

Cell Counting Kit-8

Cat #:GK3607-100T/ GK3607-500T

一、试剂盒组成、规格、储存:

成分	100T	500T	储存
CCK-8 溶液	1ml	5ml	4℃或-20℃

二、产品简介:

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8, 是一种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。CCK-8 基于 WST-8, 与 MTT 类似, 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。对于同样的细胞, 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 试剂盒可用于药物筛选、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。酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响。CCK-8 对细胞无明显毒性。加入 CCK-8 显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 使检测时间更加灵活, 便于找到最佳测定时间。

三、CCK-8 优势:

- 1、使用方便, 省去了洗涤细胞, 不需要放射性同位素和有机溶剂;
- 2、能快速检测;
- 3、检测灵敏度很高;
- 4、重复性优于 MTT 法;
- 5、对细胞毒性小;
- 6、即用型溶液, 无需配置, 使用方便。

四、使用方法 (仅供参考):

实验一: 细胞活性检测

- 1、制备细胞悬液: 胰蛋白酶消化成单个细胞, 计数。
- 2、细胞接种: 根据不同细胞特性, 取合适的细胞数铺于 96 孔板, 每孔约 100ul 细胞悬液。将培养板放在培养箱中预培养。
- 3、向每孔加入 10μl CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 会影响 OD 值的读数)。
- 4、将培养板在培养箱内孵育 1-4h。
- 5、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光值。

实验二: 细胞增殖分析

- 1、制备细胞悬液: 胰蛋白酶消化成单个细胞, 计数。
- 2、细胞接种: 根据不同细胞特性, 取合适的细胞数铺于 96 孔板, 每孔约 100ul 细胞悬液。
- 3、CO₂ 培养箱中培养: 细胞接种后培养 4-8h, 如果不需要贴壁, 这步可以省去。
- 4、加入 10ul CCK-8: 由于每孔加入 CCK-8 量比较少, 有可能因试剂沾在孔壁上而带来误差, 建议在加完试剂后轻轻振板几次以帮助混匀。或者直接配置含 10% CCK-8 的培养基, 以换液的形式加入。
- 5、培养 1-4h: 细胞种类不同, 形成的 formazan 的量也不一样。如果显色不够, 可以继续培养, 以确认最佳条件。一般 OD 值在 1 左右较好, 最大不超过 2。
- 6、在 450nm 测定吸光度。如无 450nm 滤光片, 可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600nm 的波长, 例如 650nm, 作为参考波长进行双波长测定。

实验三：细胞毒性分析

- 1、制备细胞悬液：胰蛋白酶消化成单个细胞，计数。
- 2、细胞接种：根据不同细胞特性，取合适的细胞数铺于 96 孔板，每孔约 100ul 细胞悬液。
- 3、CO₂ 培养箱中培养：细胞接种后培养 4-8h，如果不需要贴壁，这步可以省去。
- 4、加入不同浓度的毒性物质。
- 5、37℃ 培养箱中培养：加入毒性物质的培养时间，要看毒性物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，至少要一代以上的时间。
- 6、加入 10ul CCK-8：由于每孔加入 CCK-8 量比较少，有可能因试剂沾在孔壁上而带来误差，建议在加完试剂后轻轻振板几次以帮助混匀。或者直接配置含 10% CCK-8 的培养基，以换液的形式加入。
- 7、培养 1-4h：细胞种类不同，形成的甲臞的量也不一样。如果显色不够，可以继续培养，以确认最佳条件。一般 OD 值在 1 左右较好，最大不超过 2。
- 8、在 450nm 测定吸光度。如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。可以使用大于 600nm 的波长，例如 650nm，作为参考波长进行双波长测定。

注：

若暂时不测定 OD 值，可以向每孔中加入 10ul 0.1M 的 HCl 溶液或者 1% 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。

五、储存条件

4℃ 避光保存 1 年，-20℃ 避光保存 2 年。

六、注意事项

- 1、使用标准 96 孔板时，通常细胞增殖实验每孔加入 2,000 个细胞/100ul 培养基，细胞毒性实验每孔加入 5,000 个细胞/100ul 培养基(具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小，细胞增殖速度的快慢等因素决定)。按照实验需要，进行培养并给予 0-10ul 特定的药物刺激。
- 2、酚红和血清对 CCK-8 法的检测不会造成干扰，可以通过减去空白孔中本底的吸光度而消除。
- 3、CCK-8 试剂的颜色为淡红色，与含酚红的培养基颜色接近，不注意的话容易产生漏加或多加。
- 4、CCK-8 可以检测大肠杆菌，但不能检测酵母细胞。在细胞增殖实验每次测定的过程中需要避免细菌污染，以免影响结果
- 5、当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔容易干燥挥发，导致体积不准确而增加误差。一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。
- 6、在培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450nm 的吸光度即为空白对照。在做加药实验时，还应考虑药物的吸收，可在加入药物的培养基中加入 CCK-8，培养一定的时间，测定 450nm 的吸光度作为空白对照。
- 7、金属对 CCK-8 显色有影响：终浓度为 1mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会 5%、15%、90% 的抑制显色反应，使灵敏度降低。如果终浓度是 10mM，将会 100% 抑制显色反应。
- 8、部分悬浮细胞由于染色比较困难，一般需要增加细胞数量并延长培养时间。