编 号：0279

苏州大学基础医学院

实验记录本

所在学系 法医学系

姓　　名 张经风

学号/工号 20254221009

课题负责人 陶陆阳

领用日期： 2025 年 9 月 15 日

实验名称：　　年　月　日

[实验名称]：细胞传代（5代，→传二）　　2025年11月5日

[实验物品]：灭菌的培养皿、1.5ml离心管、PBS、胰酶、完全培养基、1ml移液器及枪头

[实验步骤]：同前

镜下观察细胞汇合度达80%，可进行传代

[注意事项]：培养箱使用过程中尽量减小开门次数，避免频繁开关门导致温度波动过大

避免长时间打开培养箱箱门影响内部CO2的浓度

[实验名称]：细胞获取　　2025年11月7日

[物品准备]：PBS、完全培养基、1ml移液器及枪头、废液缸

[实验步骤]：同前

[注意]：无

[实验名称]：蛋白质提取（组织、小鼠黑质-纹状体区域）　　2025年11月8日

[实验原理]：①细胞破碎与蛋白释放

物理方法：通过机械研磨、匀浆或超声波处理等方式，破坏组织细胞和细胞膜，使蛋白质释放至溶液中

化学方法：使用裂解液处理组织样本，可破坏细胞膜和脂质及分子层结构，使细胞内的蛋白质溶解并释放到裂解液中。同时，蛋白酶抑制剂可以抑制细胞内源性蛋白酶的活性，防止蛋白质在提取过程中被降解。

②蛋白质分离与纯化

将裂解后的组织匀浆进行离心，利用不同组分的密度差异，使细胞碎片、未裂解的细胞核等杂质沉淀到离心管底部，而含有蛋白质的上清液则留在上层。通过离心可以去除大部分杂质，获得相对纯净的蛋白溶液

实验名称：　　年　月　日

[实验物品]：EP管、RIPA(低)、PMSF、离心管、研磨仪、离心机

[实验步骤]：①将取材的组织样品放入EP管底（置于冰上，防止蛋白质被降解）

②加入200μl RIPA+2μl PMSF，可根据组织大小酌加或减小比例

③自动研磨仪研磨组织至碎裂成匀浆状

④匀浆完成后，置于冰上静置20~30 min，使细胞充分裂解

⑤将离心机提前预冷至4℃，静置结束后12000 rpm 离心20min

⑥离心后样品分为三层：上层为澄清的蛋白上清液，中间为脂质层，下层为细胞碎片和沉淀。小心吸取上清液，转移至新的离心管中，避免吸取中间层和下层沉淀

⑦加入1/4体系的loading buffer，离心机(慢速)离心后涡旋混匀

⑧95℃条件下煮沸10 min，使蛋白质变性

⑨变性后的蛋白样品可立即用于后续实验，或保存于-80℃冰箱，避免反复冻融

[注意事项]：全程操作需在冰上进行，低温可有效抑制蛋白酶活性，防止蛋白降解

使用离心机前需注意离心管的平衡，避免因不平衡导致离心机损坏或样品损失

蛋白酶抑制剂可以防止蛋白质在裂解过程中被内源性蛋白酶降解，而磷酸酶抑制剂则可阻止细胞内磷酸化相关的信号传导通路，从而导致蛋白质的完整性和功能

[实验名称]：细胞获取　　2025年11月9日

[物品准备]：PBS、完全培养基、1-1移液器及枪头、废液缸

[实验步骤]：①取出培养皿，肉眼观察到培养基颜色稍黄，镜下观察细胞形态正常、无污染

②吸去原有培养基，2ml PBS润洗后吸弃

③沿侧壁加入6ml完全培养基，"十字"法混匀

④放于37℃、5% CO2培养箱继续培养

实验名称：细胞铺板　　2025 年 12 月 26 日

[实验原理]：胰酶消化并离心，重悬接种至六孔板内

[实验材料]：PBS，胰酶，完培，15ml 离心管，六孔板，移液枪及枪头等

[实验步骤]：镜下观察培养皿中细胞生长状态良好，汇合度达 80% 以上，可进行传代或铺板

附：细胞铺板步骤

一个皿中细胞 ⟶ 两个培养皿 + 一个六孔板

[注意]：无菌操作

若细胞生长速度过快，六孔板内细胞不宜过为

提前将 PBS，胰酶，完培从冰箱取出，使其恢复至室温或预热

[实验名称]：构建 PD 细胞模型（加入 MPTP）　　2025 年 12 月 27 日

[实验目的]：加入 MPTP 以在 SH 细胞上构建 PD 模型

[实验步骤]：铺板 24h 待细胞贴壁后，可构建模型

①弃去原有培养基，PBS 润洗两次

②每孔加入 2ml 新鲜培养基　（浓度终为 1.3mM）

③选择前三个孔，加入 20ul MPTP/每孔，其余三孔作为对照组

④"十字法"混匀，放至培养箱培养

实验名称：RNA 提取（细胞）　　2025 年 12 月 28 日

给药 MPTP 24h 后，可进行 RNA 提取

实验名称：RNA 提取（细胞）

实验目的：从给药后 SH 细胞样本中提取高质量的完整总 RNA；对提取的 RNA 进行浓度测定。

实验原理：

①细胞裂解：利用化学方法（如 TRIzol 试剂）破坏细胞膜和细胞核膜，使细胞内的 RNA 释放出来，TRIzol 试剂中的异硫氰酸胍等成分可迅速裂解细胞，破坏细胞结构，使核蛋白复合体解离，释放出 RNA。

②相分离：加入氯仿等有机溶剂后，溶液会分为水相和有机相，在酸性条件下，RNA 因亲水性进入水相，而 DNA 和蛋白质等杂质则进入有机相或界面层，从而实现 RNA 与其他细胞成分的分离。

③RNA 沉淀：向含有 RNA 的水相中加入异丙醇，RNA 在高浓度醇的作用下会沉淀析出，通过离心可将 RNA 沉淀与上清液分离，达到浓缩和纯化 RNA 的目的。

④洗涤与溶解：用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀，可去除残留的盐分、有机溶剂和其他杂质，提高 RNA 的纯度。最后将 RNA 沉淀溶解在无 RNA 酶的水或缓冲液中，以便后续实验使用。

实验物品：冰盒、PBS、trizol 试剂、氯仿、离心机、RNA-free 管、异丙醇、75%乙醇、DEPC 水、移液器及枪头、分光光度计

实验步骤：

1.将细胞置于冰上，吸出培养基，PBS 洗 3 次。

2.每个六孔板孔加 500ul trizol，用细胞刮板刮下细胞，收集至 RNA-free 管，上下颠倒震荡混匀。（细胞裂解）

3.冰盒静置 5min，提前打开离心机预冷至 4℃。

4.加 1/5trizol 体积的氯仿，剧烈振荡，静置 10min，观察到分为两层

5.放入 4℃离心机 12000r/min 15min 离心，离心结束后，上清为 RNA 层，中间为蛋白层，下层为酚层，吸取上清至新的 RNA-free 管。（六孔板用 200ul 吸取一次后换 20ul 吸取）（相分离）

6.加等体积的异丙醇，颠倒混匀。（RNA 沉淀）

7.静置 10min，放入 4℃离心机 12000r/min 15min 离心。

8 弃上清，加 500ul 75%乙醇，颠倒 3～4 次，放入 4℃离心机 12000r/min 5min 离心。（洗涤）

9.弃上清，倒扣 5～10min 晾干

10.加 20ul "DEPC 水" 溶解（抑制 RNA 酶活性，防止 RNA 水解）（RNA 溶解）

11.分光光度计测定 RNA 浓度，放于-80℃冰箱。

实验结果：

	浓度(ng/ul)	A260/A280	A260/230
NC1	916.36	1.824	1.374
NC2	1217.7	1.846	1.316
NC3	1216.8	1.905	1.575
PD1	1026.8	1.778	1.017
PD2	1172.8	1.835	1.318
PD3	1225.4	1.703	0.738

RNA 在 260nm 波长处有最大吸收峰，1 个 A260 单位相当于 40 μg/ml 的 RNA，通过测量 A260 可计算浓度。蛋白质在 280 nm 有吸收峰，因此 A260/A280 的比值可用于评估 RNA 的纯度，纯净 RNA 的比值通常在 1.8～2.1 之间

实验名称：细胞内蛋白质的提取与浓度测定.　　2026年5月5日

24 h后，进行细胞内蛋白质的提取

分组：(1). control/nc, MPTP模型组, nc + hsa-circ0027957, MPTP + hsa-circ0027957

(2). control/nc, MPTP模型组, nc+chrM1623-1844, MPTP + chrM1623-1844

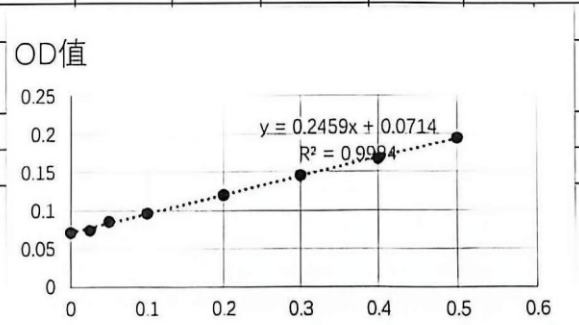
实验原理.步骤同前 P19 - P20

1. PBS清洗3次、全程冰上处理
2. 100 ul RIPA(强)+1 ul PMSF / 孔
3. 细胞刮板刮下 cell，转移至EP管，混匀静置5 min
4. 12000 rpm，15 min 吸取上清至EP管内
5. BCA法测定蛋白浓度 (570nm测定吸光度)
6. 记录并计算蛋白浓度
7. $V_{加水}$ = [(X-最低浓度)/最低浓度] × 所用样品的体积
8. $V_{loading}$ = 4 × ($V_{样品}$ + $V_{加水}$)
9. 95°C 5~10 min，保存于 -20°C

实验结果：

5.5 蛋白提取

标准蛋白浓度 (mg/ml)	OD值	样品OD值	稀释10倍样品浓度	浓度 (mg/ml)	加水 (ul)	加buffer(ul)	终浓度 (mg/ml)	备注:	
0	0.0714	0.2444	0.70353802	7.0353802	155.2632	113.815789	3.708825	circ0027957	
0.025	0.0743	0.2164	0.5896706	5.896706	32.63158	38.1578947	3.708825	circ0027958	3.7 mg/mL
0.05	0.0862	0.212	0.57177715	5.717771	32.66667	43.166667	3.708825	circ0027959	
0.1	0.0969	0.1854	0.46360309	4.6360309	0	35	3.708825	circ0027960	
0.2	0.1209	0.2388	0.68076454	6.8076454	306.7727	161.693182	2.862952	chrM1623-1844	2.86mg/mL
0.3	0.1462	0.2	0.52297682	5.2297682	55.36364	43.8409091	2.862952	chrM1623-1845	
0.4	0.1677	0.196	0.50671004	5.0671004	58.22727	49.5568182	2.862952	chrM1623-1846	
0.5	0.195	0.1594	0.35786905	3.5786905	0	35	2.862952	chrM1623-1847	
y = 0.2459x + 0.0714									



实验名称：　　2026年 6月 12日

文献阅读：同前标题

1. 入DNA：入噬菌体的基因组DNA，属于模式标准DNA。
常用作DNA分子量标准、酶切标准、载体骨架、阴性/阳性模板。

2. 研究框架：① "技术+框架" → 绘制工作

② RIC-seq 轨迹图。
→ 验证工作
先定位；
高效低发现mRNA降解。→ 揭示功能影响
靶标protein个

③ 转录组分析翻译效率(mRNA、RPF)。→ 影响翻译抑制的普遍性。
④ 碱基配对验证(2个 circRNA 为例)
(突变+rescue 实验)+排除 AGO 途径 → 碱基配对的必要性

⑤ ChIRP-MS 揭示 P-body 蛋白组
1° 共定位(circRNA+靶mRNA+P-小体标志物) → circRNA控制靶mRNA的P-body定位
高效低 circRNA 使 P-body 招募↓(共定位)
2° 高效低 P-body (WB) → 验证 P-body 完整性是翻译抑制的必要条件
3° 机制闭环：　WT　碱基配对突变(Mut)靶标点序列
circRNA 过表达　检测 mRNA 与 circRNA 在 P-body 中的共定位。
定量：靶标的 WT 报告基因在 P-body 中与 circRNA 共定位比例 > Mut

⇒ 两步翻译抑制：① circRNA 通过序列特异的碱基配对识别靶 mRNA
② P-body 蛋白 得将 circRNA-mRNA 复合物招募到 P-body