

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 4 月 21 日 19:00 — 2025 年 4 月 25 日 17:00

## 细胞凋亡流式检测（一）

### 一、实验目的

利用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒，检测 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株加药前后的凋亡情况，分析耐药细胞株的凋亡特性，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

Annexin V-FITC 是一种荧光标记的膜联蛋白，能够特异性结合凋亡细胞表面外翻的磷脂酰丝氨酸（PS）。PI（碘化丙啶）是一种核酸染料，能够穿透晚期凋亡和坏死细胞的细胞膜，使细胞核染红。通过流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 和 PI 的荧光信号，可以区分活细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡/坏死细胞。

### 三、材料与试剂

#### 3.1 材料

人膀胱移行细胞癌细胞株（T24）

低，中，高耐药细胞株 T24-RC48

T25 细胞培养瓶（Corning 公司）

六孔板（Corning 公司）

15ml 离心管（Axygen 公司）

移液器（Eppendorf）

枪头（Axygen 公司）

#### 3.2 试剂

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒（联科生物，AT101）

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 21 日 19:00 — 2025 年 4 月 25 日 17:00

---

McCoy's5A 培养基（上海源培生物科技股份有限公司）

胎牛血清（FBS, Gibco 公司）

胰酶（Gibco 公司）

PBS 缓冲液（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）

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 孔板中，每种细胞铺 2 个孔，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞。

**5.2** 24 小时后，每种细胞取 1 个孔正常换液，另外 1 孔换成含有  $200 \mu\text{g/ml}$  维迪西妥单抗（RC48）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 Accutase 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， $1000\text{rpm}$  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** 用双蒸水将  $5 \times \text{Binding Buffer}$  稀释为  $1 \times \text{工作液}$ ，取  $500 \mu\text{l}$   $1 \times \text{Binding Buffer}$  重悬细胞，每管加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和  $10 \mu\text{l}$  PI，轻柔涡旋混匀，室温避光孵育 5 分钟。

**5.8** 取  $1 \times 10^6$  个未加药处理野生型细胞，加入  $500 \mu\text{l}$  Apoptosis Positive Control Solution，置冰上孵育 30 分钟。

**5.9** 离心洗涤，弃上清，加入适量预冷  $1 \times \text{Binding Buffer}$  重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合。

**5.10** 加入预冷  $1 \times \text{Binding Buffer}$  补充至  $1.5 \text{ ml}$ ，等分成三管，其中一管为空白对照管、两管为单染管。单染管分别加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC 或  $10 \mu\text{l}$  PI，室温避光孵育 5 分钟。

**5.11** 上流式细胞仪检测。

**5.12** 使用 FlowJo 软件分析流式细胞仪数据，计算各组细胞的凋亡率，绘制凋亡率柱状图来比较不同耐药组与野生型细胞株的凋亡差异。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 21 日 19:00 — 2025 年 4 月 25 日 17:00

六、实验结果

表 1 不同耐药程度膀胱癌细胞流式细胞术结果

	野生型	低度耐药	中度耐药	高度耐药	野生型 (加药)	低度耐药 (加药)	中度耐药 (加药)	高度耐药 (加药)
凋亡率 (%)	4.05	1.8	1.93	1.69	4.34	2.92	2.48	2.08
存活率 (%)	95.95	98.2	98.07	98.31	95.66	97.08	97.52	97.92

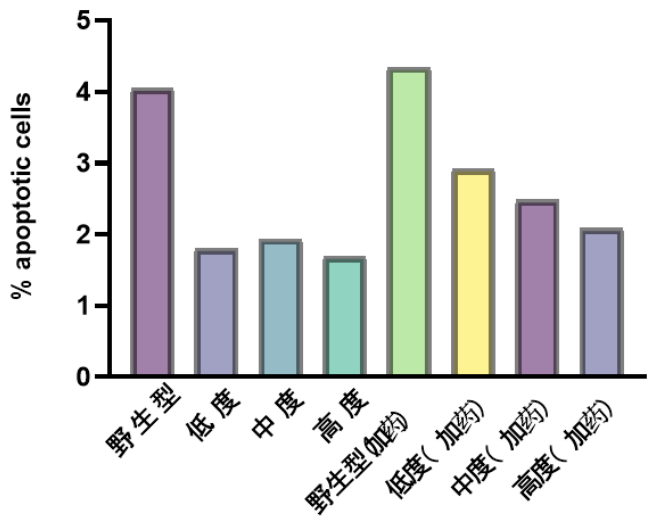


图 1 不同耐药程度膀胱癌细胞凋亡率比较柱状图

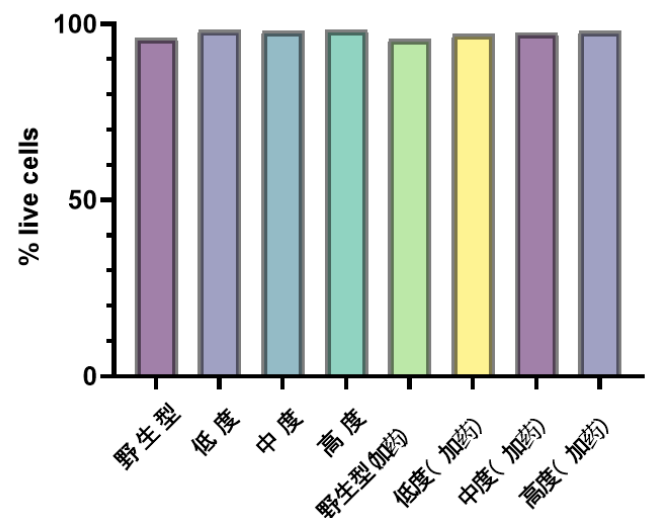


图 2 不同耐药程度膀胱癌细胞存活率比较柱状图

七、结果分析

T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的存活率整体差距不大。不同耐药程度膀胱癌细胞的凋亡率虽然一定程度上与耐药程度呈负相关，但各细胞株的凋亡率整体较低，可能由以下的问题造成：

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 21 日 19:00 — 2025 年 4 月 25 日 17:00

---

- 1) 初始铺板密度 ( $2 \times 10^5$ /孔) 过高, 导致细胞间接触抑制增强, 药物渗透效率降低, 凋亡信号未被充分诱导。
- 2) 36 小时的药物处理可能未达到凋亡进程的峰值, 部分细胞未进入凋亡阶段, 导致 Annexin V-FITC/PI 标记效率下降。
- 3) 晚期凋亡或坏死细胞可能已脱离培养板并漂浮于培养基中, 未纳入检测样本, 造成凋亡率数据低估。

针对这些可能的原因, 我们对正式实验的方案做出如下改进:

- 1) 将细胞接种密度调整为  $1 \times 10^5$ /孔, 减少接触抑制, 提升药物与细胞的作用效率。
- 2) 将 RC48 处理时间延长至 48 小时, 确保凋亡进程充分完成。
- 3) 在消化贴壁细胞前, 先收集培养基中的悬浮细胞, 合并离心后纳入检测, 避免数据遗漏。