

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

细胞活力检测试剂盒

使用说明

产品组分

产品组成	C00901 -50T	C00901 -100T	C00901 -500T	C00901 -1000T
CCK-8 溶液	0.5ml	1ml	5ml	5ml×2
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

产品简介

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 细胞活力检测试剂盒，是一种利用 WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二硝基苯基)-2H-) 进行方便的分析四唑盐，-钠盐)，其在电子载体 1-甲氧基 PMS 存在下可以被线粒体内的脱氢酶还原产生高度水溶性的橙黄色的甲瓩产物，属于 MTT 的升级产品。将 CCK-8 溶液直接添加到细胞中，不需要预先混合组分。产生的甲瓩产物的量(即颜色的深浅)与活细胞的数量成正比，与细胞的增殖成正比，与细胞毒性成反比。

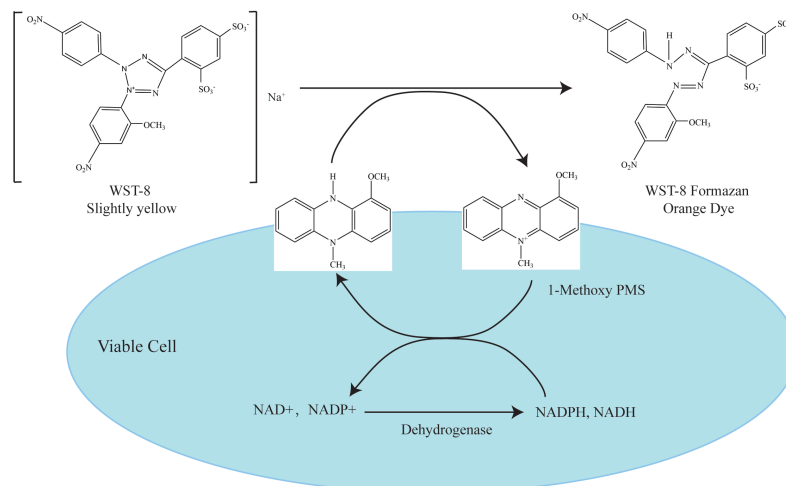


图 1. CCK-8 工作原理图

由于 CCK-8 溶液非常稳定并且几乎没有细胞毒性，因此可以进行更长时间的孵育，例如 24 小时至 48 小时。CCK-8 试剂盒允许灵敏的比色测定法测定增殖和细胞

毒性测定中活细胞的数量,检测灵敏度高于任何其他四唑盐,如MTT,XTT或MTS。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、肿瘤药物试验以及生物因子的活性检测等方面。

表 1. 细胞增殖与毒性检测试剂的对比表

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲瓚产物的水溶性	差	好	好	好
检测灵敏度	高	很高	很高	最高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600nm	420-480nm	420-480nm	430-490nm
细胞毒性	高	很低	很低	很低
试剂稳定性	一般	较差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般	便捷	便捷	非常便捷

检测方法

利用酶标仪检测 450nm 处的吸光值。

运输及保存方式

蓝冰运输。2-8℃避光保存,有效期一年,-20℃保存,有效期两年,但反复冻融会增加背景值。如短时间内需多次重复使用,请于 4℃避光保存。

使用注意事项

- 1、确保药物和 CCK-8 均匀分布在培养基中。
- 2、细胞增殖越多,颜色越深;细胞毒性越强,颜色越浅。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。
- 3、对于贴壁细胞,每孔至少需要 1000 个细胞(100 μl 培养基)。对于白细胞,由于灵敏度较低,每孔至少需要 2500 个细胞(100 μl 培养基)。推荐的 96 孔板每孔最大细胞数为 25000。如果使用 24 孔或 6 孔板进行该检测,请计算相应的每孔的细胞数,并调整 CCK-8 的体积,使其为每孔总液体体积的 10%。

4、因为 CCK-8 测定是基于活细胞中的脱氢酶活性，影响脱氢酶活性的条件或化学物质可能导致实际活细胞数与使用 CCK-8 测定活细胞之间有差异。

5、WST-8 可能与还原剂反应生成 WST-8 Formazan。如果使用还原剂（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。

6、孵育 2 小时后，背景 OD 值一般为 0.1-0.2 单位。并且注意不要在孔中引入气泡，因为它们会干扰 OD 值。

7、如果您想对 CCK-8 溶液进行灭菌，请使用 0.2 μm 的膜过滤溶液。

8、CCK-8 不能用于细胞染色。

9、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。

10、我们建议将细胞接种在靠近培养板中央的孔中，最外围一圈孔中的培养基容易蒸发，可以用 PBS，水或培养基填充这些孔，不作为测定孔用。

11、如果细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化，应洗涤细胞更换培养基后再加 CCK-8 试剂进行检测。

12、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

实验步骤

(1) 制作标准曲线

1、制备细胞悬液：细胞计数。

2、接种到 96 孔板中：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 个重复孔。每孔约 100 μl 细胞悬液。

3、细胞培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 2~4 小时（备注：如果不需要贴壁，这一步可以省略）。

4、每孔加入 10 μl CCK-8 溶液，由于每孔中加入的 CCK-8 溶液较少，为了减少试剂沾在孔壁或者枪头带来的误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀，或者直接配置含 10% CCK-8 溶液的培养基，以换液的形式加入。

5、培养箱内孵育一定时间后测定 450nm 吸光度，制作出一条以细胞数量为横坐标（即 X 轴），以吸光度为纵坐标（即 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。(备注：使用该标准曲线的前提是实验的条件一定要一致，比如加入的 CCK-8 溶液的量以及培养孵育的时间等，以便于确定细胞的接种数量)

(2) 细胞活性检测

1、制备细胞悬液：细胞计数。

2、接种到 96 孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔约 100 μl 细胞悬液，可设置 3 个重复孔。

3、细胞培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 2~4 小时（备注：如果不需要贴壁，这一步可以省略）。

4、每孔加入 10 μl CCK-8 溶液，由于每孔中加入的 CCK-8 溶液较少，为了减少试剂沾在孔壁或者枪头带来的误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀，或者直接配置含 10% CCK-8 溶液的培养基，以换液的形式加入。

5、培养箱内孵育 0.5~4 小时：细胞种类不同，形成的甲瓞的数量也不一样，一般情况下孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。尤其是血细胞，形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。

6、测定 450nm 吸光度：直接利用酶标仪检测 450nm 处的吸光值。如果暂时不测定吸光值可以向每孔中加入 10 μl 自己配置的 0.1M HCl 溶液或 1% SDS 溶液并将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。

(3) 细胞增殖-毒性检测

1、制备细胞悬液：细胞计数。

2、接种到 96 孔板中：根据合适的铺板细胞数，每孔约 100 μl 细胞悬液，可设置 3 个重复孔。

3、细胞培养：细胞接种后贴壁大约需要培养 2~4 小时（备注：如果不需要贴壁，这一步可以省略；或者根据实验要求的不同，培养相应的时间）。

4、每孔加入 0-10 μl 不同浓度的待测药物。

5、培养箱中培养细胞：加入待测药物的培养时间，需要根据药物的性质和细胞的敏感度以及细胞的周期来决定，最少要一代以上的时间。

6、每孔加入 10 μl CCK-8 溶液，由于每孔中加入的 CCK-8 溶液较少，为了减少试剂沾在孔壁或者枪头带来的误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀，或者直接配置含 10% CCK-8 溶液的培养基，以换液的形式加入。（备注：如果待测物质有氧化性或者还原性的话，可在加入 CCK-8 溶液之前除去培养基，并用新鲜的培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基以去掉药物对 CCK-8 检测结果的影响。当然，如果药物的影响较小，也可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收值即可。）

7、培养箱内孵育 0.5~4 小时：细胞种类不同，形成的甲瓞的数量也不一样，一般情况下孵育 1 小时即可。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。尤其是血细胞，形成的 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。

8、测定 450nm 吸光度：直接利用酶标仪检测 450nm 处的吸光值。如果暂时不测定吸光值可以向每孔中加入 10 μl 自己配置的 0.1M HCl 溶液或 1% SDS 溶液并将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。

(4) 计算公式

细胞存活率= $[(As-Ab) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

抑制率= $[(Ac-As) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

As: 实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

Ac: 对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物）的吸光度

Ab: 空白孔（不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8）的吸光度

相关产品列表

产品	货号
EdU 细胞增殖检测试剂盒	C01501、C01502、C01503
AnnexinV/PI 流式细胞凋亡检测试剂盒	C01201
EU 新生 RNA 检测试剂盒	C01901
流式细胞周期检测试剂盒	C01301、C01302
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒	C01101、C01102

上海东寰生物科技有限公司

SHANGHAI DONGHUAN BIOTECH CO., LTD

公司网址:www.dhbiotech.com QQ 咨询:3295258699

电话咨询:021-39965016 邮箱:market@dhbiotech.com