

产品简介

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法用于测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的一种快速、高灵敏度、无放射性的比色检测方法。CCK-8利用水溶性四唑盐WST-8[2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二硝基苯)-2H-四唑单钠盐]，它在电子耦合试剂存在的情况下还原产生水溶性formazan（甲臜）染料，如图1所示：

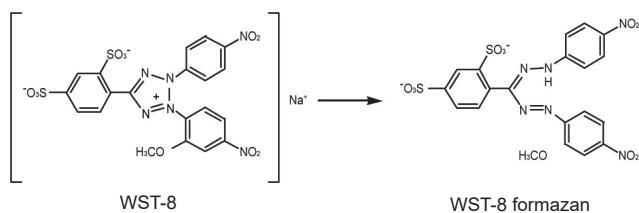


图1 WST-8和WST-8 formazan的结构式

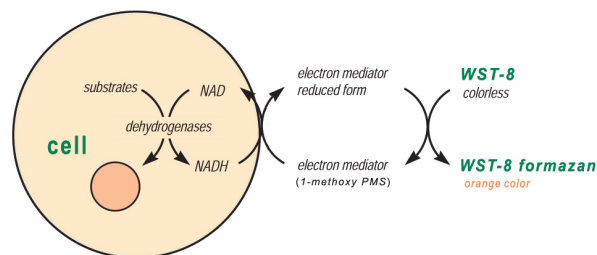


图2 CCK-8细胞活性检测的原理图

CCK-8溶液可直接加入到细胞样品中,不需要预配各种成分。WST-8被活细胞内脱氢酶还原后生成的橙黄色formazan染料能够溶解在组织培养基中（如图2所示），细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。生成的formazan染料的量与活细胞的数量呈正比。

产品特点

WST-8是MTT的一种升级替代产品，和MTT或其它MTT类似物（如XTT、MTS等）相比有明显的优点。

1. MTT被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的formazan不是水溶性的，需要有特定的溶剂来溶解，而WST-8和XTT、MTS产生的formazan都是水溶性的，可以省去后续的溶解步骤。
2. WST-8产生的formazan比XTT和MTS产生的formazan更易溶解。
3. WST-8比XTT和MTS更加稳定，使实验结果更可靠。
4. WST-8和MTT、XTT等相比线性范围更宽，灵敏度更高，并且更加稳定。WST-8对细胞无明显毒性。加入CCK-8溶液显色后，可以在不同时间反复用酶标仪读板，检测时间更加灵活，便于确定最佳测定时间。

储存条件

4℃ 避光保存有效期24个月，如需保存更长时间请-20℃。

所需设备和材料

1. 10 μL、100-200 μL以及多通道移液器
2. 带有450nm滤光片的酶标仪
3. 96孔培养板
4. CO2培养箱



使用说明

一. 制作标准曲线

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5-7个细胞浓度梯度，每组4-6个复孔；
3. 接种后培养2-4小时使细胞贴壁，然后每100 μ L培养基中加入10 μ L 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条件是试验条件完全一致。

注：如果暂时不测定OD值，打算以后测定或为了避免每次准备标准曲线，可向每孔中加入10 μ L Stop Solution，并遮盖培养板避光保存在0-5℃条件下，7天内吸光度不会发生变化。

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预培养（37℃，5%CO₂的条件下）
2. 向每孔加入10 μ L的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. 将培养板放在培养箱内孵育0.5-4 小时；
4. 用酶标仪测定在450nm处的吸光度。

注：如果暂时不测定OD值，打算以后测定，可以向每孔中加入10 μ L Stop Solution，并遮盖培养板避光保存在0-5℃条件下，7天内吸光度不会发生变化。

计算公式：

$$\text{细胞存活率} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = [(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

As：实验孔吸光度(含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质)；

Ac：对照孔吸光度(含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测物质)；

Ab：空白孔吸光度(不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8)。

三. 细胞增殖-毒性检测

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24h（37℃，5%CO₂的条件下）
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小时）。
4. 向每孔加入10 μ L的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)；
5. 将培养板放在培养箱内孵育0.5-4小时；
6. 用酶标仪测定在450nm处的吸光度。

注：如果暂时不测定OD值，打算以后测定，可以向每孔中加入10 μ L Stop Solution，并遮盖培养板避光保存在0-5℃条件下，7天内吸光度不会发生变化。

注：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。

注意事项

1. 培养时间根据细胞种类的不同和每孔内细胞数量的多少而异。根据细胞种类而定，需要摸索条件，CCK-8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。对于贴壁细胞，CCK-8的反应时间一般为1-4小时，但在培养30分钟左右即可开始检测。悬浮细胞与贴壁细胞相比较难显色。对于悬浮细胞，在加入CCK-8培养1-4小时后，可先从培养箱中取出，目测染色程度或用酶标仪测定决定。若显色困难，可将培养板放回培养箱，继续培养数小时后再确定。
2. 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等，可以每接种几个孔就混匀一下。
3. 使用96孔板进行检测时，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，为了减少误差，建议培养基的四边每孔改加相同量的培养基、PBS或水，并把96孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。
4. 建议采用多通道移液器，以减小平行孔间的差异。加 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O.D值读数。
5. 加CCK-8试剂时速度要快，以减小平行孔间的差异。为了避免加样时由于CCK-8试剂在枪头上的残留所带来的误差，可以在加样前用培养基稀释CCK-8试剂并混匀后加样。为使CCK-8试剂和培养基充分混匀，建议在加入CCK-8试剂后轻轻振摇培养板。
6. 若细胞培养时间较长，培养基颜色发生变化或pH发生变化，建议更换新鲜的培养基后再加CCK-8试剂。含有酚红的培养基不影响本试剂盒做细胞活性的测定。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题及解决办法

1. 每孔应该接种多少细胞？

贴壁细胞每孔至少需要接种1000个细胞（100 μ L的培养基），检测白细胞时由于它的灵敏度较低，每孔至少需要接种2500个细胞（100 μ L的培养基），建议先做几个孔摸索接种细胞的数量。推荐96孔板每孔最大细胞数为25000，如果要使用24孔板或是6孔板，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。

2. CCK-8对细胞的毒性大小如何？

CCK-8对细胞的毒性相当低，同样的细胞在CCK-8法检测后还可用于其他细胞增殖的检测实验，如结晶紫检测法，中性红检测法或DNA荧光检测法等。

3. CCK-8能否对活细胞进行染色？

不能。因为CCK-8的主要成分是一种水溶性的四唑盐（WST-8），并通过电子载体1-Methoxy PMS将活细胞中的电子交换到培养基中的WST-8上，因为WST-8及其生成的甲臞染料是高度水溶性的，不会进入细胞内，所以CCK-8不能对活细胞进行染色。

4. 如何设定空白对照？

在不含细胞的培养基中加入CCK-8，测定450nm的吸光度即为空白对照。在做加药实验（细胞毒性实验）时，还应考虑药物的吸收，可在不含细胞，加入药物的培养基中加入CCK-8，测定450 nm的吸光度作为空白对照。

5. 哪些物质会影响CCK-8的测定？

当有还原性物质存在时会影响CCK-8的测定，增加OD值；在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生，减小OD值。药物中金属离子的存在可能会影响CCK-8的灵敏度，如终浓度10mM的FeCl₂、CuSO₄等会100%抑制。在有酚红存在的情况下，会增加空白吸收，但不影响测定，扣除空白吸收即可。

6. 在做加药实验时，药物对测定是否有影响？如何解决？

有时会有影响。如果药物具有还原性，就会和CCK-8试剂发生显色反应，增加吸光度。解决办法：首先要确认药物是否有吸收，在含有药物的培养基中加入CCK-8，测定450 nm的吸光度，如果它的吸光度比不含药物的培养基（只加CCK-8）的吸光度高，则证明药物有影响，可在加CCK-8之前更换培养基，去掉药物的影响。

7. 我没有450 nm的滤光片，还可以使用哪些其他的滤光片？

可以使用吸光度在430-490nm之间的滤光片，但是450nm滤光片的检测灵敏度最高。

8. 必须设定参比波长吗？设定的目的是什么？

不一定要设定，CCK-8试剂在参比波长处没有吸光度。设定参比波长的目的是为了去除由于样品浑浊所带来的吸收。如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议设定600 nm（或600 nm以上）作为参比波长，扣除参比波长的OD值即可。

9. 如果OD值太低，可以采取什么办法？

适当增加细胞数量，或延长加入CCK-8试剂后的染色时间。

10. 如何终止CCK-8反应(96孔板)？

在显色反应后，向每孔中加入10 μ L Stop Solution或（10 μ L 0.1 M HCl溶液，或10 μ L 1% (w/v) 的 SDS（十二烷基硫酸钠）溶液）。反应停止后，避光保存，室温下24小时内吸光度不会发生变化，若避光保存在0-5℃条件下，7天内吸光度不会发生变化。

11. CCK-8的保质期有多久？

CCK-8在避光0-5℃的条件下可以存放2年。在常温下可以保存3周左右，颜色应该为浅红色，如果颜色发生改变，则可能会增加空白吸光度。