

復旦大學

本科毕业论文



论文题目: 探究细胞密度对盘基网柄菌随机行走的
影响

姓 名: 陈子扬 学 号: 16307110163

院 系: 复旦大学生命科学学院

专 业: 生物科学

指导教师: 陈唯 职 称: 教授

单 位: 复旦大学物理学系

完成日期: 2020 年 6 月 6 日

《学位论文作假行为处理办法》（节选）

（中华人民共和国教育部令第 34 号发布，自 2013 年 1 月 1 日起施行）

第三条 本办法所称学位论文作假行为包括下列情形：

（一）购买、出售学位论文或者组织学位论文买卖的；（二）由他人代写、为他人代写学位论文或者组织学位论文代写的；（三）剽窃他人作品和学术成果的；（四）伪造数据的；（五）有其他严重学位论文作假行为的。

第四条 学位申请人员应当恪守学术道德和学术规范，在指导教师指导下独立完成学位论文。

第五条 指导教师应当对学位申请人员进行学术道德、学术规范教育，对其学位论文研究和撰写过程予以指导，对学位论文是否由其独立完成进行审查。

第七条 学位申请人员的学位论文出现购买、由他人代写、剽窃或者伪造数据等作假情形的，学位授予单位可以取消其学位申请资格；已经获得学位的，学位授予单位可以依法撤销其学位，并注销学位证书。取消学位申请资格或者撤销学位的处理决定应当向社会公布。从做出处理决定之日起至少 3 年内，各学位授予单位不得再接受其学位申请。

前款规定的学位申请人员为在读学生的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除学籍处分；为在职人员的，学位授予单位除给予纪律处分外，还应当通报其所在单位。

第八条 为他人代写学位论文、出售学位论文或者组织学位论文买卖、代写的人员，属于在读学生的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除学籍处分；属于学校或者学位授予单位的教师和其他工作人员的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除处分或者解除聘任合同。

第九条 指导教师未履行学术道德和学术规范教育、论文指导和审查把关等职责，其指导的学位论文存在作假情形的，学位授予单位可以给予警告、记过处分；情节严重的，可以降低岗位等级直至给予开除处分或者解除聘任合同。

《复旦大学学生纪律处分条例》（2019 年修订版）（节选）

第六十八条 违反学术规范，有下列行为之一的，给予记过处分：

（一）抄袭他人作品或者剽窃、侵占他人研究成果的；（二）在论文或者研究报告中伪造、篡改数据、图片、文献、注释或者捏造事实、编造虚假研究成果的；（三）未参加研究、创作，在研究成果、作品上署名，未经他人许可不当使用他人署名，虚构合作者共同署名，或者多人共同完成研究、创作，在发表研究成果、作品时未注明他人工作、贡献的；（四）故意一稿多投、重复发表的；（五）在申报课题、成果、奖励和职务评审评定、申请学位等过程中提供虚假学术信息的；（六）其他学术不端行为。有前款规定行为之一，情节严重的，给予留校察看处分；情节特别严重的，给予开除学籍处分。

第六十九条 介绍他人买卖论文的，给予记过处分；情节严重的，给予留校察看以上处分；由他人代写论文，代他人写论文，或者买卖论文的，给予开除学籍处分。

第七十条 有本条例第六十三条至第六十九条规定的行为的，学生参加的学校相应课程或者其他教育教学活动的考核成绩记为不合格，并不得补考。

论文撰写人承诺：

本毕业论文是本人在导师指导下独立完成的，内容真实、可靠。本人在撰写毕业论文过程中不存在请人代写、抄袭或者剽窃他人作品、伪造或者篡改数据以及其他学位论文作假行为。

本人清楚知道学位论文作假行为将会导致行为人受到不授予/撤销学位、开除学籍等处理（处分）决定。本人如果被查证在撰写本毕业论文过程中存在学位论文作假行为，愿意接受学校依法作出的处理（处分）决定。

承诺人签名：

陈子扬

日期：2020 年 6 月 6 日

《学位论文作假行为处理办法》（节选）

（中华人民共和国教育部令第 34 号发布，自 2013 年 1 月 1 日起施行）

第三条 本办法所称学位论文作假行为包括下列情形：

（一）购买、出售学位论文或者组织学位论文买卖的；（二）由他人代写、为他人代写学位论文或者组织学位论文代写的；（三）剽窃他人作品和学术成果的；（四）伪造数据的；（五）有其他严重学位论文作假行为的。

第四条 学位申请人员应当恪守学术道德和学术规范，在指导教师指导下独立完成学位论文。

第五条 指导教师应当对学位申请人员进行学术道德、学术规范教育，对其学位论文研究和撰写过程予以指导，对学位论文是否由其独立完成进行审查。

第七条 学位申请人员的学位论文出现购买、由他人代写、剽窃或者伪造数据等作假情形的，学位授予单位可以取消其学位申请资格；已经获得学位的，学位授予单位可以依法撤销其学位，并注销学位证书。取消学位申请资格或者撤销学位的处理决定应当向社会公布。从做出处理决定之日起至少 3 年内，各学位授予单位不得再接受其学位申请。

前款规定的学位申请人员为在读学生的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除学籍处分；为在职人员的，学位授予单位除给予纪律处分外，还应当通报其所在单位。

第八条 为他人代写学位论文、出售学位论文或者组织学位论文买卖、代写的人员，属于在读学生的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除学籍处分；属于学校或者学位授予单位的教师和其他工作人员的，其所在学校或者学位授予单位可以给予开除处分或者解除聘任合同。

第九条 指导教师未履行学术道德和学术规范教育、论文指导和审查把关等职责，其指导的学位论文存在作假情形的，学位授予单位可以给予警告、记过处分；情节严重的，可以降低岗位等级直至给予开除处分或者解除聘任合同。

《复旦大学学生纪律处分条例》（2019 年修订版）（节选）

第六十八条 违反学术规范，有下列行为之一的，给予记过处分：

（一）抄袭他人作品或者剽窃、侵占他人研究成果的；（二）在论文或者研究报告中伪造、篡改数据、图片、文献、注释或者捏造事实、编造虚假研究成果的；（三）未参加研究、创作，在研究成果、作品上署名，未经他人许可不当使用他人署名，虚构合作者共同署名，或者多人共同完成研究、创作，在发表研究成果、作品时未注明他人工作、贡献的；（四）故意一稿多投、重复发表的；（五）在申报课题、成果、奖励和职务评审评定、申请学位等过程中提供虚假学术信息的；（六）其他学术不端行为。有前款规定行为之一，情节严重的，给予留校察看处分；情节特别严重的，给予开除学籍处分。

第六十九条 介绍他人买卖论文的，给予记过处分；情节严重的，给予留校察看以上处分；由他人代写论文，代他人写论文，或者买卖论文的，给予开除学籍处分。

第七十条 有本条例第六十三条至第六十九条规定的行为的，学生参加的学校相应课程或者其他教育教学活动的考核成绩记为不合格，并不得补考。

论文撰写人承诺：

本毕业论文是本人在导师指导下独立完成的，内容真实、可靠。本人在撰写毕业论文过程中不存在请人代写、抄袭或者剽窃他人作品、伪造或者篡改数据以及其他学位论文作假行为。

本人清楚知道学位论文作假行为将会导致行为人受到不授予/撤销学位、开除学籍等处理（处分）决定。本人如果被查证在撰写本毕业论文过程中存在学位论文作假行为，愿意接受学校依法作出的处理（处分）决定。

承诺人签名：

陈子扬

日期：2020 年 6 月 6 日

指导教师对论文独立性的审查意见：

☒ 本人依据《学位论文作假行为处理办法》，经过尽职审查，未发现毕业论文撰写人有学位论文作假行为。本人认为毕业论文撰写人独立完成了本毕业论文。

☐ 本人依据《学位论文作假行为处理办法》，经过尽职审查，发现毕业论文撰写人有如下学位论文作假行为：

指导教师签名：

陈唯

日期： 2020 年 6 月 5 日

指导教师评语：

该论文实验研究了不同密度下粘菌细胞行走的行为特性。通过对细胞行走的轨迹分析，得出不同时间分辨率下细胞速度分布的表现。通过广义郎之万方程拟合，得出了细菌运动时确定项和随机项的形式。以此为基础计算细胞的速度分布并且与实验结果相比较，给出了合理的解释。研究的选题合理，对于文献调研充分，对研究背景介绍详细。整个研究方法得当，实验结果丰富，理论运用合理，结果可靠。 论文写作符合规范。是一篇很好的学位论文。

签名：

陈唯

2020 年 6 月 5 日

答辩委员会（小组）评语：

签名：

20 年 月 日

学分

成绩

备注：

复旦学院（本科生院）制

探究细胞密度对盘基网柄菌随机行走的影响

完成人

陈子扬

指导老师

陈唯 教授

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、 前言	1
1.1 研究背景	2
二、 材料与方法	3
2.1 材料	3
2.1.1 实验仪器	3
2.1.2 主要试剂及配方	3
2.2 研究方法	5
2.2.1 克雷伯氏菌的培养	5
2.2.2 盘基网柄菌细胞的接种	5
2.2.3 发育细胞的收集	5
2.2.4 盘基网柄菌孢子的冷冻保存	6
2.2.5 盘基网柄菌样品的制作	6
2.2.6 数据处理方法	7
三、 研究结果	9
3.1 模型及参数的确立	9
3.1.1 基本假设和所用模型	9
3.1.2 细胞轨迹的选取以及参数的选择	13

3.2 细胞密度的影响	24
3.2.1 细胞密度对于 α , β , γ 的影响不同	23
3.2.2 时间分辨率对于 α , β , γ 的影响不同	25
四、 讨论	28
五、 参考文献	29
六、 致谢	32

摘 要

细胞不仅可以自发随机运动，还可以显示对环境信号的反应。由于可以将前者视为实现后者的基础，并在各种细胞功能中发挥重要作用，因此定量研究在不同生理条件下与细胞生理功能相关的自发运动非常重要。为此，论文运用细胞跟踪系统量化了不同密度下盘基网柄菌单细胞在社会循环时期的一系列随机迁移，并成功地将广义 Langevin 模型应用于实验数据，将运动分为确定性部分和随机性部分，推导了速度分布函数的解析表达式。使用该模型，论文讨论了自发细胞运动与细胞密度的关系，两种贡献显示出对密度的不同反应，随机因素取决于密度，确定性因素则不然。

关键词：盘基网柄菌，随机运动，Langevin 模型

Abstract

Not only can the cells spontaneously move randomly, but they can also show responses to environmental signals. Since the former can be regarded as the basis for the latter and plays an important role in various cell functions, it is important to quantitatively study spontaneous movements related to cell physiological functions under different physiological conditions. To this end, the paper uses a cell tracking system to quantify a series of random migration of *Dictyostelium discoideum* single cells at different cell densities in the social cycle, and successfully applies the generalized Langevin model to experimental data, dividing motion into deterministic parts and the random part, the analytical expression of the velocity distribution function is derived. Using this model, the paper discusses the relationship between spontaneous cell movement and cell density. The two contributions show different responses to density. Random factors depend on density, while the deterministic factor does not.

Key words: *Dictyostelium discoideum*, random walk, Langevin model

一、前言

1.1 研究背景

集体细胞迁移在多细胞生物中无处不在，并导致许多生物现象，包括形态发生，伤口愈合和癌症侵袭。它是由细胞之间综合物理和化学线索造成的，例如细胞间粘附和扩散因子介导的信号传导，这些线索被整合并并行作用¹。

Dictyostelium 在真核细胞运动和趋化运动的研究中被作为模式生物。在缺乏营养条件下，*Dictyostelium* 会进入一个 social 周期，其中包括由趋化运动所导致的聚集，细胞分化，最终形成多细胞聚集体²，如下图所示，这种单倍体社交变形虫在生命的大部分时间内都经历了 vegetative 循环，以土壤中的细菌为食，并周期性分裂。当食物短缺时，sexual 周期或 social 周期就会开始。在社会周期中，成千上万单细胞在 cAMP³ 的影响下聚集，形成能动的 slug⁴，并朝着光移动。最终，slug 形成子实体，其中约有 20% 的细胞死亡，从而将剩余的细胞提升到更好的孢子形成和散布位置。在有性循环下，变形虫聚集依靠 cAMP 和性信息素，两个交配类型相反的细胞融合，然后开始消耗其他被吸引的细胞。在被消耗之前，一些猎物细胞会在整个群体中形成纤维素壁。同类相食后，巨大的二倍体细胞会变成一个大囊肿，最终会发生重组和减数分裂，并孵化出数百种重组体。

在聚集期间，饥饿的细胞通常向聚集中心移动，以形成一个多细胞聚集体。通过 cAMP 梯度的自组织和对细胞外 cAMP 的趋化性来实现这种协调的迁移。当 *Dictyostelium* 感觉到细胞外 cAMP 信号时，cAMP 受体通过 G 蛋白激活 PI3-激酶，从而在细胞前质膜上瞬时产生磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (PIP3)，导致腺苷酸的胞质调节剂瞬时定位环化酶 (CRAC) 通过与 PIP3 结合的 Pleckstin 同源 (PH) 域结合到膜上，从而激活腺苷酸环化酶⁵。*Dictyostelium* 细胞具有腺苷酸环化酶的三种亚型 (ACA, ACB 和 ACG)，但只有 ACA 被外部 cAMP 信号激活⁶。cAMP 由 ACA 响应外部 cAMP 信号合成，并分泌以诱导邻近细胞类似地产生 cAMP。同时，响应外部 cAMP，PIP3 在细胞前沿的短暂积累也诱导肌动蛋白聚合和假足形成⁷，导致趋化迁移。这些反应最终导致 cAMP 信号作为称为 cAMP

relay 的行波传播，导致趋化向聚集中心迁移。也就是说，多个细胞的相关迁移是由单个可扩散化学因子细胞外 cAMP 介导的⁸。

对于原核生物运动的探讨已经有了很多深入的研究⁹，但是对于真核细胞迁移的了解却很少。通常情况下，真核细胞的运动是通过 Ornstein-Uhlenbeck Process 所模拟¹⁰。通常认为，真核细胞足够大，可以通过计数受体的占有率来检测然后向信号移动。这是可行的，因为相对较大的真核细胞不会受到布朗运动的影响，因此可以使用空间微分来检测相关时间范围内信号的方向。如何实现这种空间区分是成纤维细胞、嗜中性粒细胞和盘基网柄菌的研究活跃领域，其中趋化反应系统的主要成分是众所周知的。但是这些细胞在没有趋化性（或其他）信号的情况下的行为也具有重要的研究价值。例如，我们可能会想象，在这种情况下细胞会随机移动，或者它们已经进化出一种策略，可以某种方式优化其找到信号源的机会，即使它们无法感知时也是如此。最近的理论研究表明，对于可重现的目标，即一段时间后重新聚集在同一位置的目标，使用 Lévy 行走是最佳的^{11,12}。

对于单细胞时期 Dictyostelium 的研究都是集中在 social 周期当中的。有研究发现这一过程中的细胞运动可以被分成与不同生理过程相关的确定性和随机的两个部分，从而证明了使用 Langevin 方程对这一过程进行分析的合理性¹³。因此一种研究方法是通过一种统计分析方法来提取实验数据中的确定性和随机成分，并将其用于研究细胞运动。在布朗运动的经典图中，这两个部分在数学上分别对应于微球体在粘性液体中经历的有效粘性耗散和波动。而对于细胞而言，这些波动特性与细胞内过程和细胞间信号传导中的细胞决策有关，分析将运动的确定性部分和随机性部分分开。确定性部分类似于经典的布朗运动。因此，与“主动布朗运动”相反，细胞的传播是由动力学的波动部分引起的。但是请注意，噪声的贡献不是像经典的布朗问题那样由热波动引起的，它们是由细胞自身产生的，因此从生物学意义上讲，运动确实是主动的。因此细胞运动的物理学研究提供了一种“自上而下”的研究方式。

二、材料与方法

2.1 材料

我们采用 *Dictyostelium* KAx-3 作为研究所用的菌种,相比于野生型(如 NC4)的 *Dictyostelium* 该品系具有可以在无细菌作为营养的环境下生存的能力。使用 *Klebsiella* 作为营养来源,使用 SM 固体培养基进行培养。当 KAx-3 处于指数期时,将其收集并通过差速离心的方法将其与 *Klebsiella* 进行分离,分离后的 KAx-3 将置于 4°C 的环境内饥饿 2 小时,目的是为了使细胞进入 social cycle。随后细胞再被充分打散后将会被置于成分一致的 SM 固体培养基中,并在外界条件相对恒定的状态下通过显微镜和单反相机来记录其运动轨迹。

2.1.1 实验仪器

实验仪器包括:高压灭菌锅,恒温培养箱,冰箱(4°C),移液枪(量程分别为:10μL、50μL、200μL 和 1000μL),移液管,烧杯,细胞刮刀,量筒,PH 计,磁力搅拌器,血球计数板,平头小铲,日立 RPR 20-2 型离心机,10mL 聚丙烯离心管,摇床, Cannon100-D 单反相机,显微镜(4x 物镜,10x 目镜)

2.1.2 主要试剂及配方

2.1.2.1 HL5 溶液

表 1 HL5 溶液

组成	HL5 溶液 (500ml)
Tryptone	5g
葡萄糖	5g
Yeast Extract	5g
NaHPO ₄	0.47g
KH ₂ PO ₄	0.24g

将上述物质在 500ml 蒸馏水中稀释后调节 pH 值为 6.4-6.6,高压蒸汽灭菌,待冷却后加入 0.015g Dihydrostreptomycin (双氢链霉素),4°C 冰箱保存。

2.1.2.2 PB 缓冲液以及母液

表 2 PB 缓冲液以及母液

组成	PB 母液（400mL）	PB 工作液（600mL）
0.2M NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	147mL	-
0.2M Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	53mL	-
PB 母液	-	10mL
配置完成后调节 pH 6.4-6.6，高压蒸汽灭菌，放入 4℃ 冰箱保存。		

2.1.2.3 PDF 溶液的配制

表 3 PDF 溶液

组成	PDF 溶液（1L）
KCl	1.5g
MgCl ₂	0.5g
K ₂ HPO ₄	1.6g
KH ₂ PO ₄	1.6g
将上述物质在 1 L 蒸馏水中稀释后调节 pH 值为 6.4-6.6，高压蒸汽灭菌，待冷却后加入 0.5g 硫酸链霉素，放入 4℃ 冰箱保存。	

2.1.2.4 SM 液体培养基和固体培养基的配置

表 4 SM 液体培养基和固体培养基

组成	SM 液体培养基（1L）	SM 固体培养基（1L）
葡萄糖	10g	10g
Tryptone	10g	10g
KH ₂ PO ₄	1.9g	1.9g
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	0.78g	0.78g
MgSO ₄	1g	1g
Yeast Extract	1g	1g
琼脂粉	-	20g
将上述物质稀释于蒸馏水 1L，调 pH 值为 6.0—6.4。每 25ml 分装至 100ml 锥形瓶内，高压蒸汽灭菌后放入 4℃ 冰箱保存或倒入培养皿内。		

2.2 方法

2.2.1 克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 的培养

- 1) 超净工作台紫外灭菌 15min;
- 2) 在无菌环境下, 挑取 SM 平板上划线培养的 *Klebsiella* 菌单菌落, 注射到 25mLSM 液体培养基中;
- 3) 放置在 24°C 恒温培养摇床中, 以 120 rpm 的转速培养;
- 4) 9-12h 后, 液体培养基中出现均匀混浊, 把它从摇床上取下, 置于 4°C 冰箱中备用;
- 5) SM 液体培养基中的 *Klebsiella* 菌可在 3-5 天内使用, 每隔 3-5 天需要从液体培养基中吸适量体积移入新的 SM 液体培养基 (25mL) 中, 重新培养。

2.2.2 盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 细胞的接种

- 1) 在 SM 固体培养基中加入约 200 μ L *Klebsiella* 菌液, 按照野生型细胞 20 个孢子/板左右的接种量进行接种;
- 2) 用灭菌的三角玻璃推棒将所接种细胞均匀推开使其铺满整个培养皿中, 接种好的平板置于 24°C 恒温培养箱内培养。

2.2.3 发育细胞的收集

接种的细胞生长至 36-48h 到达对数期, 收集对数期细胞。

- 1) 用细胞刮刀将对数期细胞刮下来, 避免刮下培养基, 悬浮在含有 5mL PB 工作液的 10mL 离心管中;
- 2) 将细胞打散吹匀, 1000rpm 离心 10 分钟, 弃去上清液;
- 3) 在沉淀的细胞团中再加 10mLPB 溶液, 打散吹匀, 1000 rpm 离心, 弃去上清液, 如此重复 2-4 次, 至上清液无色为止 (细胞中 *Klebsiella* 菌基本清除干净);
- 4) 在沉淀的细胞团中再加 10mL PDF 溶液, 吹散, 1000 rpm 离心 1 次, 弃上清液;
- 5) 而后将离心最终得到的细胞团重悬在 3mL PDF 缓冲液中, 打散吹匀后, 使用血球计数板配合单反-显微镜系统和 ImagePro 软件计数。

2.2.4 盘基网柄菌孢子的冷冻保存

- 1) 把超净工作台用紫外灭菌 15min, 使用 70%酒精擦拭桌面, ;
- 2) 把准备收集的长有盘基网柄菌孢子的培养皿在用 70%酒精擦拭后拿入工作台;
- 3) 点燃酒精灯, 把接种环用酒精灯烘烤杀菌, 后放在玻璃架上;
- 4) 拿出一个 1mL 无菌冻存管放在玻璃架上待用;
- 5) 在确定接种环温度合适后, 用平头小铲轻轻将固体培养基上的孢子层全部刮下, 然后小心将平头小铲的头部插入离心管中, 后将离心管放在玻璃架上;
- 6) 用 1000ul 的移液枪吸取 500ul 的 HL5 溶液, 后将沉淀的孢子团打散, 而后加入约 500ul 50%甘油, 打匀;
- 7) 做好标记后放入冰箱 4℃冷藏室中 1h, 1h 后将离心管从冷藏室拿出, 放入液氮保存罐中, 保存待用。

2.2.5 盘基网柄菌样品的制作

- 1) 按前文所述的方法收集盘基网柄菌发育细胞, 收集对数期细胞放入冰箱饥饿处理 (2 小时);
- 2) 制作观察用琼脂胶, 使用 2g/100ml 的琼脂密度, 使用 1%的盐酸调整 PH 值至 6.2-6.4, 高压灭菌 20 分钟, 趁热分装于观察用 35mm 培养皿内, 每培养皿 3mL, 培养皿处于水平位置, 保持小培养皿盖子盖上, 防止工作台的空气流动导致琼脂胶面不平整;
- 3) 将稀释完的菌液注入观察用培养皿前, 分别使用 1000uL, 200uL, 100uL, 10uL 的 4 支移液枪反复吸取液体进行彻底打散, 每支移液枪需打散 200 下;
- 4) 使用细胞计数板进行初步细胞计数。实验中, 采用相机采集的 10 倍物镜下图片, 使用 Imgpro 软件选取固定大小的图片区域直接计数, 细胞计数板高度为 0.1mm, 可计算出原细胞液的体密度。再根据使用的观察用培养皿的面积, 换算成所需面密度所需要的菌液, 注入观察用培养皿的菌液体积为 100uL, 体密度= 培养皿面积 *面密度/100uL), 将原菌液稀释至所需体密度 ρ 后, 取 100uL 加入培养皿中, 通过倾斜培养皿使得液面均匀覆盖各处;

5) 每份稀释菌液彻底打散后, 立即进行该密度样品的制作, 可按实际情况决定样品的具体密度和样品数量。

6) 培养皿敞口晾干细胞样品, 倒置加入少量 PDF 溶液保持培养皿内湿度, 使用封口膜封住边缘后待用。

7) 将所有样品置于显微镜系统下, 检查样品质量, 选取合适的样品, 使用单反相机预览功能调整系统, 选择最好的拍摄条件和拍摄目标。控制多个 (3~4 台) 相机, 同时对样品拍照, 拍照间隔取为 10s 一张, 拍摄过程中应当保持环境光强和温度湿度相对恒定。照片通过自己编写的程序进行命名并进行初步压缩和粗化, 存入电脑硬盘待用。

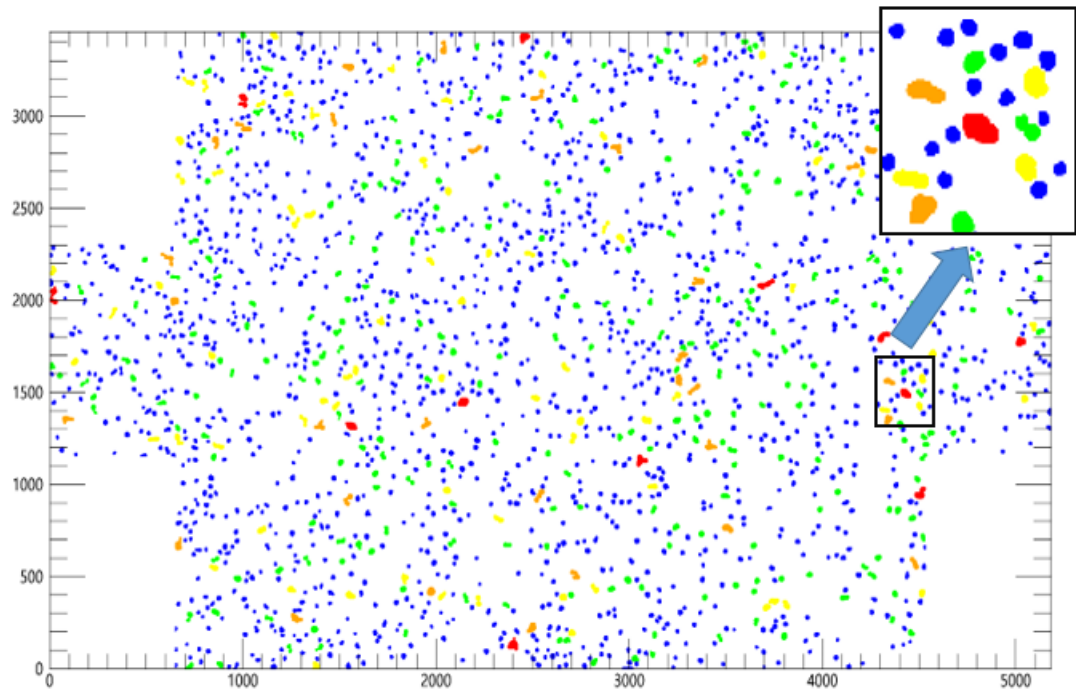
8) 整个拍摄过程持续到细胞聚集或者细胞停止运动。

2.2.6 数据处理方法

在获得照片之后, 首先需要对于这些照片进行处理和分析, 从而实现对于不同细胞的追踪, 以获得与运动相关的参数。

细胞相关的数据由本人自编的程序获得, 根据这些数据进一步进行相关的分析。下图中显示了

细胞选取: 识别细胞采用正态分布统计大约 10000 个本次实验的细胞和细胞集团的面积, 其来源为密度最低组 (小于 100 个/mm^2) 的前 1000 帧, 选取所有颗粒物所得。从而获得合理的分布参数, 根据 '3 σ ' 原则来区别细胞、杂志以及细胞集团。下图中显示了某次实验中对于视野中细胞和颗粒的识别, 其中蓝色的颗粒为单细胞, 绿色为单细胞或 2 细胞的聚集, 黄色橙色红色分别为 3、4、5 细胞聚集, 图中删除了四角以排除显微镜视野范围的影响, 横纵坐标的单位为像素。



细胞坐标：采用几何中心坐标，通过计算细胞所占像素坐标的平均值获得。

细胞追踪基本原理：相邻两帧中距离最近，且距离大小合理（根据所有最小距离的正态分布进行判断）的两个细胞认定为同一个细胞。

轨迹数据：根据获得轨迹，选取轨迹长度长于 60 帧（10min）的细胞轨迹进行分析。

细胞线速度：在笛卡尔坐标系下计算时间间隔 Δt 内的位移 Δx ，则 $v = \Delta x / \Delta t$ 。

线速度和加速度分量：在笛卡尔坐标系下，将速度分为 x 轴分量和 y 轴分量。

细胞扩散方向：在笛卡尔坐标系下，计算速度与 x 轴的夹角获得的角度 θ 。

三、研究结果

3.1 模型及参数的确立

3.1.1 基本假设和所用模型

最初的 Langevin 方程描述了布朗运动，这是由于与流体分子发生碰撞而使流体中的粒子出现随机运动，

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = \lambda\mathbf{v} + L(t) \quad (1)$$

这里的关注自由度是粒子的速度 $\mathbf{v}$ 。作用在粒子上的力分为与粒子速度成比例的粘性力和“Langevin 力” $L(t)$ （代表与流体分子碰撞的影响）的总和。

其随机微分方程的形式为： $d\mathbf{v} = \lambda\mathbf{v}dt + Dd\mathbf{W}(t)$ ，这里 $\mathbf{W}(t)$ 代表了维纳过程。维纳过程是零均值高斯随机过程，其特点之一为维纳过程的增量是高斯随机变量，并且对于非重叠间隔是独立的。如果间隔的长度相同（均匀增量），则它们的分布是一致的，即 $\mathbf{W}(t + \delta t) - \mathbf{W}(t) \sim N(0, \delta t)$ ，也就是所谓的“白噪声”。

Langevin 方程的解是一个马尔可夫过程，它的给定时间 t 之后的变化不依赖于 t 之前的变化（简而言之：该状态在任何未来时间点的可能性仅取决于其当前状态，而不取决于任何过去状态。）。上式的 Langevin 方程所描述的过程被称为 Ornstein–Uhlenbeck 过程，这是因为一个同时是平稳随机过程，高斯过程和马尔可夫过程的过程，必然是一个 Ornstein–Uhlenbeck 过程。而作为 Markov 过程，Ornstein–Uhlenbeck 过程可以方便地通过其转移概率密度来表征，这是相应 Fokker–Planck 方程的基本解。

对于单细胞时期 Dictyostelium 的研究都是集中在 social 周期当中的。有研究发现这一过程中的细胞运动可以被分成与不同生理过程相关的确定性和随机的两个部分，从而证明了使用 Langevin 方程对这一过程进行分析的合理性¹³。因此一种研究方法是通过一种统计分析方法来提取实验数据中的确定性和随机成分，并将其用于研究细胞运动。在布朗运动的经典图中，这两个部分在数学上分别对应于微球体在粘性液体中经历的有效粘性耗散和波动。而对于细胞而言，这些波动特性与细胞内过程和细胞间信号传导中的细胞决策有关，分析将运动的确

定性部分和随机性部分分开。确定性部分类似于经典的布朗运动。因此，与“主动布朗运动”相反，细胞的传播是由动力学的波动部分引起的。但是请注意，噪声的贡献不是像经典的布朗问题那样由热波动引起的，它们是由细胞自身产生的，因此从生物学意义上讲，运动确实是主动的。

因此，我们可以使用这样一个方程来描述 *Dictyostlium* 细胞中心的速度^{13,14}：

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = \mathbf{H}(\mathbf{v}) + R(\mathbf{v})\Gamma(t) \quad (2)$$

其中， $\mathbf{H}(\mathbf{v})$ 代表运动的确定性部分，而 $R(\mathbf{v})\Gamma(t)$ 代表运动的随机性部分。而 $\Gamma(t)$ 是归一化后的白噪音。对于该式认为，实验数据在时间平移下必须是不变的。通过比较每 2000 帧为一组的速度直方图并选择合适的时间区段（图 6，见后文），我们已经确认了这个属性。此外，通过比较加速度的 x 和 y 分量的方差，我们证明了等式的旋转不变性（图 1），通过计算大量细胞随时间的传播角直方图，已验证了旋转对称性（图 2）。因此可以把公式可以简化为

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = H(v)\frac{\mathbf{v}}{v} + R(v)\Gamma(t) \quad (3)$$

在此式中，噪声幅度取决于速度 $v = |\mathbf{v}|$ ，因此两个速度分量都耦合在一起。 $H(v)$ 和 $R(v)$ 均可通过条件平均从实验数据中确定¹⁵，也就是说：对于一个固定的速度 v_0 ，加速度的确定性部分是稳定的，而随机性部分的平均值趋近于 0¹⁶。因此， $H(v)$ 可以通过对于固定速度进行平均来获得¹⁷，即：

$$H(v_0) \approx \left\langle \frac{\mathbf{v}(t + \Delta t) - \mathbf{v}(t)}{\Delta t} \cdot \frac{\mathbf{v}(t)}{|\mathbf{v}(t)|} \right\rangle \Big|_{|\mathbf{v}(t)| \approx v_0} \quad (4)$$

由于只能使用有限数量的数据点，因此必须将速度划分为较小的间隔。下标 $|\mathbf{v}(t)| \approx v_0$ 反映了这一点。

而随机性部分可由 Langevin 方程导出的 Fokker-Plank 方程的 Kramers–Moyal 系数 $D^{(2)}$ 等价获得¹⁸，即：

$$R^2(v_0) \approx \left\langle \frac{(v_i(t + \Delta t) - v_i(t))^2}{2\Delta t} \right\rangle \Big|_{|v(t)| \approx v_0} \quad (5)$$

其中 i 为 x 或 y 。

最后，我们假设细胞迁移可以被描述为速度空间中的马尔可夫过程。在图中 3，示出了速度自相关系数，我们发现，对于 $t = 0$ 和 40 帧之间的时间间隔，速度自相关系数衰减呈指数关系。对于 $t > 2$ 帧，相关性已下降到噪声水平。

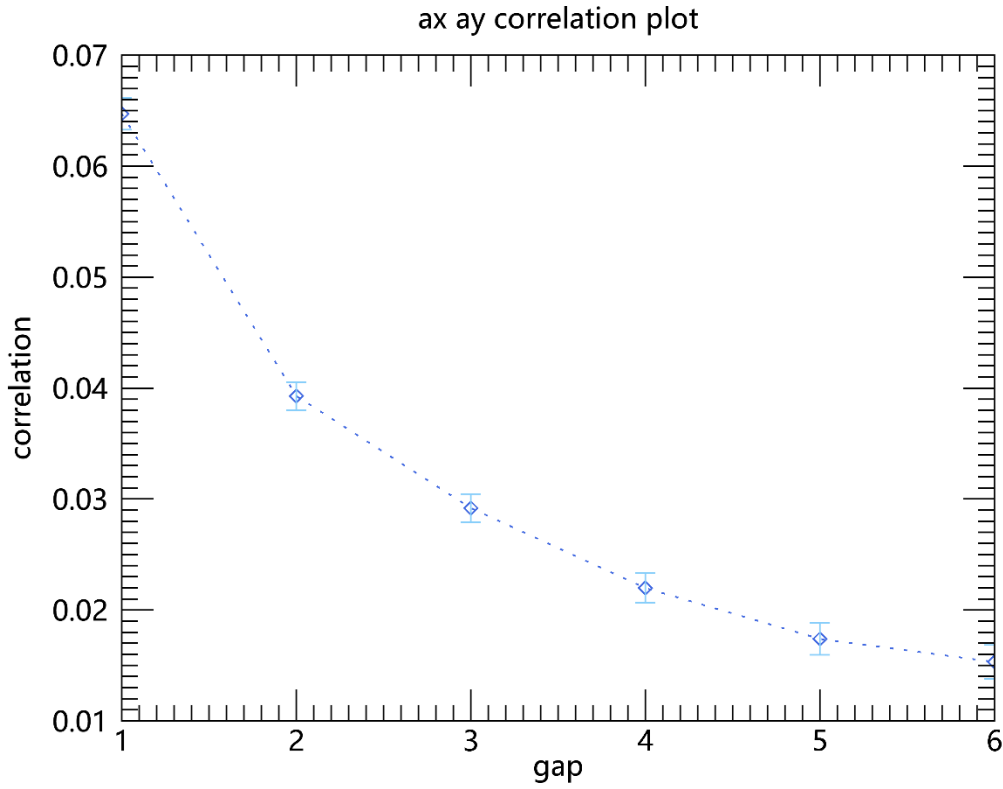


图 1. 加速度分量的相关性随采样时间的变化图

细胞加速度在 x , y 轴分量的相关性随 **gap** 的增大而指数衰减。**gap** 的定义为计算速度大小所采用的时间间隔，单位为“帧”，**errorbar** 代表标准误差 SEM

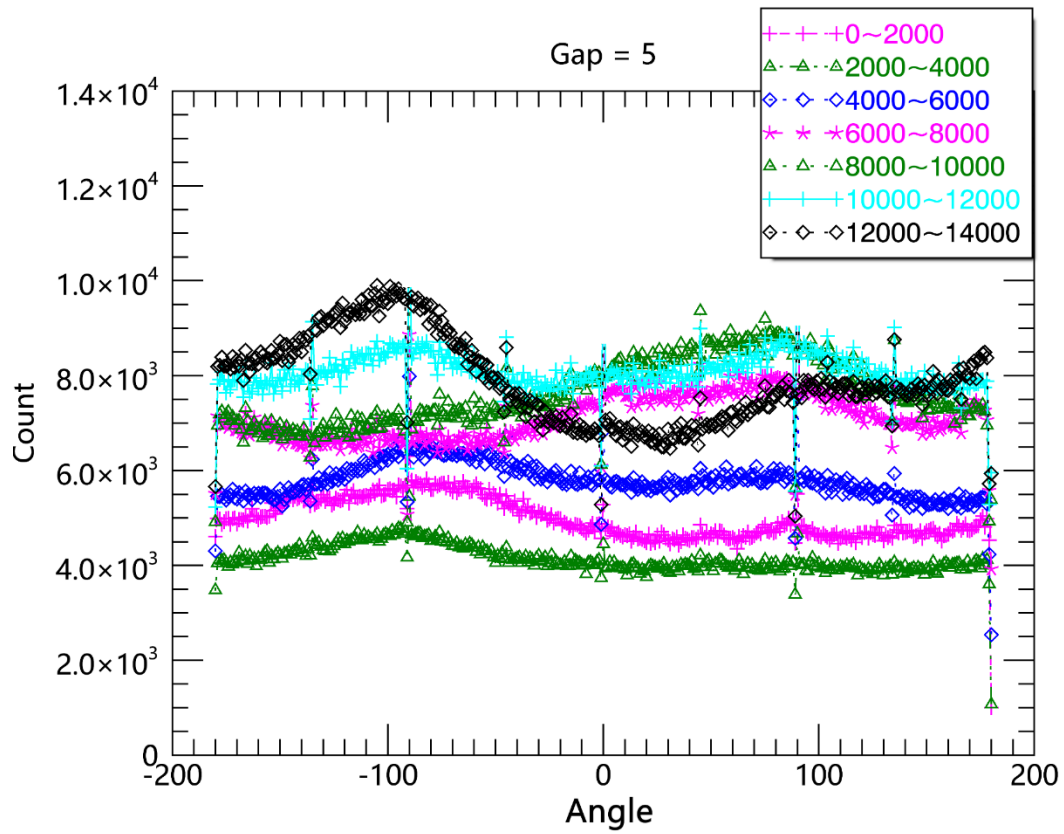


图 2 细胞随时间的传播角直方图

图中以 2000 帧为一组刻画了细胞传播角直方图随时间的变化，可以看出随着时间发展，细胞在各个方向的传播分布并无明显的变化和差异，在传播方向上具有旋转对称性，因此符合进行速度分量分析的条件

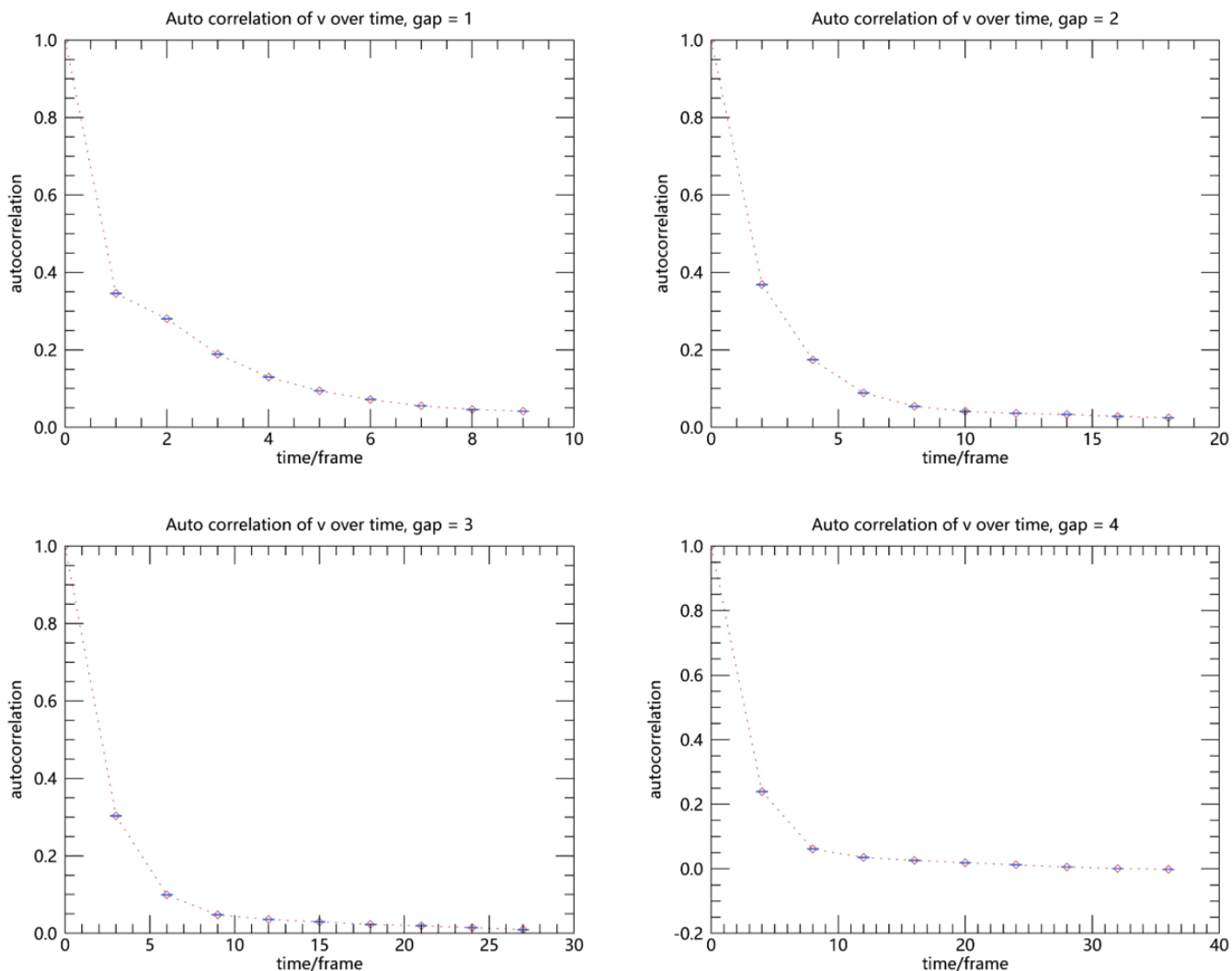


图 3. 不同 gap 的速度的自相关性

图中显示了不同 gap 的速度随时间的自相关系数的大小（errorbar 代表标准误差 SEM），从图中可以看出自相关系数随间隔时间增加呈指数形式衰减，符合 OU-Process 的特性，而 gap 值越大则衰减越迅速

3.1.2 细胞轨迹的选取以及参数的选择

以某次实验的实验结果为例，获得细胞轨迹后进行分析，细胞轨迹图如图 1 所示，其中不同颜色的轨迹代表不同的细胞，1 帧的长度为 10s，该图可以说明细胞的运动基本是随机运动，符合分析前提。

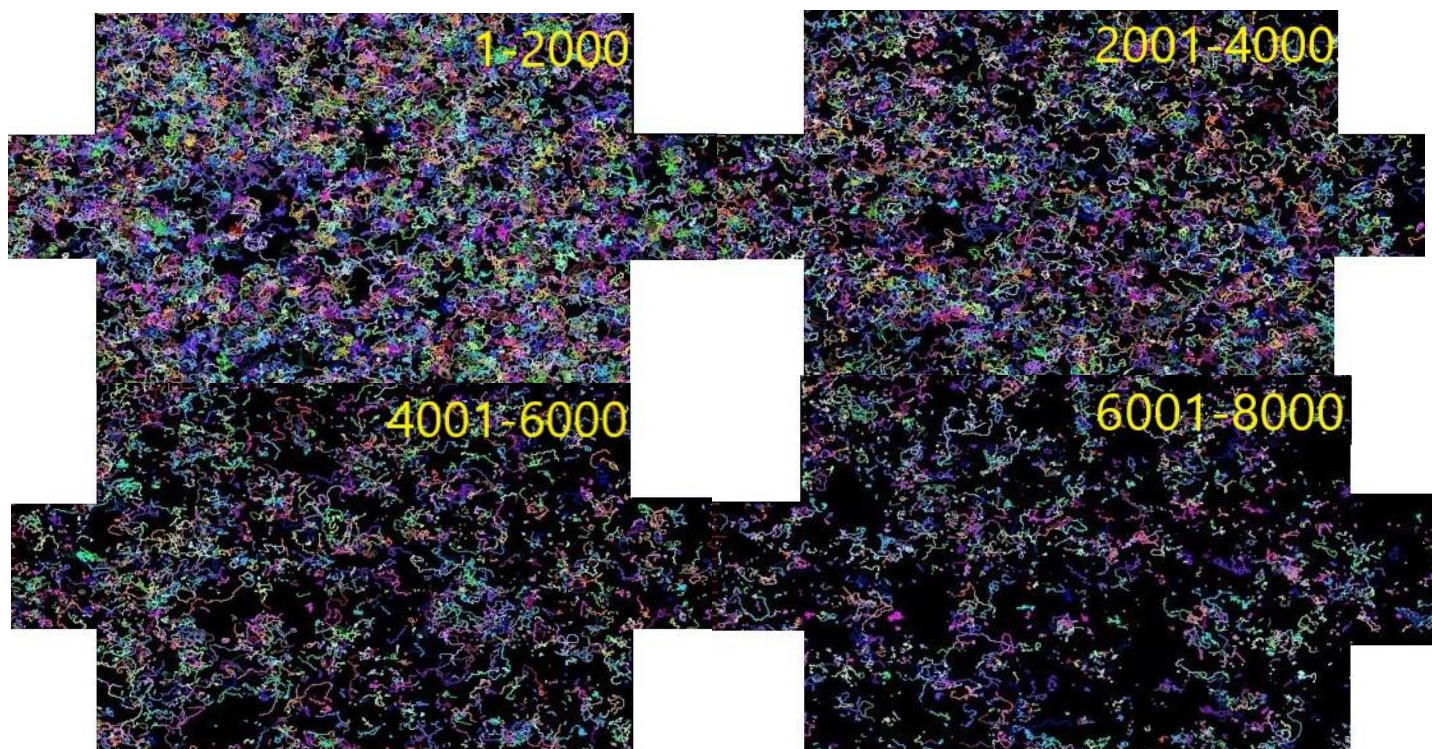


图 4.细胞轨迹概览图

以 2000 帧为一组刻画细胞轨迹图，图中不同颜色仅代表不同细胞，并无其他意义。细胞轨迹没有规律，可以认为是其运动为一个布朗运动，四角被去除以排除显微镜视野带来的干扰。

选取合适的细胞轨迹进行分析，如图 5 所示，细胞的轨迹当中存在平均速度随时间变化较大的区段，分段作图（图 6）和逐帧细胞事件的统计图（图 4）也证明了这一点。

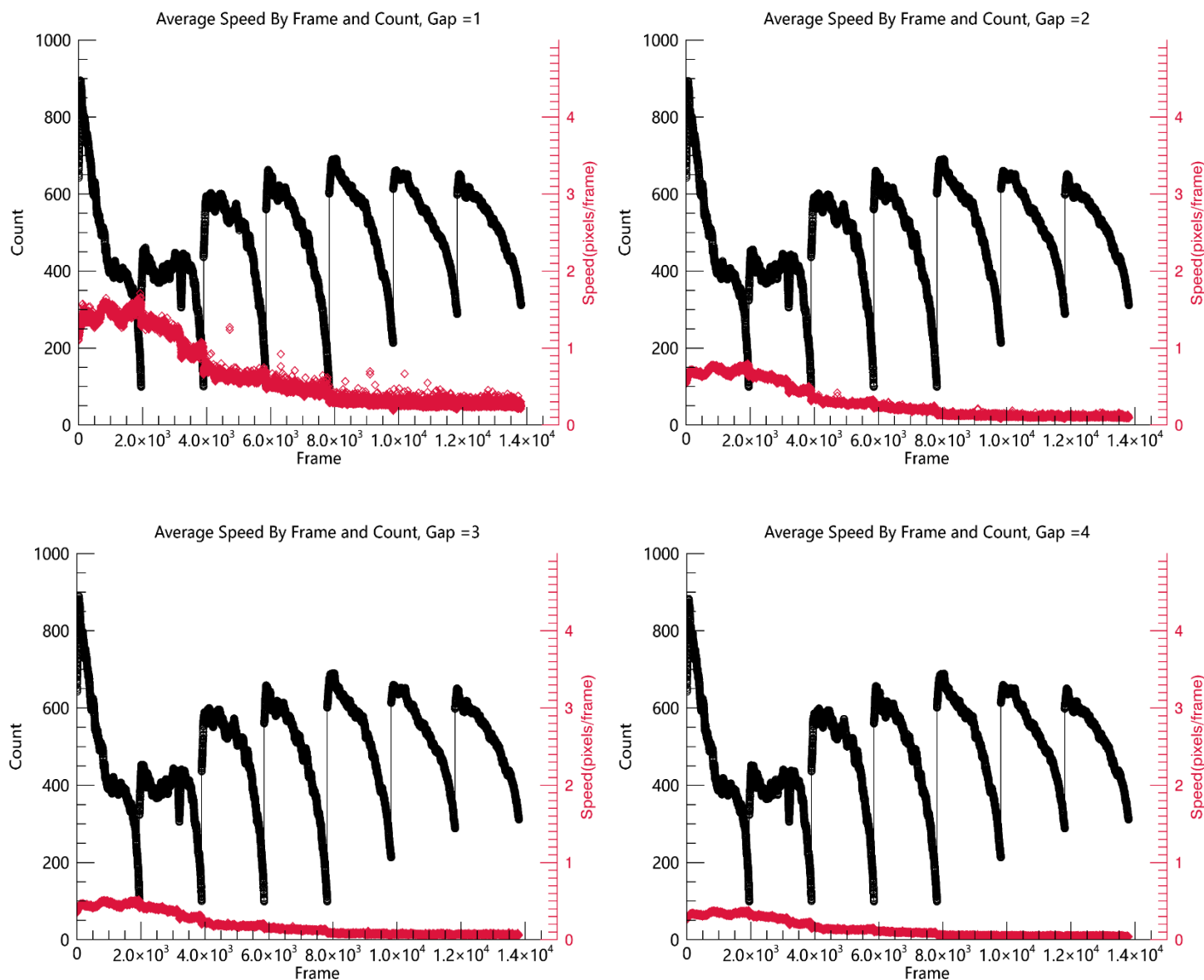


图 5.每帧平均速度及统计总量变化图

Gap=1~4 时逐帧平均速度与统计量作图，黑色散点图为每一帧的统计量（参考左侧黑色 y 轴），而红色散点图为当前帧的平均速度（参考右侧红色 y 轴）。图中可以看出起始阶段的平均速度波动较大，和后面有着较大的差异，而后半段平均速度较稳定，呈缓慢下降趋势，符合细胞运动的生理规律，而趋势中出现的“跳跃”，则是由统计量的减少引起的，这种减少是由于程序自身的逻辑所造成的。Gap 的定义为计算速度大小所采用的时间间隔，单位为“帧”。从图中还可以看出，当 gap 大于等于 2 时，平均速度的分布比较集中，且不再随 gap 的增大而明显变化

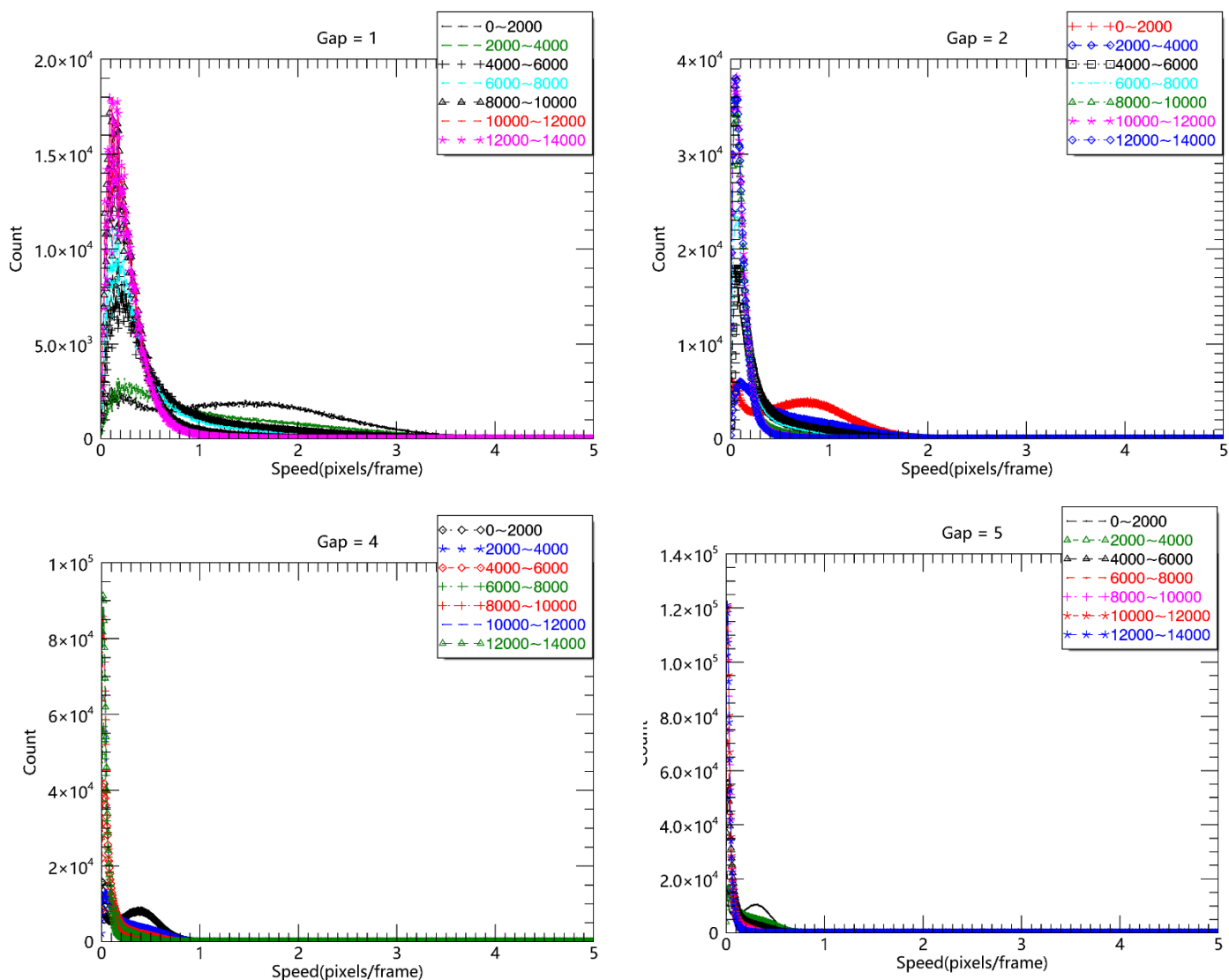


图 6. 细胞速度直方图的分段作图

以 2000 帧为 1 组，对细胞速度直方图进行分段作图。图中可以看出起始阶段的速度分布与后面有着较大的差异，而后半段分布较相似，呈低速细胞占主导趋势，符合细胞运动的生理规律和图 4 的结果。从图中还可以看出，当 gap 大于等于 2 时，速度的分布不再随 gap 的增大而明显变化。

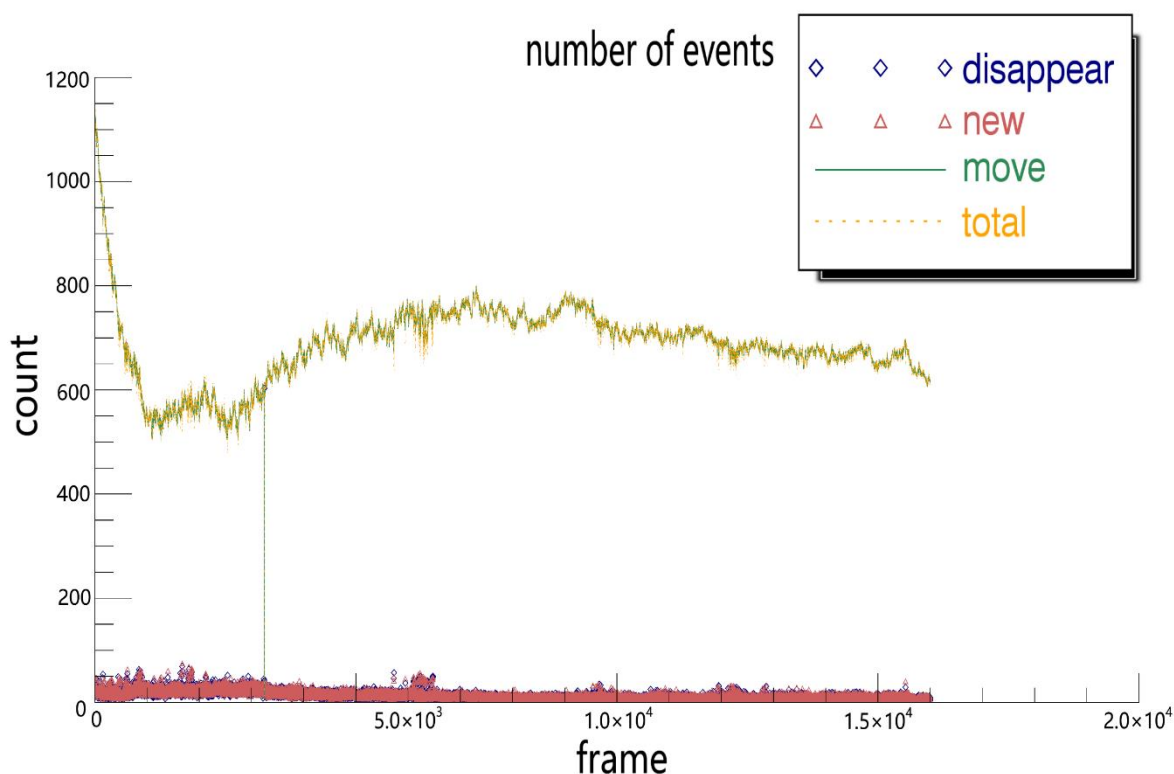


图 7. 逐帧细胞事件统计图

将每帧细胞发生的事件归为[运动，消失，新产生]中的一种，对每一帧进行各种事件的数量统计并做图，其中 **total** 等于 **move+new-disappear**。从图中可以看出，新增和消失细胞数较稳定，随时间变化不大，这是由于这两类细胞事件的发生主要是由于程序自身对于细胞认定的判断失误所造成的，为排除该问题对统计数据有效性的影响，在选取统计数据时只选取了足够长的细胞轨迹纳入统计范围，单个细胞轨迹长度超过 60 帧（10min）。而细胞运动事件的记录同样在开始阶段和后期有着较大的差异，且后期基本稳定。

除此之外，对每一帧发生的细胞事件进行分类和统计的结果（图 7）也发现，在开始阶段细胞统计量迅速递减。综合上述结果，在细胞轨迹的选取中我们去除了前期的不稳定阶段。

根据我们所使用的模型，时间步长 Δt 必须选择得尽可能小，但同时也应满足选择对于数据影响较小，在选择合适的细胞轨迹范围后对不同 gap 值的速度直方图进行观察如图 6 所示，同时根据我们的假设（见前文），也应当满足：1，速度在 x、y 轴方向的加速度之间没有相关性，如图 1 所示，xy 轴方向的加速度之间的相关性很低，特别是在 gap 大于等于 2 之后；2，速度的自相关性呈指数递减，如图 3 所示。

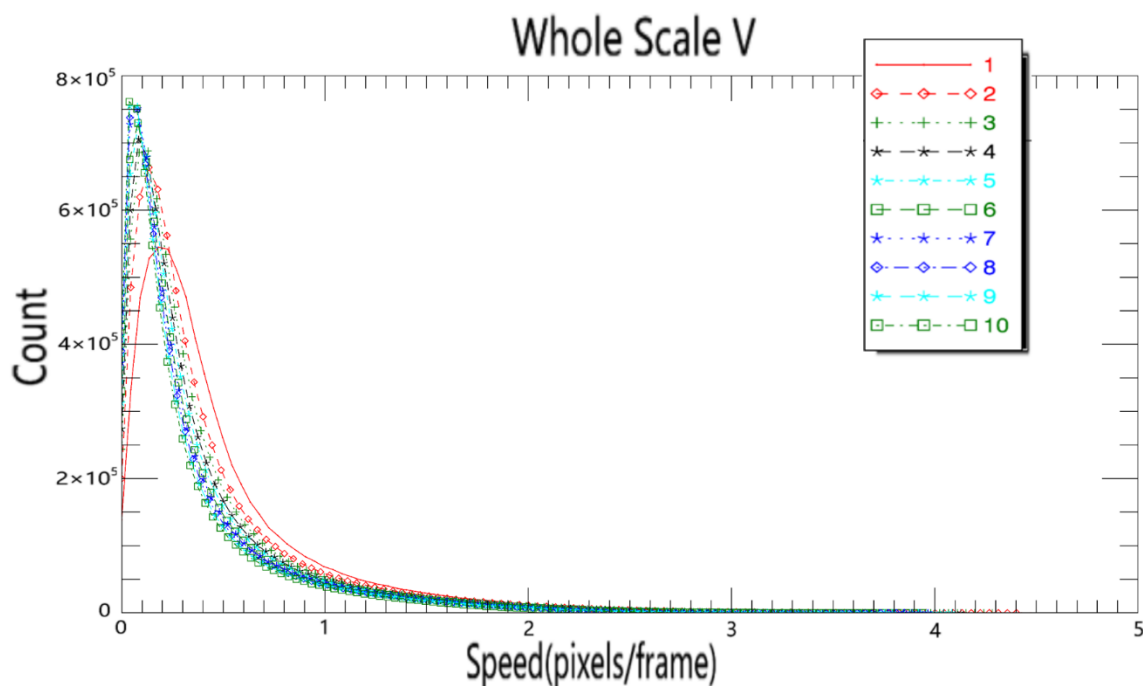


图 8 不同 gap 的全局速度直方图

选取合适的时间段后，对不同 gap 下的所有细胞速度做直方图。从图中可以看出，随着 gap 值的变大，全局细胞速度的分布逐渐减小，但是在 gap 大于等于 2 之后变化较小

对于经典的布朗运动，每个分量 v_x , v_y 的分布都是高斯分布。但是，对速度直方图的拟合（图 9）显示，分布的尾部明显比高斯分布的比重大。

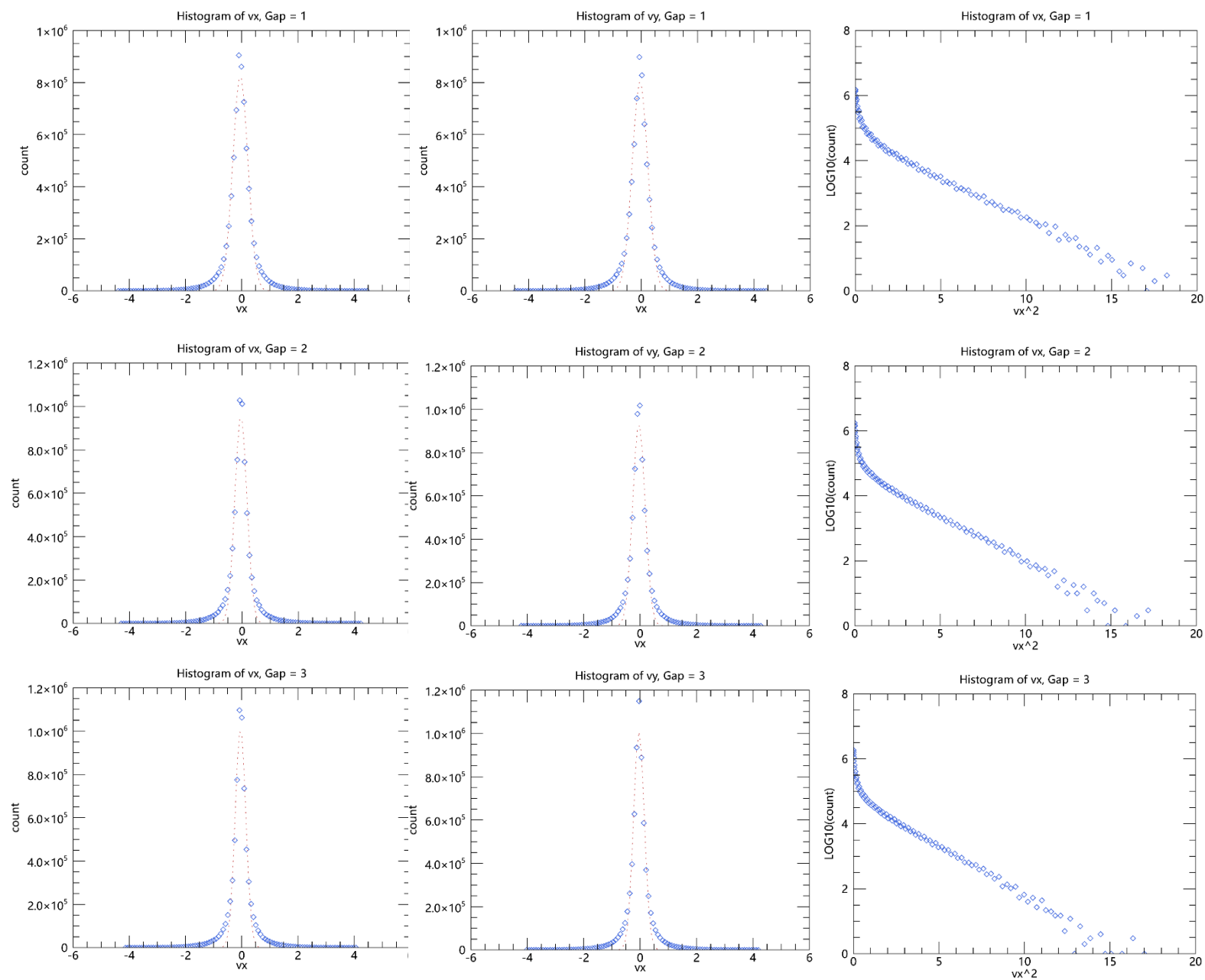


图 9. 速度分量直方图以及 LOG 统计

不同 gap 下速度分量 v_x , v_y 的速度直方图, v_x , v_y 分布基本相同, 且随 gap 值的变化变化不大。但都出现 gauss 分布尾部比重大的现象。同时

以某次实验的数据为例, 通过对实验所获得的 $H(v)$ 和 $R(v)$, 进行拟合 (图 10, 图 11) 可以发现, 当 gap 大于等于 2 时, 实验数据的线性性逐渐提升, 而且对于 $R(v)$, xy 轴方向的拟合结果相近程度提升, 综合前文对于时间步长的要求, 我们选定 3 帧作为最小步长。所有的数据都出现了在尾部质量下降的状

况，这是由于有效数据量迅速衰减所导致的（图 12）。值得注意的是 $H(v)$ 和 $R(v)$ 斜率的正负，符合其分别作为“线性阻滞”和“主动随机运动”的特性。

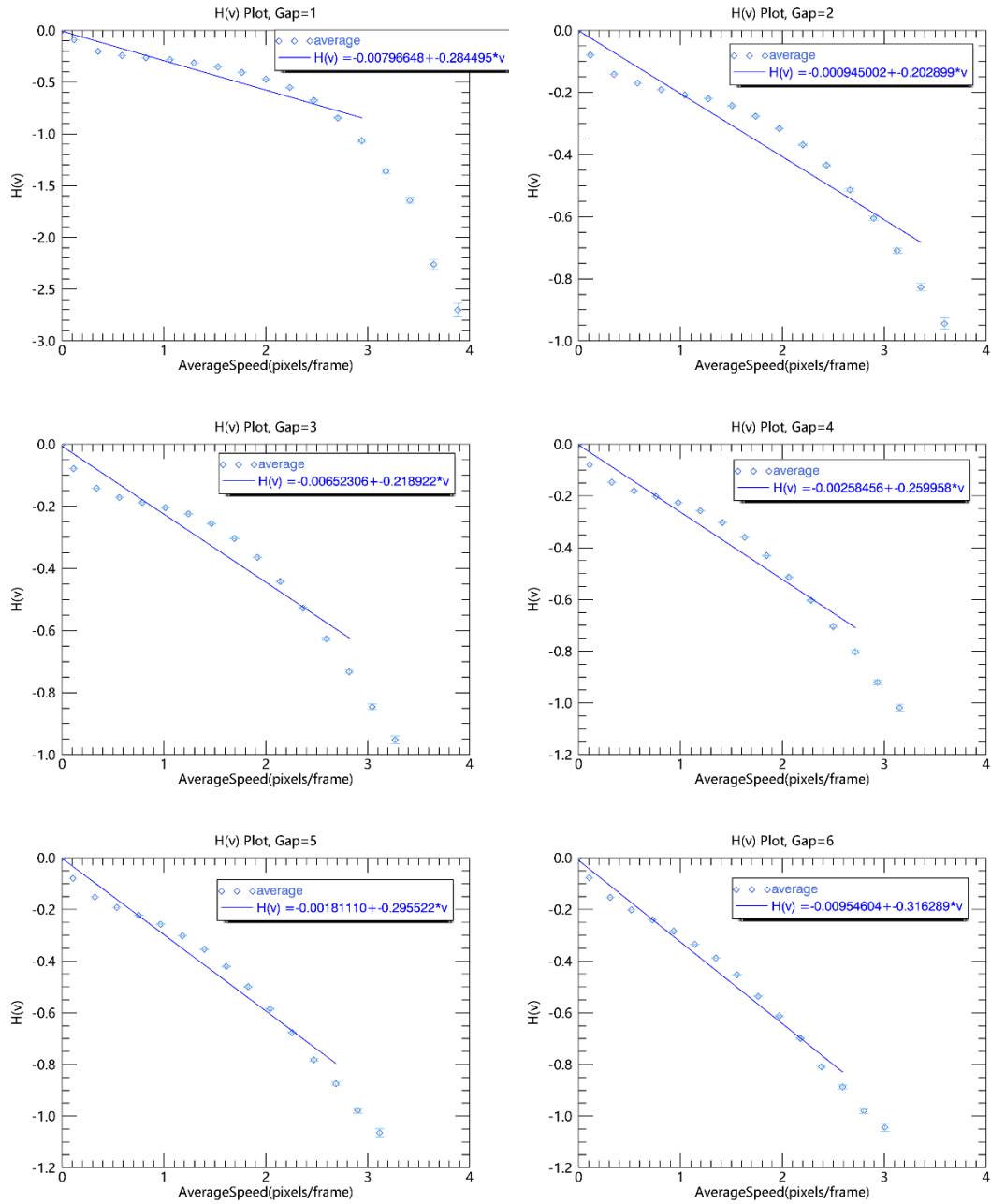


图 10. 不同 gap 的 $H(v)$ 数据以及线性拟合结果

对于不同 gap 所获得 $H(v)$ 作图，并依据上文中提到的线性公式进行拟合，图中可见 gap 大于等于 2 时，数据线性性较好

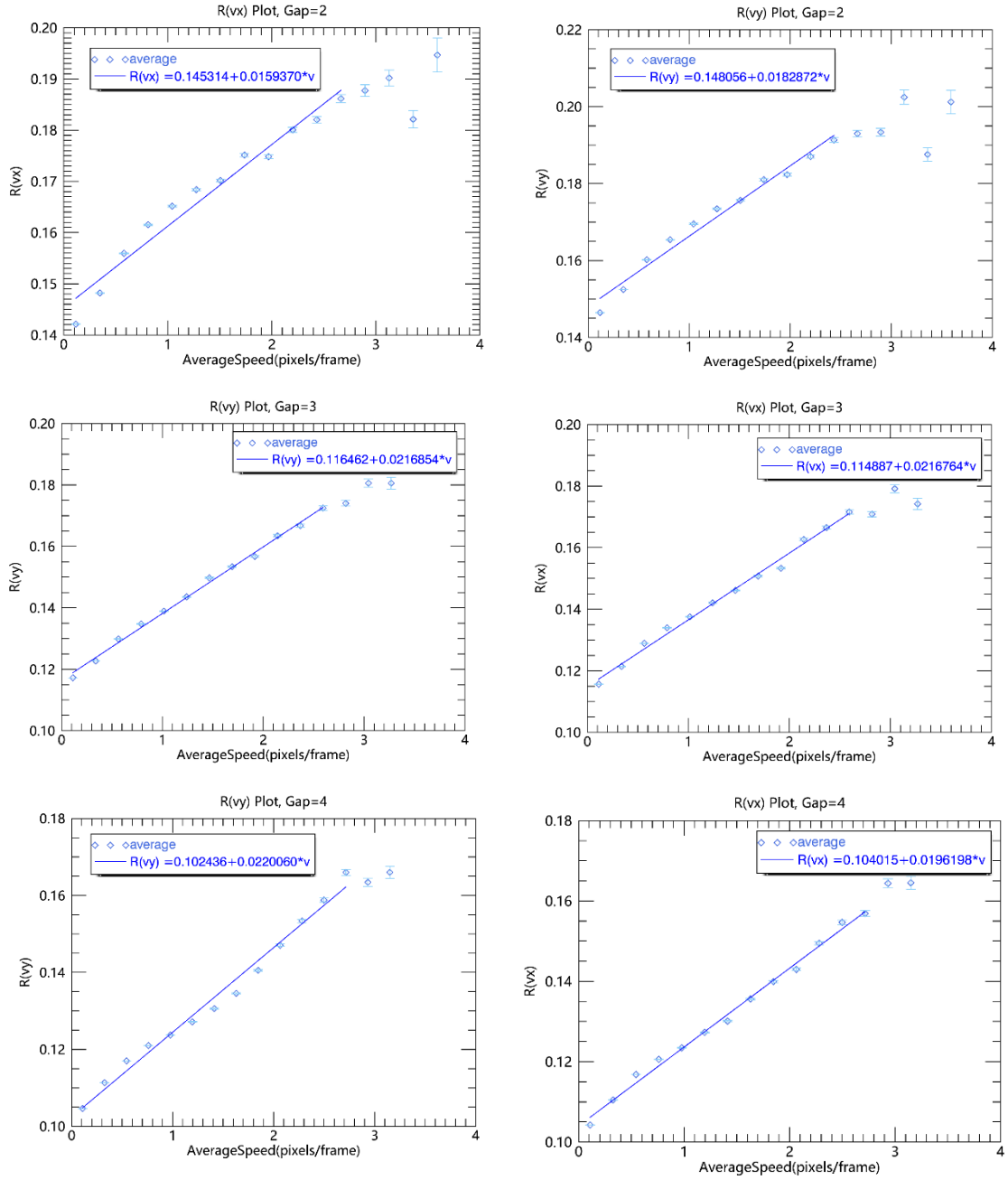


图 11. 不同 gap 的 $R(v)$ 以及线性拟合结果

对于不同 gap 所获得 $R(v)$ 作图，并依据上文中提到的线性公式进行拟合，图中可见 gap 大于等于 2 时，数据线性性较好，且 x, y 分量的拟合结果一致性高

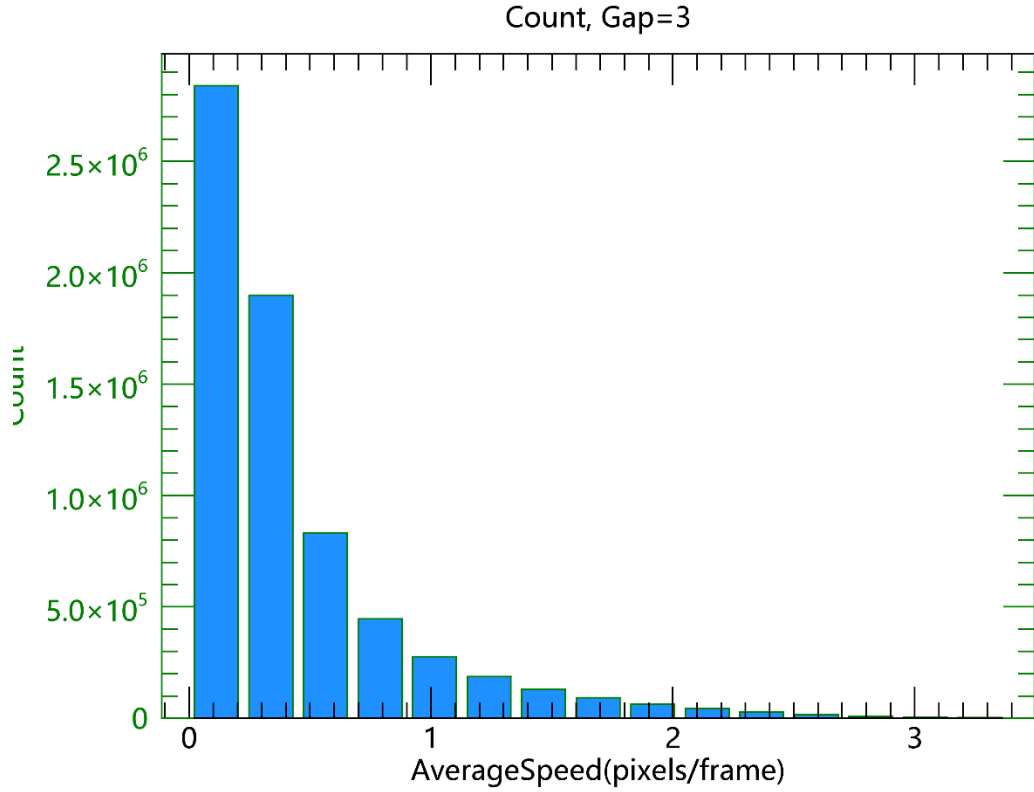


图 12. Gap=3 时 $H(v)$ 和 $R(v)$ 各数据点的统计量直方图

对 gap=3 时 $H(v)$ 和 $R(v)$ 各数据点的统计量做直方图，可以看出高速区段统计量迅速衰减，数据可靠性较低。

3.2 细胞密度的影响

实验探究不同密度对于细胞运动的影响，连同实验确定的 $H(v)$ 和 $R(v)$ ，Langevin 方程在等于或大于我们实验的时间分辨率（30s，原因见上文）的时间尺度上捕获了细胞轨迹的统计特性。在这里，我们从 Langevin 方程解析得出速度 PDF $P(v)$ ，以与通过实验获得的分布进行比较。速度 PDF 由对应的 Fokker-Planck 方程的平稳解¹⁹给出，当近似条件为 $H(v) = -\gamma v$ ， $R(v) = \alpha + \beta v$ 时，平稳解为：

$$P(v) = N \frac{v}{(\alpha + \beta v)^{2+(\gamma/\beta^2)}} e^{-\frac{\gamma \alpha}{\beta^2(\alpha + \beta v)}} \quad (6)$$

其中 N 为归一化常数。

为了将实验直方图与分析预测值进行比较，通过将 $H(v)$ 和 $R(v)$ 的对应表达式拟合到随机数据分析的结果来确定系数 α , β , γ 的值。图 13 显示了所得 PDF 与实验速度直方图的比较

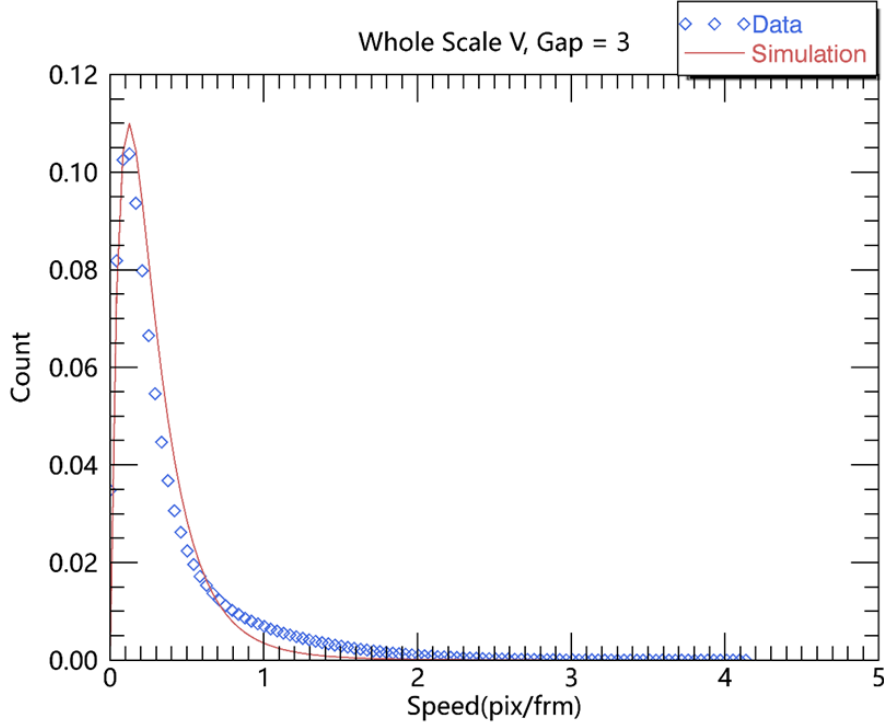


图 13 PDF 与数据比较

图中显示了实验实际数据和模拟的比较，在高速区段，PDF 与实验数据的拟合情况较差，这是由于在拟合 $H(v)$ 时，高速区段并不完全符合我们所使用的线性拟合条件 $H(v) = -\gamma v$ 所造成的

3.2.1 细胞密度对于 α , β , γ 的影响不同

依据前文所提到的模型和方法，我们研究了细胞密度对于随机行走的影响模式。选取适当密度种植的样品结果进行分析，并研究计算所得的系数 α , β , γ 和密度的关系（图 14）。通过研究可以发现 β 与密度的负相关性，然而 α , γ 则对密度并不敏感。 α 和 β 所代表的是运动的随机部分，所代表的是白噪声的振幅，而 γ 代表决定性部分大小。三者与密度的关系意味着细胞运动的随机部分与密度相关而决定性部分对密度不敏感，而密度越大则变化幅度越小。而且值得注意的是 β 的变化在低密度时比较明显，而在高密度是不明显。当 βv 远小于 α 时， $P(v) =$

$N_1 e^{\frac{-\gamma v^2}{2\alpha^2}}$ (7) 成为一个高斯分布, 当密度越大时, β 变小, 而 α 不变, 逐渐逼近这个条件, (7) 式中无 β 的特点也反映了当密度越高时 β 的变化越小的特点。

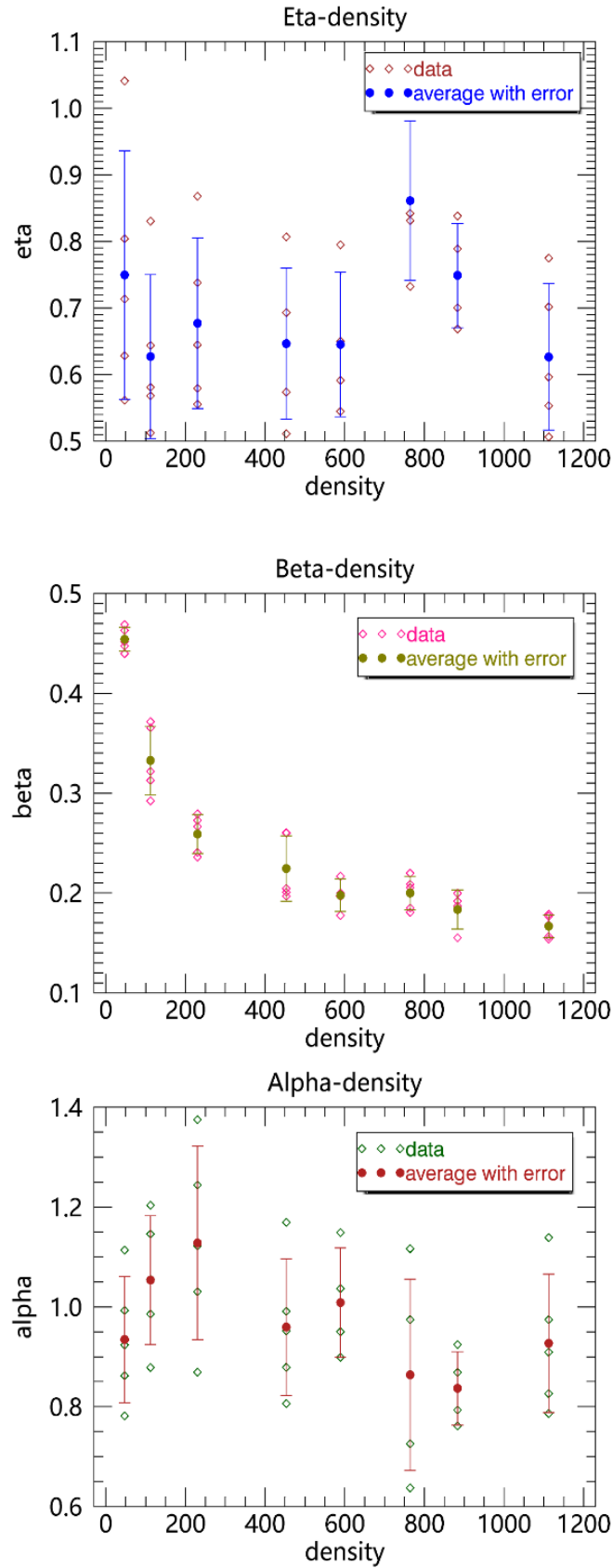


图 14 细胞密度对于 α , β , γ 绝对值的影响

图中展示了不同密度对于 α , β , γ 绝对值的影响, 其中可以明显地看出 β 与密度(单位为 个/平方毫米)的负相关性, 然而 α , γ 则对密度并不敏感。而且值得注意的是 β 的变化在低密度时比较明显, 而在高密度是不明显。

3.2.2 时间分辨率对于 α , β , γ 的影响不同

由于 α , γ 则对密度变化并不敏感, 我们进一步探究了时间分辨率对于 α , β , γ 的影响(图 15)。可以发现, 在对于时间分辨率的影响中, α , β , γ 的表现与密度作为影响因素时相反。其中值得注意的是 γ 的减小并不与“线性阻滞”的相矛盾, 这是因为随着时间分辨率的增大, 平均速度会趋向于低速(图 8), 因此才会导致“线性阻滞”的减小。而 β 对时间分辨率不敏感的特性, 则也符合其作为乘性噪音的特征。 β 的正性, 意味着噪声为乘性噪声。Shenderov 等人基于观察到的转动和运动的负相关现象, 为 *D.discoideum* 的运动建立了一个精细的模型²⁰, 在其中就高速区段的拟合较差问题正是由于乘性噪声的特性所造成。

β 不随时间分辨率的变化而变化, 在极限条件下的一些特点值得关注。当 βv 远小于 α 时, $P(v) = N_1 e^{\frac{-\gamma v^2}{2\alpha^2}}$ (7) 成为一个高斯分布, 当 gap 取值越大时, 线性性质越好, 同时逐渐逼近这个条件。而另一个极限则使得 $P(v) = N_2 v^{-2-\frac{\gamma}{\beta^2}}$ (8), 成为一个指数分布。

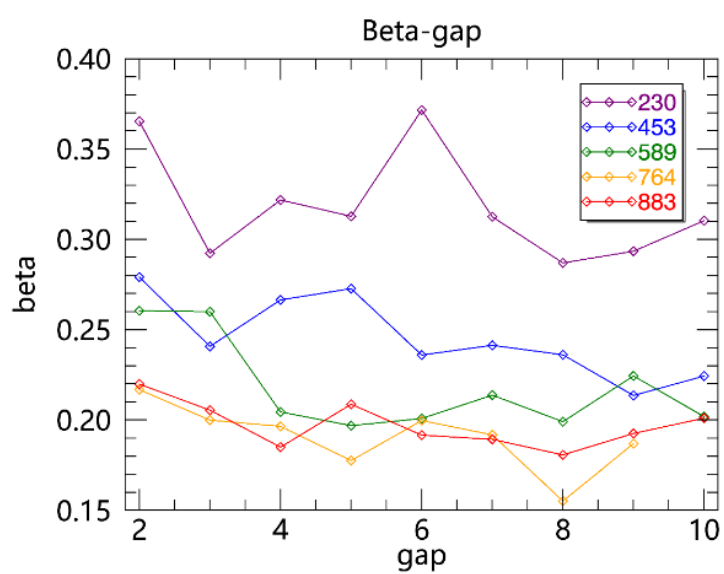
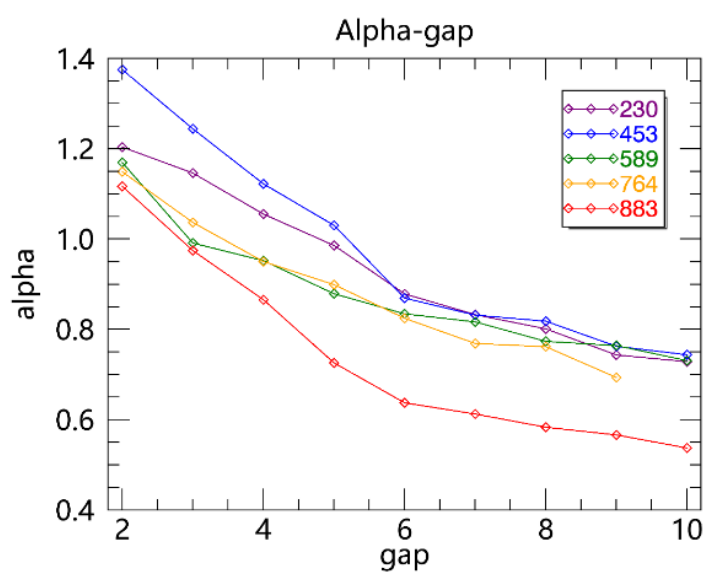
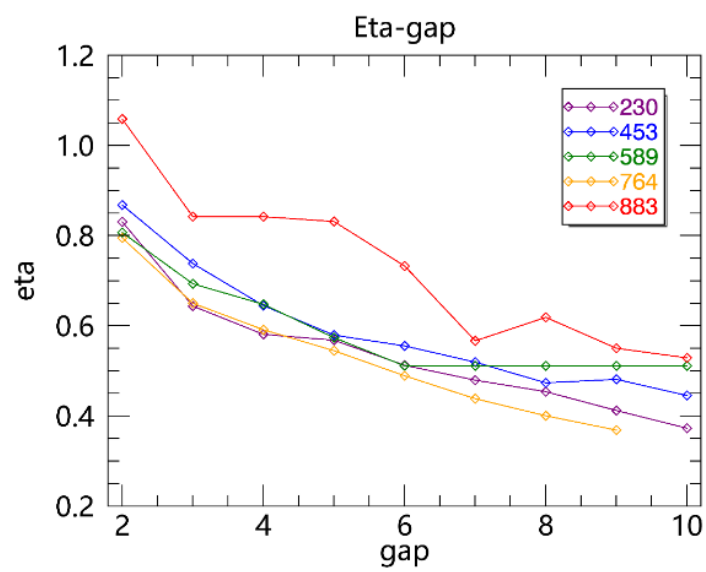


图 15 时间分辨率对于 α , β , γ 绝对值的影响

图中展示了不同时间分辨率对于 α , β , γ 绝对值的影响, 其中可以明显地看出 α , γ 与时间分辨率 (单位为 帧) 的负相关性, 然而 β 则对时间分辨率并不敏感。

四、讨论

在研究中，我们采用了随机分析的数据分析方法来找到了随机阿米巴运动的运动公式。在我们的时间分辨率下，速度的相关性与时间间隔的关系呈现出指数衰减的特征。而零点的自相关则在其余点的指数衰减曲线之上。这种偏离显示了在比较小的时间间隔中，速度的相关会进一步增强。这与研究人员对于人类成纤维细胞的研究结一致²¹。在我们的模型中，可以通过进一步拟合两个指数项来增加一个记忆项速度来把这种短时间相关的增强纳入考虑。

我们的研究区分了运动的决定部分和随机部分。在决定部分中我们观察到了线性阻滞（linear damping），这与经典布朗运动相符。但是应当注意，噪声的贡献不是由于经典布朗运动中的随机热运动所造成的，而是由于细胞自身所产生的生物学范畴上的主动运动。

我们的分析显示了运动的随机部分会受到密度的影响，而决定性部分并不会受到影响。有研究发现额外的胞外 cAMP 会起到不一样的效果，运动的决定部分会受到 cAMP 浓度的影响，线性阻滞随密度的增高而增强，而随机部分却不会受到 cAMP 的影响²²。这可能说明细胞密度对于细胞运动的影响通路与 cAMP 信号通路并不相同，可能存在其他信号调节机制。有研究指出细胞形成聚集体的过程是一个随机过程，由趋化信号独立控制²³，因此一个可能的解释是随机部分与聚集过程相关。我们观察到的线性阻滞和线性增性的乘性噪声往往意味着 Levy-type 随机行走²⁴。在低速时其特征和布朗运动一致，而剧烈的变化可能会在高速时产生，这是由于乘性噪音的贡献增强的缘故。在我们的观察中，由于时间间隔取得较小，因此更符合布朗运动的特点。作为一种搜寻策略，Levy 行走的效率明显高于布朗运动²⁵，研究中也发现各部分系数在低密度时较大，偏向于 Levy 行走的特性。

综上，我们可以将盘基网柄菌的运动分为随即部分和决定部分，而这两部分似乎也与不同的生理过程相关。故 Langevin 类型的描述对于细胞而言并不是一个人工模型，而可以反映与细胞特定信号通路相关的生理过程。我们的研究中也发现了密度对于细胞运动的影响。我们希望该研究方法可在研究其他环境因素对与细胞运动的影响时，为理解细胞运动随机过程的信号通路做出帮助。

五、参考文献

1. Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M. M. & Friedl, P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol.* **25**, 556–566 (2015).
2. Bosgraaf, L. & Haastert, P. J. M. V. The Ordered Extension of Pseudopodia by Amoeboid Cells in the Absence of External Cues. *PLOS ONE* **4**, e5253 (2009).
3. Tomchik, K. J. & Devreotes, P. N. Adenosine 3',5'-monophosphate waves in Dictyostelium discoideum: a demonstration by isotope dilution--fluorography. *Science* **212**, 443–446 (1981).
4. Strassmann, J. E. & Queller, D. C. How social evolution theory impacts our understanding of development in the social amoeba Dictyostelium. *Dev. Growth Differ.* **53**, 597–607 (2011).
5. Parent, C. A., Blacklock, B. J., Froehlich, W. M., Murphy, D. B. & Devreotes, P. N. G Protein Signaling Events Are Activated at the Leading Edge of Chemotactic Cells. *Cell* **95**, 81–91 (1998).
6. Meima, M. E. & Schaap, P. Fingerprinting of Adenylyl Cyclase Activities during Dictyostelium Development Indicates a Dominant Role for Adenylyl Cyclase B in Terminal Differentiation. *Dev. Biol.* **212**, 182–190 (1999).
7. Comer, F. I. & Parent, C. A. PI 3-Kinases and PTEN: How Opposites Chemoattract. *Cell* **109**, 541–544 (2002).
8. Hashimura, H., Morimoto, Y. V., Yasui, M. & Ueda, M. Collective cell migration of Dictyostelium without cAMP oscillations at multicellular stages. *Commun. Biol.* **2**, (2019).
9. *E. coli in Motion*.
10. Ornstein, L. S. On the Brownian Motion. *Proc Amst* **21**, 96–108 (1919).
11. Viswanathan, G. M. *et al.* Optimizing the success of random searches. *Nature* **401**, 911–914

- (1999).
12. Santos, M. C. Optimization of random searches on regular lattices. *Phys. Rev. E* **72**, (2005).
 13. Li, L., Cox, E. C. & Flyvbjerg, H. 'Dicty dynamics': Dictyostelium motility as persistent random motion. *Phys. Biol.* **8**, 046006 (2011).
 14. Bödeker, H. U., Beta, C., Frank, T. D. & Bodenschatz, E. Quantitative analysis of random ameboid motion. *EPL Europhys. Lett.* **90**, 28005 (2010).
 15. Kuusela, T. Stochastic heart-rate model can reveal pathologic cardiac dynamics. *Phys. Rev. E* **69**, 031916 (2004).
 16. Waechter, M., Riess, F., Schimmel, Th., Wendt, U. & Peinke, J. Stochastic analysis of different rough surfaces. *Eur. Phys. J. B - Condens. Matter Complex Syst.* **41**, 259–277 (2004).
 17. Bödeker, H. U. *et al.* Noise-covered drift bifurcation of dissipative solitons in a planar gas-discharge system. *Phys. Rev. E* **67**, 056220 (2003).
 18. Frank, T. D. Kramers–Moyal expansion for stochastic differential equations with single and multiple delays: Applications to financial physics and neurophysics. *Phys. Lett. A* **360**, 552–562 (2007).
 19. Tsallis, C. Possible generalization of Boltzmann-Gibbs statistics. *J. Stat. Phys.* **52**, 479–487 (1988).
 20. Shenderov, A. D. & Sheetz, M. P. Inversely correlated cycles in speed and turning in an ameba: an oscillatory model of cell locomotion. *Biophys. J.* **72**, 2382–2389 (1997).
 21. Takagi, H., Sato, M. J., Yanagida, T. & Ueda, M. Functional Analysis of Spontaneous Cell Movement under Different Physiological Conditions. *PLoS ONE* **3**, (2008).
 22. Wessels, D. *et al.* RasC Plays a Role in Transduction of Temporal Gradient Information in the

- Cyclic-AMP Wave of Dictyostelium discoideum. *Eukaryot. Cell* **3**, 646–662 (2004).
23. Andrew, N. & Insall, R. H. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat. Cell Biol.* **9**, 193–200 (2007).
24. Geisel, T., Nierwetberg, J. & Zacherl, A. Accelerated Diffusion in Josephson Junctions and Related Chaotic Systems. *Phys. Rev. Lett.* **54**, 616–619 (1985).
25. Viswanathan, G. M. *et al.* Optimizing the success of random searches. *Nature* **401**, 911–914 (1999).

六、致谢

本论文在陈唯教授和复旦大学生命科学院的悉心指导下完成。本论文从选题到完成，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血。实验开始之初遇到了诸多困难，正是陈老师的指导和帮助才使得我能够明确研究方向和研究方法。本人理论基础上的学习与进步，也离不开老师的指导；疫情期间由于情况特殊无法返校，正是陈老师在校的鼎力相助和悉心指导，才使得我可以按期完成数据分析，并明确自己的结果和结论。虽然毕业论文的研究从去年9月才开始，但我却收获匪浅。陈老师不仅是我学术上的导师，也是我在科研精神、生活态度上的标杆。在此，谨向陈唯教授表示崇高的敬意和衷心的感谢！

本论文的顺利完成，也离不开各位老师、同学和家人的关注。再次感谢生命科学学院两位本科生教务员钱老师和乔老师在解答我相关疑惑上的帮助，多位同学的关心和支持，以及本人父母在疫情期间的关心支持和教育！