

Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂)

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂)	DY40201	10mL

产品描述

Cell Counting Kit-8 是一种广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。试剂盒中使用新型水溶性四唑盐 WST-8 甲臞染料作为显色底物，与传统试剂盒相比，灵敏度大幅度的提高。WST-8 被细胞内的脱氢酶还原产生水溶性的甲臞染料。通过直接测量甲臞染料（450nm）的吸光度，即可测出活细胞的数量。WST-8 属于 MTT 的升级产品，工作原理为：在电子耦合试剂存在的情况下，可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物（formazan）。细胞增殖越多，颜色越深。使用酶标仪在 450nm 波长处测定 OD 值，间接反映活细胞数量。CCK-8 法应用非常广泛，如药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及生物因子的活性检测等。

保存方式

-20℃ 避光储存，有效期 2 年。4℃ 避光储存，有效期 18 个月。

避免反复冻融。

使用方法

一、通用操作步骤

1. 在 96 孔板每孔加入 100μL 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，直接进行第 5 步操作）。
4. 在培养箱中处理一段时间。
5. 向每孔加入 10μL 的 CCK-8 溶液。
6. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时（根据具体实验优化）。
7. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

二、制作标准曲线（测定细胞具体数量时）

1. 确定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 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。

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。

三、细胞活性检测

1. 在 96 孔板中加入细胞悬液（100μL/孔）。将培养板放在培养箱中预培养（37℃, 5% CO₂）。
2. 向每孔加入 10μL CCK-8 溶液（避免生成气泡，否则会影响 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. 如暂时不测定 OD 值，可向每孔中加入 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。

四、细胞增殖-毒性检测

使用方法（以 96 孔板为例）

1. 每孔中加 100μL 细胞悬液（通常细胞增殖实验 2000 个细胞/孔，细胞毒性实验 5000 个细胞/孔。具体每孔所需细胞数目，需根据细胞的大小、增殖速度的快慢等因素决定）。按照实验需要，进行培养（37℃,5% CO₂）,预培养 24 小时。
2. 向培养板各孔分别加入 10μL 不同浓度的待测药物刺激，并根据实验要求，将细胞在培养箱中孵育适当时间。
3. 每孔加入 10μL CCK-8 溶液（切记不要生成气泡）。可以用相应量不含细胞的培养液和 CCK-8 溶液作空白对照。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。
4. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时，通常建议 1 个小时。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。
5. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
6. 如暂时不测定 OD 值，可向每孔中加入 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。

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-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。

注意事项

1. 使用 96 孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，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，以减少蒸发。
2. CCK-8 检测细胞活性的原理是检测活细胞脱氢酶催化的反应。如果待测体系中某物质具有较强氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基，去掉药物的影响。如果药物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药物后的空白吸收即可。
3. 建议做预实验摸索接种细胞的数量和加入 CCK-8 试剂后的培养时间。
4. 建议使用多道移液器以减少平行孔间的差异。为避免产生气泡，加入 CCK-8 时，建议移液器吸头尖端斜贴培养板壁缓慢添加。
5. 使用 96 孔板每孔添加 100μL 细胞悬液时，贴壁细胞最小接种量为 1000 个/孔。检测白细胞灵敏度相对较低，建议接种量不低于 2500 个/孔，且适当延长培养时间。如使用 24 孔或 6 孔板，请先计算每孔相应的细胞悬液体积，并按照每孔悬液体积的 10%加入 CCK-8 溶液。
6. 加入 CCK-8 溶液前，如果细胞培养时间较长，培养基颜色变化或 pH 值变化建议换用新鲜培养基。
7. 450nm 滤光片的检测灵敏度最高,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。
8. 酚红和血清对测定无明显影响。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。

本产品仅做科研用途