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：分泌型AREG介导CPS1乳酸化促进非小细胞肺癌化疗耐药的机制研究

培养单位：苏大附一院

专　业：内科学（呼吸系病学）

姓　名：刘越

学　号：20254232019

指导教师：曹园园

使用起止时间：2026年3月－2026年10月

记录起止页码：

科研名称：流式细胞术检测凋亡　　日期：2026年3月18日

一、实验原理

细胞凋亡是细胞的基本特征之一，它在机体的胚胎发育、组织修复、内环境的稳定等方面起着十分重要的作用。在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）只分布在细胞膜脂质双分子层的内侧，而在细胞凋亡早期、细胞膜中的磷脂酰丝氨酸（PS）由脂膜内侧翻向外侧。

AnnexinV是一种分子量为35-36kDa的Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的PS高亲和力特性结合。因此AnnexinV作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。将AnnexinV进行荧光素FITC标记，以标记了的AnnexinV作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶（Propidium Iodide，PI）是一种核酸染料，它不能通过完整的细胞膜，但对凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI能够透过细胞膜使细胞核染红。因此将AnnexinV与PI匹配使用，就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来。

二、实验器材

倒置显微镜、CO_2培养箱、超净工作台、低速离心机、流式细胞仪、10ml离心管、移液枪、枪头、六孔板等。

三、实验试剂

0.25%胰酶、PBS、A549专用培养基、流式凋亡检测试剂盒。

四、实验步骤

1）大皿中A549消化离心后用2ml PBS洗1-2次，离心后，2ml PBS重悬，取1ml PBS分为2管，每管500μl，其中1管100℃、5min预死。

迅速冰浴后将2管混匀，平分为3管，300g，5min，离心弃上清

2）3管中各加500μl buffer，然后

①管1：不加

②管2：加5μl FITC

③管3：加5μl PI staining solution.

3）6孔板中，收集各孔培养液到10ml离心管，加1ml PBS清洗，全收集至离心管。

4）加400μl胰酶每孔，待细胞开始脱落后用收集的培养基终止（不可预消化过久），全部收集至10ml离心管

5）300g，5min离心弃上清

6）使用预冷PBS洗涤1次，300g，5min，4℃离心后弃上清

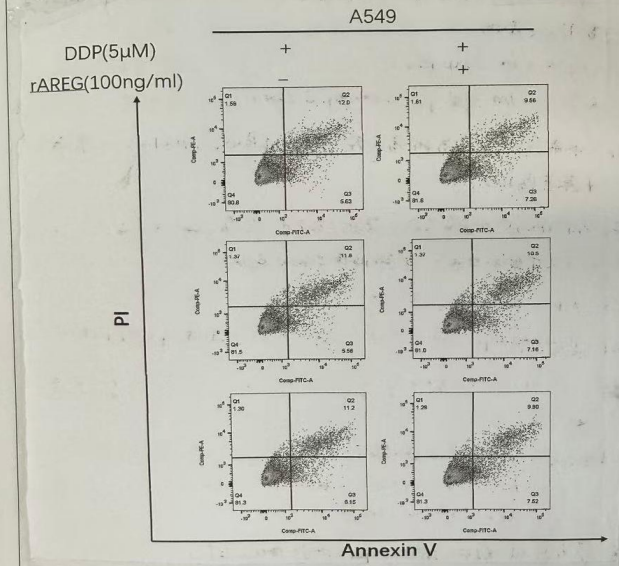
7）加入1ml PBS，轻轻至1.5ml EP管，300g，5min，4℃离心后弃上清。

8）加入

1x binding buffer	500μl
Annexin V-FITC	5μl
PI staining solution	5μl

9）轻轻混匀，避光，室温反应10-30min，上机。

五、实验结果



趋势不明显。

科研名称：CCK8实验　　日期：2026年4月6日

一、实验原理

CCK-8全称Cell Counting Kit-8，是一种基于WST-8的应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度检测试剂。其工作原理为电子耦合试剂存在的情况下，WST-8这一物质可以被线粒体脱氢酶还原成橙黄色的甲瓒产物，且其颜色深浅与细胞增殖程度成正比，与细胞毒性程度成反比。

二、实验步骤

1、制备细胞悬液：用胰酶消化贴壁细胞，离心后收集细胞于10ml离心管中，1ml培养基重悬细胞，用细胞计数板计数，计算出所需量。（3000细胞1孔）

2、在96孔板中接种细胞悬液，每孔100μl，同时设计不同浓度组，每个浓度组设3-6个复孔，且设置好空白组和对照组。

3、将96孔板放入培养箱中预培养24h左右（37℃，5%CO_2）

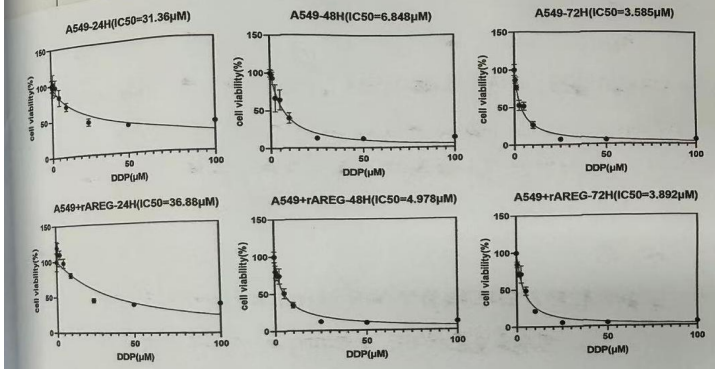
4、向96孔板各孔中加入不同浓度的待测物质，放入培养箱中孵育6-96h。

5、向每孔加入10μl CCK-8溶液，或直接配置10% CCK-8溶液的培养基以换液的形式加入。注意过程中避免产生气泡。

6、放入培养箱中孵育≥h（或1-4h，需摸索），随着时间增加，OD值就会增大。

7、将96孔板取出，酶标仪检测各孔在450nm波长处的OD值，分析处理数据，绘制增殖曲线。

科研名称：　　日期：2026年4月9日



rAREG后，24h，IC50增加，说明rAREG能使A549对DDP耐药。

科研名称：L-乳酸(L-LA)含量检测试剂盒　　日期：2026 年 5 月 29 日

一、实验原理

乳酸是生物体代谢过程中重要的中间产物，与糖代谢、脂质代谢、蛋白质代谢及细胞内能量代谢密切相关，乳酸含量是间接反映糖原平衡和有氧代谢的重要指标。乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸，同时使 NAD^+ 还原生成 NADH 和 H^+，H^+ 传递给 PMS 生成的 $PMSH_2$ 还原 MTT 生成紫色物质，在 570nm 处有特征吸收峰。

L-Lactic Acid $\xrightarrow[NAD^+ \rightarrow NADH+H^+]{\text{L-Lactate Dehydrogenase}}$ Pyruvic Acid

$NADH + MTT \xrightarrow{1\text{-mPMS}}$ Formazan (570nm)

二、实验步骤

1、样本处理（细胞）

按照细胞数量（10^6个）：生理盐水体积（ml）为 5~10：1 比例（建议 5×10^6个细胞加入 1ml 生理盐水），冰浴超声破碎细胞（功率 300W，超声 3S，间隔 7S，总时间 3min）；12000g 常温离心 10min 后取上清待测。

[收回待 10×10^6

2、测定步骤

①分光光度计预热 30min 以上，波长调至 570nm，蒸馏水调零。

②试剂二工作液，试剂四工作液可 37℃ 水浴备 5min。

③.加样表（1.5ml EP管中加入下列试剂）

试剂名称（ml）	测定管	标准管	空白管
样本	30	—	—
标准品	—	30	—
蒸馏水	—	—	30
试剂二工作液	150	150	150
试剂四工作液	240	240	240

37℃水浴避光反应 10min

试剂五	600	600	600

充分混匀后，于 570nm 处测定吸光值，分别标记为 A 测定管、A 标准管、A 空白管，计算 ΔA 测定 = A 测定管 − A 空白管；ΔA 标准 = A 标准管 − A 空白管（标准管和空白管只需做 1-2 次）

[试剂的配制]

1. 试剂二工作液：临用前先将试剂二浓缩物离至管底部，将试剂一：试剂二 = 450μl：3μl（共 452μl；约 37）的比例配置，现用现配。

2. 试剂三：黄色溶液，需要严格避光。

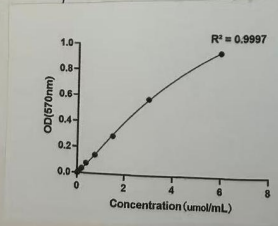
3. 试剂四：临用前加入 4ml 蒸馏水混匀，可分装后 -20℃ 保存 4周，避免反复冻融。

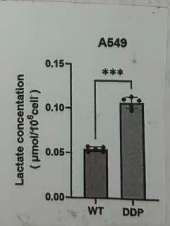
4. 试剂四工作液：将试剂三：试剂四 = 540μl：180μl（共 720μl，37）的比例稀释，现用现配，需严格避光。

5. 标准品：临用前加入 1.04ml 蒸馏水配成 100μmol/ml 标准品，2-8℃ 保存 4周。

6. 3μmol/ml 标准品的配制：临用前将 20μl 100μmol/ml 的乳酸标准品和 980μl 蒸馏水混合稀释为 3μmol/ml 的标准品待测。

三、乳酸含量的计算





一、实验目的：检测 rAREG 对 A549 细胞糖酵解过程中的关键酶的影响(mRNA 水平)。

二、实验原理：逆转录-聚合酶链反应(Quantitative Reserve Transcription Polymerase Chain Reaction，RT-qPCR)的原理为提取组织或细胞中的总 RNA，以其中的 mRNA 作为模板，采用 Oligo(dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA，再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，而数得目的基因或检测基因表达。

三、实验主要步骤：① 目的和内参引物的设计
② RNA 提取（Trizol 法）
③ 把反转录为 cDNA
④ RT-qPCR

1、引物设计

本实验使用高分文献设计好的引物，再去 NCBI 网站验证引物的特异性。

WT ○○○
mREG ○○○

2、RNA 提取

1) 工作台、仪器设备先用 75% 酒精喷洒消毒，静置 5-10 min，用干净吸水纸擦干。

2) 细胞收集：弃去旧培养基，用 PBS 洗 2 次，~~加 2mg/L 胰酶消化 2min~~，每孔加 1 ml Trizol 试剂，将六孔板放于

4°C 冰箱静置 10min，用移液枪反复吹打数次，使细胞完全裂解。

3) 用移液枪将上述细胞裂解液转移至 1.5ml 的离心管中，放于室温下静置 5min。

4) 用移液枪吸取 200μl 氯仿（三氯甲烷）加入离心管中，剧烈振荡 30s，充分混匀，放于室温下静置 10min，可以明显到分层现象，将离心管置于离心机中，在 4°C 下，以 12000 rpm/min 转速离心 15min。

5) 小心地从离心机取出离心管，用移液枪将上清液（450μl）转移至新的 1.5ml 离心管中，分点不能吸到中间的蛋白层，在上清液中加入等量的异丙醇，剧烈振荡、上下颠倒充分混匀，放置于室温下静置 10min，再将离心管置于离心机中，在 4°C 下，以 12000 rpm/min 的转速离心 15min。

6) 从离心机中取出离心管，弃上清，加入 1ml 在冰上预冷的 75% 乙醇（用 DEPC 水和无水乙醇按照 1:3 配制），振荡 30s，将离心管置于离心机中，4°C 下，以 7000 rpm/min 转速离心 5min，弃上清，小离心机离心 30s 以上，用移液枪吸走残液。

7) 将离心管打开放于室温下干燥 5min，待乙醇挥发后用移液枪加入 20μl DEPC 水溶解 RNA，-80°C 冰箱进行保存。

3. 反转（Vazyme：HisyGo RT Red SuperMix for qPCR）

小基因组清除

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

RNase-free ddH2O	10μl
5x gDNA Wiper Mix	3μl
RNA	2μl

用移液器轻轻吹打混匀，42°C 2min。

(2) 配制逆转录反应体系

为每一步反应管中直接加入 4x HisyGo qRT Red SuperMix：

4x HisyGo qRT Red SuperMix	5μl
第(1)步反应液	15μl

用移液器轻轻吹打混匀

3) 进行逆转录反应

温度	时间
37°C	15min
85°C	5 sec

(ps：产物可立即用于 qPCR 反应，或于 -20°C 保存)

4. RT-qPCR

1) 配 PCR 反应液

SupRealQ Purple Universal SYBR qPCR Master Mix(4)	5μl
Reverse primer	0.5μl
Forward primer	0.5μl
DEPC 水	3μl
cDNA	1μl

科研名称：　　日期：2026年 8月 6日

(3) 布局

β-actin
WT(-rAREG) ○○○　HK2 ○○○　GPI ○○○　PFKL ○○○
WT(+rAREG) ○○○　○○○　○○○　○○○
ALDOA　GAPDH　PGK1　PAM1
WT(-rAREG) ○○○　○○○　○○○　○○○
WT(+rAREG) ○○○　○○○　○○○　○○○
ENO1　PKM2　LDHA　β-actin
WT(-rAREG) ○○○　○○○　○○○　DDP(-rAREG) ○○○
WT(+rAREG) ○○○　○○○　○○○　DDP(+rAREG) ○○○

HK2　GPI　PFKL　ALDOA
DDP(-rAREG) ○○○　○○○　○○○　○○○
DDP(+rAREG) ○○○　○○○　○○○　○○○

GAPDH　DDP(-)　DDP(+)
DDP(-) ○○○　○○　ENO1
DDP(+) ○○○　○○　PGK1
DDP(-) ○○○　○○
DDP(+) ○○○　○○　PAM1　LDHA
DDP(-) ○○○　○○
DDP(+) ○○○　○○

在加样时准备2盘无酶枪头，1盘用来加非cDNA部分，1盘用来加cDNA部分，采用先加9μl非cDNA部分，再加1μl cDNA部分，枪头对应布局，1个孔换1个枪头。

(4)配制好反应体后，进行扩增，采用两步法PCR扩增程序：
预变性循环数1，95℃，30s；
PCR PCR反应循环数40，95℃，5s，60℃ 34s。
熔解曲线阶段不用改，信号收集在PCR阶段，熔解曲线至打平。

科研名称：　　日期：2026年 8月 6日

录入数据进行后续分析，excel。

四 实验结果

