

## 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.0) was used to dissolve the DNA acid hydrolysis products with 8-bromoguanosine (Br<sup>8</sup>G) as an internal standard. Then the DNA hydrolysis products with Br<sup>8</sup>G 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2~5]</sup>。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<sup>[6,7]</sup>。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<sup>[1,5,8]</sup>,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(m<sup>5</sup>C)、胸腺嘧啶(T)及

收稿日期:2001-11-13

作者简介:王超云,男,1970 年生,硕士,电话:(0535)6717618-8875, E-mail:ytwey@163.com.

内标物 8-溴鸟嘌呤核苷( $\text{Br}^8\text{G}$ )。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Supelcosil LC-18 (250 mm  $\times$  4.6 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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  $\mu\text{L}$ 。

### 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<sup>[9]</sup>。

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  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中水解 20 min。真空抽干甲酸, 将水解产物溶于 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 4.0) 中, 离心, 取上清液供分析<sup>[10]</sup> (注: 本方法具有一定的危险性, 故应选择合适的安全瓶, 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  $\text{m}^5\text{C}$  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  $\text{m}^5\text{C}$  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<sup>1)</sup> ( $n=4$ )

Table 1 Determination results of the sample<sup>1)</sup> ( $n=4$ ) %

Base	Content <sup>2)</sup>	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
Thymine (T)	25.3	0.54	2.1
5-Methyl cytosine ( $\text{m}^5\text{C}$ )	5.2	0.05	0.9
The methylation level of DNA	6.2 %		

1) Approximately 30  $\mu\text{g}$  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  $\text{m}^5\text{C}$  含量 (以摩尔分数计为 3.59%) 的报道<sup>[10]</sup>, 本实验测定高原习服大鼠肝组织中  $\text{m}^5\text{C}$  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)<sup>[11,12]</sup>。

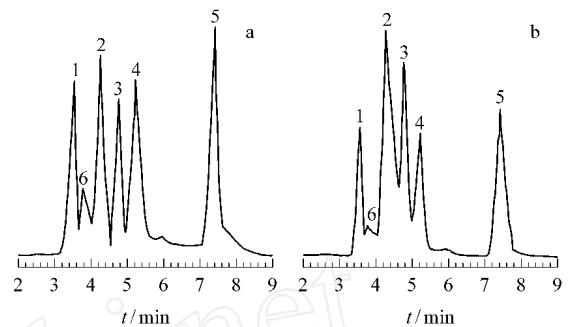


图 1 混合标准碱基(a)和大鼠肝组织中 DNA 碱基(b)的色谱图  
Fig. 1 Chromatograms of the mixture of base standards (a) and DNA bases of rat liver (b)

1. C; 2. G; 3. A; 4. T; 5.  $\text{Br}^8\text{G}$  (internal standard); 6.  $\text{m}^5\text{C}$ .

### 参考文献:

- [1] SHI Zhir-xian, WANG Jurr-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