

气相色谱/氢火焰检测器检测 HL-60 细胞 DNA 中 氧化损伤产物 8-羟基鸟嘌呤的研究*

张海涛 祝其锋

(广东医学院医用生化研究所 湛江 524023)

莫丽儿 庄海旗

(广东医学院化学教研室 湛江 524023)

蔡 春

(广东医学院分析中心 湛江 524023)

提 要 用 0.4 mmol/L H_2O_2 处理 HL-60 细胞株 24 h, 采用气相色谱/氢火焰检测器(GC/FID)检测 DNA 氧化损伤产物 8-羟基鸟嘌呤, 并用气相色谱-质谱仪选择性离子检测(CGC/MS-SIM)对其进一步鉴定。所用方法的平均回收率为 81.7%, RSD 小于 5%。

关键词 气相色谱-氢火焰检测器, 气相色谱-质谱法, HL-60 细胞, 8-羟基鸟嘌呤

分类号 O658/Q5

1 前言

H_2O_2 对脱氧核糖核酸(DNA)的损伤可表现为: DNA 单链、双链的断裂, DNA 链间或 DNA 和蛋白质间的交联以及 DNA 碱基的氧化修饰。现已发现氧化修饰的碱基有二十几种之多^[1], 其中 8-羟基鸟嘌呤更是自由基作用下细胞 DNA 中鸟嘌呤 8 位碳原子被氧化而形成的一种重要的修饰碱基。该碱基的化学性质比较稳定, 目前被认为是反映 DNA 氧化损伤的较灵敏和稳定的指标, 在衰老、肿瘤发生等过程中起着一定的作用^[2,3]。气相色谱/氢火焰检测器(GC/FID)在检测 DNA 修饰碱基方面具有分离效果好, 灵敏度高, 不受 DNA 中修饰碱基所在位点的限制等优点。气相色谱-质谱仪选择性离子检测(CGC/MS-SIM)可对 8-羟基鸟嘌呤进行定性分析^[4]。本文对细胞 DNA 氧化损伤时 8-羟基鸟嘌呤含量的检测方法作了研究。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)及乙腈均为 Fluka 公司产品; 非为 BDH 产品; 蛋白酶 K、RNA 酶 A、8-羟基鸟嘌呤及甲酸为 Sigma 公司产品; RPMI1640 完全培养基购自 LIFE TECHNO.; 小牛血清购自杭州四季清公司; 过氧化氢、苯酚、氯仿均为分析纯。

衍生瓶: 本课题组设计, 进口隔垫封口; 美国 Varian SP-3400 型气相色谱仪, 3 m×0.25 mm i. d. ×0.3 μm 交联 SE-54 熔融石英毛细管柱, 载气为高

纯氮气, FID 检测器, 台式自动平衡记录仪; 日本岛津 GC-17A/QP-5000 型气质联用仪, 美国 J&W 公司 DB-5 毛细管柱(25 m×0.32 mm i. d. ×0.3 μm), 载气为高纯氮气, 电离方式为 EI, NISI 谱库; LGJ 型真空冷冻干燥机; 电热式真空恒温干燥箱, PE. Lambda 2S 型紫外/可见光谱仪; Mettler Toledo 十万分之一天平。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养 HL-60 细胞株(军事医学科学院赠); 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基将生长状况良好的细胞的浓度调整至 5.0×10^5 / mL, 培养液体积为 40 mL。加入过氧化氢溶液, 使之最终浓度为 0.4 mmol/L, 在 37 °C 下用体积分数为 5% 的 CO_2 培养 24 h, 以 1 000 gf 离心 5 min, 收集细胞, 用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.2)洗 2 次。

2.2.2 DNA 的提取和鉴定 在收集的细胞中加入 100 mg/L 的蛋白酶 K 溶液 2 mL, 置于 37 °C 水浴中 24 h, 加入等体积的苯酚, 轻摇 10 min, 以 5 000 gf 离心 5 min, 将水层取出, 重复 1 次。加入等体积的 V(氯仿): V(异戊醇) = 24 : 1 的溶液, 轻摇 10 min, 以 5 000 gf 离心 5 min, 将水层取出, 在 4 °C 下透析, 直到透析液于 270 nm 处的吸光值小于 0.05, 加核糖核酸酶 A 溶液, 使之质量浓度为 50 mg/L, 置于 37 °C 水浴中 12 h, 加入 100 mg/L 的蛋白酶 K 溶液 1 mL, 重复氯仿-苯酚法纯化 DNA。将提取的 DNA 稀释 10 倍, 200~400 nm 波长扫描, 定性, 定量^[5]。

* 广东省重点学科资助课题
本文收稿日期: 1998-03-22, 修回日期: 1998-07-17

2.2.3 DNA 水解及衍生 取上述 DNA 溶液 300 μL 加到衍生瓶内,真空干燥 5 h;加质量浓度为 980 g/L 的甲酸 300 μL ,在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h。真空干燥 8 h;加 BSTFA 150 μL ,在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下衍生 1 h。自然冷却,过夜。

2.2.4 气相色谱检测 色谱条件:氮气和氦气的线性流速为 30 mL/min ,空气线性流速为 300 mL/min ,进样量 0.8 μL ,分流比 15 : 1,一阶升温程序为 120 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C/min}}$ 260 $^{\circ}\text{C}$ (9 min),进样口温度 300 $^{\circ}\text{C}$,FID 温度 310 $^{\circ}\text{C}$,衰减 8,量程 11。

2.2.5 气质联用仪鉴定 升温程序同气相色谱检测,进样量 0.1~0.2 μL ,分流比 10 : 1,质谱轰击电压 70 eV,质量扫描范围 30~600 amu ^[6,7]。

2.2.6 回收率实验 精确称取 8-羟基鸟嘌呤 0.10,0.30,0.50 mg ,分别加至上述提取的 300 μL DNA 溶液中,真空冷冻干燥 6 h,加甲酸 100 μL ,在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h,真空冷冻干燥 6 h,加 BSTFA 250 μL ,在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下衍生 1 h 后作为分析样品。另用上述提取的 DNA 溶液 300 μL 同样操作,测定 8-羟基鸟嘌呤含量,计算回收率。

2.2.7 精密度实验 分别取 400,1 200,2 000

mg/L 的 8-羟基鸟嘌呤溶液,各批内进样 3 次,观察批内变异程度。

3 结果

3.1 DNA 定性定量

HL-60 细胞 DNA 在 230,260,280,320 nm 处的吸光值分别为: A_{230} 0.391 8, A_{260} 0.760 9, A_{280} 0.389 9, A_{320} - 0.008。其中 $A_{280}/A_{260} = 0.512 4$, $A_{230}/A_{260} = 0.514 9$ 。一般认为 320 nm 处具有低吸光值, A_{280}/A_{260} 和 A_{230}/A_{260} 在 0.51~0.53 之间可认为所得 DNA 纯度已很高^[5]。DNA 的质量浓度为 50 $\text{mg/L} \times 0.760 9 = 38.045 \text{ mg/L}$ 。

3.2 气相色谱检测

检测结果见图 1。

3.3 气质联用仪鉴定

鉴定结果见图 2。图 2 为 CGC/MS-SIM 图谱,图 2-a 为总离子流图,图 2-b 为衍生后 8-羟基鸟嘌呤的质谱图,峰 73 (m/z) 为硅烷基峰,峰 440,455 (m/z) 为 8-羟基鸟嘌呤经 70 eV 轰击后所得特征峰。

3.4 回收率与精密度

回收率与精密度实验结果见表 1。

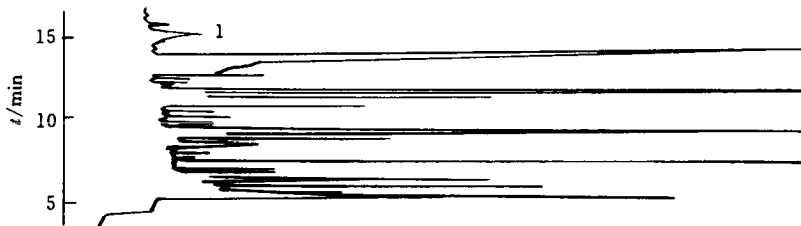


图 1 衍生处理后 HL-60 细胞 DNA 样品的气相色谱图

Fig. 1 Chromatogram of trimethylsilylated hydrolysate of HL-60 cells DNA

1. 8-羟基鸟嘌呤(8-hydroxyguanine)(15.80 min)。

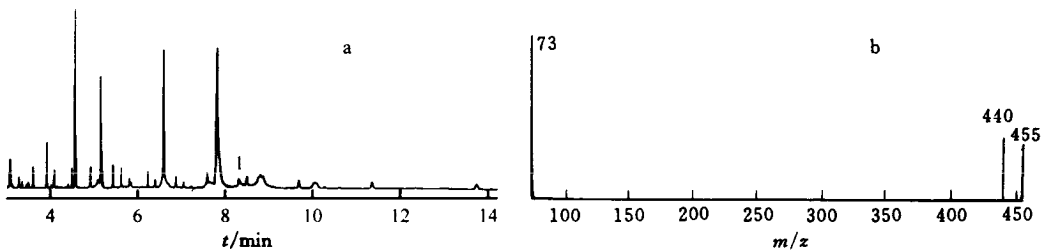


图 2 衍生处理后 HL-60 细胞 DNA 样品的 CGC/MS-SIM 图谱

Fig. 2 CGC/MS-SIM of trimethylsilylated hydrolysate of HL-60 cells DNA

a. 总离子流图, b. 衍生后 8-羟基鸟嘌呤的质谱图。

a. total ion current profile, b. mass spectrum of trimethylsilylated 8-hydroxyguanine.

1. 8-羟基鸟嘌呤(8-hydroxyguanine)。

表 1 8-羟基鸟嘌呤的回收率与精密度(n=3)

Table 1 The recovery and the precision of the 8-hydroxyguanine (n=3)

加入浓度 Added concentration (mg/L)	回收浓度 Recovered concentration (mg/L)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	标准偏差 Standard deviation ($\bar{X} \pm S$)(mg/L)	RSD (%)
400	307.56	76.89		307.56±5.84	1.90
1 200	998.64	83.22	81.70	999.00±20.76	2.08
2 000	1 699.60	84.98		1 699.60±56.80	3.34

4 讨论

本文用 HL-60 细胞株作为研究对象,利用 H₂O₂ 易穿过细胞膜到达核内攻击 DNA 这一特点,探讨自由基对活细胞 DNA 氧化损伤产物 8-羟基鸟嘌呤的 GC/FID 检测方法^[8]。气相色谱的结果揭示,衍生后的 8-羟基鸟嘌呤在样品中可以和其它成分有效分离,作为内标的非和 DNA 的其它成分也能有效分离,这也是对 8-羟基鸟嘌呤定量的一个保证。

以往的 DNA 中 8-羟基鸟嘌呤的检测以气质联用仪运用得较多,但仪器昂贵不易推广。我们以前的实验结果显示,GC/FID 对 8-羟基鸟嘌呤的 FID 检测灵敏度为 7.59×10¹⁰ mV·s/g,检测限为 1.58×10⁻¹¹ g/s;同时,实验也证实可以用气相色谱检测 DNA 中的 8-羟基鸟嘌呤^[7]。

本文测定结果重复性较好,变异系数均小于 5%,平均回收率为 81.70%。结果表明,本法是对 DNA 氧化损伤指标 8-羟基鸟嘌呤的一种准确、灵敏、有效的分析方法。

参 考 文 献

- 1 Von sonntag C. The chemical basis of raditation biology. London: Taylor & Fancis, 1987. 230-236
- 2 Guyton K Z, Kensler T W. Br Med Bull, 1993,49(3): 523-544
- 3 Floyd R A. Carcinogenesis, 1990,11(9):1447-1450
- 4 Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z et al. Biochem, 1990,29(34):7876-7882
- 5 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 北京:科学出版社,1987. 3~5
- 6 Dizdaroglu M. Anal Biochem, 1985,144(2):593-603
- 7 宋元宗,祝其锋,莫丽儿等. DNA 修饰碱基 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤的 GC/FID 分析和 CGC/MS 鉴定. 广东省生物化学学会第六届代表大会论文汇编. 湛江, 1997,64
- 8 Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Bing-chu C et al. Arch Biochem Biophy, 1991,285(2):388-390

Detection of 8-Hydroxyguanine in the DNA of the H₂O₂-Treated HL-60 Cells by GC/FID

Zhang Haitao, Zhu Qifeng, Mo Li'er¹, Zhuang Haiqi¹ and Cai Chun²
(Institute of Medical Biochemistry, ¹Department of Chemistry, ²The Central Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

Abstract This paper describes the DNA damage by hydrogen peroxide in HL-60 cells and the detection of 8-hydroxyguanine produced. The number of cells was at least about 2×10⁷/sample. Treatment of HL-60 cells with 0.4 mmol/L hydrogen peroxide for 24 h would result in DNA damage. The DNA samples were isolated, then qualitatively and quantitatively analyzed before hydrolysis. The results of experiments showed that 100~300 μL 98% formic acid could hydrolyze about 0.12 mg DNA samples completely in 150 °C for 1 h. After lyophilizing the DNA samples for 6-8 h, one DNA sample was trimethylsilylated completely with 150 μL BST-FA in 150 °C for 1 h. The recovery of trimethylsilylated 8-hydroxyguanine was 81.70%. The trimethylsilylated 8-hydroxyguanine was identified by GC/FID and CGC/MS-SIM paralleyly.

Key words gas chromatography-flame ionization detector, gas chromatography-mass spectrometry, HL-60 cell, 8-hydroxyguanine