Cell Counting Kit（CCK 试剂盒）

产品简介：

Cell Counting Kit 简称 CCK 试剂盒，为 MTT 法的替代方法，是一种基于 WST（水溶性四唑盐，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。

操作说明：

一、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（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 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（X 轴），OD 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（试用此标准曲线的前提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 后的培养时间。）

二、细胞活性检测

1、在 96 孔板中接种细胞悬液（100μL/孔）。将培养板放在培养箱中预培养 24 小时（在 37℃,5% CO_2 的条件下）。

2、向每孔加入 10 μL 的 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 小时。

4、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

5、 如果暂时不测定 OD 值，打算以后测定的话，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。在 24 小时内吸光度不会发生变化。

三、细胞增殖-毒性检测

1、在 96 孔板中配制 100μL 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 小时（在 37℃，5% CO_2 的条件下）。

2、向培养板加入 10μL 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 10μL CCK 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 小时。

6、用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

7、 如果暂时不测定 OD 值，打算以后测定的话，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。在 24 小时内吸光度不会

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。

备　注：

①建议先做几个孔摸索接种细胞的数量和加入 CCK 试剂后的培养时间。

②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。加入 CCK 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 OD 值读数。

③白细胞可能需要培养较长时间。

④当使用标准 96 孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为 1,000 个/孔 (100 µL 培养基)。检测白细胞时的灵敏度相对较低，因此推荐接种量不低于 2,500 个/孔 (100 µL 培养基)。如果要使用 24 孔板或 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 溶液。

⑤如果没有 450nm 的滤光片，可以使用吸光度在 430-490 nm 之间的滤光片，但是 450nm 滤光片的检测灵敏度最高。

⑥培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去，因此不会对检测造成影响。

活力计算：

1.细胞活力*（%）=[A(加药)-A（空白）]/[A（0 加药）-A（空白）] ×100

A（加药）：具有细胞、CCK 溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度

*细胞活力：细胞增殖活力或细胞毒性活力

2.能否用 384 孔板进行试验？

可以。向各孔中加入培养基体积 10%的 CCK-8 溶液，如果加入的 CCK-8 体积太少，可以先将 CCK-8 溶液稀释 1 倍，然后加入培养基体积 20%的量。

3.能否用 24 孔板进行试验？

可以。向各孔中加入培养基体积 10%的 CCK-8 溶液。

4.酚红会影响检测吗？

不会。培养基中酚红的吸光度可以在计算时，通过扣除空白孔中本底的吸光度而消去，因此不会对检测造成影响。

5.CCK-8 与胸苷结合检测之间是否有相关性？

有。然而，请注意由于 CCK-8 使用的检测原理与胸苷检测的不同，因此结果可能不同。

6.CCK-8 能否检测细菌细胞？

可以检测 E.coli，但不能检测酵母细胞。向 100 µl E.coli 培养液中加入 10 µl CCK-8 溶液，并

培养 1-4 个小时或过夜。

7.CCK-8 稳定吗？

CCK-8 在 0-5℃下能够保存至少 6 个月，在-20℃下避光可以保存 1 年。如果需要长期保存，我们推荐-20℃的储藏条件。

8.如果没有 450 nm 的滤光片，还可以使用哪些其他滤光片？

还可使用 450 nm 到 490 nm 之间的滤光片。

9.如何减少由于 CCK-8 试剂在枪头上或孔壁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。

10.CCK-8 是什么颜色？

应该是粉红色。若颜色不一样，有可能会影响测定。

11.CCK8 能否对活细胞进行染色？

不能。因为 CCK8 的主要成分是一种水溶性的四唑盐 (WST8)，并通过电子载体 1Methoxy PMS 将活细胞中的电子交换到培养基中的 WST8 上。由于生成的甲ā也是高度水溶性的，因此 CCK8 不能对细胞进行染色。

12.CCK8 检测溶液对细胞是否有毒？

CCK8 溶液自身因为高浓度的 1Methoxy PMS 的存在而具有一点毒性。但是，加到培养基中的 CCK8 是没有毒性的，因为被稀释了 10 倍。因此，长时间的培养，如过夜或者培养数天是可以的。同一个细胞培养液在 CCK8 检测后还可以用于其他细胞增殖检测，如结晶紫检测，中性红检测或者 DNA 荧光检测等。由于每种细胞对于 CCK8 的耐受力都不同，因此在需要进行长时间培养时，先检测一下细胞在加入 CCK8 培养后的活力。

13.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，会和 CCK8 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入 CCK8，测定 450 nm 的吸光度，如果它的吸光度比不含药物的培养基 (加 CCK8)的吸光度高，则证明药物有影响，可在加 CCK8 之前更换培养基，去掉药物的影响。

14.每次测定的数值不一样，是什么原因？如何解决？

可能会有以下几个原因： 1. 当在培养箱内培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，由于体积不准确而增加误差。 一般情况下，最外一圈的孔只加培养基，不作为测定孔用。 2. 有可能会因为 CCK8 沾在壁上而产生误差，建议在加入 CCK8 后，轻轻敲击培养板以帮助混匀。 3. 每孔的细胞数量过多或过少。请预先在 1,000100,000 个/孔范围内摸索条件。

15.如何设定空白对照？

在不含细胞的培养基中加入 CCK8，培养一定的时间，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 CCK8，培养一定的时间，测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。

16.哪些物质会影响 CCK8 的测定？

当有还原性物质存在时会影响 CCK8 的测定，例如含有维生素 C 的 Glucose 等 (一般培养基中的量不多，酚红或血清不影响测定)。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。

17.在实验中吸光度值太高，如果不能减少细胞数量，如何解决？

可以缩短加入 CCK8 后的培养时间。例如：可以把加入 CCK8 试剂后的培养时间由 2 小时缩短为 1 小时。

18.设定参比波长的目的是什么？必须设定吗？

不一定要设定。CCK-8 试剂在参比波长没有吸光度。设定参比波长的目的是为了取出由于样品混浊所带来的吸收。

19.说明书上仅写了 96 孔板的测定方法，如果使用 24 孔板货 12 孔板，应该加多少量 CCK-8 试剂？…

一般情况下建议加入 CCK-8 试剂的量是培养基体积的 1/10。

20.在 CCK-8 显色过程中，如何终止反应？

有一下几种方法（96 孔板）： 1、 在显色反应后，将培养板仿佛 4℃冰箱内。 2、 每孔加 10 μl 0.1 M HCL 溶液。 3、 每孔加 10 μl 1%（w/v）的 SDS（十二烷基硫酸钠）溶液。注意：反应停止后，应在 24 小时之内测定。

21.必须预培养细胞吗？

不一定。如果要向保持细胞的最好状态，建议预培养细胞。如果不做细胞预培养，细胞内的脱氢酶可能会不稳定。也有人不做细胞预培养，但在做标准曲线和检测时需要统一检测条件。

22.如果加入的药物中含有金属，是否会有影响？

金属对 CCK-8 显色有影响。当终浓度为 1 Mm 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90%的显色反应，使灵敏度降级。如果终浓度是 10 Mm 的话，将会 100%抑制。

23.CCK-8 试剂的保存条件？

在避光条件下 CCK-8 试剂在 4℃可保存一年。如果需要保存较长时间的话，推荐在-20℃下保存。但是 CCK-8 若反复解冻和冰冻将会增加空白吸收，从而影响检测结果，若经常使用可将试剂存放在 4℃冰箱内保存。

24.预培养后，更换培养基需要细胞计数吗？

一般情况下用胰蛋白酶处理对数增长期的细胞，用血球计数盘计数，制备成一定浓度的细胞悬液即可。如果想要精密计数细胞的话，可以预培养后取培养基用血球计数盘进行计数。

25.CCK-8 对于不同的细胞，灵敏度是否一样？

不一样，悬浮细胞与贴壁细胞相比较难染色。对于贴壁细胞，一般加入 CCK-8 培养 1-4 小时吸光度已经很高，但对于悬浮细胞则可能吸光度较低，可以通过延长 CCK-8 的加入时间或增加细胞数量来解决。

26.悬浮细胞和贴壁细胞在数量上有何区别？

悬浮细胞由于染色比较困那，一般需要增加细胞数量和延长培养时间。贴壁细胞染色比较容易，若细胞数量过大，有时吸光度会超过酶标仪的读数。

27.应该每次做标准曲线吗？

建议每次做。虽然细胞是一样的，但是细胞的状态不一定一样，对于状态不一样的细胞，建议每次做标准曲线。如果试剂的批号不一样，灵敏度可能会有轻微的差异，对于不同的批号建议分别做标准曲线。

28.有时在药物作用情况下，细胞已经死亡，但是脱氢酶的活性还在，是否能计算细胞数

量？…

不能。由于 CCK-8 是通过和细胞内的脱氢酶进行反应间接反映活细胞数量，如果细胞已经死亡，但脱氢酶的活性还在，则试剂测定的细胞数量将会比真实值高，不能真实反映活细胞数量，建议采用别的方法测定。

29.实验之前，是否需要先检测一下培养基和 CCK-8 是否会反应？

建议使用一个孔作一下检测，因为有培养基中可能含有氧化还原反应的物质，在正式实验之前有必要先确认培养基和 CCK-8 是否反应。一般正常在的 OD 值应该在 0.4 以下。

保存条件：

4℃干燥避光保存，有效期一年。-20℃保存二年。