

产品说明书

Specification

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

1. 产品描述

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂盒是一种通常用于评估细胞增殖和细胞毒性的简便且高灵敏度的工具，其原理基于水溶性四唑盐-8 (Water-Soluble Tetrazolium Salt-8, WST-8) 的比色分析法。活细胞代谢中，脱氢酶在电子载体1-甲氧基-5-甲基吩嗪甲基硫酸酯 (1-Methoxy PMS) 存在下，将四氮唑盐WST-8还原为橙黄色甲臞染料 (formazan)，在450 nm处具有最大光吸收。该反应发生在代谢活跃的细胞中，因此它被认为是细胞活力的指标，颜色深浅 (产生的甲臞量) 与样品中活细胞的数量呈线性关系。

该检测方法相较于其他四氮唑盐，如MTT、XTT或WST-1，其优势如下：

表1 CCK-8法与其他细胞增殖/毒性检测方法的比较

检测方法	MTT法	XTT法	WST-1法	CCK8法
甲臞产物的水溶性	较低	较低	较低	较高
产品性状	粉末	2瓶溶液	溶液	1瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	+	++	++	+++
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560~600nm	420~480nm	420~480nm	430~490nm
细胞毒性	高，细胞形态完全消失	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变	很低，细胞形态不变
试剂稳定性	一般	较差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般	便捷	便捷	非常便捷
整体性能	一般	优	优	最佳

2. 操作方法

本试剂盒可用于细胞活力、增殖和细胞毒性的检测。

1) 制作标准曲线

- 用细胞计数板计数细胞悬液中细胞的数量，然后将细胞接种到96孔板中；
- 按比例依次用培养基等比稀释，一般要做5-7个细胞浓度梯度，每个浓度建议4-6个复孔；
- 接种培养4小时后细胞贴壁，然后每孔100 μ L的细胞培养基中加入10 μ L CCK-8试剂，轻轻晃动平板，使生成的染料均匀分布在孔中；

[https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-\(CCK-8\).html](https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-(CCK-8).html)

d. 在37°C的CO₂培养箱中孵育，孵育时间从30分钟到过夜不等，具体取决于所使用的细胞类型和细胞浓度。450 nm处(430 - 490 nm)测定OD值，最终制作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条件完全一致)

2) 细胞增殖和细胞毒性试验

a. 实验前确定特定细胞的最佳细胞数和孵育时间;

b. 于96孔板中接种细胞悬液 (100 μL/孔)，在37°C的CO₂培养箱中培养细胞24小时，(毒性试验需要在培养板加入不同浓度的待测药物，孵育一段时间)；

*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。

c. 每孔加入10 μL CCK8试剂 (不要产生气泡)，轻轻晃动平板，使染料均匀分布在孔中，在细胞培养箱中孵育时间从30分钟到过夜不等；

d. 酶标仪测定在 450 nm(430 - 490 nm)处的吸光度。

e. 计算细胞的存活率或抑制率

$$\text{细胞存活率}\% = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0\text{加药}) - A(\text{空白})} \times 100\%$$

$$\text{抑制率}\% = \frac{A(0\text{加药}) - A(\text{加药})}{A(0\text{加药}) - A(\text{空白})} \times 100\%$$

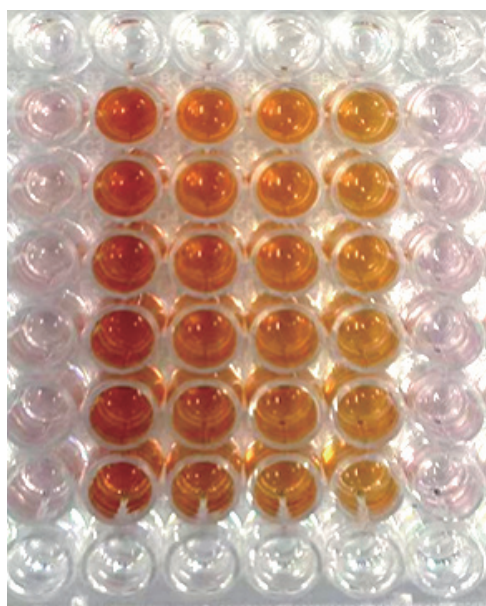
A(加药): 具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液孔的吸光度

A(空白): 具有培养基和CCK-8溶液而没有细胞孔的吸光度

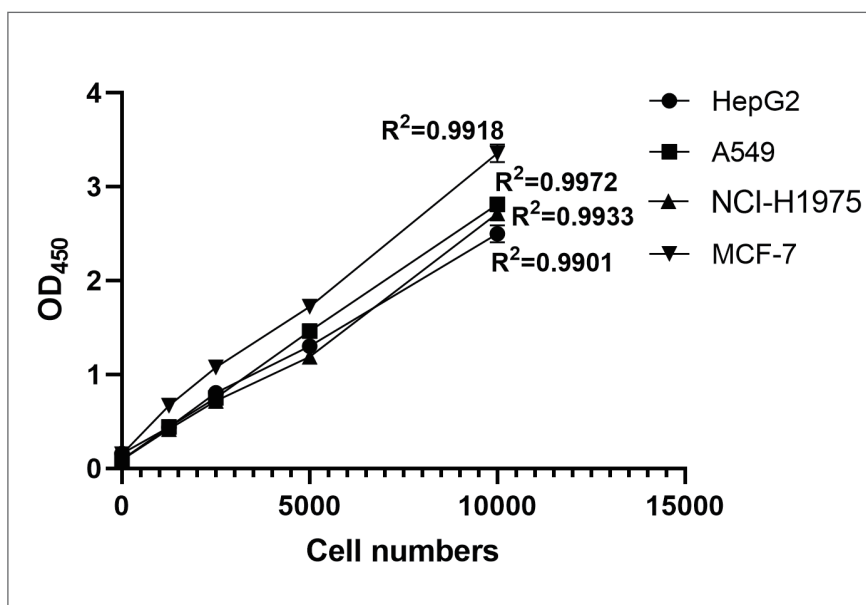
A(0加药): 具有细胞、CCK-8溶液而没有药物溶液孔的吸光度

细胞存活率%和抑制率%一定程度上显示了细胞增殖活力或细胞毒性

3. 实验案例



CCK8检测实验图



CCK8试剂和检测细胞活性

[https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-\(CCK-8\).html](https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-(CCK-8).html)

4. 储存条件

2-8°C: 2年

-20°C及以下可保存更长时间, 建议避光保存

5. 注意事项

- 1) 使用本产品之前, 请仔细阅读说明书, 穿戴实验服和一次性手套。
- 2) 本产品仅限于专业人员的科研用途, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 3) 第一次做实验时, 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。
- 4) 接种时注意细胞悬液一定要混匀, 以避免细胞沉淀下来, 导致每孔中的细胞数量不一致。
- 5) 建议采用多通道移液器, 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, 避免气泡产生, 会干扰 OD 值读数。
- 6) 反应体系中若存在还原剂 (例如一些抗氧化剂) 会干扰检测, 需更换新鲜培养基再进行实验检测。
- 7) 96孔板进行检测时, 注意边缘试剂蒸发问题, 为减少误差, 建议培养板周围的四边每孔只加培养基。
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 不同批次的试剂不得混用或超过有效期使用, 避免重复冻融循环。
- 11) 如果没有 450nm 的滤光片, 可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片, 但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。



产品仅供科研

[https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-\(CCK-8\).html](https://www.ambeed.cn/products/Cell-Counting-Kit-8-(CCK-8).html)