**附件一、采购参数需求清单**

**招标项目采购需求**

**说明：**

议价文件中标注“▲”号的条款为实质性条款或指标、要求，必须满足（无偏离）或优于（正偏离），否则其投标作否决谈判处理。非实质性条款或指标负偏离达3项以上（含3项）的投标无效。

|  |
| --- |
| **一、项目预算： 46000元** |
| **二、项目要求及技术需求** |
| 服务项目 | 数量 | 服务需求及要求 |
| 第三方机构提供科研服务项目 | 1项 | 第三方检测要求：▲一、按照下列实验方法完成实验：**1.**构建质粒 根据基因序列针对NPTN截短体合成、合成NPTN质粒、NDUFA11-PEGFP质粒合成、NDUFS1-3\*Flag质粒合成、NDUFS1突变体构建-1个:1000bp以内、NDUFS1突变体构建-3个:1000bp以上-2500bp以下，针对以上合成的质粒进行提取扩增。**2.细胞培养**进行293T细胞进行培养：293T 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，在 37°C 饱和湿度、含 5% CO2 的培养箱中培养。T75 培养瓶铺细胞数为 4\*106。预计培养10天左右，培养足够的细胞量进行后续的质粒转染。细胞传代达到实验所需数量后计数并检测细胞活率，细胞活率达到 90%可选择铺细胞。**3. 质粒共转** 3.1转染前一天细胞接种于 T75，使其在转染时密度为 70-80%。 3.2 在进行转染前，更换新鲜的培养液。 3.3 转染试剂/DNA 混合物制备 3.3.1 DNA-Opti-MEM：在无菌离心管中加入 1250μL Opti-MEM 或其他无血清、无 抗生素培养基，并添加 25μg DNA，用移液器轻轻混匀。（具体如下表） 3.3.2 转染试剂-Opti-MEM：在无菌离心管中加入 1250 μL Opti-MEM 或其他无血 清、无抗生素培养基，并添加 75 μL 转染试剂，用移液器轻轻混匀。（具体如下表） 3.3.3 将转染试剂 Opti-MEM 滴加至 DNA-Opti-MEM 中，用移液器轻轻混匀，室温 静置 10-15 min 后可用于转染。3.4 转染：将转染试剂/DNA 混合物滴加至培养基中，轻轻晃动培养器皿使转染试剂/DNA 均匀分散。3.5 继续培养 48h，收取细胞，用适当的方法进行检测。 3.6 细胞收取 细胞长满后，将细胞消化并转移至 15ml 离心管中，1200rpm 离心 5min；弃上清，加入 1ml PBS 重悬细胞，并转移至 1.5ml EP 管中，6000rpm、4℃离心 1min，弃上清并将细胞弹散至于冰上；加入配置好的 RIPA 裂解液，800ul/管，4℃展示柜内使用旋转混合仪**4.Co-IP 实验** **4.1 同型对照制备** 根据 IP 抗体的亚型制备 Isotype 同型对照实验，1.5ml 进口 EP 管中加入 700ul 裂解液（不需加其它抑制剂和还原剂）80ul 琼脂糖珠 ProteinA/G Beads，2ug IgG Isotype， 4 ℃旋转混合仪旋转孵育 30min。4 ℃， 7200r/min， 离心 2min。 加入 RIPA 高盐洗液（含 DTT 、Na3VO4）洗 3 次，1ml/次/管，5min/次。RIPA 低盐洗液（含 DTT 、Na3VO4）洗 3 次，1ml/次/管，前后洗珠子 6 次，目的是清洗珠子内的杂质以及非共价结合键，从而降低背景干扰。珠子洗至最后一遍的上清用真空吸泵尽量吸干净，但避免吸到珠子。 **4.2 Input 制备** 细胞裂解结束后，4 ℃，12000r/min，离心 15min，将未裂解的杂质沉淀下来，使蛋 白初步提纯。离心结束取 80 ul 上清定量制备 Input 样品，此步骤目的在于检测并验证组织细胞内蛋白量，判断目的蛋白及互作蛋白的表达，只有证明胞内有足量目的蛋白才能继续后面的沉淀实验，此步骤相当于 WB 收样品，管盖上标记 Input。 **4.3 孵育 IgG-Beads** 将裂解的大部分上清转移到洗好的珠子内，4 ℃旋转混合仪 旋转孵育 30min。孵育时 间结束后，将 EP 管于 4℃离心机，7200r/min，离心 2min。用移液器将上清转移至预先准备好的新 1.5ml 进口 EP 管中并放于冰盒内，注意不要吸到管底的沉淀。洗 6 遍，最后离心，真空吸泵尽量吸干净上清，加入 2\*Loading Buffer，Loading Buffer 预先加热处理，100℃煮 10min 后，4 ℃离心机瞬离后写标签并与 Input 一起置于 -20℃冰箱保存。 **4.4 IP 样品制备** 7.6.3 中的上清中加入 2ul IP 抗体，Anti-GFP、Anti-Gabra1，4 ℃冰箱旋转混合仪旋转孵育过夜（至少 8h） 后加入 80ul 琼脂糖珠 ProteinA/G Beads，4 ℃冰箱旋转混合仪继续旋转孵育 3h 后，将 EP 管于 4 ℃离心机，7200 r/min，离心 2min。真空吸泵吸取上清至 EP 管 100ul 刻度线，加入 RIPA 高盐洗液（含 DTT、Na3VO4）洗 3 次，1 ml/次/管，RIPA 低盐洗液（含 DTT、Na3VO4）洗 3 次，1 ml/次/管，前后洗珠子 6 次，目的是将与靶蛋白抗体非特异结合的化学键充分打开，只保留抗原抗体特异性结合的键，从而最大限度降低本底和非特异性相互作用蛋白的干扰。最后一遍 4 ℃离心机，7200 r/min，离心 2min，尽量吸干净上清，但不要洗到珠子即沉淀，加入 80 ul 预热的 2\*Loading Buffer，100℃煮10min 后，4 ℃离心机瞬离后与 Input、IgG Isotype 一起置于-20 ℃冰箱保存。 **4.5 蛋白定量** 配制工作液：根据标准品和样品数量，按 50 体积 A 试剂和 1 体积 B 试剂（50:1）配制成 BCA 工作液，充分混匀。稀释标准品：取 10ul 赛默飞标准品（母液浓度 2mg/ml）用10ul 蛋白裂解液梯度稀释 5 次。样品孔：8ul 蛋白裂解液+2ul 蛋白。各孔加入 200ul 工作液，37℃放置 25-30min。然后用酶标仪 A562nm 测定，根据标准曲线计算出蛋白浓度。 **4.6 SDS-PAGE 跑胶** **4.6.1 配胶**：根据蛋白大小分别配制10%蛋白胶。 **4.6.2 电泳**：确定实验蛋白浓度，上样质量均为20ug/well。将计算好的蛋白与加完β-巯基乙醇的2x Loading buffer混匀，沸水煮10min，瞬时离心冷却至室温进行实验。加样后，80V跑浓缩胶，进入分离胶marker出现后，转120V跑分离胶。 **4.6.3 转印及封闭**：转印前的PVDF膜事先用甲醇浸泡，在电泳槽中加入伯乐自带的冰袋，将电泳槽包裹在冰水混合物的泡沫箱中，根据不同蛋白大小确定转印时间，恒压60V转印3h。转印结束后，将转印成功的PVDF膜放在1X TBST中洗去剩余的甲醇，清洗三次，每次5-10分钟。然后转至用1x TBST配制的5%的牛奶摇床孵育1h。 **4.6.4 孵育一抗**：用3%BSA配制一抗。将剪好的膜从牛奶中取出放入1x TBST中清洗，将配制好的一抗加至杂交袋中，封口并标明一抗名称。摇床上4℃混匀过夜。 **4.6.5 孵育二抗**：次日从杂交袋中取出孵育完一抗的PVDF膜，放至1x TBST中，摇床清洗10分钟，三次。将清洗完的PVDF膜，放至5%牛奶配制的二抗中，摇床孵育1h，孵育结束后，将PVDF膜放至1XTBST中，摇床清洗10分钟，三次。 **4.6.6 显影**：配制好显影液，显影。▲二.结果准确性要求按照科研实验的要求进行实验，所有数据均提供所有原始数据，相关实验视频，确保数据真实、可靠，杜绝学术不端。出具正式的实验报告。▲三．取得医学检验实验室许可证、营业执照，具有丰富的科研经验。▲四．技术服务于收到预付款后4个月内完成。 |