

cck8graphpad作图_新经验 | CCK8 实验心得

原创

[weixin_39629617](#) 于 2020-12-29 06:27:39 发布 13483 收藏 2

文章标签: [cck8graphpad作图](#)

版权声明: 本文为博主原创文章, 遵循 [CC 4.0 BY-SA](#) 版权协议, 转载请附上原文出处链接和本声明。

本文链接: https://blog.csdn.net/weixin_39629617/article/details/112018499

版权

写在前面:

一直都像个新手, 从未老道过。所有新手的迷茫与无奈我最能体会。看到园子里有一些同学在问有关CCK8试验的事情, 当初我也和他们一样, 像个被蜘蛛丝缠住头的迷茫苍蝇一头扎进园子里, 期待能找到些解决谜团的只言片语。希望我写的这些非专业文字能够帮助那些在实验室里没有前行者指点迷津的筒子们。当然仁者见仁智者见智, 我写的只是个人实验心得, 仅供参考。欢迎大家拍砖共同进步。实验是简单的, 道路是曲折的, 时间就是用来浪费的, 科研就是自娱自乐使劲折腾。

我没有做过MTT实验, 但其实原理及目的都是一样的(反应机理不一样)。都说CCK8简单点而且数据更稳定, 所以就用了这个试剂盒。

CCK8的说明书大家一定要认真阅读, 里面很多细节的问题都有提到。而且说明书里提供的一些关于各种细胞的种板数都很有参考价值, 因为那是反复验证过的最佳数值。但无论如何, 做这个试验一定要摸条件。你就算再懒, 这个懒不得, 否则你都只是在做无用功。以下言论全部以细胞毒性试验为前提, 如果你做的是促进细胞生长的药物的药效实验那就另当别论了。

摸条件包括1、种板数; 2、种板后细胞的贴壁生长时间; 3、加药后的孵育时间; 4、cck8试剂加入量; 5、cck8试剂加入后细胞孵育时间。看起来很多, 其实这就是一个实验。而且都是种的空白板, 也就是不加药物, 只加细胞和CCK8。

1、种板数: 这个要查文献, 看你所用细胞别人有无做过, 把范围大致找出。记住还要参考说明书, 这个很重要。然后稀释一系列浓度种板。首先你要观察多长时间细胞可贴壁完全, 一般贴壁生长24小时。然后还有在你的实验时间内, 不同细胞数下孔内生长情况。比如我拟定考察4天的时间, 那么在4天内, 细胞是刚好铺满还是堆积生长? 因为每块板都会设置对照孔, 也就是含有细胞的培养基+CCK8, 这个数值是板上的最大数值, CCK8试验最佳OD值在1.0附近, 所以这个最大数值最好能控制在1.0左右。我的实验经验是不要让细胞长满, 一旦长满了很难去判断是否堆积生长了, 对药物能否顺利进入细胞有影响此为其一, 其二生长不均匀易导致孔间OD值数据偏差大, 而且OD值也很大。

2、贴壁生长的时间我一般就直接让它贴壁长24h了, 这个时间细胞已经贴壁完全, 而且这样设置时间对自己安排实验时间也方便。没人愿意大半夜爬起来做实验吧。

3、加药后的孵育时间, 我的实验摸了3个时间, 24h, 48h, 72h。然后根据数据的稳定性(RSD)、OD值的范围(1.0左右)这些来选择最好的时间。太长了就没有必要了, 细胞呆在孔里几天不换液结果可想而知了。

4、CCK8试剂加入量, 说明书中明确写出建议加入量为培养基体积的10%。这里有一个问题: 假设我要孔内是200微升的体系, 即细胞悬液+药液+CCK8=200微升呢, 还是细胞悬液+药液=200微升, cck8不算在体系内呢。关于这一点文献报道不一致。本人最终采用的是后者。

5、cck8试剂加入后孵育时间, 随着时间的增加, OD值就会增大。总之原则就是把OD值控制在1.0左右。这里我考察了0.5h、1.0h、2.0h。

再说一下关于种板设置问题。众所周知周围一圈孔因为边缘效应都是不用来做实验的。一般每组样品我会设置6个复孔, 得到的OD值去掉最大值与最小值, 其余取平均值。我用的是排枪, 会省很多力气, 但是也会增大组内误差。这个只有通过校正移液枪和选用最适枪头了。

做这个实验我想大家遇到的最大问题应该是数据不稳定，组内数据偏差大。讲了很多怎样摸条件，其实就一个原则，把OD值控制在1.0左右。数据不稳定也只能通过增大样品数，借助数据处理来弥补。还有实验操作一定要仔细小心，尽量平行操作。

能力有限，表达不清的大家凑合着看看吧。有疑问的欢迎大家留言讨论，我们的目标是共同进步，哈哈。

补充：谢谢大家的热烈讨论。突然想起用酶标仪检测的时候还有一些细节问题，园子里也有前辈提过。比如孔里不能有气泡，如果有气泡，就用吸耳球吹掉，气泡会很影响检测结果。样品板要擦拭干净，当然了，盖子一定要记得拿掉啊Big Smile补充说明：这几天有同学提出了一个问题，这个问题非常好也非常关键：将OD值控制在1.0这个说法是否有依据？

这里我还是想提醒大家一定要认真阅读试剂盒的说明书，试想一个试剂盒的上市并且作为技术手段得到认可需要经过多少试验反复验证。我购买的是同仁化学研究所的CCK8试剂盒，说明书的P7Q23：OD值在什么范围比较合适？答：一般情况下OD值在0.1-2.0都可以，在1.0附近比较好。

再说到自己的实验设计，酶标仪的原理其实和紫外分光光度计是一样的，所以UV上很多减小误差的注意事项在酶标仪上同样受用。这就能够理解为什么不能有气泡，为什么要擦拭干净样品板了。再者熟悉UV原理的同学了解利用紫外检测有一个最佳检测范围，超过了这个范围，数值就会呈现出不稳定，无规律。(大家可以把自已的数据统计分析看看是不是数值控制在1.0附近更稳定。)而更有甚者就是超出了仪器的检测范围，仪器读数为—。我在摸条件的时候，cck8加入2.0h后检测就出现过酶标仪读不出数据的情况。

不知道以上补充的内容是否能够回答同学们的那个问题。

感谢战友：呆呆的初学者 原文详见：<http://www.dxy.cn/bbs/topic/17932737?onlyHost=1>

超方便的实验干货查询工具

微信扫码进入「丁香实验」小程序