

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

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 TRIzol 裂解液样本，干冰送检至测序公司，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、发育调控分析及新转录本发现。

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

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

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

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）

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、实验操作照片



图 1 转录组学测序制备的样本

七、实验结果

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

7.1 样本间相关性分析

通过计算所有样本基因表达值（FPKM）的皮尔逊相关系数（ R^2 ）,我们发现各组组内样本间的相关系数 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，表明耐药性诱导导致基因表达模式改变。相关性热图显示，组内样本聚集成簇，组间样本分散，符合实验设计预期。

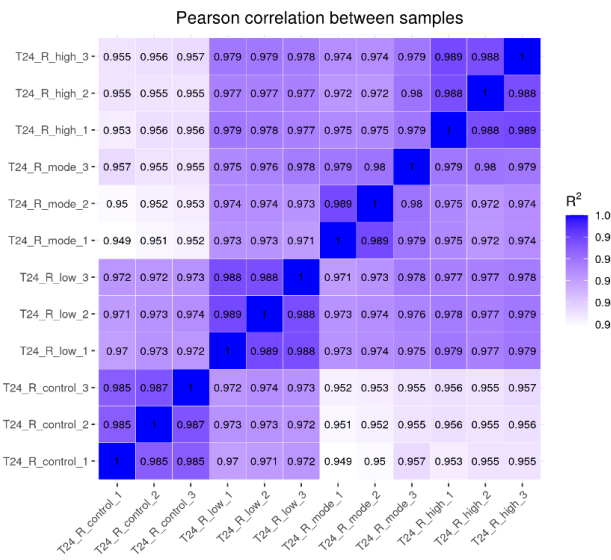


图 2 样本间相关性

7.2 主成分分析（PCA）

基于 FPKM 值的 PCA 及 3D-PCA 结果显示，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。

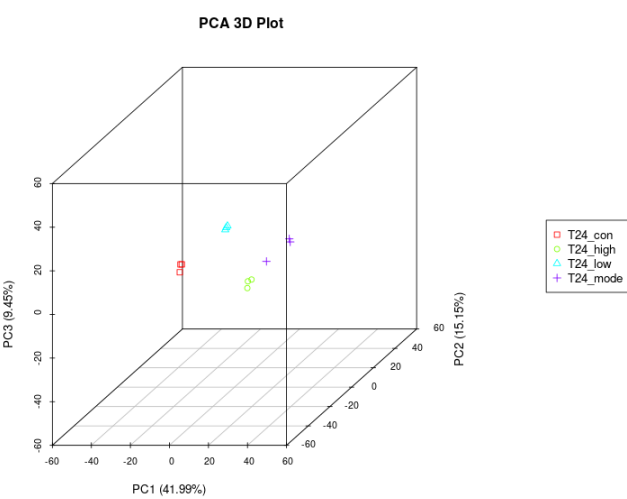


图 3 主成分分析 3D 结果

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

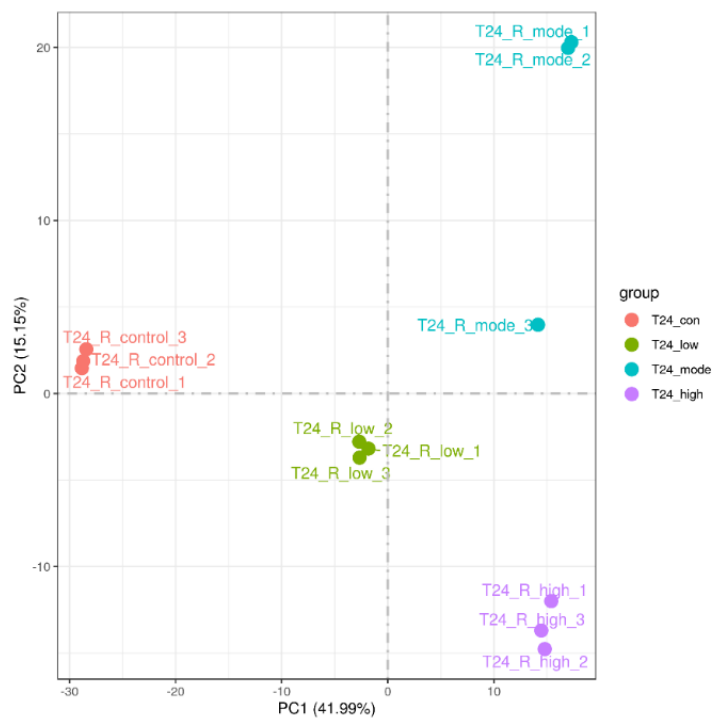


图 4 主成分分析结果（横坐标为第一主成分，纵坐标为第二主成分）

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，提示耐药性发展的基础调控网络；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 241 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。

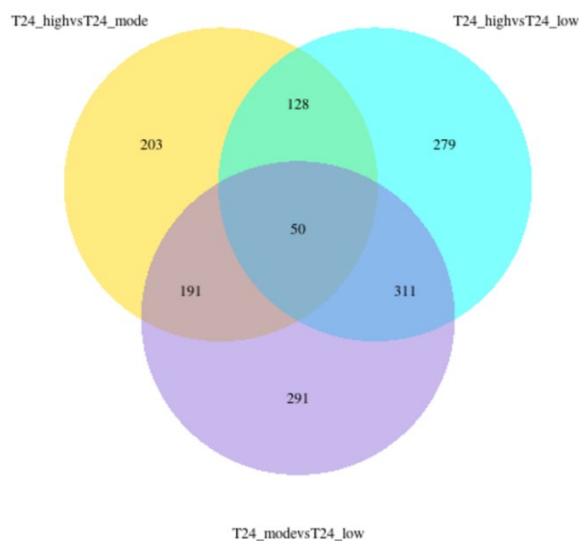


图 5 差异基因韦恩图

7.4 基因表达分布评估

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

基于 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 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。各样本异常值占比较少，符合高通量测序数据质量要求

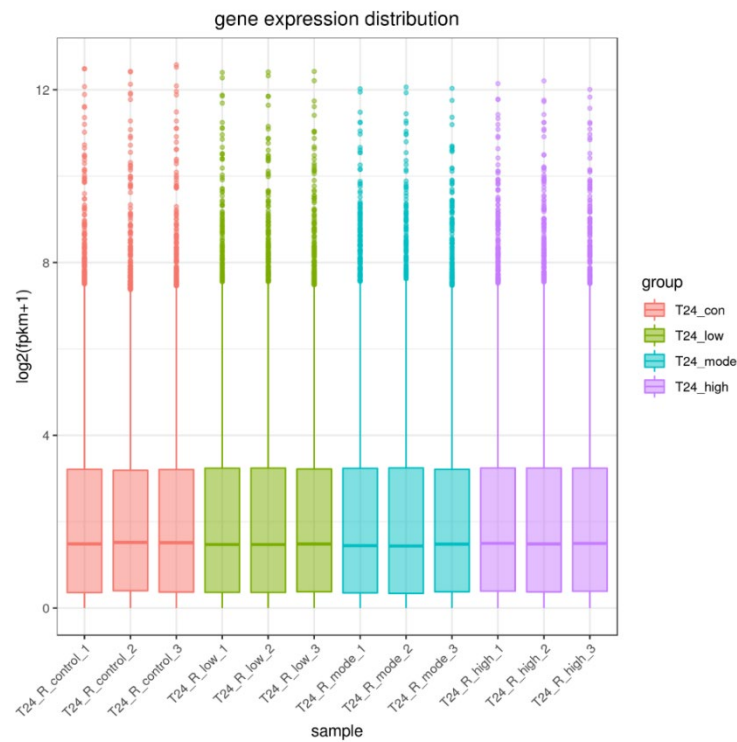


图 6 基因表达分布图

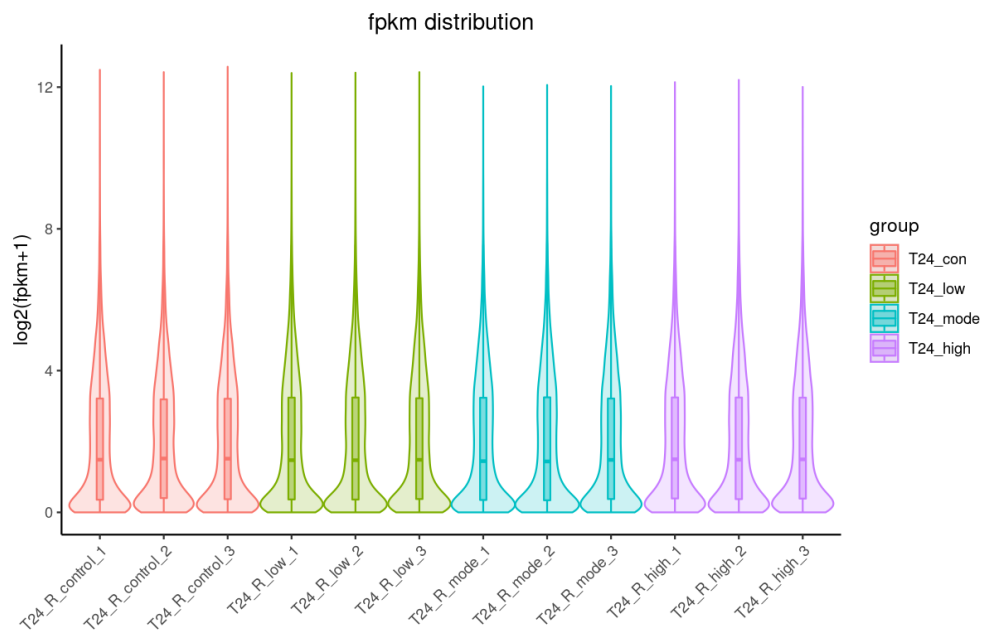


图 7 FPKM 分布图

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

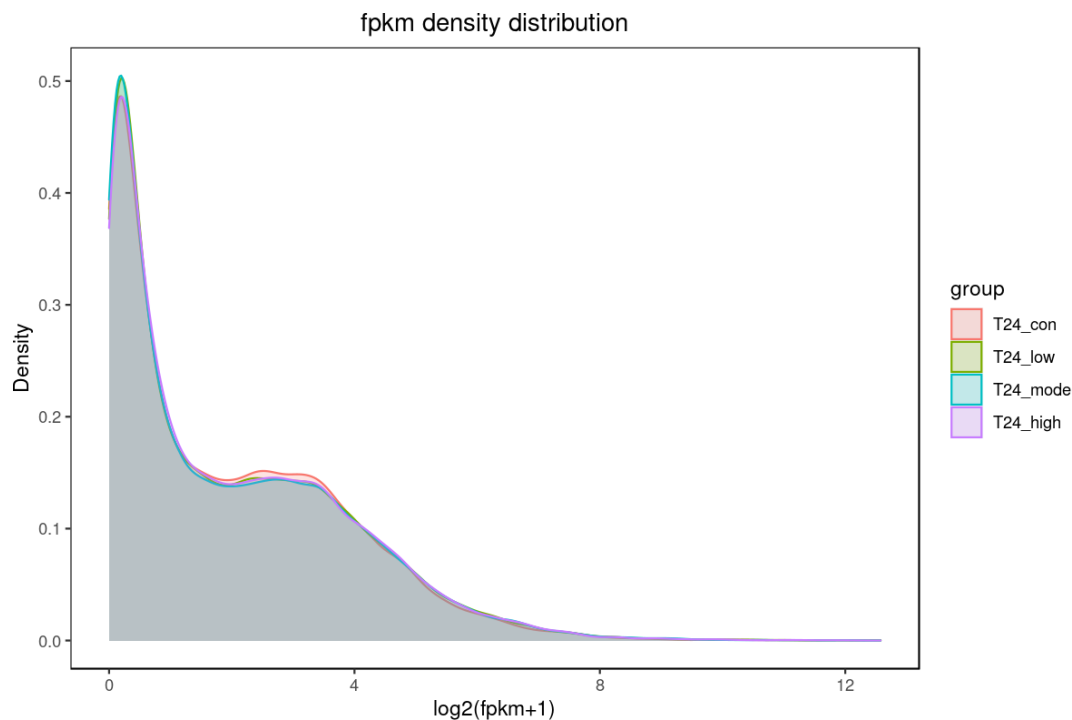


图 8 FPKM 密度分布图

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，各组组内样本间的相关系数 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，细胞培养、TRIZol 裂解等关键步骤标准化程度高。

主成分分析 (PCA) 也常用来评估组间差异及组内样本重复情况，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。理想条件下，PCA 图中，组间样本应该分散，组内样本应该聚在一起。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。

韦恩图可展示不同比较组合间差异基因的重叠情况，通过韦恩图，可筛选某几个比较组合共有或独有的差异基因。若只有一个差异比较组合，我们默认绘制该比较组合处理组与对照组的共表达基因韦恩图。韦恩图中圈内所有数字之和代表该比较组合差异基因总数，重叠区域表示组合间共有的差异基因个数。在本实验中，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，可能是驱动耐药性发展的关键调控枢纽；两两重叠区显

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 7 日 17:00 — 2025 年 4 月 12 日 16:00

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 241 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模式的动态演变，暗示不同耐药阶段可能依赖特异性分子机制。