

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

细胞增殖-毒性检测试剂盒

(100孔, 500孔, 1,000孔, 3,000孔以及10,000孔的规格)

注意事项：

- 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。
- 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等, 可以每接种几个孔就混匀一下。培养板周围一圈孔培养基容易挥发, 为了减少误差, 建议培养板的四边每孔只加培养基, 而不作为指标检测孔。
- 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。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 (~ 10⁵个细胞/孔)。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于悬浮细胞, 在加入CCK-8培养1-4小时后, 可先从培养箱中取出, 目测染色程度或用酶标仪测定决定。若显色困难, 可将培养板放回培养箱, 继续培养数小时后再确定。对于贴壁细胞, CCK-8的培养时间一般为1-4小时, 但在培养30分钟左右即可取出肉眼观察显色程度 (根据细胞种类而定, 需要摸索一下条件)。注意: CCK-8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。
- 有条件的情况下建议采用多通道移液器, 可以减少平行孔间的差异。加CCK-8试剂时, 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, 会干扰O.D值读数。
- 加CCK-8试剂时速度要快, 减少试剂在移液器上的残留。为使CCK-8试剂和培养基充分混匀, 建议在加入CCK-8试剂后轻轻振荡培养板。为了避免加样时由于CCK-8试剂在枪头上的残留所带来的误差, 可以在加样前用培养基稀释CCK-8试剂并混匀后加样。
- CCK-8试剂中的WST[®]-8会与还原剂反应生成WST[®]-8甲臜, 如果实验中有还原剂, 请检查背景的O.D值, 即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。
- 若细胞培养时间较长, 培养基颜色发生变化或pH发生变化, 建议更换新鲜的培养基后再加CCK-8试剂。含有酚红的培养基不影响本试剂盒做细胞活性的测定。
- 如果样品为高浑浊度的细胞悬液, 建议设定600 nm (或600 nm以上) 作为参比波长, 扣除参比波长的O.D值即可。
- CCK-8试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深, O.D值不断增加 (注: 活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。另外, 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。
- 如果要测定细胞的具体数量, 建议先做一个标准曲线 (具体方法参见P.3页的“制作标准曲线”)。

试剂内含

- 100孔: 1 ml x 1 管
- 500孔: 5 ml x 1 瓶
- 1,000孔: 5 ml x 2 瓶
- 3,000孔: 5 ml x 6 瓶
- 10,000孔: 100 ml x 1 瓶

贮藏条件

CCK-8在避光0-5 °C的条件下可以存放2年。

所需设备和材料：

- 10 μl、100-200 μl以及多通道移液器
- 带有450 nm滤光片的酶标仪
- 96孔培养板
- CO₂培养箱



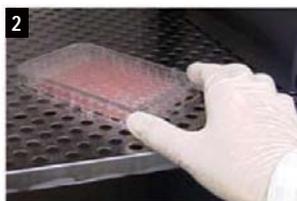
关联产品

应用	产品名称	货号	规格
细胞毒性检测	Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST [®]	CK12	500T
活细胞/死细胞检测	Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit	CK17	500T
细胞凋亡检测	Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit	AD10	50T
	Annexin V, 633 Apoptosis Detection Kit	AD11	50T
细胞周期检测	Cell Cycle Assay Kit - PI/RNase Staining	C543	50T
细胞自噬检测	DALGreen (自噬溶酶体)	D675	20 nmol
	DAPGreen (自噬体及自噬溶酶体)	D676	5 nmol
线粒体自噬检测	Mitophagy Detection Kit	MD01	1 set
细胞衰老检测	Cellular Senescence Detection Kit-SpIDER-βGal	SG03	5 assays
活死细胞双染	Calcein-AM/PI Double Staining Kit	C542	500T
线粒体膜电位检测	JC-1 MitoMP Detection Kit	MT09	1 set
乳酸检测	Lactate Assay Kit-WST [®]	L256	50T
脂质过氧化物检测	Liperfluo	L248	50 μg x 5
	MitoPeDPP	M466	5 μg x 3
铁死亡检测	Mito-FerroGreen	M489	50 μg x 2
谷胱甘肽检测	GSSG/GSH Quantification Kit II	G263	200T

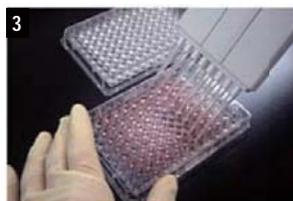
操作说明



1 在96孔板中每孔加入100 μl的细胞悬液



2 在培养箱中预培养细胞



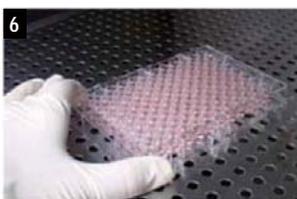
3 向培养板中加入药物 (如果不加药物, 可直接进行第5步操作)



4 在培养箱中培养一段时间



5 向每孔加入10 μl CCK-8溶液



6 在培养箱中培养1-4小时 (可根据自己的实验情况调整时间)



7 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度

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 (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O.D值, 制作出一条以细胞数量为横坐标 (X轴), O.D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 (使用此标准曲线的前提条件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)。

* 如果暂时不测定O.D值, 打算以后测定或为了避免每次准备标准曲线, 可以向每孔中加入10 μl Stop Solution, 并遮盖培养板避光保存在0-5 °C条件下。在7天内吸光度不会发生变化。

细胞活性检测

1. 在96孔板中接种细胞悬液 (100 μl / 孔)。将培养板放在培养箱预培养 (在37 °C, 5% CO₂的条件下)。
2. 向每孔加入10 μl的CCK-8溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响O.D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。

* 如果暂时不测定O.D值, 打算以后测定, 可以向每孔中加入10 μl Stop Solution, 并遮盖培养板避光保存在0-5 °C条件下, 在7天内吸光度不会发生变化。

注意: 如果待测物质有氧化性或还原性, 可在加CCK-8之前更换新鲜培养基, 去掉待测物质的影响。当然待测物质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待测物质后的空白吸收即可。

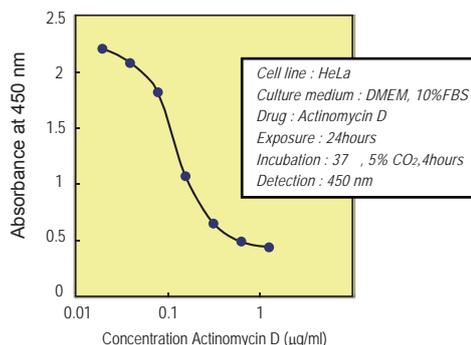


图5. 细胞毒性试验 (Actinomycin D)

计算公式:

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

$$\text{抑制率} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

As: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质)

Ac: 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测物质)

Ab: 空白孔 (不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8)

细胞增殖-毒性检测

1. 在96孔板中配制100 μl的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养24小时 (在37 °C, 5% CO₂的条件下)。
2. 向培养板加入10 μl不同浓度的待测物质。
3. 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. 向每孔加入10 μl CCK-8溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响O.D值的读数)。
5. 将培养板在培养箱内孵育1-4小时。
6. 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

* 如果暂时不测定O.D值, 打算以后测定, 可以向每孔中加入10 μl Stop Solution, 并遮盖培养板避光保存在0-5 °C条件下, 在7天内吸光度不会发生变化。

Q&A:

1. 每孔应该接种多少细胞？

贴壁细胞每孔至少需要接种1,000个细胞 (100 μ l的培养基)，检测白细胞时由于它的灵敏度较低，每孔至少需要接种2,500个细胞 (100 μ l的培养基)，建议先做几个孔摸索接种细胞的数量。如果要使用24孔板或是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。

2. 如何设定空白对照？

在不含细胞的培养基中加入CCK-8，测定450 nm的吸光度即为空白对照。在做加药实验 (细胞毒性实验) 时，还应考虑药物的吸收，可在不含细胞，加入药物的培养基中加入CCK-8，测定450 nm的吸光度作为空白对照。

3. 哪些物质会影响CCK-8的测定？

当有还原性物质存在时会影响CCK-8的测定，增加O.D值；在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生，减小O.D值；在有酚红存在的情况下，会增加空白吸收，但不影响测定，扣除空白吸收即可。

4. 在做加药实验时，药物对测定是否有影响？如何解决？

有时会有影响。如果药物具有还原性，就会和CCK-8试剂发生显色反应，增加吸光度。解决办法：首先要确认药物是否有吸收，在含有药物的培养基中加入CCK-8，测定450 nm的吸光度，如果它的吸光度比不含药物的培养基 (只加CCK-8) 的吸光度高，则证明药物有影响，可在加CCK-8之前更换培养基，去掉药物的影响。

5. CCK-8对细胞的毒性大小如何？

CCK-8对细胞的毒性相当低，同样的细胞在CCK-8法检测后还可用于其他细胞增殖的检测实验，如结晶紫检测法，中性红检测法或DNA荧光检测法等。

6. CCK-8的保质期有多久？

CCK-8在避光0-5 $^{\circ}$ C的条件下可以存放2年。在常温下可以保存3周左右，颜色应该为浅红色，如果颜色发生改变，则可能会增加空白吸光度。

7. 我没有450 nm的滤光片，还可以使用哪些其他的滤光片？

您可以使用吸光度在430-490 nm之间的滤光片，但是450 nm滤光片的检测灵敏度最高。

8. CCK-8能否对活细胞进行染色？

不能。因为CCK-8的主要成分是一种水溶性的四唑盐 (WST[®]-8)，并通过电子载体1-Methoxy PMS将活细胞中的电子交换到培养基中的WST[®]-8上，因为WST[®]-8及其生成的甲臞染料是高度水溶性的，不会进入细胞内，所以CCK-8不能对活细胞进行染色。

9. 必须设定参比波长吗？设定的目的是什么？

不一定要设定，CCK-8试剂在参比波长处没有吸光度。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。

10. 如果O.D值太低，可以采取什么办法？

可以采取2个办法：

适当增加细胞数量。

延长加入CCK-8试剂后的染色时间。

WST[®]: WST是同仁化学研究所的注册商标