

金纳米荧光分子信标对活细胞中 STAT5b mRNA 的检测

李洋, 薛建鹏, 崔思思, 田俊梅, 章冬银, 曹洁, 顾月清*

中国药科大学生命科学与技术学院生物医学工程教研室, 南京 210009

* 联系人, E-mail: guyueqingsubmission@hotmail.com

2012-05-07 收稿, 2012-07-09 接受, 2012-12-24 网络版发表

国家自然科学基金(30970776, 81000666, 31050110123)资助

摘要 信号转导和转录激活因子 5b(signal transducer and activator of transcription 5b, STAT5b)是 JAK-STAT 途径中重要的一种转录因子. 该转录因子与肿瘤的发生发展密切相关, 正日益受到人们的关注. 在本研究中, 优化 STAT5b mRNA 序列并合成出一种新型 STAT5b 金纳米荧光分子信标. 该信标由发卡型 STAT5b mRNA 特异性序列、FITC 荧光染料、金纳米粒三部分组成. 通过激光共聚焦和流式细胞术等实验方法, 实现该信标对 HepG-2 细胞和 PC12 细胞中 STAT5b mRNA 的实时检测. 最后, 运用 RT-PCR 方法, 该分子信标检测 STAT5b mRNA 的可靠性得到验证. 基于本研究实验结果, 可推断该新型金纳米荧光分子信标有望进行 JAK-STAT 信号通路中其他转录因子的检测.

关键词

金纳米粒
分子信标
STAT5b mRNA

JAK-STAT 信号转导通路(JAK-STAT signaling pathway)是与肿瘤发生发展关系最为密切的一类信号转导通路, 在研究肿瘤分子靶向治疗、筛选分子药物靶标等方面具有重要意义. 该通路由许多细胞因子和受体所激活, 这些激活因子与细胞膜上受体相结合, 使受体二聚化或多聚化. 受体内源性酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)与相偶联的胞浆可溶性 PTK 迅速磷酸化, 形成信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs)结合位点. 最后, STATs 通过 SH2 功能区与受体胞浆区结合后被激酶酪氨酸磷酸化, 离开受体, 形成二聚体并入核, 进而结合于特定的 DNA 启动子序列, 启动基因表达, 调节细胞的分化、增生和凋亡^[1]. 正常细胞中的 STATs 的磷酸化是短暂的, 而肿瘤细胞自分泌或旁分泌的细胞因子以及基因改变所致的持续活化的酶类可致 PTK 的持续激活, 从而使 STATs 呈现持续磷酸化. 人类多种原发肿瘤和肿瘤细胞系都与 JAK-STAT 通路的异常表达和活化有重要关系^[2~4]. 在此信号转导通路上, STATs 蛋白家族是最重要的一类信号转导因子. 迄今, 研究人员在哺

乳动物中发现了 7 个 STAT 家族成员(Stat1~4, Stat5a, Stat5b 和 Stat6)^[5]. 它们普遍存在于多种肿瘤细胞系和原发肿瘤中, 通过 JAK-STAT 途径被活化从而参与肿瘤细胞的异常增殖、分化和血管生成等过程.

在多种肿瘤细胞系和多种转化细胞系中(尤其是白血病和乳腺癌), 人类编码信号转导及转录活化因子 5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)是 STAT 家族中与肿瘤最密切相关的成员. 持续活化的 STAT5 增强了细胞的转化, 同时也阻断了细胞的凋亡^[6].

STAT5 的基因定位于人类第 17 号染色体上, 大鼠的位于 10 号染色体上, 小鼠的位于 11 号染色体^[7]. STAT 蛋白主要由 STAT5a 和 STAT5b 两种亚型构成. 这两种亚型 96% 以上是同源的, 它们能被许多细胞因子所激活. 研究发现, STAT5a 单基因敲除小鼠表现出泌乳素依赖性的乳腺发育障碍; STAT5b 单基因敲除小鼠则出现与生长激素受体缺陷小鼠相似的基因缺陷^[8]. STAT5b 作为信号转导及转录激活因子中的一个成员, 受许多细胞因子、激素、生长因子的调控. 其作用方式主要有两种: (1) STAT5b 在被受体激

引用格式: 李洋, 薛建鹏, 崔思思, 等. 金纳米荧光分子信标对活细胞中 STAT5b mRNA 的检测. 科学通报, 2013, 58: 537-544

Li Y, Xue J P, Cui S S, et al. Gold nanoparticle-based fluorescent molecular beacon for the detection of STAT5b mRNA expression in living cell (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 537-544, doi: 10.1360/972012-664

活后形成二聚体,转移至细胞核,结合于靶基因的启动子部位,参与靶基因转录的正调控或负调控。(2) STAT5b 激活后,通过调节下游信号转导,从而调控细胞增殖、分化、凋亡等生命活动。

STAT5b 存在于未经刺激的细胞胞浆内,可在多种细胞因子和生长因子的刺激下发生酪氨酸磷酸化而活化^[9]。近几年的研究已证实,STAT5b 的异常活化与多种恶性肿瘤的发生发展有密切关系,包括乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、肝癌、鼻咽癌、白血病等^[7,10-14]。例如,Spiekermann 等人^[15]研究发现,95%的急性髓系白血病原始幼稚细胞中 STAT5b 活性升高;Birkenkamp 等人^[16]则认为 STAT5b 的活化会上调酪蛋白启动子的活性,使淋巴细胞发生恶性转化;夏国良等人^[17]发现头部肿瘤中存在着 STAT5b 的持续或异常激活,并且与肿瘤的转移也有一定的关系。因此,通过检测 STAT5b 的活化水平,对于进一步阐明肿瘤的发病机制、深入了解肿瘤的发展状况以及寻求新的肿瘤治疗途径均具有重要意义。

目前对细胞内 STATs 蛋白的检测多用流式细胞术(flow cytometry, FCM)^[18],也有用 Western Blot 检测 STAT 蛋白的报道^[19,20]。但是 Western Blot 样本的预处理步骤复杂、费时,对样本和试剂的消耗量大。同时,Western Blot 的结果由于条件所限,几乎只能做定性分析,而无法实现定量分析。而运用流式细胞术进行蛋白含量检测最大的缺点在于极易出现假阳性结果。同时,洗涤剂对细胞的破坏、标记时间长、操作步骤多,也是流式细胞术的限制因素。

在本研究中我们介绍一种新型的特异性检测 STAT5b mRNA 靶向序列的发卡型金纳米荧光分子信标。该发卡型信标的中环由与 STAT5b 靶分子互补的 20 个碱基的核酸序列组成,茎部为两列互补的碱

基序列。该发卡型序列的 5'端与 3'端分别与荧光染料 FITC 和硫醇通过化学键相结合。处于自由状态时,发卡结构中的荧光基团 FITC 和猝灭剂金纳米粒由于茎部序列的互补配对状态而靠得很近,FITC 荧光被摩尔消光系数极高的猝灭剂金纳米所猝灭,此时荧光背景几乎为零;当存在靶序列时,分子信标中环序列与靶序列特异性结合,形成相对刚性并比分子信标茎部结构更稳定的双链体,茎部互补链打开,从而使荧光基团 FITC 与猝灭剂金纳米空间距离激增,金纳米对荧光基团 FITC 的荧光猝灭作用失效,荧光基团荧光恢复以供检测(图 1)。同时,荧光强度与细胞内靶序列的含量成正比,故该金纳米荧光分子信标可用于定量检测。更值得一提的是,该分子信标继承金纳米优越的生物相容性,即无需借助载体即可进入细胞,同时,该分子信标生物稳定性高、操作简便、特异性强,可对核酸进行实时测定^[21,22]。

1 材料与方法

(i) 试剂。氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、二硫苏糖醇(DTT)均购于上海国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均购于美国 Sigma-Aldrich 有限公司。脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)购于生工生物工程(上海)有限公司;DMEM 培养基、1640 培养基、胰蛋白酶均购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

(ii) 仪器。754PC 紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);100CX 透射电子显微镜(日本电子株式会社 JEOL);F96 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司);FV300 激光共聚焦显微镜(OLYMPUS(中国)有限公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson 有限公司);TC020A-230V PCR 循环仪(美国

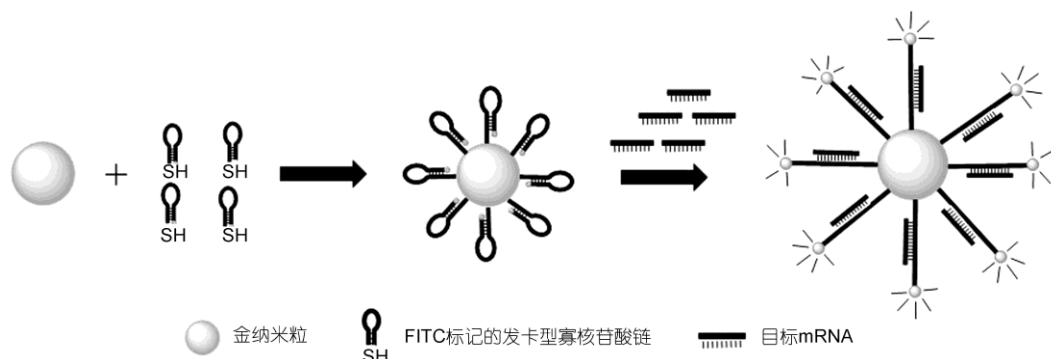


图1 发卡型金纳米分子信标合成及检测原理示意图

Labnet 仪器有限公司)。

(iii) 寡核苷酸序列的设计. 在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)中查询 STAT5b mRNA 序列, 并利用在线 BLAST 服务器和 RNAstructure 软件筛选和设计出 STAT5b 信标特异性寡核苷酸序列, 进而我们委托生工生物工程(上海)有限公司合成 5'NH₂ + 3'SHC6 修饰的上述信标 DNA 序列. 具体结构如下所示:

5'-(FITC) GCGAGAAATAATGCCGCACCTCA-ATCTCGCA (A)₉SH-3'

(iv) 金纳米粒的制备. 采用柠檬酸三钠还原法制备 15 nm 金纳米粒^[23-25]. 将合成过程中所有玻璃器皿用王水浸泡 3 h, 再用超纯水涮洗 3 遍, 放入 70℃烘箱烘干备用. 取 2.2×10⁻² mol/L 氯金酸与 25 mL 超纯水至三颈烧瓶中 100℃油浴加热至沸腾, 加入 0.8 mL 2.5×10⁻² mol/L 柠檬酸三钠溶液, 反应 45 min 后自然冷却至室温, 扫描紫外可见光谱并进行透射电子显微镜表征, 后至于 4℃冰箱保存.

(v) 发卡型金纳米荧光分子信标的制备. 将巯基修饰的环状寡核苷酸序列用 100 mmol/L DTT 活化后与金纳米粒进行连接反应, 二者的投料比为 100:1(摩尔比). 避光反应 12 h 后, 通过 2 mol/L NaCl 溶液对上述反应后溶液进行盐化作用. 最后通过 13500 r/min, 16 min 离心作用收集分子信标沉淀, 沉淀复溶后得到稳定的发卡型金纳米荧光分子信标溶液. 用紫外分光光度计和透射电子显微镜对其进行表征.

(vi) 稳定性实验. DNase I 和 GSH 是胞浆中最常见的降解分子信标的物质^[26], 为了研究分子信标在活细胞中的稳定性, 我们在体外考察上述两种物质对发卡型 STAT5b 金纳米荧光分子信标的降解作用. 配制含有 0.25 mmol/L MgCl₂ 和 50 mg/L 牛血清白蛋白的 PBS 溶液(pH 7.0)模拟细胞内离子环境, 分子信标用上述溶液稀释至 1.2 nmol/L 后, 分别加入 0.38 mg/L DNase I 或 10 mmol/L GSH 进行降解反应. 反应完全后测定分子信标荧光扫描光谱.

(vii) 细胞毒性实验(MTT 比色法). 将人源肝癌细胞 HepG-2 和褐家鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 分别接种至 96 孔细胞培养板上(5000 细胞/孔)于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h. 依据 MTT 比色法固定操作步骤, 测定浓度梯度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 nmol/L 的分子信标对 HepG-2 细胞和 PC12 细胞的毒性作用.

(viii) 激光共聚焦显微镜定性检测 STAT5b mRNA 表达. 将人源肝癌细胞 HepG-2 和褐家鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 分别接种至共聚焦细胞培养板培养至 50%密度后, 按加药处理分别加入 2 nmol/L 发卡型 STAT5b 金纳米荧光分子信标, 孵育 12 h 后利用激光共聚焦显微镜系统进行细胞成像.

(ix) 流式细胞术定量测定 STAT5b mRNA 表达^[23]. 当活细胞中 STAT5b mRNA 与荧光分子信标杂交后, 被金纳米粒猝灭的荧光信号恢复^[27]. 基于此理论基础, 我们通过流式细胞术定量测定杂交后荧光信号强度值. 细胞培养方法和加药处理方法与上述定性检测方法相同. 孵育结束后, 通过胰酶消化和 1500 r/min, 10 min 离心作用获得细胞沉淀并利用流式细胞仪测定荧光信号强度.

(x) 反转录 PCR(RT-PCR)定量测定 STAT5b mRNA 表达. 以看家基因 GAPDH 为标准内参, 通过 RT-PCR 检测两种肿瘤细胞(HepG-2 和 PC12)中 Homo-STAT5B 基因的表达. 使用 RNeasy Kit 试剂盒提取 HepG-2 细胞中总 RNA 并利用反转录酶 III 扩增得到 cDNA. 分别取 2.5 μL cDNA 进行 STAT5b 和 GAPDH 基因的 RT-PCR 扩增. PC12 细胞的 RT-PCR 方法与 HepG-2 细胞相同.

人源 GAPDH 引物(352 bp)

同义引物: 5-AAGGTCCGAGTCAACGGATTT-3

反义引物: 5-AGATGATGACCCTTTTGGCTC-3

人源 STAT5B 引物(192bp)

同义引物: 5-CAGCGCCACGTACATGGACCA-3

反义引物: 5-GCGTGCGGGATCCACTGACTGT-C-3

2 结果与讨论

2.1 金纳米粒与 STAT5b 金纳米荧光分子信标光谱特征和电子显微镜表征

在成功合成出金纳米粒与 STAT5b 金纳米荧光分子信标后, 通过紫外分光光度计扫描得到二者的紫外特征光谱(图 2). 图 2(a)为金纳米粒的紫外特征光谱, 从该图谱中我们可以明显看到在 520 nm 处出现一个强吸收峰, 这是金纳米粒最强特征吸收^[28]. 图 2(b)为 STAT5b 金纳米荧光分子信标的紫外特征光谱, 与金纳米粒紫外特征光谱对比, 该图谱在 260 nm 处出现强吸收峰, 该峰为寡核苷酸链的特征吸收

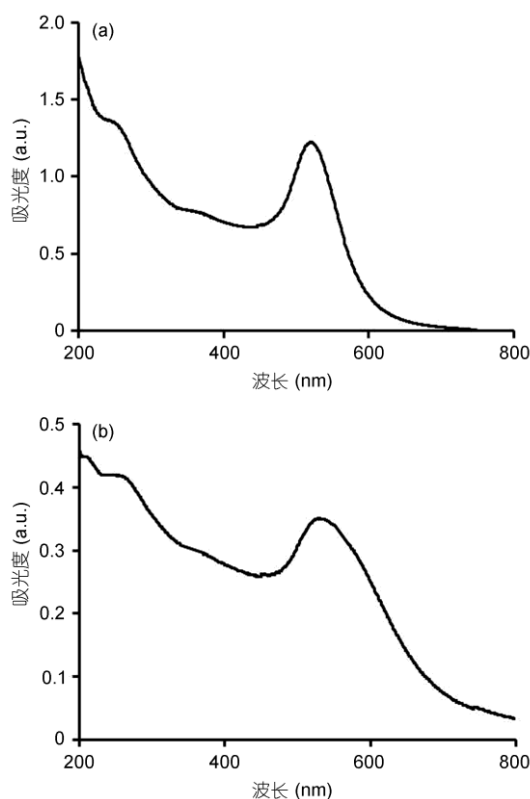


图2 紫外可见吸收光谱

(a) 15 nm 金纳米粒; (b) STAT5b 金纳米荧光分子信标

峰。同时,金纳米粒的最大吸收峰由 520 nm 红移至 526 nm 处。该消光峰红移现象是金纳米粒聚集所致。为验证上述推论,我们通过透射电子显微镜表征金纳米粒和 STAT5b 金纳米荧光分子信标的粒子形态(图 3)。透射电子显微镜图片显示,连接寡核苷酸链前后,金纳米粒发生轻微聚集。但该聚集非常轻微,未对后续实验造成可见影响。

2.2 STAT5b 金纳米荧光分子信标体外稳定性考察

DNase I 和 GSH 是细胞浆中最常见的分子信标降解物^[26],为了研究分子信标在活细胞中的稳定性,我们在体外考察上述两种物质对发卡型 STAT5b 金纳米荧光分子信标的降解作用。同时,我们体外考察了分子信标中金纳米对荧光染料 FITC 的荧光猝灭作用。最后,通过 DTT 可断开金硫键这一特性,在体外模拟金纳米粒失去对 FITC 荧光猝灭作用后, FITC 的荧光恢复能力。实验结果显示,我们组合成的发卡型 STAT5b 金纳米荧光分子信标荧光猝灭情况良好,在 500~570 nm 的荧光值保持在 1.4~2.3, FITC 特征吸收

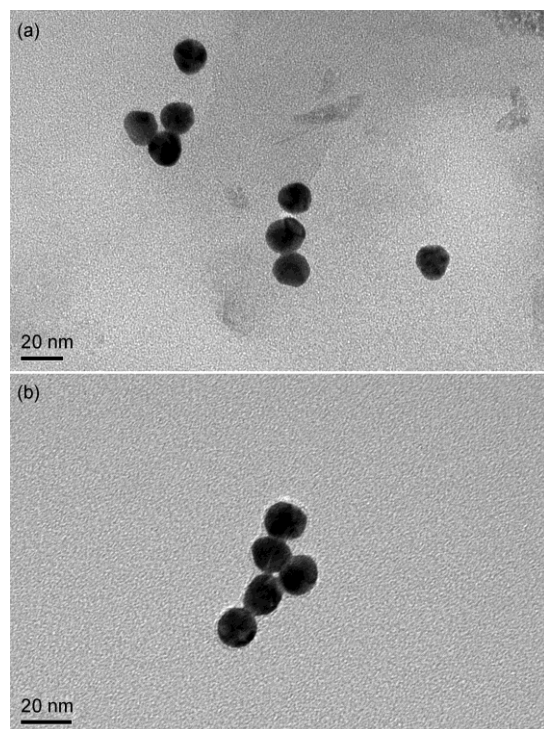


图3 透射电子显微镜图片

(a) 15 nm 金纳米粒; (b) STAT5b 金纳米荧光分子信标

波长 520 nm 处的荧光值为 2.3。在加入过量于细胞内含量的 GSH 和 Dnase I 后, 520 nm 处 FITC 最大波长增幅微弱, 从猝灭的 2.3 强度分别增至 8.9 和 11.9。该微弱荧光强度增幅无法说明该分子信标被 GSH 和 Dnase I 降解^[26,29], 为 STAT5b 金纳米荧光分子信标在细胞内的稳定性提供了保证。同时, 当金纳米粒失去对 FITC 的荧光猝灭作用后, 分子信标在 520 nm 处的荧光强度从 2.3 迅速激增至 31.2, 此 15 倍的荧光强度激增说明该分子信标可在细胞内恢复足够的荧光以供检测(图 4)^[27]。

2.3 细胞毒性实验

在此 MTT 实验中, 当加入浓度高至 2 nmol/L 的金纳米荧光分子信标时, HepG-2 细胞和 PC12 细胞的最低存活率为 96.19% 和 87.58%(图 5)。此实验结果显示, 2 nmol/L 浓度下的金纳米荧光分子信标对 HepG-2 细胞和 PC12 细胞存活无显著影响, 保证了该分子信标进行细胞成像和核酸检测的安全性和有效性。同时, 已有文献报道 15 nm 金纳米粒与相应金纳米荧光分子信标均不存在细胞毒性作用^[30], 该实验结果与前人研究结果保持了高度一致。

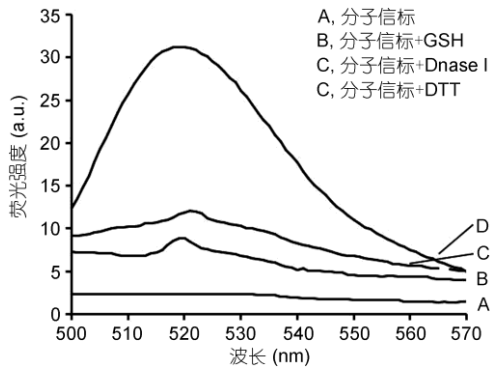


图 4 STAT5b 金纳米荧光分子信标荧光图谱

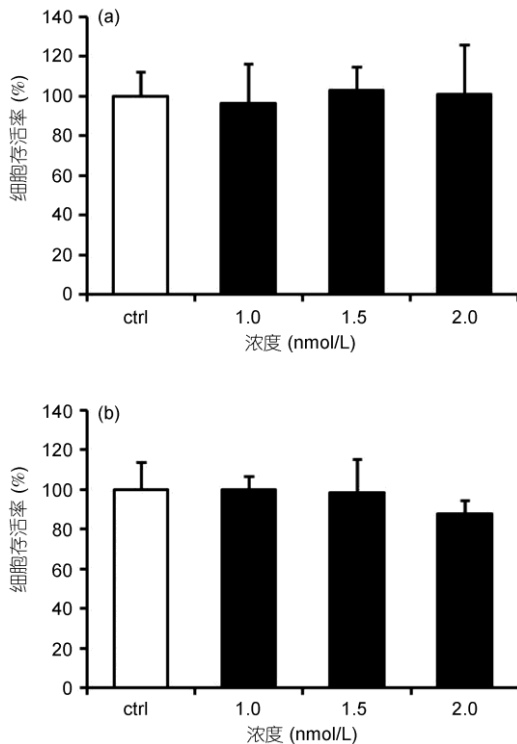


图 5 STAT5b 金纳米荧光分子信标作用后细胞存活率
(a) HepG-2; (b) PC12

2.4 激光共聚焦显微镜定性检测 STAT5b mRNA 表达

已有文献报道 STAT5b 在肝癌细胞中为高表达, 在鼠源细胞中为低表达^[31]。依此研究结果, 我们选择肝癌细胞 HepG-2 和褐家鼠肾上腺嗜铬瘤细胞 PC12 分别作为考察 STAT5b mRNA 表达的阳性实验细胞和阴性对照细胞。激光共聚焦显微镜采用点照明、逐点扫描, 共聚焦、逐点成像技术, 能够从多角度进行细胞结构立体观察及活细胞实时观测, 输

出的数字化荧光图像可作为荧光定性检测的依据^[32]。我们通过激光共聚焦显微镜, 成功捕捉 HepG-2 细胞和 PC12 细胞 STAT5b 表达荧光图片(图 6)。实验结果显示, HepG-2 细胞检测到高强度荧光信号, 而 PC12 细胞基本检测不到荧光信号。该实验结果成功验证了合成的 STAT5b 金纳米荧光分子信标在细胞水平检测 STAT5b mRNA 的可靠性。同时, 经过 STAT5b 金纳米荧光分子信标长达 12 h 的孵育后, HepG-2 细胞和 PC12 细胞仍保持良好细胞形态, 也从侧面证实我们合成的 STAT5b 金纳米荧光分子信标的高度生物相容性及低毒性。最后, 我们可以从共聚焦图片中清晰观察到, STAT5b 金纳米荧光分子信标所呈现的荧光信号绝大多数出现在细胞质中, 这是由 mRNA 存在于细胞质这一生物特性所致^[33]。

2.5 流式细胞术定量测定 STAT5b mRNA 表达

流式细胞术是定量测定活细胞荧光强度的公认方法, 同时, 已有文献通过流式细胞术成功测定细胞内磷酸化 STAT 含量^[34,35]。本研究中, 当 HepG-2 细胞和 PC12 细胞与分子信标作用后, 通过流式细胞术检测到 HepG-2 细胞的荧光强度是 9.08, 而 PC12 细胞的荧光强度为 2.98, 前者是后者的 3.07 倍(图 7)。该实验结果与上述激光共聚焦实验结果相吻合。同时也验证了 STAT5b mRNA 在 HepG-2 细胞中的高表达和在 PC12 细胞中的低表达。

2.6 RT-PCR 定量测定 STAT5b mRNA 表达

为了验证本研究所建立的核酸检测方法的可靠性, 我们通过 RT-PCR 方法测定实验细胞株中 STAT5b 含量。实验结果显示, STAT5b 在 HepG-2 细胞中的相对表达量为 $116\% \pm 5\%$, 在 PC12 细胞中为 $80.3\% \pm 5\%$, HepG-2 细胞中的相对表达量是 PC12 细胞中的 1.45 倍。RT-PCR 实验结果与建立的分子信标方法检测结果吻合且灵敏度更高(图 8), 表明本研究所合成的金纳米荧光分子信标是一种更有效的核酸检测工具。

3 结论与展望

我们设计、合成、表征了 STAT5b 金纳米荧光分子信标, 并通过观察和测定 FITC 荧光信号强度在细胞水平实现对活细胞 STAT5b mRNA 的实时检测。运用金纳米荧光分子信标进行活细胞 STAT5b

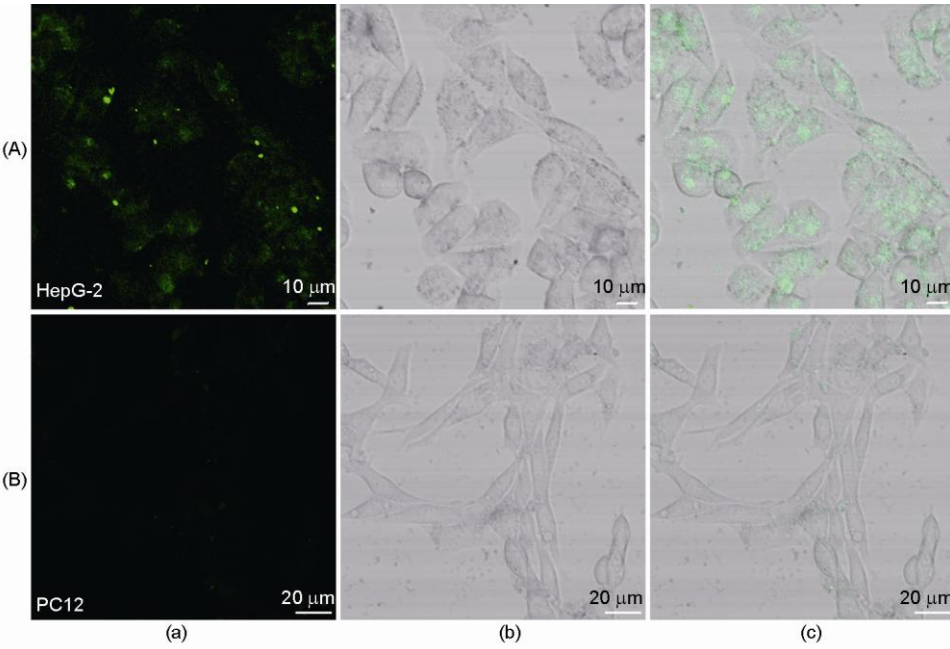


图 6 激光共聚焦显微镜下 STAT5b 金纳米荧光分子信标作用后细胞中的荧光表达
HepG-2 细胞(A), PC12 细胞(B); FITC 荧光图片(a), DIC 图片(b), 叠加图片(c)

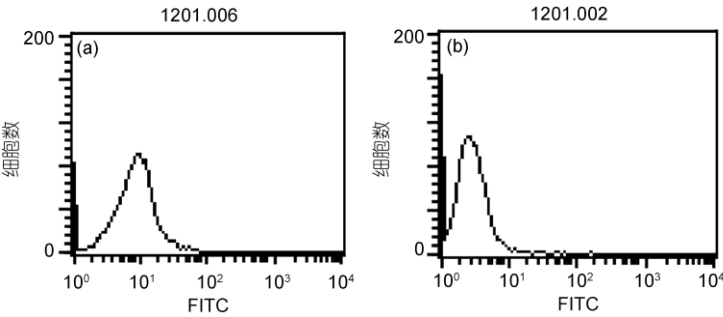


图 7 细胞与 STAT5b 金纳米荧光分子信标作用后流式细胞术测定的荧光强度
(a) HepG-2; (b) PC12

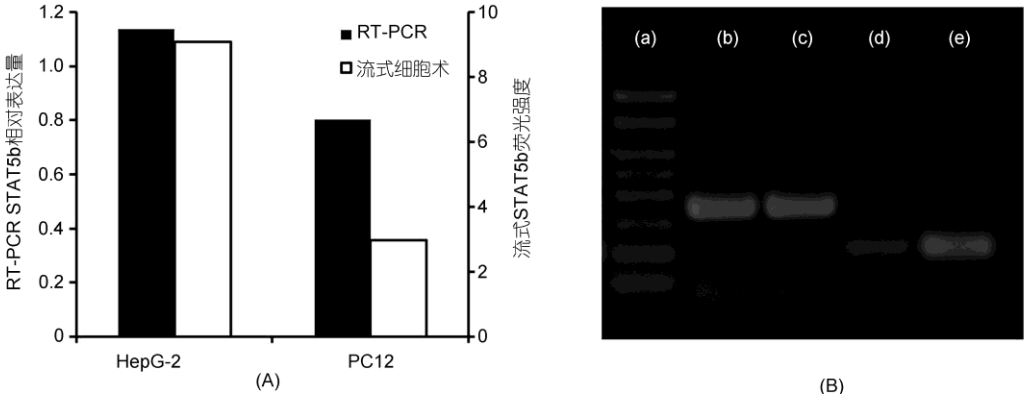


图 8 HepG-2 和 PC12 细胞中 STAT5b 表达量(A)及电泳图(B)

电泳图中, (a) Marker(从上到下): 1000 bp, 800 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp; (b) GAPDH(Pc12); (c) GAPDH(HepG-2); (d) STAT5B(Pc12); (e) STAT5B(HepG-2)

mRNA 检测是一种全新、无损、简便、高灵敏的检测方法。基于此研究成果, 我们有望进行 JAK-STAT 信号通路中其他转录因子的检测, 从而进一步研究这些转录因子在生命活动中的作用和对肿瘤发生发展的影响。同时, 该类金纳米荧光分子探针可应用于肿瘤早期诊断、生物成像和药物靶标的确认。

在金纳米荧光分子信标的研究中, 以下几个方面将是今后的研究难点和热点: (1) 在保持或进一步

简化其结构的前体下, 增强分子信标在细胞内的稳定性, 减少核酸酶的降解作用, 使其应用于更为复杂的基因表达环境和多种疾病检测。(2) 选择与金纳米猝灭基团更匹配的荧光基团, 从而降低背景信号, 提高金纳米分子信标的灵敏度。(3) 优化金纳米分子信标中特异性序列筛选方法, 从而在提高金纳米分子信标灵敏度的同时, 使其进一步应用于蛋白质组学、功能基因组学的研究中。

参考文献

- Behrmann I, Smyczek T, Heinrich P C, et al. Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: The exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak. Receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2004, 20: 35486–35493
- Bishop J M. The molecular genetics of cancer. *Science*, 1987, 235: 305–311
- Vogelstein B, Kinzler K W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 1993, 9: 138–141
- Hahn W C, Weinberg R A. Rules for making human tumor cells. *New Engl J Med*, 2002, 347: 1593–1603
- Smimova O V, Ostroukhova T Y, Bogorad R L. JAK-STAT pathway in carcinogenesis: Is it relevant to cholangiocarcinoma progression. *World J Gastroenterol*, 2007, 28: 6478–6491
- Heim M H. The JAK-STAT pathway: Cytokine signaling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*, 1999, 19: 75–120
- Crispi S, Sanzari E, Monfregola J, et al. Characterization of the human STAT5A and STAT5B promoters: Evidence of a positive and negative mechanism of transcriptional regulation. *FEBS Lett*, 2004, 562: 27–34
- Akira S. Functional roles of STAT family proteins: Lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 1999, 17: 138–146
- Buettner R, Mora L B, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 945–954
- Iyer J, Reich N C. Constitutive nuclear import of latent and activated STAT5a by its coiled coil domain. *FASEB J*, 2008, 22: 391–400
- Stephen M, Shane M, Meinrad B. STAT5 in B cell development and leukemia. *Curr Opin Immun*, 2010, 22: 168–176
- Lei G, Ayush D, Jacqueline L, et al. Transcription factor STAT3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells *in vivo*, whereas STAT5B has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth. *Am J Pathol*, 2010, 176: 1959–1972
- Qin C L, Hua X, Zhen W Z, et al. Inhibition of transcription factor STAT5B suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett*, 2009, 273: 164–171
- Fox E M, Bernaciak T M, Wen J, et al. Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 2008, 22: 1781–1796
- Spiekermann K, Pau M, Schwab R, et al. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with proteintyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol*, 2002, 30: 262–271
- Birkenkamp K U, Geugien M, Lemmink H H, et al. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*, 2001, 15: 1923–1931
- 夏国良, 乌仔东晓, 詹书良. STATS 与 cyclinDI 在人脑星形细胞瘤表达的相关性研究. *现代预防医学*, 2008, 35: 3025–3027
- Fleisher T A, Doman S E, Anderson J A, et al. Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. *Clin Immunol*, 1999, 90: 425–430
- Tian S S, Lamb P, King A G, et al. A small, nonpeptidyl mimic of granulocyte colony stimulating factor. *Science*, 1988, 281: 257–259
- 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 22
- Dubertret B, Calame M, Libchaber A J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotech*, 2001, 19: 365–370
- Rosi N L, Giljohann D A, Thaxton C S, et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*, 2006, 312: 1027–1030

- 23 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 1973, 241: 20–22
- 24 Schmitt J, Machtle P, Eck D, et al. Preparation and optical properties of colloidal gold monolayers. *Langmuir*, 1999, 15: 3256–3266
- 25 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat Phys Sci*, 1973, 241: 20–22
- 26 Anderson M E. Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chem-Bio Interact*, 1998, 112: 1–14
- 27 Harry S R, Hicks D J, Amiri K I, et al. Hairpin DNA coated gold nanoparticles as intracellular mRNA probes for the detection of tyrosinase gene expression in melanoma cells. *Chem Commun*, 2010, 46: 5557–5559
- 28 Demers L M, Mirkin C A, Mucic R C, et al. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal Chem*, 2000, 72: 5535–5541
- 29 Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical BioMed*, 1999, 27: 916–921
- 30 Yu P, Sabine N, Annika L, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 2007, 11: 1941–1949
- 31 Bromberg J, Darnell J E Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 2000, 19: 2468–2473
- 32 Collins C L, Ideker J H, Kurtis K E. Laser scanning confocal microscopy for in situ monitoring of alkali-silica reaction. *J Microsc*, 2004, 213: 149–157
- 33 Kevin A, Daniela A, Amy S, et al. Transport and Localization Elements in Myelin Basic Protein mRNA. *J Cell Biol*, 1997, 138: 1077–1087
- 34 Fleisher T A, Doman S E, Anderson J A, et al. Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. *Clin Immunol*, 1999, 90: 425–430
- 35 李玲, 魏大鹏, 张平, 等. Western blot 和流式细胞术检测磷酸化 STAT3 的比较. *中国实验诊断学*, 2011, 15: 209–211

Gold nanoparticle-based fluorescent molecular beacon for the detection of STAT5b mRNA expression in living cell

LI Yang, XUE JianPeng, CUI SiSi, TIAN JunMei, ZHANG DongYin, CAO Jie & GU YueQing

Department of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) is an important protein in JAK-STAT signal pathway and is responsible for the metastasis and proliferation of tumor cells. In this study, we demonstrated a novel beacon which consisted of a gold nanoparticle core functionalized with a dense monolayer of hairpin DNA with a specific sequence for the STAT5b mRNA and modified with FITC. By the confocal laser scanning microscope and flow cytometry, we successfully detected the expression of STAT5b mRNA using this novel beacon in HepG-2 cells and PC12 cells. At last, to confirm the presence and absence of STAT5b mRNA in HepG-2 cells and PC12 cells, RT-PCR amplification was performed. This strategy is a promising approach for the intracellular measurement of transcription factors, RNA or proteins.

gold nanoparticle, molecular beacon, STAT5b mRNA

doi: 10.1360/972012-664