

转录组测序样本制备与送检

一. 实验目的

制备T24野生型细胞株及低中高耐药T24-RC48细胞株的TR₂₀₁裂解液样本，于冰送检至测序公司，用于后续转录组测序分析。

二. 实验内容

2.1 实验设计

样本类型：T24野生型细胞株、低/中/高度耐药T24-RC48细胞株。

重复次数：每组3个样本。

2.2 测定原理

转录组测序(RNA-seq)通过逆转录将RNA转化为双链cDNA文库，随后进行测序以数字化定量基因表达信息。其流程包括：从样本中提取总RNA后，真核生物通过Oligo(dT)磁珠富集mRNA(依赖poly-A尾特性)，随后对RNA进行片段化处理，利用随机引物合成cDNA，经末端修复、加接头等步骤构建文库，最终通过illumina等平台进行高通量测序。该技术以单核苷酸分辨率捕获转录本序列，其测序深度与基因表达量成正比，能够实现全转录组覆盖，并精准解析可变剪切、融合基因等结构变异。RNA-seq无需预先设计探针，具有高灵敏度和跨

物种适用性广泛应用于疾病机制研究、发育调控分析及新物种发现。

三、材料与试剂

3.1 材料

枪头、15ml 离心管购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

T25 培养瓶购自 Corning 公司

10cm 细胞培养皿（Corning 公司）

液氮、干冰

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、胰酶均购自美国 Gibco 公司

McCoy's 5A 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）

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

五、实验步骤

5.1 将低、中、高耐药及野生型细胞株铺在10cm培养皿中，待细胞长至80%以上。

5.2 弃去培养液，加入4℃预冷的PBS，平放轻轻摇动1分钟后弃去PBS。重复以上操作3次以充分洗去培养液。

5.3 每 1×10^7 个细胞加入1ml Trizol试剂，使Trizol接触长有细胞的表面并充分消化。

5.4 用1ml枪头反复吹打Trizol悬液，并将其转移到RNase-free的1.5ml EP管中，用一次性注射器继续进行反复抽打细胞直至看不见成团的细胞块，整个溶液呈清亮而不粘稠的状态。

5.5 标记样本编号，液氮速冻后转移至-80℃保存。

5.6 干冰包装，填写测序公司交接单（附样本信息表），寄送至测序公司。

六、实验操作照

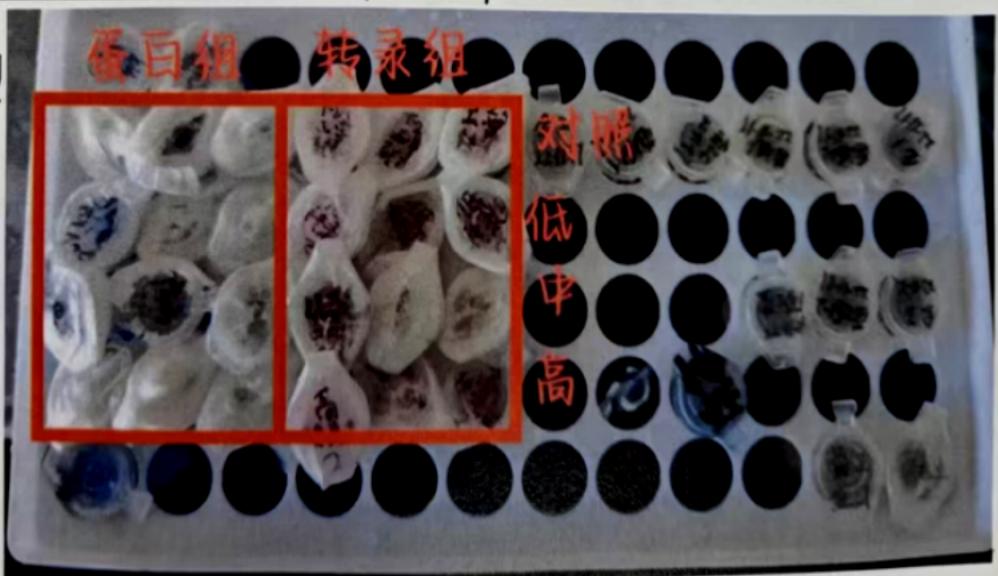
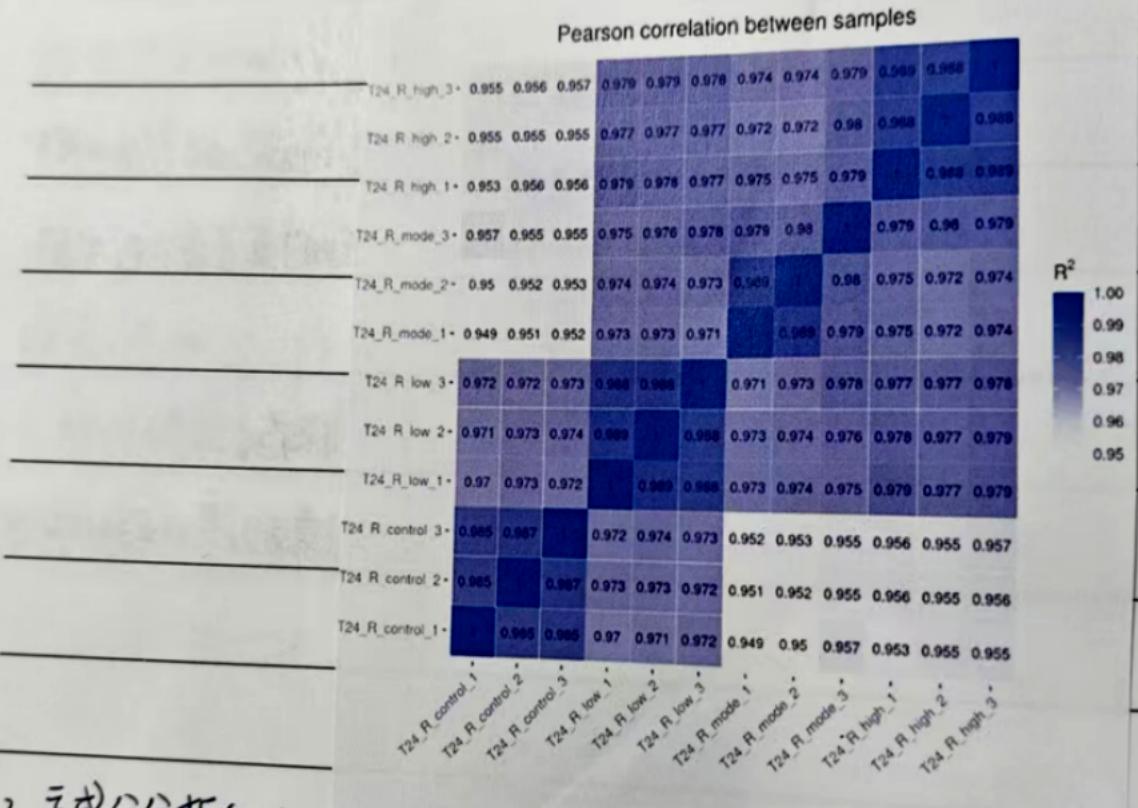


图1 转录组学测序制备的样本

七、实验结果

7.1 样本间相关性分析

通过计算所有样本基因表达值(CPKM)的皮尔逊相关系数(R^2)，我们发现各组内样本间的相关系数 R^2 均大于0.985，显示出较好的组成性；而耐药组与野生型组间相关系数显著降低，表明耐药性诱导导致基因表达模式改变。相关性热图显示，组成样本聚集成簇，组间样本分散，符合实验设计预期。



7.2 主成分分析(PCA)

图 2 样本间相关性

基于FPKM值的PCA及3D-PCA结果显示,各耐药梯度组内样本在成分空间紧密聚集;野生型与耐药组沿PC1轴显著分离,低、中、高耐药组沿PC2轴呈现分层分布。

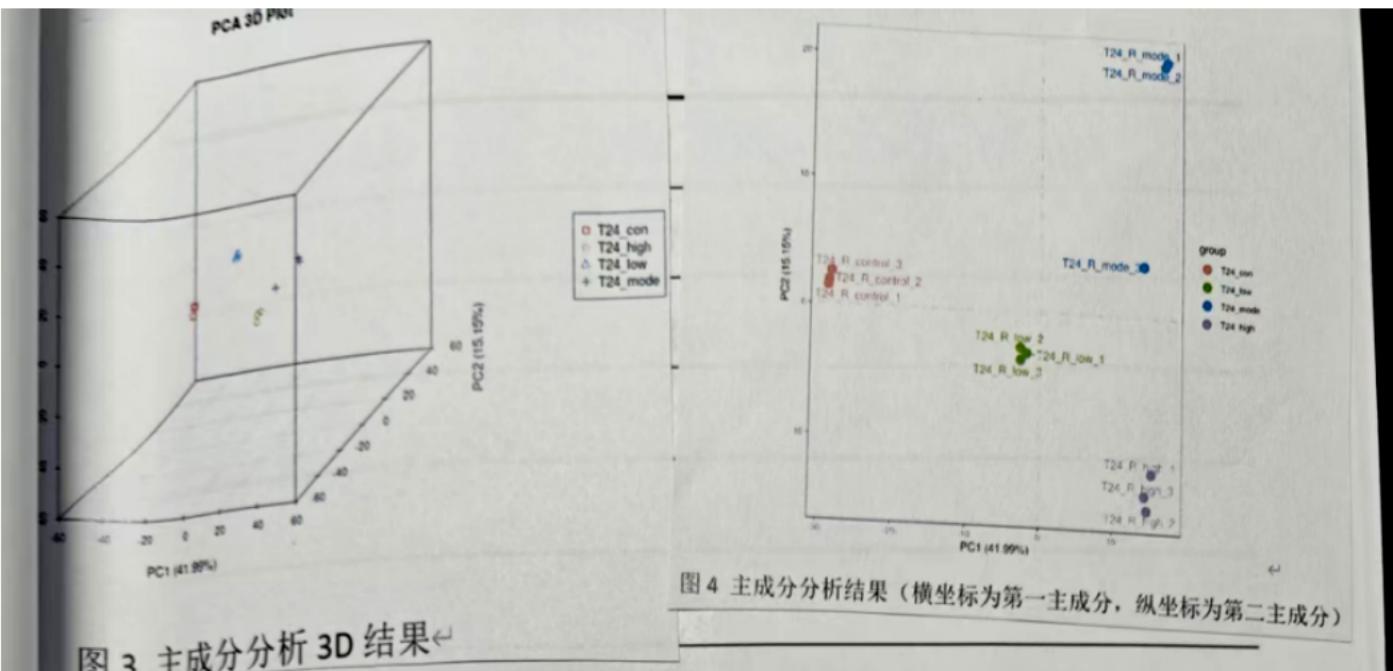
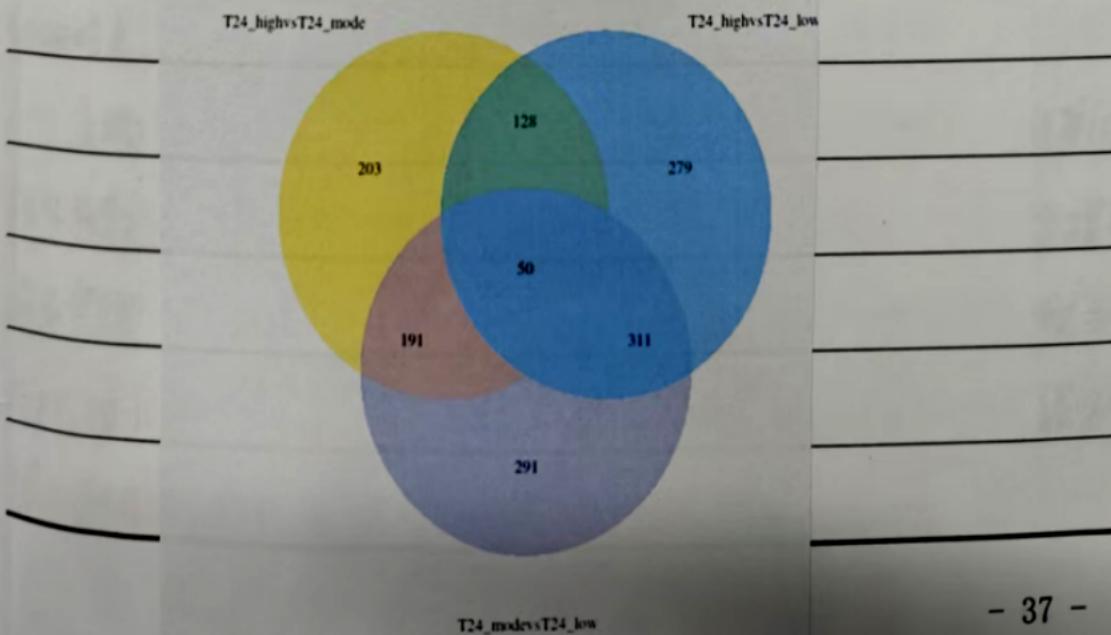


图3 主成分分析3D结果

图4 主成分分析结果(横坐标为第一主成分,纵坐标为第二主成分)

7.3 差异基因重叠分析

通过三重韦恩图比较不同耐药梯度组的差异基因,发现三组比较(高vs中、高vs低、中vs低)存在50个共有核心差异基因,提示耐药性发展而基础调控网络;两两重叠区显示阶段性调控特征(高vs中与高vs低共享178个基因,高vs中与中vs低共享247个基因,高vs低与中vs低共享361个基因),反映耐药性升级伴随基因表达动态演变。



7.4 基因表达分布评估

基于 $\log_2(FPKM+1)$ 的盒形图分析显示，所有样本中位数FPKM值范围为1-2，四分位距均<3，表明数据标准化有效。各样本异常值占比少，符合高通量测序数据质量要求。

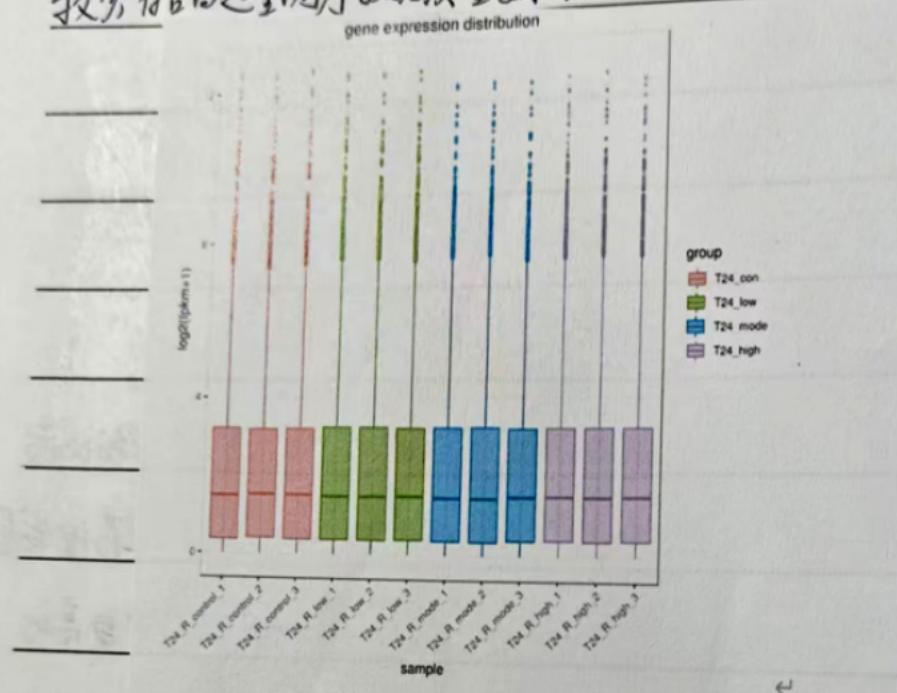


图 6 基因表达分布图

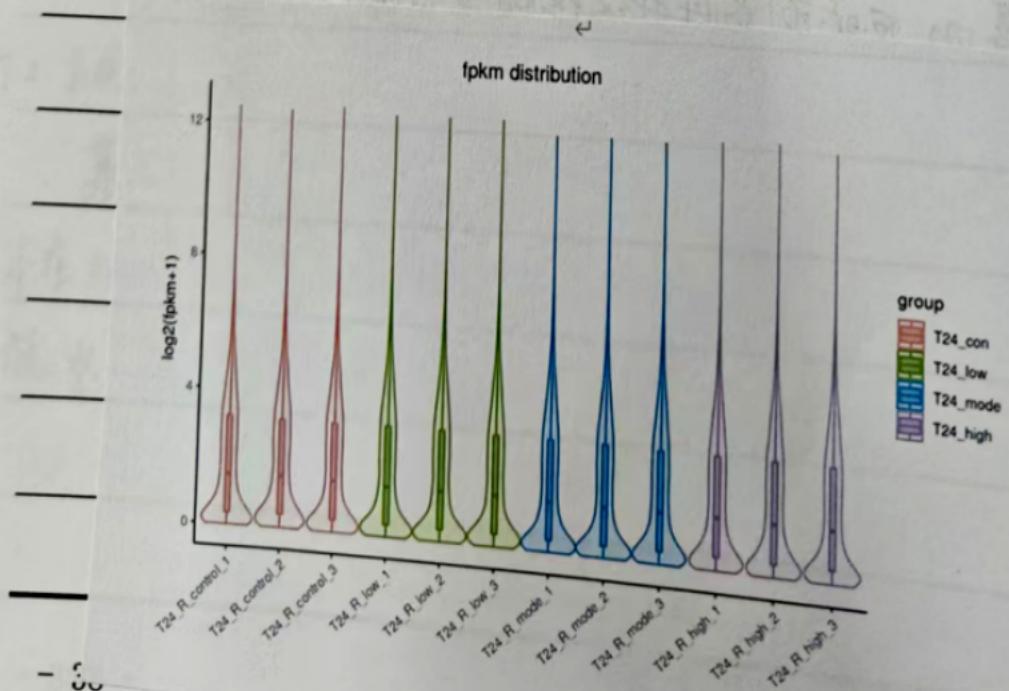


图 7 FPKM 分布图

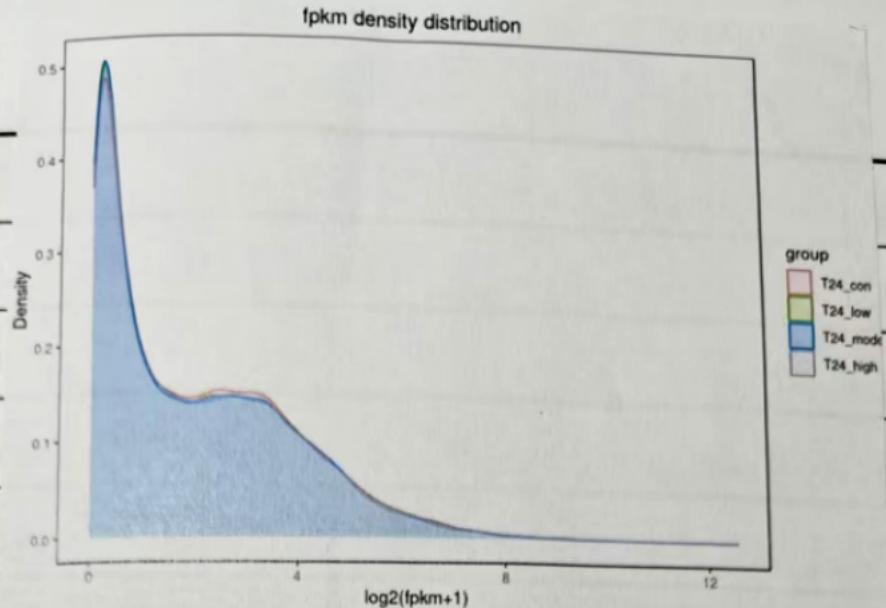


图 8 FPKM 密度分布图

八、结果分析

样品间基因表达水平相关性是检验实验可靠性和样本选择性是否合理的重要指标。相关系数越接近1，表明样品之间表达模式的相似度越高，Encode 计划建议皮尔逊相关系数的平方(R^2)大于0.92 (ENCODE Project Consortium, 2004)。在本实验中各组组内样本的相关系数 R^2 均大于0.985，显示出较好的组内重复性，而耐药组与野生型组间相关系数显著降低。该结果表明本实验操作具有可重复性，而耐药组与细胞培养、TRIZol 破解等关键步骤标准化程度高。(笔误，，)

主成分分析(PCA)也常用来评估组间差异及组内样本重複情况，PCA采用线性代数的计算方法，对数以万计的基因变量进行降维及主成分提取，在本实验中，各耐药梯度组内样本在主成分空间紧密聚集；野生型与耐药组沿PC1轴显著分离，低、中、高耐药组沿PC2轴呈现分层分布。提示耐药性差异与主成分变化高度关联。