

· 论 著 ·

应用 Tet-On 基因表达系统实现 Mac-1-FP 在 CHO 细胞中的可调控性表达

杨生生¹, 杨志峰¹, 严 鸣², 蔡在龙¹, 焦炳华¹, 毛积芳^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 基础医学部病理生理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的:应用 Tet-On 基因表达系统构建可调控性真核表达质粒,实现 Mac-1-FP 在 CHO 细胞中的可调控性表达。方法:采用 DNA 重组技术构建真核表达质粒 p TRE-Tight-CFP-CD11b 和 p TRE-Tight-YFP-CD18(CD11b 和 CD18 是 Mac-1 的两个亚基),通过脂质体介导共转染 CHO 细胞,用荧光显微镜观察转染后阳性细胞;应用 RT-PCR 和荧光强度分析观察不同浓度(0,0.01、0.1、0.5、1、2 μg/ml)强力霉素(Dox)对细胞内 CD11b 和 CD18 表达水平的影响;检测 PMA(1 μg/ml)刺激前后 CHO-Mac-1-FP 细胞与其配基 ICAM-1 黏附活性的变化。结果:酶切鉴定和测序证实,已成功构建真核表达质粒 p TRE-Tight-CFP-CD11b 和 p TRE-Tight-YFP-CD18,在荧光显微镜下观察到转染成功的 CHO 细胞发出青色荧光和黄色荧光。通过荧光显微镜观察到随着培养液中 Dox 浓度的增加,CHO 细胞内的荧光强度相应增强,同时 CD11b 和 CD18 在 mRNA 水平的表达也随 Dox 浓度的增加而增加。PMA 刺激后,CHO-Mac-1-FP 细胞与其配基 ICAM-1 黏附率增高(2 h 和 4 h 时最高,此后逐渐下降)。结论:本研究成功实现了 Mac-1-FP 在 CHO 细胞中的可调控性表达并具有野生型 Mac-1 的黏附活性,为进一步开展单分子光谱(SMS)和荧光共振能量转移(FRET)技术研究活细胞内 Mac-1 分子的 2 个亚基的二聚化、群集、构象及与配基亲和力变化创造条件。

[关键词] Mac-1;青色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;融合蛋白;可调控表达

[中图分类号] R 786 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1092-06

Inducible expression of Mac-1-FP in Chinese hamster ovary cells using Tet-On gene expression system

YANG Sheng-sheng¹, YANG Zhi-feng¹, YAN Ming², CAI Zai-long¹, JIAO Bing-hua¹, MAO Ji-fang^{1*} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] Objective: To construct eukaryotic inducible expression plasmids p TRE-Tight-CFP-CD11b and p TRE-Tight-YFP-CD18 using Tet-On gene expression system and co-transfect them into Chinese hamster ovary (CHO) cells, so as to achieve the inducible expression of Mac-1-FP. Methods: The eukaryotic expression vectors p TRE-Tight-CFP-CD11b and p TRE-Tight-YFP-CD18 were constructed by recombinant DNA technique. The 2 vectors were co-transfected into CHO cells using liposome to fuse CD11b and CD18: the 2 subunits of Mac-1. Fluorescence microscope was used to observe the cyan fluorescence and the yellow fluorescence of Mac-1-FP. The influence of different levels of Dox (0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 μg/ml) on expression levels of CD11b and CD18 in CHO cells was analyzed by RT-PCR and fluorescence intensity analysis. The adhesive rate of CHO-Mac-1-FP cells with ligand ICAM-1 was analyzed before and after PMA (1 μg/ml) stimulation. Results: The recombinant plasmids of p TRE-Tight-CFP-CD11b and p TRE-Tight-YFP-CD18 were successfully constructed. The cyan and yellow fluorescences were observed in co-transfected CHO cells under fluorescence microscope. The fluorescence intensity of the cells was increased with the increase of Dox concentration. RT-PCR analysis demonstrated that the CD11b and CD18 mRNA increased with the increase of Dox concentration. The adhesive rate of CHO-Mac-1-FP cells with ICAM-1 was increased after PMA stimulation (peaked at 2 h and 4 h after stimulation and decreased afterwards). Conclusion: This study achieves the inducible expression of Mac-1-FP in CHO cells. And Mac-1-FP, like wildtype Mac-1, exhibits adhesive activity with ligand ICAM-1, which lays a foundation for studying the consisting dimer, clustering, conformation and affinity of the ligands of Mac-1 using single molecule spectroscopy and fluorescence resonance energy transfer technique in living cells.

[KEY WORDS] Mac-1; cyan fluorescent protein; yellow fluorescent protein; fusion protein; inducible expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1092-1097]

白细胞黏附分子 Mac-1 (macrophage differentiation antigen associated with complement three receptor function) 是位于白细胞表面的整合素家族 2 亚族的成员之一,它是白细胞表面参与机体防御

[基金项目] 国家自然科学基金(30291705). Supported by National Natural Science Foundation of China (30291705).

[作者简介] 杨生生, 硕士, 讲师.

* Corresponding author. E-mail: jifang@hotmail.com



功能及免疫反应的极为重要的黏附分子^[1]。它由 (CD11b) 和 (CD18) 两个亚基以非共价键的方式形成异二聚体。

有关 Mac-1 在白细胞脱黏附中的作用及其机制的研究很少;对于 Mac-1 的贮存、转位、变构的过程,尚缺乏在活细胞内对其全过程动态定位定量的研究;对不同的激动剂引起的 Mac-1 的活化过程,还只是一个统一的笼统的模式^[2,3]。严鸣等^[4]曾利用 GFP 的突变体 BFP 与 YFP 分别标记 CD11b 和 CD18,初步观察了 Mac-1 在 PMA 刺激以及和 ICAM-1 结合后在胞内的走向。目前仍存在许多亟待解决的问题,特别是以下 3 个方面,即:(1)二聚化;(2)群集;(3)配基与膜受体结合的亲和力。而要研究上述问题,最好的方法应当是 Mac-1 的单分子视觉研究。联合应用荧光共振能量转移(FRET)以及原子力显微镜(AFM),不仅可以进行单分子 FRET,还可以通过定位研究细胞表面的膜蛋白的微观结构,利用 Mac-1 的配基 ICAM-1 修饰 AFM 针尖,即可以测得单分子 Mac-1 的亲和力,从而对上述问题可以进行深入的研究。

本研究采用 CFP 和 YFP 分别标记 Mac-1 的 2 个亚基形成融合蛋白的方法,研究 Mac-1 在活细胞内的定位、走向及其相互作用。同时采用 Tet-On 基因表达系统的可控真核表达载体使 Mac-1-FP 融合蛋白在 CHO 细胞中得到可控的低表达。为进一步开展单分子光谱和 FRET 技术研究活细胞内 Mac-1 分子的 2 个亚基的二聚化、群集、构象及与配基亲和力变化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和细胞株 DH5 菌株由本教研室保存,pECFP-N1、pEYFP-N1、pEYFP-C1 和 pTRE-Tight 质粒购自 Clontech 公司,pBS-CD11b 和 pBS-CD18 质粒由本校基础医学部病理生理学教研室严鸣博士提供。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司,pGEM-T 载体购自 Promega 公司。pTRE-Tight-CFP 和 pTRE-Tight-YFP 质粒为自行构建。CHO-K1 Tet-On 细胞株(已稳定转染质粒 pTet-On,简称 CHO 表示)购自 Clontech 公司,CHO-ICAM-1 细胞株来源于 ATCC,由美国 NIH 杨义力博士惠赠。

1.2 试剂 限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶购自 New England Biolabs, Ex Taq 酶(DRR001A)和一步法 RT-PCR 试剂盒(DRR024A)购自 TaKaRa 公司,Lipofectamine2000TM购自 Invitrogen 公司,Opti-

MEM、DMEM 和 TRIzol 购自 Gibco 公司,Tet 系统专用胎牛血清购自 Clontech 公司,PMA 购自 Sigma 公司,质粒纯化和胶回收试剂盒购自 QIA GEN 公司,PCR 引物由 Sangon 合成。

1.3 pTRE-Tight-CFP-CD11b 的构建 以质粒 pECFP-N1 为模板,设计合成一端含有 *Bam*H 酶切位点,另一端将终止密码突变但含有 *Not* 酶切位点的一对 PCR 引物(上游和下游引物序列如下:P1: 5'-ATT CTG CAG TCG ACG GTA-3 ;P2: 5'-GCG GCC GCT ATA CTT GT-3),扩增无终止密码子的编码 CFP 的 cDNA 片段与 pMD18-T 载体连接。*Bam*H 和 *Not* 双酶切质粒 pMD18-CFP-C1 获得 CFP-C1 的 cDNA 片段插入质粒 pTRE-Tight 相应位点获得质粒 pTRE-Tight-CFP-C1。*Not* 酶切质粒 pBS-CD11b 获得 CD11b 的 cDNA 片段,插入质粒 pT-CFP-C1 相应位点,转化大肠杆菌 DH5,获得质粒 pTRE-Tight-CFP-CD11b。用 *Kpn*I (位于 339 bp 处)和 *Spe*I (位于 5 290 bp 处)双酶切鉴定插入方向,并进行正向全长 DNA 测序鉴定。

1.4 pTRE-Tight-YFP-CD18 的构建 *Nhe*I 和 *Sal*I 分步双酶切质粒 pEYFP-C1 获得 YFP-C1 的 cDNA 片段插入质粒 pTRE-Tight 相应位点,获得质粒 pTRE-Tight-YFP-C1。*Kpn*II 和 *Sal*I 双酶切质粒 pBS-CD18 获得 CD18 后一部分的 cDNA 片段(用 CD18b1 表示),插入质粒 pT-YFP-C1 相应位点,构建重组质粒 pTRE-Tight-YFP-CD18b1。以质粒 pBS-CD18 为模板,设计合成两端都含有 *Kpn*II 酶切位点的一对 PCR 引物(上游和下游引物序列如下:P1: 5'-TCC GGA ATG CTG GGC CT-3 ;P2: 5'-GGT TTC CGG AAA TCA GCT-3),扩增 CD18 前一部分的 cDNA 片段(用 CD18a1 表示)插入质粒 pT-YFP-CD18b1 相应位点,转化大肠杆菌 DH5,获得质粒 pTRE-Tight-YFP-CD18。用 *Bam*H (位于 344 bp、1 277 bp 处)酶切鉴定插入方向,并进行正向全长 DNA 测序鉴定。

1.5 CHO-Mac-1-FP 细胞的构建 大量抽提质粒 pTRE-Tight-CFP-CD11b 和 pTRE-Tight-YFP-CD18,与带潮霉素 B 抗性筛选标记的线性化 DNA 片段(Clontech 公司)一起经 Lipofectamine2000TM 介导共转染 CHO 细胞,以未转染的细胞作为对照,接种于 24 孔板(2 × 10⁴/孔)。加潮霉素 B 至终浓度为 750 μg/ml,37 培养约 2 周,直到出现抗潮霉素

B 细胞克隆。传代用含潮霉素 B 400 μg/ml 的培养液维持培养。

1.6 荧光显微镜观测 将 CHO-Mac-1-FP 细胞培养于 24 孔培养板上,然后置于荧光显微镜(Olympus IX70)载物台,分别在 435 nm 与 492 nm 激发光波长下透过 490 nm(CFP)与 550 nm(YFP)的滤光片观察 CFP 和 YFP 的荧光。

1.7 检测 Dox 对 Mac-1-FP 表达的调控

1.7.1 RT-PCR 法 将 CHO-Mac-1-FP 细胞培养于 6 孔培养板上,每孔加入 Dox,使终浓度分别为 0、0.01、0.1、0.5、1、2 μg/ml,共 6 孔。培养 12 h。用 TRIzol 抽提每孔细胞的总 RNA。设计 PCR 引物:根据 CD11b、CD18 和 仓鼠系来源三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的 cDNA 序列应用软件 Primer Premier 5.0 设计引物。CD11b 的上游引物和下游引物分别为 5-CATAGCCAGCGGATAGCA-3 和 5-GCAACTGTAGTTTCA GGGTC-3,跨度为 456 bp;CD18 的上游引物和下游引物分别为 5-CAC AAG CCT CGC TGA AAC C-3 和 5-GAAGGA CCC GAA GCC AA T-3,跨度为 270 bp;内参照 GAPDH 的上游引物和下游引物分别为 5-GTC TCC TGC GAC TTC AAC A-3 和 5-GGG TGG GCT TCT TAC TCC-3,跨度为 176 bp。应用一步法 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应。同时以无模板和无逆转录酶的反应作为对照,用于排除基因组 DNA 污染的可能。

1.7.2 荧光强度检测 将 CHO-Mac-1-FP 细胞培养于 24 孔培养板上,每孔加入 Dox,使终浓度分别为 0、0.01、0.1、0.5、1、2 μg/ml。培养 12 h。荧光显微镜下对 CHO-Mac-1-FP 细胞进行成像,用软件 Image-pro plus(V5.0.1)分析计算其中 YFP-CD18 所发的荧光强度值。

1.8 黏附活性的测定 参见文献^[5]。CHO-ICAM-1 细胞接种于 24 孔培养板上(10⁵/ml);实验组将 CHO-Mac-1-FP 细胞加入 PMA(终浓度为 1 μg/ml)后,分别孵育 0、1、2、4、8、16 h;对照组将转染质粒 pTRE-Tight-CFP 和 pTRE-Tight-YFP 的 CHO 细胞(用 CHO-YFP-CFP 细胞表示)计数后,加入接种 CHO-ICAM-1 细胞的 24 孔培养板上,与实验组相同,孵育相应时间;用 PBS 洗脱未黏附的细胞 3 次,收集洗脱液,600 r/min 离心 5 min,去上清,重悬细胞沉淀行细胞计数。黏附率=(黏附前细胞计数-洗脱液中细胞计数)/黏附前细胞计数×100%。
1.9 统计学处理 所有实验均重复 3 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Student's *t* 检验确定组间的统计学意义。

2 结果

2.1 pTRE-Tight-CFP-CD11b 和 pTRE-Tight-YFP-CD18 的构建 经酶切鉴定(图 1、图 2)和测序(图谱略)确定重组质粒 pTRE-Tight-CFP-CD11b 和 pTRE-Tight-YFP-CD18 构建完全正确。

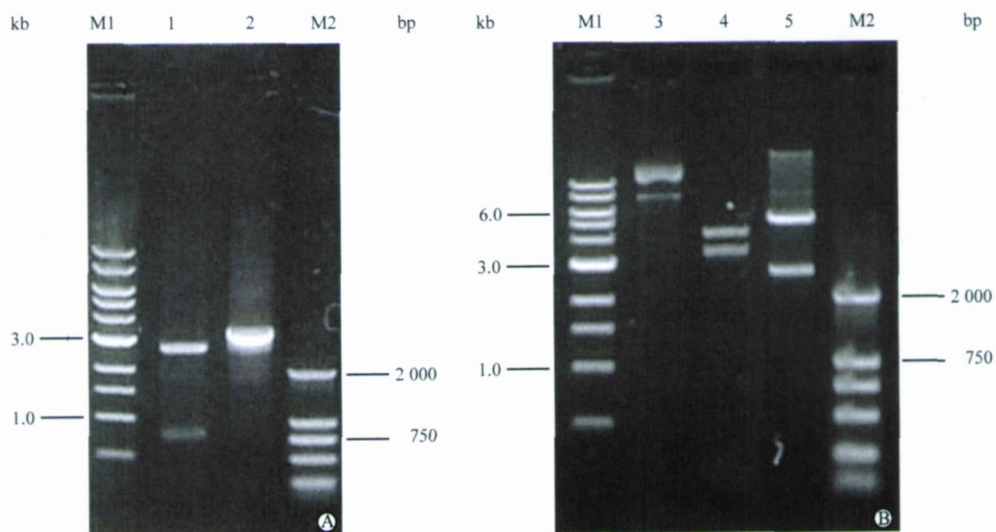


图 1 质粒 pTRE-Tight-CFP-C1(A)和 pTRE-Tight-CFP-CD11b(B)的酶切鉴定

Fig 1 Identification of plasmid pTRE-Tight-CFP-C1 (A) and pTRE-Tight-CFP-CD11b (B) by digestion with restriction enzymes M1:1kb DNA ladder; M2: DL2000; 1: pTRE-Tight-CFP-C1/ BamH + Not ; 2: Plasmid pTRE-Tight-CFP-C1; 3: Plasmid pTRE-Tight-CFP-CD11b; 4: pTRE-Tight-CFP-CD11b/ Not ; 5: pTRE-Tight-CFP-CD11b/ Kpn + Spe

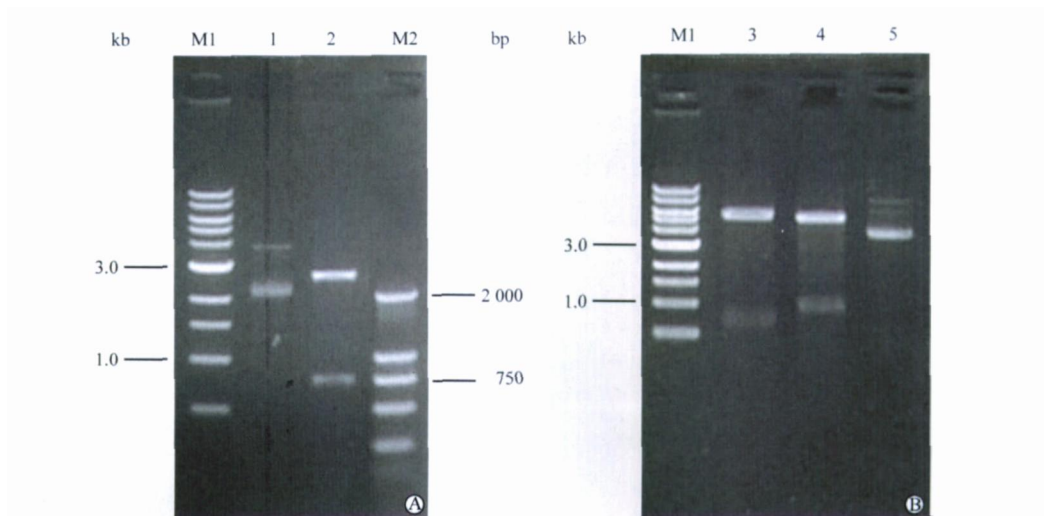


图 2 质粒 pTRE-Tight-YFP-C1 (A) 和 pTRE-Tight-YFP-CD18 (B) 的酶切鉴定

Fig 2 Identification of plasmid pTRE-Tight-YFP-C1 (A) and pTRE-Tight-YFP-CD18 (B) by digestion with restriction enzymes
 M1: 1 kb DNA ladder; M2: DL2000; 1: Plasmid p TRE-Tight- YFP-C1; 2: p TRE-Tight- YFP-C1/ *Nhe* + *Sal*; 3: p TRE-Tight- YFP-CD18/*Kpn*2; 4: p TRE-Tight- YFP-CD18/ *Bam*H; 5: Plasmid p TRE-Tight- YFP-CD18

2.2 荧光成像系统观察 可以看到转染阳性的 CHO 细胞在激发波长为 435 nm 和 492 nm 时发出青色和黄色荧光(图 3)。

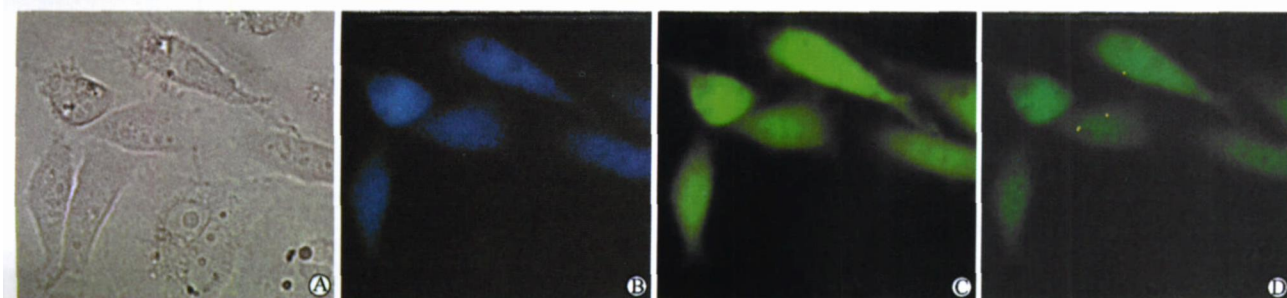


图 3 pTRE-Tight-CFP-CD11b 和 pTRE-Tight-YFP-CD18 共转染 CHO 细胞的荧光成像

Fig 3 Fluorography of CHO cells co-transfected with of pTRE-Tight-CFP-CD11b and pTRE-Tight-YFP-CD18 (x250)
 A: CHO cells co-transfected with p TRE-Tight-CFP-CD11b and p TRE-Tight- YFP-CD18; B: Cyan fluorescence at 435 nm wave length under fluorescent microscopy; C: Yellow fluorescence at 492 nm wave length under fluorescent microscopy; D: Merged with A, B and C

2.3 检测 Dox 对 Mac-1-FP 表达的调控 图 4 中可以观察到第 1~6 泳道各有 456 bp 大小和 270 bp 大小的条带,其强度逐渐增加,为 CD11b 和 CD18 的 RT-PCR 产物,另有一 176 bp 大小的条带的强度没有变化,为内参 GAPDH 的 RT-PCR 产物。结果表明 CHO-Mac-1-FP 细胞内 CD11b 和 CD18 的 mRNA 水平随着 Dox 浓度的增加而增加。将在不同浓度 Dox 培养下的 CHO-Mac-1-FP 细胞分别在激发光为 492 nm 的荧光显微镜下观察,荧光强度随 DOX 浓度增加而增强,经成像软件 Image-pro plus

(V5.0.1) 计算当 DOX 浓度分别为 0、0.01、0.1、0.5、1、2 μg/ml 时,其荧光强度分别为 227、618、1 046、2 648、10 224、11 091。

2.4 黏附活性的测定 静息状态下,CHO 细胞、CHO-YFP-CFP 细胞与 CHO-Mac-1-FP 细胞相比,黏附率没有明显的区别;PMA 刺激后,CHO 细胞、CHO-YFP-CFP 细胞的黏附率与静息状态相比没有明显改变,而 CHO-Mac-1-FP 细胞的黏附率则出现了明显的增高,以 2 h 和 4 h 最高 ($P < 0.05$),继而逐渐下降(图 5)。

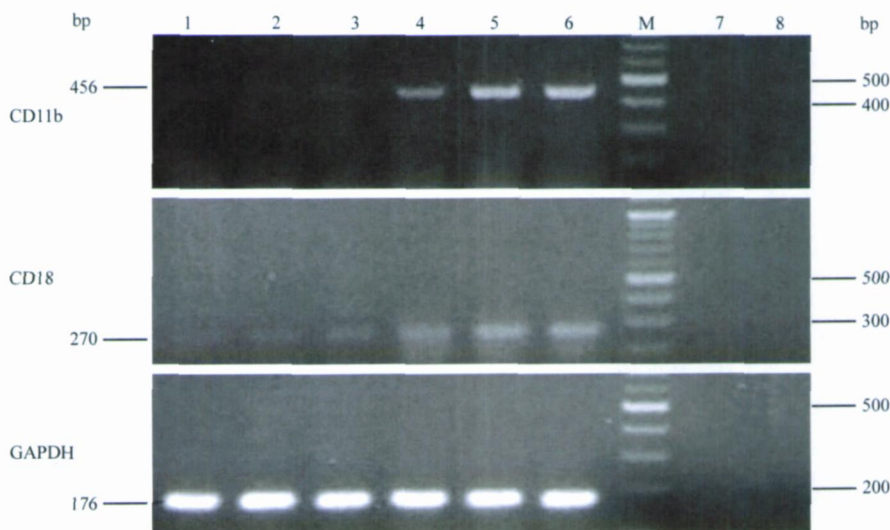


图4 RT-PCR检测 Dox 对 Mac-1-FP 表达的调控的电泳分析

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

1:RT-PCR product without Dox; 2: RT-PCR product with 0.01 µg/ml Dox; 3: RT-PCR product with 0.1 µg/ml Dox; 4: RT-PCR product with 0.5 µg/ml Dox; 5: RT-PCR product with 1 µg/ml Dox; 6: RT-PCR product with 2 µg/ml Dox; M:100 bp DNA ladder; 7: RT-PCR product of without template; 8: RT-PCR product without retroviridase

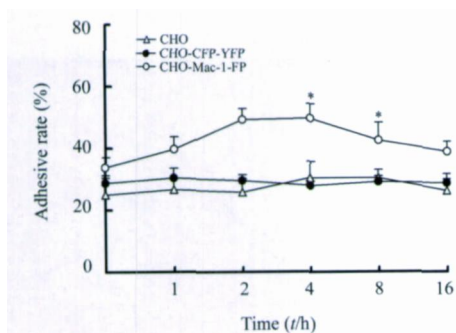


图5 PMA(1 µg/ml)刺激后细胞黏附活性的变化

Fig 5 Adhesive rate of CHO cells with

CHO-ICAM-1 after stimulated by 1 µg/ml PMA

* P < 0.05 vs 0 h; n = 3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

大量文献报道 GFP 与靶蛋白融合后不会影响靶蛋白的空间结构与功能,曾有人构建了 GFP 与整合素 $\alpha_3\beta_1$ 亚基的融合蛋白,实验发现 GFP 既未影响其在膜上的表达,也未影响其亲和力^[6]。但也有报告 GFP 与靶蛋白融合后,对其信号转导功能有一定影响^[7]。因此,我们采用 CFP、YFP 标记两个亚基后,是否会影响两个亚基的二聚化并具有正常 Mac-1 的功能就是一个迫切需要解决的问题。由于 Mac-1 最主要的功能就是黏附功能,因此,我们选择 Mac-1 与配体 ICAM-1 的黏附实验进行鉴定。Mac-1-FP 的功能鉴定主要有两种方法,一是利用

Mac-1 活化后由胞质内转位至膜上的特点,通过流式细胞术检测膜上是否有 Mac-1,二是利用 Mac-1 可与配基 ICAM-1 结合的特点,检测其黏附性。相比较而言,Mac-1 的黏附活性是其基本的功能,因此我们检测 Mac-1-FP 的黏附性。黏附实验表明:PMA 刺激后,CHO 细胞、CHO-YFP-CFP 细胞的黏附率与静息状态相比没有明显改变,而 CHO-Mac-1-FP 细胞的黏附活性明显升高。由于 CHO 细胞没有白细胞黏附分子的表达,因此,CHO-Mac-1-FP 细胞的黏附活性变化肯定是由 Mac-1-FP 引起的。又因为 Mac-1 的 α 亚基(CD11b)和 β 亚基(CD18)必须在二聚化后才能发挥黏附功能,因此,黏附实验证明 CFP-CD11b 与 YFP-CD18 融合蛋白能够形成二聚体,被 PMA 活化后能够转位到细胞膜上发挥黏附功能;并说明 CFP 和 YFP 标记了 CD11b 和 CD18 后没有影响到 α 亚基和 β 亚基二聚化及与膜转位和黏附相关的信号转导。

Gossen 等^[8]和 Urlinger 等^[9]构建的 Tet-Off 基因表达系统和 Tet-On 基因表达系统具有严谨快速的调控性、诱导表达的范围广、无多效性和低背景表达等优点,为基因表达调控提供了一条可行的途径,已成功用于细胞和转基因鼠中基因功能的研究^[10,11]和基因治疗^[12]等方面,均取得了可喜的成果。以往在生物学领域所进行的研究中绝大多数是集团平均(ensemble averaging)研究,得到的是由大量对象组成的一个整体所表现出的平均响应和平均

值,这一平均效应掩盖了许多特殊的信息。单分子探测技术可对体系中的单个分子进行研究,通过与时间相关过程的探测,能实时了解生物大分子构象变化等动力学信息。其中单分子光谱(single molecule spectroscopy, SMS)探测技术的发展可以帮助我们获得应用集团平均研究无法观察到的信息,如被观察目标的分布函数,异源样本中的亚群,以及在生化反应中常被掩盖的非同步的分子轨迹^[13,14]。Murakoshi 等^[15]就利用单分子 FRET 方法对活细胞内单个 Ras 分子的活化进行了观测。为能适应今后单分子光谱检测的研究,我们选用了具有更低背景表达的质粒 pTRE-Tight,目的是使视野内的 CFP-CD11b 和 YFP-CD18 分子的数目少到适合于单分子的运动轨迹的视见,以准确地判断哪些亮点是单分子,哪些是 2 个分子、3 个分子等等。通过 RT-PCR 方法和检测 YFP-CD18 的荧光强度可以发现转染后的 CHO 细胞中的 Mac-1-FP 的表达确实可以受到 Dox 的调控,这为今后运用单分子光谱检测技术研究 Mac-1 分子提供了基础。实验中我们选用的宿主细胞为 CHO-K1 细胞。因为 CHO-K1 细胞属于成纤维样细胞,应是非专职性炎细胞,有文献^[16,17]报道认为其无内源性 Mac-1 表达,同时具有一定的炎症反应信号转导系统。在实验中,为避免普通胎牛血清中微量四环素及其衍生物对基因表达的影响,选用了 Tet 系统专用胎牛血清。

本实验选择适用于 FRET 技术的 CFP 与 YFP 分别标记 Mac-1 的亚基 CD11b 与亚基 CD18 的 N 端形成融合蛋白,成功构建了 pTRE-Tight-CFP-CD11b 和 pTRE-Tight-YFP-CD18 可调控真核表达质粒。通过 RT-PCR、荧光强度检测和黏附活性检测证明,Mac-1-FP 在 CHO 细胞中得到可调控性表达并具有野生型 Mac-1 的黏附活性,为进一步应用 SMS 和 FRET 技术研究活细胞内 Mac-1 分子的 2 个亚基的二聚化、群集、构象及与配基亲和力变化创造了条件。

[参考文献]

- [1] Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: Regulation by glucocorticoids and role of cytokine[J]. J Immunol, 1998, 161: 6861-6870.
- [2] McDowall A, Leitinger B, Stanley P, et al. The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 27396-27403.
- [3] Simms HH, D'Amico R. LPS induces intracytoplasmic migration of the polymorphonuclear leukocyte CD11b/CD18 receptor [J]. Shock, 1995, 3: 196-203.
- [4] 严鸣,毛积芳,韦毅,等. Mac-1 在细胞内走向的直视研究[J]. 中国科学(C辑 生命科学), 2004, 34: 263-270.
- [5] Charo IF, Yuen G, Goldstein IM. Adherence of human polymorphonuclear leukocytes to endothelial monolayers: effects of temperature, divalent cations, and chemotactic factors on the strength of adherence measured with a new centrifugation assay [J]. Blood, 1985, 65: 473-479.
- [6] Kashiwayi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, et al. Affinity modulation of platelet integrin $\alpha_3\beta_3$ by α_3 -endoneurin, a selective binding partner of the α_3 integrin cytoplasmic tail [J]. J Cell Biol, 1997, 137: 1433-1443.
- [7] Misteli T, Spector DL. Application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15: 961-964.
- [8] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells [J]. Science, 1995, 268: 1766-1769.
- [9] Urlinger S, Baron U, Thellmann M, et al. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7963-7968.
- [10] Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, et al. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector [J]. Gene Ther, 2003, 10: 84-94.
- [11] Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 10933-10938.
- [12] Folliot S, Briot D, Conrath H, et al. Sustained tetracycline-regulated transgene expression *in vivo* in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector [J]. J Gene Med, 2003, 5: 493-501.
- [13] Ishii Y, Yanagida T. Single molecule detection in life science [J]. Single Mol, 2000, 1: 5-16.
- [14] Mörtelmaier M, Kögler EJ, Hesse J, et al. Single molecule microscopy in living cells: subtraction of autofluorescence based on two color recording [J]. Single Mol, 2002, 3: 225-231.
- [15] Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, et al. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7317-7322.
- [16] Ingalls RR, Arnaout MA, Golenbock DT. Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin [J]. J Immunol, 1997, 159: 433-438.
- [17] Flaherty SF, Golenbock DT, Milham FH, et al. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin [J]. J Surg Res, 1997, 73: 85-89.

[收稿日期] 2006-01-14

[修回日期] 2006-09-13

[本文编辑] 尹茶