

## Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖与活性检测试剂盒

### 产品介绍

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 细胞活性检测试剂盒是一种广泛应用于细胞增殖和细胞毒性相关实验的快速、高灵敏度检测试剂盒。其主要成分为水溶性四唑盐 WST-8 [化学名：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸基苯)-2H-四唑单钠盐]。在电子耦合试剂1-甲氧基吩嗪硫酸甲酯 (1-Methoxy PMS) 存在下，WST-8 可被活细胞线粒体脱氢酶还原为橙黄色水溶性的甲臞 (formazan)。WST-8 被细胞内脱氢酶还原后生成的甲臞能够直接溶解在培养基中。活细胞的数目越多，则颜色越深。对于同样的细胞，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

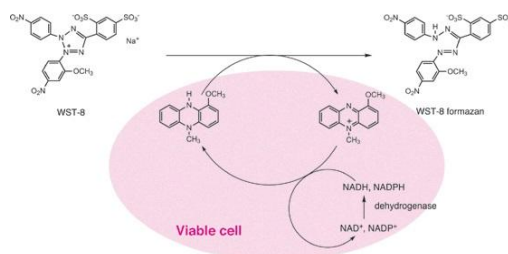


图 WST-8 分子结构式及其检测原理

### 保存

CCK-8 溶液在避光、2-8°C 的条件下可以保存1年，如长期不用可在-20°C下避光保存2年。

### 操作步骤

#### 1. 接种细胞

在96孔板中每孔加入100 μL细胞悬液。外围一圈可加PBS、培养基或无菌水以减少蒸发。铺板期间注意混匀悬液，防止细胞沉淀导致孔间不均一。

#### 2. 预培养

将96孔板置于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中预培养，使细胞贴壁并恢复生长状态。

#### 3. 加入CCK-8试剂

每孔加入10 μL CCK-8溶液。加样时斜贴孔壁，避免插入液面下产生气泡。加完后轻晃培养板数次，使试剂与培养基充分混匀。

#### 5. 孵育

在培养箱中继续孵育1-4小时。具体时间需根据细胞类型和细胞数量通过预实验确定（参考值：增殖实验约2000 cells/孔，毒性实验约5000 cells/孔）。

#### 6. 测定吸光度

使用酶标仪测定450 nm处的OD值。若无450 nm滤光片，可用420-480 nm波长替代。对于高浑浊度样品，建议以600 nm或更长波长为参考波长进行双波长测定。

#### 6. 终止反应（可选）

如需延迟测定，每孔加入10 μL 0.1 M HCl或1% SDS溶液，避光室温保存，24小时内吸光度稳定。

### 注意事项

1. 防蒸发：细胞培养时间较长时，注意蒸发问题。外围孔不纳入实验，并尽量将培养板靠近培养箱水盘。

2. 预实验：正式实验前建议预实验确定最佳铺板密度和CCK-8孵育时间。

3. 加样技巧：加入CCK-8时速度要快，减少残留；避免气泡，否则影响OD读数。

4. 干扰因素：若样品中含有还原剂，可能干扰检测，需通过预实验评估是否去除。

5. 培养基状态：若长期培养后培养基颜色或pH发生变化，建议更换新鲜培养基后再加CCK-8。

6. 无菌操作：试剂为无菌灌装，操作应在超净台内进行，防止污染。

7. 安全提示：操作时请穿着实验服，佩戴一次性手套或乳胶手套。