ttt

**手动生化实验**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，IP/COIP检测，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，电镜检测，免疫荧光，免疫组化，tunel，原位杂交染色，全景扫描，分析阅片等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建，肝功，肾功，血糖，血脂，无机离子，尿常规，凝血检测，血常规等生化检测。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc169613423)

[一、样本信息 6](#_Toc169613424)

[二、实验仪器 6](#_Toc169613425)

[三、实验步骤 7](#_Toc169613426)

[1.标本处理 7](#_Toc169613427)

[血清 7](#_Toc169613428)

[血浆 7](#_Toc169613429)

[细胞上清 7](#_Toc169613430)

[细胞裂解液 7](#_Toc169613431)

[组织 7](#_Toc169613432)

[全血 8](#_Toc169613433)

[2.BCA检测 8](#_Toc169613434)

[3.CAT试剂盒检测 8](#_Toc169613435)

[四、数据分析 9](#_Toc169613436)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| 高速微量冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速低温组织研磨仪 | Servicebio | KZ-III-FP |
| 双光束紫外可见分光光度计 | 佑科仪器 | T2602 |
| 酶标分析仪 | Detielab | HBS-1096A |
| 电子天平 | 幸运 | FA2204E |
| 电热鼓风干燥箱 | 明途 | 101-1B |
| 纯水仪 | 成都品成科技有限公司 | PCJ-60 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640110 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640000 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640030 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640040 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640050 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640060 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| BCA蛋白浓度测定试剂盒 | biosharp | BL521A |
| 过氧化氢酶（CAT）测定试剂盒 | 南京建成 | A007-1-1 |
| 离心管 | LABSELECT | MCT-001-500 |
| 研磨管 | Servicebio | HT-200-M |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-200 |
| 移液器吸头 | LABSELECT | T-001-1250 |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-10-T |
| 移液器吸头 | biosharp | BS-1000-T |

# 实验步骤

## 标本处理

血清

使用不含热原和内毒素的试管，操作过程中避免任何细胞刺激，收集血液后，室温血液自然凝固10-20分钟，3000 rpm离心10分钟，仔细收集上清，检测或者分装后-20 ℃或 -80 ℃保存，避免反复冻融。

血浆

用含抗凝剂的采集管或离心管采集血液样本，样本采集后30分钟内，3000 rpm离心10-20分钟，取上清检测或者分装后-20 ℃或 - 80℃保存，避免反复冻融。保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。

细胞上清

收集好的细胞上清样本，2000-3000 rpm离心20分钟，除去细胞碎片和杂质，取上清，检测或者分装后-20 ℃或 -80 ℃保存，避免反复冻融。

细胞裂解液

收集细胞悬浮液样本，1000 rpm离心10分钟弃培养基，用预冷PBS润洗3次；加入适量的预冷PBS重悬细胞，反复冻融破碎，收集样本4 ℃ 10000×g离心10分钟，取上清，检测或者分装后-20 ℃或 -80 ℃保存，避免反复冻融。

组织

准确称取组织重量按重量（g）：体积（mL）=1:9的比例加入9倍体积的匀浆介质(推荐 0.86%或 0.9%的生理盐水)，冰水浴条件下，机械匀浆,制备成 10%的匀浆液，2500～3000 rpm，离心 10 分钟，取上清液进行测定。

全血

1﹕99 溶血液的制备：取50 μL全血加双蒸水至5 mL充分混匀后放置10分钟，待测。

## BCA检测

（1）BCA工作液配制：将BCA试剂A与BCA试剂B按照体积比50:1混合，充分混匀，配成BCA工作液；

（2）蛋白标准品配制：将5 mg/mL BSA蛋白标准溶液，用PBS分别稀释成0、25、125、250、500、750、1500、2000 μg/mL的BSA标准蛋白测定溶液；

（3）微孔板法：

①取20 μL不同浓度标准蛋白测定溶液、待测样品分别置于各孔，为测定准确每个加样孔均应做复孔；

②每孔加入200 μL BCA工作液，轻微震荡混匀，动作不可剧烈，37 ℃放置30分钟；

③测定562 nm处的吸光值，并记录读数；以不含BSA的样本的光吸收值作为空白对照；

④以BSA含量为纵坐标，A562为横坐标，绘制标准曲线，计算样品中的蛋白浓度；

⑤结果分析：见BCA结果分析表格。

## CAT试剂盒检测

（1）试剂组成与配置：

试剂一：液体100 mL×1瓶，4 ℃保存6个月。

试剂二：底物液体10 mL×1瓶，4 ℃保存6个月。

试剂三：显色粉剂×1 瓶，4 ℃保存 6 个月。加双蒸水 100 mL溶解，4 ℃保存 1 个月。（如果底部有不溶粉末沉淀，直接取上清使用，不影响测定结果）

试剂四：液体 10 mL×1 瓶，4 ℃保存 6 个月。天冷时会凝固，临用前 37 ℃加热至透明方可使用。

（2）血清（浆）、细胞上清操作表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 对照管 | 测定管 |
| 待测样本（mL） |  | 0.1 |
| 试剂一（37 ℃预温）（mL） | 1.0 | 1.0 |
| 试剂二（37 ℃预温）（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 立即混匀，计时，37 ℃准确反应 1 分钟（60 秒） | | |
| 试剂三（mL） | 1.0 | 1.0 |
| 试剂四（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 待测样本（mL） | 0.1 |  |
| 混匀，取200 μL反应液加入孔板中， 405 nm处读数，计算△A=A 对照-A 测定 | | |

（3）组织、细胞裂解液操作表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 对照管 | 测定管 |
| 待测样本（mL） |  | 0.05 |
| 试剂一（37 ℃预温）（mL） | 1.0 | 1.0 |
| 试剂二（37 ℃预温）（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 立即混匀，计时，37 ℃准确反应 1 分钟（60 秒） | | |
| 试剂三（mL） | 1.0 | 1.0 |
| 试剂四（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 待测样本（mL） | 0.05 |  |
| 混匀，取200 μL反应液加入孔板中， 405 nm处读数，计算△A=A 对照-A 测定 | | |

（4）全血操作表：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 空白对照管 | 测定管 | 自身对照管 |
| 双蒸水（mL） | 0.05 |  | 2.1 |
| 1﹕99 溶血液（mL） |  | 0.05 | 0.05 |
| 试剂一（37 ℃预温）（mL） | 1.0 | 1.0 |  |
| 试剂二（37 ℃预温）（mL） | 0.1 | 0.1 |  |
| 立即混匀，计时，37 ℃准确反应 1 分钟（60 秒） | | | |
| 试剂三（mL） | 1.0 | 1.0 |  |
| 混匀，取200 μL反应液加入孔板中， 405 nm处读数，计算△A溶血液=A 空白对照+A自身对照-A 测定 | | | |

# 数据分析

（1）血清（浆）、细胞上清CAT活力计算公式

CAT活力（U/mL）=△A\*235.65（斜率的倒数，常数，直接使用）/V样（取样量，0.1mL）/T（反应时间，60 秒）\*N（样本测试前稀释倍数）

（2）组织、细胞裂解液中CAT活力计算公式

CAT活力（U/mgprot）=△A\*235.65（斜率的倒数，常数，直接使用）/V样（取样量，0.05mL）/T（反应时间，60 秒）/Cpr（匀浆液蛋白浓度，mgprot/mL）

（3）溶血液中CAT活力计算公式

CAT 活力（U/mgHb）=△A溶血液\*235.65（斜率的倒数，常数，直接使用）/V样（取样量，0.05mL）/T（反应时间，60 秒）/CHb（溶血液血红蛋白浓度，mg/mL）

**详细实验结果见附件一、附件二**