



Protein Biotechnologies

CCK-8 Cell Counting Kit

货号：CC201



Protein Biotechnologies

CCK-8 Cell Counting Kit

货号：CC201

## 北京普鲁顿生物科技有限公司 Protein Biotechnology Co., Ltd



Protein Biotechnologies

### Protein Biotechnology Co., Ltd

免费咨询热线：400-999-4431

网站：www.proteinbiotechnology.com

销售：sales@proteinbiotechnology.com

市场：admin@proteinbiotechnology.com

技术：support@proteinbiotechnology.com

- CCK-8 Cell Counting Kit
- 目录号 CC201
- 使用手册
- 实验室使用, 仅用于体外



Protein Biotechnologies

## CCK-8 Cell Counting Kit

货号：CC201

### 产品简介

CCK-8 Cell Counting Kit 基于 WST-8, 广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测。WST-8 与 MTT 类似, 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan。对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目在一定范围内呈线性关系。试剂盒内仅有一管即用型的 CCK-8 溶液, 只需加入细胞上清中孵育后即可进行检测, 适用于大批量样品的检测。CCK-8 溶液对细胞无明显毒性。加入显色后, 可以在不同时间反复用酶标仪读板, 使检测时间更加灵活, 便于绘制生长曲线。

### 产品应用

用于细胞增殖、细胞毒性检测。

### 产品优点

- 检测灵敏度高
- 直接检测, 省略了繁琐的重溶解步骤
- 细胞毒性小, 加入后可进行连续检测

### 试剂盒组分及储存

组份	CC201-01 500T	CC201-02 1000T
CCK-8 reagent solution	5ml	5ml×2

**Product Use:** For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

### 产品储存

4°C避光保存一年有效。长期不用放-20°C 避光保存二年有效。

### 自备材料

1. 10  $\mu$ l、100-200  $\mu$ l 以及多通道移液器
2. 带有 450 nm 滤光片的酶标仪
3. 96 孔培养板
4. CO<sub>2</sub> 培养箱



Protein Biotechnologies

## CCK-8 Cell Counting Kit

货号：CC201

### 注意事项

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等，可以每接种几个孔就混匀一下。培养板周围一圈孔培养基容易挥发，为了减少误差，建议培养板的四边每孔只加培养基，而不作为指标检测孔。
3. 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。一般情况下，白细胞较难显色，因此需要较长的 CCK- 8 反应时间或增加细胞数量 ( $\sim 10^5$  个细胞/孔)。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。对于贴壁细胞，CCK- 8 的培养时间一般为 1- 4 小时，但在培养 30 分钟左右即可取出肉眼观察显色程度 (根据细胞种类而定，需要摸索一下条件)。注意：CCK - 8 的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。
4. 有条件的情况下建议采用多通道移液器，可以减少平行孔间的差异。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，减少试剂在移液器上的残留。为使 CCK- 8 试剂和培养基充分混匀，建议在加入 CCK- 8 试剂后轻轻振荡培养板。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。
6. CCK- 8 试剂中的 WST- 8 会与还原剂反应生成 WST- 8 甲臜，如果实验中有还原剂，请检查背景的 O.D 值，即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 O.D 值明显偏高，则说明有反应。
7. 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。
8. 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 O.D 值即可。
9. CCK- 8 试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深，O.D 值不断增加(注：活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。另外，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。
10. 如果要测定细胞的具体数量，建议先做一个标准曲线 (具体方法参见 P.3 页的“制作标准曲线”)。

**实验步骤 (实验前请先阅读注意事项)**
**一、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% CO<sub>2</sub>)。
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 小时。
4. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
5. 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μL 0.1M 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 小时内测定, 吸光度不会发生变化。

**二、细胞增殖、毒性检测**

1. 在 96 孔板中配置 100 μL 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。
2. 向培养板加入 10 μL 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 μL CCK-8 溶液 (注意不要再孔中生成气泡, 它们会影响 OD 值的读数)。
5. 将培养板在培养箱内孵育 1-4 小时。
6. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。
7. 若暂时不测定 OD 值, 可以向每孔中加入 10 μL 0.1M 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 小时内测定, 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-8 溶液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。**

**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 (例如: 1/2 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 小时使细胞贴壁, 然后加 CCK-8 试剂培养一定时间后测定 O.D 值, 制作出一条以细胞数量为横坐标 (X 轴), O.D 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实验的条件要一致, 便于确定细胞的接种数量以及加入 CCK-8 后的培养时间)。

计算公式:

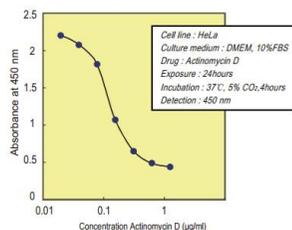
$$\text{细胞存活率} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

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

As: 实验孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质)

Ac: 对照孔 (含有细胞的培养基、CCK-8、没有毒性物质)

Ab: 空白孔 (不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-8)



图例: 细胞毒性试验 (Actinomycin D)

**常见问题与解决方案**

常见问题	解决方案
每孔应该接种多少细胞?	贴壁细胞每孔至少需要接种 1,000 个细胞 (100 μl 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 2,500 个细胞 (100 μl 的培养基), 建议先做几个孔摸索接种细胞的数量。如果要使用 24 孔板或是 6 孔板实验, 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。
如何设定空白对照?	在不含细胞的培养基中加入 CCK-8, 测定 450 nm 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。
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 O.D 值; 在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生, 减小 O.D 值; 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。
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 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。
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。
CCK-8 的保质期有多久?	CCK-8 在避光 4°C 的条件下可以存放 1 年, 在 -20°C 下避光可以保存 2 年。如果需要长期保存, 我们推荐在 -20°C 储藏。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。
没有 450 nm 的滤光片, 还可以使用哪些其他的滤光片?	您可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片, 但是 450 nm 滤光片的检测灵敏度最高。
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。
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 O.D 值太低, 可以采取什么办法?	可以采取办法: 适当增加细胞数量或延长加入 CCK-8 试剂后的染色时间。