T47D细胞CCK8实验方法

实验材料及设备

二氧化碳培养箱，生物安全柜，低俗离心机，微量移液器及吸头，1.5EP管，15ml离心管，50ml离心管，二甲基亚砜 DMSO (细胞培养级)（索莱宝 D8371），Gibco 1640培养基，T-47D (人乳腺管癌细胞) (STR鉴定正确)(Pricella)，T-47D细胞专用培养基（Pricella，CM-0228），CCK-8试剂盒(细胞增殖及毒性检测试剂盒)（索莱宝CA1210），细胞计数板，无菌PBS缓冲液，胰酶细胞消化液（0.25%EDTA）（碧云天），细胞培养瓶，96孔细胞培养板，博来霉素（ NSC12506，selleck），双醋瑞因Diacerein（S4267 ，selleck），杨梅素Myricetin（S2326，selleck），硼替佐咪Bortezomib（S1013，selleck）

实验步骤

1. 将T47D细胞消化成单细胞悬液，用低速离心机室温1200g 2分钟离心，去上清
2. 加入新培养液，制成细胞悬液，进行细胞计数，将细胞悬液稀释到90000个细胞/ml
3. 用单细胞悬液铺板，96孔板中没孔加入200ul单细胞悬液
4. 用细胞培养箱培养24小时
5. 进行细胞加药分组为正常组，DMSO组，加药组

药物浓度为

双醋瑞因：10,20,30,40nmol/L

杨梅素：10,20,30,40,50,60nmol/L

硼替佐咪：0.5,2.5,10，20，30,40nmol/L

博来霉素：50,100,200,400nmol/L

1. 用细胞培养箱培养48小时，进行CCK8细胞活性测定，吸掉带有药物培养液，加入新的培养基100ul，没孔中加入CCK8活性检测试剂10ul，培养箱孵育1小时，用酶标仪检测细胞活性，波长为450nm
2. 计算细胞活性，选择最优浓度，进行双药物检测

最终确定博来霉素浓度为200nmol/L，杨梅素10nmol/L，硼替佐咪40nmol/L，

第二次实验再次确定双醋瑞因浓度，双醋瑞因单药浓度变为30，40,60,80,100nmol/L，分别与200nmol/L博来霉素进行检测，观察其对细胞活性影响。

参考文献：An Unbiased Oncology Compound Screen to Identify Novel Combination Strategies

药物实验验证至少需要三个部分：每个部分怎么做，多少用量，多少细胞，培养基多少

1. 细胞培养、处理

所有细胞系均购自ATCC或Sigma-Aldrich，并在收到后6个月内使用（来源以及处理时间）。所有细胞系均在ATCC或Sigma-Aldrich通过短串联重复序列（STR）谱进行鉴定。高通量筛选是在全自动GNF PolyTarget机器人平台（GNF Systems）上进行的。将细胞以 400 个细胞/孔的 10 μL 生长培养基接种在 1,536 孔组织培养处理板 （Brooks Automation） 中，然后在 DMSO 中加入 50 nL 化合物，并在 37°C 下在 5% CO 2 、95% 湿度下孵育 96 小时（怎么进行的细胞培养，各个培养基的使用）。

1. 药物处理：

所有药物均购自selleck，对于单药研究，细胞用 3 倍稀释系列（每种药物的 8 种浓度）处理，每个细胞系的每种药物浓度进行 6 次重复处理（单药怎么处理的）。根据已发表的每种药物的数据，在96小时增殖测定细胞活力 以选择起始浓度（最优浓度是怎么选取的）。对于联合研究，用 4 x 4 的药物浓度基质处理细胞，该基质也选择跨越每种药物的 IC 50 ，每个细胞系的每种药物/药物组合浓度进行四次重复处理（双药检测药物做了什么处理）。总的来说，每个细胞系筛选了 60 个检测板，典型通量为每天 5 个细胞系。

3、CCK-8法细胞活力检测（CCK-8法测定的具体处理流程，以及检测用的试剂，剂量详细一点）

将细胞以 3,500 个细胞/孔接种在 96 孔板中。然后用 Wee1 抑制剂 AZD1775 和 mTOR 抑制剂 ridaforolimus 浓度的 8×8 基质处理细胞。96 小时后，使用 Cell Titer Glo （Promega） 测量细胞活力。根据制造商的方案，使用 CellTiter-Glo 细胞活力试剂 （Promega） 测量每个孔的总细胞活力。在Viewlux读数仪（Perkin Elmer）上测量发光信号，每块板的积分时间为30秒。