

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 3 月 10 日 18:00 — 2025 年 3 月 17 日 21:00

生长曲线测定（一）

一、实验目的

通过 CCK-8 法测定 T24 细胞株及高度耐药 T24-RC48 细胞株在 200 $\mu\text{g/ml}$ RC48 处理下的三天内的增殖能力，绘制生长曲线，评估药物对不同细胞生长的抑制作用。为正式测定生长曲线摸索条件。

二、实验内容

2.1 实验设计

细胞类型：T24 野生型细胞株、高度耐药 T24-RC48 细胞株。

药物处理：维迪西妥单抗（RC48）浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 。

时间点：0h、24h、48h、72h。

重复次数：每组 6 个复孔。

2.2 测定原理

CCK-8 试剂中的 WST-8 被细胞线粒体脱氢酶还原为橙黄色甲瓚，其吸光度（OD=450nm）与活细胞数量正相关，通过酶标仪测定吸光度值计算细胞存活率。

三、材料与试剂

3.1 材料

1000 μl 枪头、100 μl 枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

96 孔板（Corning 公司） $\times 4$

移液器：Eppendorf

T25 培养瓶购自 Corning 公司

人膀胱移行细胞癌细胞株（T24）

高度耐药细胞株 T24-RC48

3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国 Gibco 公司

McCoy's5A 培养基来自上海源培生物科技股份有限公司

胎牛血清（FBS，Gibco 公司）

维迪西妥单抗（RC48，荣昌生物制药股份有限公司）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 10 日 18:00 — 2025 年 3 月 17 日 21:00

CCK-8 试剂盒

McCoy's 5A 基础培养基（上海源培生物科技股份有限公司）

四、实验仪器

超净台：苏州净化设备厂

台式常温低速离心机：Eppendorf 公司

酶标仪

五、实验步骤

5.1 取处于对数生长期的 T24 细胞株及高度耐药 T24-RC48 细胞株，胰酶消化后离心重悬，调整密度至 4×10^4 个/ml。

5.2 将细胞悬液按实验设计分别接种至 4 块 96 孔板中并编号，每种细胞在每板各接种 12 个孔。每孔 $100 \mu\text{l}$ （含 4×10^3 个细胞），边缘孔加 PBS 防蒸发。置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养。

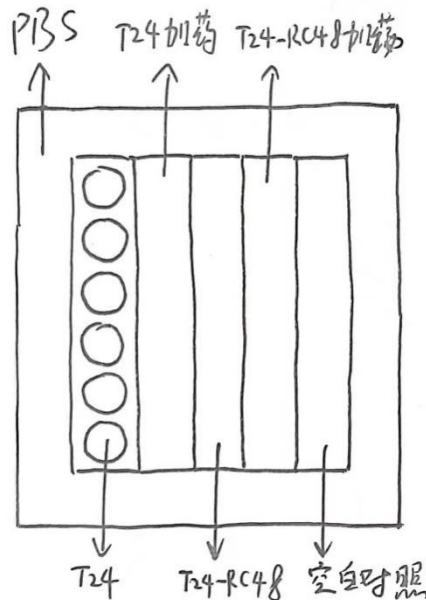


图 1 各组细胞悬液在 96 孔板中的分布情况

5.3 过夜后细胞贴壁，吸除旧培养基，取 3 个 96 孔板更换新鲜培养基(每个培养板中取 6 个孔的新鲜培养基中加含 $200 \mu\text{g/ml}$ 的 RC48)，记此时的时间为 0，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中继续培养。剩下一板（1 号板）按照 CCK-8 试剂盒说明书要求将显色液加入培养孔中，在培养箱中继续培养 1h，用酶标仪测定 450nm 吸光度值。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 10 日 18:00 — 2025 年 3 月 17 日 21:00

5.4 分别于 24h、48h、72h 取出对应孔板按照 CCK-8 试剂盒说明书要求进行处理并测定 450nm 吸光度值。

5.5 以 RC48 处理时间为横坐标，450nm 处的实验组 OD 值—空白对照孔 OD 值为纵坐标，绘制绘制时间-OD 值曲线，即细胞增殖曲线。

六、实验结果

6.1 细胞形态观察

从图 2 的倒置相差显微镜照片可以看出，经过 72 小时的处理后，T24-RC48 细胞依然保持着较为良好的生长状态，细胞形态相对完整，且细胞密度约为 100%。

6.2 细胞增殖能力变化

在未添加 RC48 药物处理时，两种细胞株均呈现出较为稳定的增殖趋势，且它们的倍增时间无明显差异，表明在正常培养条件下，两者的增殖情况相近。而在加入 200 μ g/ml 浓度的 RC48 处理后，T24-RC48 细胞株的倍增时间虽略有延长，但相较于加药后的亲本 T24 细胞，其延长幅度明显较小，且仍显著短于加药后的 T24 细胞。T24 细胞加药的增殖曲线明显低于未加药时的水平，呈现出明显的抑制趋势。

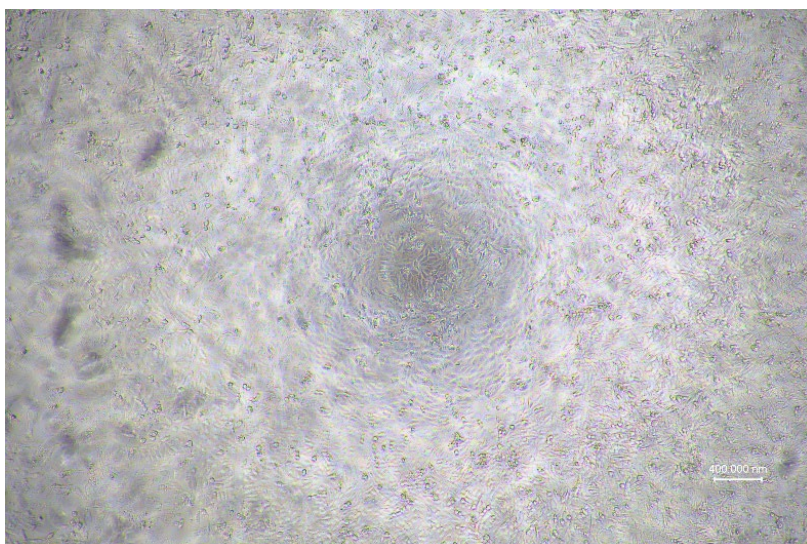


图 2 T24-RC48 细胞 72h 后于倒置相差显微镜下的照片

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 10 日 18:00 — 2025 年 3 月 17 日 21:00

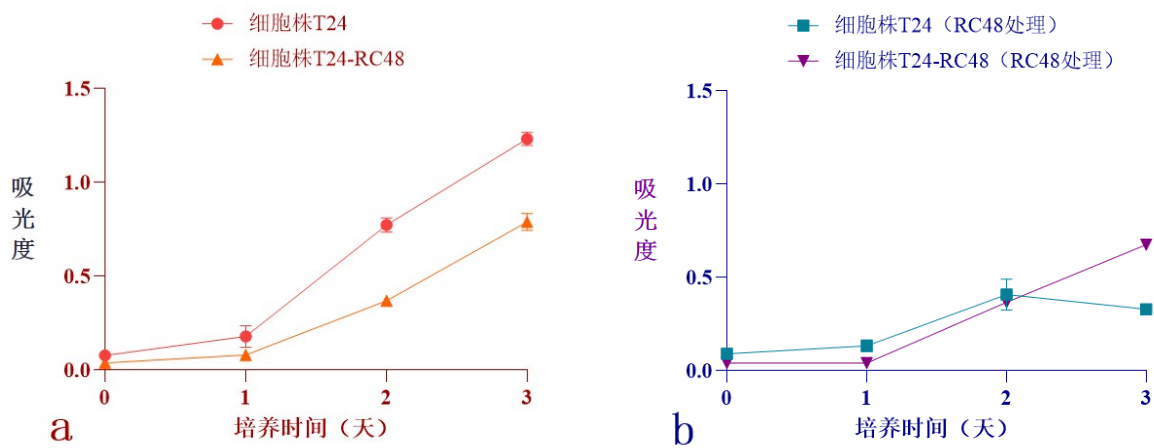


图 3 T24 和 T24-RC48 细胞在加药前(3a)后(3b)生长曲线图

七、结果分析

经72小时培养，未加药细胞形态相对完整，且细胞密度接近100%，表明在本实验中，铺板密度与培养时间设置合理，这为后续开展为期5天的生长曲线测定提供了参考，提示我们应适当降低铺板浓度。

由图3可知，RC48耐药细胞T24-RC48与亲本细胞T24倍增时间无明显差异。加药后T24-RC48倍增时间相对未加药时未出现明显延长，且显著短于加药的亲本T24细胞。由此可见，本研究所培养的T24-RC48细胞株相较于传统的T24细胞株，对RC48药物展现出了更强的耐药性。在药物处理下，T24-RC48细胞的生长速率虽受到一定影响，但这种影响远小于RC48对T24细胞的影响。这可能是因为T24-RC48细胞在长期的培养和筛选过程中，逐渐发展出了对RC48药物的适应机制，例如通过增强药物代谢酶的活性、增加药物外排泵的表达、改变细胞内信号通路等方式，来降低药物对细胞增殖的抑制作用。同时，T24细胞加药的增殖曲线呈现出明显的抑制趋势提示我们 200ug/ml 的药物处理浓度较为合理，在后续实验中可以沿用。

这一结果对于深入研究 T24 细胞对 RC48 药物的耐药机制具有重要意义。它验证了实验的预期，即 T24-RC48 细胞在 RC48 处理下能够保持相对较高的增殖能力，为后续更深入的耐药机制研究奠定了基础。提示我们在后续的研究中，可以进一步探究 T24-RC48 细胞具体的耐药机理，为开发更有效的抗癌药物和治疗策略提供理论依据。