

CCK-8 试剂盒

Cell Counting Kit -8

货号	规格
CT-K-1	1 毫升
CT-K-5	5 毫升
CT-K-10	10 毫升

保存条件:

4°C 避光保存一年有效, -20°C 避光保存两年有效。避免反复冻融。

检测原理

Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒), 是一种基于 WST-8 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, 能在电子载体 1-甲氧基 PMS 的作用下被还原成水溶性甲臜产物, 生成的甲臜量与活细胞数量成正比, 因此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, 可以反映活细胞数量。

CCK-8 试剂盒操作说明

CCK-8 溶液可直接加入到细胞中, 不需要与其它组分预混。由于 CCK-8 溶液非常稳定并且细胞毒性很小, 所以可以进行长时间孵育, 例如孵育 24-48 小时。

在进行以下实验之前, 可先设置空白对照孔, 仅加入相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液, 不加入细胞。

方法一. 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) 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。)

方法二. 细胞活性检测

- 1、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 (37°C, 5% CO₂) 预培养一段时间。
- 2、向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。
- 3、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 4、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

方法三. 细胞增殖-毒性检测

- 1、在 96 孔板中加入 90 μ L 的细胞悬液。将培养板放在培养箱预培养 24 小时 (37°C, 5% CO₂)。
- 2、向培养板加入 10 μ L 不同浓度的待测物质。
- 3、将培养板在培养箱中孵育适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 小时)。

- 4、向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。
- 5、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 6、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

活力计算：

$$\text{细胞活力 (\%)} = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(\text{不加药}) - A(\text{空白})} \times 100$$

A(加药)：具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A(空白)：具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A(0 加药)：具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

细胞活力：细胞增殖活力或细胞毒性活力

注意事项：

- ◇ 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。
- ◇ 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。培养基中酚红和血清的吸光度，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。
- ◇ 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，建议斜贴着培养板的孔壁加，不要插到培养基液面下加，否则容易产生气泡，干扰 OD 值读数。加完之后最好能够离心，以免 CCK-8 液滴悬挂在壁上。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。
- ◇ 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。
- ◇ 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。白细胞可能需要培养较长时间。若使用 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。
- ◇ 若没有 450nm 的滤光片，可使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。
- ◇ 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。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。