

参考文献

- [1] Oh D, Shin S Y, Lee S *et al* 2000. Role of the hinge region and the tryptophan residue in the synthetic antimicrobial peptides, cecropin A (1-8) - Magainin 2(1-12) and its analogues on their antibiotic activities and structures *Biochemistry* 39: 11855-11864.
- [2] Bhaskaran R, Ponnuswamy P K (1988) Positional flexibilities of amino acid residues in globular proteins *Int J Peptide Prot Res* 32: 241-255.

整合素-ICAM-1相互作用的二维反应动力学研究

付长亮(研究生),佟春芳,王曼柳,高宇欣,龙勉(导师)

(中国科学院微重力重点实验室,中国科学院力学研究所生物力学与生物工程中心,北京,100190)

整合素(LFA-1和Mac-1)与其配体细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的相互作用在诸如肿瘤转移、炎症反应等许多病理生理过程中起着重要的作用。研究表明,中性粒细胞(PMN)在特定环境下可通过整合素与ICAM-1的相互作用而增强黑色素瘤细胞的转移能力^[1],但其动力学调控机制还不清楚。受体-配体键结合和解离的二维反应动力学定量描述了分子结合的快慢和强弱,是回答整合素与ICAM-1相互作用如何调控黑色素瘤细胞、中性粒细胞、中性粒细胞-内皮细胞之间粘附的关键。本文选取表达ICAM-1的黑色素瘤细胞系WM9、表达整合素LFA-1和Mac-1的人中性粒细胞(从健康人血液中提取)、表达整合素LFA-1的人白血病细胞系Jurkat和表达ICAM-1的人肺微血管内皮细胞系HMEC-ST1.6R,采用实验室独立发展的气体驱动的微管吸吮技术(GSMAT)^[2]以及图像处理算法,开展了以下三个方面的研究工作:1)测定了WM9-PMN和PMN-HMEC间整合素与ICAM-1相互作用的反应动力学参数,用于阐明LFA-1与Mac-1共同表达时整合素-ICAM-1反应动力学的差异;2)测定了WM9-Jurkat和Jurkat-HMEC间整合素与ICAM-1相互作用的反应动力学参数,用于阐明LFA-1单独表达时整合素-ICAM-1反应动力学的差异;3)采用TNF- α 刺激WM9和HMEC细胞上调ICAM-1表达,并重复上述两部分实验,用于阐明趋化因子对整合素-ICAM-1反应动力学的影响。实验中通过改变细胞间的接触时间可得到粘附频率(P_a)随接触时间改变的粘附曲线,并由小系统概率动力学模型拟合获得整合素与ICAM-1相互作用的反应动力学参数:

$$P_a = 1 - P_0 = 1 - \exp(- (A_c m_r m_l k_f / k_r^0) (1 - e^{-k_r^0 t}))$$

其中 A_c 为接触面积, m_r 和 m_l 分别为受体和配体的分子密度, $A_c m_r m_l k_f$ 和 k_r^0 分别为有效正反应率和零力下的负反应率,扣除受体和配体的分子密度后可得有效正反应率 $A_c k_f$ 与有效反应亲和性 $A_c K_a$ 。初步实验结果表明:1)PMN-WM9间 $A_c m_r m_l K_a$ 值较PMN-HMEC高3.9倍(分别为0.6257和0.1613 s^{-1}),主要是由HMEC和WM9表达的ICAM-1分子密度不同所致(前者为后者的4.7倍);2)PMN-WM9间 k_r^0 仅为PMN-HMEC的1/3(分别为0.1282和0.3943 s^{-1});3)TNF- α 刺激对PMN-WM9和PMN-HMEC的 k_r^0 影响不大,对 $A_c m_r m_l k_f$ 的影响则主要来自于对细胞表面ICAM-1分子密度的上调表达;4)WM9-Jurkat及Jurkat-HMEC的反应动力学与上述结果类似。上述研究工作对于深入认识整合素与ICAM-1相互作用的二维反应动力学在肿瘤转移中的作用具有重要科学意义。(国家自然科学基金项目(30730032)、科技部“蛋白质科学”国家重大研究计划(2006CB910303)、科技部863项目(2007AA02Z306)和中国科学院知识创新工程项目(KJCX2-YW-L08),E-mail: mlong@imech.ac.cn; Tel: (010)82544131)

参考文献

- [1] Liang, S, M. J. Slattery, and C. Dong 2005. Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion *Exp. Cell Res* 310: 282-292.

- [2] Shao, J. Y., and J. B. Xu 2002. A modified micropipette aspiration technique and its application to tether formation from human neutrophils. *J. Biomech. Eng.* 124: 388-396.

拟南芥原生质体分离影响因素的分析

廖嘉明(研究生),王伯初(导师)*,王益川,田继权

(重庆大学生物流变科学与技术教育部重点实验室)

在生物力学研究领域,拟南芥原生质体是一种基础的研究材料。目前的文献报道的拟南芥原生质体分离并不一致,并且多数研究只涉及产量,而对后续工作有着重要影响的原生质体活力并没有作为指标量化。为了提高原生质体的产量与活力,以野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia)为材料,以原生质体产量和活力为指标,研究了以下几种因素拟南芥叶肉细胞原生质体分离的影响:不同预处理(24小时4℃低温预处理、无处理)不同酶解方式(45 mp/m in低速振荡3小时酶解、静置酶解14小时)不同酶解温度(28℃酶解、25℃酶解)不同离心力水平(600 r/m in、900 r/m in、1200 r/m in)不同材料来源(生长28天的拟南芥幼叶叶片、生长10天的拟南芥子叶叶片)。对于原生质体产量的影响,结果如下:24小时4℃低温预处理对原生质体产量没有显著影响,无处理组产量为 2.61×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,略高于低温处理组的 2.04×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,但没有达到显著性水平。45 mp/m in低速振荡3 h酶解会显著降低原生质体产量。其对照样本静置酶解14 h的产量为 2.32×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,振荡酶解组产量为 0.57×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,两者相差高达4.05倍。28℃酶解可以显著提高原生质体产量。结果显示,样本6产量为 3.60×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,对照组25℃酶解的样本1产量为 2.04×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,两者相差1.77倍。1200 r/m in、900 r/m in、600 r/m in离心组的产量分别为 4.28×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 、 3.60×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 、 2.91×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,1200 r/m in离心组的产量分别为600 r/m in组的1.47倍和900 r/m in组的1.19倍。在分离条件相同的情况下,生长10天的子叶叶片所得的原生质体产量为 0.51×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,生长28天的幼叶叶片所得的原生质体产量为 2.26×10^6 个 $\cdot g^{-1}$,前者为后者的4.43倍。对于原生质体活力的影响,结果如下:24小时4℃低温预处理对原生质体活力影响显著,低温处理组原生质体活力为81.35%,为无处理组的54.24%的1.50倍。45 mp/m in低速振荡3 h酶解对活力没有显著影响,振荡酶解组活力为80.86%,静置酶解组活力为80.01%,两者没有明显差异。28℃酶解对于原生质体活力没有显著影响,28℃酶解组活力为80.16%,25℃酶解组活力为80.68%,两者没有明显差异。离心力对原生质体活力有显著影响。600 mp/m in能够提高原生质体活力到84.03%,比900 mp/m in提高了5%,接近显著性水平。1200 mp/m in会降低原生质体活力到72.91%,与900 mp/m in相比降低了10%。在分离条件相同的情况下,生长10天的子叶叶片所得的原生质体活力为77.58%,生长28天的幼叶叶片所得的原生质体活力为79.45%,两者差异不显著。拟南芥原生质体分离的最佳条件为4℃低温预处理24 h,28℃静置离心14 h,600 r/m in静置离心,其所得的原生质体活力最高为84.03%,产量为 2.91×10^6 个/g。(国家自然科学基金10872223, E-mail: wangbc2000@126.com)

参考文献

- [1] 陈颖,贾艳菊,张翠茹. 拟南芥叶肉细胞原生质体分离及影响因素[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2008, 28(4): 423-426.
- [2] Sheahan M B, Rose R J, McCurdy D W. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts[J]. *Protoplasma*, 2007, 230: 141-152.
- [3] V R N. Chikkala, G D Nugent, P J. Dix, et al. Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. botrytis (cauli flower)[J], *Scientia Horticulturae*, 2009, 119: 330-334.