

利用光镊技术研究力作用下 P-selectin/PSGL-1 键的解离

章 燕 霍 波 龙 勉[△]

(中国科学院力学研究所, 北京 100080)

摘要 采用光镊技术研究力作用下 P-selectin/PSGL-1 键的解离, 得到了在较小的加载率 (< 25 pN/s) 下键解离的断裂力分布, 发现键的最可几断裂力随加载率增加而增加; 测量了较低的力范围 (< 30 pN) 内 P-selectin/PSGL-1 键解离的寿命, 发现键的寿命随作用力增加而下降, 呈现一个从“滑移键”到“逆锁键”的过渡相。研究结论深化了力作用下受体/配体键的认识。

关键词 P-selectin/PSGL-1 键 逆锁键 光镊 断裂力 寿命

Forced Dissociation of P-selectin/PSGL-1 Bonds Using an Optical Trap Assay

Zhang Yan Huo Bo Long Mian[△]

(Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Forced dissociations of P-selectin/PSGL-1 bonds were studied using an optical trap assay. Rupture force distributions of the bonds were obtained from experimental measurements in a range of loading rate (< 25 pN/s), and the most probable rupture forces were found to increase with increase of loading rates. Lifetimes of the bonds decreased with increase of forces in the lower force range (< 10 pN), demonstrating another transition phase from slip bond to catch bond. These findings further the understandings of forced dissociations of receptor/ligand bonds.

Key words P-selectin/PSGL-1 bond Catch bond Optical trap Rupture force Lifetime

1 引言

许多研究表明, 白细胞在激活的内皮细胞表面发生的滚动过程中, P 选择素分子(P-selectin)与其对应的 P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)的相互作用起着重要的作用^[1]。Evans 等采用生物膜力探针(BFP)发现了 P-selectin/PSGL-1 键解离的最可几断裂力随加载率的增加而增加^[2], 本课题组叶志义采用原子力显微镜(AFM)也得到了类似的结果^[3], 但在较低的加载率范围内 (< 500 pN/s) 的 P-selectin/PSGL-1 键解离仍不清楚。Marshall 等利用 AFM 和流动腔实验首次揭示了 P-selectin/PSGL-1 键在外力作用下存在“逆锁键”现象^[4], 即键寿命在 $10 \sim 20$ pN 力范围内随力增加而增加(即负反应率 k_r 减少), 但当外力超过 20 pN 键寿命则随力增加而减小(即 k_r 增加)。前者称为“逆锁键”, 而后者称

为“滑移键”。逆锁键-滑移键的转变解释了在一定的剪应力范围内随力增加白细胞在内皮细胞上滚动先增加而后减少的“剪切阈值”现象^[5]。但是由于 AFM 等方法在施加较低的加载率 (< 500 pN/s) 和较小的外力 (< 10 pN) 等方面存在的技术困难, 目前缺乏在较低加载率和较小外力下 P-selectin/PSGL-1 键解离的实验数据。在本研究中, 我们利用光镊技术能产生较低加载率和较小外力下的特点, 测量了在较低的加载率 (< 25 pN/s) 和较小的外力 (< 10 pN) P-selectin/PSGL-1 键的最可几断裂力和寿命。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验用 P-selectin 片段(sPs)采用包括 N-末端、Lectin 区、EGF 区及九个 CR 区的全长胞外片段。PSGL-1 和 sPs 分别通过预先物理吸附的非阻断抗体(PL2 和 S12)耦联到直径为 5.66 和 $2.32 \mu\text{m}$ 玻璃小球上。为了保证 P-selectin/PSGL-1 在碰撞时

[△] 联系人。E-mail: mlong@imech.ac.cn

主要是单键结合,需要控制表面分子密度使其黏附频率小于 30%。

2.2 实验系统

光镊系统基于一台倒置的 Zeiss 显微镜 (AXIOVERT200),激光光源为波长 $1.06 \mu\text{m}$ 的 YAG 激光。实验采用光阱捕获包被了 sPs 的 $2.32 \mu\text{m}$ 小球与固定在载玻片上、包被了 PSGL-1 的 $5.66 \mu\text{m}$ 小球发生结合-解离反应。光阱刚度系数通过 Stokes 公式进行标定,加载率改变通过计算机控制的载物台和光阱移动速度实现,作用力则通过测量小球的位移得到。整个实验系统的时间测量精度为 0.04 s ,空间测量精度为 $28\sim 30 \text{ nm}$ 。

3 结果与讨论

3.1 加载率与键断裂最可几力关系

图 1 为 P-selectin/PSGL-1 键最可几断裂力对加载率依赖性的实验结果。结果表明无论是在高加载率还是在低加载率下,加载率的对数与键断裂的最可几力之间都有着良好的线性关系(除极低的加载率以外),结果与本研究组 AFM 的结果具有良好的 consistency。

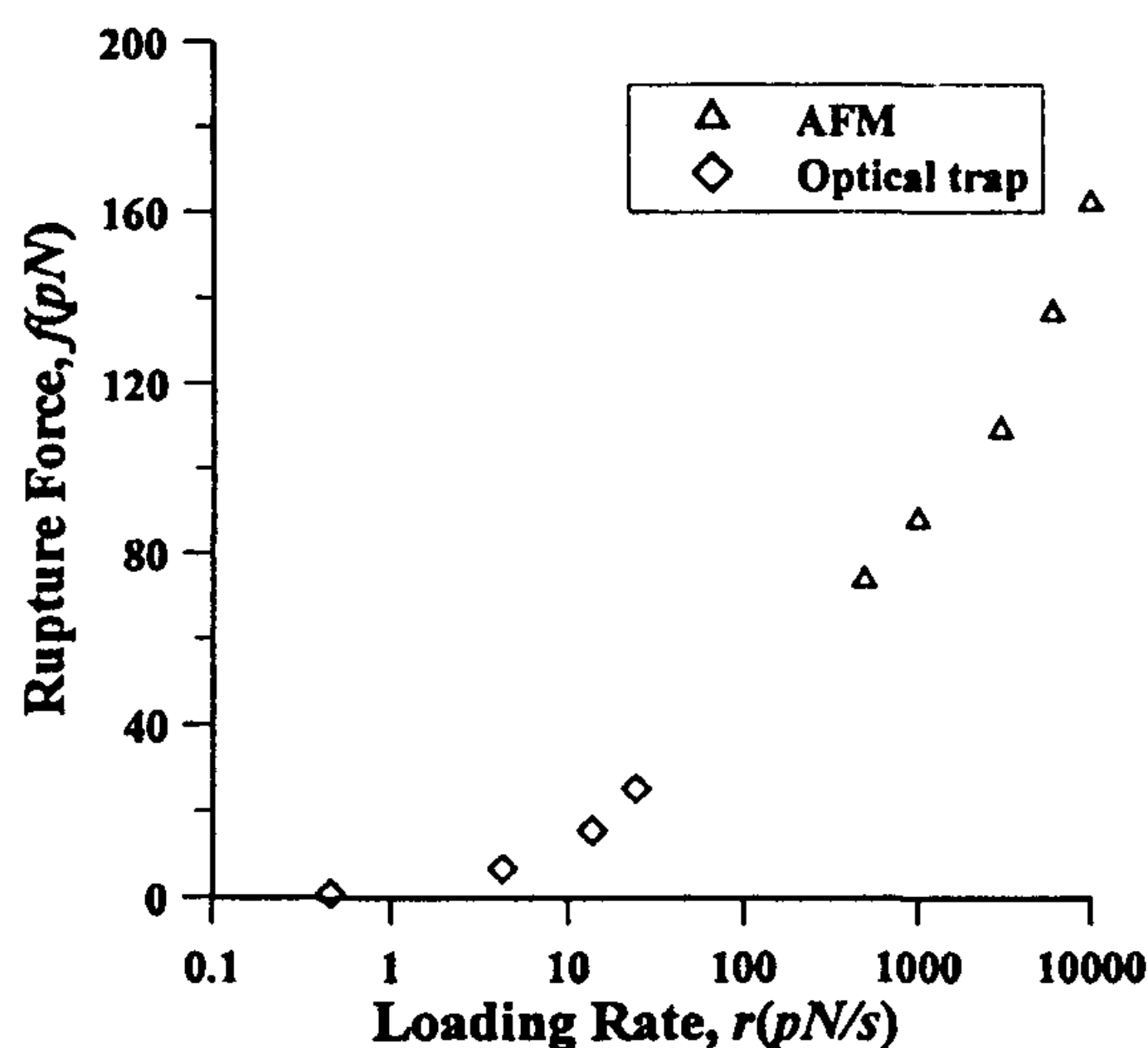


图 1 加载率与键最可几断裂力关系

3.2 P-selectin/PSGL-1 键寿命对外力的依赖性

图 2 为 P-selectin/PSGL-1 键寿命对外力依赖性的测量结果。实验结果不仅较好地重复了 AFM 的实验结果,即在 $10\sim 30 \text{ pN}$ 观察到了逆锁键和滑移键的转换,而且观测到了外力小于 10 pN 下键的寿命随外力增加而减小的趋势,这种趋势的发现意味着在外力小于 30 pN 时至少存在两次逆锁键和

滑移键的转换。

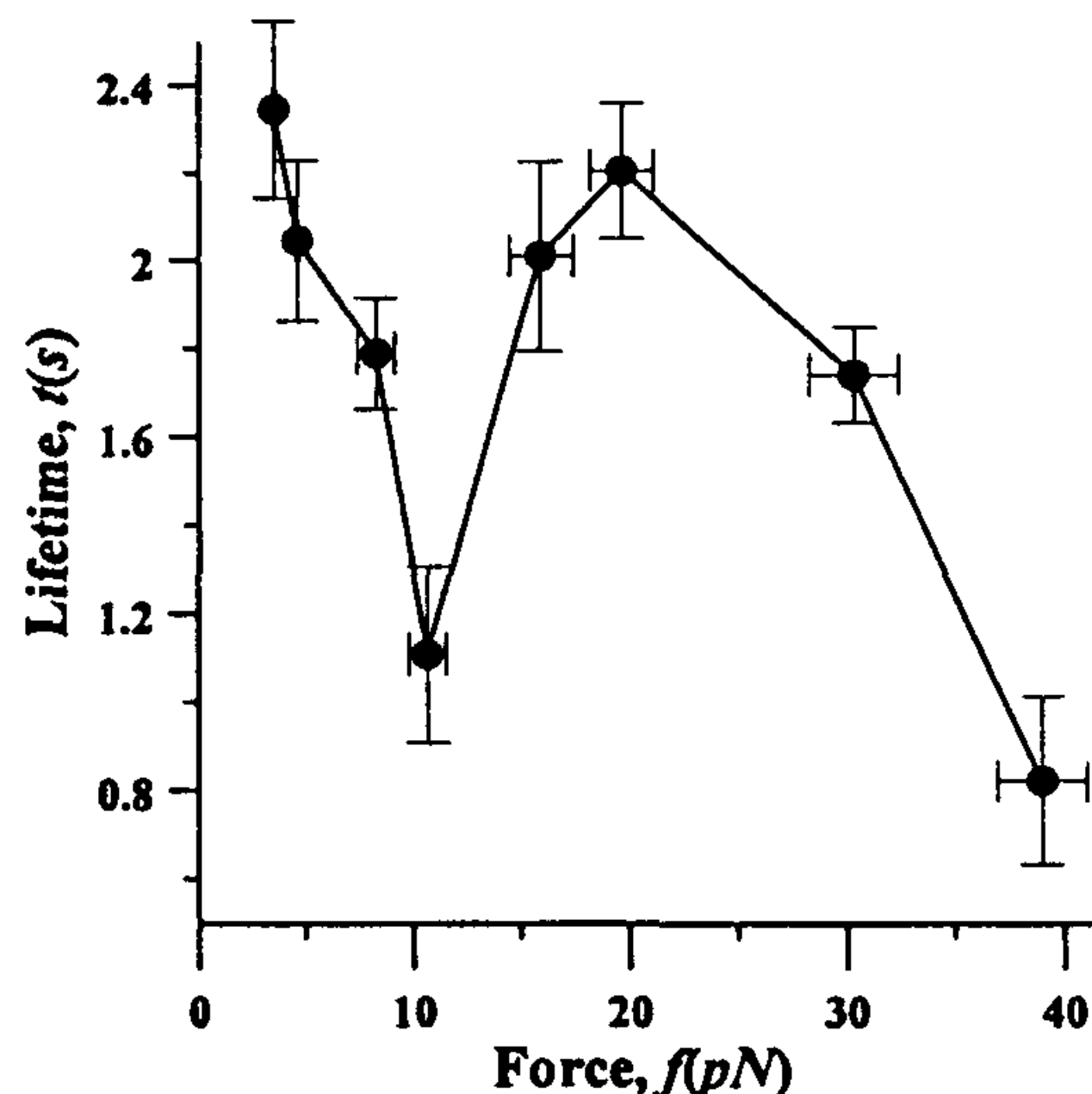


图 2 外力与 P-selectin/PSGL-1 键寿命的关系。图中每个数据点的样本量在 $50\sim 70$ 之间,实线为趋势线

3.3 讨论

我们的实验结果补充了 AFM 等实验结果,得到了在低加载率下 P-selectin/PSGL-1 键断裂力分布,由此得到的键断裂力图谱可以用来分析键内部的结构和功能之间的关系;同时对低力下键寿命的直接测量发现了另一个逆锁键和滑移键的转换,深化了对 P-selectin/PSGL-1 相互作用之“逆锁键”的认识。

本研究得到国家自然科学基金 10332060、30225027、10128205,中国科学院知识创新工程项目 KJCX2-SW-L06 和力学所知识创新工程项目、中国科学院科研装备项目等的支持。

参 考 文 献

- 1 Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 1995; 128 : 661
- 2 Evans E, Ritchie R, Merkel R. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 1997; 72 : 1541
- 3 叶志义. 接触速度,接触时间以及加载率对力作用下 P-selectin/PSGL-1 键解离的影响. 中国科学院力学研究所博士后研究报告, 2004
- 4 Marshall BT, Long M, Piper JW, *et al.* Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003; 423 : 190
- 5 Lawrence MB, Kansas GS. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L, P, E). *J Cell Biol*, 1997; 136 : 717