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 (100μL /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% CO2).
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 10μL 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 10μL 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 μ 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% CO2).
3) Add 10 μL 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 10μL 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 10μL 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.

北京富百科生物技术有限公司 www.fluorescence.cn

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_5 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.

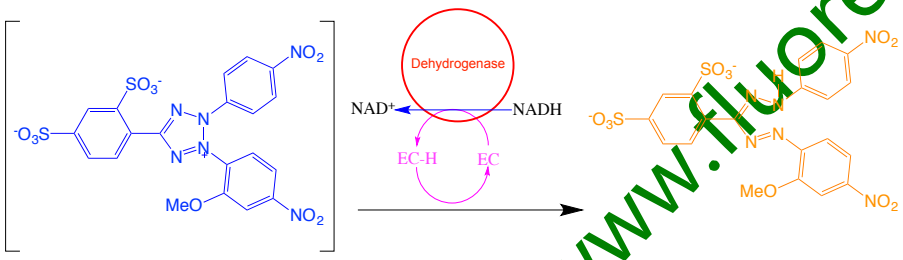
Q&A:

1. How many cells should there be in a well?
   For adhesive cells, at least 1000 cells are necessary per well (100 µl medium) when using the kit's standard 96-well plate. For leukocytes, at least 2500 cells are necessary per well (100 µl 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 ℃, 1 year at 4 ℃, and 6 months at room temperature. CCK-8 is stable over 2 days even at 60℃ 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 mediumis 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.

北京富百科生物技术有限公司www.fluorescence.cn

细胞增殖-毒性检测试剂盒 Cell Counting Kit-8(CCK-8)

水溶性四唑（2-（2-甲氧基-4硝基苯）-3-(4-硝基苯)-5-（2,4-二磺基苯）-2H-四唑单钠盐），是一种类似于MTT的化合物，在电子耦合试剂存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的水溶性的甲臜染料(formazan,下图)， 这种甲臜染料直接溶解在培养基中。水溶性四唑被细胞内脱氢酶生物还原后生成的甲臜能够。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，生成的甲臜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。正是利用这一特性开发的CCK-8试剂盒直接进行细胞增殖和毒性分析。CCK-8法应用非常广泛，可以用于生物活性因子的活性检测，抗肿瘤药物的筛选，细胞增值的测定，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臜，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。



CCK-8 法与 MTT 比较：

CCK8 试剂盒提供了一种灵敏度高，操作简便，使用安全，重现性好的细胞增殖与活性检测方法。与传统的 MTT 相比无需有机溶剂和放射性同位素，步骤少，无损失，结果准确！本试剂盒检测非常便捷。试剂盒仅一管已经配制好的含有 WST-8 的 CCK-8 溶液，无须再进行任何配制等操作，无须使用同位素，所有的检测步骤仅在同一块 96 孔板内完成。不必洗涤细胞，不必收集细胞，也不必采用额外的步骤去溶解 formazan。可以用于大批量样品的检测。

1. MTT 实验生成的甲臜不是水溶性的，需要使用 DMSO 等有机溶剂溶解；而本方法产生的甲臜是水溶性的，不仅省去了溶解的步骤，更因此而减少了该操作步骤带来的误差。
2. 与 MTT 方法相比，本方法线性范围更宽，灵敏度更高。

本方法对细胞无毒性，因此加入WST-8显色后，可以在不同时间反复用酶标仪读数多次测定从而找到最佳测定时间。

3. 本方法所用试剂在培养基中比 MTT 更加稳定，实验效果重复性好。
4. MTT 具有毒性，同时其生成的甲臜需要有机溶剂溶解，会对操作人员身体造成危害。本试剂无毒，使用中无需有机溶剂，操作更加安全。
5. 本试剂盒在 4℃避光可长期保存，使用无需配制，即开即用。
6. 酚红和血清对 CCK 法的检测不会造成干扰（扣除空白孔即可）

CCK-8法与其他细胞增殖/毒性检测方法的优势比较

检测方法	MTT 法	XTT 法	WST-1 法	CCK-8 法
甲臜产物的水溶性	差,需要加 DMSO 溶解	好	好	好
产品性状	粉末	2 瓶溶液	溶液	1 瓶溶液
使用方法	配成溶液后使用	现配现用	即开即用	即开即用
检测灵敏度	一般	较高	较高	高

北京富百科生物技术有限公司www.fluorescence.cn

重现性	差	中等	好	非常好
检测时间	较长	较短	较短	最短
检测波长	560–600nm	420–480nm	420–480nm	430–490nm
细胞毒性	高 细胞形态完全消失	很低 细胞形态不变	很低 细胞形态不变	很低 细胞形态不变
试剂稳定性	一般	非常差	一般	很好
批量样品检测	可以	非常适合	非常适合	非常适合
便捷程度	一般，工作量大	便捷	便捷	非常便捷

保存条件： CCK-8溶液在避光，0-5℃的条件下可以保存一年； -20℃下保存2年；如需经常使用请将试剂存放在0-5℃，为防止背景值增加干扰实验结果，请勿反复冻融。

CCK-8试剂使用方法

一、通用操作步骤

1. 在 96 孔板每孔加入 100uL 细胞悬液； 2.在培养箱中预培养细胞；3.向培养板中加入药物(如果不加药物，直接进行第五步操作)；4.在培养箱中培养一段时间；5. 向每孔加入 10 μL 的 CCK 溶液；6. 将培养板在培养箱内孵育 1～4 小时(根据具体实验优化)。7. 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度

二、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(用此标准曲线的前提条件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)

三、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（在 37 °C,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。

四、细胞增值-毒性检测

使用方法（以 96 孔板为例，其他规格培养板按实际情况安排）：

1. 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 2000 个细胞，细胞毒性实验每孔加入 100μl5000 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，进行培养（在 37 °C, 5%CO_2, 的条件下）预培养 24 小时。
2. 向培养板加入 1-10μl 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 10μlCCK-8 溶液（注意不要在孔中生成气泡，它们会影响 OD 值的读数）。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 小时就可以了。时间的长短根据细胞的类型和细胞的密度等实验情况而定，初次实验时可以在 0.5、1、2 和 4 小时候分别用酶标仪检测，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，如无 450nm 滤光片，可以使用 420-480nm 的滤光片。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，打算以后测定的话，可以向每孔中加入 10μl 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。
8. 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。

北京富百科生物技术有限公司 www.fluorescence.cn

活力计算： 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

细胞增殖分析

方法

制备细胞悬液
↓
接种到 96 孔培养板
↓
37℃培养箱中培养(注 1)
↓
加入 10ul 的 CCK-8(注 2)
↓
培养 1-4 小时（注 3、注 4）
↓
测定 450nm 吸光度（注 5）

（3）注意事项

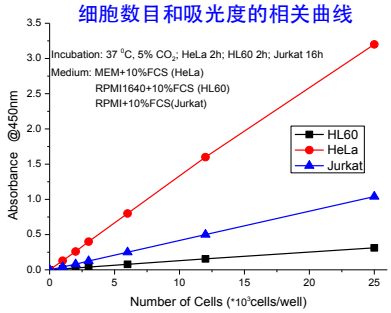
注 1: 细胞接种后贴壁大约需要培养 2-4 小时,不需要贴壁的话，可以省去这个步骤

注 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。

注 3: 细胞的种类不一样，形成的 Formazan 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 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。

注 4: 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以帮助混匀。

注 5: 建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm,参比波长 600-650nm



细胞毒性分析

方法

制备细胞悬液
↓
接种到 96 孔培养板
↓
37℃培养箱中培养(注 1)
↓
加入不同浓度的毒性物质
↓
加入 10uL 的 CCK-8(注 2)
↓
培养 1-4 小时（注 3、注 4）
↓
测定 450nm 吸光度（注 5）

注意事项

注 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。

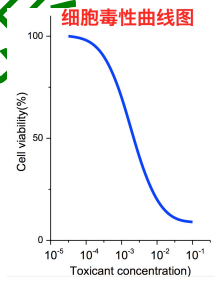
注 2: 加入毒性物质的培养时间，要看毒性物质的性质和细胞的敏感性，一般要根据细胞周期来决定，起码要一代以上的周期。

注 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。

注 4: 细胞的种类不一样，形成的 Formazan 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 Formazan 很少，需要较长的显色时间（5-6 小时）。

注 5: 如果颜色不均匀的话，可以轻轻敲击培养板以混匀。

注 6: 建议采用双波长进行测定，检测波长 450-490nm, 参比波长 600-650nm



细胞毒性曲线图

IC_{50}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 IC_{50}.

细胞存活率（%）=$[(A_s-A_b)/(A_c-A_b)]\times 100\%$

A_s:实验孔（含有细胞的培养基、CCK-8、毒性物质）

A_c：对照孔（含有细胞的培养基、CCK-8、没有毒性物质）

A_b：空白孔（不含细胞和毒性物质的培养基、CCK-8）

北京富百科生物技术有限公司www.fluorescence.cn

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。如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基，去掉药物的影响。当然药物影响比较小的情况可以不更换培养基，直接扣除培养基中加入药物后的空白吸收即可。
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，不要查到培养基液面下加样，溶液产生气泡，会干扰 OD 值读数。
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（100μl 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，（100μl 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，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-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 430-490nm 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。

Q & A（常见问题与解答）

Q1.设定参比波长的目的是什么？必须要设定吗？
A1.不一定要设定。 CCK-8 试剂在参比波长处没有吸光度。设定参比波长的目的是为了去除由于样品浑浊所带来的吸收。

Q2.如何设定空白对照？ A2.在不含细胞的培养基中加入 CCK-8，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测定 450 nm 的吸光度作为空白对照。

Q3.在做加药实验时，药物对测定是否有影响？如何解决？A3.有时会有影响。如果药物具有氧化还原性，会和 CCK-8 发生反应，吸光度发生变化。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 CCK-8，测定 450nm 的吸光度，如果它的吸光度与不含药物的培养基（加 CCK-8）的吸光度相比有明显变化，则证明药物有影响，可在加 CCK-8 之前更换培养基，去掉药物的影响。

Q4.不更换培养基加 CCK-8 试剂，有没有问题？A4.一般没有问题。但是如果培养基里有氧化还原性物质的话，可能会产生误差，必须更换其他培养基。我以下培养基会影响测定：培养基 IMDM 的空白吸收 1.0；培养基 McCoy/s 的空白吸收 0.3。

Q5.哪些物质会影响 CCK-8 的测定？ A5.当有还原性物质存在时会影响 CCK-8 的测定，增加 O.D.值；在有氧化性物质存在时会抑制测定反应的发生，减小 O.D.值；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；血清不影响测定。

Q6.说明书上仅写了 96 孔板的测定方法，如果使用 24 孔板或 12 孔板，应该加多少量 CCK-8 试剂？
A6.一般情况下建议加入 CCK-8 试剂的量是培养基体积的 1/10.

Q7 如何减少由于 CCK-8 试剂在枪头或者孔壁上的残留所带来的误差？ A7.可以在加样前用培养基稀释 CCK-8 试剂并混匀后加样。

Q8.每次测定的 O.D 值不一样，是什么原因？如何解决？ A8.可能会有以下几个原因：

1. 当在培养箱中培养时，培养板最外一圈的孔最容易干燥挥发，导致培养基的体积不一样，从而增加误差。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 CCK-8 沾在壁上而产生误差，建议在加入 CCK-8 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 1000-100000 个/孔范围内摸索条件。

Q9.在 CCK-8 显色过程中，如何终止反应？ A9. 有以下几种方法：注意: 反应停止后, 应在 24 小时内测定。
1)每孔加 10ul0.1M HCl 溶液。2)在显色反应后，将培养板放入 4℃冰箱内。3)每孔加 10ul 1%(w/v)的 SDS（十二烷基磺酸钠）溶液。

Q10.在实验中吸光度值太高，如果不能减少细胞数量，如何解决？A10.缩短加入 CCK-8 后的培养时间。

Q11.必须预培养细胞吗？ A11.不一定。如果要想保持细胞的最好状态，建议预培养细胞。如果不做细胞的预培养，细胞内的脱氢酶可能会不稳定。也有研究人员不做细胞预培养，但在做标准曲线和检测时需要统一检测条件。

Q12.如果加入的药物中有金属，是否会有影响？ A12.金属对 CCK-8 显色有影响。终浓度为 1mM 的氯化亚铅、氯化铁、硫酸铜会抑制 5%、15%、90%的显色反应，使灵敏度降低。如果终浓度是 10mM 的话，将会 100%抑制。

Q13.CCK-8 的保质期有多久？ A13.CCK-8 在避光 0-5℃的条件下可以存放 1 年，在-20℃下避光可以保存 2 年。如果需要长期保存，我们推荐在-20℃储藏。正常的 CCK-8 颜色为浅红粉色，如有明显颜色变化，则 CCK-8 的质量有可能发生变化。CCK-8 若反复冻融有可能会增加空白吸收，从而影响检测结果，若短时间频繁使用可将试剂存放在 4℃冰箱内保存。

北京富百科生物技术有限公司www.fluorescence.cn

Q14.预培养后，更换培养基需要细胞计数吗？A14.一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。如果想要精确计数细胞，可以预培养后去培养基用血球计数盘进行计数。

Q15.CCK-8 是否对细胞进行染色？ A15.CCK-8 不对细胞进行染色。培养基中的 CCK-8 并不进入细胞内染色细胞，而是在电子载体的作用下被细胞中的脱氢酶还原为高度水溶性的黄色甲臜染料，是一个显色反应。显色反应后，更换新的培养基，可以继续培养细胞。

Q16.CCK-8 对于不同的细胞，灵敏度是否一样？A16.不同细胞的脱氢酶活性不一样，显色程度不一样，灵敏度也不一样。

Q17.悬浮细胞和贴壁细胞在接种数量上有何区别？ A17.大部分悬浮细胞相比贴壁细胞比较难显色，O.D.值偏低，一般需要增加细胞接种数量或延长加入 CCK-8 后的培养时间。贴壁细胞显色比较容易，若细胞数量过大，有时吸光度会超过酶标仪的读数。

Q18.应该每次做标准曲线吗？ A18.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。

Q19.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？
A19.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，则实际测定的活细胞数量将会比真实值高，不能真实反应活细胞数量，建议采用别的方法测定。

Q20.CCK-8 是什么颜色？ A20.应该是粉红色。若颜色不一样，有可能会影响测定。
Q21.导入基因后，是否用 CCK-8 来检测活细胞？ A21.可以
Q22.在 pH5 的培养基中培养细胞，是否可以用 CCK-8 试剂检测？A22.理论上可以的，但是需要做标准曲线进一步确定。
Q23.O.D.值在什么范围比较合适？ A23.一般情况下 O.D.值在 0.1-2.0 范围内都可以，在 1.0 附近较好。

Q24.细菌是否会和 CCK-8 试剂发生反应？ A24.CCK-8 不会和细菌发生显色反应。细菌防御系统强，不会发生还原反应
Q25.CCK-8 试剂用于测定活细胞的数量，对于增殖期的细胞和静止期的细胞，有何影响？A25.一般情况下 CCK-8 试剂用于检测对数生长期的细胞。如果静止期细胞的脱氢酶活性和增殖期的细胞的脱氢酶活性有很大的 不同的话，则两者会有很大的差别。
Q26.如果 O.D.值太低，可以采取什么办法？A26.两个办法：1)适当增加细胞数量; 2)延长加入 CCK-8 后的反应时间。

Q27.在做药物毒性实验时，加入 CCK-8 培养一段时间后，检测时颜色没有变化，样品和空白 O.D.值一样，是何原因？

A27.可能因素有 2 个：药物的浓度太高，细胞全部被杀死；如果药物有氧化性，则会抑制 CCK-8 试剂的显色反应，可以采取先更换培养基清洗掉药物，然后再加 CCK-8 试剂进行检测的方法。

Q28.如何避免细胞聚团现象？A28. 1) 消化时间长一些。2) 细胞培养好后，手摇或设备摇匀。3)用枪头反复吹打，但要避免产生气泡。

Q29.做悬浮细胞的实验时，检测几天比较合适？ A29.由于不更换培养基长时间的培养，培养基中的氧气和营养会流失，会影响细胞的状态。建议培养 4-5 天左右，但要确定细胞数量是否已经达到饱和？如果需要长时间培养，因为容易蒸发，建议培养板的边缘孔不加细胞。

Q30.如何制作标准曲线？ A30.先取已知细胞数量的细胞悬液加入到培养板中，然后用培养基一次等比例稀释成一个系列浓度的细胞悬液，细胞培养一段时间后加 CCK-8 试剂，培养一段时间，等颜色发生明显变化后，用酶标仪进行测定，以细胞数量为 X 轴，O.D.值为 Y 轴，就可以做成一条标准曲线。

Q31.细胞数量太多会有什么结果？A31.贴壁细胞如果接种太多，细胞在培养过程中容易长满而产生互相挤压的现象，导致细胞状态不好或者死亡。另外细胞接种太多容易产生 O.D.值过高（甚至于超过仪器的检测范围）的情况。

Q32.BrdU 法和 CCK-8 法有何区别？ A32.CCK-8 法师通过检测对数生长期的细胞内的脱氢酶来反映细胞的活性，而 BrdU 法是检测细胞的 DNA 合成。CCK-8 法只需要加入试剂，通过比色法就可以检测，而 BrdU 法不仅要加入试剂，而且要固定细胞，通过抗原抗体反应之后用发光法来检测。两者的原理是完全不同的。如果只是检测细胞增殖的话，那么 CCK-8 的方法是比较简单的。

Q33.在做药物毒性实验时，药物对细胞有抑制作用，但检测结果却是 O.D.值升高，为什么？
A33.很可能药物和 CCK-8 试剂发生了反应，可以做一个只加药物的空白对照，如果 O.D.值确实比正常的空白对照 O.D.值高很多，则说明药物和 CCK-8 试剂发生了反应。可以通过更换培养基清洗掉药物的办法解决。

Q34.加入 CCK-8 试剂后，为什么在不同时间检测的值不一样（例如在 3 小时和在 3.5 小时）？ A34.由于 CCK-8 试剂和细胞内的脱氢酶反应是一个时间反应，随着时间的增加，O.D.值也会不断增加，颜色会不断加深，但细胞数量却没有什么太大变化。一般情况下建议在确定最佳的实验条件（合适的时间、合适的 O.D.值）后，把加入 CCK-8 试剂后的培养时间固定下来，以后在同样的培养时间点进行检测。

Q35.组内数据差异比较大或组间数据杂乱，没有规律，是何原因？
A35.原因有可能是 CCK-8 试剂在移液枪的枪头上或培养板的孔壁上残留，加入时最好快速加入以避免残留，可以用培养基稀释 CCK-8 试剂的办法来降低误差：用培养基稀释 CCK-8 试剂 1 倍，混匀后每孔加 20ul 使用。

Q36.用 CCK-8 试剂做细胞毒性检测时：1）贴壁细胞预培养多长时间合适？2）预培养过程中细胞分裂，如何计算细胞数量？3）如果预培养时间太长，会有什么结果？ A36. 一般情况下建议贴壁细胞预培养的时间为 24h. 如果只计算药物的 LD50 值的话,可不必考虑预培养过程中的细胞分裂问题,但要做一个加细胞的对照(该值为最大值)。 如果预培养时间太长，有可能细胞会增长过多，达到饱和状态，O.D.值将会很高，甚至会超过仪器的检测范围。

Q37.在实验中加入刺激细胞增长的因子，但是细胞数量却没有增加（或者吸光值没有上升），为什么？

北京富百科生物技术有限公司 www.fluorescence.cn

A37.首先用显微镜观察一下，确定细胞数量是否增加？然后才考虑其他的因素（如果加入的刺激因子和 CCK-8 发生反应的话，吸光值不变这种可能性是非常低的）。如果显微镜下观察细胞数量确实增加了，则请检查加入的药物是否具有氧化性？有可能抑制了 CCK-8 试剂的反应。方法是：在有细胞的培养基中做 1 个加药物和不加药物的对比，然后分别加入 CCK-8 试剂进行检测，如果不加药物的 O.D.值比加药物的 O.D.值高，则说明药物确实具有氧化性，产生了干扰。

Q38. Cell Counting Kit-8 法实验中每孔应该接种多少细胞？ A.38 贴壁细胞每孔至少需要接种 1,000 个细胞 (100 mL 的培养基)，检测白细胞时由于它的灵敏度较低，每孔至少需要接种 2,500 个细胞 (100 mL 的培养基)，建议先做几个孔摸索接种细胞的数量。如果要使用 24 孔板或是 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-8 溶液。
Q39. 哪些物质会影响 CCK-8 的测定？ A39. 当有还原性物质存在时会影响 CCK-8 的测定，增加 OD 值，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。
Q40. 在做加药实验时，药物对测定是否有影响？如何解决？ A40 有时会有影响。如果药物具有还原性，会和 CCK-8 试剂发生显色反应，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 CCK-8，测定 450 nm 的吸光度，如果它的吸光度比不含药物的培养基 (只加 CCK-8) 的吸光度高，则证明药物有影响，可在加 CCK-8 之前更换培养基，去掉药物的影响。
Q41. CCK-8 对细胞是否有毒？ CCK-8 对细胞的毒性相当低。 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.

Q42.. Cell Counting Kit-8 试剂稳定吗？ A42. CCK-8 在避光 0～5℃的条件下可以存放 1 年，在-20 度下避光可以保存 2 年。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。 在常温下可以保存 3 周左右，颜色应该为浅红色，如果颜色发生改变，则可能会增加空白吸光度。
Q43. 我没有 450 nm 的滤光片，还可以使用哪些其他的滤光片？ A43 可以使用吸光度在 430～490 nm 之间的滤光片，但是 450 nm 滤光片的检测灵敏度最高。
Q44. CCK-8 能否对活细胞进行染色? A44 不能。因为 CCK-8 的主要成分是一种水溶性的四唑盐，并通过电子载体将活细胞中的电子交换到培养基中的 CCK 上，因为 CCK 及其生成的甲瓒染料是高度水溶性的，不会进入细胞内，所以 CCK-8 不能对活细胞进行染色。
Q45. 如果 OD 值太低，可以采取什么办法？ 可以采取 2 个办法： 适当增加细胞数量和 延长加入 CCK 试剂后的染色时间。

CCK-8 试剂参考实验数据

（此数据仅供参考，建议预先摸索最佳实验条件）

	细胞种类		接种细胞数量	培养板	培养基名称	培养基体积	CCK-8 试剂量	加入 CCK 培养时间
1	A549(人肺癌)	贴壁	8000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2-3hr.
2	AGS	贴壁	10000/孔	96	F12	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
3	ASTC-a-1	贴壁	50000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3.5hr.
4	B16(黑色素瘤)	贴壁	4000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
5	Balb/c 3T3	贴壁	10000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
6	Bcap-37(人乳腺癌)	贴壁	6000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
7	Bel-7402（人肝癌）	贴壁	5000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
8	CTLL-2	悬浮	16000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
9	EaHY926	贴壁	20000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
10	ECV340(人脐静脉血管内皮细胞)	贴壁	20000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
11	HaCaT	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
12	HAEC	贴壁	10000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
13	HEK-293	贴壁	5000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
14	HepG2(人肝细胞癌)	贴壁	2000/孔	96	DMEM,10%FCS	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
15	Hela(人宫颈癌)	贴壁	2000-25000/孔	96	MEM,10%FCS, L-glutamine	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
16	Ho-8910(人卵巢癌)	贴壁	80000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
17	HL60(人原髓细胞白血病)	悬浮	30000-45000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
18	HLF	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	1hr.
19	HS 766T(人胰腺癌细胞)	贴壁	100000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
20	Huh7	贴壁	100000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
21	HUVEC	贴壁	5000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
22	Hepatocytes(肝细胞)	贴壁	30000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2-3hr.
23	HSC	悬浮	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
24	Jurkat	悬浮	40000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	6hr.
25	K562(人白血病)	悬浮	200000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
26	L929(小鼠成纤维细胞株)	贴壁	1000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
27	MCF-7(人乳腺腺癌)	贴壁	10000/孔	96	RPMI1640+10%小牛血清	100μl/孔	10μl/孔	2-3hr.
28	MN9D	贴壁	5000/孔	96	DMEM/F12(1:1)	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
29	NIH3T3	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	1-2hr.
30	NRK(大鼠肾细胞)	贴壁	5000/孔	96	DMEM+10%小牛血清 L-glutamine	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
31	P815	悬浮	10000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
32	PC12	贴壁	10000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3-4hr.
33	(人胆管癌细胞系)QBC$_{939}$	贴壁	5000/孔	96	RPMI1640+10%TBS	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
34	Raji(人 Burkitt's 淋巴瘤)	悬浮	100000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	5hr.
35	RAW264.7(小鼠巨噬细胞)	贴壁	20000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
36	SD 大鼠脾淋巴细胞	悬浮	3×10^5-4×10^5/孔	96	RPMI1640+10%BSA	200μl/孔	10μl/孔	4hr.
37	SGC-996	贴壁	150000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
38	SH-SY5Y	悬浮	12000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3hr.

北京富百科生物技术有限公司 www.fluorescence.cn

39	SK	贴壁	80000/孔	96	DMEM	500μl/孔	50μl/孔	3hr.
40	SMC	贴壁	20000/孔	96	DMEM	200μl/孔	10μl/孔	4hr.
41	SMMC-7721(人肝癌)	贴壁	1000/孔	96	DMEM,10%FCS	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
42	SPC-A1(肺腺癌)	贴壁	3000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
43	SW480	贴壁	1000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
44	T-24(人膀胱变异细胞癌)	贴壁	80000/孔	96	DMEM	180μl/孔	10μl/孔	3hr.
45	Tca8113	贴壁	10000000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
46	T 淋巴细胞	悬浮	1×10^4-1×10^6/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
47	U937	悬浮	200000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
48	Vero E6	贴壁	30000/孔	96	RPMI1640(10%FBS)	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
49	Wish 细胞(人羊膜细胞)	贴壁	30000/孔	96	5%BCS MEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
50	7901	贴壁	15000-20000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
51	成纤维细胞	贴壁	1500/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
52	大鼠系膜细胞	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
53	骨髓间充质干细胞	贴壁	4000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
54	结肠癌 Caco-2 细胞	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
55	乳鼠心肌细胞	贴壁	10000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	0.5-3hr.
56	人成骨细胞	贴壁	5000/孔	96	DMEM-LG 成骨细胞诱导培养液	100μl/孔	10μl/孔	3hr.
57	人外周血淋巴细胞	悬浮	50000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
58	人支气管上皮细胞	贴壁	2000/孔	96	LHC-8 无血清培养基	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
59	神经母细胞瘤	贴壁	10000/孔	96	MEM	100μl/孔	10μl/孔	2hr.
60	肾小球系膜细胞	贴壁	1000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	1hr.
61	树突状细胞	悬浮	1000000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4.5hr.
62	兔软骨细胞	贴壁	1000/孔	96	DMEM	100μl/孔	10μl/孔	3-4hr.
63	小鼠脾脏 T 淋巴细胞	悬浮	2000000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.
64	原代大鼠肝脏细胞	贴壁	30000/孔	96	DMEM/F12(1:1)	100μl/孔	10μl/孔	3-4hr.
65	原代胃癌细胞	贴壁	10000/孔	96	RPMI1640	100μl/孔	10μl/孔	4hr.

北京富百科生物技术有限公司www.fluorescence.cn