



CCK-8 使用说明书

产品编号：SK2060

储存条件：-20°C可储存 2 年，避免反复冻融；2-8°C可储存 1 年。

产品介绍：

CCK-8 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。不必洗涤细胞和收集细胞，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（结果扣除空白孔即可）。

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-8 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 450 nm 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-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 450 nm 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 0.1 M 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 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 浓度的条件下）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 450 nm 处的吸光度，如无 450 nm 滤光片，可以使用 420-480 nm 的滤光片。可以使用大于 600 nm 的波长，例如 650 nm，作为参考波长进行双波长测定；
7. 如果暂时不测定 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，并遮盖培养板避光保存在室温条件下，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

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°C 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 10 μL 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 450 nm 吸光度：建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490 nm，参比波长 600-650 nm。

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°C 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 10 μL 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 450 nm 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 450-490 nm，参比波长 600-650 nm；



8. IC₅₀ 的计算方法:
9. 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

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

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

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 μL 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 μL 培养基), 且延长培养时间。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. 推荐使用 450 nm 的滤光片, 此波长的检测灵敏度最高, 也可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片;
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。