

**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** |  |

**流式EdU检测  
实验报告**

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](#_Toc288)

[一、 实验仪器 6](#_Toc25702)

[二、 试剂与耗材 6](#_Toc21712)

[三、 实验步骤 6](#_Toc30161)

[1. 样本前处理 6](#_Toc14661)

[2、细胞固定与通透 7](#_Toc17395)

[3、细胞染色上机 7](#_Toc2939)

[四、实验结果 8](#_Toc2587)

[（一） 图片结果分析举例 8](#_Toc10944)

[（二） 统计结果分析举例 11](#_Toc24245)

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **实验仪器** | **品牌** | **货号** |
| 二氧化碳培养箱 | LABGIC | COI-80 |
| 流式细胞仪 | 层浪 | FongCy C2080 |
| 净化工作台 | 尚光 | 1FD |
| 高速微量冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速大容量冷冻离心机 | LABGIC | L-CM-4019 |
| 涡旋混合器 | 塞维尔 | MV-100 |
| 手动移液枪 | Thermo | 4640060 |

# 试剂与耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂与耗材名称** | **品牌** | **货号** |
| EdU细胞增殖流式检测试剂盒 | Elabscience | E-CK-A370 |
| 磷酸盐缓冲液（PBS） | Biosharp | BL316A |
| 4%多聚甲醛 | Biosharp | BL539A |
| 离心管 | LABSELECT | CT-012-15A |
| Triton X-100 | Biosharp | BS-084 |
| 牛血清蛋白（BSA） | Aladdin | B265993 |

# 实验步骤

## 样本前处理

1. 细胞培养

贴壁细胞

显微镜下观察培养瓶中细胞密度和状态，取处于对数生长期的细胞，根据细胞特性将细胞用胰酶消化成单细胞悬液并计数，按照2~3\*105个细胞/孔接种于6孔培养板，37℃ 5% 培养箱中培养过夜。

悬浮细胞

显微镜下观察培养瓶中细胞密度和状态，取处于对数生长期的细胞，收集并计数，按照2~3\*105个细胞/孔接种于6孔培养板，37℃ 5% 培养箱中培养过夜。

1. EdU 和细胞共培养
2. 培养时间向孔板加入不同浓度EdU（10 μM、20 μM、50 μM），37℃ 5%培养箱中培养不同时间（3h、6h）。
3. 共培养后，细胞用胰酶消化，制成细胞悬液，300 g 离心 5 min，弃上清。
4. 细胞染色

## 2、细胞固定与通透

**使用量以 6 孔板中细胞数为参考，其他培养孔可根据实验需要进行适当调整。**

1. 加入 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞，充分混匀后 300 g 离心 5 min，弃上清。
2. 加入 1 mL 含 4% 多聚甲醛的 PBS 重悬细胞，充分混匀后室温避光孵育 15 min。
3. 300 g 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL 含 1% BSA 的PBS 溶液重悬细胞，充分混匀300 g 离心 5 min，弃上清。此步骤重复一次。
4. 加入 0.5 mL 含 1% Triton X-100的 PBS 溶液混匀，室温孵育20 min。

## 3、细胞染色上机

**本说明书按照六孔板每孔 500 μL 的反应体系加的 Click 反应液体积。**

1. 根据实验样本数，参考下表配制 Click 反应液。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **组分** | **样本数** | | |
| **1** | **5** | **10** |
| Click ReactionBuffer I | 440 μL | 2.2 mL | 4.4 mL |
| CuSO4 | 40 μL | 200 μL | 400 μL |
| FITC Azide I | 1 μL | 5 μL | 10 μL |
| Click AdditiveSolution | 20 μL | 100 μL | 200 μL |
| 总体积 | 500 μL | 2.5 mL | 5 mL |

1. 300 g 离心 5 min，弃上清，每孔加入上述表格配制的500 μL 的 Click 反应液，混匀，室温避光孵育 30 min。
2. 300 g 离心 5 min，弃上清，每孔加入 1 mL 含 1% Triton X-100的 PBS 溶液混匀，300 g 离心 5 min，弃上清。
3. 加入 200 μL 含 1% BSA 的 PBS 溶液混匀，上机检测。

# 四、实验结果

1. **图片结果分析举例**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **EDU测试8.8-blank-Plot3** | **EDU测试8.8-3h-10μM-Plot3** | |
| **图一** | **图二** | |
| **EDU测试8.8-3h-20μM-Plot3** | | **EDU测试8.8-3h-50μM-Plot3** |
| **图三** | | **图四** |
| **EDU测试8.8-6h-10μM-Plot3** | | **EDU测试8.8-6h-20μM-Plot3** |
| **图五** | | **图六** |
| **EDU测试8.8-6h-50μM-Plot3** | |  |
| **图七** | |  |
|  | | |
| **图八** | | |

图1：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:0.02%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图2：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:25.79%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图3：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:36.76%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图4：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:28.36%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图5：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:35.90%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图6：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:43.80%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图7：利用直方图（X:FITC-A;Y:Count）确定G4门内EdU阳性细胞数:31.42%；在统计数据文件中G4-Mean值为阳性细胞强度。

图8：通过所有样本的FSC-A/SSC-A以及FSC-A/FSC-H以及荧光通道直方图和所有的荧光通道直方叠加，Mean值为阳性强度。

1. **统计结果分析举例**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试管名称 | G5 Parent% | G2 Parent% | G3 Parent% | G4 Parent% | G4 Mean BL1-A |
| blank | 82.33% | 63.38% | 0.02% | 0.02% | 25231 |
| 3h-10μM | 73.70% | 63.55% | 24.79% | 25.79% | 72104 |
| 3h-20μM | 68.17% | 61.54% | 32.23% | 36.76% | 75543 |
| 3h-50μM | 69.06% | 61.48% | 26.21% | 28.36% | 78422 |
| 6h-10μM | 71.40% | 66.33% | 33.51% | 35.90% | 107128 |
| 6h-20μM | 66.60% | 64.95% | 35.81% | 43.80% | 95687 |
| 6h-50μM | 81.62% | 71.32% | 30.12% | 31.42% | 66459 |

例如：在样本blank中，G5 Parent%为所研究的目的细胞，其细胞量为82.33%；G2 Parent%为排除粘连细胞的目的细胞，其细胞量为63.38%；G3 Parent%为EdU增殖细胞数，其细胞量为0.02%；G4 Parent%为直方图中EdU增殖细胞数，其占比为0.02%；G4 Mean BL1-A为EdU平均荧光强度，其为25231。