

## Cell Counting Kit-8

目录号	产品名称	规格	包装
AC10873-100	Cell Counting Kit-8	100 T	1ml
AC10873-500	Cell Counting Kit-8	500 T	5ml
AC10873-1000	Cell Counting Kit-8	1000 T	10ml

**保存:** 4℃密封避光保存, 有效期一年。

### 产品简介:

Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒, 为 MTT 法的替代方法, 是一种基于 WST (水溶性四唑盐, 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。可用于药物筛选、细胞增殖测定、细胞毒性测定、肿瘤药敏等试验

### 使用说明:

#### 一、制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

- 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。
- 2、按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, 每组 3-6 个复孔。
- 3、接种后培养至细胞贴壁, 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 (试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。)

#### 二、细胞活性检测

- 1、在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 $\mu$ L/孔)。将培养板放在培养箱中预培养 (在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下)。
- 2、向每孔加入 10 $\mu$ 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 小时。
- 4、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
- 5、如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 $\mu$ L 0.1M 的 HCl 或者 1%SDS(W/V)溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

#### 三、细胞增值-毒性检测

- 1、在 96 孔板中配置 100  $\mu$ L 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时 (在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的条件下)。
- 2、向培养板加入 10 $\mu$ L 不同浓度的待测物质。在培养箱孵育一段适当的时间 (例如: 6、12、24 或 48 小时)。
- 3、向每孔加入 10  $\mu$ 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)。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。
- 4、将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
- 5、用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。
- 6、如果暂时不测定 OD 值, 打算以后测定的话, 可以向每孔中加入 10 $\mu$ L 0.1M 的 HCl 或者 1%SDS(W/V)溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

活力计算：.

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

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

### 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白细胞可能需要培养较长时间。
- ③当使用标准 96 孔板时, 贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100  $\mu$ L 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 2,500 个/孔 (100  $\mu$ L 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。
- ④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 检测灵敏度最高。
- ⑤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。

### CCK-8 法与其它检测方法之间的比较:

细胞计数方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
形成的 formazan 的水溶性	差	好	好	好
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	无需预制	无需预制
检测灵敏度	高	很高	很高	高
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
大批量样品检测	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