

## qPCR(二)

### 一、实验目的

本研究旨在通过系统整合RNA提取、逆转录及实时荧光定量PCR技术，系统性分析人膀胱移行细胞癌株(T24)及其低中高耐药亚系(T24-RC48)中PDL1、VEGF、KBR1、ICAM1、DSP、SOD2、CAT等耐药相关基因的表达谱差异，以探究潜在调控作用。

### 二、实验内容

2.1 实验设计 本实验通过系统性实验探究人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)及其低/中/高度耐药类型(T24-RC48)中PDL1、VEGF等基因的mRNA表达差异，揭示耐药机制。实验流程分为三个阶段：总RNA提取，逆转录合成cDNA。

qPCR定量分析（具体详见“提取RNA”“逆转录”“qPCR(-)”）

2.2 样本类型 T24野生型细胞株、低/中/高度耐药T24-RC48细胞株。

2.3 测定原理 总RNA提取、逆转录合成cDNA、qPCR定量分析分别见于“提取RNA”“逆转录”“qPCR(-)”。

### 三、材料与试剂

3.1 材料 无酶枪头、1.5ml离心管：Axygen公司；移液器：Eppendorf公司  
EP管：Axygen公司；96孔板、光学封口膜(泛特律)：均购自国产公司

RNAase Free EP管、八联管、Tip枪头：购自Axygen公司。

封口膜、擦镜纸、冰盒、2ml EP管；T24细胞株；T24-RC48低/中/高度耐药株

3.2 试剂 PBS：购自美国Gibco公司；TRIZOL试剂：购自thermo fisher公司  
异丙醇、75%乙醇购自Sensi Chemical公司；逆转录试剂：购自Vazyme公司。  
ROX Reference Dye；待测基因及内参基因 GAPDH引物。

RNase-free ddH<sub>2</sub>O；氯仿

#### 四. 实验仪器

通风橱，震荡仪，-80℃冰箱，台式常温低速离心机（Eppendorf公司）；  
分光光度计（Thermo Fisher Scientific公司）恒温金属浴加热仪（Biosafet公司）；  
超微量分光光度计（赛默飞公司）；移液器、台式低温低速离心机（Eppendorf公司）  
实时定量PCR仪：ABI QuantStudio 5 1.5ml。  
离心管（Corning公司）；Cubee离心机（GeneReach公司）。

#### 五. 实验步骤 同“提取RNA、逆转录”“qPCR(-)”系统操作流程。

附录各图表如下

#	样品名称	ng/μL	A260/A280	A260/A230	A260	A280
1	i 样品 1	1610.7	2.04	2.33	40.27	19.74
2	i 样品 2	1.1	-5.19	0.59	0.03	-0.01
3	i 样品 3	1520.4	2.04	2.16	38.01	18.62
4	i 样品 4	1.3	-8.43	0.79	0.03	0.00
5	i 样品 5	1844.8	2.06	2.31	46.12	22.41
6	i 样品 6	1.3	-11.54	0.84	0.03	0.00
7	i 样品 7	1722.9	2.08	2.10	43.07	20.74

图 1 RNA 定量结果

表 1 各组逆转录体系中各试剂的加入量

	RNA 量 (ng/μL)	Enzyme Mix(μL)	5 × All-in-one qRT SuperMix(μL)	RNase-free ddH <sub>2</sub> O(μL)
- 110 -	野生型	1610.7	28.9926	115.9704
	低度耐药	1520.4	27.3672	109.4688
	中度耐药	1844.8	33.2064	132.8256
	高度耐药	1722.9	31.0122	124.0488

| PDL1  |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| VEGF  |
| RBPJ  |
| ICAM1 |
| DSP   |
| IL1B  |
| CAT   |
| GAPDH |

图 296 孔板布局示意图

表 2 体系各试剂的加入量

	cDNA(μl)	ROX Reference Dye(μl)	正向引物(μl)	反向引物(μl)	RNase-free ddH <sub>2</sub> O (μl)
野生型	15 <sup>-2</sup>	75 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	54 <sup>-2</sup>
低度耐药	15 <sup>-2</sup>	75 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	54 <sup>-2</sup>
中度耐药	15 <sup>-2</sup>	75 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	54 <sup>-2</sup>
高度耐药	15 <sup>-2</sup>	75 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-2</sup>	54 <sup>-2</sup>

## 六、实验结果

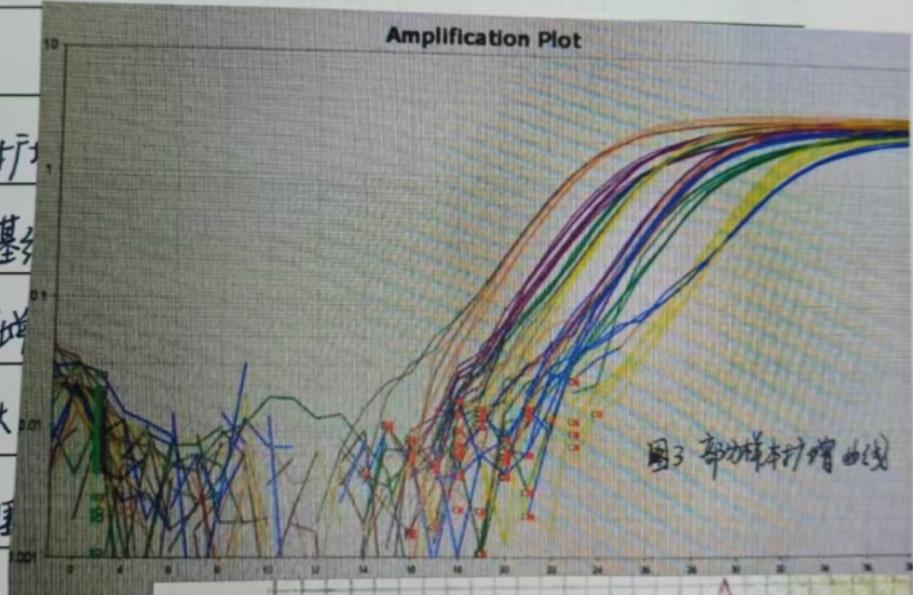
实验组与对照组扩增

均呈光滑的“S型”曲线，基

循环无漂移，指数扩增

稳定增长。C<sub>t</sub>值差异不大

扩增效率符合理想范围

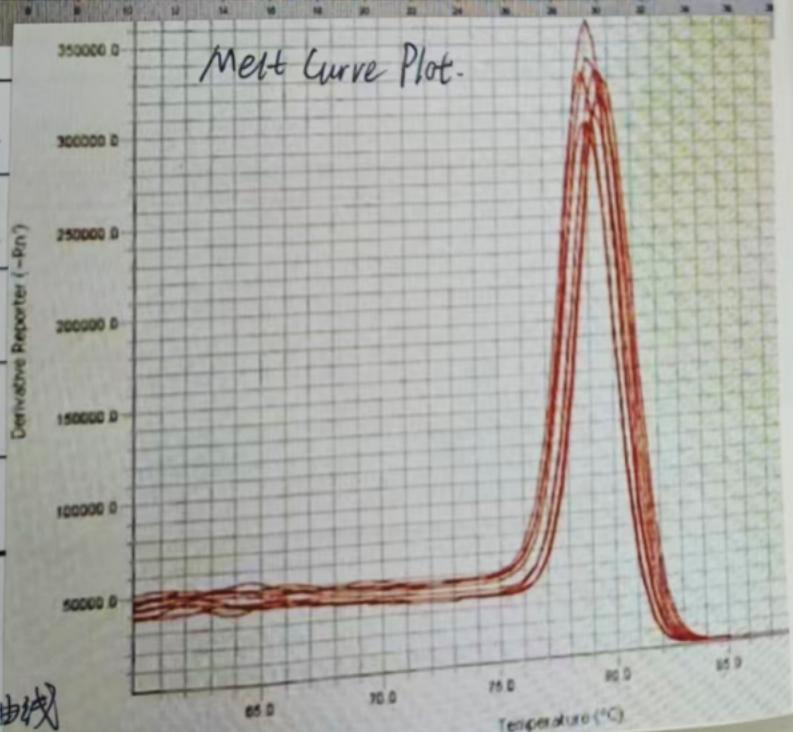


熔解曲线(图4)显示单峰。峰

形尖锐对称无杂峰或拖尾现象，表

明扩增产物纯度良好，无非特

异性扩增或引物二聚体干扰。



对于PDL1基因(图5)低度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.001$ )；高度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )。

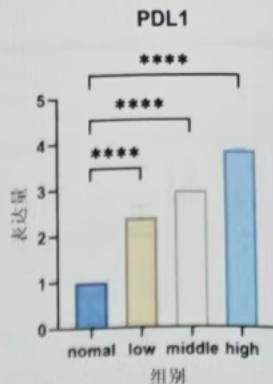


图5 各组细胞中基因 PDL1 表达差异分析图

对于RBPJ基因(图6)低度耐药细胞对野生型细胞无显著差异(ns)；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )；高度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )。

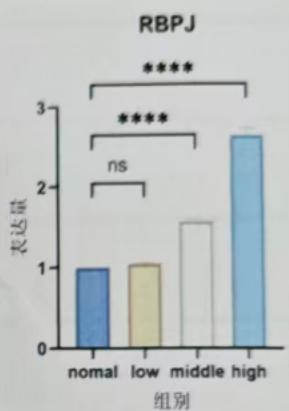


图6 各组细胞中基因 RBPJ 表达差异分析图

对于SOD2基因(图7)低度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.01$ )；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )；高度同中度。

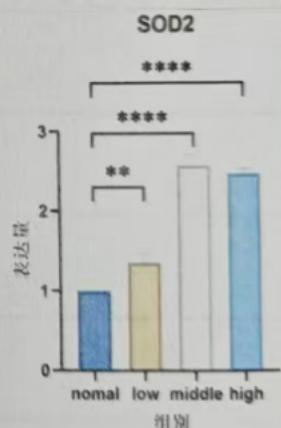


图7 各组细胞中基因 SOD2 表达差异分析图

对于VEGF基因(图8)低度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )；高度耐药细胞不增生型细胞显著增高( $p<0.0001$ )。

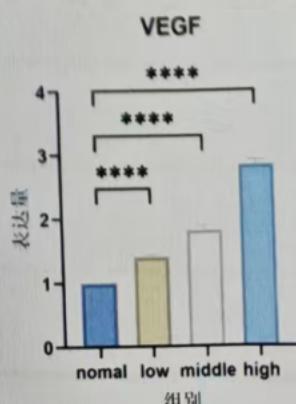


图8 各组细胞中基因 VEGF 表达差异分析图

对于CAT基因(图9)低度耐药对野生型细胞显著降低( $P<0.0001$ )；中度耐药对野生型细胞显著降低( $P<0.001$ )，高度耐药细胞对野生型细胞显著降低( $P<0.0001$ )。

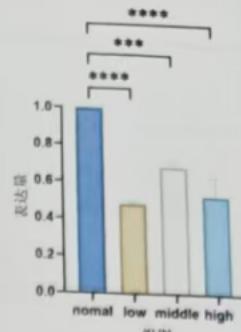


图9 各组细胞中基因CAT表达差异分析图

对于DSP基因(图10)低度耐药细胞对野生型细胞无显著差异(ns)；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $P<0.0001$ )；高度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $P<0.0001$ )。

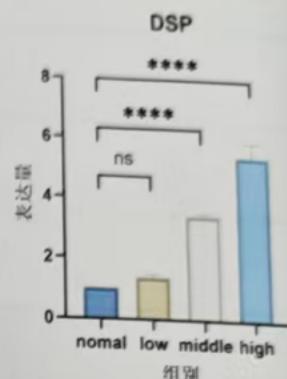


图10 各组细胞中基因DSP表达差异分析图

对于ICAM1基因(图11)低度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $P<0.05$ )；中度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $P<0.0001$ )；高度耐药细胞对野生型细胞显著增高( $P<0.0001$ )。

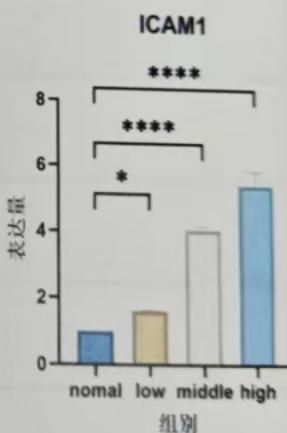


图11 各组细胞中基因ICAM1表达差异分析图

## 七. 结果分析

本实验通过系统整合RNA提取、逆转录及qPCR技术，对人膀胱移行细胞癌株(T24及低、中、高耐药亚系T24-RC48)中PPL1、VEGFRBP1、ICAM1、DSP、SOD2、CAT等耐药相关基因的mRNA表达差异进行了分析。以下是具体的结果分析：

## 7.1 总体实验流程回顾 同实验设计基本流程。

### 7.2 各基因表达差异分析

PDL1基因：在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用，高表达提示PDL1可能是膀胱癌耐药机制中的关键调控因子，针对PDL1靶向可能克服膀胱癌耐药性。

VEGF基因：主要功能是促进血管生成。耐药细胞中高表达可能有助于维持肿瘤的生长和繁殖，从而增强耐药性。

RBPJ基因：在低度耐药性逐渐增强的过程中发挥关键作用，随耐药程度加深，其表达上调可能参与了更复杂的耐药调控网络，进一步影响耐药性。

SOD2基因：SOD是一种抗氧化酶，其高表达可能增强了肿瘤细胞的抗氧化能力，帮助细胞抵抗氧化应激损伤，从而维持细胞存活和耐药性。

CAT基因：CAT同样是抗氧化酶，其表达降低可能导致细胞内活性氧水平升高，影响细胞正常生理功能，进而促进耐药表型的形成。

DSP基因：DSP参与细胞间黏附等过程，其中高耐药细胞中的高表达可能改变了细胞间的相互作用和信号转导，从而参与耐药机制的形成。

ICAM1基因：ICAM1参与细胞间黏附和免疫细胞与肿瘤细胞的相互作用，其高表达可能影响肿瘤微环境，促进肿瘤细胞的存活和耐药性发展。

### 7.3 实验结果可靠性分析。

从实验结果来看，PCR扩增图显示实验组与对照组扩增曲线均呈光滑的“S”型曲线，基线期无漂移，指数扩增期荧光信号稳定。

定增长，说明扩增过程正常，体系稳定；CT值差异方面，实验组对照组虽有差别但重合度高，且统计学分析两组间差异显著( $p=0.0082$ )，保证了实验结果的可信度。扩增效率为95.2%。 $(\Delta C_t)_{平均} = -3.45$ ，处于理想范围(90%~110%)，进一步证实了实验体系的可靠性。

综上所述，本实验通过对人膀胱移行细胞癌株及其耐药亚系中多个耐药相关基因表达差异的分析，揭示了这些基因在膀胱癌耐药表型形成中的潜在调控作用。但这些结果仍需进一步通过功能验证实验进行深入探究，以明确各基因在耐药过程中的具体作用机制。