

## 说明书

## 细胞增殖与毒性检测试剂盒 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)



## 产品介绍

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)细胞增殖与毒性检测试剂盒是一种基于水溶性四唑盐的细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒。它在电子耦合试剂 1-Methoxy PMS 存在的情况下，可以被线粒体内的脱氢酶还原为可溶性的橙黄色甲臃(formazan)。甲臃的数量与活细胞的数量成正比。细胞增殖越快则细胞毒性越小，细胞数量越多，则颜色越深；颜色的深浅与细胞数量呈现良好的线性关系。该产品细胞毒性小，对后续实验没有影响，与 MTT、XTT、MTS 和 WST-1 相比，此法检测灵敏度更高，线性范围更宽；适用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定和肿瘤药敏实验。CCK-8 是非放射性的，允许敏感的比色分析来测定细胞增殖和细胞毒性分析中的活细胞数量。



## 特点

- 比 MTT、MTS 或 WST-1 更敏感。
- 优化配方减少对细胞的损伤，对细胞无毒性。
- 操作步骤标准化，简单步骤（无需解冻），操作更安全。
- 性价比高，质量媲美进口品牌，价格低廉。



## 储存事项

如频繁使用，建议储存于 4℃避光可稳定保存 1 年。如长时间存放，可储存于 -20℃避光可稳定保存 2 年，但需要注意的是反复冻融会使背景增加，干扰检测，应尽量避免。



## 注意事项

- △ CCK-8 孵育条件与细胞培养条件相同。
- △ CCK-8 可以检测大肠杆菌，但不能检测酵母细胞。
- △ 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。在细胞增殖实验每次测定的过程中需要避免细菌污染，以免影响结果。
- △ 悬浮细胞由于染色比较困难，一般需要增加细胞数量和延长培养时间。
- △ 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 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 2,500 个/孔 (100μL 培养基)。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。
- △ 如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450nm 检测灵敏度最高。
- △ 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。
- △ 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。建议最外圈孔仅加入培养基或 PBS，不用于样品检测。
- △ 在培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度即为空白对照。在做加药实验时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450 nm 作为空白对照。
- △ 对 CCK-8 显色有影响：当终浓度为 1mM 的氯化亚铅、化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90%显色反应，使灵敏度降级。如终浓度达 10 mM 时，三者均引起 100% 显色抑制。



## 操作步骤

### 制作标准曲线（测定细胞具体数量时）

- (1) 使用细胞计数板（或细胞计数仪）精确测定细胞悬液密度，根据目标浓度梯度调整接种体积。
- (2) 采用倍比稀释法制备梯度，设置 3~5 个浓度梯度，每梯度至少 4 个复孔（推荐 6 孔以减少误差）。
- (3) 接种后培养至细胞贴壁，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（适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-8 后的培养时间）

### 细胞活性检测

- (1) 96 孔板接种 100μL 细胞悬液→培养箱预培养（贴壁细胞≥24h；悬浮细胞 4~6h）。注：设空白对照孔。
- (2) 向每孔加入 10μL CCK-8（终浓度 10%），枪头贴壁缓慢注入避免气泡。轻晃混匀（禁止垂直振荡）。
- (3) 将培养板在培养箱内避光孵育 1~4h（高代谢细胞 1~2h；低代谢细胞 3~4h，勿超 4h）。
- (4) 酶标仪检测：主波长 450nm，参比波长 600-650nm。印前处理：刺破气泡+拭干冷凝水。
- (5) 如延迟检测：加 10μL 终止剂（首选 1% SDS，酸敏感样本用 0.1M HCl）→避光覆盖→15-25℃保存（24h 内检测，禁冷藏）
- (6) 计算：细胞活性(%) = [(OD 样品 - OD 空白)/(OD 对照 - OD 空白)] × 100

### 细胞增殖-毒性检测

- (1) 96 孔板加 100μL 细胞悬液→预培养 24h。
- (2) 向培养板加入 10μL 不同浓度的待测物质。在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或 48 小时）。
- (3) 向每孔加入 10μL CCK-8 溶液。如果待测物质有氧化/还原性药物，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基（吸弃培养基→PBS 洗 2 次→换 100μL 新培养基→再加 10μL CCK-8 \*限贴壁细胞），去掉药物影响。
- (4) 将培养板在培养箱内避光孵育 1~4h。
- (5) 酶标仪测 OD<sub>450</sub>（参比波长 600-650nm）。
- (6) 延迟检测加 10μL 0.1M HCl 或 1% SDS→避光 15-25℃保存（24h 内稳定）。
- (7) 活力计算：

$$\text{细胞活力}(\%) = [A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100$$

A（加药）：具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：具有细胞、CCK-8 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



## 重要提示

**产品用途：**仅供研究使用，不适用于人或动物的体外诊断与治疗。

**由于实验受多种因素影响具有不确定性，本说明书操作说明仅供参考，最终解释权归本公司所有。**

**警告！**产品对人体危害性未知，请遵循操作说明。穿戴适当的防护眼镜、衣服和手套！

