

CCK-8 Detection Kit CCK-8 检测试剂盒说明书

产品包装

规格	500T (5ml)	1000T (5ml*2)	3000T (5ml*6)
目录号	CT01A	CT01B	CT01C

本产品蓝冰运输；避光保存，2~8℃一年有效，-20℃两年有效。

产品介绍

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒，是 MTT 的升级替代方法，是一种基于 WST-8 [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、高灵敏度且无放射性的检测试剂盒。

检测原理：WST-8 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水溶性的橙黄色的甲臞产物 (formazan) (参考图 1)。产生的 formazan 的量与活细胞的数量成正比。因此，细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。使用酶标仪在 450nm 波长处测定 OD 值，间接反映活细胞数量。

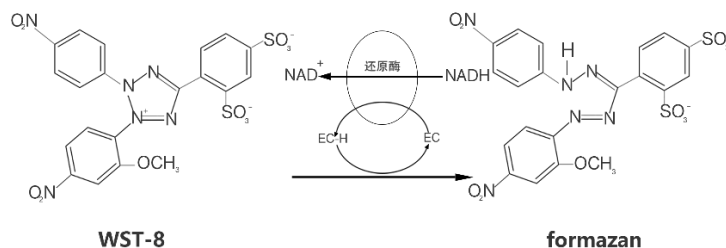


图1.WST-8检测原理图 (EC=electron coupling reagent,即电子耦合试剂)

CCK-8 法与 MTT、MTS 等细胞增殖或毒性检测方法相比具有明显的优势。首先，由于 WST-8 产生的 formazan 是水溶性的，因此不再需要 DMSO 等有机溶剂来溶解。其次，WST-8 比 MTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更加稳定。另外，WST-8 检测灵敏度更高，更易溶解。

本试剂盒检测非常便捷。试剂盒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，可以直接加入到细胞样品中，检测快速，可以用于大批量样品的检测。本试剂盒可用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏试验以及一些生物活性因子的活性检测等。

CCK-8 试剂的细胞毒性非常低，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。

操作说明

1. 制作标准曲线

- 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；
- 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；
- 接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后每 100 μ L 培养基加 10 μ L 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。

2. 细胞活性检测

- 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
- 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
- 将培养板置于培养箱内孵育 0.5-4 小时;
- 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

3. 细胞增殖-毒性检测

- 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μ L/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 24 小时;
- 向培养板加入不同浓度的待测药物;
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间;
- 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡);
- 将培养板置于培养箱内孵育 0.5-4 小时;
- 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

4. 计算公式

细胞存活率 = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$; 抑制率 = $[(A_c - A_s) / (A_c - A_b)] \times 100\%$

A_s : 实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);

A_c : 对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物);

A_b : 空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)。

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。

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 试剂后的孵育时间。
- 如果细胞培养时间较长, 需要注意蒸发问题。由于 96 孔板外围一圈最容易蒸发, 可以采取弃用外围一圈的办法, 改加相同量的 PBS、水或培养基。
- 接种时注意细胞悬液一定要混匀, 以避免细胞沉淀下来, 导致加入到每孔中的细胞数量不一致。可以采用多通道移液器, 减少平行孔间的误差。
- 为了避免加样时由于 CCK-8 残留在枪头上或孔壁上所带来的误差, 可以在加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂并混匀后加样。加 CCK-8 试剂时注意不要在孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数。
- 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。
- CCK-8 法的检测依赖于脱氢酶催化的反应, 所以还原剂会干扰检测, 如果待检测体系中存在较多的还原剂, 需设法去除。为减少药物对测定的可能影响, 可以在加 CCK-8 之前更换培养基, 去掉药物的影响。
- CCK-8 的毒性非常低, 细胞在 CCK-8 法检测后仍然可以正常生长, 可用于其他细胞增殖测定, 例如结晶紫测定, 中性红测定或 DNA 荧光测定。但为了避免 CCK-8 溶液可能带来的对于后续检测的影响, 除非细胞极为稀少, 否则不推荐再用于其他实验。
- 如果 OD 值太低, 可以适当增加细胞数量或者延长加入 CCK-8 试剂后的孵育时间。
- 本产品仅限科研使用



(官网)



(公众号)