

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

**炎症细胞模型实验**

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，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](#_Toc169253603)

[一、实验仪器 6](#_Toc169253604)

[二、 试剂与耗材 6](#_Toc169253605)

[三、实验步骤 7](#_Toc169253606)

[1、细胞传代/换液 7](#_Toc169253607)

[2、细胞铺板 7](#_Toc169253608)

[3、LPS刺激 7](#_Toc169253609)

[4、结果展示 7](#_Toc169253610)

[5、其他检测方式 8](#_Toc169253611)

# 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高糖液体培养基 | Biosharp | BL304A |
| CCK-8试剂盒 | Biosharp | BL1055A |
| 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 |
| 12孔培养板 | LABSELECT | 11210 |
| 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 |
| 小鼠IL-6试剂盒 | 贝茵莱 | MU30044 |
| IL-6一抗 | Affinity | df6087 |

# 三、实验步骤

## 1、细胞传代/换液

显微镜观察RAW264.7细胞状态，当细胞状态不好时，若是新复苏的细胞，需要5天后进行换液操作，若是传代的细胞，则需要立刻进行换液处理。若细胞状态良好，但细胞数量不足80%时，需要进行换液处理。若细胞状态良好，细胞生长至80%以上时，需要进行传代处理，具体传代比例根据细胞说明书或细胞生长情况而定。

## 2、细胞铺板

取处于对数生长期的RAW264.7细胞，根据RAW264.7细胞特性按照细胞传代的步骤消化成单细胞悬液并计数，按照5-10\*105个细胞/孔接种于12孔培养板，需铺3块12孔板。孔板上记录细胞种类、铺板密度、铺板时间，培养过夜。

## 3、LPS刺激

根据课题方案，按比例配制含不同浓度的LPS培养基：0μg/mL、0.1μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、10μg/mL。将铺板过夜的RAW264.7细胞孔板内培养基换成对应的不同浓度的LPS培养基，孔板上标记每孔的药物浓度

三块板分别在培养于15h、24h、48h时收集细胞上清液和细胞，用于测定细胞中炎症介质的相关指标；

上清液检测白细胞介素6（IL-6）分泌水平。（具体详细操作根据不同试剂盒说明书操作细胞）。取各组细胞总蛋白，按照2 μg/孔浓度上样SDS-PAGE。转模后，采用affinity的IL-6，按1:2000稀释比过夜孵育，检测细胞IL-6表达水平。

## 4、结果展示

根据实验室测试检测的ELISA和WB检测IL-6结果表明：

（1）0.01μg/mL处理15h时，上清中IL-6表达水平最高，但细胞中水平一般。μg/mL处理15h时，上清中IL-6表达水平一般，但细胞中水平最高。因此可建议客户用ELISA检测上清中IL-6时，采用0.01μg/mL处理15h左右的条件，而用WB检测细胞中IL-6时，采用1μg/mL处理15h左右的条件。

（2）低浓度诱导炎症模型在15h时，IL-6上清浓度最高，延长作用时间不升反降，空白组与加药组数值接近甚至更高，因此建议客户用ELISA检测上清中IL-6时，低浓度条件下不要诱导太长时间。

（3）高浓度诱导炎症模型在24h之后，细胞中IL-6水平虽然会升高，但通过镜下细胞状态和实验内参情况，大部分细胞都已发生死亡，因此，WB检测细胞中IL-6时，1-2μg/mL处理24h可行，但不建议客户长时间大剂量的诱导。

以上结论仅仅针对客户检测IL-6指标时作为凭证，其他指标（如核表达蛋白）还需进一步摸索。

另外本次测试是采用新配置的LPS，不确定存储一段时间之后LPS效果是否发生改变，LPS长时间处于存储液状态时容易被塑料容器吸收导致实际浓度远小于理论值，因此针对某些客户大剂量LPS诱导也毫无效果的，可推荐客户使用新鲜配置的LPS重新造模。

## 5、其他检测方式

（1）ELISA用于检测细胞上清或血清中炎症因子的蛋白水平。例如IL-1β、IL-6、TNF-α等，使用相应的ELISA试剂盒进行量化。

（2）qPCR（实时定量PCR）：用于检测细胞或组织样本中炎症因子mRNA的表达水平。可设计针对特定炎症因子的引物，如IL-1β、IL-6、TNF-α等。

（3）WesternBlot（蛋白印迹法）：用于检测炎症因子的蛋白表达情况以及与炎症相关的信号通路分子的磷酸化水平。常用抗体包括NF-κB、NLRP3、TNF-α、IL-6等。

（4）免疫荧光/免疫组化：免疫荧光或免疫组织化学染色可以观察炎症因子在细胞或组织中的定位和分布。适用于研究局部炎症环境中的细胞反应。

（5）流式细胞仪：可用于检测细胞表面或胞内炎症因子。例如，利用细胞因子染色的抗体检测单个细胞中IL-6、TNF-α等表达。