

研究简报

大鼠下丘脑交叉上核中 CREB 的昼夜节律

杨 靖

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

陈 洪

(中国科学院遗传学研究所, 北京 100101)

井上慎一

(日本三菱化成生命科学研究所以, 东京 194)

摘要 利用凝胶迁移率变化的实验方法, 对饲养在光照-黑暗循环的条件和持续黑暗的条件下 Wistar 雄性大鼠下丘脑交叉上核中 CREB 含量的昼夜间变化进行了分析, 发现 CREB 在交叉上核中具有内源性的昼夜节律。

关键词 大鼠, 交叉上核, CREB, 昼夜节律

诸多实验结果表明哺乳类下丘脑的交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 具有昼夜节律起搏器功能, 该组织的损伤会导致激素、行为和电生理水平昼夜节律的消失^[1,2]。近几年, 从分子水平研究 SCN 的功能是该领域的热点, 已在神经肽^[3]和 mRNA 水平^[4]进行了一些研究, 但在基因调控蛋白水平的研究工作则刚刚起步。本文采用凝胶迁移率变化的实验方法, 研究分析了 cAMP 应答元件结合因子 (cAMP-response element binding, CREB) 在 Wistar 雄性大鼠下丘脑 SCN 中的昼夜节律。

1 材料和方法

1.1 取材 3 周龄 Wistar 雄性大鼠, 在光照-黑暗 (LD) 时间各半 (光照: 9:00—21:00, 黑暗: 21:00—9:00) 的循环中饲养两周。在获取持续黑暗 (DD) 条件的样品前, 需将实验大鼠置持续黑暗 48h。采用微量打孔法, 以 4h 间隔取得直径为 600 μ m 的 SCN 组织, 置液氮速冻, -70 $^{\circ}$ C 贮存备用。每次以 9:00 为零点取样, 节律时间 (circadian time, CT) 依次为 0 (9:00), 4 (13:00), 8 (17:00), 12 (21:00), 16 (1:00) 和 20 (5:00) (CT0=

CT24)。一只大鼠的一对 SCN 组织作为一个时间点样品进行调控蛋白含量的分析测定。

1.2 制备细胞提取物 取一只大鼠的一对 SCN, 加入 50 μ l 匀浆液 (20mmol/L Hepes, pH 7.8, 125mmol/L NaCl, 12% glycerol, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 2mmol/L PMSF 和 40 μ g/L pepstatin), 冰浴条件下进行超声波处理 5s。经 4 $^{\circ}$ C 离心后, 利用 Bradford 法测定上清液中总蛋白浓度。将上清的其余部分分装, 置液氮速冻, -70 $^{\circ}$ C 贮存备用。

1.3 标记结合探针 含有结合 CREB 核心序列的寡核苷酸 (5'-AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3', 购自 Promega 公司), 经 T4 寡核苷酸激酶进行 5' 端同位素标记, 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化标记的 CREB 结合探针。

1.4 凝胶迁移率变化试验 (gel mobility shift assay) 首先通过加入冷探针的竞争实验确定特异性结合带, 然后对一天中六个时间点的 SCN 样品进行定量分析。每个时间点 SCN 结合试验均用 12 μ g 的细胞提取物, 分别加入

5 μ l 5 倍浓度的结合反应缓冲液 (50mmol/L Hepes, pH 7.8, 36% glycerol 和 15mmol/L DTT), 2 μ l polyI · polyC (1g/L). 室温反应 15min 后, 加入 1 μ l CREB 的结合探针 (2×10^4 cpm), 再经过室温反应 15min 后, 在 TAE 电泳缓冲系统中进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (180V 约 2h). 最后用图象分析仪对每个时间点的 CREB 结合带强度进行定量分析, 并对结果进行统计学分析.

2 结果与讨论

图 1 表示 LD 条件下的样品经凝胶迁移率变化试验后的图象分析结果, 各时间点的结合

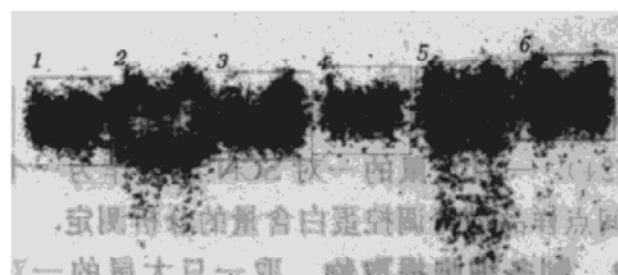


图 1 凝胶迁移率变化实验的图象分析结果

2, 3 和 4 分别表示实验大鼠经过 4, 8 和 12h 光照时 CREB 在 SCN 中的含量; 5, 6 和 1 分别表示实验大鼠在黑暗中经历 4, 8 和 12h 时 CREB 在 SCN 中的含量.

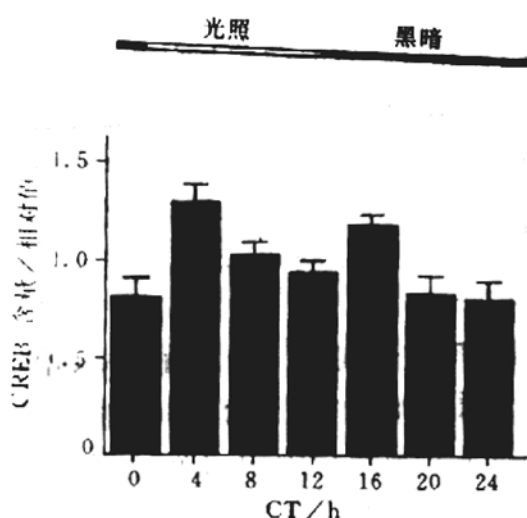


图 2 光照-黑暗循环条件下, SCN 中 CREB 含量的昼夜节律

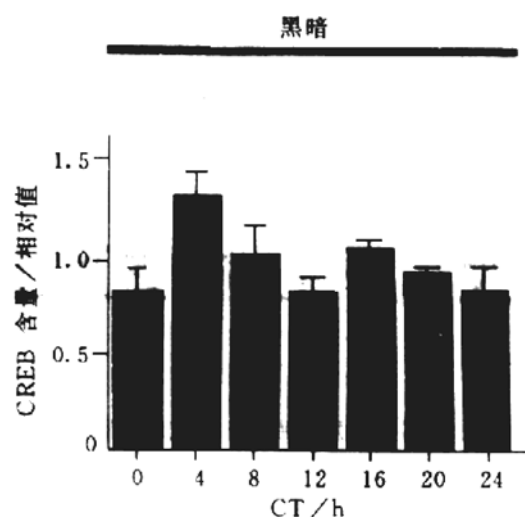


图 3 持续黑暗条件下, SCN 中 CREB 含量的昼夜节律

带强弱表示着 CREB 含量的差异. 显然, 2 号和 5 号, 即经历光照或黑暗 4h 时的 SCN 中, 其 CREB 的含量达到一定的浓度, 而随后时间点的结合带强度呈现逐渐减弱的趋势, 表明 CREB 的含量在递减. 如图 2 和图 3 所示, DD 条件下样品的分析结果与 LD 条件下的结果完全吻合, 经计算均具有统计学意义 (ANOVA, $P < 0.001$, $n = 3$). 在 LD 和 DD 两种不同条件下, CREB 含量昼夜间呈现相同模式的规律性变化, 表示这种节律的产生并不受光照条件变化的影响, 而是一种内源性节律.

c-fos 和生长激素释放抑制因子等基因的调控区均含有可与 CREB 结合的核苷酸序列, 在 SCN 这一重要的昼夜节律起搏器中, CREB 的这种内源性昼夜节律是否会影响到某些基因有节律地表达, 以及其自身节律的产生究竟受到哪些因素的影响, 都有待进一步研究.

参考文献

- 1 Inouye S I T, Kawamura H. J Comp Physiol, 1982; 146: 153
- 2 Moore R Y. Fed Proc, 1983; 42: 2783
- 3 Shinohara K, Tominaga K, Isobe Y *et al.* J Neurosci, 1993; 13: 793
- 4 Yang Jing, Cagampang F R A, Nakayama Y *et al.* Mol Brain Res, 1993; 20: 259

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