

**糖氧剥夺实验报告**

**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](#_Toc13462)

[一、实验仪器 6](#_Toc11132)

[二、 试剂与耗材 6](#_Toc9758)

[三、实验步骤 7](#_Toc28013)

[1、细胞悬液制备 7](#_Toc12880)

[2、分组造模 7](#_Toc4581)

[3、细胞给药（根据方案选做） 7](#_Toc11349)

[4、结果处理 7](#_Toc9639)

[四、结果展示 8](#_Toc17212)

# 一、实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **实验仪器** | **品牌** | **货号** |
| 二氧化碳培养箱 | LABGIC | COI-80 |
| 超净工作台 | 博科 | BBS-DDC |
| 低速离心机 | SCILOGEX | SCI406 |
| 感应式数控涡旋混匀仪 | LABGIC | L-VM-B |
| 大容量电动移液器 | SCILOGEX | SCI-Fill |
| 酶标仪 | detielab | HBS-1096A |
| 手动移液枪 | Thermo | 4640060 |

# 试剂与耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **品牌** | **货号** |
| DMEM无糖液体培养基 | Biosharp | BL1124A |
| DMEM高糖液体培养基 | Biosharp | BL304A |
| 胎牛血清（FBS） | 四季青 | 11011-8611 |
| 胰蛋白酶（Trypsin） | Biosharp | BL526A |
| 双抗（P/S） | Biosharp | BL505A |
| 磷酸盐缓冲液（PBS） | Biosharp | BL316A |
| 血球计数板 | Marienfeld | 650030 |
| 台盼蓝染色液(0.4%) | Biosharp | BL627A |
| 细胞培养瓶 | LABSELECT | 13112A |
| 氧气指示剂 | 三菱瓦斯 | C-22 |
| 2.5L厌氧产气袋 | 三菱瓦斯 | C-01 |
| 96孔培养板 | LABSELECT | 11410 |
| 0.22μm细菌过滤器 | Biosharp | BS-PES25-22-S |
| 移液器吸头 | Biosharp | BS-RT-1250 |
| 离心管 | Biosharp | BS-15-M |

# 三、实验步骤

## 1、细胞悬液制备

选择处于对数生长期且细胞融合率约80%的细胞，在超净工作台中吸弃培养基，加入PBS清洗细胞碎片与残留培养基，吸弃PBS，根据不同类型的细胞传代方式，将细胞制备成单细胞悬液，1000rpm离心5min，吸弃上清液，加入2mL完全培养基重悬并吸打混匀，计算实验所需的细胞量

## 2、分组造模

按照课题设计要求，将细胞悬液加到孔板中，37℃。5%CO2条件培养12h至细胞贴壁。

将缺氧组细胞，放置在厌氧产气袋中密封，其余细胞作为正常组，两组细胞继续放置于培养箱中培养至客户所需造模时间后；

取出厌氧培养袋中的细胞，继续放置37℃，5%CO2条件培养，复氧时间根据方案决定。

## 细胞给药（根据方案选做）

OGD造模结束后，根据实验方案，若需要预处理的先加入相应保护剂/抑制剂，然后补全液体量，等到预处理完毕，对两个细胞板进行换液，不需要预处理的可以直接换液，缓慢抽出每个孔的培养基，在每个孔里加入 PBS，加完之后拿起板前后左右轻轻晃动 3~5 次，抽出 PBS，加入方案所需药物浓度培养基，培养至方案刺激时间。

## 结果处理

1、细胞活力检测：

•CCK-8/MTT检测：使用细胞增殖和毒性检测试剂盒，根据说明书操作测定各组细胞的活力。糖氧剥夺通常会导致细胞活力下降。

2、细胞凋亡检测：

•AnnexinV/PI双染：使用凋亡检测试剂盒，通过流式细胞仪检测早期和晚期凋亡水平。糖氧剥夺可能导致细胞凋亡水平的上升。

3、自噬检测：

•LC3-II检测：提取蛋白样本，通过WesternBlot检测LC3-I到LC3-II的转化水平，评估自噬活性。检测自噬底物p62的降解情况，评估自噬过程是否活跃。

4、代谢产物检测：

•乳酸测定：利用乳酸测定试剂盒测定培养上清液中乳酸的含量，评估糖酵解代谢水平。

•ATP测定：使用ATP检测试剂盒测定细胞内ATP水平，反映能量代谢状态。

5、氧化应激检测：

•ROS检测通过流式细胞仪可以评估荧光强度。

•MDA检测：通过检测丙二醛（MDA）水平来评估脂质过氧化水平。

# 四、结果展示