

Circadian Rhythm of CREB in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. Yang Jing (*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080, China*); Chen Hong (*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*); Inouye S.I.T (*Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, Tokyo, Japan*).

Abstract Day-night variation of the content

of CREB in the suprachiasmatic nucleus was analyzed in male Wistar rats maintained under light-dark cycles and constant dark by gel-mobility shift. It was found that the CREB in the SCN has endogeneous circadian rhythm.

Key words rat, suprachiasmatic nucleus, CREB, circadian rhythm

钙调素化学发光标记的研究*

王志玲 李红兵 李宗让 孙连云 白娟¹⁾ 孙大业¹⁾ 董燕麟²⁾

(解放军石家庄医学高等专科学校, 石家庄 050081)

摘要 用发光物质 N-氨基丁基 N-乙基异鲁米诺 (ABEI), 采用碳二亚胺缩合法, 成功地标记了动物及植物钙调素 (CaM), 标记率为 $[ABEI] / [CaM] \approx 0.8-0.9$. 对 ABEI 标记 CaM 的反应条件、结合物的质量和保存时间进行了观察. 此标记物稳定, -20°C 可保存 10 个月以上, 适用于化学发光免疫法测定生物样品中 CaM 含量.

关键词 钙调素 (CaM), ABEI 标记

化学发光免疫测定法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 是一种以化学发光反应示踪抗原抗体间特异性免疫反应的微量检测技术. 该技术的灵敏度及重复性可与放射免疫测定法相媲美, 同时又避免了放射性元素的污染, 其标记物稳定^[1]. 自 CLIA 技术问世以来, 已应用于多种痕量物质的分析测定^[2-4]. 但国内、外尚未见用此法测定钙调素 (calmodulin, CaM) 含量的报道, 我们用 ABEI 标记动物及植物钙调素, 现将方法介绍如下:

1 材料与方法

1.1 试剂

牛脑钙调素和花椰菜钙调素均按经 Biro 等^[5]修改的 Gopalakrishna 等的方法制备, 用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯度为单带^[6]; ABEI (6-[N-(4-氨基丁基)-N-乙基]-氨基-2,3-二氢吩噻-1,4-二酮) 为军事医学科学院基础医学研

究所产品; EDC ([1-乙基-3-(3-甲氨基丙基)-碳二亚胺]-HCl) 为 Sigma 公司产品; 氯化血红素 (hemin) 为 Sigma 公司产品.

1.2 仪器

WDD-1 型发光测试仪 (为北京第二光学仪器厂生产).

1.3 方法

1.3.1 标记过程 标记采用 EDC 缩合法^[7,8] 略有修改. 按 $\text{CaM} : \text{ABEI} : \text{EDC} = 1 : 50 : 300$ 的摩尔比率加入各种物质. 将固体 EDC 分次加入到 CaM 溶液中, 再将用 0.1mol/L HCl 溶解的 ABEI 逐滴加入上述体系, 控制 pH 在 $3.5-4.0$ 之间, 室温搅拌反应 $4-5\text{h}$. 用 1.0mol/L 醋酸盐终止反应. 反应液对 1×10^{-3}

* 总后青年基金资助课题.

¹⁾ 河北师范大学生物系, 石家庄 050016, ²⁾ 第三军医大学生物化学教研室, 重庆 630038.

收稿日期: 1994-05-20, 修回日期: 1994-06-04

mol/L HCl 透析 48h, 然后用 1×10^{-3} mol/L HCl 平衡后的葡聚糖 G-25 柱除去游离的 ABEI. 分步收集, 鉴定质量. 所需部分分装后, -20°C 保存.

1.3.2 结合物质量鉴定 CaM 含量测定: 结合物中 CaM 含量用微量 Lowry 法测定^[9]. 结合物中发光强度测定: 配制系列标准 ABEI 溶液, 测定其发光强度并绘制发光曲线 (图 1). 再把收集液中含 CaM 的部分进行发光强度测定, 从曲线查得结合物中 ABEI 的浓度.

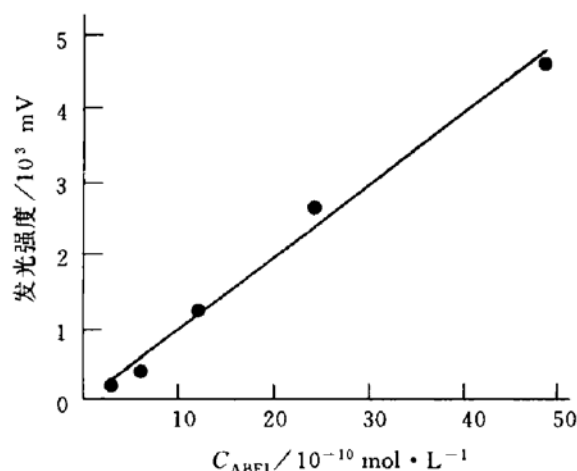


图 1 ABEI 的发光强度曲线

1.3.3 计算 $[\text{ABEI}] / [\text{CaM}]$ 的标记率 根据以上 CaM 含量和发光剂浓度计算出 $[\text{ABEI}] / [\text{CaM}]$ 的标记率.

2 结果与讨论

2.1 ABEI 的发光强度曲线 (图 1)

测定含钙调素的收集液中 ABEI 的发光强度, 按此曲线查得其 ABEI 浓度.

2.2 标记 CaM 洗脱图形及紫外吸收特征

将分步收集液进行蛋白测定, 并测定含蛋白管的发光强度. 结果如图 2. 然后合并蛋白含量及发光强度均高的高峰管, 用岛津 UV-265 型紫外分光光度计进行紫外扫描. 结果如图 3. 从图 2 可看出 CaM 含量高的管发光强度也相应增高, 此部分即为所需的 ABEI-CaM. 并可根据收集液中 CaM 含量及 ABEI 浓度计算出标记率 $[\text{ABEI}] / [\text{CaM}] \approx 0.8-0.9$. 从

图 3 可见 ABEI-CaM 在 260—280nm 和 320—330nm 处有吸收峰. 前者为 CaM 的特征吸收峰, 后者为 ABEI 的特征吸收峰.

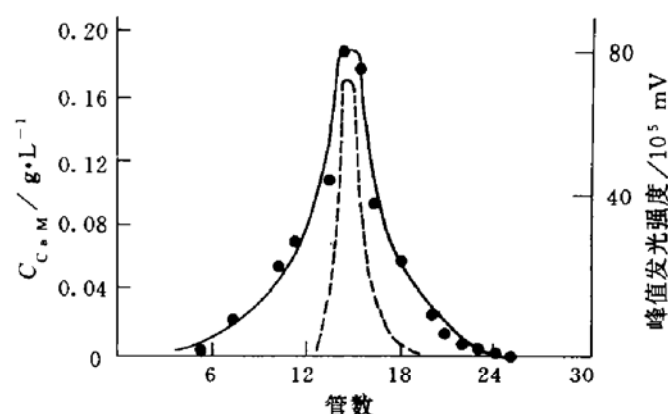


图 2 EDC 法制备 ABEI-CaM 结合物过 sephadex G-25 柱洗脱曲线

—●—: CaM, ---: 发光曲线.

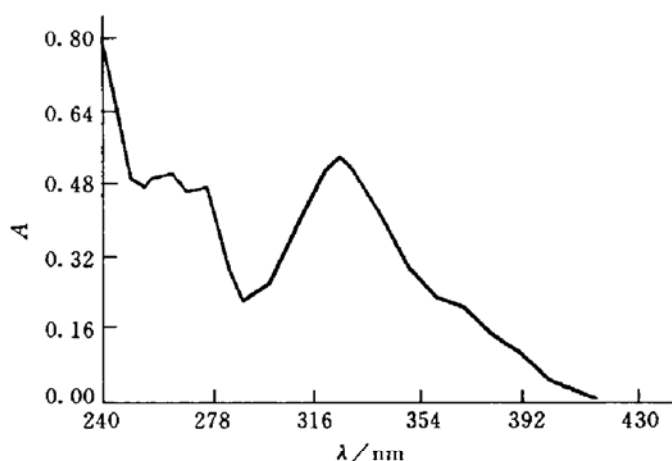


图 3 ABEI-CaM 结合物紫外扫描图谱

2.3 标记反应的 pH 及摩尔比对标记率的影响

用不同 pH 条件进行标记, 结果如表 1.

表 1 摩尔比与 pH 对标记的影响

CaM : ABEI : EDC 摩尔比率	标记反应的 pH	标记率 $[\text{ABEI}] / [\text{CaM}]$
1 : 12 : 52	4.5—5.0	0.045/1
1 : 100 : 300	4.5—5.0	0.08/1
1 : 50 : 300	3.5—4.0	0.8—0.9/1
1 : 50 : 300	3.0—3.5	0.88/1
1 : 50 : 300	<3.0	0/1

从表 1 看标记时的 pH 对标记率有影响, pH>4.0 标记率较低, pH=3.1—3.9 标记率最高, pH<3.0 标记反应几乎不进行. 同时可看出如 pH 不适, 单纯增加反应体系中 ABEI 和 EDC 的摩尔比率不能增大标记率. 故严格控制 pH 是提高标记率的关键.

2.4 保存时间对 ABEI-CaM 质量的影响

每次实验前将 ABEI-CaM 稀释并测其发光强度 (10s 积分), 观察发光强度变化情况. 结果如表 2.

表 2 保存时间对 ABEI-CaM 发光强度的影响

保存时间/d	4	30	60	120	150	180	300
发光值/(10 ³ mV)	12	12.1	10.8	10.5	10.2	11	10.5

从表 2 可以看出, 保存 10 个月 ABEI-CaM 的发光强度无明显改变, 同时以此稀释度的 ABEI-CaM 用化学发光免疫测定法测定钙调素含量. 表 3 为结合相中 ABEI-CaM 的发光强度. 从表 3 可以看出, 保存 10 个月的 ABEI-CaM 用于化学发光免疫测定法测定 CaM 结果稳定.

表 3 保存时间对 ABEI-CaM 与抗 CaM 抗血清结合的影响

保存时间/月	0.5	1	4	6	10
结合相发光强度/mV	1850	1365	1560	1600	1306

结果表明, 用 ABEI 标记 CaM 过程简单, 只要条件适宜就能达到一定的标记率, 标记物稳定, -20℃ 可保存 10 个月以上. 我们用本法标记的 CaM 建立了化学发光免疫法测定 CaM 的含量, 得到满意的结果. 方法另文发表.

致谢 本文承蒙军事医学科学院蒋滋慧教授指导, 301 医院田亚平同志帮助和本校勾凌燕帮助紫外扫描, 特此感谢.

参 考 文 献

- Weeks I, Campbell A K, Woodhead J S. Clin Chem, 1983; **29**: 1480
- 田亚平, 沈文梅, 刘智峰等. 生物化学与生物物理进展, 1989; **16**: 310
- Kao P C, Riggs B L, Schryver P G. Clin Chem, 1993; **39**: 1369
- Gopalakrishna R, Anderson W B. Biochem Biophys Res Comm, 1982; **104**: 830
- Laemmli U K. Nature, 1970; **227**: 680
- Cheng P-J, Hemmila I, Lovgren T. J Immuno Methods, 1982; **48**: 159
- Carraway K L, Spoerl P, Koshland D E. J Mol Biol, 1969; **42**: 133
- 李红兵, 李宗让, 王志玲等. 生物化学与生物物理进展, 1993; **20** (5): 402

Study on the Chemiluminescent Conjugating of Calmodulin. Wang Zhiling, Li Hongbing, Li Zongrang, Sun Lianyun (Shijiazhuang Medical College of PLA, Shijiazhuang 050081, China); Bai Juan, Sun Daye (Biology Department of Hebei Normal University, 050016, China); Dong Yanlin (Biochemistry Department of the Third Military University, 630038, China).

Abstract Animal and plant calmodulin were conjugated successfully with the emission substance, N-(4-aminobutyl)-N-ethyl-isoluminol (ABEI) by the method of carbodi-imide condensation. The labelling rate of [ABEI] / [CaM] is 0.8—0.9. The reacting condition of CaM with ABEI, the quality and the keeping time of the ABEI-CaM conjugate were observed. The conjugate was stable and can be kept more than 10 months at -20℃. It was suitable for the chemiluminescent immunoassay in which the level of CaM in the biological sample was measured.

Key words calmodulin, chemiluminescent conjugating