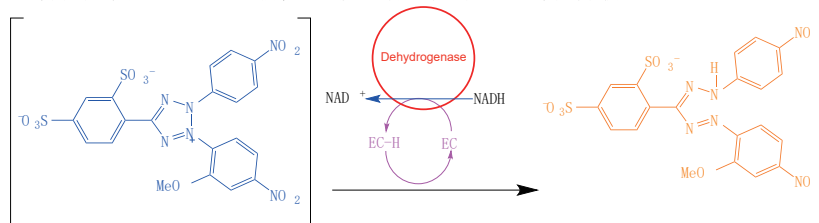


细胞增殖-毒性检测试剂盒 Cell Counting Kit-8(CCK-8)

水溶性四唑：2-(2-甲氧基-4-硝基苯)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐，是一种类似于 MTT 的化合物，在电子耦合试剂存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臞染料(formazan, 下图)，这种甲臞染料直接溶解在培养基中。水溶性四唑被细胞内脱氢酶生物还原后生成的甲臞能够。细胞增殖越多越快，则培养基的颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。正是利用这一特性开发的 CCK-8 试剂盒直接进行细胞增殖和毒性分析。



CCK-8 法与 MTT 比较：

CCK8 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！

1. MTT 实验生成的甲臞不是水溶性的，需要使用 DMSO 等有机溶剂溶解；而本方法产生的甲臞是水溶性的，不仅省去了溶解的步骤，更因此而减少了该操作步骤带来的误差。
2. 与 MTT 方法相比，本方法线性范围更宽，灵敏度更高。
3. 本方法对细胞无毒性，可以多次测定，选取最佳测定时间。
4. 本方法所用试剂在培养基中比 MTT 更加稳定，实验效果重复性好。
5. MTT 具有毒性，同时其生成的甲臞需要有机溶剂溶解，会对操作人员身体造成危害。本试剂无毒，使用中无需有机溶剂，操作更加安全。
6. 本试剂盒在 4℃避光可长期保存，使用无需配制，即开即用。

	CCK-8 法	MTT 法
1	还原后的 Formazan 是水溶性的 (不需要溶解)	还原后的 Formazan 是非水溶性的 (需要加有机溶剂溶解)
2	重现性好	重复性差
3	操作简单	操作繁琐
4	测定波长: 450~490nm	测定波长: 550~600nm
5	K 1 瓶溶液，无需预制，即开即用	由于需要加有机溶剂溶解，工作量大

用途：

CCK-8 试剂盒可以用于生物活性因子的活性检测，抗肿瘤药物的筛选，细胞增值的测定，细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。本试剂盒使用方便，试剂盒包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的 CCK-8 溶液，即开即用，无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞，可直接使用 96 孔板或者 384 孔板在酶标仪上检测，适合大规模，高通量的样品检测。

保存条件：

CCK-8 溶液在避光，0-55 的条件下可以保存一年，如长期保存，可在-205 下保存 2 年；如需经常使用请将试剂存放在 0-55，为防止背景值增加干扰实验结果，请勿反复冻融。

CCK-8试剂使用方法

A、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 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 后的培养时间要一致)

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 °C,5% CO₂ 的条件下）。
- 2、向每孔加入 10 μL 的 CCK 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 10 μL 0.1M 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。

三、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 100μl 的细胞悬液（通常细胞增殖实验每孔加入 100μl 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100μl 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 °C，5%CO₂ 的条件下）预培养 24 小时。
2. 向培养板加入 1-10μl 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 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）。如果起始的培养体积为 200μl，则需加入 20μl 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 小时候分别用酶标仪检测，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 450nm 处的吸光度，如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。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。
7. 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 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。
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。

活力计算：

细胞活力*（%）=[A(加药)-A（空白）]/[A：0 加药）-A（空白）] ×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

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。
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 I /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 2500 I /孔，（100μl 培养基），且培养时间长一些。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. 如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490nm 之间的滤光片，但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。
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。

细胞增殖分析

设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪

方法

制备细胞悬液

↓
接种到 96 孔培养板

↓
37℃培养箱中培养(注 1)

↓
加入 10ul 的 CCK-8(注 2)

↓
培养 1-4 小时(注 3、注 4)

↓
测定 450nm 吸光度(注 5)

: 3) 注意事项

注 1: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时,不需要贴壁的话,可以省去这个步骤

注 2: 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。

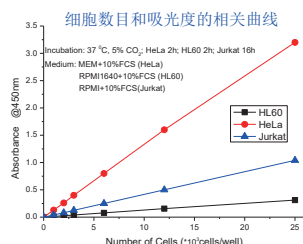
注 3: 细胞的种类不一样,形成的 Formazan 的量也不一样。

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)。

注 4: 如果颜色不均匀的话,可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。

注 5: 建议采用双波长进行测定,检测波长 450-490nm,参比波长 600-650nm



细胞毒性分析

设备：培养箱 酶标仪 单枪或排枪

方法

制备细胞悬液

↓
接种到 96 孔培养板

↓
37℃培养箱中培养(注 1)

↓
加入不同浓度的毒性物质

↓
加入 10ul 的 CCK-8(注 2)

↓
培养 1-4 小时(注 3、注 4)

↓
测定 450nm 吸光度(注 5)

注意事项

注 1: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时,不需要贴壁的话,可以省去这个步骤。

注 2: 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。

注 3: 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。

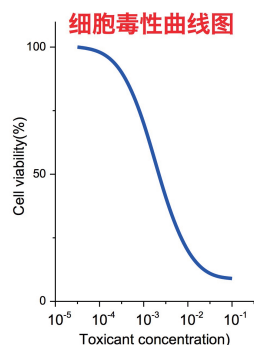
注 4: 细胞的种类不一样,形成的 Formazan 的量也不一样。

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)。

注 5: 如果颜色不均匀的话,可以轻轻敲击培养板以混匀。

注 6: 建议采用双波长进行测定,检测波长 450-490nm,参比波长 600-650nm



细胞毒性曲线图

IC₅₀ 的计算方法:

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。

细胞存活率 (%) = $\frac{(A_0 - A_1)}{(A_0 - A_1)} \times 100\%$

A₀ 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-(、毒性物质)

A_c 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-(、没有毒性物质)

A₁ 空白孔 (不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-(



地址：北京市海淀区丰慧中路 7 号新材料创业大厦 B 座 327 室。邮编:100080