CCK-8 试剂盒

Cell Counting Kit-8

包装清单

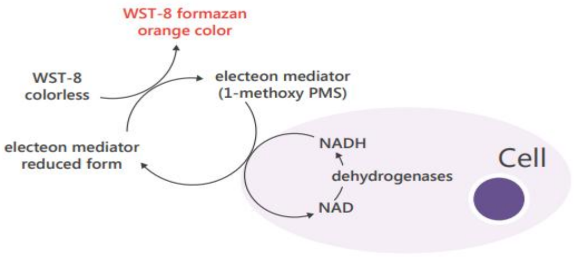
Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0002	CCK-8 溶液	1mL
	说明书	1 份

产品简介

Cell Counting Kit-8，简称 CCK-8 试剂盒，是一种基于 WST-8 而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。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。细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。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。

WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品，和 MTT 或其它 MTT 类似产品，如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。

1. MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的，需要有特定的溶剂来溶解；而 WST-8 和 XTT 、MTS 产生的 formazan 都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。
2. WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 更易溶解。
3. WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更可靠。
4. WST-8 和 MTT、XTT 等相比线性范围更宽，灵敏度更高，并且更加稳定。WST-8 对细胞无明显毒性。加入 CCK-8 溶液显色后，可以在不同时间反复用酶标仪读板，检测时间更加灵活，便于确定最佳测定时间。



CCK-8 的原理图

本试剂盒可以用于细胞因子等诱导的细胞增殖检测，也可以用于抗癌药物 等对细胞有毒试剂诱导的细胞毒性检测，或一些药物诱导的细胞生长抑制 检测。

保存条件

4℃避光保存，有效期两年。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 加入药物中如含有金属，对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1 mM 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 10 mM 的话，将会 100%抑制。
5. 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。
6. 本产品可以检测 E.coli，但不能检测酵母细胞。向 100μL E.coli 培养液中加入 10μL CCK-8 溶液，并培养 1-4 小时或过夜。
7. 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。
8. 要测定细胞的具体数量，建议同时做标准曲线。

9. 建议采用多通道移液器，以减小平行孔间的差异。
10. 以下方法可以终止 CCK-8 反应(96 孔板)：
（1）在显色反应后，将培养板放置 4° C 冰箱内。
（2）每孔加 10μL 0.1 M HCl 溶液。
（3）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。
11. 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。
12. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1.制作标准曲线

（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 5-7 个细胞浓度梯度，每组 4-6 个复孔。
（3）接种后培养 2-4 小时使细胞贴壁，然后每 100μL 培养基加 10μL 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

（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）向每孔加入 10μL 的 CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡)。
（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。

3. 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 10μL 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。

4. 计算公式

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) 。
注：如果待测药物有氧化性或还原性，可在加入 CCK-8 之前更换新鲜培养基，去掉待测药物的影响。当待测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待测药物后的空白吸收即可。