发放日期	
归档日期	
指导教师（签字）	
第　　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：E3泛素连接酶底物受体DCAF7通过嘧啶代谢调控胃癌化疗药敏感性的研究

培养单位：药学院

专　　业：药学

姓　　名：赵岳

学　　号：20254026020

指导教师：许国强

使用起止时间：2025.10.09 - 2026.10.12

记录起止页码：9-150

煮热，加入核酸染料 1:10000，(40mL凝胶加4mL EB)
趁
轻轻颠摇锥形瓶2-3次，混合均匀，倒胶，拔梳子 (梳子插入位置在板架中间有固定槽)
(核酸染料：棕色管 YeaRed 核酸染料10000X)
或 Ultra GelRed 棕管(GRS01-01-AA)

↓

电泳仪提前倒满 1XTAE，大约1L

↓

琼脂凝胶室温放置30min 凝固(4°C放10min即可快凝)

↓

轻轻垂直拔出梳子，准备上样

↓

点样预处理：经PCR扩增的DNA样本 5μL，加入 5μL 10×Loading Buffer，轻轻吹打混匀(避免剧烈震荡导致DNA断裂) (10× DNA Loading Buffer)

↓

点样：每孔上 20μL-30μL (对μL)量体积，可重复上两孔增加回收体积；Marker：3μL (DL5000 DNA Marker)

↓

电泳运行：正负极连接，DNA带负电，电泳时向正极(红色接线柱)移动，因此需确保凝胶的"上样端"接负极(黑色接线柱)，另一端接正极。

Tips：琼脂胶固定板，切勿挡住电子移动路径，应上下平行摆放；

↓

电压设定原则：低电压分离大分子，高电压分离小分子

分离 >10000 bp 的大片段：5-8V/cm (如凝胶长10cm，电压50-80V)
电泳1~2h；

分离100-10000bp 中、小片段：8-12V/cm，电泳30-60min

(1313实验室默认：恒压135V，35min)

科研名称：

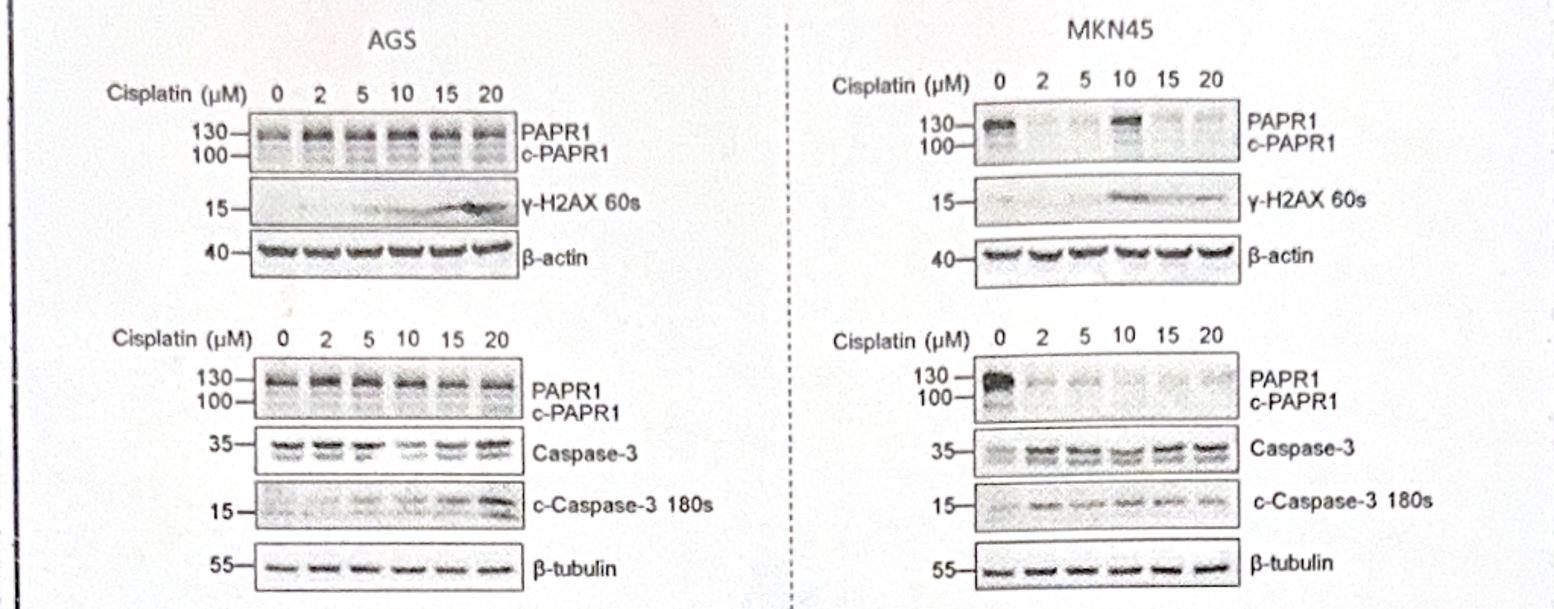
日期：2026 年 3 月 8 日

二、实验结果

3.8
1

3.12

3 梯度 …24h，确定后续… 给药浓度

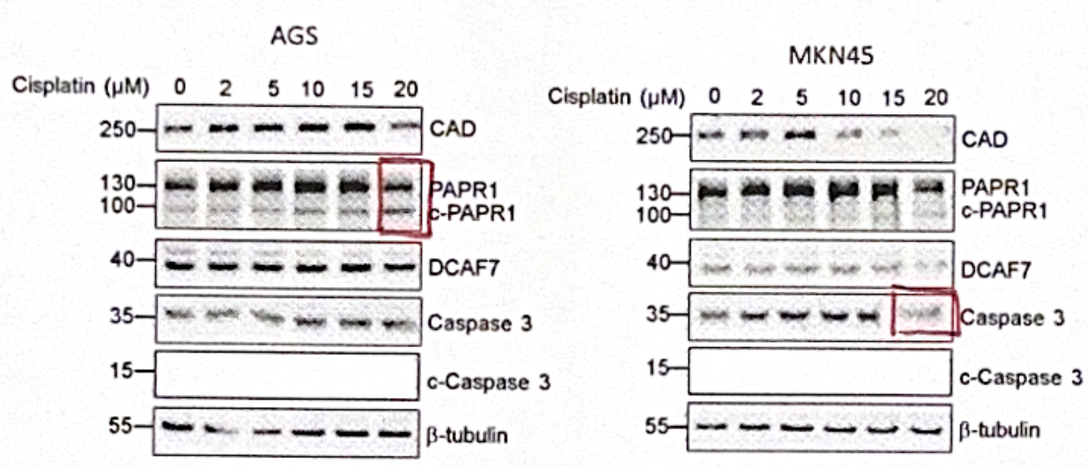


AGS细胞中，20μM的顺铂诱导24h后，Cleaved-Caspase 3最明显；MKN45细胞中，除0浓度顺铂外，均有Cleaved-Caps 3蛋白存在。但PARP1未出现明显切割，可能是顺铂失效，已从王晓卉师姐处借得新顺铂，并分装，重新检测。

3.13重复 可能顺铂过期，故换新顺铂，重复上述实验：

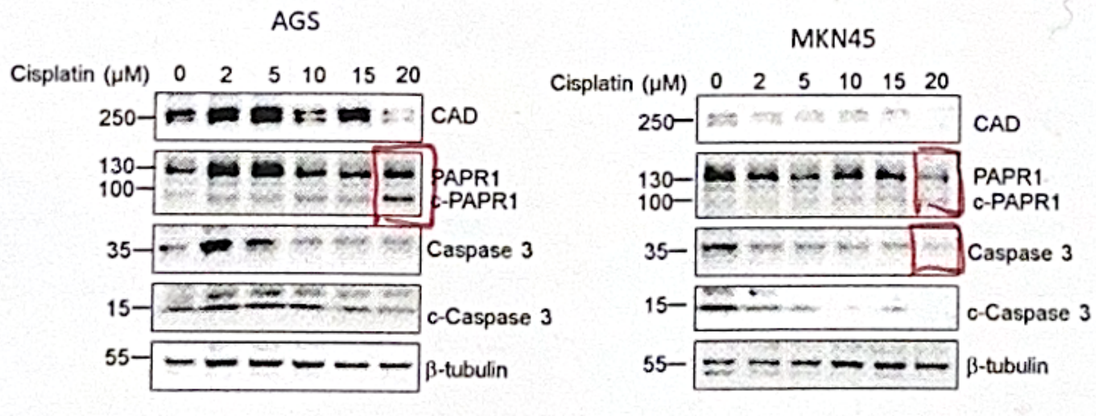
3.25 不同顺铂浓度梯度诱导野生型AGS与MKN45细胞

3.15 WB



3.30 不同顺铂浓度梯度诱导野生型AGS与MKN45细胞

3.16 WB



王晓卉师姐意见：
可能是**顺铂浓度低**，20μM的AGS细胞才出现PARP1的切割，故下次用0-50μM的顺铂浓度来筛选

在AGS细胞中，20μM浓度顺铂处理发生PARP1切割，但c-Caspase 3在0-10 20μM就发生切割，15-20μM顺铂浓度反而c-Caspase 3变浅

原因（1）c-Caspase-3：低浓度顺铂（0-10μM）：细胞处于早期 / 中期凋亡，c-Caspase-3 持续激活、大量积累，因此条带逐渐变亮；高浓度顺铂（15-20μM）：细胞进入晚期凋亡 或坏死，c-Caspase-3 已经完成切割 PARP1、CAD 等底物的任务，随后被泛素 - 蛋白酶体系统快速降解，或被胞内蛋白酶进一步切割为 < 10kDa 的小片段（直接跑出胶），因此条带变浅。
（2）PARP1：凋亡的晚期底物标志物，切割产物稳定持久。PARP1 是 c-Caspase-3 的下游底物，只有当 c-Caspase-3 积累到足够浓度时，才会被大量切割为稳定的 89kDa 片段（c-PARP1）：低浓度顺铂：c-Caspase-3 未达到阈值，仅少量切割 PARP1，因此全长 PARP1 仍占主导，切割型条带弱；高浓度顺铂：c-Caspase-3 达到阈值，大量切割 PARP1，且 c-PARP1 片段稳定性极高、不易降解，因此切割型条带持续增强，全长条带显著减少。

20μM CDDP浓度下，在AGS中发现c-PARP1有明显表达，在MKN45中，~~c-~~Caspase3降低，推测可能顺铂浓度不够，故加大CDDP浓度，至50μM。

71

后期

科研名称：　　日期：　　年　月　日

三、实验步骤

经PEI转染试剂 转染 pcDNA3.1 与 Flag-DCAF7 的2个大皿293T细胞，分皿至六孔板中　6.18 ↓ 6.20

分组：

pcDNA3.1	Flag-DCAF7
①. DMSO	④. DMSO
②. MG132	⑤. MG132
③. BafA1	⑥. BafA1

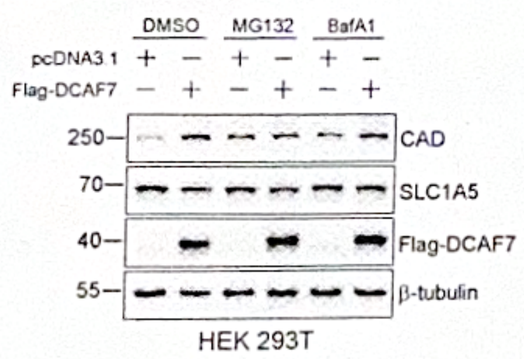
当细胞汇合度为60%-70%时，PBS洗2次，将各抑制剂稀释至培养基加，加入孔板中　6.21 10:00

↓24h

收集，裂解细胞，WB检测各蛋白表达。　6.22 10:00

四、实验结果

蛋白酶体与溶酶体抑制剂，检测DCAF7对于SLC1A5、CAD蛋白稳定性的影响



MG132处理细胞后，Flag-DCAF7上调CAD蛋白的作用被抑制，说明DCAF7通过抑制CAD蛋白的蛋白酶体途径降解而稳定CAD蛋白。
抑制剂失效

MG132处理后，Flag-DCAF7上调CAD蛋白的作用被抑制，说明DCAF7通过抑制CAD蛋白的蛋白酶体途径降解而稳定CAD。

但SLC1A5，在Flag-DCAF7过表达，表达反而减少，溶酶体抑制剂BafA1作用下，降解减少，推测是经溶酶体途径降解，也有可能抑制剂失效。