编 号:0301

苏州大学生命科学学院

实验记录本

所在学系 生物化学和生物物理学系

姓　　名 马驰

学号/工号 20254257018

课题负责人 苏雄

领用日期: 2025 年 9 月 15 日

实验名称：RT-qPCR　　2025 年 9 月 18 日

一、实验目的

检测目的基因表达情况（在不同处理细胞中）

二、材料准备

八连管、qPCR板、无酶水，RT mix，F、R（上下游引物），RNA，ep管

提前打冰，无酶水，RT mix，F R等，RNA拿出后于冰上放置，水浴锅提前加热

三、实验流程

（体系=20ul）

1、逆转录：计算RNA，无酶水，RT mix用量，依次加入到8连管中，盖上做好标记，瞬离并设为37℃ 15min，85℃ 5s，完成逆转录（RNA → cDNA）

样品名称	rna浓度(ng/ul)	rna体积(ul)	无酶水(ul)	5×RT(ul)
ctl	527.3	1.90	14.10	4
100A	510.6	1.96	14.04	4
PA	274.9	3.64	12.36	4
100AP	314.9	3.18	12.82	4
O	293.8	3.40	12.60	4
OP	490.3	2.04	13.96	4

2、qPCR体系制备

体系（一个孔）10ul
- qPCR mix　5ul
- F　0.4ul
- R　0.4ul

制成混样，混匀，标记

- cDNA　4.2ul　无酶水稀释，使浓度适宜（10 pg - 1ug 每20ul）

3、布板

	ctl	100A	PA	100AP
actin	○○○	○○○	○○○	○○○
GAPDH				
Tubulin				

	O	OP
actin	○○○	○○○
GAPDH		
Tubulin		

实验名称：　　2025 年 9 月 22 日

PCR

一、实验目的

扩增目的基因，为建立目的基因过表达细胞作准备。

二、材料准备

八联联管，管盖，DNA模板，上下游引物（10 uM），PCR mix（Primer STAR），无酶水

三、步骤

PCR体系（50ul）
- 模板　1
- F（10 uM）　1
- R（10 uM）　1
- PCR mix（2X）　25
- 无酶水　22

PCR仪参数
- 温度
  - 预变性　98℃　5min
  - 变性　98℃　10s
  - 复性　60℃　5s
  - 延伸　72℃　1min30
  - 终延伸　72℃　5min
  - 4℃　∞
- 循环数：35
- 体系：50 ul

琼脂糖凝胶电泳

一、材料准备

小锥形瓶，1×TAE，制胶板（35ml，70ml），琼脂糖，一次性ep手套，核酸染料，loading，DNA marker（10000，2000）等。

二、目的

验证上步PCR的扩增效率（目的条带在2000左右），判断扩增情况，是否有非特异性扩增（除目的条带外的多余条带，如引物二聚体）

三、步骤

1、制胶：称取琼脂糖（1%，5%）3.5g于锥形瓶，加入35ml 1×TAE，瓶口盖上ep手套，微波炉中高火加热，第一次沸腾拿出振动，放回，第二次沸腾，轻摇，呈透明状，室温放置使温度降至60℃左右，加入核酸染料（1:10000），摇匀，倒入板子（缓慢连续），拔去除气泡，30min左右凝固。

2、制样+电泳：胶凝固后，放入电泳槽，加入电泳缓冲液（1×TAE），样品+6×loading于ep手套上混匀（10ml样品+2ml loading），上样，电泳（80V，100V，120V）

3、于紫外下观察目的条带（2000 kb处），是否有非特异性扩增（无）

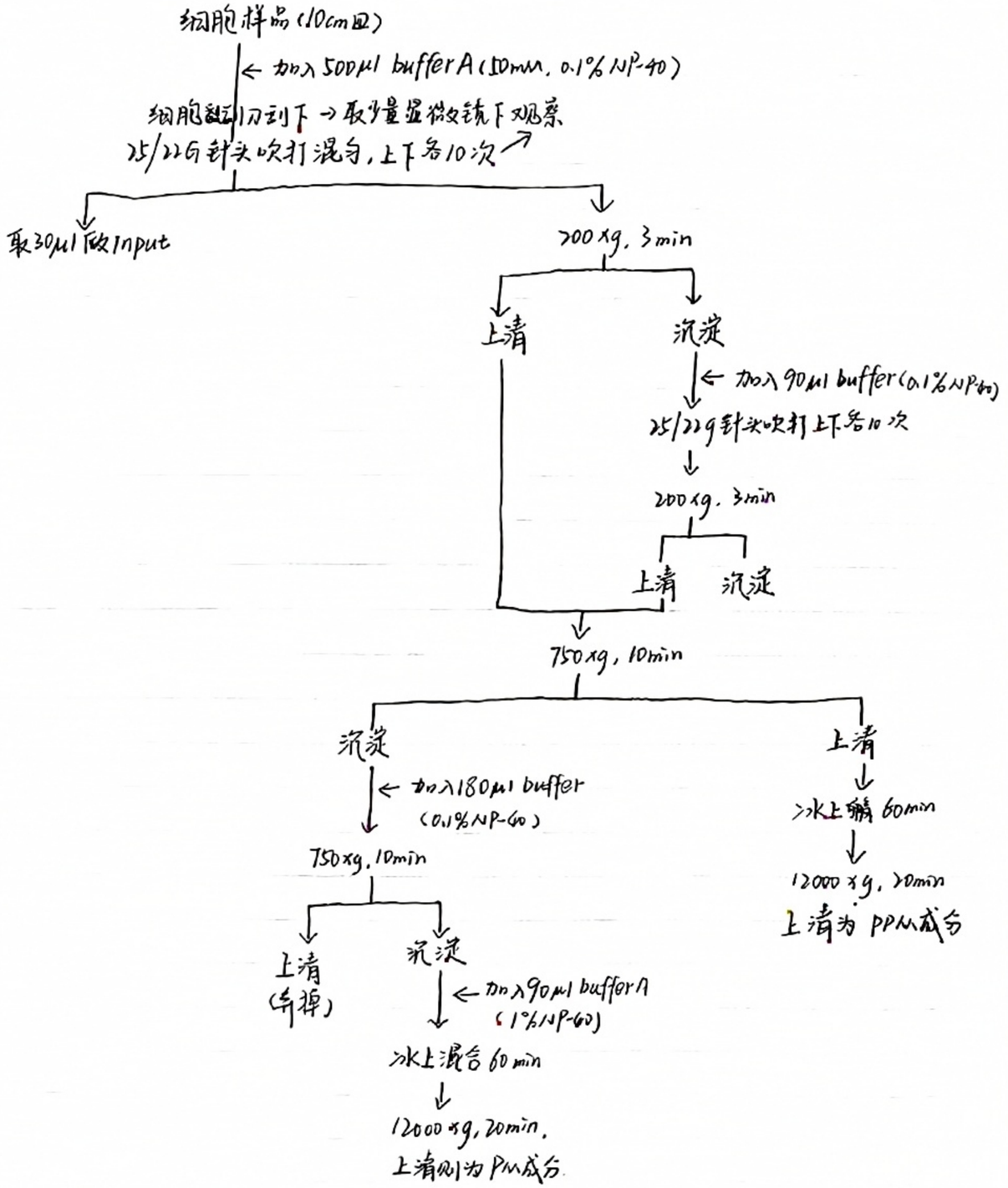
4、切胶回收

实验名称：膜蛋白提取　　2026年4月20日

细胞：3T3-L1，10cm皿×2，　汇合度：100%

提前配制 500mM buffer A，使用前稀释至 50mM 并加入 NP-40 和蛋白酶抑制剂

实验流程：



实验名称：WB验证4月20日膜Pr提取效率　　2026年4月22日

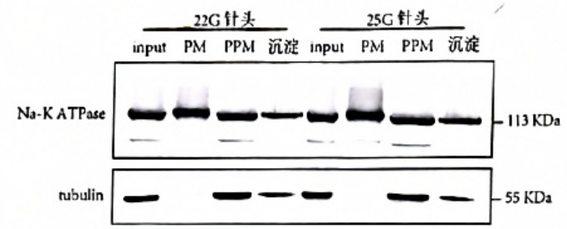
实验准备：

制样：input；PM组；PPM组 → +5×LB（含DTT）；沉淀组 +2×LB

凝胶：10孔，10%，2块，

实验流程：

1. 上样：顺序：样品ⅠD（input，PM，PPM，沉淀），样品ⅡD（input，PM，PPM，沉淀）
2. 电泳：80V → 120V
3. 转膜：冰上，恒流 300A，90 min
4. 5% 牛奶封闭 2h
5. 一抗 4℃ 过夜：膜Ⅰ膜Ⅱ → 内参 = Tubulin；目的Pr：Na^+-K^+ ATPase
6. 二抗室温 2h
7. 显影：伯乐 1705060



膜蛋白提取（打孔剂穿孔法）　　2026年4月28日

在黄晓恒师兄指导下完成实验操作

材料准备

1. 细胞：3T3-L1，6cm皿×3，汇合度 60-70%
2. buffer：

成分	分子量	目标浓度	体积	所需质量
HEPES	238.3	20mM	50ml	238mg
KOAc 醋酸钾	98.4	110mM	50ml	540mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	202.3	2mM	50ml	20.3mg
EGTA	380.35	1mM	50ml	19.0mg

混匀后可短暂放于 4℃ 冰箱保存

3. 冰盒，PBS 预冷，离心机 4℃ 预冷，

实验名称：提膜蛋白（增殖期细胞） 2026 年 5 月 5 日

5月4日种板，培养约15h，汇合度60%-70%，细胞处于增殖期。

一、打孔法：

细胞：6cm皿×3（vec），6cm皿×3（CD36.0E）

方法同4月28日，打孔剂浓度0.01%，沉淀加入150μl ripa（含cocktail，NaF），最终取上清130μl（PM组分）

每份cell获得PM组分和胞质组分，

保存于-20℃

二、2016 Current Protocols in Protein Science：

cell：10cm皿×3（vec），10cm皿×3（CD36.0E）

方法同4月20日。

每份cell获得input组分和PM组分，保存于-20℃

提膜蛋白（静止期） 2026年5月7日

4月4日种板，培养3day，汇合度100%，细胞处于静止期。

一、打孔法：

cell：6cm皿×3（vec），6cm皿×3（CD36.0E）

方法同4月28%，打孔剂浓度：0.01%（留液5%）

沉淀加入500μl ripa（因cell量大，ripa少裂不完全），最终取上清450μl（PM），存于-20℃

二、2016 current Protocols in Protein Science：

同5月5日。

BCA测Pr浓度

打孔法	样品	Pr浓度(ng/μl)
增殖期	vec PM1	605.39 485.62
	vec PM2	542.90 774.50
	vec PM3	634.72
	OE PM1	774.90
	OE PM2	772.55
	OE PM3	769.71
接触抑制期	vec PM1	780.19
	vec PM2	862.31
	vec PM3	771.42
	OE PM1	1124.51
	OE PM2	1129.96
	OE PM3	1115.78

2016 Protocols	样品	Pr浓度(ng/μl)
增殖期	PM1-OE	80.97
	PM2-OE	96.57
	PM1-vec	43.89
	PM1-vec	67.24
接触抑制期	PM1-OE	1476.78
	PM2-OE	1312.56
	PM1-vec	1124.52
	PM2-vec	780.19

实验名称：制备固体LB（抗生素Kana） 2026 年 5 月 6 日

1. 配置制200 ml LB agar.

成分	浓度	用量（200ml）
Tryptone	10g/L	2g
Yeast extract	5g/L	1g
Sodium chloride	10g/L	2g
Agar	15g/L	3g
ddH2O		补至200ml

2. 灭菌（121℃，20min）

3. 配制工作浓度Kanamycin（50μg/mL），1mL，后续存于4℃

4. 超净台照20min紫外灭菌，LB agar灭菌后，放至50℃左右，1:1000加入Kana，混匀

5. 倒平板：20~30ml/10cm皿，放至凝固后，缠保鲜膜，倒置放于4℃（最长可放1个月）

抗生素	工作浓度
Ampicillin	100μg/ml
kanamycin	50μg/ml

使用时均1:1000稀释

转化、摇菌、涂平板 2026年5月6日

目的质粒：CD36-GFP（膜蛋质粒，人源human，抗性：kana）

感受态细胞：DH5α

流程：1μl质粒（纯）→ 加入（勿吹打）→ 冰上静置 30-60min → 热激（42℃）60s → 冰上冷却 2min → 感受态DH5α（30μl）→ 加入500μl液体LB → 200rpm，37℃摇1h → 涂平板（kana）200μl菌液 / 100μl菌液 → 倒置培养过夜 37℃培养箱

2026年5月7日

观察菌落生长情况：单菌落良好。

摇菌：5ml液体LB + 5μl kana（50μg/ml）+ 挑单菌落 → 37℃，200rpm过夜摇，次日提质粒。

CD36 GFP质粒编号	1	2	3	4	5	6
浓度(ng/μl)	521.6	569.89	415.5	427.2	419.5	530.6

2026年5月8日

标记提取日期（20260508）和浓度后保存于-20℃

实验名称：慢病毒包装　　2026 年 9 月 9 日

实验目的　构建 MCF-7 CD36 OE 细胞系

实验材料　质粒：CD36 OE，PCDH N-flag，工作质粒：PM，PS，Opti-MEM，PEI（1mg/ml）

293T cell，P6，汇合度 70% 左右

步骤参考前面，

9月13日收第一批病毒，14日收第二批

病毒感染 MCF-7 WT 细胞　　2026 年 9 月 10 日

1. cell：MCF-7　PS 悬转法感染

2. 病毒：PCDH.N-flag，CD36 OE，使用当天收取的第一批病毒。

3. ctl　：新鲜完全 DMEM
   VOC　：DMEM + PCDH virus 1:1
   CD36 OE：DMEM + CD36 virus 1:1

培养 24h 后换用新鲜完全 DMEM 培养至长满

Puromycin 0.8 ug/ml 筛选 4 day

2026 年 9 月 11 日

种 2×6 孔板，LD + HD

LD 组每孔加入 50 μl 3T3-L1 OE 细胞悬液

HD 组每孔加入 200 μl 3T3-L1 OE 细胞悬液

LD 组细胞加药　　2026 年 9 月 12 日

MG132 加药浓度：100nM

BafA1 加药浓度：30 nM

处理时间：12h，　ripa（含抑制剂）200μl 裂解收样

HD 组细胞加药　　2026 年 9 月 13 日

MG132 浓度：100 nM

BafA1 加药浓度：30 nM

处理时间：48h，　ripa 800 μl 裂解收样。

实验名称：BCA 蛋白定量　　2026 年 9 月 15 日

测定样本：9月12日收样的 LD 组细胞：LD ctl，LD MG132 100nM，LD BafA1 30nM

9月14日收样的 HD 组细胞：HD ctl，HD MG132 100nM，HD BafA1 30nM

BCA 蛋白定量试剂盒：P1511（普利莱）

定量结果：

LD			HD			
ctl	MG132	BafA1	ctl	MG132	BafA1	
573.3	584.7	556.9	865.7	841.0	854.8	(mg/ml)

WB　　2026年9月16日

实验目的　验证 MG132 和 BafA1 对 CD36 HD 下调的回补情况

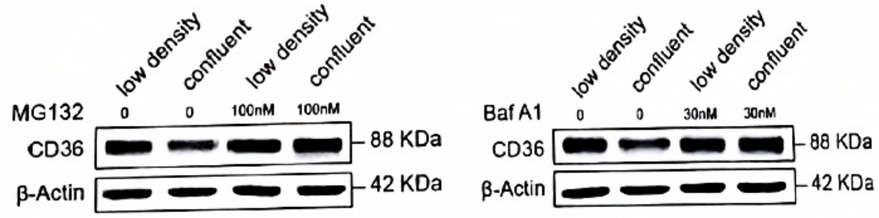
参数　1. 细胞：3T3-L1，CD36 OE 细胞系（c-flag）

处理：MG132 100nM，BafA1 30nM，LD 处理 12h，HD 处理 48h

2. 上样量：10ug，总体积 32 μl.

3. 目的条带：CD36，　内参：β-Actin

4. 显影结果



2026年9月18日

1. MG132 和 BafA1 对 CD36 抑制下调的回补重复实验以及定量分析