

# DNA 修饰碱基 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤的 毛细管气相色谱分析及质谱鉴定

宋元宗<sup>1</sup>, 祝其锋<sup>1</sup>, 庄海旗<sup>2</sup>, 莫丽儿<sup>2</sup>

(1. 广东医学院医用生化研究所, 广东 湛江 524023; 2. 广东医学院化学教研室, 广东 湛江 524023)

**摘要** 探索了 GC/FID 定量分析 DNA 修饰碱基 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤的实验条件, 用 GC/MS 鉴定各有关成分。结果表明, DNA 水解物中不同成分可被成功地衍生和分离, 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤的相对摩尔反应因子分别为 3.0 和 1.3, 灵敏度分别为  $5.50 \times 10^9$  mV·s/g 和  $7.59 \times 10^{10}$  mV·s/g, 检测限可分别达 36.4 pg/s 和 15.8 pg/s, 整个分析流程的相对标准偏差小于 20%。

**关键词** 气相色谱, 质谱, 修饰碱基, 5-甲基胞嘧啶, 8-羟基鸟嘌呤

中图分类号: O658.0657.7; Q5

文献标识码: A

文章编号: 1000-871X(2000)04-0295-05

## 1 前言

8-羟基鸟嘌呤是在活性氧、电离辐射、某些致癌原、药物或激素的作用下细胞 DNA 中的鸟嘌呤发生氧化损伤而形成的一种修饰碱基, 而 5-甲基胞嘧啶是一种经典的 DNA 修饰碱基, 这两种修饰碱基均参与多种基因表达的调控, 在许多疾病的发生发展过程中发挥着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。本文参考国外 GC/MS 分析 DNA 中 8-羟基鸟嘌呤等修饰碱基的方法<sup>[3]</sup>, 对 GC/FID 分析 DNA 中 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤等修饰碱基的实验条件进行了较为系统的研究, 并应用 GC/MS 对有关成分进行了鉴定, 同时对以往分析过程的某些环节进行了必要的创新和优化。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂和仪器设备

鲑精 DNA、5-甲基胞嘧啶(5-MC)、8-羟基鸟嘌呤(8-ohG)及乙腈等试剂为 Sigma 公司产品, BSTFA [Bis(methylsilyl)trifluoroacetamide] 为 Fluka 公司产品, 菲为 BDH 产品,  $\text{FeSO}_4$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  等为国产分析纯试剂。

美国 Varian SP-3400 型气相色谱仪, 交联 SE-54 熔融石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.3 μm), 载气为高纯氮, FID 检测器, 台式自动平衡记录仪; 岛津 GC-17A/QP-5000 型气质联用仪, 美国 J&W 公司 DB-5 毛细管柱, 载气为高纯氮, 电离方式为 EI, LGJ 型真空冷冻干燥机, 电热式恒温干燥箱。

### 2.2 衍生条件

取 1.4 g/L DNA 溶液 300 μL 置于衍生瓶中, 用 98% 甲酸水解 40 min 后冻干, 每个衍生瓶中加入衍生溶液 (BSTFA-乙腈, 体积比为 1:1) 300 μL 进行三甲基硅烷基 (TMS) 衍生化, 用进口隔垫封口, 拧紧瓶盖后置电热式干燥箱内, 于 130 °C 下衍生不同时间后加入适量内标菲进行气相色谱分析, 以鸟嘌呤峰面积与菲峰面积比值为纵坐标, 衍生时间为横坐标作图, 结果见图 1。

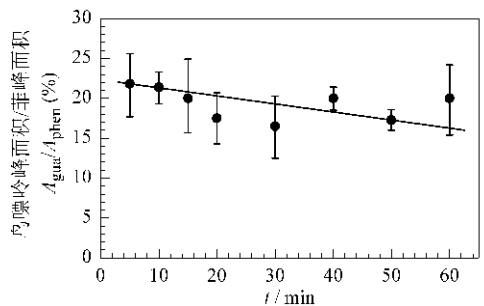


图 1 DNA 样品水解物的 TMS 衍生曲线

Fig.1 The TMS derivatization curve of the hydrolysate of DNA sample

### 2.3 分离条件

在 DNA 溶液 (终质量浓度 1.0 g/L) 中分别加入一定浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{FeSO}_4$  溶液, 通过 Fenton 反应产生 HO· 以攻击 DNA 样品, 进而产生 8-羟基鸟嘌呤。将反应液在 37 °C 下保温一定时间后取 300 μL 置于衍生瓶中冻干, 酸解, 再冻干。加入衍生液 300 μL

收稿日期: 1999-09-20, 修回日期: 1999-12-10

基金项目: 广东省重点学科资助课题, 批准号: 粤高教科 [1997] 14 号

作者简介: 宋元宗 (1970-), 男, 中南大学附属湘雅医院儿科在读博士生, 湖南长沙, 邮编: 410008, 电话: (0731) 4327208。

进行 TMS 衍生化,再加入含内标菲的乙腈溶液(0.4 g/L)0.5 μL,然后按下列条件进行 GC 分析:氮气和氢气的线性流速均为 30 mL/min,空气的线性流速为 300 mL/min,每次进样 0.8 μL,分流进样,分流比为 15:1。一阶升温程序:120 °C(1 min)  $\xrightarrow{15\text{ °C/min}}$  250 °C(9 min)进样口温度 300 °C,FID 温度 310 °C,衰减为 8,量程 11。GC/MS 分析的升温程序同上,进样 0.2 μL,分流比 10:1,质谱轰击电子能量为 70 eV,质量扫描范围 30 u~600 u。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 DNA 水解样品的 TMS 衍生曲线

本文所选内标为菲,其化学性质稳定且无可衍生基团,因此鸟嘌呤与菲峰面积的比值可较准确地反映样品中被 TMS 化的鸟嘌呤的含量。从图 1 可看出,在选定的条件下,衍生 15 min 即可将 1.4 g/L 的 DNA 样品成功地进行 TMS 衍生化。值得注意的是,近年来有报道<sup>[4]</sup>证实,DNA 中的 4 种碱基在 TMS 衍生过程中都会有少量转化为相应的活性氧损伤产

物。从本文研究结果也可看出,随着衍生时间的延长,鸟嘌呤的含量有降低的趋势,尽管这种降低在统计学上没有显著性意义( $F = 1.13, P > 0.05$ )。因此,在测定 DNA 中 8-ohG 等活性氧损伤产物时,为尽量避免衍生过程所产生的系统误差,应注意控制衍生时间、温度、衍生试剂浓度等参数于合适的范围。

鸟嘌呤在 4 种 DNA 常见碱基中带有最多的可衍生基团(1 个氨基、1 个亚氨基和 1 个羟基),是一种最难进行 TMS 衍生化的碱基,DNA 中修饰碱基属稀有碱基,其含量远远低于鸟嘌呤,故一般情况下鸟嘌呤的衍生条件亦可满足其它碱基的 TMS 衍生化要求。若 DNA 浓度增大或样品中混有其它可衍生物质,则需根据实验要求相应升高衍生温度、延长衍生时间或增大衍生液中 BSTFA 的体积分数。

#### 3.2 经 HO· 攻击的 DNA 样品水解产物的分析

DNA 样品经 Fenton 反应、水解、三甲基硅烷化后,所得产物的典型气相色谱分离图谱(FID 检测)见图 2;GC/MS 总离子流图(TIC)见图 3;有关物质的质谱鉴定图见图 4。

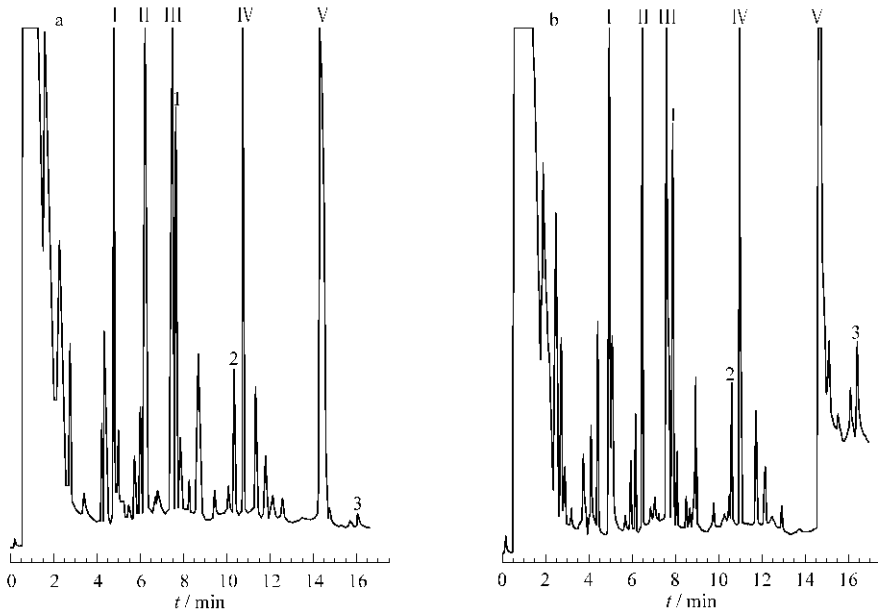


图 2 DNA 样品水解产物的气相色谱图

Fig.2 Typical gas chromatogram of the trimethylsilylated hydrolysate of DNA sample

a. FID 的衰减为 8;b. 峰 V 出现后立即将 FID 衰减由 8 调至 1。

a. The FID attenuation was 8;b. The FID attenuation is adjusted from 8 to 1 as peak V appears.

峰:I.磷酸;II.胸腺嘧啶;III.胞嘧啶;IV.腺嘌呤;V.鸟嘌呤。1.5-甲基胞嘧啶;2.菲(内标);3.8-羟基鸟嘌呤。

Peak:I. phosphoric acid; II. thymine; III. cytosine; IV. adenine; V. guanine. 1. 5-methylcytosine; 2. phenanthrene

(internal standard); 3. 8-hydroxyguanine.

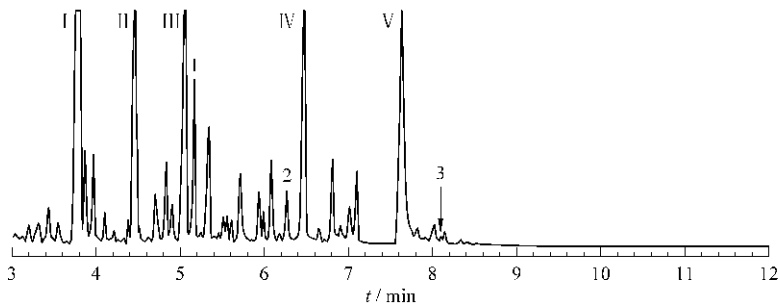


图 3 DNA 样品的典型气质联用总离子流图

Fig.3 Typical GC/MS total ion current profile of a DNA sample

峰 I ~ V 及 1 ~ 3 同图 2。

Peaks I - V , 1-3 same as in Fig.2.

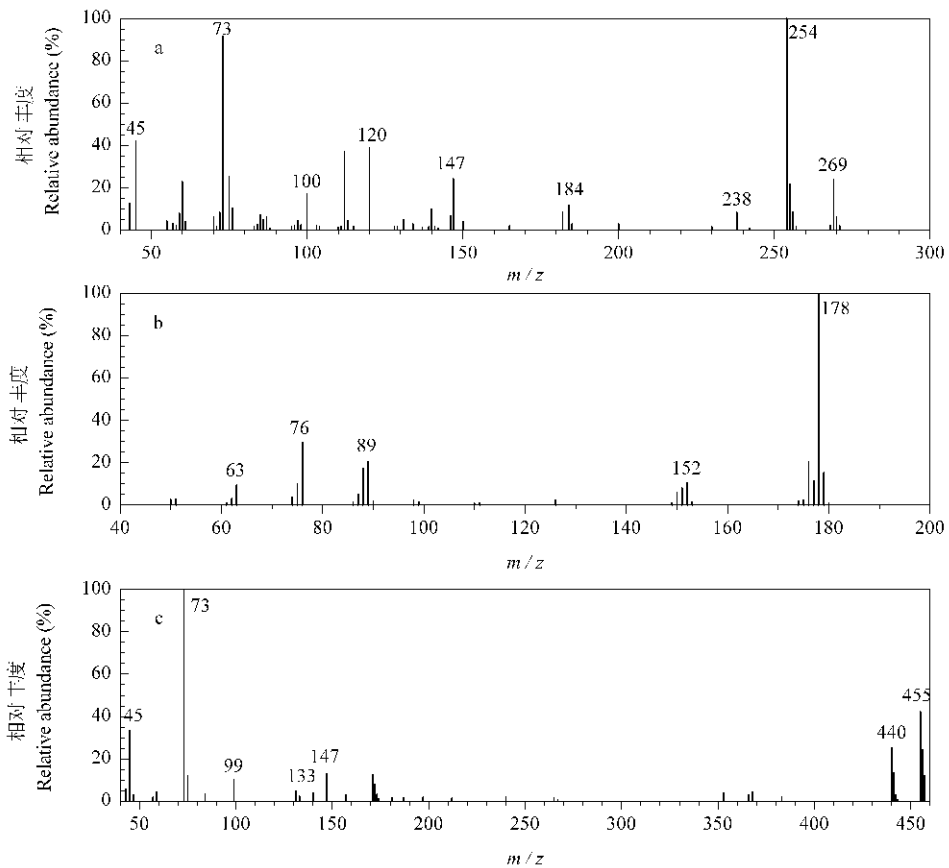


图 4 图 3 中几个峰的质谱鉴定结果

Fig.4 Mass spectra of several peaks in Fig.3

a b c 分别对应于图 3 中 1 2 3 峰。

a b c correspond to the peaks 1 2 3 in Fig.3 , respectively.

经标准品对照和气质联用鉴定证实,图 2 及图 3 中峰 1 2 3 分别对应 5-甲基胞嘧啶、菲、8-羟基鸟嘌呤。由图 2 可见,在本文实验条件下,用 GC/FID 分析 DNA 在 20 min 内即可得到满意的分离效果,而且

内标菲与 DNA 中的其它成分有着良好的分离效果,这就使应用 GC/FID 定量分析 DNA 中的修饰碱基成为可能。应用 GC/MS 则可在 9 min 内将有关成分有效地分离开来,与国外类似研究相比,更节省分析时

间。

### 3.3 相对摩尔反应因子( $f_m$ )的测定

分别精确称取一定量的 5-MC 和 8-ohG 标准品,以适量菲作内标,共同溶于衍生溶液(BSTFA-乙腈,体积比为 1:2)中,平行衍生 6 个试样,分别进样后测定两种修饰碱基及菲的峰面积,计算各自的相对摩尔反应因子 $f_m$ ,结果见表 1。

表 1 5-甲基胞嘧啶和 8-羟基鸟嘌呤的  $f_m$  值  
Table 1  $f_m$  of 5-methylcytosine and 8-hydroxyguanine

样品号 Sample No.	5-甲基胞嘧啶 5-Methylcytosine	8-羟基鸟嘌呤 8-Hydroxyguanine
1	2.8	1.4
2	2.8	1.3
3	3.1	1.3
4	3.1	1.3
5	3.4	1.3
6	2.8	1.3
$\bar{X} \pm SD$	$3.0 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.04$
RSD(%)	6.7	3.1

从表 1 可见  $f_m$  的批内 RSD 不超过 7%。但我们的实验表明  $f_m$  尽管在理论上是一个定值,但仍存在日间变异,因此,精确测定 5-MC 和 8-ohG 绝对浓度时, $f_m$  的测定最好与样品的检测同时进行。Hashizume<sup>[5]</sup>对鸟嘌呤等碱基相对摩尔反应因子的研究也曾得到类似的结论。

### 3.4 GC/FID 灵敏度及检测限测定结果

5-MC 和 8-ohG 的 FID 灵敏度分别为  $5.50 \times 10^9$  mV·s/g 和  $7.59 \times 10^{10}$  mV·s/g;FID 检测限可分别达 36.4 pg/s 和 15.8 pg/s。

气质联用选择性离子测量方式(GC/MS-SIM)的应用,可将 TIC 测量方式时的灵敏度提高 2~3 个数量级,这使得痕量 DNA 修饰碱基的检测成为可能。对于染色质、细胞等水平 8-羟基鸟嘌呤的检测可采用这种测量方式以提高其检测灵敏度。Dizdaroglu<sup>[3]</sup>的研究表明,应用选择性离子测量方式,8-ohG 的质谱检测限可达 fmol 水平。

### 3.5 重复性实验

**3.5.1 仪器重复性实验** 将同一衍生瓶中的样品重复进样 5 次后,分别计算 5-MC 和 8-ohG 的浓度,求其均值、SD 和 RSD,结果见表 2。

**3.5.2 衍生方法的重复性实验** 分别取适量 5-MC 和 8-ohG 标准品溶于衍生液后作 5 次平行衍生,然后进行气相色谱分析,求其均值、SD 和 RSD,结果见表 2。

**3.5.3 检测方法的重复性实验** 4 个平行 DNA 样品经 HO·攻击后酸解、衍生,分别测定实验样品中的 5-MC 和 8-ohG 的浓度,求其均值、SD 和 RSD,结果见表 2。

表 2 重复性实验结果

Table 2 The results of repeatability experiments mmol/L

进样号 Injection No.	GC		衍生化 Derivatization		GC/FID	
	5-MC	8-ohG	5-MC	8-ohG	5-MC	8-ohG
	1	4.0	2.2	5.3	2.0	2.7
2	4.3	2.1	5.3	1.8	2.8	2.3
3	4.2	2.3	4.8	2.1	1.9	2.3
4	4.1	2.3	4.7	2.0	2.5	3.4
5	3.9	2.0	5.3	2.1	-	-
$\bar{X} \pm SD$	$4.1 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.1$	$5.1 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.1$	$2.5 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.5$
RSD(%)	4.8	4.5	5.8	5.0	16.0	18.7

本文所报道的数据,是根据 GC/FID 分析所得色谱图及浓度计算公式得出的。从表 2 可看出,色谱仪及衍生方法稳定性好,GC/FID 分析的整个流程的相对标准偏差亦未超过 20%,实际分析过程中可酌情增大样本例数以进一步提高结果的精密度。此外,张海涛等<sup>[6]</sup>曾报道,应用 GC/FID 分析法检测 DNA 样品中 8-ohG 的平均回收率为 81.7%,基本可满足定量分析的要求。GC-17A/QP-5000 型气质联用仪配有定量分析软件,可充分发挥 MS 自身高选择性和高可靠性的定量分析功能,应用内标法或绝对标准曲线法计算有关修饰碱基的浓度。

实验过程中发现,衍生化的 8-ohG 等遇水极不稳定,即使与潮湿的空气接触也会在色谱图上出现双峰,从而影响其定量、定性研究。Sasaki 等<sup>[7]</sup>在鸟嘌呤等碱基 TMS 衍生产物的气相色谱分析过程中也曾注意到类似双峰现象,并认为这可能与有水条件下 TMS 衍生产物中部分 TMS 基团水解下来有关。本实验过程中曾观察到的 8-ohG 等 TMS 衍生产物的双峰现象可能也由类似机理所致。因此在实验过程中采取严格的干燥措施,保证实验试剂、实验用具及色谱室空气等尽可能地无水化是非常必要的。本研究采取色谱分析室安装空调和空气吸湿机,微量进样器和待测样品置于小型干燥器内,衍生化小容器保存前用有机溶剂(如丙酮)冲洗等多种干燥措施,基本上保证了待测样品的稳定性。

### 参 考 文 献

1 SONG Yuan-zong, ZHU Qi-feng, MO Li-ei(宋元宗,祝其锋,

- 莫丽儿). *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*( 癌变·畸变·突变), 1998, 1(2):119-122
- 2 CHEN Ya-wen, SUN Mei, LIU Ying-miao, et al( 陈雅文, 孙梅, 刘英苗, 等). *Basic Medical Sciences and Clinics*( 基础医学与临床), 1996, 1(5):21-24
- 3 Dizdaroglu M. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, 10: 225-242
- 4 Douki T, Delatour T, Bianchini F, et al. *Carcinogenesis*, 1996, 17(2):347-353
- 5 Hashizume T. *Analytical Biochemistry*, 1968, 24:232-242
- 6 ZHANG Hai-tao, ZHU Qi-feng, MO Li-er, et al( 张海涛, 祝其锋, 莫丽儿, 等). *Chinese Journal of Chromatography*( 色谱), 1999, 17(3):262-264
- 7 Sasaki Y, Hashizume T. *Analytical Biochemistry*, 1966, 16:1-9

## Capillary Gas Chromatographic Analysis and Mass Spectrometric Identification of Modified DNA Bases 5-Methylcytosine and 8-Hydroxyguanine

SONG Yuan-zong<sup>1</sup>, ZHU Qi-feng<sup>1</sup>, ZHUANG Hai-qi<sup>2</sup>, MO Li-er<sup>2</sup>

( 1. *Medical Biochemistry Institute, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China* ;

2. *Teaching and Research Section of Chemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China* )

**Abstract** :The purpose of this paper was to establish a method for the determination of modified bases, 5-methylcytosine and 8-hydroxyguanine in DNA by GC/FID. The experimental conditions were explored systematically for the quantitative analysis of these two modified bases, and the components were identified by GC/MS. The results showed that the variant components in DNA treated with Fenton's reaction can be derivatized and separated successfully. The relative molar reactive factors of 5-methylcytosine and 8-hydroxyguanine were 3.0 and 1.3, respectively. The sensitivity for them were  $5.50 \times 10^9$  mV·s/g and  $7.59 \times 10^{10}$  mV·s/g, respectively, while their detectable limits were 36.4 pg/s and 15.8 pg/s, respectively. The coefficients of variation for gas chromatograph were less than 5%, for derivatization, less than 6% and for the whole analysis process, less than 20%.

**Key words** :gas chromatography ;mass spectrometry ;modified bases ;5-methylcytosine ;8-hydroxyguanine