

反相高效液相色谱法测定大鼠肝组织中 DNA 的碱基含量

王超云, 胡凤祖, 师治贤

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要 利用反相高效液相色谱法, 采用 Supelcosil LC-18 色谱柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm), 以甲醇-0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液(体积比为 20:80)为流动相, 流速 0.8 mL/min, 在 254 nm 波长处检测, 对生活在高原(海拔 2.3 km)的习服大鼠肝组织中脱氧核糖核酸(DNA)的碱基含量进行了检测, 发现各碱基在 DNA 中所占的比例是相对稳定的:腺嘌呤(A)28.8%、鸟嘌呤(G)23.3%、胞嘧啶(C)17.4%、胸腺嘧啶(T)25.3%, 并利用内标法对 DNA 甲基化水平进行了测定。

关键词 反相高效液相色谱法; 脱氧核糖核酸; 碱基; 甲基化水平; 肝组织; 大鼠

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)04-0348-02

Determination of the Base Contents of Liver DNA of Rats by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Chao-yun, HU Feng-zu, SHI Zhi-xian

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: The base contents of liver deoxyribonucleic acid (DNA) of rats living at an altitude of 2.3 km were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. At first, 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 4.0) was used to dissolve the DNA acid hydrolysis products with 8-bromoguanosine (Br⁸G) as an internal standard. Then the DNA hydrolysis products with Br⁸G were chromatographed on a Supelcosil LC-18 column with UV detection at 254 nm and eluted by the mobile phase of MeOH-0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 4.0) (20:80, V/V) at the flow rate of 0.8 mL/min. Under these conditions, several bases were separated effectively. From the results, the relatively constant proportions of the bases in DNA were found. The contents were 17.4% of cytosine (C), 28.8% of adenine (A), 23.3% of guanine (G) and 25.3% of thymine (T). RSDs of the determination of these bases were 1.7%, 1.5%, 1.3% and 2.1%, respectively. At the same time the methylation level of liver DNA of the rats determined by the internal standard method was 6.2%.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography; deoxyribonucleic acid; base; methylation level; liver; rat

高效液相色谱法(HPLC)广泛用于蛋白质、核酸以及其他生物活性小分子的分离和纯化^[1]。目前反相高效液相色谱技术被公认为检测核苷、碱基的较理想方法^[2-5]。脱氧核糖核酸(DNA)中的碱基组成是相对稳定的, 当某些碱基被修饰或改变时会引起 DNA 结构的改变, 从而导致 DNA 转录水平的变化, 其中胞嘧啶(C)的甲基修饰对基因的表达调控存在着极其重要的作用, 细胞癌变与 DNA 甲基化水平密切相关, 如癌变细胞的 DNA 总是处于不充分的甲基化状态^[6,7]。肝脏是机体的重要器官, 对其 DNA 中碱基组分的测定有着重要的理论和现实意义。我们改进了现有的测定方法^[1,5,8], 对

大鼠肝组织中的碱基含量进行了测定, 分离结果令人满意。方法的精密度高, 为相关的研究提供了可信的科学数据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 公司 600E 高效液相色谱仪(包括 U6K 进样阀、486 可调波长紫外检测器、746 色谱数据处理机)、溶剂过滤系统(Millipore 公司)、安瓿瓶(由本所理化分析测试中心提供)、碱基标准品及内标物(购自美国 Sigma 公司):腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、5-甲基胞嘧啶(m⁵C)、胸腺嘧啶(T)及

内标物 8-溴鸟嘌呤核苷 (Br⁸G)

1.2 色谱条件

色谱柱 :Supelcosil LC-18(250 mm × 4.6 mm i.d. 5 μm);流动相 :甲醇-0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 4.0) (体积比为 20 : 80),流速 :0.8 mL/min ;检测波长 :254 nm ;检测灵敏度 :0.010 AUFS ;柱温 :室温 ;进样量 :15 μL。

1.3 样品处理

DNA 的提取 :利用盐浓度法提取生活在高原 (海拔 2.3 km) 的习服大鼠肝组织中的 DNA^[9]。

DNA 的酸解 :准确称取 DNA 样品 2.5 mg ,将其置于安瓿瓶中 ,加入 88% (质量分数) 甲酸 3 mL ,小心将瓶口封闭 ,于 180 °C 烘箱中水解 20 min。真空抽干甲酸 ,将水解产物溶于 0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 4.0) 中 ,离心 ,取上清液供分析^[10] (注 :本方法具有一定的危险性 ,故应选择合适的安瓿瓶 ,并尽量减少每瓶的加入量 ,样品多时可分为几个瓶同时进行酸解 ,该实验应在安全设备齐全、通风设备良好的实验室中进行)。

1.4 DNA 甲基化水平的测定

利用公式 $m_i = f_i \times m_s \times A_i / A_s$ 求出 C 和 m⁵C 的质量 (m_i 为待测组分的质量 , m_s 为内标物质量 , f_i 为相对校正因子 , A_s 为内标物峰面积 , A_i 为待测物峰面积)。

$$\text{DNA 的甲基化水平} = \frac{n(\text{m}^5\text{C})}{n(\text{m}^5\text{C}) + n(\text{C})} \times 100\%$$

其中 $n(\text{m}^5\text{C})$ 为 m⁵C 的物质的量 , $n(\text{C})$ 为 C 的物质的量。

2 结果与讨论

在选定的色谱条件下 ,将各碱基标准品混合进样 ,将 DNA 样品酸解溶液平行进样 ,分析结果见图 1。根据保留值对样品中的碱基进行定性 ,采用内标法定量 ,并对其精确度进行测定 (见表 1)。结果表明 ,在该分离条件下各碱基有较好的分离度 ,并具有较高的精确度。同时 DNA 的酸解是成功的 ,其中各碱基的含量相对稳定。

表 1 样品测定结果¹⁾ (n = 4)

Table 1 Determination results of the sample¹⁾ (n = 4) %

Base	Content ²⁾	SD	RSD
Cytosine(C)	17.4	0.29	1.7
Guanine(G)	23.3	0.34	1.5
Adenine(A)	28.8	0.37	1.3
Thymin(T)	25.3	0.54	2.1
5-Methyl cytosin(m ⁵ C)	5.2	0.05	0.9
The methylation level of DNA	6.2%		

1) Approximately 30 μg sample was used for each analysis.

2) percentage of the peak area of the base in total peak area.

国内曾有小鼠肝中 m⁵C 含量 (以摩尔分数计为 3.59%) 的报道^[10] ,本实验测定高原习服大鼠肝组织中 m⁵C 含量为 6.2% (摩尔分数)。二者之间存在差异 ,这可能是由以下原因造成的 :所选用的材料不同 (不同种类的动物其 DNA 的甲基化程度是不同的) ;实验动物栖息的环境不同 (高原低氧引起 DNA 中碱基的修饰改变)^[11,12]。

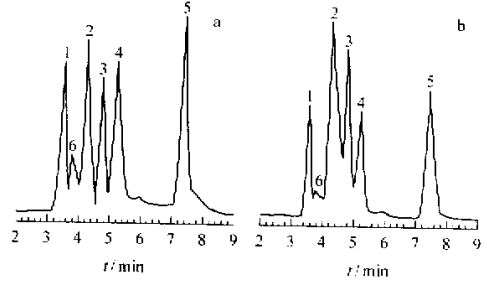


图 1 混合标准碱基 (a) 和大鼠肝组织中 DNA 碱基 (b) 的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of the mixture of base standards (a) and DNA bases of rat liver (b)

1. C; 2. G; 3. A; 4. T; 5. Br⁸G (internal standard); 6. m⁵C.

参考文献 :

[1] SHI Zhi-xian , WANG Jun-de. Separation and preparation of Biomacromolecules by High Performance Liquid Chromatography. 2nd ed. Beijing : Science Press , 1996. 279
师治贤 , 王俊德. 生物大分子的液相色谱分离与制备. 第 2 版. 北京 : 科学出版社 , 1996. 279

[2] Ehrlich M , Ehrlich K. J Chromatogr Sci , 1979 , 17(9) : 531

[3] Gehrke C W , Kuo K C , Zumwalt R W. J Chromatogr , 1980 , 188(1) : 129

[4] Gehrke C W , Kuo K C , McCune R A , et al. J Chromatogr , 1982 , 230(2) : 297

[5] Yamamoto T , Shimizu H , Kato T , et al. Anal Biochem , 1984 , 142(2) : 395

[6] Rubery E D , Newton A A. Biochem Biophys Acta , 1973 , 324 : 24

[7] Ehrlich M , Wang R Y. Science , 1981 , 212 : 1350

[8] Lim C K , Peters T J. J Chromatogr , 1989 , 461 : 259

[9] ZHANG Long-xiang , SHEN Tong. Biochemical Experimental Methods and Technologies. Beijing : High Education Press , 1981. 227
张龙翔 , 沈 同. 生化实验方法和技术. 北京 : 高等教育出版社 , 1981. 227

[10] HE Zhong-xiao , XUE Ji-yan , WU Guo-li. Acta Biologica Experimentalis Sinica , 1989 , 22(4) : 417
何忠效 , 薛继艳 , 吴国利. 实验生物学报 , 1989 , 22(4) : 417

[11] Galson D L , Tsuchiya T , Tendler D S , et al. Mol Cell Biol , 1995 , 15(14) : 2135

[12] Hassoun P M , Yu F S , Shedd A L , et al. Am J Physiol , 1994 , 266(2 , Pt 1) : L163