

Version: CT 2.1 (2023.04.11修订)

增强型CCK-8试剂盒

目录号: CT0001

01/产品组分

序号	组分	100T CT0001-A	500T CT0001-B	500T × 5 CT0001-C	500T × 20 CT0001-D	500T × 50 CT0001-E
1	CCK-8 溶液	1 mL	1 mL × 5	1 mL × 25	1 mL × 100	1 mL × 250

02/保存条件

4°C避光保存，有效期1年。也可-20°C保存，但反复冻融会使背景值增加，干扰实验测定。

03/产品概述

CCK-8 (Cell Counting Kit-8)，是基于 WST-8 而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性检测的试剂盒。检测速度快且灵敏度高于任何其它四唑盐，如 MTT、XTT 或 MTS。

本试剂中含有 WST-8 (化学名：2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐)，是一种类似于 MTT 的化合物，它在电子耦合试剂 1-Methoxy PMS 存在条件下，可被线粒体内的脱氢酶还原为橙色甲瓚产物 Formazan (具有高度水溶性)，生成的 Formazan 数量与活细胞数量成正比。细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。

根据这一特性，可以进行药敏实验、药物筛选、细胞增殖和毒性分析等。同 MTT 相比对细胞无明显毒性，一般状况下对细胞形态没有明显的改变，因此加入 CCK-8 溶液显色后，可选择不同时间点反复用酶标仪读板，找到实验最佳测定时间。

本实验溶液不需配制，无需换液，步骤便捷，数据可靠、重现性好、检验速度快且灵敏度高。

04/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 实验前建议先做预实验摸索接种细胞的数目和 CCK-8 溶液加入后的培养时间。
- ◇ 由于使用 96 孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，一定要注意液体蒸发。96 孔板外围一圈最易蒸发，可弃用，外围一圈改加 PBS，水或无血清培养基。也可以把孔板置于靠近培养箱内水源处，以减缓蒸发。
- ◇ 虽然培养基中的酚红和 CCK-8 溶液颜色相近，但是在计算时，培养基中酚红的吸光度可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。
- ◇ 若使用 24 孔板或 12 孔板实验，可按孔内培养基总体积的 10% 加入 CCK-8 溶液。
- ◇ 如果待测体系中存在氧化还原物质可能会干扰检测结果，还原性物质会使吸光度增加，氧化性物质会使吸光度减小，因此需要尽量去除这些物质的影响。
- ◇ 若没有 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 检测灵敏度最高。如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议采用双波长进行测定，检测波长 450 nm，参比波长 600-650 nm。
- ◇ 由于每孔加 CCK-8 的量比较少，有可能因试剂粘在孔壁带来误差，可以加过试剂后轻敲混匀或直接配置含有 10% CCK-8 的培养基，以换液形式加入。操作时注意不要产生气泡，这会影响最后的测定结果。
- ◇ 设置空白孔作为调零孔时，在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，培养相同时间后在 450 nm 处测定的吸光值为空白对照。当加入药物处理细胞时，还应该考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养相同时间后在 450 nm 处测定的吸光值为空白对照。
- ◇ 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，不得存放于普通住宅内。
- ◇ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

05/使用方案

提示：

- ◇ 制作标准曲线（测定具体数目时）

- 1、收集细胞：制备细胞悬液并计数。
- 2、接种细胞：可按比例（如 1：2）依次用培养基等比稀释成一个细胞浓度梯度，一般做 5-7 个细胞浓度梯度，每组设置 3-6 个重复，96 孔板每孔加入 100 μ L 细胞悬液。实验设置调零孔，孔内加 100 μ L 培养基（不含细胞）。
- 3、继续培养：培养至细胞贴壁，一般 2-4 小时即可。悬浮细胞或不需贴壁此步可不做。
- 4、CCK-8 溶液孵育：每孔加 10 μ L CCK-8 溶液，混匀，培养箱内孵育 0.5-4 小时测定酶标仪 450 nm 处 OD 值。（细胞种类不

同，形成的 Formazan 的量也不一样，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色程度不够，可继续培养以确认最佳条件）。

5、制作标准曲线：以细胞数为横坐标（X 轴），OD 值为纵坐标（Y 轴）制作标准曲线。在实验条件一致时，可以根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数。

◇ 细胞活性检测

1、收集细胞：制备细胞悬液并计数。

2、接种细胞：根据合适的铺板细胞数，用培养基稀释细胞悬液，96 孔板每孔加入约 100 μL，并设置重复（一般设置 3-6 个重复）。

3、继续培养：37℃ 培养箱预培养 24 小时。

4、加入 CCK-8 并检测：每孔加 10 μL CCK-8 溶液，混匀，培养箱内孵育 0.5-4 小时测定酶标仪 450 nm 处 OD 值（细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不一样，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色程度不够，可继续培养以确认最佳条件）。

◇ 细胞毒性检测

1、收集细胞：制备细胞悬液并计数。

2、接种细胞：根据合适的铺板细胞数，用培养基稀释细胞悬液。实验设置空白孔、对照孔及实验孔，空白孔内加 100 μL 培养基（不含细胞），对照孔及加药孔加入 100 μL 相同细胞浓度的细胞悬液，并设置重复（一般设置 3-6 个重复）。

3、继续培养：37℃ 培养箱预培养 24 小时，或根据实验的不同要求合理调整培养时间。

4、加药处理：实验孔内加入 0-10 μL 不同浓度的待测药物。置于培养箱继续孵育一段时间（例如：6、12、24 或 48 小时），具体孵育时间要根据药物性质及细胞敏感性（一般根据细胞周期决定，起码要一代以上的时间）。

5、加入 CCK-8 并检测：每孔加 10 μL CCK-8 溶液，（注意：若待测药物有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 前吸除培养基，并用新的培养基轻轻洗涤细胞两次后再加入新的培养基，以去掉药物影响。）混匀，继续孵育。培养箱内孵育 0.5-4 小时测定酶标仪 450 nm 处 OD 值（细胞种类不同，形成的 Formazan 的量也不一样，对于大多数情况孵育 1 小时即可。如果显色程度不够，可继续培养以确认最佳条件）。

◇ 计算公式

细胞存活率 = $[(\text{实验孔 OD} - \text{空白孔 OD}) / (\text{对照孔 OD} - \text{空白孔 OD})] \times 100\%$

抑制率 = $[(\text{对照孔 OD} - \text{实验孔 OD}) / (\text{对照孔 OD} - \text{空白孔 OD})] \times 100\%$

实验孔 OD：实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、待测药物）的吸光度

对照孔 OD：对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测药物）的吸光度

空白孔 OD：空白孔（不含细胞和待测药物的培养基、CCK-8）的吸光度

06/相关产品

CA0001-500ML	DMEM高糖，丙酮酸钠 (-)
CM0001-100 ML	青链霉素混合液 (100×)
CN0004	0.25%胰酶溶液 (含酚红)
CR0014-500ML	PBS (1×) , PH7.4
CT0002	MTT试剂盒

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

