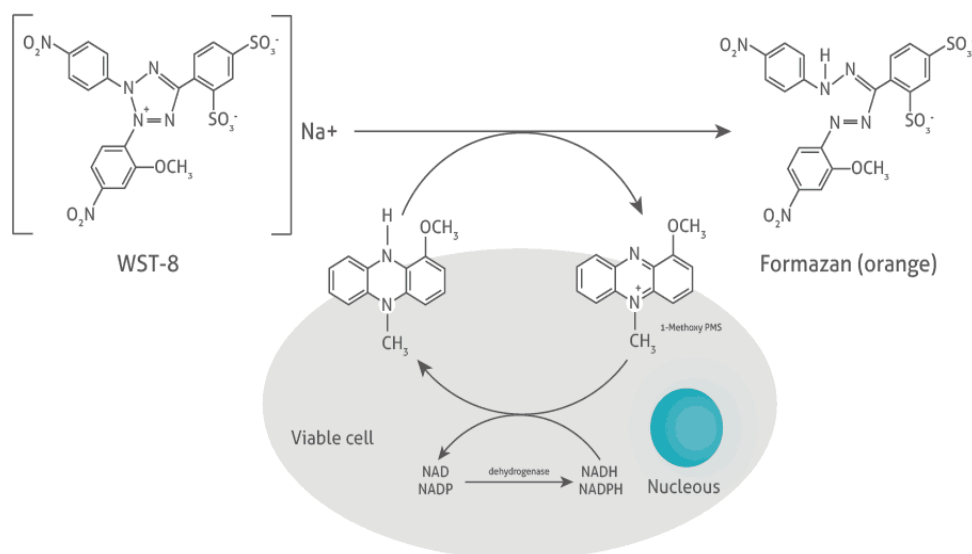


产品介绍

Cell Counting kit-8 简称 CCK8(或 WST-8)试剂盒，是一种基于 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。

WST-8工作原理：在电子耦合试剂存在的情况下，可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臃产物（formazan）。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 450 nm 波长处测定 OD 值，间接反映活细胞数量。



WST-8 是 MTT 的一种升级替代产品，和 MTT 或其它 MTT 类似产品如 XTT、MTS 等相比有明显的优点。首先，MTT 被线粒体内的一些脱氢酶还原生成的 formazan 不是水溶性的，需要有特定的溶解液来溶解；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。其次，WST-8 产生的 formazan 比 XTT 和 MTS 产生的 formazan 相比更易溶解。再次，WST-8 比 XTT 和 MTS 更加稳定，使实验结果更加稳定。另外，WST-8 和 MTT、XTT 等相比线性范围更宽，灵敏度更高。CCK-8 法应用非常广泛，如药物筛选、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。

产品成分

组分	500T	3000T	6000T
cck-8	液体		

包装规格

500T/3000T/6000T

保存条件

4℃避光保存1年有效，-20℃避光保存2年有效。

使用方法

1.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 2-4 h 使细胞贴壁，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，OD值为纵坐标的标准曲线，根据此标准线可以测定未知样品的细胞数量（使用此标准曲线的前提条件是实验条件一致，便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间）。

2.细胞活性检测

- 1) 在 96 孔板中接种细胞悬液（100 μL/孔）。将培养板放在培养箱中预培养（37 °C，5% CO₂）。
- 2) 向每孔加入 10 μL 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 h。
- 4) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

5) 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 uL 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内测定, 吸光度不会发生变化。

3.细胞增殖毒性检测

1) 在 96 孔板中配置 100 uL 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 h (37 °C, 5% CO₂)。

2) 向培养板加入 1-10 uL 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 h)。

4) 向每孔加入 10 uL 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) 将培养板在培养箱内孵育 1-4 h。

6) 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

7) 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 uL 0.1 M 的 HCl 溶液或者 1% w/v SDS 溶液, 并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内测定, 吸光度不会发生变化。

注: 如果待测物质有氧化性或还原性, 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。若药物影响比较小, 可以不更换培养基, 直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。

注意

1.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。

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一致。

3.培养板周围一圈孔培养液容易挥发, 为减少误差, 建议培养板周围的四边每孔只加培养基。

4.建议采用多通道移液器, 减少平行孔间的误差, 加 CCK-8 时, 建议斜贴着培养板壁加, 若插到培养基液面下加, 容易产生气泡, 干扰 OD 值。

5.若细胞培养时间较长, 培养基颜色或 pH 发生变化, 建议更换培养基后再加 CCK-8, 含有酚红的培养基不影响测定。

6.CCK-8 对细胞的毒性非常低, 其他的实验, 例如中性红法或结晶紫法, 也可在 CCK-8 法检测完后继续进行。

7.可以使用大于 600 nm 的波长, 例如 650 nm, 作为参考波长进行双波长测定, CCK-8 在参考波长处没有吸光值, 设定参考波长的目的是为了去除由于样品浑浊所带来的吸收。

8.如果实验中待测物质有氧化还原剂, 在不含细胞的培养基中加入药物, 然后加入 CCK-8 试剂在一定时间内检测, 和不加药物的培养基进行比较 (只加 CCK-8 试剂), 如果 OD 值明显偏高, 则说明有反应。

9.加 CCK-8 试剂时速度要快, 减少试剂在移液器上的残留, 加入 CCK-8 试剂后轻震培养板, 为了避免加样时由于 CCK-8 残留在枪头上所带来的误差, 可以在加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂并混匀后加样。

10.CCK-8 反复冻融会增加背景值, 干扰实验测定。

计算公式:

细胞存活率=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100%

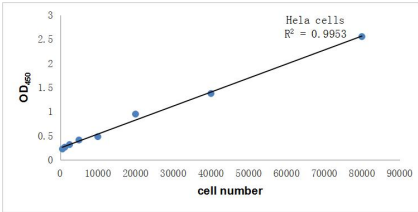
抑制率=[(Ac-As)/(Ac-Ab)]×100%

As:实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、待测物质) 吸光度

Ac:对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有待测物质) 吸光度

Ab:空白孔 (不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8) 吸光度

Validation Data



细胞系: HeLa cell line
培养基: DMEM+10% FBS
培养条件: 37℃, 5% CO2, 加入 CCK-8 试剂 2 h 后 450 nm 读数 R2=0.9953