

11. 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；

12. 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。

13. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作