

## 细胞计数试剂盒 (CCK8) 产品说明书

### 【产品信息】

细胞计数试剂盒 (CCK8)

货号: A516-010, A516-005, A516-001

规格: 10ml/瓶, 5ml/瓶, 1ml/瓶

### 【产品介绍】

细胞计数试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 是一种基于 WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下, 被线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞产物 (formazan), 生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比, 使用酶标仪在 450nm 波长处测得的吸光值即可间接反映活细胞的数量。细胞增殖越快, 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。CCK-8 广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测。

BDBIO 细胞计数试剂盒 (CCK8) 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操作, 并且不必洗涤或收集细胞, 使用便捷, 加入 CCK-8 溶液显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 检测时间更加灵活, 便于找到最佳测定时间, 可以用于大批量样品的检测。

### 【产品用途】

检测细胞的活力; 细胞增殖测试; 细胞毒性分析等

### 【使用方法】

#### 一、制作标准曲线

1. 细胞铺板: 对收集的细胞悬液进行计数, 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 5-7 个细胞浓度梯度, 每组 4-6 个复孔;
3. 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后每 100 $\mu$ L 培养基加 10 $\mu$ L (培养基体积的 10%) 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试验条件完全一致）。

## 二、细胞活性检测

1. 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 $\mu$ L/孔) , 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
2. 向每孔加入 10 $\mu$ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡) ;
3. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
4. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

## 三、细胞增殖-毒性检测

1. 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 $\mu$ L/孔) , 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
2. 向培养板加入不同浓度的待测药物;
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
4. 向每孔加入 10 $\mu$ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
5. 将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
6. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

## 四、计算公式

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. 酚红和血清对 CCK-8 的检测不会造成干扰, 可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。
2. 若细胞毒性非常低, 加入 WST-8 显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读数从而找到最佳测定时间。
3. 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 (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。
4. 加入药物中如含有金属, 对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1 mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90% 的显色反应, 使灵敏度降低。如果终浓度是 10mM 将会 100%抑制。

5. 不同的细胞系，加入 CCK-8 试剂后的反应时间不同，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。
6. 当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1000 个/孔 (100 $\mu$ 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 2500 个/孔 (100 $\mu$ 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。
7. 建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。同时避免产生气泡，否则会干扰 OD 值读数。
8. 白细胞可能需要培养较长时间。
9. 使用 96 孔板进行检测时，如果细胞培养时间较长，需要注意蒸发问题，可以采取弃用周围一圈的办法，改加相同量的 PBS 、水或培养液。
10. 以下方法可以终止 CCK-8 反应 (96 孔板): (a). 在显色反应后，将培养板放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内。(b). 每孔加 10 $\mu$ L 0.1M HCl 溶液。(c). 每孔加 10 $\mu$ L 1% (w/v) 的 SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液，反应停止后，应在 24 小时内测定。
11. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 【保存条件】

4 $^{\circ}$ C 避光保存 12 个月；-20 $^{\circ}$ C 避光保存 24 个月。

#### 【声明】

仅用于科研使用，不能用于临床诊断和治疗。