

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/68

G01N 33/574

C12Q 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510038461.9

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1664583A

[22] 申请日 2005.3.17

[21] 申请号 200510038461.9

[71] 申请人 中国人民解放军南京军区南京总医院
地址 210002 江苏省南京市中山东路 305 号

[72] 发明人 李秋荣 黎介寿

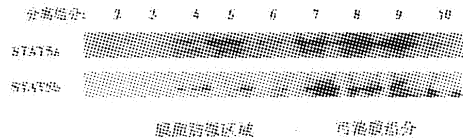
[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司
代理人 夏平 刘成群

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称 一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法。该方法的步骤为对 T 细胞培养，细胞破裂前用 IL-2 刺激 T 细胞；采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离 T 细胞膜脂肪微区域；采用蛋白免疫印记法分析分离的 T 细胞膜脂肪微区域中的 STAT5a 和 STAT5b。该方法能够简单、有效、准确地测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布，可用于新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定。



ISSN 1008-4274

1、一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其特征在于包含下列步骤：

- a. T 细胞培养，细胞破裂前用 IL-2 刺激 T 细胞；
- b. 采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离 T 细胞膜脂肪微区域；
- c. 采用蛋白免疫印记法分析分离的 T 细胞膜脂肪微区域中的 STAT5a 和 STAT5b。

2、根据权利要求 1 所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其特征在于，其中 T 细胞培养的方法是将人类 Jurkat E6-1 T 细胞加入 RPMI 1640 培养基，培养基中添加占培养基体积百分比 10% 的热灭活新生牛血清、青霉素 100 U/ml 培养基、链霉素 100 μ g/ml 培养基，置于二氧化碳培养箱中，在 5% CO_2 于 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。

3、根据权利要求 1 所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其特征在于，其中采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离 T 细胞膜脂肪微区域的方法为将 2×10^7 个/ml Jurkat T 细胞用 Hanks 平衡盐溶液清洗后，用含 1% Brij58 的 TKM 缓冲液，并加入蛋白酶抑制剂，冰上孵育 30 min，破裂细胞；与等容量的溶解于 TKM 缓冲液的 80% w/v 蔗糖混合，5.5 mL 36% 蔗糖缓慢覆盖其上层，然后再用 2.5 mL 5% 蔗糖覆盖在顶层，250 000g 于 4 $^\circ\text{C}$ 下超速离心离心 18 小时，从顶部取每 1 mL 收集不同的分离组分，-80 $^\circ\text{C}$ 保存。

4、根据权利要求 1 所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其特征在于，其中蛋白免疫印记法为用 SDS-PAGE 分离 T 细胞膜不同组分中的蛋白质，电转运蛋白到 PVDF 膜；分别用 STAT5a、STAT5b 和磷酸酪氨酸抗体，二抗为辣根过氧化物酶偶联的 IgG 抗体，Western blot 分析，BM 化学发光，Western blot 检测盒检测，感光胶片曝光即可。

5、权利要求 1 所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法在新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定中的应用。

一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种测定 T 细胞 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，特别是涉及一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，本发明还涉及该方法在新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定中的应用。

背景技术

T 细胞膜脂肪微区域 (lipid rafts) 为细胞膜液体脂双层内的功能性区域 (见图 1)，富含糖脂、鞘磷脂和胆固醇。现已明确膜脂肪微区域在一些细胞信号传导的作用，许多重要受体和细胞信号传导蛋白都集中在膜脂肪微区域，这种受体信号分子的区室化在功能上有重要的意义。近期研究结果表明，许多信号传导途径的重要分子，如 T 细胞受体 (TCR/CD3)，B 细胞受体 (BCR)，IgE 受体存在于 lipid rafts 区域中。T 细胞受体介导的信号传导分子如 Src 激酶家族、G 蛋白家族和 eNOS 蛋白等作为其组成或诱导性位于膜脂肪微区域中，在该微区域中完成信号传导过程。国内关于膜脂肪微区域与受体信号蛋白的研究，未见报道。

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)家族成员共有 7 个成员，即 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6，是 JAK 激酶(Janus kinase)/信号转导和转录激活子通路 (JAKs-STATs) 非常重要的下游分子。许多细胞因子和多数造血生长因子均通过此途径完成细胞信号传递过程，为细胞因子受体介导的主要信号转导途径，参与了多种免疫和造血细胞的发育、分化、成熟、凋亡和功能表达过程。

IL-2 和 IL-2 受体 (IL-2R) 结合可以激活下游的 JAK 激酶家族，使其磷酸化，STAT5 信号在胞浆内激活的酪氨酸激酶激活 STAT5 分子并使之磷酸化，然后穿过细胞核膜进入核内，STAT5 在核内与特异性的 DNA 启动子结合，调节相关基因的表达 (见图 2)。JAKs-STATs 途径是细胞信号转导途径中非常重要的一条通路，在调控机体一系列生理与病理反应中发挥关键作用，如何有效地调控 JAKs-STATs 途径对于许多疾病的防治有重要意义。

按目前的研究理论 STAT 家族蛋白应存在于胞浆和核内，目前仅有 Sehgal 的一篇论文报道在膜脂肪微区域组分检测到 STAT1 和 STAT3（见图 3）。为了解决 STAT5a 和 STAT5b 是否也存在于细胞膜的功能性区域——脂肪微区域中，本发明提供了测定 STAT5a 和 STAT5b 在 T 细胞膜脂肪微区域分布的方法。

发明内容

本发明的目的是提供一种准确有效地测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法。

本发明技术方案是根据细胞膜脂肪微区域不溶于非离子活性剂，利用该化学特征可进行细胞膜亚区域的分离，再采用蛋白免疫印记法分析分离的细胞膜亚区域中的 STAT5a 和 STAT5b，从而可以测定 STAT5a 和 STAT5b 在细胞膜脂肪微区域的分布。

本发明的目的是通过下列具体措施实现的：

一种测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其特征在于包含下列步骤：

- a. T 细胞培养，细胞破裂前用 IL-2 刺激 T 细胞；
- b. 采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离 T 细胞膜脂肪微区域；
- c. 采用蛋白免疫印记法分析分离的 T 细胞膜脂肪微区域中的 STAT5a 和 STAT5b。

所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其中 T 细胞培养的方法为将人类 Jurkat E6-1 T 细胞加入 RPMI 1640 培养基，培养基中添加占培养基体积百分比 10% 的热灭活新生牛血清、青霉素 100 U/ml 培养基、链霉素 100 μ g/ml 培养基，置于二氧化碳培养箱中，在 5% CO_2 于 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。

所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其中采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离 T 细胞膜脂肪微区域的方法是将 2×10^7 个/ml Jurkat T 细胞用 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)清洗后，用含 1% Brij58 的 TKM 缓冲液，并加入蛋白酶抑制剂，冰上孵育 30 min，破裂细胞；与等容量的溶解于 TKM 缓冲液的 80% w/v 蔗糖混合，5.5 mL 36%蔗糖缓慢覆盖其上层，然后再用 2.5 mL 5% 蔗糖覆盖在顶层，250 000g 于 4 $^\circ\text{C}$ 下超速离心离心 18 小时，从顶部取每 1 mL 收集不同的分离组分，-80 $^\circ\text{C}$ 保存。

所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法，其中蛋白免疫印记法是用 SDS-PAGE 分离 T 细胞膜不同组分中的蛋白质，电转运蛋白到 PVDF 膜；分

别用 STAT5a、STAT 5b 和磷酸酪氨酸抗体，二抗为辣根过氧化物酶偶联的 IgG 抗体，Western blot 分析，BM 化学发光，Western blot 检测盒检测，感光胶片曝光即可。

所述的测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布的方法在新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定中的应用。

本发明的有益效果：

按目前的研究理论 STAT5a 和 STAT5b 应该存在胞浆和核内，我们用 IL-2 刺激 Jurkat T 细胞、应用不连续蔗糖密度超速离心法分离膜脂肪微区域、蛋白免疫印记分析的方法，在膜脂肪微区域组分和可溶膜组分中都检测到 STAT5a、STAT5b 蛋白，这是在国内首次首次在膜功能性脂肪微区域组分中检测到 STAT5a、STAT5b 蛋白。在细胞膜脂肪微区域组分存在的 STAT5a 和 STAT5b 是细胞因子信号传导通路早期的一个阶段，在细胞信号传导的早期阶段进行信号传导过程，然后进入胞内，穿过核膜转入核内，表明细胞膜脂肪微区域组分存在不同细胞因子与 STATs 作用的生理位点。

本发明采用的方法可以简单准确地测定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布。STATs 蛋白是一类具有信号传导和转录调节的功能蛋白质，控制细胞增殖、分化和生存，STATs 激活后诱导某些与细胞增殖、分化、生存、凋亡密切相关的关键基因的异常高表达，通过各种途径促进细胞增殖、恶性转化、表现出致癌的作用。STATs 蛋白在细胞内不适当的活化可导致的癌症发生在许多研究中得到证实，在多种肿瘤细胞组织中都有激活，如乳腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、脑瘤、非小细胞性肺癌和各种白血病等。阻断了这种蛋白，就会阻止癌细胞（如乳腺和前列腺）的生长和扩散；STATs 持续性激活与细胞的恶性转化进程密切相关，利用 STATs 信号传导途径中的各个靶位点，设计肿瘤治疗策略已成为当今 STATs 研究中的热点，本发明方法确定 T 细胞膜脂肪微区域 STAT5a 和 STAT5b 分布，为抗肿瘤药物的一个新的作用位点，可用于新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定。

附图说明

图 1 是 T 细胞膜脂肪微区域示意图。

图 2 是 STATs 在细胞浆和细胞核内分布示意图。

图 3 是 Sehgal 在细胞膜脂肪微区域检测的 STAT1 和 STAT3 分布图。图中 2、3、4 表示表面脂肪微区域，6 表示可溶膜组分。

图 4 是本发明测定的 STAT5a、STAT5b 在 T 细胞膜脂肪微区域的分布图。

具体实施方式

以下通过实施例对本发明作进一步的阐述，但不限制本发明。

实施例 1

1. 实验材料

人类 Jurkat E6-1 T 细胞 (American Type Culture Collection, Bethesda, MD), RPMI 1640 培养基、新生牛血清来源于 Invitrogen 公司 (Grand Island, NY); 人类白介素-2 (hIL-2)、蛋白酶抑制剂 cocktail 和 BM 化学发光 Western blotting kit 购于 Roche 公司 (Indianapolis, IN); 兔抗人 STAT5a、STAT5b 抗体购自 Upstate 公司 (Lake Placid, NY); 抗兔辣根过氧化物酶偶联抗体购自 Roche 公司 (Indianapolis, IN)。

2. 细胞培养

人类 Jurkat E6-1 T 细胞加入 RPMI 1640 培养基, 培养基中添加占培养基体积百分比 10% 的热灭活新生牛血清 (杭州四季青)、青霉素 100 U/ml 培养基、链霉素 100 μ g/ml 培养基, 置于二氧化碳培养箱中, 在 5% CO₂ 于 37 °C 条件下培养。细胞破裂前, 用 400U/ml IL-2 刺激 30 min。

3. 膜脂肪微区域的分离

膜脂肪微区域的分离采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法。2 \times 10⁷ 个/ml Jurkat T 细胞用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 清洗后, 用含 1% Brij58 的 TKM 缓冲液 (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 25 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA), 并加入蛋白酶抑制剂 cocktail (含 0.12 mg antipain-HCl, 20 μ g bestatin, 40 μ g chymostatin, 0.12 mg E-64, 20 μ g leupeptin, 20 μ g pepstatin, 0.12 mg phosphoramidon, 0.8 mg pefabloc, 40 μ g aprotinin), 冰上孵育 30 min, 破裂细胞。与等容量的溶解于 TKM 缓冲液的 80% w/v 蔗糖混合, 5.5 mL 36% 蔗糖缓慢覆盖其上层, 然后再用 2.5 mL 5% 蔗糖覆盖在顶层, 250 000g 于 4 °C 下超速离心 (Optima L-80 XP ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) 离心 18 小时。从顶部取每 1 mL 收集不同的分离组分, -80 °C 保存。

4. 蛋白免疫印记分析

用 10% SDS-PAGE 分离 (Bio-Rad, minigel 装置) T 细胞膜不同组分中的蛋白质, 电转运蛋白到 PVDF 膜, 分别用 STAT5a、STAT 5b 和磷酸酪氨酸 (phosphotyrosine) 抗体, 二抗为辣根过氧化物酶偶联的 IgG (H&L) 抗体, Western blot 分析, BM 化学发光 Western blot 检测盒检测, 感光胶片 (KODAK BioMAX XAR) 曝光 1 分钟, 结果见图 4。

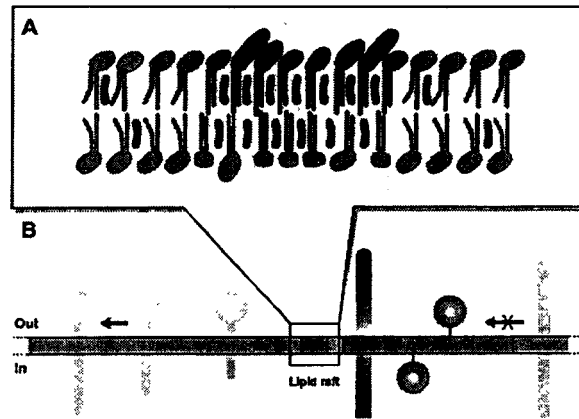


图 1

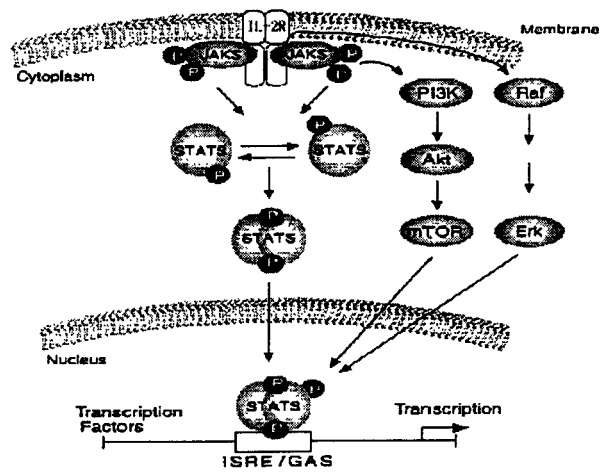


图 2

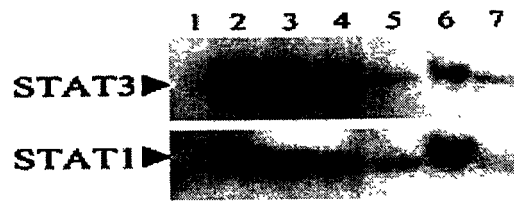


图 3

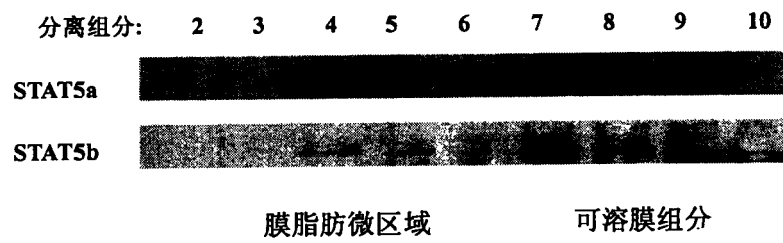


图 4

专利名称(译)	一种测定T细胞膜脂肪微区域STAT5a和STAT5b分布的方法及其应用		
公开(公告)号	CN1664583A	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	CN200510038461.9	申请日	2005-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
[标]发明人	李秋荣 黎介寿		
发明人	李秋荣 黎介寿		
IPC分类号	C12Q1/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
代理人(译)	夏平 刘成群		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定T细胞膜脂肪微区域STAT5a和STAT5b分布的方法。该方法的步骤为对T细胞培养，细胞破裂前用IL - 2刺激T细胞；采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法分离T细胞膜脂肪微区域；采用蛋白免疫印记法分析分离的T细胞膜脂肪微区域中的STAT5a和STAT5b。该方法能够简单、有效、准确地测定T细胞膜脂肪微区域STAT5a和STAT5b分布，可用于新型抗肿瘤药物研制和抗肿瘤效果的测定。

