**CCK-8试剂盒说明书**

**产品简介：**

CCK-8（Cell Counting Kit-8）试剂检测细胞活力，可用于细胞增殖和毒性分析，方法简便而准确。其基本原理为：该试剂中的WST-8与MTT类似，在电子载体1-甲氧基PMS的作用下，被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色甲臜染料（Formazan），甲臜的生成量与活细胞的数量和活力成正比，因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析。

**操作步骤：**

1、使用96孔板，细胞培养和处理完毕。

2、每100μl细胞培养液加入CCK-8试剂10μl。

3、培养板放回培养箱，37℃孵育1~4小时。

4、于450nm处测定OD值。

5、结果分析将各测试孔的OD值减去对照孔或调零孔OD值。各平行孔的OD值取平均数。

细胞活力％=（加药细胞OD-空白OD）/(对照细胞OD-空白OD)×100％

6、若使用96孔外的培养板，试剂用量等比例增减。

**注意事项：**

1、首次使用时，建议先做几个孔摸索条件，考察接种细胞的数量和加入CCK-8试剂后的培养时间。

2、加入试剂速度要快，以避免试剂残留和加样速度不一所致反应时间不同造成的显色误差。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。为避免枪头上的残留所带来的加样误差，CCK-8试剂可在加样前用培养基稀释混匀。

3、试剂加入后轻轻振摇培养板，使CCK-8试剂与培养基充分混匀。

4、试剂加入后培养时间根据细胞种类的不同和每孔细胞数量的多少而异。对于贴壁细胞，加入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）。与贴壁细胞相比，悬浮细胞较难显色。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。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（~105个细胞/孔）。若显色困难，可以将培养板放回培养箱，继续培养数小时后再确定；注意：CCK-8的最佳反应时间以具体显色的最佳时间为准。

5、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，需要检查背景的OD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OD值明显偏高，则说明有反应。

6、若细胞培养时间较长导致培养基颜色或pH发生变化，建议更换新鲜培养基后再加入CCK-8试剂。含有酚红的培养基不影响本试剂使用。

7、如果样品为高浑浊度的细胞悬液，建议设定600nm（或600nm以上）作为参比波长，扣除参比波长的OD值即可。

8、如果要测定细胞的具体数量，需要先做一个标准曲线。

9、若测得OD值过高，可酌减铺板细胞数或CCK-8试剂用量。

**试剂的优点：**

**1、结果准确，重现性好** 试剂不影响细胞活力，显色产物直接溶解于培养液，直接测定OD值即可， 可准确反应细胞活力。

**2、操作省时简单** 试剂即开即用，无需配制；只需一步操作，即可测定。

**3、安全性好** 不含放射性同位素和有害有机溶剂，使用安全。

**4、灵敏度高** 灵敏度高于MTT、XTT和MTS等方法。

**贮藏条件：**

在避光0-5℃的条件下存放一年，测定效果完全不变。在-20℃的条件下可以贮存更久。反复冻融会增加背景值，经常使用时请于0~5℃条件下保存。

**本产品仅供科研使用，不做其它用途。**