

产 品 说 明 书

产品名称：Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒

产品货号：BN15201

产品规格：100 T, 500 T, 3000 T, 10000 T, 5×10000 T

储存条件

-20℃避光保存两年有效，4℃避光保存一年有效。

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臞产物 (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 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 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。

使用方法

1. 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)。
2. 向每孔加入 10 μ L CCK 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 μ L 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。

2. 细胞增殖-毒性检测

1. 在 96 孔板中配置 100 μ L 的细胞悬液 (通常细胞增殖实验每孔加入 100 μ L 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100 μ L 5000 个细胞。具体每孔所用的细胞的数目，需根据细胞的大小，细胞增殖速度的快慢等因素决定)。按照实验需要，进行培养 (在 37℃, 5% CO₂ 的条件下) 预培养 24 小时。
2. 向培养板加入 1-10 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 h)。
4. 向每孔加入 10 μ L CCK 溶液 (注意不要再孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数)。
5. 在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时，对于大多数情况孵育 1 小时就可以了。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等实验情况而定，初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 小时分别用酶标仪检测，然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。
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 μ L 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。

注意：如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK 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。当然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药物后的空白吸收即可。

注意事项

由于使用 96 孔板进行检测，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，可以采取弃用周围一圈的办法，改加相同量的 PBS、水或培养液；另一方面，可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

本试剂盒的检测依赖于脱氢酶催化的反应，所以还原剂(例如一些抗氧化剂)会干扰检测，如果待检测体系中存在较多的还原剂，需设法去除。

用酶标仪检测前需确保每个孔内没有气泡，否则会干扰测定。

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，不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。