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：基于CRISPR-Cas9和恒温扩增技术对DNA损伤应答中的研究

培养单位：苏大放射医学与防护学院

专　业：放射医学（理）

姓　名：丛昊

学　号：20234220024

指导教师：叶才寒 / 周光明

使用起止时间：2023.9.12 —

记录起止页码：1

科研名称：　　日期：　　年　月　日

2025年9月15日 – 2025年9月24日

使用新到的 βCTB-4dT.RNA，重复体外切割DNA实验，与 βCTB-2dT 体系对比

其它条件不变 { βCTB-2dT + Cas9 + NEB + 120ng DNA + DEPC ，总体积30μL
βCTB-4dT + Cas9 + NEB + 120ng DNA + DEPC

辐照后统一孵育37°C，30min后立刻95°C，5min，加入蛋白酶K后，55°C，15min

取回以样品在琼脂糖成胶结果，结果如图



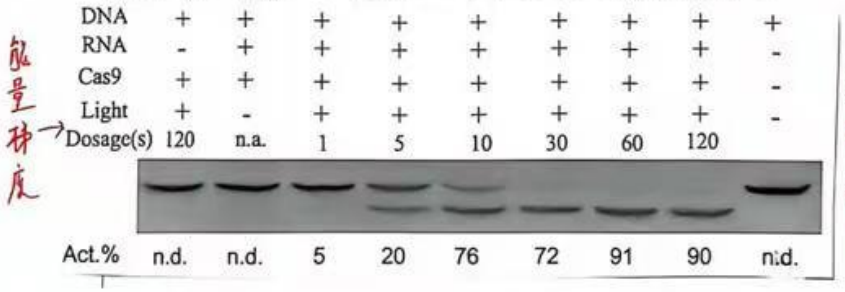
结论：1. 4dT与2dT相比，不光照时，切割特异性更好，5W30S光照处理后，切割的更干净

2. 后续所有实验均用 βCTB-4dT

由于上述实验确定了RNA，后测探究Cas9切割与时间与能量关系，补充计实验

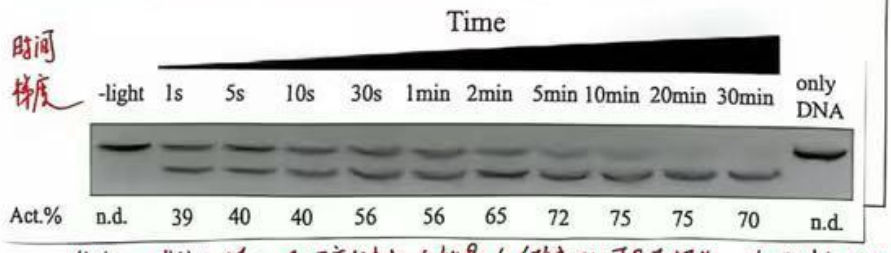
(1) 其中时间梯度，统一照射5W，30S，孵育不同时间，15，55，105，30S，1min，2min，5min，10min，20min，30min，95°C终止反应

(2) 能量梯度，功率365nm紫外光源选择5W，照射15，55，105，30S，60S，120S，统一孵育30min后95°C终止反应，得到如图结果



能量梯度

其中DNA为样品普通DNA用1.5mL EP管照射



时间梯度

结论：本体外证明 Cas9 切割活性与能量和孵育时间呈正相关，表明体外单化的(EX)-Cas9复合物能成功

科研名称：　　日期：　　年　月　日

后续对不照射，长时间孵育结果使用 GTB-4dT DNA 进行重复，得到如图结果



结果证明经优化后 DNA 但长时间依然自动切割 DNA 后续需筛选合适时间启动反应

2025年9月26日 - 2025年9月30日

同临近标记原理为 H2O2 提供大量 -OH 自由基，氧化 BP，产生大量活性高的醌酚氧自由基，结合到临近的蛋白上。电离辐射也会产生大量自由基，所以是否电离辐射产生自由基也可以氧化 BP，达到标记蛋白的作用？设计实验

1、使用细胞 Hela，BP 浓度 2.5mM，剂量选择 10Gy 和 100Gy。

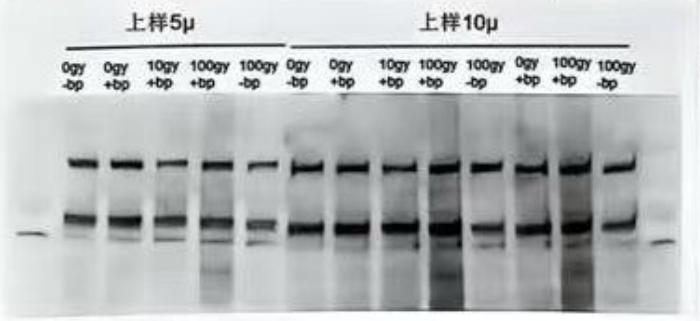
2. 每个样品体积为 50μl 细胞悬液，共5组样品。

0Gy-BP，0Gy+BP，10Gy+BP，100Gy+BP，100Gy-BP。

BP 储液 250mM 按 1:100 稀释使用

3. 按照剂量照后于冰上存放，加入 0.1L PBS 重悬，300rpm，3min 离心，加入 30μL loading

4. 95℃煮 10min 后，进行 WB 实验，使用 Streptavidin-HRP，以后续与 HRP 检测生物素量



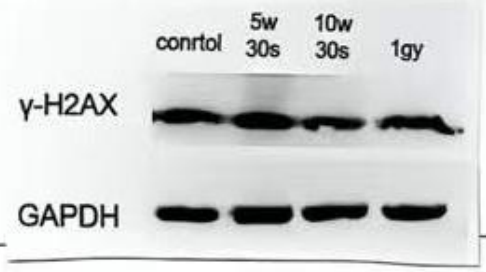
结论：电离辐射剂量越大产生自由基多，与 BP 结合，使 BP 标记更多蛋白，WB 条带背景明显更深。

实验目的：检测用 365nm 光源照射 293T 细胞产生 DNA 损伤情况

1、使用紫外灯，分别使用 1W 和 10W，照射 30s，照射后 1h 统一收细胞样。WB 检测结果

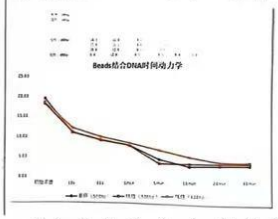
使用 60mm 培养皿照射，293T 细胞

结果：处理无论 1Gy 还是紫外灯 1W 和 10W，照射后从 γ-H2AX 入量并无明显差异

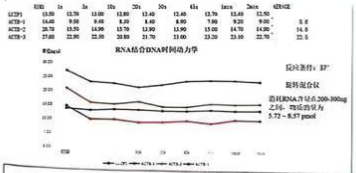


科研名称：　　日期：　　年　月　日

对DNA结合Beads做了时间动力学测定和RNA结合时间动力学测定



结论：
1、DNA结合Beads随时间增加而增加，但10min以上趋于饱和。
2、10μL的Beads加入1μg DNA，DNA结合800-900ng才饱和。
3、环状与线性的结合效率相差不大。



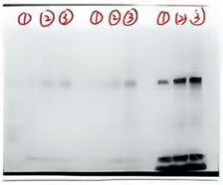
结论：RNA结合DNA在加入的几秒内即可完成，且作用非互补的RNA作为对照证明RNA结合DNA的特异性和高效性。

将DNA的结合与RNA结合放在一起进行验证后，我使用该体系进行一次复选，验证体系是否正常工作。

①取10μL Beads，加入1x MEB Buffer 3:1润洗Beads 2次
②加入1μg 纯化的DNA（溶解在MEB Buffer 3:1），室温，震荡500rpm，孵育30min
③直接加入1μL 500μM bp，震荡孵育10min（用于饱和磁珠）
④弃去MEB Buffer清洗2遍Beads，加入提前配置好的RNP复合物，37℃旋转混合仪，孵育10min，用MEB Buffer清洗2遍Beads，清除未结合的RNP
⑤提取细胞：获得1x10^6个细胞，100μL裂解液resuspend（3x MEB Buffer 10mM DTT，1mM PMSF，0.2% Triton x-100），冰上静置20min，中途涡旋

科研名称：　　日期：　　年　月　日

⑥将裂解液中的入离心机4℃，12000rpm取上清液液。用水将样到1X后再次离心4℃，12000rpm
⑦将提好的蛋白溶液加入Beads中，每个样品中加入100μL
(1)照射，不加H_2O_2　(2)照射，加入H_2O_2　(3)不照射，加入H_2O_2
⑧每个样品加入1μM bp（稀释1:100），对照照射10W，60S后，立刻加入1mM H_2O_2，在反应2min后，靠静置加入中和试剂，总体积为200μL
⑨超声打断DNA，收集上清液
⑩将总体积为200μL的样品，加入500μL（PBS，0.05% Tween-20，pH 7.4）置于10kd的超滤管中，4℃，4000rpm，10min（重复4次）
⑪收集滤液，加入500μL（PBS，0.05% Tween-20）4℃，12000rpm，10min
⑫将上述上清液加入10μL Beads中，置于旋转混合仪上孵育1小时（4℃，4h）用结合蛋白
加入PBS清洗磁珠，加入40μL 1x loading Buffer，99℃，10min，收集上清液
⑬WB检验体系结果



①：照射，不加H_2O_2
②：不照射，加入H_2O_2
③：照射，加H_2O_2
Bp：2.5nM，H_2O_2：1.5mM
上样体积：3μL，5μL，10μL

实验结论：③组照射，加入H_2O_2后在40kD左右出现了特异性条带，且真实条带也出现了更浅的条带，证明体系体系工作正常工作，可以为后续条件优化。

※后续实验重心
1、对整体Cas9-APEX2体系进行改进，包括提高蛋白的表达浓度，不断完善即和H_2O_2浓度，保证不影响Cas9切割。同时提高体系检测的精准。
2、用加表达的蛋白含量来说，我们用提高Beads含量或者提高DNA含量

科研名称：　　日期：　　年　月　日

实验目的：DNA成环验证——以带上生物素标签是否影响.

根据文献方法分析，因使用线性DNA做实验时，端点部位也相当于DNA损伤，会干扰实验结果，所以为了解决问题，拟采用环状的DNA带上生物素标记，进行后续实验

实验方法：

①将6μg由PCR得到的线性DNA，加入如下体系

总体积	50μL
DNA	6μg
T4 DNA酶	3μL
10× T4 DNA Buffer	5μL
BsaI酶	3μL
ATP	2μL
无酶水	补充到50μL



使用未添加生物素标记的引物得到DNA产物环化结果



使用添加生物素标记的引物得到DNA产物环化结果

线性DNA与环状DNA，可以通过电泳判断环状DNA的迁移速度高于线性

②37℃，1h后，于65℃加热15min，以中止T4 DNA酶的活性

③将上述溶液加入等体积的T3酶切割线性DNA体系

总体积	50μL
T3 Buffer	5μL
T3	3μL
Tris-Base	2μL
无酶水	39μL

经过体系验证后，DNA连接1h和12h结果，12h的DNA成环率比1h的高20%，但总体6μg总DNA，成环后可以得到800-900ng环状DNA，且包含单环和多环的混合结果。

④再于37℃，反应1h后，琼脂糖凝胶电泳鉴定成环结果

实验结论：如图所示，DNA环状实验成功，带生物素的DNA并不影响环化，但因环状DNA的产量低，尝试多种改进方法，也无法提高产量，但因后续需要某些实验步骤先使用线性DNA作验证，再使用环状DNA，为了得到足够的环状DNA，大约花费了1个月。

科研名称：　　日期：　　年　月　日

2026年7月－2026年8月

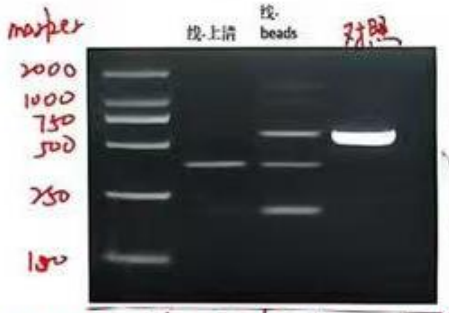
实验目的：验证带有生物素标签的DNA结合Beads上的切割情况

实验步骤：①将1μg线性的带有生物素标签的DNA加入10μL Beads中.

②室温26℃，震荡仪震荡上500rpm. 30℃，用于结合DNA.

③使用365nm紫外光源，一边震荡一边照射，10W，60s.

④分别收集上清液和Beads上的DNA，琼脂糖凝胶检测切割结果



从marker上显示

对照线性Bp为500左右

从Beads上pull down上来的DNA为574bp. 1476bp和367bp.

实验结论：线性DNA结合到Beads上后，10W 60s照射后，Beads上的DNA就成功切开。

后续为了证明可以早期发现DNA捕获后的富集情况，所以希望照射后DNA可以被立刻打开. 从便于后续实验的需要，使用10W 30S照射后，做不同的时间选择1min. 5min 10min. 30min的时间点. 结束切割反应，分别将具时间点的DNA pull down下来，并加入一个体外的相性对照，判断DNA切割结果如图所示。



实验结论：不照射时DNA不发生切割，切割后1min即可看到较明显的切割.

为了捕获早期的DNA信号，决定使用365nm光源照射10W，60s然后1min后启动Hx1r反应。

后续对体系进行一系列的改进，分别做了体外和Beads结合实验，决定DNA和Beads结合时间为30min，10μL的Beads上结合1μg DNA。且环状DNA也可以被成功切割。