上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)

产品简介：

Yuanye Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒，是一种基于 WST-8（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。

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臜产物(formazan)。颜色的深浅与细胞的增殖成正比，与细胞毒性成反比。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。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	r42152 100T	r42152 500T	r42152 1000T	r42152 2500T	r42152 10000T	Storage
Cell Counting Kit-8	1ml	5ml	2×5ml	5×5ml	20×5ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份					

自备材料：

1、 细胞培养液、胰蛋白酶消化液、0.1M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液
2、 低速离心机、96 孔培养板、细胞计数板或计数器、摇床、显微镜、酶标仪

操作步骤(仅供参考)：

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，然后接种细胞到培养板内。
2、按比例（例如：1/2 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 3-5 个细胞浓度梯度，每个浓度建议 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（X 轴），OD 值为纵坐标（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（使用此标准曲线的前提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。）

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

（37℃,5% CO2）。

2、向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 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 450 nm 处的吸光度。

5、若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 10 μL 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。24 小时内测定，吸光度不会发生变化。

三. 细胞增殖与细胞毒性检测

1、在 96 孔板中接种细胞悬液（100 μL/孔）。将培养板放在培养箱预培养 24 小时（37℃，5% CO2）。

2、向培养板加入 10 μL 不同浓度的待测物质。

3、将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（例如：6、12、24 或 48 小时）。

4、向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液（注意不要再孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。

5、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。

6、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

7、若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 10 μL 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。24 小时内测定，吸光度不会发生变化。

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。

活力计算：

细胞活力(%)=$(A_s-A_b)/(A_c-A_b)\times100$

抑制率(%)=$(A_c-A_s)/(A_c-A_b)\times100$

A_s：实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8 溶液和待测药物)的吸光度

A_b：空白孔(含有培养基和 CCK-8 溶液，不含细胞和待测药物)的吸光度

A_c：对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8 溶液，不含待测药物)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、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。

2、有条件的情况下建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。加入 CCK-8 试剂时，建议斜贴着培养板壁加，不要插到培养基液面下加，容易产生气泡，会干扰 OD 值读数。

3、白细胞可能需要培养较长时间。

4、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 μL 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 μL 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。

5、如果没有 450 nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450 nm 滤光片的检测灵敏度最高。

6、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。

7、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

8、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

CCK-8 方法的优势：

1、酚红和血清对 CCK-8 法的检测不会造成干扰；

2、细胞毒性非常低，因此加入 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、CCK-8 法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲臜产物的水溶性	差（需加有机溶剂溶解后再检测）	好	好	好
产品性状	粉末	2 瓶溶液	溶液	1 瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	高	很高	很高	高
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560-600 nm	420-480 nm	420-480 nm	430-490 nm
细胞毒性	高，细胞形态完全消失	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变
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

有效期：4℃避光保存，12 个月有效。低温运输。