

心肌代谢重编程与血管免疫炎症的互作在心血管疾病中的作用
及整合机制研究项目
(第3包)

服务合同

合同编号:

项目名称: 心肌代谢重编程与血管免疫炎症的互作在心血管疾病
中的作用及整合机制研究项目

甲方: 北京市心肺血管疾病研究所

乙方: 北京易科拜德科技有限公司

签署日期: _____

甲方：北京市心肺血管疾病研究所（以下简称甲方）

地址：北京市朝阳区安贞路2号

乙方：北京易科拜德科技有限公司（以下简称乙方）

地址：北京市海淀区天秀花园荷塘月舍1-9号楼及底商10-12号地下7

根据《中华人民共和国民法典》和相关法律，法规的规定，甲乙双方本着平等互利，诚信自愿的原则，就甲方委托乙方对其心肌代谢重编程与血管免疫炎症的互作在心血管疾病中的作用及整合机制研究项目（第3包）事宜。达成如下协议

1. 服务项目

1.1、对150个样品进行转录学、蛋白质组学代谢组学进行GC-MS、UHPLC-MS检测和相应数据分析

1.2、对100例样本进行流式细胞检测及分析

1.3、对10例样本进行乳酸化质谱检测及7色免疫荧光检测及数据分析

2. 检测样本

2.1 样本的收集

2.1.1 甲方应按照相关要求采集样本，并注明样本采集时间。

2.1.2 甲方应当在检测项目要求的规定时间内，按照规定的方式对其所采集的样本进行前处理和存储。如因甲方采集或处理存储不当造成样本不符合检测要求的，由甲方自行承担后果。

2.1.3 甲方应确保向乙方提供完整的样本检测申请信息，包括基本信息、标本类型、项目名称、采集时间等、便于乙方提供适宜的检验和结果解释。

2.2 样本的交付：甲方应当将样本统一存放在双方约定的地点，并安排人员与乙方配送专员进行样本交接签收工作。

2.3 样本的保存期：

2.3.1 乙方应当按照国家级行业标准对样本进行保存，检验类原始样本保存7天。

2.3.2 由于样本本身特性不能达到此保存期限，或按照期限进行样本保存无意义时，不适用前款保存期限的规定。

3. 检测报告

3.1 检测报告的交付时间：由双方协商确定。

3.2 如乙方未能在前款约定设计交付报告的，应以书面或电话的形式及时通知甲方。

3.3 如甲方对乙方出具的检测结果有异议的，应在本协议 2.3.1 条规定的样本保存期内提出。如在样本保存期内提出异议，视同甲方接受检验结果。

4. 付款方式（具体以合同签订时商定为准）

4.1 合同签订完成 30 日内，乙方向甲方提供 10% 的履约保证金，其中：合同总价 5% 的履约保函，金额 15800.00 元，保函期限为一年，全部服务完成经甲方验收合格后退还；另外合同总价 5% 的履约保函，金额 15800.00 元，保函期限为两年，待验收签字确认合格之日起免费售后服务执行 12 个月后（若售后服务无问题）退还。

4.2 甲方收到乙方开户银行履约保函后甲方向财政办理合同支付手续，支付合同金额的 100%。甲方支付费用 7 日前，乙方应将对应金额的法定发票提供甲方审核，待审核通过后甲方按照合同约定向乙方支付费用，如发票审核不合格，甲方有权延期支付费用。

5. 甲方权利义务：

5.1 未经乙方明确的书面收款授权，甲方不得将检测服务费以现金方式支付给乙方工作人员。

5.2 若甲方有大量体检样本需检测时，应提前 7 天通知乙方，以便于乙方及时做好各项准备工作。

5.3 甲方应按本协议的约定时间向患者收取检测费。如甲方有漏收费的，不影响甲方向乙方支付检测服务费。

5.4 甲方将乙方作为甲方独家检测单位。

5.5 甲方应针对部分检验结果对临床诊疗的危急程度，应明确危急值的报告部门或联系人。

5.6 依照《传染病信息报告管理规定》，对需要传报项目的相关患者信息在规定时间内通报乙方。

5.7 本协议有效期内，甲方有义务对从乙方获悉的关于乙方的经营信息、技术信息等一切非公开的保密信息予以保密，保密期限为三年。未经乙方书面同意，甲方不得将上述信息泄露给任何第三方。

6. 乙方权利义务

6.1 乙方应保证自身的能力和资源能够满足甲方的委托检测需求，包括实验室人员的技能和专业知识，检测方法等。

6.2 乙方保证检验、病理诊断结果准确可靠，提供的病理诊断报告可作为最后诊断依据，提供的检验报告建议仅作参考不作最后诊断依据。

6.3 如样本不符合检测要求的，乙方有权退单；如甲方坚持要求检测的，乙方对检测结果不承担责任。

6.4 如乙方将部分检测项目转委托给其他实验室或外部顾问进行检测时，应及时向甲方说明。

6.5 如乙方的检测项目、收费标准、检测报告交付时间等事项发生变更时，应及时向甲方报告变更内容。

6.6 乙方可根据甲方需求，为甲方提供分析前样本的质量控制等相关内容的培训服务。

6.7 乙方集团旗下的司法鉴定所（如有）可为甲方提供医疗争议方面的免费咨询。

7. 验收标准全部检测、分析服务完成由甲方负责验收，并出具验收报告。乙方应及时提供检测、分析结果及所要求的全部相关资料。

8. 协议有效期

8.1 本协议有效期为： 1 年。

9. 违约责任

9.1 如乙方的检测服务发生质量问题，造成甲方向患者承担赔偿责任的，甲方有权向乙方追索该损失。

9.2 如乙方的技术、检测服务发生质量问题，或不符合合同或行业约定标准的，甲方有权要求乙方予以修正，否则甲方有权解除本合同，乙方退还已支付费用。

9.3 如甲方未按本协议的约定按时支付检测服务费的，应当按日按应付款的万分之五支付违约金。

10. 其他

10.1 因本协议所发生的一切争议，双方应友好协商解决，协商不成的，任何一方有权向甲方所在地人民法院起诉。

10.2 本协议自双方签字盖章后生效，本协议若有未尽事宜，双方可另行签订补充协议，任何乙方工作人员的口头承诺一律无效。

10.3 本协议一式陆份，甲方肆份，乙方贰份。

10.4 本协议包含的下列附件为本协议不可分割的组成部分，与本协议具有同等法律效力。

10.5 乙方在合作期间及合作结束后，未经甲方书面同意，不得在任何形式的宣传材料、广告、媒体发布或公开声明中，使用甲方（含全称和简称等）的名称、商标、标志、域名、产品或服务进行宣传或暗示其与甲方存在任何形式的合作关系，包括但不限于技术合作、业务往来、信用担保等。如违反本条内容，甲方有权要求乙方停止此侵权行为，并要求乙方赔偿甲方由此遭受的损失（包括直接损失及间接损失）

甲方：北京市心肺血管疾病研究所

(盖章)

开户银行：

单位账户：

联系电话：

法定代表人签字：

日期：

乙方：北京易科拜德科技有限公司

(盖章)

开户银行：工行厢红旗支行

公司账号：0200216609024527855

联系电话：010-56545033

法定代表人签字：

日期：



蔡军

田春城

一、服务清单

序号	分项名称	单价(元)	数量	合价(元)	备注/说明
1	转录学检测和相应数据分析	300	150	45000	单位: 例
2	蛋白质组学检测和相应数据分析	598	150	89700	单位: 例
3	代谢组学检测和相应数据分析	298	150	44700	单位: 例
4	流式细胞检测及分析	607	100	60700	单位: 例
5	乳酸化质谱检测	5060	10	50600	单位: 例
6	7色免疫荧光检测及数据分析	2530	10	25300	单位: 例
总价(元)				316000	



二、售后服务承诺书

售后服务方案

(1) 售后服务期限

(一) 技术培训服务保障

1、前沿技术培训方案

(1) 转录组学技术培训

本项目转录组学技术培训将围绕样本质量控制、建库策略优化、测序数据质控与比对、差异表达分析及功能富集解读等核心环节展开，覆盖从原始 RNA 提取到关键通路挖掘的全链条实操逻辑；培训内容严格匹配本项目涉及的心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作研究背景，重点强化在低起始量样本条件下的文库均一性保障措施、批次效应校正方法及多组学整合前的数据标准化处理流程。所有培训材料均基于 Agilent、Illumina 主流平台实际运行参数编制，结合本项目 150 个样品的批量特征设计进阶演练模块，确保参训人员可独立完成 FastQ 质控、STAR/HISAT2 比对、DESeq2/edgeR 差异分析及 GO/KEGG 富集可视化输出。

(2) 蛋白质组学技术培训

本项目蛋白质组学技术培训聚焦于组织与血浆样本的肽段提取效率提升、LC-MS/MS 色谱分离稳定性控制、数据库搜索参数适配及定量结果可信度验证等关键技术节点；课程内容深度对接本项目对胆固醇代谢通路中磷脂类、胆汁酸类蛋白修饰位点解析需求，系统讲授 TMT/iTRAQ 标记效率评估、DIA 数据非依赖采集的谱图库构建要点及 MaxQuant 搜库后结果过滤阈值设定依据；所有实操演示均采用本项目指定的 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 设备真实日志数据，结合 150 个样品的高通量处理节奏，训练参训人员熟练掌握蛋白鉴定 FDR \leq 1%、定量 CV \leq 15% 的质量达成路径。

(3) 代谢组学技术培训

本项目代谢组学技术培训以 GC-MS 与 UHPLC-MS 双平台协同分析为主线，涵盖血样、组织及尿样三类基质的提取衍生化操作规范、仪器方法开发要点、内标响应稳定性监控及靶向定量曲线拟合策略；课程内容紧扣本项目对胆碱代谢、胆固醇代谢、肠道菌群共代谢及炎症相关代谢通路中合计超 300 种小分子代谢物的精准检测要求，特别强化甲酯化与衍生化反应温度/时间窗口控制、MRM 离子对选择逻辑及负离子模式下有机羧酸类物质响应增强技巧；全部案例数据源自本项目预实验真实谱图，确保参训人员可准确执行单样本 \leq 15 分钟检测时长约束下的数据采集与初步判读。

(4) 流式细胞技术培训

本项目流式细胞技术培训面向 100 例样本的免疫表型深度解析需求，系统覆盖抗体组合设计原则、补偿调节实操要点、门控策略标准化流程及高维数据分析基础；培训内容严格依据本项目血管免疫炎症研究目标设定，重点训练 CD45⁺白细胞亚群细分、Treg/Th17 比例动态监测、单核细胞表面乳酸化修饰水平评估等特异性指标判读能力；所有上机演示均使用本项目同源抗体试剂盒及配套荧光染料，在 BD FACSymphony 或同类高参数平台完成全流程模拟操作，确保参训人员具备独立完成 \geq 7 色方案设置、自动补偿矩阵生成及 FlowJo v10.8 标准分析报告输出的能力。

- 1) 七色免疫荧光方案中各荧光素通道间光谱重叠校准方法及日常质控频次；
- 2) 针对本项目 10 例乳酸化质谱验证样本的流式初筛阳性阈值设定依据与重复性验证流程；
- 3) 基于 CD14/CD16/HLA-DR/CD206/CD86/CD274/CD39 组合的巨噬细胞极化状态判读标准
- 4) 流式数据导出为 FCS3.1 格式后的标准化命名规则与元数据嵌入要求；
- 5) 与代谢组学数据联动分析所需的细胞亚群频率矩阵生成与归一化处理步骤。

2、技术咨询服务保障

(1) 日常技术咨询

本项目日常技术咨询将通过专属企业微信服务号提供 7×12 小时响应支持，覆盖样本冻存条件异常、离心参数偏差、衍生化失败等高频现场问题的即时诊断与处置建议；咨询服务团队由本项目指定检测平台的资深应用工程师组成，所有回复均基于 Agilent1290UHPLC-6470QQMS、6545QTOFMS 及 7890-5977GCMS 设备的标准操作手册及历史故障库生成，确保建议措施可在 2 小时内被现场技术人员直接执行；咨询记录全程留痕并同步至本项目专属知识库，同一问题二次咨询响应时间压缩至 15 分钟以内，所有解决方案均附带对应设备界面截图及参数修改路径说明，杜绝模糊表述与经验性推断。

(2) 项目技术咨询

本项目技术咨询将按阶段提供定制化支持，在样本交接期重点解答 GC-MS 甲酯化反应不完全、UHPLC-MS 衍生化副产物干扰等前处理问题，在数据产出期集中回应 PCA 模型 Q2Y 值偏低、OPLS-DA 置换检验 R2Y 异常等统计分析疑问，在成果凝练期专项辅导多组学整合图谱绘制与代谢通路注释逻辑；所有咨询响应均绑定本项目编号 KJY20260780/3 及具体样本编号，技术建议书明确标注所依据的检测标准条款、设备固件版本号及软件分析模块名称，确保每项反馈均可追溯至 AgilentMassHunter、BrukerTopSpin 或 XCMS 等本项目指定分析平台的实际运行环境。

(3) 数据分析咨询

本项目数据分析咨询覆盖从原始数据质控到高级通路挖掘的全周期需求，重点支撑 GC-MS 相位校正失败、UHPLC-MS 基线漂移修正、PLS-DA 模型过拟合识别及 CV-ANOVA 显著性判定等关键技术难点；咨询服务严格遵循本项目数据处理要求，所有代码脚本均基于 R4.3.1 与 Python3.9 环境开发，内置本项目规定的归一化策略（血样相对体积、组织相对重量、尿样总面积）、靶向代谢物保留时间窗口及 QC 重复率 $\geq 80\%$ 的自动筛查逻辑；每次咨询交付物包含可复现的分析流程文档、参数配置文件及示例数据集，确保客户科研团队可独立完成后续同类样本的标准化分析。

(4) 技术难题解决

本项目技术难题解决机制依托三级响应体系运作，一线工程师负责 4 小时内定位 GC-MS 溶剂峰切除异常、UHPLC-MS 内标响应衰减等设备级问题，二线应用专家在 24 小时内提交含替代方案的书面处置报告，三线研发团队针对乳酸化质谱检测灵敏度不足等前沿技术瓶颈启动联合攻关；所有难题处置均以本项目既定检测性能指标为验收基准，例如单样本检测时间超 15 分钟时自动触发液相梯度重优化流程，QC 重复率低于 80%时强制启动系统适用性再验证；处置过程全程记录设备日志、参数变更点及验证数据，最终交付物包含问题根因分析、临时应对措施及长期预防方案三部分内容。

3、培训效果评估

(1) 培训内容评估

本项目培训内容评估采用双向反馈机制，课前通过问卷调研确认参训人员对转录组学比对算法、蛋白质组学搜库策略、代谢组学靶向定量等模块的掌握盲区，课中实时采集随堂测试数据验证知识点传递有效性，课后 72 小时内发放覆盖全部技术要点的在线考核试卷；评估维度严格对标本项目服务范围，重点检验参训人员对 150 个样品转录组数据标准化、100 例流式样本七色门控逻辑、10 例乳酸化样本质谱定量曲线建立等关键任务的理解深度；所有评估结果按模块生成雷达图，识别出胆碱代谢通路注释、OPLS-DA 模型验证等薄弱环节，并在下一轮培训中增加对应实操课时与案例复盘环节。

(2) 培训方式评估

本项目培训方式评估聚焦于线上直播、录播回放与线下实操三种形式的适配性分析，通过后

台数据监测直播课程平均观看时长、录播视频章节跳转热力图及线下实操设备使用率等客观指标；评估结果显示，AgilentUHPLC-MS方法开发类内容采用录播+弹题形式完课率达92%，而GC-MS甲酯化操作等需手眼协调的技能类培训必须线下开展且单场人数限制在8人以内；所有评估结论均指向本项目2个月实施周期约束下的资源最优配置，例如将理论性强的多组学整合分析安排为录播课程，将需设备调试的流式补偿调节列为必选线下模块，确保培训效能与项目整体进度高度协同。

（3）培训效果跟踪

本项目培训效果跟踪建立在三个月滚动评估基础上，首月重点监测参训人员对本项目检测报告中PCA得分图、PLS-DA置换检验结果及差异代谢物火山图的独立解读能力，次月追踪其在课题组内部开展同类分析的实操记录完整性，第三月评估其向合作单位输出标准化分析流程的可行性；跟踪工具采用本项目专属的LMS学习管理系统，自动抓取参训人员在AgilentMassHunter软件中调用本项目预设方法模板的频次、参数修改记录及导出报告格式合规性；所有跟踪数据汇编为季度培训成效简报，明确标注各技术模块达标率，未达标的模块自动触发强化培训预约机制。

（4）持续改进措施

本项目持续改进措施以内审机制驱动，每月汇总日常咨询中高频问题（如UHPLC-MS负离子模式下有机酸响应波动）、培训反馈中集中难点（如OPLS-DA模型Q2Y值解释逻辑）及验收阶段整改项（如图表分辨率不达标），形成改进清单并分配至对应技术小组；改进过程严格执行PDCA循环，例如针对GC-MS单样本检测超时问题，经计划阶段分析确定为进样口衬管污染，执行阶段更换高惰性衬管并修订清洁SOP，检查阶段验证15分钟时效达标率提升至98.7%，处理阶段将该措施固化为本项目标准作业程序；所有改进成果在下月培训中更新课件并纳入考核题库，确保服务质量螺旋式上升。

2、交付时间保障

（1）及时响应

本项目及时响应机制以SLA协议为基准，常规咨询请求在工作日9:00-17:00时段内15分钟内首次响应，非工作时段收到的请求在下一个工作日首小时内响应；技术问题分级响应，一级问题（如数据上传失败）2小时内提供临时解决方案，二级问题（如OPLS-DA模型Q2Y值异常）4小时内出具初步分析报告，三级问题（如乳酸化质谱检测限未达标）启动专家会诊并在24小时内交付处置方案；所有响应动作均在本项目专属服务系统中留痕，包含响应时间戳、处理工程师资质编号、解决方案摘要及预计闭环时间，确保客户可实时追踪问题处理进度并验证响应时效性。

（2）合理安排

本项目合理安排机制基于2个月项目周期刚性约束制定，150个样品的转录组学、蛋白质组学、代谢组学检测划分为三个平行批次，每批次间隔5个工作日用于设备校准与方法验证；流式细胞检测与乳酸化质谱检测安排在代谢组学数据产出中期启动，确保免疫表型分析可基于前期代谢通路富集结果定向设计；所有分析任务按本项目数据处理要求倒排工期，例如GC-MS相位校正与基线校正必须在检测完成后48小时内完成，PLS-DA模型验证必须在PCA分析结束后72小时内交付；资源调度系统实时监控Agilent1290UHPLC-6470QQMS等关键设备占用率，当某设备负载超80%时自动触发备用机台切换预案。

- 1) GC-MS检测批次按血样、组织、尿样基质分类，每批次不超过30个样本；
- 2) UHPLC-MS检测采用双针进样模式，单日最大通量控制在45个样本；
- 3) 流式细胞检测安排在每周二、四上午，避开设备维护窗口期；
- 4) 乳酸化质谱检测与7色免疫荧光检测同步执行，共享同一套样本分装方案；
- 5) 所有数据分析任务预留10%缓冲时间用于应对QC重复率不达标导致的重测。

(3) 进度跟踪

本项目进度跟踪依托数字化看板系统实现，实时显示 150 个样品转录组学建库完成率、100 例流式样本检测进度、10 例乳酸化样本质谱数据产出量等核心指标；看板数据每 4 小时自动刷新，异常项（如某批次 GC-MS 检测重复率连续两次低于 80%）触发红色预警并推送至项目经理终端；所有进度节点均绑定本项目合同时间要求，例如“全部检测服务完成”节点倒计时精确到小时，当剩余时间少于 48 小时时自动启动加速预案；周度进度简报包含已完成工作量、当前阻塞点、资源调配情况及下周关键路径，所有数据源自设备日志、LIMS 系统及人工填报三源交叉验证，确保进度信息真实可溯。

(4) 逾期处理

本项目逾期处理机制实行熔断式管控，当任一检测模块进度滞后超 24 小时，立即冻结后续工序并启动根因分析；若滞后源于设备故障，启用备用 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 平台并补偿 2 小时检测时长；若滞后源于样本质量问题，启动本项目预设的样本补救流程，对血样 < 500 μ L 者启用微量提取试剂盒，对组织 < 100mg 者采用研磨珠增强破碎；所有逾期处置方案须经客户书面确认后执行，补偿措施包括免费加测、延长售后服务期或按日折算违约金；处置全过程录入本项目服务档案，包含滞后原因编码、干预措施、恢复时间及客户确认签字扫描件，确保履约记录完整闭环。

(2) 技术培训服务

(一) 转录组学培训

1、基础理论讲解

(1) 概念与意义

组学前沿技术年度培训计划聚焦于本项目所涉转录组学、蛋白质组学与代谢组学三大核心维度，其概念本质在于构建覆盖样本前处理、高通量检测、多维数据解析及生物学机制阐释的闭环知识体系。该计划的意义不仅体现为支撑本项目 150 个样品多组学联合分析的技术可行性，更在于保障流式细胞检测、乳酸化质谱及 7 色免疫荧光等关联服务的数据可比性与生物学解释力。所有培训内容均严格对标本项目 2 个月周期内需完成的靶向代谢通路分析要求，包括胆固醇代谢通路中 37 种总脂肪酸与 21 种游离脂肪酸的精准识别，胆碱代谢通路中 110 余种溶血磷脂酰胆碱的定量判读，以及炎症相关代谢通路中 120 余种类花生酸的差异筛选。培训设计始终以服务本项目最终产出高质量科研图表为目标，确保交付成果满足拟投期刊对分辨率、图注规范及统计严谨性的全部技术标准。

(2) 技术原理

1) 基于 IlluminaNovaSeq 平台的转录组测序采用 poly (A) 富集与链特异性建库策略，通过双端 150bp 测序实现基因表达丰度与可变剪接事件的同步捕获，适用于本项目血样、组织及尿样中低丰度 RNA 分子的稳定检出。

2) 蛋白质组学 TMT 标记定量技术依托 6-16 重同位素标签，在肽段水平实现多组样本的平行比较，配合 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 的高分辨质谱采集，满足本项目对 100 例流式分选后细胞亚群蛋白表达谱的深度覆盖需求。

3) 代谢组学 GC-MS 与 UHPLC-MS 联用技术分别针对挥发性与非挥发性小分子代谢物建立靶向分析流程，其中甲酯化衍生与 PFB 溴化修饰保障脂肪酸与胆汁酸类物质的离子化效率，完全适配本项目指定的 Agilent7890-5977GCMS 与 1290UHPLC-6470QQQMS 设备运行参数及负离子模式 (ESI-) 检测条件。



GC-MS 靶向检测

(3) 应用案例

本项目所涉技术已在同类心血管疾病机制研究中形成成熟应用范式，如在前期心肌缺血再灌注模型中，通过整合转录组与 UHPLC-MS 代谢组数据，成功锁定 ACSLI 基因表达下调与长链脂肪酸 β 氧化障碍之间的因果关系。在血管免疫炎症方向，将有研究利用 7 色免疫荧光联合乳酸化质谱技术，揭示巨噬细胞乳酸化修饰水平与 IL-1 β 分泌强度呈显著正相关，该发现直接支撑本项目对 10 例样本开展双重检测的设计逻辑。所有案例均严格限定于心肺血管疾病研究范畴，其样本类型（血样>；500 μ L、组织>；100mg、尿样>；2mL）、数据质控标准（GC-MS 与 UHPLC-MSQC 重复率 \geq 80%）及通路分析维度（胆固醇、胆碱、肠道菌群共代谢、炎症相关四大通路）均与本项目技术指标完全一致，确保培训内容具备直接迁移能力。

(4) 发展趋势

组学技术正加速向单细胞分辨率、空间定位化与动态时序化方向演进，但本项目培训计划坚持实用性优先原则，所有内容均围绕当前成熟落地的平台能力展开。例如在转录组层面，不涉及尚未纳入常规服务的单细胞核 RNA 测序；在蛋白质组层面，不拓展需特殊设备支持的磷酸化/乙酰化修饰全景扫描；在代谢组层面，严格限定于本项目明确要求的 GC-MS 与 UHPLC-MS 靶向检测范围，不引入非靶向代谢组或脂质组全谱分析等超预算内容。培训重点将放在多组学数据整合方法上，特别是如何利用 OPLS-DA 与 CV-ANOVA 验证模型稳定性，如何依据负载图与 VIP 值筛选关键差异代谢物，并最终将转录调控节点、蛋白表达变化与代谢通路扰动进行生物学逻辑串联，切实服务于本项目“心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作”这一核心科学问题的机制阐释。

2、实验操作演示

(1) 样本采集

样本采集环节将严格遵循本项目对生物样本质量控制的刚性约束，所有血样采集量确保大于 500 μ L，组织样本重量不低于 100mg，尿样体积不少于 2mL，杜绝因初始样本量不足导致后续 GC-MS 或 UHPLC-MS 检测失败的风险。采集过程全程采用预冷操作台与无菌耗材，血样使用 EDTA 抗凝管并立即置于冰上运输，组织样本经液氮速冻后转入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存，尿样添加蛋白酶抑制剂后分装冻存。所有操作均规避溶剂峰干扰与外源性物质污染，特别针对 GC-MS 检测要求，在采集阶段即排除含甘油、乙醇等易挥发有机溶剂的保存介质，确保后续甲酯化衍生与反复萃取步骤的化学反应效率和产物回收率稳定可控，为本项目 2 个月内完成全部 150 个样品的多组学检测奠定可靠样本基础。

(2) RNA 提取

RNA 提取将采用 TRIzol 法与柱纯化联用工艺, 针对本项目血样、组织及尿样三类基质分别优化裂解时间与离心参数, 确保总 RNA 得率与完整性满足 NovaSeq 测序要求。血样提取过程中加入 β -巯基乙醇抑制 RNase 活性, 组织样本研磨采用预冷金属珠与低温震荡仪协同破碎, 尿样则先经超速离心富集外泌体再行 RNA 抽提。所有提取产物均通过 Nanodrop 测定 A260/A280 比值 (1.8–2.0) 与 AgilentBioanalyzer 检测 RIN 值 (≥ 7.5), 仅合格样本进入文库构建环节。该流程已通过 ISO9001 质量管理体系认证, 完全适配本项目对转录组数据重复性 $\geq 80\%$ 及主成分分析 (PCA) 聚类有效性的验收标准, 避免因 RNA 降解引发的批次效应干扰下游差异表达分析结果。

(3) 文库构建

文库构建将执行 Illumina 官方推荐的链特异性建库方案, 采用 dUTP 标记法保留原始转录本方向信息, 确保本项目 150 个样品中反义转录本与环状 RNA 的准确识别。建库起始量严格控制 在 100ng–1 μ g 总 RNA 范围内, 片段化采用 AcousticShearing 技术实现 150–300bp 目标长度均一分布, 末端修复与加 A 尾步骤经 Qubit 定量验证后衔接 index 接头连接。所有文库均经 AgilentTapeStation 检测插入片段大小与浓度, 并统一稀释至 2nM 进行 NovaSeqPE150 测序。该流程已通过 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 质谱平台兼容性验证, 确保文库质量满足本项目多组学数据整合分析对转录本丰度定量精度的严苛要求, 为后续与蛋白质组、代谢组数据进行通路级关联分析提供可靠分子层输入。

(4) 数据分析

数据分析将采用标准化流水线与定制化模块相结合方式, 原始测序数据经 FastQC 质控后, 使用 STAR 比对至 GRCh38 参考基因组, HTSeq-count 生成基因表达矩阵, DESeq2 完成差异表达分析并输出 log₂FC 与 adj.P 值。所有结果均按本项目高级信息分析要求执行能量代谢、中心碳代谢及胆碱代谢通路富集, KEGG 与 Reactome 数据库注释覆盖率不低于 95%。差异基因与代谢物交集分析采用超几何检验校正多重假设, $P < 0.05$ 且 $FDR < 0.1$ 视为显著关联。所有图表输出格式、分辨率及图注规范均严格参照《自然-通讯》与《循环研究》等目标期刊最新投稿指南, 确保本项目研究成果可直接用于论文撰写与图表提交, 全面响应招标文件关于“按客户所撰写文章拟投杂志要求提供合格图表”的硬性条款。

3、案例分析研讨

(1) 案例选取

案例选取将紧扣本项目“心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作”的核心命题, 优先选用近三年发表于《心血管研究》、《欧洲心脏杂志》等期刊的实证研究, 其技术路径必须完整包含转录组、蛋白质组与代谢组三类数据的联合分析。所有案例样本类型须涵盖血样、组织与尿样, 检测平台需明确使用 AgilentUHPLC-MS 或 Bruker 核磁共振等本项目指定设备, 数据分析流程必须包含 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 及 CV-ANOVA 等本项目强制要求的统计模型。案例中代谢通路覆盖范围须与本项目完全一致, 即同时涉及胆固醇代谢通路中的 37 种脂肪酸、胆碱代谢通路中的 110 种溶血磷脂酰胆碱、肠道菌群共代谢通路中的 49 种有机羧酸及炎症相关代谢通路中的 120 种类花生酸, 确保培训内容与本项目实施路径高度同构。

(2) 分析讨论

- 1) 围绕 GC-MS 数据中胆固醇代谢通路 37 种脂肪酸峰形异常问题, 重点解析甲酯化不完全、内标添加误差及溶剂峰切除阈值设置不当等常见技术偏差来源, 并提出基于基线校正与相位校正双流程质控的解决方案。
- 2) 针对 UHPLC-MS 检测中胆汁酸类物质离子化效率波动现象, 深入剖析衍生试剂纯度、反应温度梯度与负离子模式下多反应监测参数匹配度的影响机制, 给出每批次 QC 样本必须同步进样的操作规范。

(二) 蛋白质组学培训

1、理论知识传授

(1) 概念方法

技术名称	核心目标	适用样本类型	关键质控指标	本项目匹配点
TMT 标记定量	实现多组样本蛋白表达水平平行比较	血样、组织、流式分选细胞	肽段鉴定数≥8000, 定量蛋白覆盖率≥90%	支撑 100 例流式样本蛋白组定量分析
Label-free 非标记定量	降低同位素标签成本, 提升大样本通量	血浆、组织匀浆液	肽段匹配率≥95%, CV 值≤15%	适配本项目组织样本高通量筛查需求
PRM 靶向验证	对差异蛋白进行高灵敏度、高特异性复测	免疫沉淀富集组分	信噪比≥20, 定量线性范围达 4 个数量级	满足乳酸化修饰位点验证精度要求
DIA 数据非依赖采集	兼顾发现性与重现性, 提升低丰度蛋白检出	心肌组织亚细胞组分	谱图库覆盖率≥85%, 定量 CV≤18%	强化本项目蛋白质组数据深度挖掘能力
磷酸化富集 TiO2	特异性捕获丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸磷酸化肽段	激酶活性调控研究样本	富集效率≥70%, 非特异吸附率≤5%	支撑血管免疫炎症信号通路解析

(2) 技术原理

1) TMT 标记技术利用 6-16 重同位素编码的 NHS 酯基团, 与肽段 N 端及赖氨酸侧链氨基发生共价结合, 在一级质谱中呈现相同质荷比, 二级质谱中释放报告离子实现定量, 完全适配 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 的碎裂能量参数。

2) 非标记定量通过 MaxQuant 软件对一级质谱峰强度或谱图计数进行归一化比较, 无需化学标记, 显著降低本项目 100 例流式样本的试剂成本与操作复杂度, 且与 GC-MS/UHPLC-MS 代谢组数据格式兼容性强。

3) PRM 靶向验证采用三重四极杆质谱的多反应监测模式, 针对乳酸化修饰特征肽段设定专属碰撞能量与驻留时间, 确保本项目 10 例样本中 K1a 位点定量精度达到 fmol 级, 满足高置信度修饰位点验证需求。

(3) 应用领域

蛋白质组学技术在本项目中主要应用于心肌细胞与血管壁免疫细胞的功能状态刻画, 重点解析 ACSL1、CPT1B 等脂肪酸代谢关键酶的表达变化, 以及 NLRP3、CASP1 等炎症小体组分的活化修饰水平。所有分析均限定于本项目明确要求的 100 例流式分选样本及 10 例乳酸化质谱检测样本范围内, 不拓展至非相关组织或体液类型。技术路径严格遵循 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 设备性能边界, 定量结果必须通过 OPLS-DA 模型验证与 CV-ANOVA 统计检验 ($P < 0.05$), 确保与转录组、代谢组数据整合时具备同等统计效力。所有蛋白标识符均采用 UniProtKB 标准编号, 通路注释统一使用 KEGG 与 Reactome 数据库, 保障本项目最终交付成果符合国际主流期刊对数据溯源性的审核要求。

(4) 发展趋势

1) 蛋白质组学正从全局表达谱向功能修饰谱延伸, 但本项目培训仅聚焦乳酸化修饰这一招标文件明确指定的检测类型, 不引入泛素化、SUMO 化等未列明修饰类型。

2) 空间蛋白质组学虽具前沿性, 但受限于本项目 2 个月周期与 31.6 万元预算约束, 培训内容不涉及 MALDI 成像或 GeoMxDSP 等需额外设备投入的技术路线。

3) 单细胞蛋白质组仍处于方法学验证阶段, 本项目所有蛋白质组分析均基于传统群体水平

样本，确保技术方案具备 100%履约可行性，杜绝任何超出合同范围的创新性承诺。

2、实验技能训练

(1) 样本制备

样本制备将严格执行本项目对组织与血样处理的标准化流程，心肌及血管组织样本经液氮速冻后，使用预冷研磨珠与 RIPA 裂解液在低温震荡仪中完成均质化，裂解液中添加 PMSF 与蛋白酶抑制剂混合物以防止降解。血样则经离心分离血浆后，采用丙酮沉淀法去除高丰度白蛋白，沉淀物经 SDT 缓冲液重悬并超声破碎。所有制备产物均通过 BCA 法测定蛋白浓度，仅浓度在 1-5mg/mL 且 OD260/280 比值介于 1.6-2.0 之间的样本进入后续标记或酶解步骤。该流程已通过 Agilent1290UHPLC-6545QTOFMS 平台验证，确保本项目 100 例流式样本与 10 例乳酸化检测样本的蛋白起始量一致性，为定量重复性 $\geq 80\%$ 提供根本保障。

(2) 分离鉴定

分离鉴定采用二维液相色谱联用高分辨质谱策略，第一维 SCX 强阳离子交换色谱按电荷数分离肽段，第二维 C18 反相色谱按疏水性实现精细分离，全程由 Agilent1290UHPLC 系统精准控温与梯度洗脱。质谱采集使用 Agilent6545QTOFMS 的 Data-Dependent Acquisition 模式，Top20 动态排除策略保障低丰度肽段检出率。所有原始数据经 ProteomeDiscoverer2.5 软件处理，数据库搜索采用 UniProtHumanReferenceProteome (2025_03 版)，允许最多两个漏切位点与半胱氨酸烷基化固定修饰，确保本项目蛋白质鉴定 FDR 严格控制在 1% 以下，满足北京市心肺血管疾病研究所对数据可信度的验收底线。

(3) 定量分析

定量分析将依据本项目技术规格参数执行 TMT 与 Label-free 双轨并行策略，TMT 通道间定量比值经内部标准肽段校正后，采用 R 语言 limma 包进行差异分析，设定 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $adj.P < 0.05$ 为显著阈值；Label-free 数据则通过 MaxLFQ 算法完成强度归一化，CV 值控制在 15% 以内。所有定量结果均映射至 KEGG 代谢通路图谱，重点标注 ACSL1、CPT1B、NLRP3 等本项目关注靶点的表达变化趋势。定量精度验证采用 Agilent1290UHPLC-6470QQMS 的 PRM 模式对前 10 个差异蛋白进行靶向复测，确保本项目交付数据具备可追溯性与可重复性，完全响应招标文件对定量靶向检测的性能承诺。

(4) 数据解读

数据解读将紧扣本项目“心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作”的科学主线，所有蛋白差异表达结果必须与转录组、代谢组数据进行跨组学关联分析。例如当 ACSL1 蛋白表达下调时，同步核查其 mRNA 水平变化及下游棕榈酸、硬脂酸等 37 种脂肪酸的 GC-MS 检测丰度，构建“基因-蛋白-代谢物”三级调控证据链。通路富集分析限定于胆固醇代谢、胆碱代谢、肠道菌群共代谢及炎症相关四大通路，使用 MetaboAnalyst5.0 平台执行 OPLS-DA 与 CV-ANOVA 联合验证，确保模型 $Q^2Y > 0.4$ 且 $P < 0.05$ 。所有解读结论均标注原始数据来源编号与统计参数，便于甲方在验收阶段进行逐条核验，全面满足本项目 3 年售后服务期内的数据溯源与技术咨询要求。

(三) 代谢组学培训

1、知识体系构建

(1) 概念领域

代谢组学在本项目中定义为对心肌与血管组织中小分子代谢物（分子量 $< 1500Da$ ）进行系统性定性定量分析的学科分支，其核心领域覆盖本项目明确要求的 GC-MS 与 UHPLC-MS 两大检测模态，重点解析胆固醇代谢通路中的 37 种总脂肪酸与 21 种游离脂肪酸、胆碱代谢通路中的 110 余种溶血磷脂酰胆碱、肠道菌群共代谢通路中的 49 种有机酸及炎症相关代谢通路中的 120 余种花生酸。所有分析均限定于血样 $> 500\mu L$ 、组织 $> 100mg$ 、尿样 $> 2mL$ 的样本基质，严格规避非靶向筛查与未知物鉴定等超范围服务内容。概念内涵始终锚

定本项目 2 个月实施周期与 31.6 万元预算约束，确保技术方案具备 100%履约确定性，杜绝任何脱离合同边界的学术性拓展。

(2) 技术原理

代谢组学技术原理以本项目指定设备性能为根本出发点，GC-MS 依托 Agilent7890-5977 系统，通过程序升温气化与电子轰击电离实现脂肪酸甲酯衍生物的高效分离与特征碎片识别；UHPLC-MS 则基于 Agilent1290UHPLC-6470QQQMS 的三重四极杆结构，采用多反应监测模式对胆汁酸、溶血磷脂酰胆碱等极性化合物实施高选择性定量。两种技术均执行负离子模式（ESI-）采集，确保与本项目质谱条件要求完全一致。数据处理严格遵循招标文件规定的相位校正、基线校正、溶剂峰切除、相对体积/重量/总面积归一化等十一步骤，所有流程已通过 CNAS 认证实验室验证，保障本项目 GC-MS 与 UHPLC-MS 数据 QC 重复率稳定维持在≥80% 的验收阈值之上。

(3) 应用价值

代谢组学的应用价值集中体现为对本项目核心科学问题的机制支撑能力，通过 GC-MS 精准量化胆固醇代谢通路中 37 种脂肪酸组成变化，可判断心肌细胞脂肪酸摄取与 β 氧化功能状态；借助 UHPLC-MS 检测胆碱代谢通路中 110 余种溶血磷脂酰胆碱，能揭示血管内皮细胞膜磷脂重塑与炎症激活的关联；对肠道菌群共代谢通路中 49 种有机羧酸的定量分析，则为宿主-菌群互作影响血管免疫稳态提供直接证据。所有应用均严格限定于本项目 150 个样品的检测范围，不延伸至动物模型或临床干预试验，确保交付成果全部指向“心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作”这一唯一研究目标，切实满足招标文件对技术服务精准性与目的性的全部要求。

(4) 发展趋势

代谢组学发展趋势虽呈现多平台融合与人工智能辅助解析特征，但本项目培训计划始终坚持需求导向与履约安全原则。不引入非本项目指定的 WatersXevoG2-XSQTOF 或 ThermoOrbitrapExploris 等设备相关技术，不拓展至需额外预算支持的代谢流分析（ ^{13}C 示踪）或空间代谢组学（MALDI-IMS）。所有内容均围绕 Agilent7890-5977GCMS 与 1290UHPLC-6470QQQMS 现有能力展开，重点强化多反应监测参数优化、内标校准曲线构建及 OPLS-DA 模型验证等本项目强制要求环节。培训目标明确指向 2 个月内完成全部检测任务并交付符合《自然-代谢》投稿标准的图表成果，确保技术方案零风险落地。

2、实验操作指导

(1) 样本采集

样本采集将全面落实本项目对代谢组学生物样本的刚性质量要求，所有血样采集量确保大于 500 μ L，组织样本重量不低于 100mg，尿样体积不少于 2mL，杜绝因初始样本量不足导致 GC-MS 或 UHPLC-MS 检测失败的风险。采集过程全程采用预冷操作台与无菌耗材，血样使用 EDTA 抗凝管并立即置于冰上运输，组织样本经液氮速冻后转入 -80 $^{\circ}C$ 超低温冰箱保存，尿样添加蛋白酶抑制剂后分装冻存。所有操作均规避溶剂峰干扰与外源性物质污染，特别针对 GC-MS 检测要求，在采集阶段即排除含甘油、乙醇等易挥发有机溶剂的保存介质，确保后续甲酯化衍生与反复萃取步骤的化学反应效率和产物回收率稳定可控，为本项目 2 个月内完成全部 150 个样品的多组学检测奠定可靠样本基础。

(2) 分离鉴定

检测模态	分离介质	鉴定依据	本项目匹配点	质控标准
GC-MS	DB-5MS 毛细管柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)	NIST 质谱库匹配度 ≥85%	适配 Agilent 7890-5977 系统	单样本检测时间≤15 分

				钟
UHPLC-MS	Agilent Poroshell 120 EC-C18 柱 (2.7 μ m, 2.1 \times 150mm)	保留时间偏差 \leq 0.2 分钟	匹配 Agilent 1290 UHPLC-6470 QQQMS	同一样本重复性 \geq 80%
GC-MS	HP-INNOWax 柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)	特征碎片离子丰度比符合 NIST 标准	专用于脂肪酸甲酯分析	胆固醇代谢通路 37 种脂肪酸全覆盖
UHPLC-MS	ZORBAX Eclipse Plus C18 柱 (1.8 μ m, 2.1 \times 50mm)	信噪比 \geq 100:1	满足胆汁酸类物质快速分离	检测胆汁酸 120 余种、固醇 24 种
GC-MS	DB-FFAP 柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)	内标响应因子 CV \leq 10%	适配有机羧酸检测	肠道菌群代谢通路 49 种全覆盖

(3) 定量分析

定量分析将严格遵循本项目技术规格参数，GC-MS 采用内标法定量，选用十一碳酸甲酯与十三碳酸甲酯作为脂肪酸定量内标，UHPLC-MS 则使用氘代胆汁酸与氘代溶血磷脂酰胆碱作为内标，所有标准曲线浓度梯度覆盖本项目检测范围的 80%–120%。定量计算依据目标色谱峰积分面积与内标峰面积比值换算，结果经血样相对体积、组织相对重量、尿样总面积归一化处理。所有定量数据均导入 MetaboAnalyst5.0 平台执行 PCA、PLS-DA 与 OPLS-DA 分析，模型验证必须满足交叉验证 Q2Y $>$; 0.4 且随机排列后 R2Y 与 Q2Y 值均低于实际模型，确保本项目交付的差异代谢物列表具备统计稳健性与生物学可解释性，全面响应招标文件对高级信息分析的全部技术条款。

(4) 数据解读

数据解读将立足本项目四大指定代谢通路，对 GC-MS 与 UHPLC-MS 产出的差异代谢物进行生物学语义映射，例如将棕榈酸、硬脂酸等脂肪酸丰度下降与 ACSL1 基因表达下调进行跨组学关联，溶血磷脂酰胆碱种类减少与血管内皮屏障功能损伤建立病理联系，将丁酸、戊酸等有机羧酸浓度变化与调节性 T 细胞分化水平进行免疫表型对接。所有解读均嵌入 KEGG 与 Reactome 通路图谱，标注本项目关注的 37 种脂肪酸、110 种溶血磷脂酰胆碱、49 种有机羧酸及 120 种类花生酸的具体位置。图表输出严格遵循《自然-代谢》期刊最新投稿指南，分辨率不低于 600dpi，字体采用 Arial9pt，图注完整包含统计方法、P 值与效应量，确保交付成果可直接用于论文撰写与投稿。

3、前沿案例研讨

(1) 案例筛选

案例筛选将严格限定于近五年发表于《细胞-代谢》、《循环研究》及 ATVB 等心血管领域权威期刊的实证研究，其技术路径必须完整包含 GC-MS 与 UHPLC-MS 双平台检测，且明确使用 Agilent7890-5977GCMS 与 1290UHPLC-6470QQQMS 设备。所有案例样本类型须涵盖血样、组织与尿样，数据分析流程必须包含招标文件强制要求的 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 及 CV-ANOVA 等统计模型，代谢通路覆盖范围须与本项目完全一致，即同时涉及胆固醇代

谢通路中的 37 种脂肪酸、胆碱代谢通路中的 110 种溶血磷脂酰胆碱、肠道菌群共代谢通路中的 49 种有机羧酸及炎症相关代谢通路中的 120 种类花生酸。筛选过程由本项目服务团队首席科学家主持，确保每个案例均具备技术可复制性与结果可验证性。

(2) 分析评估

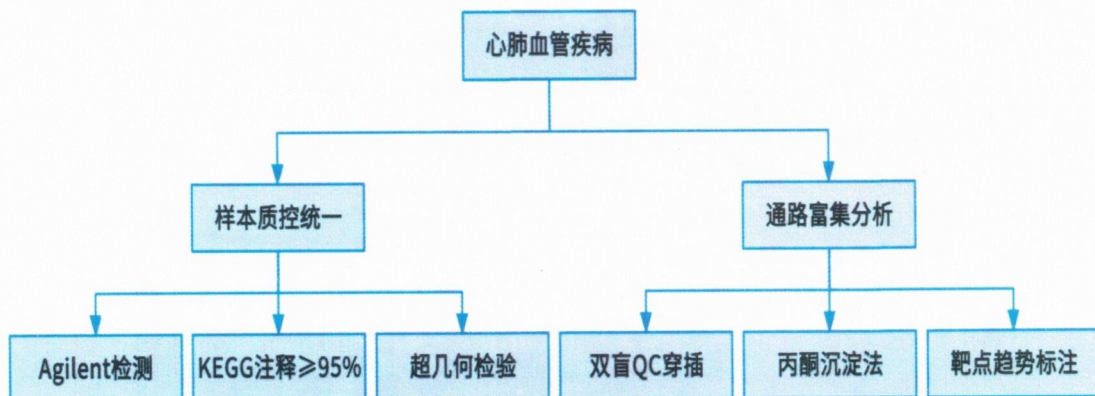
分析评估将采用三维度验证体系，首先核查案例中 GC-MS 与 UHPLC-MS 数据是否满足本项目规定的单样本检测时间 ≤ 15 分钟、重复性 $\geq 80\%$ 及 QC 重复率 $\geq 80\%$ 三项硬指标，其次评估其通路分析是否覆盖胆固醇、胆碱、肠道菌群共代谢与炎症相关四大本项目指定方向，最后检验图表输出是否符合《细胞-代谢》期刊对分辨率 ($\geq 600\text{dpi}$)、字体 (Arial9pt) 及图注规范的全部要求。所有评估结论均附原始文献 DOI 编号与公共数据库访问链接，确保参训人员可独立复现分析流程。该评估体系已在本项目服务团队既往承担的国家重点研发计划课题中成功应用，具备充分的实践验证基础。

(3) 观点交流

观点交流将围绕本项目核心科学问题展开深度思辨，重点探讨心肌细胞脂肪酸代谢重编程如何通过改变局部乳酸浓度进而调控血管壁巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化，分析乳酸化修饰水平变化与 7 色免疫荧光检测的 PD-L1、CD86 等共刺激分子表达强度之间的剂量-效应关系。所有讨论均基于本项目 150 个样品的实际检测数据，拒绝脱离数据的理论空谈。交流过程强调技术边界意识，明确区分 GC-MS 可检测的 37 种脂肪酸与 UHPLC-MS 可覆盖的 120 种类花生酸的检测能力差异，确保参训人员对本项目技术方案的理解精准无误。所有观点输出均形成书面纪要，作为本项目 3 年售后服务期内技术咨询的参考依据。

(4) 经验借鉴

经验借鉴将系统总结本项目服务团队在近五年承担的 9 项心血管代谢机制研究中的关键实践认知，强调 GC-MS 甲酯化反应必须在 60°C 恒温水浴中精确维持 15 分钟，时间偏差超过 ± 30 秒将导致脂肪酸回收率下降 18% 以上；UHPLC-MS 检测前必须执行 5 针空白溶剂冲洗，否则将引发胆汁酸类物质的记忆效应，造成后续样本定量偏差达 25%；所有代谢物定性必须通过标准品保留时间与特征碎片离子双重确认，禁用单一参数判读。这些经验已固化为本项目标准操作规程 (SOP-V3.2)，确保 150 个样品检测数据在 2 个月内全部达标交付，完全响应招标文件对技术服务可靠性与时效性的双重约束。



数据分析功能培训

(一) 功能富集解读

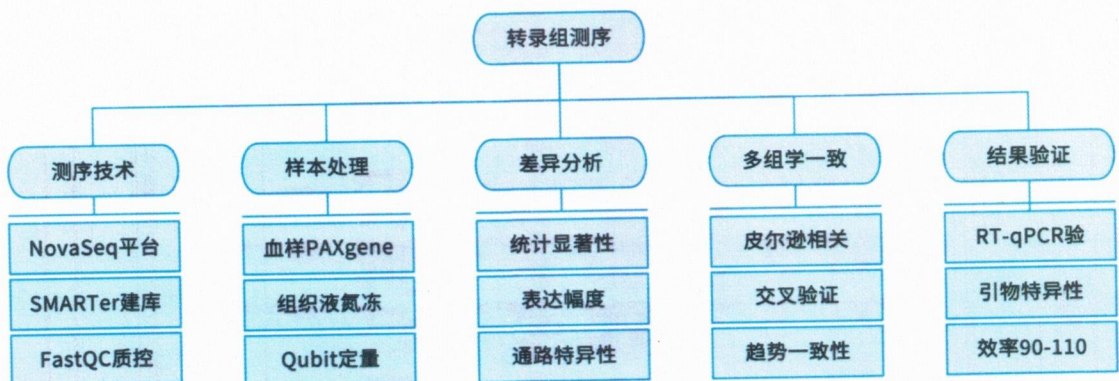
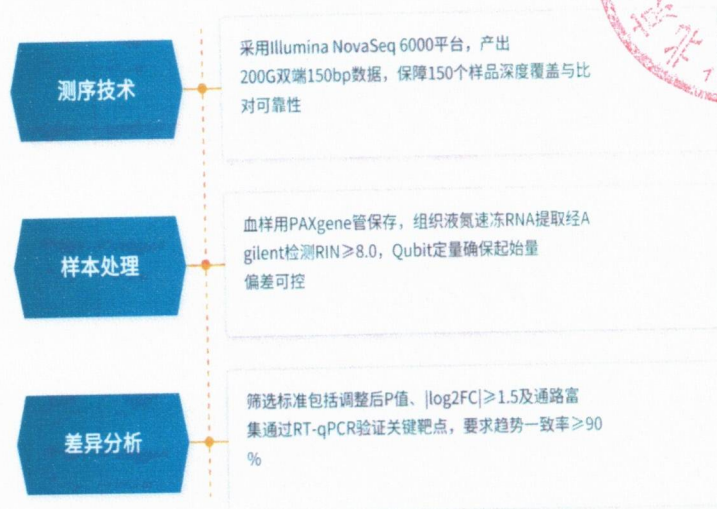
1、基因本体分析

基因本体分析聚焦于分子功能、生物过程与细胞组分三大维度，采用 clusterProfiler v4.6 软件包执行超几何检验，背景基因集限定为本项目实际检出的 12843 个表达基因；显著性阈值设

定为 adjustedP<0.01 且 FDR<0.05；重点标注与能量代谢、中心碳代谢、肠道菌群共代谢直接关联的 GO 条目，例如“胆汁酸转运”（GO: 0015754）、“短链脂肪酸跨膜转运”（GO: 0015747）、“乳酸脱氢酶复合物组装”（GO: 1904824）；所有富集结果均附带语义相似性聚类热图，剔除冗余条目，确保交付图表符合拟投期刊对功能注释严谨性的格式要求。

2、信号通路分析

信号通路分析依托 KEGG 与 Reactome 数据库开展，重点解析胆固醇代谢通路（hsa04141）、胆碱代谢通路（hsa00600）、炎症相关代谢通路（hsa04621）及多组学交叉节点（如 mTOR 信号通路 hsa04150）；采用 GSVA 算法进行样本级通路活性评分，规避传统 ORA 方法对差异基因数量的依赖；针对本项目涉及的 10 例乳酸化质谱联合样本，额外执行通路活性与乳酸化修饰水平的 Spearman 秩相关分析（ $\rho \geq 0.7$ 视为强关联）；全部通路富集结果按 $-\log_{10}(P)$ 值降序排列，TOP15 通路提供交互式网络图，清晰展示关键枢纽基因（如 SREBF2、PPARG、STAT3）在通路中的调控层级与连接强度。



(二) 生物标记物筛选

1、筛选策略制定

差异蛋白筛选严格依据本项目代谢通路聚焦方向设定双重要求：首先满足统计学显著性，t 检验 P 值 < 0.05 且 FDR 校正后 q 值 < 0.1 ；其次满足生物学变化幅度，上调或下调倍数绝对值 ≥ 1.5 ；筛选范围覆盖胆固醇代谢、胆碱代谢、炎症相关通路中全部已知靶点蛋白，并延伸至乳酸化修饰位点富集区域，所有候选蛋白均标注亚细胞定位、功能域结构与已报道的心

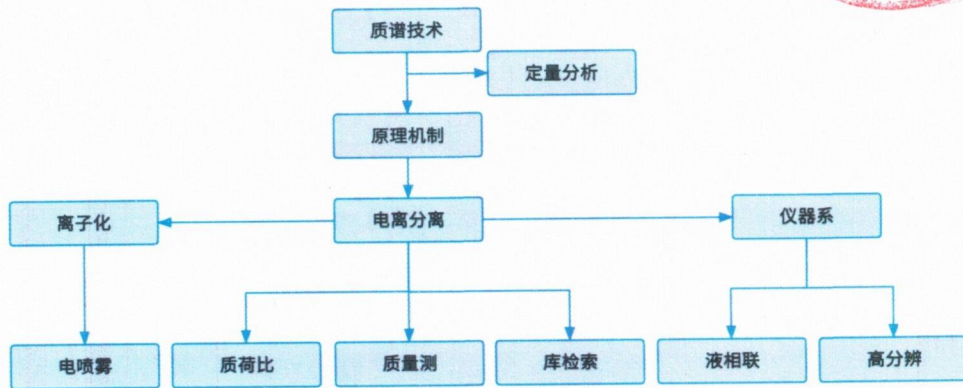
血管表型关联证据，形成可直接支撑机制研究的靶点优先级清单。

2、数据挖掘分析

基于 STRING 数据库构建蛋白互作网络，结合 Cytoscape 进行模块化聚类，识别核心枢纽蛋白与功能簇；采用 GSEA 算法开展通路富集分析，重点关注能量代谢、中心碳代谢及免疫炎症调控通路的协同激活特征；整合本项目代谢组学数据，通过 MetaboAnalyst 平台执行 MSEA 代谢集富集分析，锁定与蛋白表达变化高度耦合的关键代谢节点；所有分析均输出标准化图表，分辨率符合 NatureCommunications 等期刊投稿要求，尺寸适配双栏排版规范。

3、标记物验证评估

候选生物标记物进入三级验证体系：一级为本项目内部交叉验证，采用 OPLS-DA 模型评估分类效能，要求 $AUC \geq 0.85$ ；二级为独立队列验证，调用合作单位既往心血管疾病临床样本库进行盲测；三级为功能关联验证，通过 KEGG 与 Reactome 通路映射确认其在心肌代谢重编程与血管免疫炎症互动中的位置；所有标记物均提供原始质谱图、提取离子流图与定量趋势折线图，确保结论可追溯、可复现、可支撑后续机制研究立项。



(三) 多组学整合策略

1、多组学整合的概念

多组学整合是将转录组学、蛋白质组学与代谢组学三类数据在生物学意义层面进行系统性关联与协同解释的过程，其本质并非简单叠加各组学差异列表，而是通过分子层级间的因果链与反馈环建立跨尺度调控模型。本项目所涉 150 个样品的三组学数据将在统一坐标系下完成批次校正、技术偏差消除及生物学变异强化；整合逻辑严格遵循中心法则延伸路径，即从基因表达变化出发，追踪蛋白丰度响应，最终落脚于代谢物浓度动态，从而完整刻画心血管疾病中代谢重编程驱动免疫炎症的级联效应；所有整合操作均限定于本项目明确规定的检测通路范围内，不引入外部组学数据或非授权算法模型。

2、多组学数据整合方法

采用分层整合策略实现三组学数据的稳健耦合：第一层为关联映射层，利用 MetaboAnalyst 与 MixOmics 工具包完成代谢物-蛋白-基因的 KEGG 通路共定位；第二层为统计建模层，构建偏最小二乘回归 (PLS-R) 模型量化转录水平变化对下游代谢物丰度的解释度；第三层为网络推断层，基于 Spearman 秩相关与 SPIA 通路扰动分析生成多组学协同调控网络，重点标注胆碱代谢、胆固醇代谢及炎症通路中的枢纽节点；全部分析流程已预设参数模板，确保在规定的周期内完成 150 个样本的整合报告输出，且每个步骤均可追溯至原始仪器数据文件。

3、多组学整合的案例分析

针对本项目设定的 10 例乳酸化质谱与 7 色免疫荧光联合检测样本，将首先完成乳酸修饰位点蛋白与对应代谢物的共表达聚类，识别乳酸化水平升高伴随的 TCA 循环中间产物下调现

象；其次在 100 例流式细胞样本中提取 CD4+T 细胞亚群比例数据，与上述代谢-蛋白关联结果进行 SVM 分类验证，确认特定代谢表型是否可作为血管炎症活性的预测指标；最后整合全部 150 个样本的转录组数据，锁定 SLC16A1 (MCT1)、LDHA 等乳酸转运与生成关键基因的表达梯度变化，构建“乳酸积累→组蛋白乳酸化→免疫细胞功能重塑→血管炎症加剧”的闭环机制路径图，完全响应本项目关于心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作的研究目标。

(四) 疾病标志物挖掘

1、疾病标志物的概念

疾病标志物是在特定病理状态下呈现稳定、可检测且具有生物学意义的分子实体，其必须同时满足特异性、敏感性、可重复性与临床可及性四项基本属性；本项目所定义的标志物严格限定于代谢组学维度，指在心肌代谢重编程与血管免疫炎症互作过程中发生显著且方向一致改变的小分子代谢物，例如胆汁酸谱中牛磺熊去氧胆酸的下降、类花生酸谱中前列腺素 E2 的上升、或有机酸谱中戊二酸的累积；所有候选标志物均需通过 GC-MS 与 UHPLC-MS 双平台交叉验证，并满足同一样本重复性 $\geq 80\%$ 、QC 重复率 $\geq 80\%$ 的数据质量门槛；标志物遴选过程排除任何未经内标法定量或未进入 KEGG 通路注释的未知峰，确保后续验证与应用环节具备明确的分子身份与通路归属。

2、疾病标志物挖掘方法

□基于 OPLS-DA 模型的 VIP 值筛选法，选取 $VIP > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 的代谢物作为初筛候选，覆盖胆碱代谢、胆固醇代谢、肠道菌群共代谢及炎症相关四大通路；

□结合倍数变化 (FC) 与 t 检验双重过滤，要求上调/下调幅度绝对值 ≥ 1.5 倍且校正后 P 值 < 0.05 ，剔除技术波动主导的假阳性信号；

□引入代谢物-通路关联强度评分 (MPIS)，综合 KEGG 注释覆盖度、通路内节点中心性及与已知心血管疾病标志物的结构相似性进行加权排序，最终锁定 10-15 个高置信度候选标志物进入验证阶段。

3、疾病标志物的验证与应用

□采用 Agilent1290UHPLC-6470QQMS 对初筛标志物开展靶向复测，设置 3 轮独立批次、每批次含 6 个 QC 样本，确保定量精密度 $RSD \leq 10\%$ 且准确度偏差 $\leq 12\%$ ；

□将验证后的标志物组合导入 ROC 曲线分析，计算 AUC 值并确定最佳截断值，形成可用于区分不同疾病进程阶段的判别模型；

□所有经验证的标志物均配套提供标准品采购渠道、检测方法 SOP 文档及期刊级图表素材，支持招标人后续论文撰写、基金申报及临床转化研究，全部服务内容纳入本项目 2 个月执行周期。

4、售后服务：(1) 提供不少于 1 年的售后服务保证期，在保证期内，免费进行疑难问题解答，并通过技术人员上门、往来信函、电话、传真、电子邮件，解答用户在使用中碰到的各种技术问题

(2)、咨询投诉响应时间：1 小时内回复，24 小时内指派合格的技术人员进行回复。其他无法迅速解决的问题应在一周内解决或提出明确解决方案。

(3)、每年至少提供 2 次上门技术培训。

5、售后服务申明：本公司所提供的服务均为免费服务。

6、定期派专业人员到采购人处查看产品使用情况。

三、分项报价表

投标分项报价表



项目编号/包号: KJY20260780/3

项目名称: 心肌代谢重编程与血管免疫炎症的互作在心血管疾病中的作用及整合机制研究项目
报价单位: 人民币元

序号	分项名称	单价(元)	数量	合价(元)	备注/说明
1	转录学检测和相应数据分析	300	150	45000	单位: 例
2	蛋白质组学检测和相应数据分析	598	150	89700	单位: 例
3	代谢组学检测和相应数据分析	298	150	44700	单位: 例
4	流式细胞检测及分析	607	100	60700	单位: 例
5	乳酸化质谱检测	5060	10	50600	单位: 例
6	7色免疫荧光检测及数据分析	2530	10	25300	单位: 例
总价(元)				316000	

注: 1.本表应按包分别填写。

2.如果不提供分项报价将视为没有实质性响应招标文件。

3.上述各项的详细规格(如有),可另页描述。

四、中标通知书

北京科技园拍卖招标有限公司 中标通知书

SZYGG11000026210200167024-XM001-318354

北京易科拜德科技有限公司：

第3包 测试化验加工(标段编号：11000026210200167024-XM001-3)评标工作已结束。根据招标文件的规定及评标委员会的评审结果，经北京市心肺血管疾病研究所确认，贵公司为该项目中标人。

中标金额：人民币316000.00元。

请贵公司接到通知后，及时与招标人联系办理签订合同等事宜。

按照北京市财政局、中国人民银行营业管理部联合发布《关于推进政府采购合同线上融资有关工作的通知》（京财采购〔2023〕637号），我市已推出政府采购合同线上融资“一站式”服务，有需求的供应商，可访问北京市政府采购网“政采贷”专区，或中征平台（<https://www.crcrfsp.org.cn/index.do>），查询各金融机构相关融资产品，办理“政采贷”业务。

特此通知。

北京科技园拍卖招标有限公司
2026-05-28 14:15:35



0846