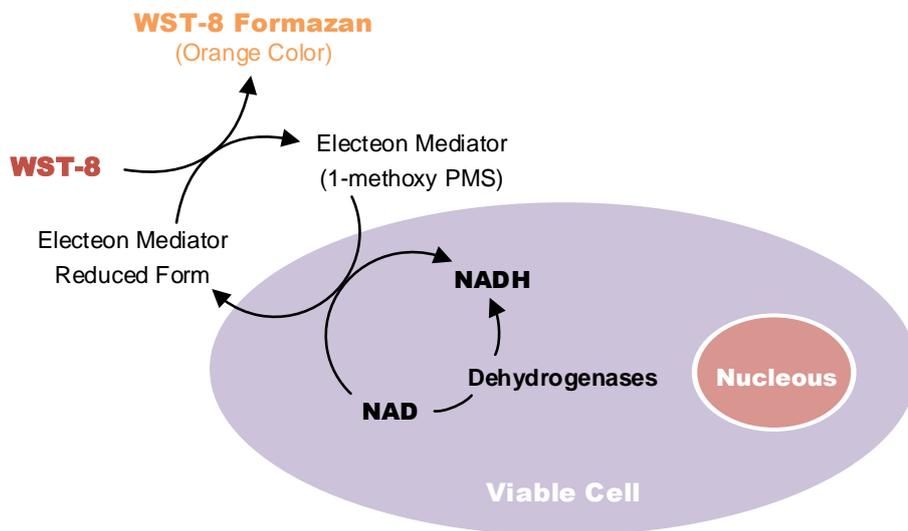




Cell Counting Kit-8



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



Cell Counting Kit-8

一、产品描述:

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 作为 MTT 法的替代方法, 可对细胞增殖和细胞毒性进行快速、高灵敏度、无放射性的比色检测, 广泛应用于抗肿瘤药物筛选、生物活性因子检测、细胞增殖或毒性测定、肿瘤药敏等试验。

CCK-8 试剂无需预配即可直接加入细胞样品中, 试剂中含有 WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], WST-8 在电子耦合试剂 (1-Methoxy PMS) 的作用下被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色 Formazan, 产物数量与活细胞数量呈线性关系, 通过测定 450 nm 处吸光值的变化即可反映活细胞的数量。

二、产品内容

产品编号	规格	试剂规格	储存条件
AKCE001-1	100T	液体 1 mL×1 瓶	4°C避光密封保存, 有效期 1 年 -20°C避光密封保存, 有效期 2 年
AKCE001-2	500T	液体 5 mL×1 瓶	
AKCE001-3	1000T	液体 10 mL×1 瓶	

三、产品使用说明

1. 细胞数量标准曲线的制作

- ①使用细胞计数板计数所制备的细胞悬液中的细胞数量;
- ②使用培养基按比例将细胞悬液等比稀释为 5-7 个细胞浓度梯度, 每组 4-6 个复孔, 然后接种细胞 (注意每孔的细胞数量, 如果您将细胞悬液在管中稀释, 加入培养板前, 请再次小心混匀细胞, 每孔中细胞悬液的体积应该是一致的);
- ③培养 2-4 小时使细胞贴壁, 然后每 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 试剂, 培养一定时间后测定 450 nm 处 OD 值, 以细胞数量为横坐标 (x 轴), OD 值为纵坐标 (y 轴) 制作标准曲线 $y=kx+b$, 根据此标准曲线可以测定样品的细胞数量 (使用此标准曲线的前提是试验条件完全一致, 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 μ L/孔), 置于培养箱中预培养 24 h (37°C, 5% CO₂);
 - ②向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液 (注意不要产生气泡, 气泡会对检测造成影响);
 - ③将培养板置于培养箱内孵育 1-4 小时;
 - ④使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度;
- 若不立刻测定 OD 值: 可以向每孔中加入 10 μ L 0.1 M HCl 或 1% SDS (W/V) 溶液, 并遮盖培养板避光在室温下保存, 在 24 小时内吸光度可保持稳定。

3. 细胞增值/毒性检测

- ①在96孔板中接种细胞悬液（100 μL/孔），置于培养箱中预培养24 h（37°C，5%CO₂）；
 - ②向培养板加入10 μL不同浓度的待测化合物；
 - ③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 μL CCK-8溶液（注意不要产生气泡，气泡会对检测造成影响）；若待测物质具有氧化性或还原性，可在加CCK-8前更换新鲜培养基（除去培养基，并用新鲜培养基洗涤细胞两次，然后加入新的培养基）去除药物影响；
 - ⑤将培养板置于培养箱内孵育1-4小时；
 - ⑥使用酶标仪测定450 nm处吸光度；
- 若不立刻测定OD值：可以向每孔中加入10 μL 0.1 M HCl或1% SDS (W/V)溶液，并遮盖培养板避光在室温下保存，在24小时内吸光度可保持稳定。

4. 结果计算：

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

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

As：实验孔吸光度（含细胞、培养基、CCK-8溶液、待测化合物）

Ac：对照孔吸光度（含细胞、培养基、CCK-8溶液；不含待测化合物）

Ab：空白孔吸光度（含培养基、CCK-8溶液、待测化合物；不含细胞）

四、注意事项：

- ①CCK-8的培养时间一般为1-4小时，需要摸索接种细胞的数量和加入CCK-8试剂后的培养时间，CCK-8的最佳反应时间以具体显色最佳时间为准；
- ②孵育时间因细胞类型和数量而异；白细胞着色较弱，可能需要较长的孵育时间或大量细胞；
- ③当使用标准96孔板时，贴壁细胞的最小接种量为1000个细胞/孔（100 μL培养基）；检测白细胞时的灵敏度相对较低，推荐接种量应不低于2500个细胞/孔（100 μL培养基）；如果要使用24孔板或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；
- ④如果没有450 nm滤光片，可以使用430-490 nm之间的滤光片，但450 nm检测灵敏度最高。如果您需要进行双波长测定，650 nm处的吸光度可作为参考波长进行测定；
- ⑤培养基中的酚红不会影响实验结果，酚红的吸光度可以通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去；
- ⑥本产品可以检测*E.coli*，但不能检测酵母细胞；
- ⑦如果您需要对CCK-8溶液进行无菌处理，请使用0.2 μm滤膜过滤除菌；
- ⑧使用96孔板进行检测时，96孔板外圈孔位易蒸发，如果细胞培养时间较长，可以选择弃用外圈孔位，或改加等量的PBS、水或培养液作为填充液。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedure

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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	560-600 nm	420-480 nm	420-480 nm	430-490 nm
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

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

