

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 2 日 18:00 — 2025 年 5 月 7 日 17:00

## 细胞周期流式检测（一）

### 一、实验目的

本实验旨在利用细胞周期检测试剂盒（Cell Cycle Staining Kit），检测 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株加药前后的细胞周期分布，分析耐药细胞株的周期变化，为揭示膀胱癌 ADC 耐药机制提供实验依据。

### 二、实验内容

#### 2.1 实验设计

**样本分组：**空白对照组（未处理的 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株）  
药物处理组（T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别用维迪西妥单抗（RC48）处理 36 小时）

**重复次数：**每组 3 个样本。

#### 2.2 测定原理

在细胞周期中，G0/G1 期细胞的 DNA 含量为 2N，S 期细胞的 DNA 含量介于 2N 到 4N 之间，G2/M 期细胞的 DNA 含量为 4N。细胞周期检测试剂盒（Cell Cycle Staining Kit）使用 DNA 结合染料碘化丙啶（Propidium Iodide, PI），对细胞进行染色，通过流式细胞仪检测细胞的 DNA 含量，从而得到细胞周期分布的直方图。通过比较加药前后的细胞周期分布直方图，可以分析药物对细胞周期进程的影响，例如是否导致细胞周期阻滞在某个特定阶段。

### 三、材料与试剂

#### 3.1 材料

枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

10cm 细胞培养皿（Corning 公司）

人膀胱移行细胞癌细胞株（T24）

低，中，高耐药细胞株 T24-RC48

#### 3.2 试剂

PBS、胰酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 2 日 18:00 — 2025 年 5 月 7 日 17:00

---

McCoy's5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司

细胞周期检测试剂盒（联科生物，CCS012）

## 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 公司流式细胞仪（BD 公司，非 C6 型）

## 五、实验步骤

**5.1** 将 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别接种于 6 个 10cm 细胞培养皿（Corning 公司）中。

**5.2** 24 小时后，每种细胞取 3 皿正常换液，另外 3 皿换成含有 200 $\mu$ g/ml 维迪西妥单抗的完全培养基处理 36 小时。

**5.3** 弃去培养基，用 PBS 洗涤细胞 3 次。

**5.4** 加入胰酶消化细胞，轻轻拍打培养瓶使细胞脱落。

**5.5** 收集每孔细胞悬液，1000rpm 离心 5 分钟，弃上清。

**5.6** 用预冷的 PBS 离心洗涤细胞两次，弃上清。

**5.7** 加入 1 ml DNA Staining solution 和 10  $\mu$ l Permeabilization solution，涡旋振荡 5 - 10 秒混匀，室温避光孵育 30 分钟。

**5.8** 上流式细胞仪检测。

**5.9** 使用 FlowJo 软件对流式细胞仪数据进行分析，计算细胞处于各细胞周期阶段的占比，并比较不同耐药组与野生型细胞株在细胞周期分布上的差异。

## 六、实验结果

在本次实验中，各组细胞（T24 野生型及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的空白对照组与药物处理组）经 PI 染色后，流式细胞仪检测结果显示所有样本均未呈现明显的 DNA 荧光信号。仅检测到低强度背景信号，与未染色样本的基线水平相似。

将染色时间延长到 4h 后上机复测，结果仍无改善，荧光信号强度未随染色时间延长而增加。

## 七、结果分析

本次实验未能获得有效的细胞周期分布数据，可能是由于细胞数量过多：每份样本使用

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 2 日 18:00 — 2025 年 5 月 7 日 17:00

---

1 个 10cm 培养皿的细胞量（约  $4\times 10^6$  细胞），导致染色液与细胞比例失衡。过量细胞可能阻碍 PI 与 DNA 充分结合，或导致染色液渗透不均。在后续实验中，可将每份样本从 1 个 10cm 细胞培养皿的细胞量改成六孔板单孔的细胞量以减少细胞密度，确保获得可分析的细胞周期分布数据，为耐药机制研究提供依据。