

## M5 Hiper Cell Counting Kit (CCK) CCK-8 细胞增殖与活性检测试剂盒

产品名称	单位	货号
M5 Hiper Cell Counting Kit (CCK)	5ml	MF128-01
M5 Hiper Cell Counting Kit (CCK)	10ml	MF128-02

### 【储存条件】

4°C 避光保存（保质期 1 年），或 -20°C 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条件下，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）

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

1. 在96孔板中接种细胞悬液（100 $\mu$ l/孔）。将培养板放在培养箱中预培养（37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>）。
2. 向每孔加入10 $\mu$ l的CCK-8溶液（注意不要在孔中生成气泡，以免影响OD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450nm处的吸光度。
5. 如果暂时不测定OD值，可以向每孔中加入10 $\mu$ l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）

1. 在96孔板中配置100 $\mu$ l的细胞悬液（通常细胞增殖实验每孔加入100 $\mu$ l约2000个细胞，细胞毒性实验每孔加入100 $\mu$ l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。
2. 向培养板加入1-10 $\mu$ l不同浓度的待测药物刺激。
3. 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）。
4. 每孔加入10 $\mu$ l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200 $\mu$ l，则需加入20 $\mu$ l 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 ↓ 接种到96孔培养板 ↓ 37°C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）	<ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>3. 细胞的种类不一样，形成的甲臆的量也不一样。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臆很少，需要较长的显色时间（5-6小时）。</li> <li>4. 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。</li> <li>5. 建议采用双波长进行测定，检测波长450-490nm，参比波长600-650nm。</li> </ol>

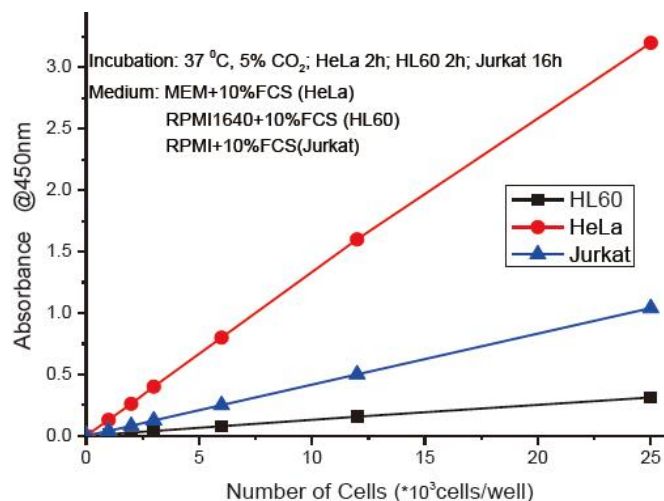


图1 细胞数目和吸光度的相关曲线

**【细胞毒性分析】**

方法	备注
制备细胞悬液 ↓ 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）	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。

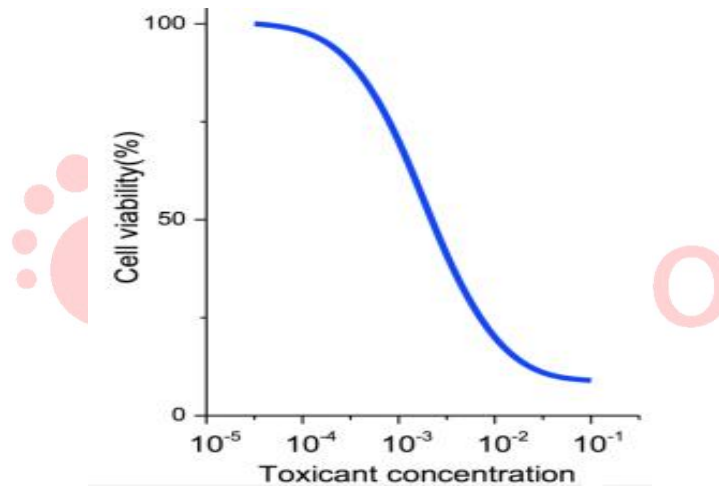


图2 细胞毒性曲线

**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%

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100\%$$

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）

**【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。