

ClearV Cell Counting Kit (CCK-8)

产品简介

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臞产物（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 450 nm 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。

产品规格

产品货号	C331301E	C331301S	C331301M	C331301L	C331301T
产品规格	100 T	500 T	1000 T	3×1000 T	10×1000 T

产品储存

2~8°C 干燥避光储存，有效期 1 年。-20°C 干燥避光保存，有效期 2 年。冰袋运输。

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. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本产品仅用于科研。

操作说明

1. 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 h 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)。

2. 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预培养一段时间 (37°C, 5% CO₂)。
- 2) 向每孔加入 10 μ L 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 h。
- 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 μ L 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 h 内测定，吸光度不会发生变化。

3. 细胞增殖-毒性检测

- 1) 在 96 孔板中配制 100 μ L 的细胞悬液。将培养板放在培养箱预培养 24 h (37°C, 5% CO₂)。
- 2) 向培养板加入 10 μ L 不同浓度的待测物质。
- 3) 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 h)。
- 4) 向每孔加入 10 μ L 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 h。
- 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 μ L 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 h 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。

4. 活力计算

细胞活力* (%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0\text{加药}) - A(\text{空白})] \times 100$

A (加药) : 具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A (空白) : 具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A (0 加药) : 具有细胞、CCK-8 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