

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

使用说明

产品编号	产品名称	规格
PC-1050-1	Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	500T/5ml
PC-1050-2	Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	1000T/10ml

保存：4℃避光可稳定保存 1 年，若长时间保存，可置于-20℃避光保存 2 年，避免反复冻融。

产品简介：

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臞 (formazan)，formazan 的数量与活细胞的数量成正比。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 可用于药物筛选，细胞增殖测定，肿瘤药敏等试验。

使用方法（仅供参考）：

一、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（试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。）

二、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℃, 5% CO₂ 的条件下)。
- 2、向每孔加入 10μL 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 10μL 0.1M 的 HCl 或者 1% SDS (W/V) 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。

三、细胞增殖-毒性检测

- 1、在 96 孔板中配置 100 μ L 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时（在 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 的条件下）。
- 2、向培养板加入 10 μ L 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 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（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。
- 4、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 5、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 6、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 或者 1%SDS(W/V)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。

活力计算：

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-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

注意事项：

1.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，以免影响实验结果。

2.白细胞可能需要培养较长时间。

3.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(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 2,500 个/孔(100 μ L 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。

4.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。

5.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。

6.CCK-8 可以检测大肠杆菌，但不能检测酵母细胞。

所需材料：

96 孔板，CO₂ 培养箱，酒精灯，移液器，酶标仪等

