

## S6 HiPer Cell Counting Kit CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒说明书

产品名称	单位	货号
S6 HiPer Cell Counting Kit CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒	5ml	S6128-01
S6 HiPer Cell Counting Kit CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒	10ml	S6128-02

**【储存条件】** 4℃避光保存（保质期1年），或-20℃避光保存（保质期2年）。避免反复冻融

### 【产品概述】

CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 是一种基于WST (水溶性四唑盐, 一种类似于MTT的化合物) 的细胞增殖与活性检测试剂盒, 是用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。在电子耦合试剂存在的情况下, WST被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臞染料 (formazan), 甲臞染料直接溶解在培养基中。细胞增殖越多越快, 则培养基的颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅。对于同样的细胞, 生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

### 【CCK-8法与MTT法的比较】

	CCK-8法	MTT法
1	还原后的甲臞是水溶性的 (不需要溶解)	还原后的甲臞是非水溶性的 (需要加有机溶剂溶解)
2	重现性好	重现性差
3	操作简单	操作繁琐
4	测定波长: 450-490nm	测定波长: 550-600nm
5	单一溶液, 即开即用	需要加有机溶剂, 有毒性

### 【用途】

用于生物活性因子的活性检测、抗肿瘤药物的筛选、细胞增殖的测定、细胞毒性检测以及药敏等与细胞活性和增殖相关的实验。本试剂盒使用方便, 试剂盒包含一管已经配制好的含有水溶性四唑的CCK-8溶液, 即开即用, 无需其他准备步骤。检测过程也无需采用额外的步骤去溶解甲臞, 可直接使用96孔板或者384孔板在酶标仪上检测, 适合大规模, 高通量的样品检测。

### 【使用方法】

#### 一、制作标准曲线 (测定细胞具体数量时)

- 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。
- 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。
- 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OD值, 制作出一条以细胞数量为横坐标, OD值为纵坐标的标准曲线。根据此标准曲线可以测定出未知样品的细胞数量 (适用此标准曲线的前提是实验的条件要一致, 尤其加入CCK-8后的培养时间要一致)。

#### 二、细胞活性检测

- 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 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)。
- 向每孔加入10μl的CCK-8溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 以免影响OD的读数)。
- 将培养板在培养箱内孵育1-4小时。
- 用酶标仪测定450nm处的吸光度。
- 如果暂时不测定OD值, 可以向每孔中加入10μl的0.1M的HCl溶液或1% w/v SDS溶液, 并遮盖培养板避光室温保存, 24小时内吸光度不会发生变化。

#### 三、细胞增殖-毒性检测 (以96孔板为例)

- 在96孔板中配置100μl的细胞悬液 (通常细胞增殖实验每孔加入100μl约2000个细胞, 细胞毒性实验每孔加入100μl约5000个细胞。具体每孔所用的细胞的数目, 需根据细胞的大小、细胞增殖速度的快慢等因素决定)。按照实验需要, 进行预培养。
- 向培养板加入1-10μl不同浓度的待测药物刺激。
- 将培养板在培养箱孵育一段适当的时间 (后面有具体细胞的建议时间, 例如: 6、12、24或48小时)。
- 每孔加入10μl的CCK-8溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 以免影响OD读数)。如果起始的培养体积为200μl, 则需加入20μl CCK-8溶液, 其他情况以此类推。可以用加了相应量细胞培养液和CCK-8溶液但没有加入细胞的孔作空白对照。如果担心所使用的药物会干扰检测, 需设置加了相应量细胞培养液、药物和CCK-8溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。

5. 在细胞培养箱内继续孵育1-4小时（对于大多数情况孵育1小时就可以）。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等情况而定，初次实验时可以在0.5、1、2 和4小时分别用酶标仪检测，然后选取吸光度范围比较适宜的一个时间点用于后续实验。
6. 用酶标仪测定在450nm处的吸光度。可以使用大于600nm的波长，例如650nm，作为参考波长进行双波长测定。
7. 如果暂时不测定OD值，可以向每孔中加入10 $\mu$ l 0.1M的HCl溶液或者1% w/v SDS溶液，并遮盖培养板避光室温保存，24小时内吸光度不会发生变化。

注意：如果待测物质有氧化或还原特性，可在加CCK-8之前更换新鲜培养基（先用培养基洗涤细胞两次），去掉药物影响。如果药物影响比较小，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。

### 【活力计算】

$$\text{细胞活力} * (\%) = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})} \times 100$$

A（加药）：具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液的孔的吸光度

A（空白）：具有培养基和CCK-8溶液而没有细胞的孔的吸光度

A（0 加药）：具有细胞、CCK-8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

### 【注意事项】

1. 由于使用96孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，一定要注意蒸发的问题。一方面，由于96孔板周围一圈最容易蒸发，可以采取弃用周围一圈的办法，改加PBS，水或培养液；另一方面，可以把96孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。
2. CCK-8检测细胞活性的原理是通过检测活细胞脱氢酶催化的反应。任何待测体系中存在还原剂，例如一些抗氧化剂会干扰检测，需设法去除。
3. 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。
4. 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样，溶液产生气泡，会干扰OD读数。
5. 当使用标准96孔板时，贴壁细胞的最小接种量至少为1000个/孔（100 $\mu$ l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2500个/孔（100 $\mu$ l培养基），且培养时间长一些。如果要使用24孔板或6孔板实验，需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。
6. 加入CCK-8溶液时，如果细胞培养时间较长，培养基颜色已变化或pH值变化，建议换用新鲜的培养基。
7. 如果没有450nm的滤光片，可以使用吸光度在450-490nm之间的滤光片，但是450nm滤光片的检测灵敏度最高。
8. 酚红和血清对本试剂盒的测定无明显影响。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。
9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 【细胞增殖分析】

方法	备注
制备细胞悬液	1. 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时，不需要贴壁的话，可以省去这个步骤。 2. 由于每孔加入的 CCK-8 量比较少，有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。 3. 细胞的种类不一样，形成的甲臞的量也不一样。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的甲臞很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。 4. 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。 5. 建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm，参比波长 600-650nm。
↓	
接种到 96 孔培养板	
↓	
37℃ 培养（注 1）	
↓	
加入 10 $\mu$ l 的 CCK-8（注 2）	
↓	
培养 1-4s（注 3、注 4）	
↓	
测定 450nm 吸光度（注 5）	

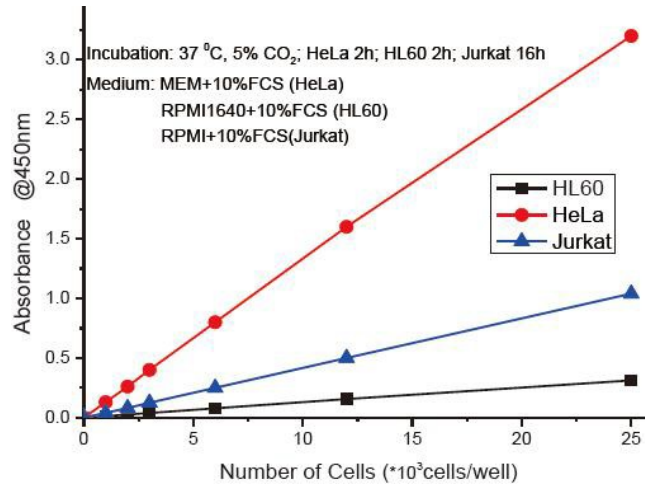


图1 细胞数目和吸光度的相关曲线

**【细胞毒性分析】**

方法	备注
制备细胞悬液	1. 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时，不需要贴壁的话，可以省去这个步骤。 2. 加入毒性物质的培养时间，要看毒性物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的周期。 3. 由于每孔加入的 CCK-8 量比较少，有可能会因试剂沾在孔壁上而带来误差，建议在加完试剂后轻轻敲击培养板以帮助混匀。 4. 细胞的种类不一样，形成的甲臞的量也不一样。如果显色不够的话，可以继续培养，以确认最佳条件。特别是血液细胞形成的甲臞很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。 5. 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。 6. 建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm，参比波长 600-650nm。
↓	
接种到 96 孔培养板	
↓	
37°C 培养 (注 1)	
↓	
加入不同浓度的毒性物质 (注 2)	
↓	
加入 10μl 的 CCK-8 (注 3)	
↓	
培养 1-4 小时 (注 4、注 5)	
↓	
测定 450nm 吸光度 (注 6)	

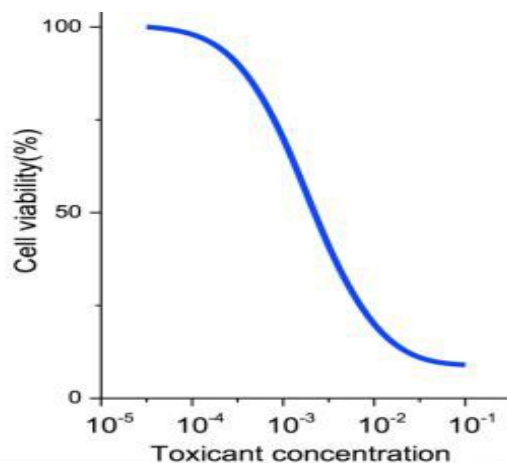


图2 细胞毒性曲线

**IC50的计算方法**

按照以下公式计算细胞存活率，绘制成图表，细胞存活率50%的值即为IC50%

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

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, 无毒性物质)

Ab: 空白孔 (含有培养基、毒性物质、CCK-8, 无细胞)

## Cell Counting Kit-8

### INTRODUCTION:

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) utilizes the highly water-soluble tetrazolium salt [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] to produce a water-soluble formazan dye upon reduction in the presence of an electron carrier.

Cell Counting Kit-8 is a one-bottle solution; no premixing of components is required. Cell Counting Kit-8, being nonradioactive, allows sensitive colorimetric assays for the determination of the number of viable cells in cell proliferation and cytotoxicity assays. CCK is reduced by dehydrogenases in cells to give a yellow colored product (formazan), which is soluble in the tissue culture medium. The amount of the formazan dye generated by the activity of dehydrogenases in cells is directly proportional to the number of living cells. The detection sensitivity of CCK-8 is higher than other tetrazolium salts such as MTT, XTT, MTS or WST-1.

### ADVANTAGES:

- -One-bottle, ready-to-use solution
- No organic solvents or isotopes required
- No harvesting, no washing and no solubilization steps
- More sensitive than MTT, XTT, MTS or WST-1
- -Low toxicity.

### STORAGE:

CCK-8 is stable for 2 years at -20 °C, 1 year at 4 °C and 6 months at room temperature with protection from light. Repeated thawing and freezing causes an increase in the background, which interferes with the assay. To avoid repeated thawing and freezing, keep the kit at 4 °C if it is frequently used.

### PROTOCOL:

#### 1. Cell Proliferation Assay:

- 1) Inoculate cell suspension (100 $\mu$ L /well) in a 96-well plate. Also prepare wells that contain known numbers of viable cells (to create a calibration curve in step 5). Pre-incubate the plate in a humidified incubator (e.g., at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).
- 2) Thaw the CCK-8 on the bench top or in a water bath at 37 °C if it is frozen. It takes about 30 minutes on the bench top at 25 °C or 5 minutes in a water bath at 37 °C.
- 3) Add 10 $\mu$ L of the CCK-8 solution to each well of the plate. Be careful not to introduce bubbles to the wells, since they interfere with the O.D. reading.
- 4) Incubate the plate for 1-4 hours in the incubator.
- 5) Measure the absorbance at 450 nm using a microplate reader. Prepare a calibration curve using the data obtained from the wells that contain known numbers of viable cells. To measure the absorbance later, add 10 $\mu$ L of 1% w/v SDS to each well, cover the plate and store it with protection from light at room temperature. No absorbance change should be observed for 48 hours.

#### 2. Cytotoxicity Assay

- 1) Dispense 100  $\mu$ l of cell suspension (5000 cells/ well) in a 96-well plate.
- 2) Pre-incubate the plate for 24 hours in a humidified incubator (e.g., at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).
- 3) Add 10  $\mu$ L of various concentrations of toxicant into the culture media in the plate.
- 4) Incubate the plate for an appropriate length of time (e.g., 6, 12, 24 or 48 hours) in the incubator.
- 5) Thaw the CCK-8 on the bench top or in a water bath at 37 °C if it is frozen. It takes about 30 minutes on the bench top at 25 °C or 5 minutes in the water bath at 37 °C.
- 6) Add 10 $\mu$ L of CCK-8 solution to each well of the plate. Be careful not to introduce bubbles to the wells, since they interfere with the O.D. reading.
- 7) Incubate the plate for 1-4 hours in the incubator. Measure the absorbance at 450 nm using a microplate reader. To measure the absorbance later, add 10 $\mu$ L of 1% w/v SDS to each well, cover the plate and store it with protection from light at room temperature. No absorbance change should be observed for 48 hours.

### TIPS:

1. Since the CCK-8 assay is based on the dehydrogenase activity detection in viable cells, conditions or chemicals that affect dehydrogenase activity in viable cells may cause discrepancy between the actual viable cell number and the cell number determined using the CCK-8 assay.
2. CCK may react with reducing agents to generate CCK formazan. Please check the background O.D. if reducing agents are used in cytotoxicity assays or cell proliferation assays.
3. Be careful not to introduce bubbles to the wells, since they interfere with the O.D. reading.

4. Phenol red containing culture media can be used with this kit for cell viability assays.
5. Membrane filtration is recommended for the sterilization of the CCK-8 solution, if necessary.
6. The incubation time varies by the type and number of cells in a well. Generally, leukocytes give weak coloration, thus a long incubation time (up to 4 hours) or a large number of cells (~10<sup>5</sup> cells/well) may be necessary.
7. Since the cytotoxicity of this kit is very low, further color development is possible after reading the absorbance.
8. Neutral red or crystal violet can be used after the CCK-8 assay.
9. Measure the reference wavelength at 600 nm or higher if there is a high turbidity in the cell suspension.

#### Q&A:

##### 1. How many cells should there be in a well?

For adhesive cells, at least 1000 cells are necessary per well (100  $\mu$ l medium) when using the kit's standard 96-well plate. For leukocytes, at least 2500 cells are necessary per well (100  $\mu$ l medium) because of low sensitivity. The recommended maximum number of cells per well for the 96-well plate is 25000. If a 24-well or 6-well plate is used for this assay, please calculate the number of cells per well accordingly, and adjust the volume of the CCK-8 solution in a well to 10% of the total volume.

##### 2. Does CCK-8 stain viable cells?

No, it does not stain viable cells because the water-soluble tetrazolium salt is used in the CCK-8 solution. The electron mediator, 1-Methoxy PMS, receives electrons from a viable cell and transfers the electron to CCK-8 in the culture medium. Since its formazan dye is also highly water-soluble, CCK-8 cannot be utilized for cell staining purpose.

##### 3. How stable is CCK-8?

CCK-8 is stable for 2 years at -20  $^{\circ}$ C, 1 year at 4  $^{\circ}$ C, and 6 months at room temperature. CCK-8 is stable over 2 days even at 60 $^{\circ}$ C as long as the CCK-8 solution keeps its original red color and does not turn orange.

##### 4. Does phenol red affect the assay?

No. The absorption value of phenol red in a culture medium can be removed by subtracting the absorption value of a blank solution from the absorption value of each well. Therefore, a phenol red containing medium is usable for the CCK-8 assay.

##### 5. Is there a correlation between CCK-8 and the Thymidine incorporation assay?

Yes. For correlation graphs, see page 1. Please note that since CCK-8 uses a different assaying mechanism from that of the Thymidine assay, the CCK-8 and Thymidine assay results may differ.

##### 6. Is CCK-8 toxic to cells?

The toxicity of CCK-8 is so low that, after the CCK-8 assay is completed, the same cells can be used for other cell proliferation assays such as the crystal violet assay, neutral red assay or DNA fluorometric assay.

##### 7. I do not have a 450 nm filter. What other filters can I use?

You can use filters with the absorbance between 450 and 490 nm, even though 450 nm filter gives the best sensitivity.

# Science Tool

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。

网址：[www.scintol.cn](http://www.scintol.cn)

北京市昌平区生命科学园北清创意园

热线电话：(86) 010-56545018  
17326982853

QQ:3353846966