

发放日期	
归档日期	
指导教师(签字)	
第 2 本	共 本

苏州大学研究生科研记录本

(自然科学类专业用)



论文题目: 用于免疫调控的工程化脂质纳米颗粒的构建及其抗肿瘤-抗感染双效研究

培养单位: 药 学 院

专 业: 药学硕士(专业学位)

姓 名: 任 雨 萱

学 号: 20245226020

指导教师: 李盛亮, 殷黎晨

使用起止时间: 2025年4月17日至

记录起止页码: 5-1

实验目的: 使用BioLegend的MojoSort™ Mouse CD8 T Cell Isolation kit (Cat: 480007, Lot: B437620, 10 tests) 分离OT-1小鼠脾脏的CD8⁺T细胞, 用于后续与BMDL细胞的共培养。

→ 0326新冰箱4℃
倒数第一层紫色
盒子。

实验原理: 将样本与生物素抗体混合物孵育, 接着用链霉亲和素磁珠孵育。
非CD8⁺T细胞会被磁珠标记; 借助磁力分离器, 标记的部分被留存, 倾侧液体收集未被标记的CD8⁺T细胞, 用于共培养等实验。

magnetic Streptavidin Nanobeads.

试剂准备: MojoSort™ Buffer (5x), MojoSort™ Magnet, 70μm滤网。

- 实验步骤:
- ① 从脾脏中制备细胞, 重悬于MojoSort™ Buffer中 (≤4 mL) (ddH₂O稀释)
 - ② 70μm滤器过滤细胞, 300g离心5min, 重悬在适量MojoSort™缓冲液里, 调整浓度到 1×10^8 cells/ml
 - ③ 加生物素抗体混合物, 取100μl细胞悬液 (10^7 细胞) 到新管, 加10μl生物素抗体混合物, 混匀, 冰上孵育15分钟。
 - ④ 加链霉亲和素磁珠, 加10μl磁珠, 混匀, 冰上孵育15分钟。
 - ⑤ 加2.5 mL MojoSort™缓冲液, 吹散。
 - ⑥ 把管子放磁体里5分钟后, 倾侧并收集液体, → 目标细胞
 - ⑦ 重复5-6次。

等比例

★ CFSE染色后再共培养!!!

文献: *Angew Chem*
 2014, 53: 13444

一、实验原理

OVA M=44500 } NBC: 蛋白 = 100:1 →
 NBC M=399 } FITC: 蛋白 = 3:1/1:1
 FITC M=389.4

异硫氰酸荧光素 (FITC) 与卵清蛋白 (OVA) 的氨基发生化学
 反应。FITC 结构中的 异硫氰基 (由 异氮 和 硫 组成, 符号 $-N=C=S$) 与 OVA 中赖
 氨酸的 $(-NH_2)$ 游离氨基、在弱碱性环境下发生亲核加成反应,
 形成稳定的硫脲键 $(-NH-C(=S)-NH-)$ 。从而将 FITC 共价连接
 到 OVA 分子上, 使 OVA 带荧光标记, 以便后续研究。

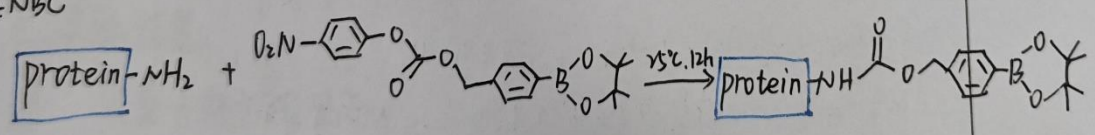
★ 找蛋白质的氨基酸序列:

NCBI 官网 (美国国家医学图书馆, 提供基因序列、蛋白质结构等
 丰富的生物信息资源) → 搜索类别 "protein" → 输入 "OVA" → 点 FASTA
 → 页面搜索赖氨酸 "K" 的数量 → 19 个 K (赖氨酸)

二、实验步骤

① 接 FITC、A 液: FITC (M=389.38, 0.66 μmol, 0.256 mg) 溶于 84 mg + 10 ml 水
 DMSO (150 μL) 饱和溶液稀释 10 倍。
 B 液: OVA (M=44.5 kDa, 0.22 μmol, 9.79 mg) 溶于 0.1 M NaHCO₃ 缓冲液 (0.5 ml)
 A 液滴加至 B 液中, 避光反应 12 h, 透析, 冻干, -20°C 保存。

② 接 NBC



A 液: 将 NBC (8.97 mg, 22.47 μmol) 溶于 DMSO (150 μL) → A
 B 液: OVA (或 OVA-FITC) (~~10 mg~~ 9.79 mg, 0.22 μmol) 溶于 NaHCO₃ (0.5 ml)
 A 液滴加到 B 液中, 室温搅拌 12 h, 离心沉淀 (2000g, 5 min)
 冻干, -20°C 保存。

溶酶体逃逸

细胞摄取途径研究

体内安全性研究

蛋白普适性研究


一、实验目的

1. 掌握TRIzol法提取总RNA的基本原理和操作流程
2. 从细胞中分离高纯度、完整性好的总RNA, 用于后续RT-PCR

二、实验原理 \rightarrow Biosharp. 15596-026.

TRIzol试剂是一种含有苯酚和异硫氰酸胍的单一相溶液能迅速裂解细胞并抑制细胞释放的核酸酶(RNase)。其基本原理是利用相分离将RNA、DNA和蛋白质分别分配到不同相中。

三、实验步骤

1. 贴壁细胞, PBS洗2次. \rightarrow 加量不足会导致RNA有DNA污染
2. 冰上, 每孔加1ml TRIzol, 裂解细胞, 吹打混匀(到透明)
3. 收集裂解液至1.5 ml Ep管, 裂解5-10 min (此时可存至-80°C)
4. 每个样品加200 μ l (定体积) 氯仿, 剧烈震荡15s (至草莓奶昔样) \rightarrow 氯仿 $\left\{ \begin{array}{l} \text{促进相分离} \\ \text{抽提, 去除杂质} \\ \text{稳定RNA于上层水相} \end{array} \right.$
5. 室温3min, 分层. 
 - 上层(水相): 包含RNA
 - 中间层: 包含DNA
 - 下层(有机相): 包含蛋白质和其他组分
6. 于新的Ep管中加入500 μ l 异丙醇, 1:1吸取等体积的上层RNA水相溶液(缓慢转移, 不要吸到下面层) (也可600 μ l + 600 μ l) \rightarrow 沉淀剂, 中和RNA分子电荷, 并破坏水合层, 降低溶解度, 析出RNA
7. 12000 rpm, 4°C, 10 min. \rightarrow 洗涤异丙醇, 溶解部分蛋白, 保护RNA
8. 弃上清(异丙醇), 加入1ml 75% 乙醇(上下颠倒混匀)
9. 12000 rpm, 4°C, 3min, 重复步骤“8”“9”两遍
10. 弃上清, 室温干燥5min (也不能过度干燥)