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](#_Toc169613477)

[一、样本信息 6](#_Toc169613478)

[二、实验仪器 6](#_Toc169613479)

[三、实验步骤 7](#_Toc169613480)

[1.标本处理 7](#_Toc169613481)

[血清 7](#_Toc169613482)

[血浆 7](#_Toc169613483)

[细胞上清 7](#_Toc169613484)

[细胞裂解液 7](#_Toc169613485)

[组织 7](#_Toc169613486)

[全血 8](#_Toc169613487)

[2.BCA检测 8](#_Toc169613488)

[3.GSH-PX试剂盒检测 8](#_Toc169613489)

[四、数据分析 11](#_Toc169613490)

# 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 |
| 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）测定试剂盒 | 南京建成 | A005-1 |
| 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

溶血液的配置：取肝素抗凝全血20 μL，以蒸馏水稀释至1 ml，配成1∶49的溶血液；鼠血10 μL 加蒸馏水至1 ml，配成1∶99的溶血液。充分混匀，放置5分钟直至使玻璃管中的溶血液对光呈完全透明状，方可进行检测。

## 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。

## GSH-PX试剂盒检测

（1）试剂组成与配置：（50管/24样）

试剂一：贮备液：1 mL×1 瓶，4 ℃保存6个月。

试剂一应用液的配制：用时取 0.1 mL加蒸馏水至 10 mL，配成应用液，现用现配，需多少配多少；4 ℃保存。

试剂二：甲粉1瓶，4 ℃保存6个月；用时每瓶加蒸馏水 85 mL 加热至 90～100 ℃，充分完全溶解 。乙液 25 mL×1 瓶。4 ℃保存6个月 。

试剂二应用液的配制：将已配好的甲液与乙液充分混合。此为过饱和溶液， 室温静置冷却后，如有结晶，则取上清进行实验；4 ℃或室温保存6个月。

试剂三：粉剂1瓶，4 ℃保存6个月。

试剂三应用液的配制：加蒸馏水100 mL溶解；溶解时也可以放在 37 ℃环境中加速溶解。

试剂四：液体 25 mL×1 瓶，4 ℃避光保存6个月。

试剂五：粉剂×2 支，4 ℃避光保存6个月。

试剂五应用液的配制：每支加蒸馏水 10 mL溶解，4 ℃避光保存五天。

试剂六：GSH标准品粉剂3.07 mg×2 支，4 ℃保存6个月。

试剂七：GSH标准品溶剂贮备液5 mL×1 瓶，4 ℃保存6个月。

标准品溶剂应用液：贮备液∶蒸馏水=1∶9 即10倍稀释配成应用液，现用现配；4 ℃保存 。

1 mmol/L GSH 溶液：GSH 的分子量为 307，每次测定前将 1 支 3.07 mg 的 GSH标准品粉剂加到 GSH 标准品的溶剂应用液中，定容至 10 mL即为 1 mmol/L 的GSH 溶液，现用现配。

20 μmol/L 的 GSH 标准溶液：取 1 mmol/L GSH 溶液 0.2 mL加 GSH 标准品溶剂应用液定容至 10 mL，即为 20 μmol/L 的 GSH 标准溶液。

（2）试剂组成与配置：（100管/48样）

试剂一：贮备液：2 mL×1 瓶，4 ℃保存6个月。

试剂一应用液的配制：用时取0.1 mL加蒸馏水至10 mL，配成应用液，现用现配，需多少配多少；4 ℃保存。

试剂二：甲粉1瓶，4 ℃保存6个月 ；用时每瓶加蒸馏水170 mL 加热至90～100 ℃，充分完全溶解 。乙液 50 mL×1 瓶。4 ℃保存6个月 。

试剂二应用液的配制：将已配好的甲液与乙液充分混合。此为过饱和溶液， 室温静置冷却后，如有结晶，则取上清进行实验；4 ℃或室温保存6个月。

试剂三：粉剂1瓶，4 ℃保存6个月。

试剂三应用液的配制：加蒸馏水100 mL溶解；溶解时也可以放在 37 ℃环境中加速溶解。

试剂四：粉剂1瓶，4 ℃避光保存6个月。

试剂四应用液的配置：加蒸馏水50 mL溶解，4 ℃避光保存6个月。

试剂五：粉剂×4 支，4 ℃避光保存6个月。

试剂五应用液的配制：每支加蒸馏水10 mL溶解，4 ℃避光保存五天。

试剂六：GSH标准品粉剂3.07 mg×4 支，4 ℃保存6个月。

试剂七：GSH标准品溶剂贮备液10 mL×1 瓶，4 ℃保存6个月。

标准品溶剂应用液：贮备液∶蒸馏水=1∶9 即10倍稀释配成应用液，现用现配；4 ℃保存 。

1 mmol/L GSH 溶液：GSH 的分子量为 307，每次测定前将1支 3.07 mg 的 GSH标准品粉剂加到 GSH 标准品的溶剂应用液中，定容至10 mL即为1 mmol/L 的GSH 溶液，现用现配。

20 μmol/L 的 GSH 标准溶液：取1 mmol/L GSH 溶液0.2 mL加 GSH 标准品溶剂应用液定容至10 mL，即为20 μmol/L的GSH标准溶液。

（3）血清（浆）、细胞上清操作表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mol/L GSH（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测匀浆（mL） |  | 0.1 |
| 37 ℃水浴预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 37 ℃水浴准确反应5分钟 | | |
| 试剂二应用液（mL） | 2 | 2 |
| 用旋涡混匀器充分混匀，置 37 ℃恒温水浴或气浴 40 分钟 | | |
| 待测匀浆（mL） | 0.1 |  |
| 混匀，3500~4000 rpm，离心10分钟，取上清1 mL作显色反应 | | |

（4）组织、细胞裂解液操作表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mol/L GSH（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测匀浆（mL） |  | 0.2 |
| 37 ℃水浴预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 37 ℃水浴准确反应5分钟 | | |
| 试剂二应用液（mL） | 2 | 2 |
| 用旋涡混匀器充分混匀，置 37 ℃恒温水浴或气浴 40 分钟 | | |
| 待测匀浆（mL） | 0.2 |  |
| 混匀，3500~4000 rpm，离心10分钟，取上清1 mL作显色反应 | | |

（5）全血操作表：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mol/L GSH（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测溶血液（mL） |  | 0.2 |
| 37 ℃水浴预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 37 ℃水浴准确反应5分钟 | | |
| 试剂二应用液（mL） | 2 | 2 |
| 待测溶血液（mL） | 0.2 |  |
| 混匀，3500~4000 rpm，离心10分钟，取上清1 mL作显色反应 | | |

（6）显色反应操作表：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 非酶管 | 酶管 |
| GSH标准品溶剂应用液（mL） | 1 |  |  |  |
| 20 μmol/L GSH标准液（mL） |  | 1 |  |  |
| 上清液（mL） |  |  | 1 | 1 |
| 试剂三应用液（mL） | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 试剂四应用液（mL） | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 试剂五应用液（mL） | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 混匀，室温静置15分钟后，412 nm，1 cm光径比色杯，蒸馏水调零，测各管OD值 | | | | |

# 数据分析

（1）血清（浆）、细胞上清GSH-PX活力计算公式

GSH-PX活力（U/mL）=（非酶管OD值-酶管OD值）/（标准管OD值-空白管OD值）\*标准品浓度（20μmol/L）\*稀释倍数（6倍稀释）\*样本测试前稀释倍数

（2）组织、细胞裂解液中GSH-PX活力计算公式

GSH-PX活力（U/mgprot）=（非酶管OD值-酶管OD值）/（标准管OD值-空白管OD值）\*标准品浓度（20μmol/L）\*稀释倍数（5倍稀释）/反应时间/（取样量\*样本蛋白含量）

（3）全血中GSH-PX活力计算公式

GSH-PX活力（U/mgprot）=（非酶管OD值-酶管OD值）/（标准管OD值-空白管OD值）\*标准品浓度（20μmol/L）\*稀释倍数（5\*（1+X）/（1+49））

X 为全血稀释比例，例如 1︰99 稀释，X 即为 99。

1+49：溶血液为 1︰49 稀释时，取 0.2ml 检测即等同于取样量为 4 μL的全血。

**详细实验结果见附件一、附件二**