

# 國立臺灣師範大學附屬高級中學第50屆科學展覽會

## 作品說明書封面

科別：動物與醫學學科

組別：高中組

作品名稱：影響NK細胞毒殺能力的基因

關鍵字：NK細胞、GBM細胞、毒殺能力

編號：

## 摘要

IL-2在NK細胞的活化與增殖扮演極其重要的角色，我們的目標是找出為何在沒有IL-2的NK細胞其毒殺能力較弱的原因。在確認NK毒殺GBM細胞的過程後，以RNA-seq，找出在沒有IL-2的NK細胞跟有IL-2的NK細胞相比的基因熱點圖，並設計引子找尋在沒有IL-2的狀態下影響NK毒殺能力的基因。

我們在沒有IL-2下的NK細胞中篩選出*BCL6*、*FCGR2B*、*LY9*、*IL1RL1*、*IL6*、*LTA*六種對NK毒殺能力可能有影響的基因。藉由PCR、qPCR與西方墨點法，確認在缺少IL-2下NK細胞中的*BCL6*基因表現量上升和*LTA*基因表現量下降，是影響NK細胞死亡進而影響NK細胞毒殺能力的關鍵基因。

## 壹、研究動機

### 一、NK細胞與NK92細胞

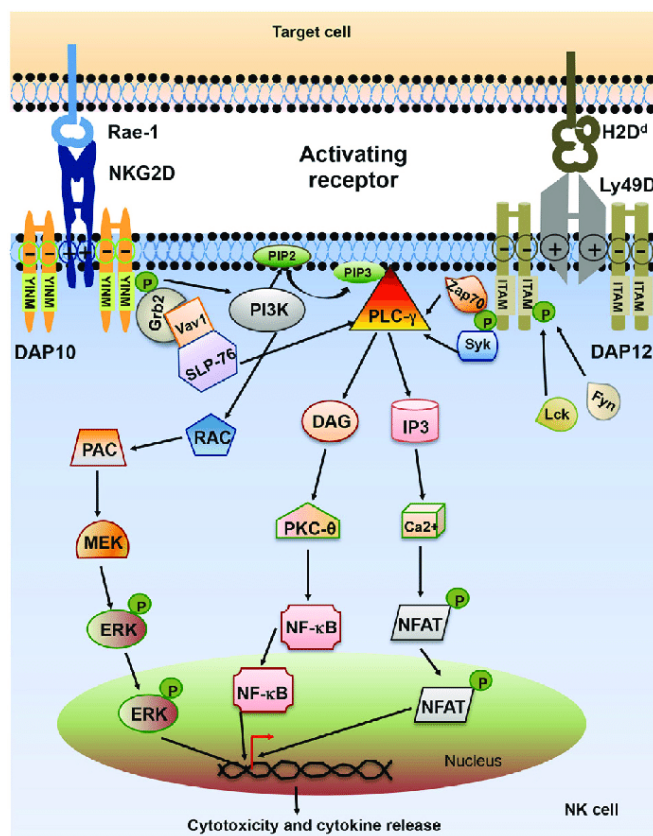
NK細胞(Natural Killer Cell)是先天性免疫細胞，可以釋出細胞毒素來殺死腫瘤細胞或感染的細胞。在人體中，NK細胞的表型為CD3+CD56-。CD3+代表此NK細胞具有CD3膜蛋白，而CD56-代表此NK細胞不具有CD56膜蛋白。NK細胞表面上有兩個受體，分別為抑制型受體(inhibitory receptor)和活化型受體(activating receptor)，其中健康細胞的MHC-1會和NK細胞上的抑制型受體結合，抑制NK細胞的胞殺作用(Sourav Paul et al.,2017)。

根據Burcu Duygu et al.(2021)的研究顯示，人類白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA)在體細胞上的不同表現量，是使NK細胞區分正常體細胞和受病毒感染的體細胞的主要分子，因為有些受病毒感染的細胞和腫瘤細胞還是會有正常的MHC-1表現量。

我們使用NK92細胞來當作NK細胞進行我們的實驗。NK92也是一個依賴IL-2的自然殺手細胞，它來自非霍奇金氏細胞瘤(non-Hodgkin's lymphoma)的50歲白人男子的外周血單核細胞。NK92細胞是NK細胞群裡穩定性高的，且容易培養，因此在癌症治療、免疫學、細胞毒性的研究上，是很好的研究材料。

NK細胞上的NKG2D受體，是影響NK細胞毒殺能力的受體，NKG2D的配體在正常的狀態下表現量較低，但當體細胞被感染，NKG2D會刺激細胞毒殺分子(如IFN- $\gamma$ 等)的產生。LY49D則是影響激素的釋放。下圖一為NK細胞活化受體(NKG2D & LY49D)的反應路徑。NKG2D和LY49D的受體與它們的配體(ligand)相互作用，分別導致DAP10配體的尾端YINM序列與DAP12配體的尾端ITAMs序列被磷酸化。磷酸化的YINM或ITAM會吸引PI3K和Grb2/Vav1/SLP-76複合體、Syk/Zap70的活化，PI3K的活化會導致下面的MEK/ERK途徑

的激活。磷酸化的Syk/Zap70與Grb2/Vav1/SLP-76複合體吸引PLC- $\gamma$ ，進而活化IP-3和DAG路徑，導致轉錄因子NF- $\kappa$ B和NFAT的活化。這個信號傳遞的最終結果是NK細胞釋放細胞激素以及細胞毒性分子。(Sourav Paul et al. 2017)



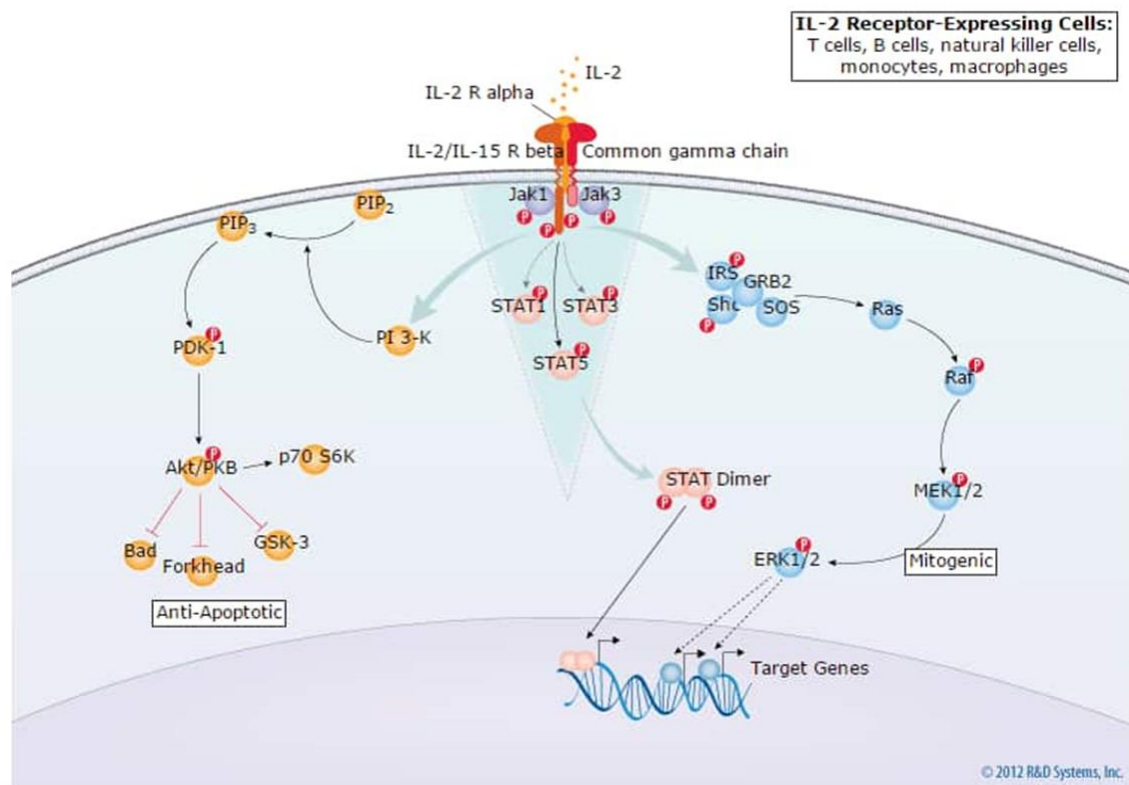
圖一 影響NK細胞釋放毒殺分子的NKG2D和LY49D受體(Sourav Paul et al. 2017)

## 二、介白素2(IL-2)

IL-2(Interleukin 2)是一個調節負責免疫系統的細胞激素，主要的功能是活化具有IL-2受體的免疫細胞(例如T細胞、B細胞、NK細胞、單核球、巨噬細胞)，其作用為增殖NK細胞，使NK細胞聚集在一起而不致死亡，增加NK細胞毒殺的功能(Xiong Q. et al., 2022)。

IL-2藉由與免疫細胞上的IL-2受體結合，引起一系列的分子傳遞。如圖二右方路徑所示，它將影響細胞核內的基因表現。首先，IL-2受體上的Common  $\gamma$  鏈，會吸引Jak3活化，使Jak3磷酸化，藉促使下面的IRS與Shc均被磷酸化。磷酸化的Shc會吸引GRB2、SOS，完成以上步驟後，會引發MAPK途徑的活化(即活化的Ras引起Raf磷酸化，並引起MEK及ERK的磷酸化，此一連串的反应就是MAPK途徑)。最後磷酸化的ERK會進入細胞核，影響目標基因的表現。

## IL-2 Signaling Pathways



圖二、IL-2 在免疫細胞上的信號傳遞途徑(Rosanne Spolski. et al., 2018)

### 三、膠質母細胞瘤 (Glioblastoma multiforme, GBM)

膠質母細胞瘤是一種惡性的腦腫瘤，好發於中年的男性。由於惡性腦腫瘤含有具轉移與侵入能力的癌細胞，因治療難度較高且治療方法受限的原故，故GBM患者的生存期通常不到一年，因此若以GBM癌細胞為研究NK細胞毒殺能力的媒材，或許能為患者提供另一種醫學臨床上的治療選擇。

研究中所用的GBM細胞株是U87-MG，拿它來做實驗的原因也是因為它比較好培養，而且較易取得。

### 四、研究動機

膠質母細胞瘤是一個很嚴重的腦癌，我們想要了解影響NK細胞毒殺能力的基因來更深入研究如何殺死GBM，因此我們做此研究。首先，因為NK細胞在有IL-2時會聚集在一起，細胞毒殺能力較顯著，可以殺死GBM細胞。我們想先做個小小驗證，證明當有IL-2時，NK92可以聚集在一起並且存活，再做另一個實驗驗證有IL-2的NK92可以順利殺死U-87 MG。再來我們拿掉IL-2，看看NK細胞有沒有毒殺的能力，找到拿掉IL-2之後基因表現量變化大的基因，尋找NK是透過什麼基因毒殺GBM的。

## 貳、研究目的

- 一、觀察NK細胞毒殺GBM細胞的情形。
- 二、確認IL-2是NK細胞增長時所必需的調控因子。
- 三、找尋拿掉IL-2後的NK細胞中，具有提升或降低表現量的關鍵基因。
- 四、找到影響NK細胞死亡及毒殺能力的關鍵基因。

## 參、研究設備與器材

### 一、研究材料

(一)NK92細胞株(序號：CRL-2407, 廠商：American Type Culture Collection; ATCC)

(二)U-87 MG癌細胞株(序號：HTB-14, 廠商：American Type Culture Collection; ATCC)

### 二、研究設備

#### (一) 細胞繼代培養所需設備

1. Pipet(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
2. AutoPipet(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
3. 100mm x 20mm培養皿(Cat#310109011, 廠牌：LabServ, US)
4. 細胞計數器(廠牌：MARIENFELD, Germany)
5. 100  $\mu$  L-1250  $\mu$  L Tip (Cat#112NXL-Q, 廠牌：Quality Scientific Plastics, US)
6. 10  $\mu$  L-200  $\mu$  L Tip(Cat#TW110-N-Q, 廠牌：Quality Scientific Plastics, US)
7. 0.1  $\mu$  L-10  $\mu$  L Tip(Cat#104-Q, 廠牌：Quality Scientific Plastics, US)
8. AutoPipet使用的玻璃管(廠牌：Quality Scientific Plastics, US)
9. 離心管(廠牌：Falcon, Germany)
10. 光學顯微鏡(廠牌：Leica, Germany)
11. 無菌操作台(廠牌：Bestgen, US)
12. 恆溫培養箱(廠牌：SANYO, Japan)
13. 離心機(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
14. 滅菌釜(廠牌：Tomin, Taiwan)

#### (二) 抽取mRNA並轉成cDNA時所需設備

1. milli-Q(廠牌：millipore, the Netherlands)
2. NanoDrop(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
3. Thermal Cycler(廠牌：Astec, Japan)

4. vortex(廠牌：Finepcr, Korea)

(三) 進行PCR所需設備

1. 製膠台與電泳儀器(廠商：BIO-RAD, US)
2. GeneFlash Gel Imaging System(廠牌：Syngene, UK)
3. 電源供應器(廠牌：Major Science, Taiwan)

(四) 進行qPCR所需設備

1. Real-Time PCR system(廠牌：Applied Biosystems, US)
2. 8-strip tubes & caps(廠牌：Gunster, Taiwan)

(五) 進行西方墨點法所需設備

1. 加熱器(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
2. 旋轉器(廠牌：DigSystem, US)
3. 震盪器(廠牌：GenePure, Taiwan)
4. 蛋白質電泳槽(廠牌：BIO-RAD, US)
5. membrane(LOT number：29429A, 廠牌：PALL, Taiwan)
6. Nylone membrane 轉漬槽(廠牌：BIO-RAD, US)
7. ChemiDoc Touch Imaging System(廠牌：BIO-RAD, US)

### 三、藥品溶液

(一) 細胞繼代培養所需藥品溶液

1. DMEM(GBM medium)(LOT number：26223009, 廠牌：CORNING, US)
2. EL837(GBM medium)(LOT number：LMR307003, 廠牌：Elite, US)
3. PBS(廠牌：Medicago, Sweden)
4. Trypsin(LOT number：14522004, 廠牌：CORNING, US)
5. Trypan Blue 0.5%(Cat#AT1070-0010, 廠牌：Bionovas, Canada)

(二) 抽取mRNA並轉成cDNA時所需藥品溶液

1. 抽mRNA kit(Cat#R2052, 廠牌：Zymo research, US)
2. TRIsure(Cat#BIO-38033, 廠牌：Bioline, UK)
3. 99.9%絕對酒精(廠牌：DP, Taiwan)
4. T-Pro Biotechnology(Lot number：9600403111211, 廠牌：Omics, US)
5. 轉cDNA kit(Cat#RR037A, 廠牌：Takara, China)

(三) 進行PCR所需的藥品溶液

1. agarose(Cat#PB1200, 廠商：Bioman, Taiwan)

2. TAE buffer(Cat#10407-1, 廠商：Cepharm, US)
3. safe DNA gel buffer(Cat#SDB001T, 廠商：Bioman, Taiwan)
4. Taq 2x Master mix(ID number：5200300-1250, 廠商：Ampliqon, Denmark)
5. Prestained Protein Ladder(Cat#PREP1025G, 廠商：Bioman, Taiwan)
6. 引子(廠商：Genomics, Taiwan)
  - (1) (BCL6-F：AGA GAA GCC CTA CAA ATG CGA A)
  - (2) (BCL6-R：CTT TTG TGA CGG AAA TGC AGG)
  - (3) (FCGR2B-F：ACT TCT CCA TCC CAC AAG CAA A)
  - (4) (FCGR2B-R：GAA ATC CGC TTT TTC CTG CAG)
  - (5) (LY9-F：GCA CCA AAG AGT CAC ACA GAT G)
  - (6) (LY9-R：GAT GTT TAG GGG GAG AGT CAC G)
  - (7) (IL1RL1-F：CAG GCT CTT CAA GGA TCA AGG)
  - (8) (IL1RL1-R：AGT GCC TTT TCC AAA ACA AGC)
  - (9) (IL6-F：ATG TGT GAA AGC AGC AAA GAG G)
  - (10) (IL6-R：TGT ACT CAT CTG CAC AGC TCT G)
  - (11) (LTA-F：AGC AAC AAT TCT CTC CTG GTC C)
  - (12) (LTA-R：ATC TTC TGG GAG CTG AGG AGA G)

#### (四) 進行qPCR所需的藥品溶液

1. SYBR Green 2x master mix(LOT number：0000539552, 廠牌：Promega, US)
2. GAPDH(廠牌：Thermo fisher Scientific, Finland)
3. 引子

#### (五) 進行西方墨點法所需的藥品溶液

1. Acrylamide(廠牌：Bionovas, US)
2. Tris(LOT number：MSEP26, 廠牌：Bionovas, US)
3. SDS(LOT number：STBH4019, 廠牌：Sigma, US)
4. APS(LOT number：LAUG12, 廠牌：Bionovas, US)
5. TEMED(LOT number：BCCC2915, 廠牌：Sigma, US)
6. TGS 10x running buffer(Cat#IB3372, 廠牌：Omics Bio, US)
7. TBS buffer 10x(廠牌：Bioman, Taiwan)
8. STAR Block Blocking Buffer(BL0420-0500, 廠牌：WonWon, Taiwan)
9. Prestained Protein Ladder(Cat#PREP0310, 廠牌：Bioman, Taiwan)

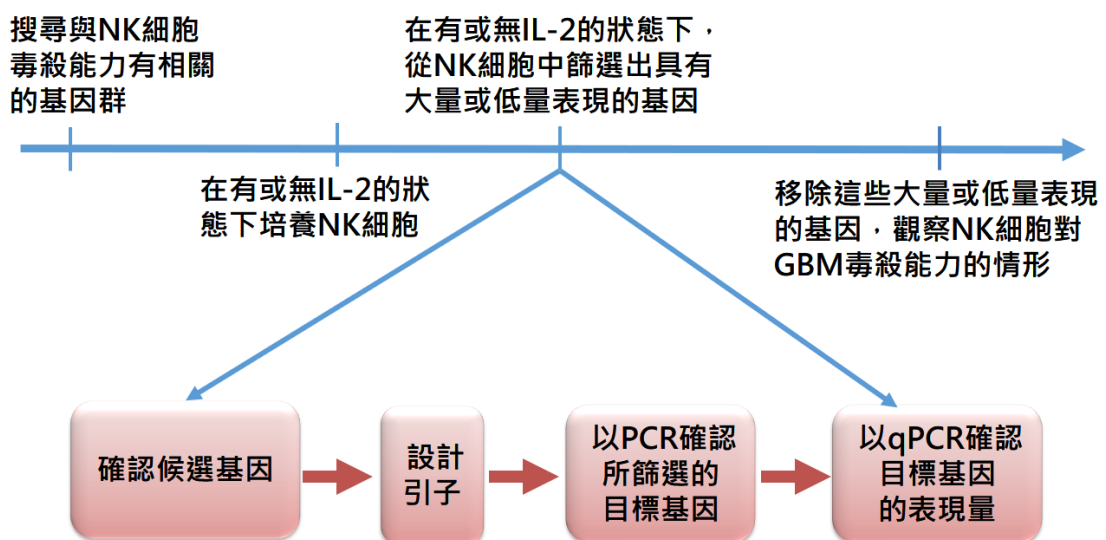
10. T-Pro LumiLong Plus Chemiluminescence Detection Kit(Lot number : 9600403111211, 廠牌 : Omics, US)
11. 一級抗體(Host : Rabbit)(廠牌 : GeneTex, Taiwan)
- (1) (TNF beta(LTA) : Cat#GTX130100)
  - (2) (BCL6 : Cat#GTX101338)
  - (3) (CD32B(FCGR2B) : Cat#GTX637785)
12. 二級抗體(Host : Goat, Target : Rabbit)(廠牌 : JACKSON, Taiwan)
- (1) Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)(#111-035-003)

#### 四、電腦軟體

- (一) GraphPad(URL : <https://www.graphpad.com/>, Prism, US)
- (二) NanoDrop 2000/2000c(URL : [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com), Thermal fisher Scientific, US)
- (三) StepOne software v2.3([http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/downloads/instrument-software/cms\\_234199.zip](http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/downloads/instrument-software/cms_234199.zip), Thermal fisher Scientific, US)

## 肆、研究過程與方法

### 一、實驗設計



圖三、實驗設計流程圖

### 二、從基因庫中挑選適合的基因

我們從實驗室的基因庫中，利用Gliovis網站(此網站主要為腦部腫瘤基因資料庫，可針對各可能引起腦腫瘤基因之分析)(<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>)查詢各類基因高



度表現和低度表現時對病患存活時間(Survival Time)的影響，並得知這些統計資料中的P value。若該基因表現程度與病患存活時間的P value值小於0.05，表示該基因對病患的存活時間影響很顯著。另外，若該基因的TreatA01和TreatA02、ControlA01、ControlA02套用到該網站的分析公式中會得到一個log2值，若此值大於+1.5或小於-1.5，代表該基因的表現程度也對病患存活時間有顯著影響，故該待選基因即是我們所要挑選的目標基因。

### 三、設計PCR所需要的引子

我們先用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)這個網站查找基因的Coding DNA Sequence (CDS)，再利用Primer 3(<https://primer3.ut.ee/>)這個網站設計引子。並根據以下條件，設計引子以挑選出合適的候選基因。

(一)引子的設計條件如下：

1. 約18-25個鹼基對。
2. CG比例在40%-60%間。
3. 兩引子間的Tm(引子熔點)相差小於5度。
4. 產物Tm與引子間相差小於10度。

### 四、DNA電泳膠的配置

以3%的agarose gel及safe DNA dye加入一倍的TAE buffer，共配成50c.c.的DNA電泳膠，以利PCR產物的分析。

### 五、PCR反應

PCR反應溶液如表一所示。PCR反應條件為: denaturation, temperature：攝氏95度30秒，annealing, temperature：攝氏54度30秒，extension, temperature：攝氏72度30秒，共進行30個循環。

表一、PCR溶液配置

材料	
2x Master Mix(稀釋成1倍)	6 $\mu$ L
Foward Primer	1 $\mu$ L
Reverse Primer	1 $\mu$ L
NK cDNA	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L
總計	12 $\mu$ L

### 六、qPCR反應

qPCR反應溶液如表二所示。qPCR反應條件為: denaturation, temperature：攝氏95度30秒，annealing, temperature：攝氏54度30秒，extension, temperature：攝氏72度30秒，共進行

30個循環。並且分析二重複後的Ct值結果，以確認Ct值是否相差在1之間，如果不是，那就是操作手法有誤。另外我們會增加一個Primer GAPDH做為對照組(control)。

表二、qPCR反應溶液

材料	
SYBR Green(qPCR Master Mix 2x)	5 $\mu$ L
Foward Primer	0.4 $\mu$ L
Reverse Primer	0.4 $\mu$ L
NK cDNA	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2.2 $\mu$ L
一格的量	10 $\mu$ L

## 七、西方墨點法

西方墨點法所需之蛋白質膠體電泳的配置如下:

表三、西方墨點法所需之蛋白質膠體電泳

一片蛋白質膠體的量(下膠部分)	
mq H <sub>2</sub> O	4mL
Acrylamide	3.3mL
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5mL
10%SDS	100 $\mu$ L
10%APS	100 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L
一片蛋白質膠體的量(上膠部分)	
mq H <sub>2</sub> O	3.4mL
Acrylamide	830 $\mu$ L
1M Tris-HCl pH6.8	630 $\mu$ L
10%SDS	50 $\mu$ L
10%APS	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

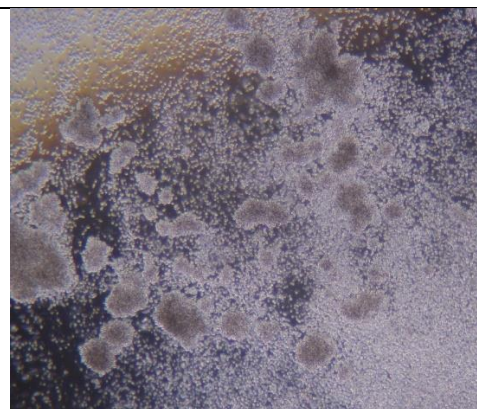
接著將膠放入電泳槽，倒入1x running buffer，再將蛋白質 sample和蛋白質 marker加入well內，開始跑膠(100V 先跑10分鐘, 接著用130V 跑到指定位置)，之後把膠拿出來放到Transfer 盤，由下到上依序放置：海綿-吸水紙-nylon membrane-蛋白質膠體-吸水紙-海綿，再夾起來(確定裡面沒有氣泡)，放入轉漬槽(transfer tank)，並倒入TBST Buffer，開始Transfer 120 分鐘，最後加入一級抗體(BCL6, CD32B, TNF beta(Host：皆是Rabbit))(1小時)及二級抗體(Goat Anti-Rabbit IgG(H+L))(1小時)分別進行反應，反應完之後將泡過抗體的nylon me

mbrane用T-Pro LumiLong Plus Chemiluminescence Detection Kit的兩個溶液的混合液洗過，即可在ChemiDoc Touch Imaging System機器上呈色。

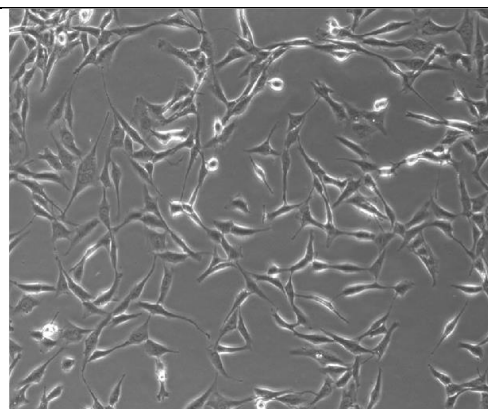
## 伍、研究結果

### 一、確認NK細胞是否具有毒殺GBM的能力

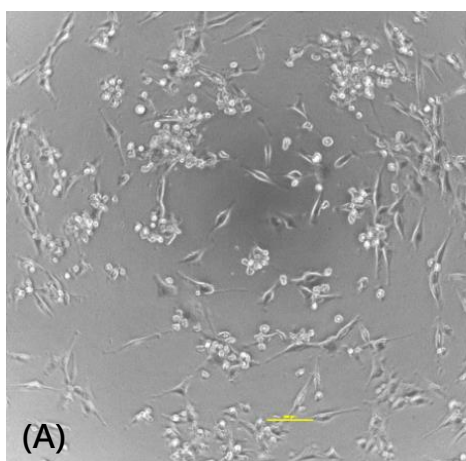
實驗的最開始，我們需要先確認NK細胞是否對GBM細胞具有毒殺能力，於是我們在EL837培養基培養NK細胞，在DMEM培養基中培養GBM細胞，圖四為在含有IL-2的狀態下培養NK92細胞，而圖五呈現的是U87-MG膠質母細胞瘤細胞的狀態。當此兩種細胞一同培養時，如圖六所示，發現NK細胞明顯對U87-MG膠質母細胞腫瘤細胞具有攻擊的現象(圖六(A)為沒有染劑染色，圖六(B)(C)則有用染劑染色)。



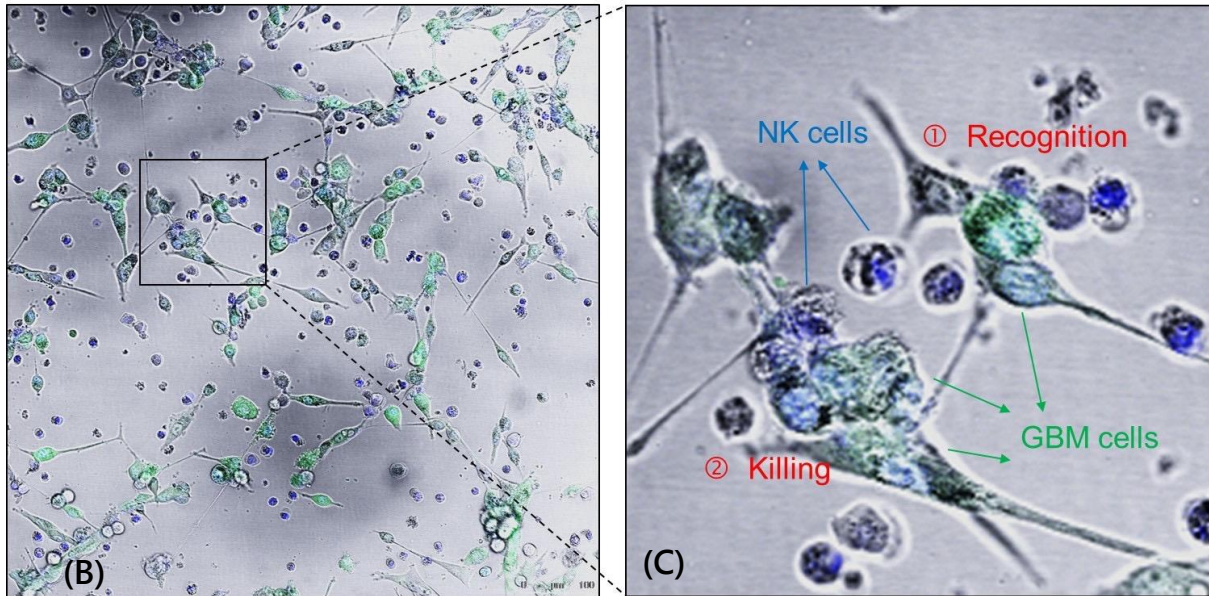
圖四、在含有IL-2的狀態下培養NK92的細胞圖



圖五、U87-MG膠質母細胞腫瘤細胞圖



Green: GFP-labeled U87MG-luc cells; Blue: Hoechst-labeled NK-92 cells

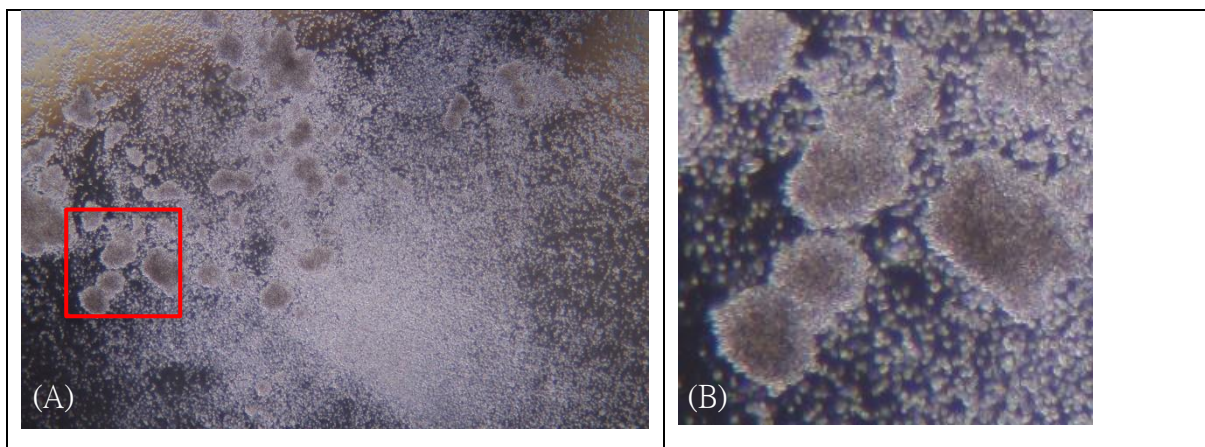


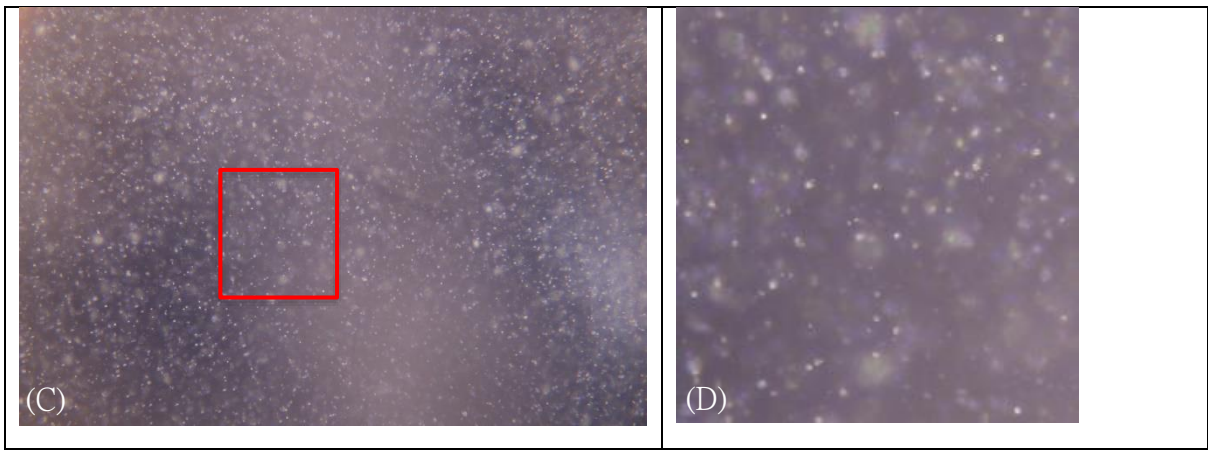
圖六、NK細胞毒殺GBM細胞，(A) NK 與GBM細胞共培養;

(B)(C)以綠色的GFP標記U87-MG，以藍色的赫斯特(Hoechst)標記NK92

## 二、確認IL-2是NK細胞增長時所必需的調控因子

先前的文獻提到，在有IL-2環境中生長的NK細胞，會出現聚集的現象，才會具有毒殺能力。若沒有IL-2，其毒殺能力甚弱(Xiong Q. et al., 2022)。因此我們將生長在IL-2環境的NK細胞設為實驗組，生長在無IL-2的NK細胞設為對照組，結果如預期的一般，NK細胞在有IL-2的環境下比NK細胞在沒有IL-2的環境下生長狀態更聚集(圖七(B))，推測其毒殺能力應較強，而沒有IL-2下的NK細胞較不聚集，且出現死亡的現象(圖七(D))。





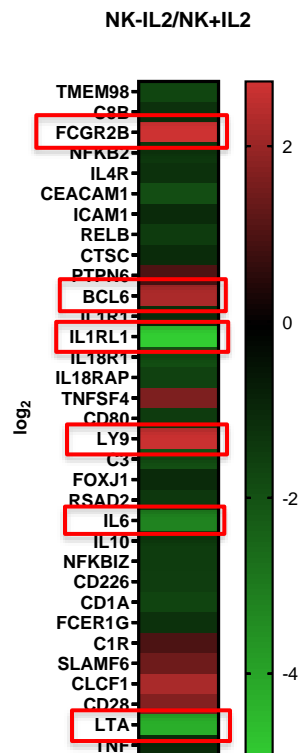
圖七、IL-2的有無，對NK細胞生長的影響

(A)(B)為生長在有IL-2下的NK細胞，(B)為圖(A)紅色區塊的放大圖

(C)(D)為生長在沒有IL-2下的NK細胞，(D)為圖(C)紅色區塊的放大圖

### 三、篩選在無IL-2下的NK細胞內基因表現量變化明顯的基因

為了瞭解在沒有IL-2的環境下NK細胞毒殺能力減弱的原因，篩選在無IL-2下的NK細胞內基因表現量變化明顯的基因是為第一步。藉由這些表現異常的基因(可能是表現量增加或是減少)了解NK細胞毒殺能力下降，甚至在無IL-2環境下不會聚集而死亡的原因。所以我們進行RNA-seq，並得到如下圖八的熱點圖，圖八顯示出，在無IL-2與在有IL-2的環境比較之下，NK細胞中基因表現量的情形。紅色代表該基因表現量是增加的，而綠色代表該基因表現量是下降的。

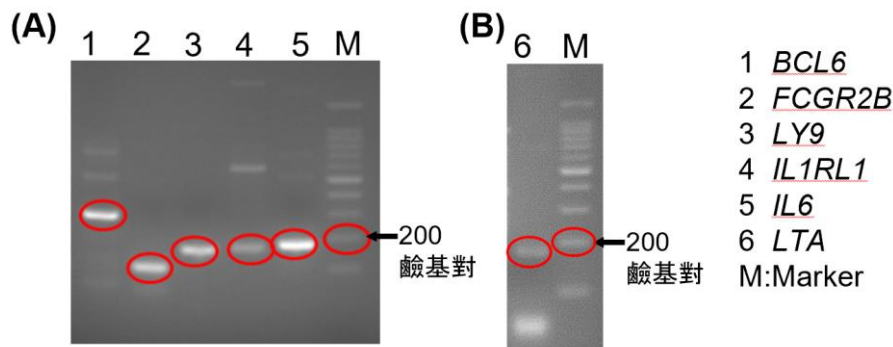


圖八、在無IL-2與在有IL-2的環境比較之下，NK細胞中基因表現量的情形(基因庫的熱點圖)  
(UC San Diego BROAD Industry Mouse Gene Set (<https://www.gsea-msigdb.org/> ) )

從圖八基因表現量熱點圖中，分別挑選基因表現量上升和下降變化量較大的三種基因，以利後續實驗分析。相較於有IL-2的NK細胞，在無IL-2下的NK細胞其*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*為表現量上升量較多的三種基因，而*IL1RL1*、*IL6*、*LTA*則為基因表現量下降較多的三種基因。此六種基因即為此實驗的候選基因。

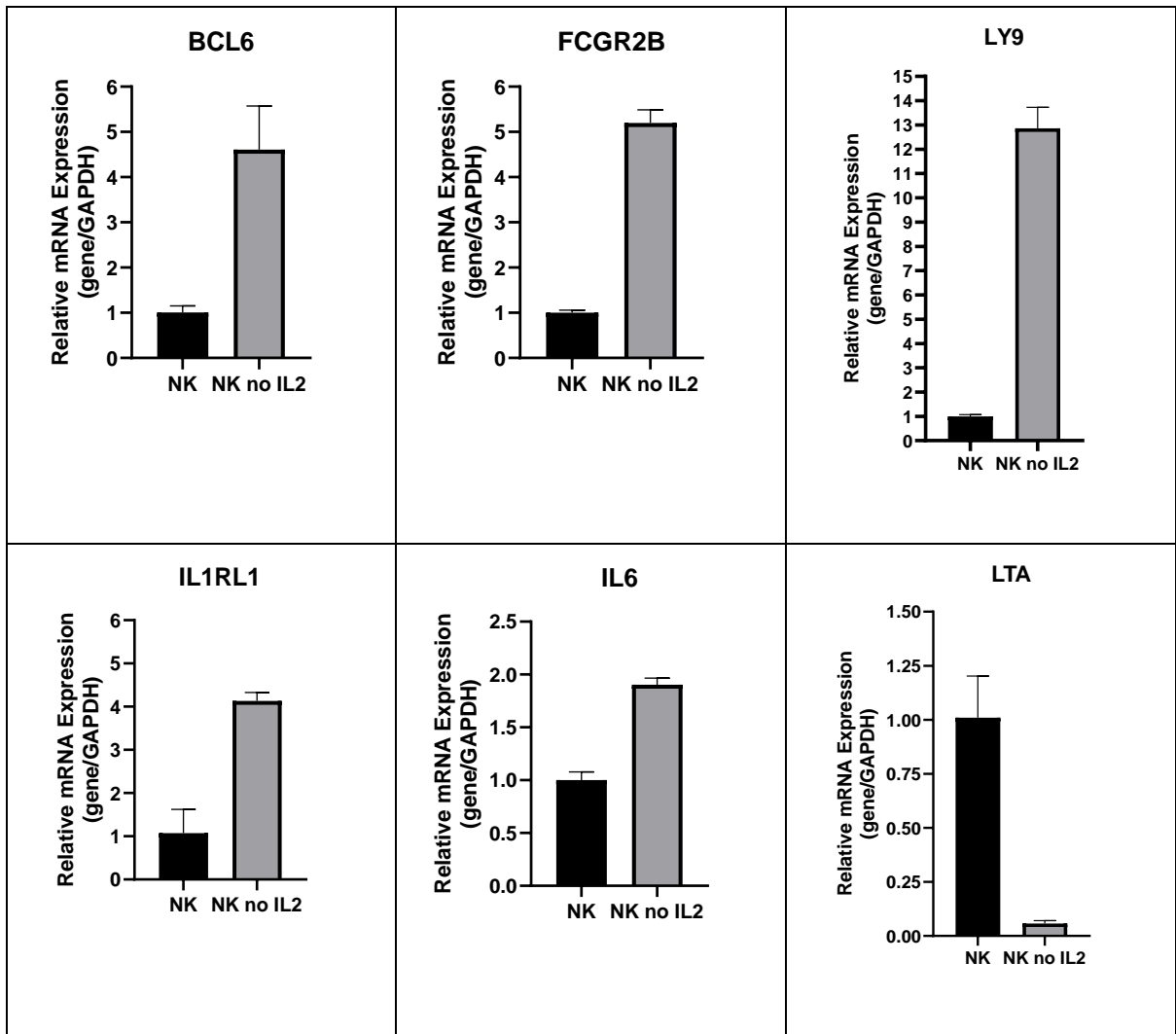
#### 四、挑選並確認影響NK細胞毒殺能力的基因

找到上述六個基因後，我們做了一系列的實驗來檢查這些基因是不是具有影響NK細胞毒殺能力，這些實驗包括了PCR、qPCR、西方墨點法。首先，萃取在無IL-2下的NK細胞的mRNA並轉成cDNA，利用可分別對*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*、*IL1RL1*、*IL6*、*LTA*六種基因進行篩選的引子，以PCR的方式進行基因選殖。結果如下圖九所示，可以發現全部基因的長度都位在200鹼基對左右，符合我們當時所設計引子要抓的基因長度。代表已從缺少IL-2下的NK細胞中，成功篩選出*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*、*IL1RL1*、*IL6*、*LTA*六種基因。



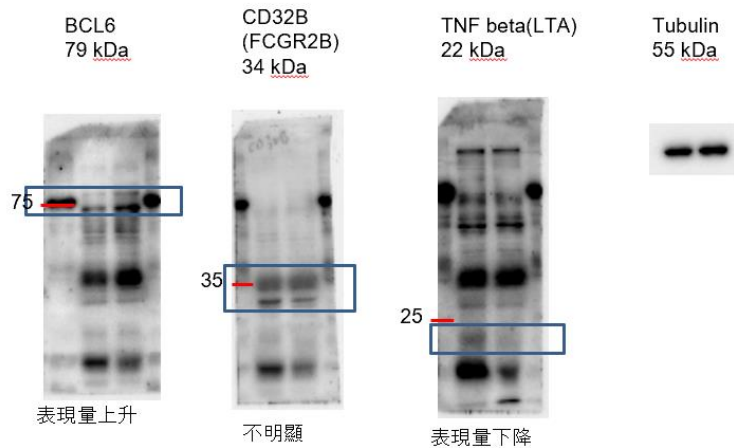
圖九、以PCR的方式選殖出*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*、*IL1RL1*、*IL6*、*LTA*六種基因

此外，藉由qPCR的結果，可以確認在缺少IL-2的狀態下，NK細胞中此六種基因的表現情形。從圖十的結果顯示，*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*、*LTA*基因表現量與熱點圖(圖八)所預期的相符，然而在缺少IL-2下的NK細胞內的*IL1RL1*和*IL6*的基因表現出現上升的情況，此一結果與熱點圖(圖八)所預期的*IL1RL1*與*IL6*基因表現量不符合。所以我們排除了這兩個基因是影響NK細胞毒殺能力的基因。



圖十、各基因經過qPCR後基因的表現量變化(以在IL-2下生長的NK基因表現量當1.00)

為了確認基因表現量與基因熱點圖相符的四個基因(*FCGR2B*、*BCL6*、*LY9*、*LTA*)的蛋白質狀態，可利用西方墨點法進行檢測。但因為LY9的抗體太昂貴，故暫不分析此基因，其他三種基因的檢測結果如圖十一所示。結果發現BCL6和LTA(TNF beta)蛋白具有大量表現的趨勢，符合熱點圖(圖八)的預測，因此可以確認在缺少IL-2的狀態下，NK細胞中的*BCL6*基因表現量上升和*LTA*基因表現量下降是影響NK細胞死亡，進而影響NK細胞毒殺能力的關鍵原因。



圖十一、BCL6、FCGR2B、LY9三種蛋白質表現的結果  
Tubulin是確認實驗是否準確的指標

## 陸、討論

### 一、培養NK92細胞卻死亡的原因

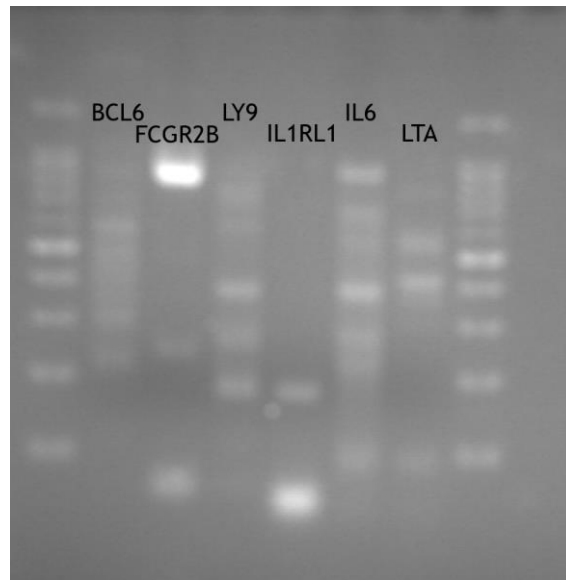
NK92是我們在實驗室要使用的最主要NK細胞的來源，因此我們在細胞培養室裡培養NK92，起初，我們培養得很順利，到了三次繼代都沒有什麼問題，但到了第五次繼代，我們在顯微鏡下觀察到我們的細胞死去了。我們列出幾個有可能的原因：

- (一) 可能是無菌操作台內跑入異物----因為可能是我們手伸到外面來了，帶入了異物進入無菌操作台。
- (二) 太久沒有照顧好它導致細胞死去----因為開學後一個禮拜只去一次實驗室的關係，我們沒辦法像寒、暑假一樣每兩三天就繼代一次。

### 二、設計引子與PCR出現的問題

設計引子是目前最複雜的一個步驟，首先要先去找要設計的基因的基因資訊，並找出它的編碼區域(Coding region, CDS)，再將CDS輸入進一個網站(Primer 3)，之後這個網站會推薦一些引子，我們要避開3'端引子的尾巴有連續三個G(鳥糞嘌呤)或C(胞嘧啶)，因為會影響其黏性。找到引子之後要做PCR試試看這個引子可不可以抓到目標基因，結果每一次的實驗幾乎都如下圖十三，引子亂抓基因片段，而沒有主要的基因片段。





圖十三、失敗的PCR結果(左右兩側為Marker)

我們做了許多次，結果都如圖十三一樣雜亂無章，換了兩三個引子也是一樣，最後我們找到了最根本的問題----NK的cDNA不純，這可以歸咎於許多原因，例如：有污染物跑進去、加入的材料太少……都是導致cDNA不純的原因。所以我們更換並抽取新的mRNA轉cDNA之後，我們的結果就完整了，即找對了引子，並開始做qPCR。

### 三、qPCR實驗的結果不甚完美

qPCR實驗考驗技術，我們要加入極少的量進入八聯管(8-strip tubes)，必須要用較精密的Pipet才能裝。我們很多次的結果誤差都出乎預料的大(圖十四)，圖中有些Ct值未偵測到(Undetected)可能是因為這個基因的表現量太低，有些則是漏加到cDNA的樣本。這個實驗耗時很長，最後我們把這個技術練到爐火純青，誤差就沒這麼大了。

Well	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	Ct
A1	NK cDNA	BCL6	UNKNOWN	SYBR	None	Undetermined
B1	NK cDNA	BCL6	UNKNOWN	SYBR	None	Undetermined
C1	NK cDNA	FCGR2B	UNKNOWN	SYBR	None	26.81037712
D1	NK cDNA	FCGR2B	UNKNOWN	SYBR	None	Undetermined
E1	NK cDNA	LY9	UNKNOWN	SYBR	None	25.16125679
F1	NK cDNA	LY9	UNKNOWN	SYBR	None	22.96345901
G1	NK cDNA	IL1RL1	UNKNOWN	SYBR	None	28.0970974
H1	NK cDNA	IL1RL1	UNKNOWN	SYBR	None	26.56628609
A4	NK cDNA	IL6	UNKNOWN	SYBR	None	22.99364471
B4	NK cDNA	IL6	UNKNOWN	SYBR	None	20.68424606
E4	NK cDNA	GAPDH	UNKNOWN	SYBR	None	17.9569912
F4	NK cDNA	GAPDH	UNKNOWN	SYBR	None	17.95072746

圖十四、其中一次的qPCR結果，Ct值差距頗高

## 柒、結論

一、在有IL-2的環境下的NK細胞具有攻擊膠質母細胞瘤的能力。

- 二、NK細胞在有IL-2的環境下較無IL-2下更適合聚集，毒殺能力應較強。
- 三、在缺少IL-2的狀態下，NK細胞中的*BCL6*基因表現量上升與*LTA*基因表現量下降，是使NK細胞無法存活的關鍵因素，進而影響NK細胞的毒殺能力。

## 捌、未來展望

未來我們希望還有時間可去實驗室進行下一步的實驗，我們目前僅僅是確認出影響NK毒殺能力的基因，接下來我們會嘗試從活體細胞中拿掉這些基因，再進行實驗，觀察NK細胞是否能順利毒殺GBM細胞。

## 玖、參考資料與其他

- 一、Huntington ND, Xu Y, Nutt SL, Tarlinton DM. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J Exp Med*. 2005 May 2;201(9):1421-33. doi: 10.1084/jem.20042294. PMID: 15867094; PMCID: PMC2213181.
- 二、Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017 Sep 13;8:1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124. PMID: 28955340; PMCID: PMC5601256.
- 三、Schulz JA, Rodgers LT, Kryscio RJ, Hartz AMS, Bauer B. Characterization and comparison of human glioblastoma models. *BMC Cancer*. 2022 Aug 3;22(1):844. doi: 10.1186/s12885-022-09910-9. PMID: 35922758; PMCID: PMC9347152.
- 四、Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol*. 2018 Oct;18(10):648-659. doi: 10.1038/s41577-018-0046-y. PMID: 30089912.
- 五、Wang M, Zhou Z, Wang X, Zhang C, Jiang X. Natural killer cell awakening: unleash cancer-immunity cycle against glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2022 Jul 8;13(7):588. doi: 10.1038/s41419-022-05041-y. PMID: 35803912; PMCID: PMC9270460.
- 六、Wensveen FM, Jelenčić V, Polić B. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Front Immunol*. 2018 Mar 8;9:441. doi: 10.3389/fimmu.2018.00441. PMID: 29568297; PMCID: PMC5852076.
- 七、Xiong Q, Zhang H, Ji X, Zhang Y, Shi G, Dai L, Cheng F, Wang H, Luo J, Xu J, Ji Y, Su X, Yang W, Zhang L, Deng H. A novel membrane-bound interleukin-2 promotes NK-92 cell persistence an

d anti-tumor activity. *Oncoimmunology*. 2022 Sep 22;11(1):2127282. doi: 10.1080/2162402X.2022.2127282. PMID: 36185809; PMCID: PMC9519007.

- 八、General guidelines for primer design, from [https://ocw.mit.edu/courses/7-15-experimental-molecular-genetics-spring-2015/b6d9befecddfc6f51fc98157769dceaa\\_MIT7\\_15S15\\_Primer\\_design.pdf](https://ocw.mit.edu/courses/7-15-experimental-molecular-genetics-spring-2015/b6d9befecddfc6f51fc98157769dceaa_MIT7_15S15_Primer_design.pdf)
- 九、The pathway of NKG2D and LY49D, from [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-natural-killer-NK-cell-activating-receptor-signaling\\_fig3\\_319670577](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-natural-killer-NK-cell-activating-receptor-signaling_fig3_319670577)
- 十、西方墨點法, 取自 <https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-western-blotting.html>
- 十一、膠質母細胞瘤是什麼？腦膠質瘤原因、症狀及治療方法總整理, 取自 <https://www.auh.org.tw/NewsInfo/HealthEducationInfo?docid=2140> 亞洲大學務署醫院