



Cell Counting Kit (CCK-8)

目录号：CW9101T(100 T)
CW9101M(500 T)

运输与保存：冰袋运输，4℃短期保存，有效期6个月；-20℃长期保存，有效期24个月，
尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW9101T 100 T	CW9101M 500 T
Cell Counting Kit (CCK-8)	1 mL	5 mL

产品简介

CCK-8试剂盒，是一款基于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）的快速、高灵敏度比色检测试剂盒，广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的检测。检测原理为：在电子耦合剂1-Methoxy PMS的存在下，WST-8可被线粒体内的一些脱氢酶还原，生成橙黄色的水溶性甲臃（formazan，参考图1）。甲臃生成的颜色深浅与细胞增殖成正比，与细胞毒性成反比。通过使用酶标仪在450nm波长处测定OD值，可以间接反映活细胞数量。该试剂盒适用于细胞增殖测定、细胞毒性检测、药物筛选以及细胞生长抑制检测等领域。

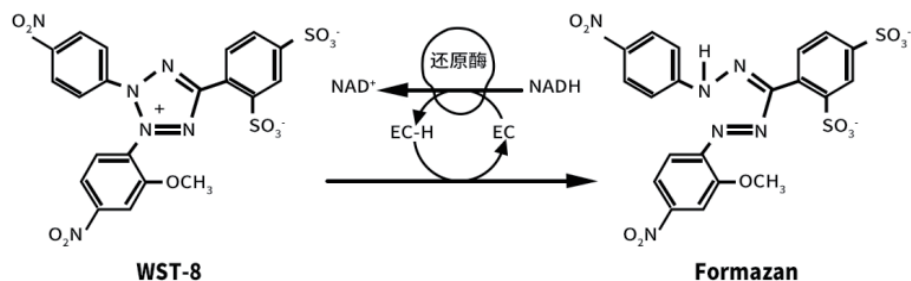


图1: WST-8分子结构和检测原理

使用方法

1. 以96孔板为例，96孔板中每孔接种100 μL 的细胞悬液，在细胞培养箱预培养 24 h。
2. 向每孔加入10 μL 不同浓度的待测物质。如果仅测定细胞活性，则不需要 2-3 步骤，直接从第4步操作。
3. 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间（依据待测药物而定）。
4. 向每孔加入10 μL CCK-8 溶液（注意不要产生气泡，轻轻混匀）。
5. 将培养板在培养箱内孵育适当时间（一般 0.5-2 h）。
6. 酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用，不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 试剂反复冻融会造成测定背景OD值升高。
3. 建议调试合适的接种细胞的数量和加入CCK-8溶液后培养的时间。当使用标准96孔板时，贴壁细胞至少1000个/孔(100 μL 培养基)，白细胞至少2500个/孔(100 μL 培养基)。建议实验前设定几个不同细胞数量的梯度孔进行条件测试，细胞培养时间和处理方法根据实验情况而定，加入CCK-8溶液后（加入体积为每孔细胞培养液体积的 10%），在37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育，不同时间点后测 450 nm 处的吸光值(CCK-8 敏感性高，一些细胞 0.5 h 后就可以测定第一次)。
4. CCK-8试剂盒的检测是基于脱氢酶催化反应的原理。在待检测体系中，若存在较多还原剂（或抗氧化剂），则可能导致背景吸光度（OD）值升高，从而干扰检测结果的准确性。若实验过程中存在还原剂，建议对背景OD值进行仔细检查，并采取措施消除还原剂的干扰。例如，在添加CCK-8溶液前，可更换为新鲜的培养基，以消除待测药物的影响。当待测药物的影响相对较弱时，可不更换培养基，而是直接从培养基中加入待测药物后的空白吸收值中扣除。
5. 在进行药物抑制实验的过程中，若药物成分中包含金属离子，如 Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等，这些金属离子可能会对CCK-8溶液的显色反应产生干扰，进而影响检测的灵敏度。
6. 在细胞培养过程中，若培养时间较长，观察到培养基颜色发生改变，此时应当对细胞进行清洗，并更换新鲜培养基，随后进行CCK-8检测。细胞培养基中的酚红成分不会对CCK-8检测结果产生影响。
7. 为了确保CCK-8试剂盒中的培养基得到充分混合，并降低移液器上CCK-8残留的可能性，建议在加样前，使用培养基对CCK-8试剂进行稀释，并在混合均匀后进行加样操作。
8. 在短期内不进行OD值测定时，建议向各孔中添加0.1M的盐酸（HCl）溶液或1%的十二烷基硫酸钠（SDS）溶液，浓度均为重量体积比。在室温条件下，于避光环境中保存，最长可在24小时后进行检测(加入的1% SDS溶液体积与CCK-8溶液的体积相等)。
9. 如果吸光值很低，可以适当增加细胞数量或者延长加入 CCK-8 溶液后孵育的时间。