Cell Counting Kit-8（CCK-8）

货号：Cat.No.C6005 Size: 5 ml（500T）； Cat.No.C6050 Size: 5 ml X 10（5000T）

产品介绍

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒，是 MTT，XTT 等的替代方法，一种基于 WST-8（水溶性四唑盐，化学名：2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐）的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。CCK-8 溶液可以直接加入到细胞样品中，不需要预配各种成分。WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下，可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 Formazan。对于同样的细胞，颜色的深浅(生成的 Formazan 量)和细胞数目呈线性关系。可用于药物筛选、细胞增殖和毒性测定、肿瘤药敏等试验。

操作步骤

一. 制作标准曲线（测定细胞具体数量）

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 4-7 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，然后加入 CCK-8 试剂（按每 100 μL 培养基加 10 μL CCK-8）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 μL/孔)，将培养板放在培养箱中预培养一段时间；
2. 向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液(注意不要产生气泡，它们会影响 OD 值的读数)；
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 450 nm 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 μL/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 μL 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 450 nm 处的吸光度。

注意：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。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。

四.活力计算

细胞存活率*（%）=[(As-Ab) / (Ac-Ab)] × 100%

抑制率*（%）=[(Ac-As) / (Ac-Ab)] × 100%

As:实验孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液)；

Ac: 对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液，不含药物) ；

Ab: 空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液，不含细胞、药物) 。

保存条件

4℃避光保存，有效期 12 个月；-20℃避光保存，有效期 24 个月。

实验应用

1. 细胞增殖测定：CCK-8 是水溶性的，在培养基中稳定且无毒。

2. 细胞活性分析，包括细胞毒性：代谢活性以及染料的形成与细胞的活性和损伤成比例。

3. 细胞因子分析：测定细胞因子诱导的增殖，必要时，可在试验结束时回收和扩增细胞。

注意事项

1.CCK-8 试剂盒的使用过程中需要注意避光操作。

2.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，需要摸索条件，CCK-8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。

3.使用 96 孔板进行检测时，如果细胞培养时间较长，一定要注意蒸发问 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，改加相同量的 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。

4.本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应，所以还原剂（例如一些抗氧化剂)会干扰检测，如果待检测体系中存在较多的还原剂，需设法去除。用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡，否则会干扰测定。

5.加入药物中如含有金属，对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1mM 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 的话，将会 100% 抑制。

6.培养基中的酚红不会影响实验结果，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。

7.本产品可以检测革兰氏阴性细菌，但不能检测革兰氏阳性细菌和酵母细胞。向 100μL 培养液中加入 10μL CCK-8 溶液，并培养 1-4 小时或过夜。

8.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，OD 值不断增加(注:活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。

9.要测定细胞的具体数量，建议同时做标准曲线。

10.建议采用多通道移液器，以减小平行孔间的差异。

11.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° C 冰箱内。(b).每孔加 10μL 0.1M HCl 溶液。(c).每孔加 10μL 1% (w/v) 的 SDS (十二烷基硫酸钠)溶液。注意：反应停止后，应在 24 小时内测定。

12. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

13. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。