

## Cell Counting Kit-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

**产品货号:** AR1199

**产品批号:** 见外包装标签

**产品规格:** 5ml×5

**保存条件:** 4℃避光保存, 一年有效。

**产品描述:** 按照每孔加入 10ul 的试剂, 本产品可以用于 2500 孔的检测。

### 产品说明:

Cell Counting Kit-8 (简称 CCK-8) 试剂盒广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测, 它对细胞无明显毒性, 在电子载体的作用下被细胞线粒体中的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan。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。

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。

### 注意事项:

1. 第一次做实验时, 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。
2. 接种时注意细胞悬液一定要混匀, 以避免细胞沉淀下来, 导致每孔中的细胞数量不一致。
3. 培养板周围一圈孔培养液容易挥发, 为减少误差, 建议培养板周围的四边每孔只加培养基。
4. 建议采用多通道移液器, 减少平行孔间的误差, 加 CCK-8 时, 建议斜贴着培养板壁加, 不要插到培养基液面下加, 容易产生气泡, 干扰 OD 值。
5. 若细胞培养时间较长, 培养基颜色或 PH 发生变化, 建议更换培养基后再加 CCK-8, 含有酚红的培养基不影响测定。
6. CCK-8 对细胞的毒性非常低, 其他的实验, 例如中性红法或结晶紫法, 也可在 CCK-8 法检测完后继续进行。
7. 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, CCK-8 在参比波长处没

有吸光值，设定参比波长的目的是为了去除由于样品浑浊所带来的吸收。

8. 如果实验中待测物质有氧化还原剂，在不加细胞的培养基中加入药物，然后加入 CCK-8 试剂在一定时间内检测，和不加药物的培养基进行比较(只加 CCK-8 试剂)，如果 O.D 值明显偏高，则说明有反应。
9. 加 CCK-8 试剂时速度要快，减少试剂在移液器上的残留，加入 CCK-8 试剂后轻轻震培养板，为了避免加样时由于 CCK-8 残留在枪头上所带来的误差，可以在加样前用培养液稀释 CCK-8 试剂并混匀后加样。
10. CCK-8 反复冻融会增加背景值，干扰实验测定。

**所需材料：**10ul，100-200ul 以及多通道移液器，96 孔培养板，CO<sub>2</sub> 培养箱，  
带有 450nm 滤光片的酶标仪

#### **使用方法：**

##### **制作标准曲线**

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，OD 值为纵坐标的标准曲线，根据此标准线可以测定未知样品的细胞数量（使用此标准曲线的前提条件是实验的条件一致，便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间）。

##### **细胞活性检测**

1. 收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，96孔板每孔加入100ul,使待测细胞调密度至(1000-10000)/孔。
2. 5%CO<sub>2</sub>，37℃培养细胞24小时（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异）。
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，其它情况以此类推。
4. 在细胞培养箱内继续孵育0.5-4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（一般情况下，白细胞较难显色，因此需要较长的CCK-8反应时间或增加细胞数量。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于贴壁细胞，CCK-8的培养时间一般为1-4小时，注意：CCK-8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准）。初次实验时可以在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. 在 450nm 测定吸光度。

##### **细胞增殖-毒性检测**

1. 收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，96孔板每孔加入100ul,使待测细胞调密度至(1000-10000)/孔。



2. 5%CO<sub>2</sub>, 37°C培养细胞24小时（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异）。
3. 加入10ul不同浓度的待测物质，将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（例如6,12, 24或48小时）。
4. 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，其它情况以此类推。
5. 在细胞培养箱内继续孵育0.5-4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（一般情况下，白细胞较难显色，因此需要较长的CCK- 8反应时间或增加细胞数量。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于贴壁细胞，CCK- 8的培养时间一般为1- 4小时，注意：CCK- 8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准）。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. 在 450nm 测定吸光度。

**注意：如果待测物质有氧化还原性，可在加 CCK-8 之前更换新鲜的培养基，去掉待测物质的影响。**

**计算公式：**细胞存活率= [(实验孔-空白孔) / (对照孔-空白孔)]×100%

抑制率= [(对照孔-实验孔) / (对照孔-空白孔)]×100%

实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质)

对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测物质)

空白孔(不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8)

#### 疑难解答：

每孔接种多少细胞	贴壁细胞每孔至少需要接种1000个细胞，检测白细胞时由于它的灵敏度较低，每孔至少需要接种2500个细胞，建议先做几个孔摸索接种细胞的数量（一般每孔接种细胞为1000-10000个之间）。
OD值太低怎们办	可以适当增加细胞数量,延长加入CCK- 8试剂后的染色时间
药物对测定有影响，如何解决	可在加CCK-8之前更换新鲜培养基，去掉药物的影响
如何设定空白对照	在不含细胞的培养基中加入CCK-8，即为空白对照，在做加药实验时，在不含细胞的培养基中加入CCK-8和药物，即为空白对照
哪些物质对CCK-8有影响	氧化还原性物质
CCK-8对细胞毒性大小如何	CCK-8对细胞的毒性非常低
没有450nm的滤光片怎么办	可以使用420-480nm的滤光片