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：多酶位点序列模块的优化及其在辐射诱导DNA甲基化检测中的应用

培养单位：苏州大学附属第二医院

专　　业：临床检验诊断学

姓　　名：周声妹

学　　号：20244233027

指导教师：尚莉

使用起止时间：

记录起止页码：

科研名称：MspJI限制性酶切体系的酶量 梯度优化. 日期：2026 年 6 月 8 日

~~MspJI 酶量优化~~ 接头连接确认（酶切gDNA + 接头）

(1) 样本准备

双链退火：49-Y { 17-Yjietou-Sp49 / 15-Yjietou } ：27.2ng/μL

M 酶：1μL (5U/μL) + 49μL 1x cut ：0.1U/μL

(2) M 酶切

模板 (gDNA：56.6ng/μL)：1/10：1.8μL (10ng)

M 酶	：1μL (0.1U/μL)	15μL
Activator	：1μL	
10x cut	：1.5μL	
H2O	：9.7μL	

37°C 1h 65°C 20min

(2) 连接头

以上模板	：15μL	
T4 DNA	：1μL	
10 x ATP	：2.5μL	25μL
10 x cut	：1μL	
49-Y	1/5：1.3μL (7ng)	
H2O	：4.2μL	

25°C 30min

(3) 0.8x Ampure XP 纯化

25μL EB 洗脱

(4) 对照 2：

49-Y	：1.3μL
10xATP	：2.5μL
10x cut	：2.5μL
H2O	：18.7μL

25μL

对照 1

模板	：1.8μL (10ng)
10xATP	：2.5μL
10x cut	：2.5μL
49-Y	：1.3μL
H2O	：16.9μL

25μL

科研名称： 日期： 年 月 日

(5) qPCR

模板：25μL

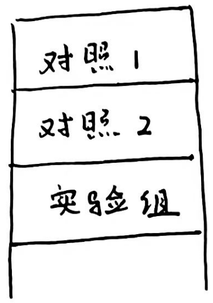
i5 dagiao：1μL

i7 dagiao：1μL

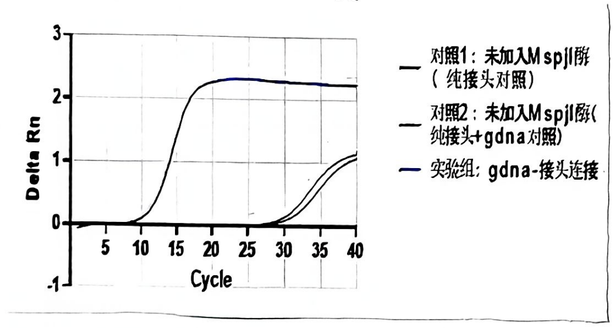
50μL

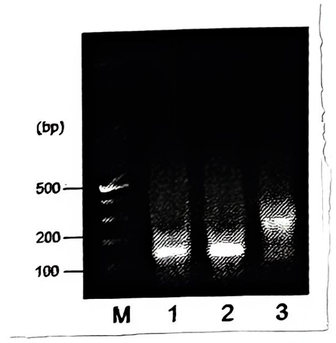
2x pcr mix：25μL

加样顺序：



(6) 结果讨论 + 跑胶





讨论分析：

仅微量M酶即可完成10ng低起始量gDNA高效酶切，酶切产物可正常与测序接头连接。该体系适配微量样本甲基化建库需求。

科研名称：　　日期：2026 年 6 月 22 日

MspJI 酶量优化

(1) 样本准备

双退 { 17-Yjietou-5949 / 15-Yjietou ：36.2ng/μL

MspJI (5U/μL)： 1μL + 24μL 1xcut ：0.2U/μL

2μL(0.2U/μL) + 2μL 1xcut：0.1U/μL

2μL (0.1U/μL) +2μL 1xcut ：0.05U/μL

2μL (0.05U/μL)+2μL 1xcut：0.025U/μL

(2) M 酶切

模板 (gDNA：65ng/μL)：1/10：1.5μL (long)

Activator ：1μL

10 x cut ：1.5μL ＼ 15μL

H2O ：10μL ／

MspJI ：1μL (0.2U / 0.1U / 0.05U / 0.025U)

37°C 1h 65°C 20min

(3)

以上模板 ：15μL

T4 DNA ：1μL ＼

10 x ATP ：2.5μL 25μL

10 x cut ：1μL /

49-Y ：0.5μL

H2O ：5μL

对1： 模板 (gDNA) ：1.5μL

10x ATP ：2.5μL

10x cut ：2.5μL

49-Y ：0.5μL

H2O ：18μL

25°C 30min

对2： ＼

2.5μL

2.5μL

0.5μL

19.5μL

科研名称：　　日期：　　年　月　日

(4) 0.8 x Ampure XP 磁珠

25μL EB 洗脱

(5) 以上模板 ：25μL

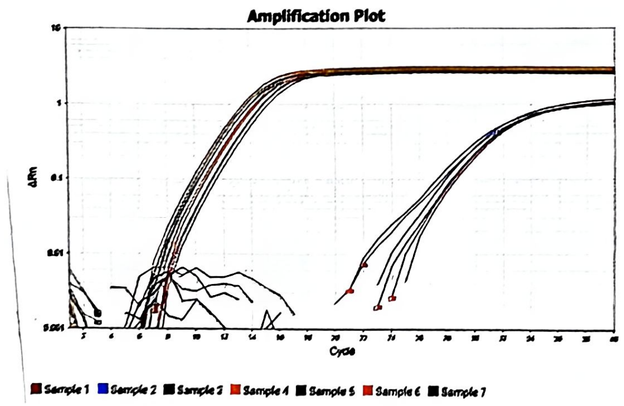
i5 daqiao ：1μL

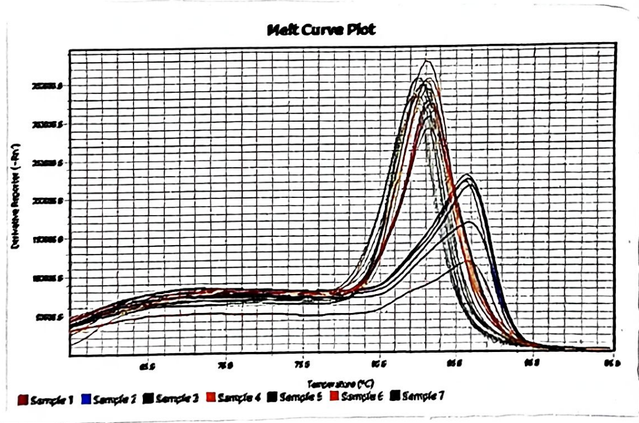
i7 daqiao ：1μL

2x pcr mix ：25μL

(6) qPCR

对1	对2
0.2U	
0.1U	
0.05U	
0.025U	





结果分析：进行从酶用量梯度优化，各组不同酶量对应的CT值无明显差异，CT结果基本持平，提示当前梯度范围内酶量尚未达到反应下限，酶仍处于饱和状态，后续需继续下调酶量，探索最低有效酶量。

MspJI 酶量优化 重复

(1) 样本准备

M 酶

4μL (5U/μL) + 9μL 1X cut : 0.5U/μL

1μL (0.5U/μL) + 4μL 1Xcut : 0.1U/μL

1μL (0.1U/μL) + 2μL 1X cut : 0.03U/μL

1μL (0.03U/μL) + 2μL 1Xcut : 0.01U/μL

1μL (0.01U/μL) + 2μL 1xcut : 0.003U/μL

1μL (0.003U/μL) + 2μL 1Xcut : 0.001U/μL

(2) - (4) 与前面步骤一致.

对照 2组一致

(5) 以上模板 : 25μL

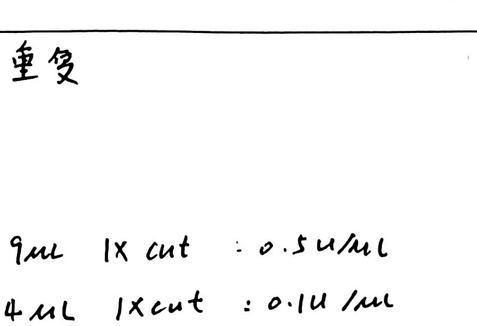
i5 dagiao : 1μL

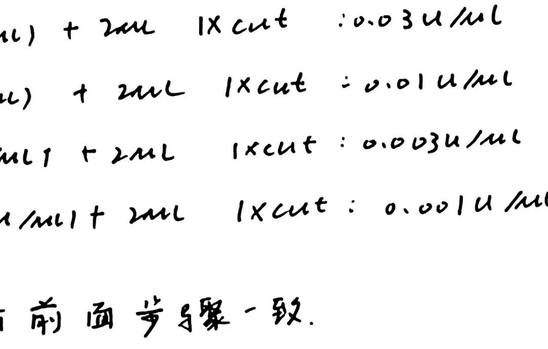
i7 dagiao : 1μL

2X pcr mix : 25μL

(6) 全PCR)

又寸 1
又寸 2
0.5U
0.1U
0.03U
0.01U
0.003U
0.001U





结果分析：

持续多轮重复优化M酶用生梯度，确定反应下限区间约为 0.003U ~ 0.03U.

(注：0.001U 忘上样，但不影响结果分析)

M 酶量优化 确认

(1) 样本准备

双链退火：49-Y { 17-Yjietou-5P49 / Is-Yjietou

85°C 5min，缓慢恢复至室温

M酶稀释：

1μL 5U/μL M + 49μL 1X cut : 0.1U/μL

5μL 0.1U/μL M + 10μL 1Xcut : 0.03U/μL

2μL 0.03U/μL M + 2μL 1X cut : 0.015U/μL

3μL 0.03U/μL M + 6μL 1x cut : 0.01U/μL

2μL 0.01U/μL M + 2μL 1X cut : 0.005U/μL

(2) M 酶七刃 (每个样本做平行对照重复样本3)

模板 (9 DNA: 05ng/μL) : 1/10 : 1.5μL (10ng)

Activator : 1μL

10× cut : 1.5μL

H2O : 10μL

MSPJ1 : 1μL (0.1U /0.03U /0.015U /0.01U /0.005U)

15μL

37°C 60min 65°C 20min

(3) 连接头 (共15管)

以上模板 : 15μL

T4 DNA : 1μL

10 × ATP : 2.5μL

10 × cut : 1μL

49-Y : 0.55μL

H2O : 5μL

25μL

对照 1（3管）

模板（gDNA）体：1.5 mL
10× ATP　：2.5 mL
10× cut　：2.5 mL
4J-Y　：0.55 mL
H₂O　：18 mL

25°C　30min

对照 2（3管）

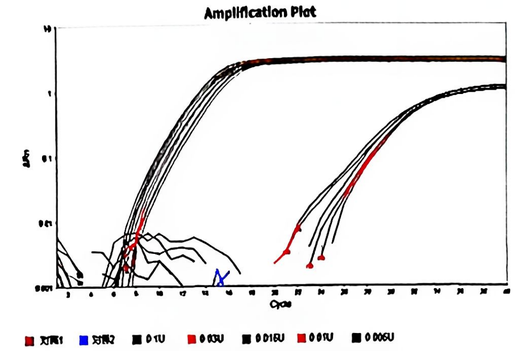
\
2.5 mL
2.5 mL
0.55 mL
19.5 mL

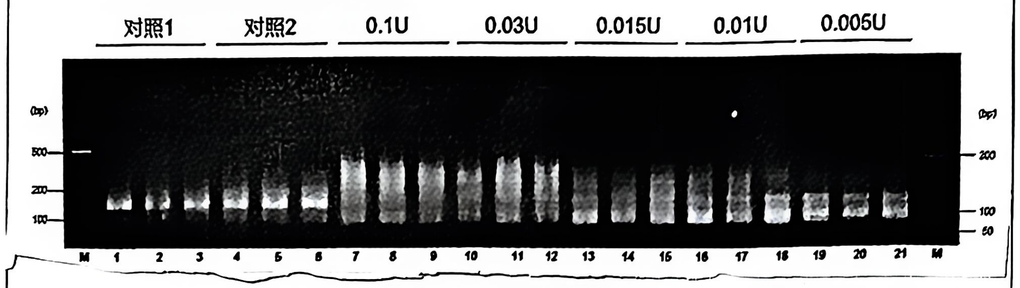
(4) 0.8× 磁珠纯化
→ 25 mL EB 洗脱

(5) 以上模板：25 mL
is daqiao　：1mL　≈ 50mL
i7 daqiao　：1mL
2× qPCR mix：25mL

qPCR 上样顺序

对1	0.1U	0.01U
对1	0.03U	0.01U
对1	0.03U	0.005U
对2	0.03U	0.005U
对2	0.015U	0.005U
对2	0.015U	
0.1U	0.015U	
0.1U	0.01U	





结果分析：如果所示，相对连接效率随酶量呈依赖关系，效率从0.005U至0.03U逐步升高，在0.03U处达到最大值，然而，进一步增加至0.1U后效率略微下降，提示过量的酶可能产生抑制或过度酶切作用。

这些结果表明，0.03U M酶是最佳酶量