

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **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** |  |

**检测结题报告**

**琼脂糖凝聚电泳实验**

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，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，免疫荧光，免疫组化，原位杂交染色等。

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。

**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](#_Toc24882)

[一、实验仪器 6](#_Toc17115)

[二、 试剂与耗材 6](#_Toc7277)

[三、实验步骤 6](#_Toc22786)

# 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** |
| 高速冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速低温组织研磨仪 | Servicebio | KZ-IH-F |
| 微量离心机 | SciloEGX | S1010 |
| 实时荧光定量PCR分析仪 | BIOER | FQD-96C |
| 超微量分光光度计 | KAIAO | K5600 |
| 超净工作台 | 尚光 | IFD |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **仪器名称** | **品牌** | **型号** |
| RNAsimple 总RNA提取试剂盒 | 天根 | DP419 |
| 裂解液RZ（Buffer RZ） | 天根 | RK145 |
| BlastaqTM 2× qPCR MasterMix试剂盒 | ABM | G891 |
| All-in-one 5× RT MastMix试剂盒 | ABM | G592 |
| DEPC水 | Biosharp | BL510B |
| RNAsimple 总RNA提取试剂盒 | 天根 | DP419 |

提取 RNA 所用离心管、移液器吸头灭菌前均用 DEPC 水浸泡，其他离心管、移液器吸头直接高温湿热灭菌 40 min，干燥。

# 三、实验步骤

**1、总RNA抽提**（枪头和离心管均经过湿热灭菌，无RNA酶）

1.1样本处理

**a.组织：**每50-100 mg组织加1 ml裂解液RZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液RZ体积的十分之一。

**b.单层生长的细胞：**直接在培养板中加入裂解液RZ裂解细胞，每10cm2面积加1ml RZ。用移液枪抽打若干次至溶液透明。

**c.细胞悬液：**离心取细胞，弃上清。每5-10×106动物细胞和植物细胞加入1ml裂解液RZ。加裂解液RZ前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。

**d.血液：**直接取新鲜血液，加入3倍体积RZ（推荐0.25 ml血液+0.75 ml RZ），充分振荡混匀。

**1.2** 将匀浆样品在室温放置5min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

**1.3** 可选步骤：4℃ 12000 rpm(~13400×g)离心5min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。

**1.4** 加入200 μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置3min。

**1.5** 4℃12000 rpm(~13400×g)离心10min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液RZ试剂的50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

**1.6** 缓慢加入0.5倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，4℃ 12000rpm（~13400×g)离心30sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱CR3，请分两次转入吸附柱CR3中，4℃ 12000rpm(~13400×g)离心30sec，弃掉收集管中的废液。

**1.7** 向吸附柱CR3中加入500μl去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇）， 4℃ 12000rpm(~13400×g)离心30sec，弃废液，将CR3放入收集管中。

**1.8** 向吸附柱CR3中加入500μl漂洗液RW（请先检查是否已加入无水乙醇），室温静置2 min，4℃ 12000rpm(~13,400×g)离心30sec，弃废液。

**1.9** 重复操作步骤**1.8**。

**1.10** 将吸附柱放入新的2ml收集管中，4℃ 12000 rpm(~13,400×g)离心2min，去除残余液体。离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

**1.11** 将吸附柱CR3转入一个新的1.5ml离心管中，加30-100μl RNase-Free ddH2O，室温放置2min，4℃ 12000 rpm(~13,400×g)离心2min。洗脱缓冲液体积不应少于30μl，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-80℃，以防降解。（注意：如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。）

1.12 DNA浓度测定:用仪器空白调零后取2.5μl 待测DNA溶液于检测基座上，放下样品臂，使用仪器自带的软件开始吸光值检测。

**2、PCR**

2.1取0.2ml PCR管，配制如下反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积** |
| 2× qPCR Mix | 25.0μL |
| 10μM基因引物 | 3.0μL（上下游引物各1.5μL） |
| 反转录产物 | 2.0μL |
| DEPC H2O | Add to 50μL |
| 总体积 | 50μL |

3.2 PCR扩增

预变性 98℃，2min

变性 98℃，20s→60℃，20s

退火 55℃，20s

延伸 72℃，10s

末端延伸 70℃，5min

降温 16℃，2min

**4、琼脂糖凝胶电泳**

4.1 配制 3%琼脂糖凝胶液：称取 1.5 g 琼脂糖置于锥形瓶中，加入 50 mL 1×TAE ，微波炉 加热煮沸至全部融化，摇匀。

4.2 制备点样凝胶块：将制胶槽洗干净，晾干，放入制胶器，在固定位置插好电泳梳子。 将制胶器置于水平位置，倒入冷却到 65℃左右的琼脂糖凝胶液，胶液缓慢展开，直到整个 胶槽内铺成均匀胶层，室温下静置直至完全凝固，垂直轻拔梳子，将凝胶及胶槽放入电泳槽 中，添加 1 ×TAE 电泳缓冲液至没过凝胶表面为止。

4.3 加样：在点样板中按照 6：1 的比例混匀 DNA 样品和 6×Loading Buffer 。用 10 ul 移液 器分别将样品按顺序加入对应的孔中。每加完一个样品，更换一个吸头，以防污染，加样时 勿碰坏样品孔周围的凝胶面。

4.4 电泳：设定电压 60- 100V ，时间 30-45min 。（注：样品应由负极(黑色)向正极(红色)方 向移动）当溴酚蓝移动到距离胶板下沿约 1cm 处时，停止电泳。

4.5 观察照相：在紫外灯下观察，采用凝胶成像系统拍照保存。

