

液相色谱-串联质谱法分析大鼠血液中 基因组 DNA 羟甲基化水平

陈光照¹, 杨柳青², 文娟¹, 葛苗苗¹, 张立坚¹, 蔡春¹

(1. 广东医学院分析中心, 广东 湛江 524023; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 是由 TET 蛋白家族催化氧化 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC) 生成的, 对哺乳动物的基因转录和表达发挥着重要的调控作用。本研究建立了血液样品中 5hmC 的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 测定方法, 采用试剂盒法提取血液基因组 DNA, 在甲酸环境下加热裂解, 采用 HILIC 色谱柱分离, 电喷雾电离和多反应监测模式定量。结果表明: 5hmC 在 0.1~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999 4; 高、中、低 3 个加标水平的平均回收率为 95.87%, 日内和日间的相对标准偏差分别为 3.42% 和 4.12%; 5hmC 的检出限 (LOD, $S/N=3$) 为 0.050 $\mu\text{g/L}$, 定量限 (LOQ, $S/N=10$) 为 0.100 $\mu\text{g/L}$ 。该方法准确、快速、稳定、灵敏, 可用于血液样品全基因组中 5-羟甲基胞嘧啶的检测分析。

关键词: 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC); 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS); DNA 羟甲基化; 血液; 大鼠

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2015)03-0249-06

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2015.0011

Analysis of Global DNA Hydroxymethylation in Rats' Blood by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Guang-zhao¹, YANG Liu-qing², WEN Juan¹, GE Miao-miao¹,
ZHANG Li-jian¹, CAI Chun¹

(1. Analysis Center of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC), which was formed from the enzymatic oxidation of 5-methylcytosine (5mC) by TET proteins family, played an important role in gene transcription and expression regulation as a new epigenetic modified in mammal animal. A method for global DNA hydroxymethylation in blood sample of rats using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. Genomic DNA from blood samples was extracted by genomic DNA isolation kit, and then was hydrolyzed with formic acid at 140 °C. The LC separation was

收稿日期: 2014-07-08; 修回日期: 2014-08-25

基金项目: 国家自然科学基金 (21375029); 广东省学科建设基金 (2013CXZDA018) 资助

作者简介: 陈光照 (1990—), 男 (汉族), 广东湛江人, 硕士研究生, 生物医学分析专业。E-mail: 849405005@qq.com

通信作者: 蔡春 (1961—), 男 (汉族), 广东湛江人, 教授, 从事生物医学分析研究。E-mail: caichun@gdmc.edu.cn

网络出版时间: 2015-01-30; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150130.1551.011.html>

conducted on Waters HILIC column by gradient elution with acetonitrile-7 mmol/L ammonium formate as mobile phase, and the analysis were performed by tandem MS with positive ion electrospray ionization (ESI^+) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results show that the calibration curve with a good linearity in the concentration range of 0.1-50 $\mu\text{g/L}$ is established for 5hmC, and the correlation coefficients are higher than 0.999. The limit of detection (LOD, $\text{S/N}=3$) and the limit of quantification (LOQ, $\text{S/N}=10$) for 5hmC are 0.050 and 0.100 $\mu\text{g/L}$, respectively. The relative standard deviations (RSD) of the intra-day and inter-day precision are 3.42% and 4.12%, respectively. The recovery of the spiked standards varies from 92.51% to 102.19%. The method is applied to analyze the hydroxymethylation level of genomic DNA from the blood samples of rats, and a average 5hmC degree of 0.48% is acquired. The method is available for the determination of global DNA hydroxymethylation in blood for its simplicity, speediness, and precision.

Key words: 5-hydroxymethylcytosine (5hmC); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); DNA hydroxymethylation; blood; rat

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 介导下,以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 为甲基供体,将 1 个甲基共价结合到胞嘧啶环 (Cyt) 第 5 位碳原子上,成为 5-甲基胞嘧啶 (5mC),5mC 在 TET (ten-eleven translocation) 蛋白加双氧酶家族催化氧化下生成 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) [1]。在哺乳动物基因组内,DNA 甲基化修饰在胚胎发育、基因表达调控、X 染色体失活、肿瘤与遗传病等方面发挥着重要的作用。近年来,随着 TET 蛋白家族功能的发现,DNA 羟甲基化在表观遗传领域越来越受到重视。Jin 等 [2] 指出 5hmC 存在于人类大脑额叶组织;Robertson 等 [3] 在人类胚胎干细胞调控基因的启动子上检测到 5hmC;Jin 等 [4] 指出 DNA 中 5hmC 可以抑制参与 5mC 转录调控的甲基化结合蛋白,从而导致 DNA 被动去甲基化,这说明 5hmC 在表观遗传中充当着重要的角色。

与基因组 DNA 甲基化检测方法不同,绝大多数方法,如限制性内切酶处理和重亚硫酸盐测序都不能区分 5mC 和 5hmC [4-5]。由于 5hmC 在体内的含量较低,定量检测基因组 DNA 中的 5hmC 在技术上具有一定的挑战性。5hmC 现有的检测方法有:薄层色谱法 [6]、液相色谱法 [6-7]、免疫组织化学法 [8]、糖基化法和在糖基化基础上的化学标记法 [9-10];另外,通过单

分子实时测序法 [9] 和应用氧化重硫酸盐测序法也能对 5hmC 进行定量测定 [11-12],但是,这些分析方法均存在半定量或效率不高的局限。近年来,液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 在表观遗传领域的发展较快,陈丽宇、张立坚等 [13-15] 采用 LC-MS/MS 法检测了组织中的 5hmC 含量,具有快速、灵敏、准确性高、检测限低等特点,但尚未发现血液中 5hmC 的 LC/MS 分析报道。

本研究采用试剂盒法提取血液中全基因组 DNA,并用甲酸加热水解,亲水作用色谱-串联质谱法测定 DNA 水解碱基 Cyt、5mC 与 5hmC 的含量,并分析 SD 大鼠血液中 DNA 羟甲基化水平,以期为血液样品中 5hmC 定量测定提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

3K15 台式高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司产品;Agilent 1200-6430A 液相色谱-串联质谱仪:美国 Agilent 公司产品。

胞嘧啶 (Cytosine, Cyt)、5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC)、5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 标准品:德国 Sigma 公司产品;同位素胞嘧啶 (Cytosine- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$, Cyt- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$): Toronto research chemicals Inc 公司产品;血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技 (北京) 有限公司等 4 家公司产品;乙腈、甲酸 (色谱纯):德国

Merck 公司产品;甲酸铵(色谱纯);美国 Sigma-Aldrich 公司产品;无水乙醇为分析纯;实验用水:由美国 Millipore 公司超纯水器制备。

1.2 血液样品 DNA 提取和处理

1.2.1 血液样品 DNA 提取 抽取 16 周龄 SPF 级的 SD 大鼠心脏血液于血常规试管中,以 3 000 r/min 离心 5 min,取 3~4 mL 下层血液,按照试剂盒的说明步骤提取血液全基因组 DNA。

1.2.2 DNA 的水解及处理 取约 1 μg DNA 和 200 μL 50 $\mu\text{g/L}$ 的 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 于反应瓶中,用 N_2 吹干,加入 200 μL 88% 甲酸,于 140 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 90 min,冷却至室温后用 N_2 吹干,再加入 200 μL 乙腈-7 mmol/L 甲酸铵水溶液(93:7,V/V)溶解,以 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液,供 LC-MS/MS 分析。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取一定量的 Cyt、5mC 和 5hmC 固体标准品,用甲醇溶解并定容,配制成 1 mg/L 的 Cyt、5mC 及 5hmC 标准储备液。准确称取一定量的 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 内标物,用甲醇溶解并定容,配制成 1 mg/L 的 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 内标标准储备液。所有储备液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,使用时用流动相逐级稀释成混合标准工作液。

1.4 仪器条件

1.4.1 液相色谱条件 BEH HILIC 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.7 μm);流动相: A 为 7 mmol/L 甲酸铵, B 为乙腈;流速 0.3 mL/min,柱温 20 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL ;梯度洗脱程序: 0—1.5 min, 93% B; 1.5—3.7 min, 93% B 降至 50% B; 3.7—8.7 min, 维持 50% B; 8.7 min, 升至 93% B; 8.7—15 min, 93% B 维持 7 min。

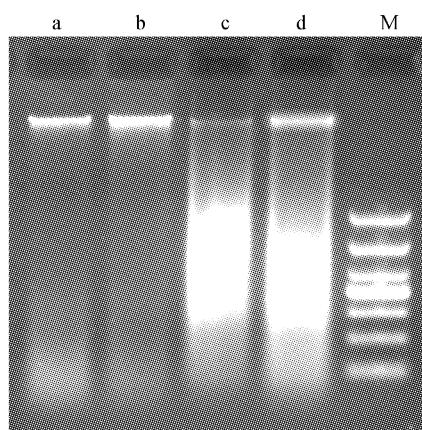
1.4.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI),正离子模式;多反应监测模式(MRM)定量;5hmC 的母离子 m/z 142.0,定量离子 m/z 124.0,定性离子 m/z 81.0;干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流速 10 L/min;毛细管电压 4 000 V。Cyt、5mC 分析条件参见文献[15]。

2 结果与讨论

2.1 血液 DNA 提取及水解条件优化

DNA 提取的质量对后续的质谱定量分析有着重要的影响。为探讨不同试剂盒提取血液 DNA 对后续分析的差异,比较了 4 家公司生产

的血液基因组 DNA 提取试剂盒的提取效果,并设置空白对照组。用紫外光度法检测发现,4 种试剂盒提取的 DNA 纯度均较好, A260/A280 值均在 1.7~1.9 之间。但在琼脂糖凝胶电泳图上可见: c 和 d 两个厂家生产的试剂盒提取的 DNA 降解明显,拖尾现象较严重; a 和 b 两个厂家生产的试剂盒提取效果则较好, DNA 较完整、条带明亮,示于图 1。综合 DNA 提取效果、操作简便程度和试剂盒成本等因素,本实验选择了天根公司的基因组 DNA 提取试剂盒进行血液样品基因组 DNA 的提取。



注: a. 天根公司试剂盒; b. QIAGEN 公司试剂盒;
c. 某生物公司的小量抽提试剂盒;
d. 某生物公司的磁珠法试剂盒(血液); M. DNA 标记

图 1 不同公司试剂盒提取的 DNA 电泳结果
Fig. 1 DNA electrophoresis results
of different corporations' kit

在 DNA 裂解环节,通过设计标准对照实验和空白对照实验考察样品的水解是否对 LC-MS/MS 灵敏度和分离度产生干扰。采用 DNA 提取试液加标准溶液作标准对照实验,采用 DNA 提取试液作空白对照实验。LC-MS/MS 分析结果显示:与标准样品的色谱图比较,标准对照色谱峰的灵敏度和分离度均较好;空白对照显示基线没有干扰峰,说明水解过程对 LC-MS/MS 分析没有影响。

2.2 质谱条件的优化

为提高目标化合物的响应,对质谱参数进行了优化。分别加入 5 μL 1 mg/L 的 5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 标准溶液,在正、负离子模式下, m/z 50~500 范围内进行全扫描,以

选择合适的准分子离子峰和电离方式。5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 在正离子模式下的响应较高,示于图 2。在选择离子监测模式下,优化了 5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 的锥孔电压值,使其响应达到最高;并在多反应监测模式下对 5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 的定量和定性离子的碰撞能量进行了优化,最终选用 m/z 142.0/124.0、112.0/95.0、126.0/109.0、115.0/97.0 分别作为 5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 的定量离子对;选用 m/z 142.0/81.0、112.0/69.0、126.0/83.0、115.0/70.0 分别作为对应的辅助定性离子对^[16]。

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 色谱柱的选择

Cyt、5mC 和 5hmC 都是

极性较强的化合物,在反相色谱柱中几乎没有保留,因而无法分离。HILIC 色谱柱对极性样品有很好的保留和分离能力,能满足极性较强的样品分析。此外,由于 HILIC 流动相含有高浓度的有机溶剂,有利于增强电喷雾质谱的离子化效率,从而提高分析灵敏度,与质谱具有很好的兼容性,为此,选择 HILIC 色谱柱分离这 3 个组分。

2.3.2 流动相的优化 为了优化 Cyt、5mC 和 5hmC 在 HILIC 色谱柱中的保留和分离条件,探讨了乙腈和水相的比例、甲酸铵溶液浓度及流动相流速对样品分离及灵敏度的影响。

在固定流速下,乙腈的比例升高,5hmC 的峰面积增加,但峰宽增大;然而,水相的比例升

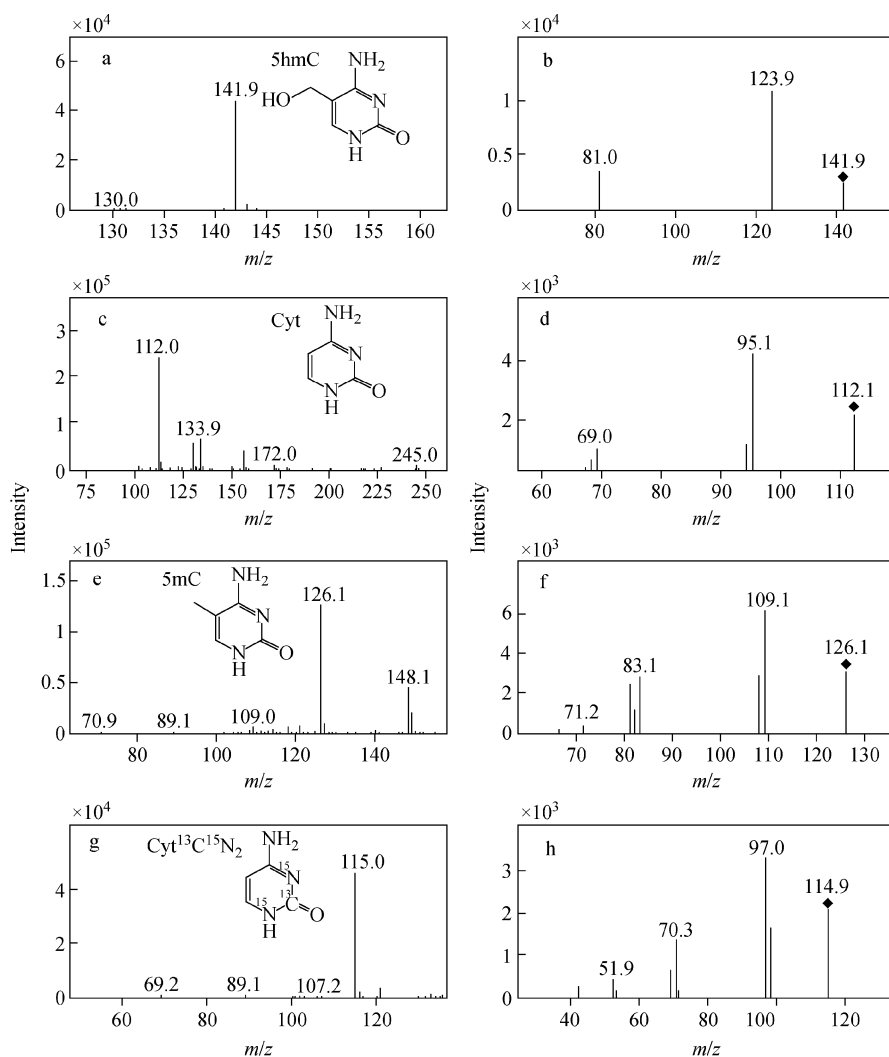


图 2 5hmC、Cyt、5mC 和 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 的全扫描(a, c, e, g)和子离子优化(b, d, f, h)图

Fig. 2 Full-scan(a, c, e, g) and product ion optimization(b, d, f, h) spectrogram of 5hmC, Cyt, 5mC and $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$, respectively

高,色谱峰的峰宽变小,但响应降低,出峰时间缩短,目标组分易受干扰。综合考虑上述因素,采用 1.4.1 节中的梯度洗脱程序进行洗脱。

在已优化的梯度洗脱条件下,分别配制 2.5、5、7、10、15 mmol/L 甲酸铵溶液的水相,考察 5hmC 的灵敏度和峰面积,发现甲酸铵浓度为 7 mmol/L 时,5hmC 的峰形、灵敏度、分离度及重现性较好。同时优化了流动相流速,结果表明,采用 7 mmol/L 甲酸铵水溶液和乙腈作为流动相,以 0.3 mL/min 流速进行梯度洗脱时,Cyt、5mC 和 5hmC 的分离度和灵敏度均较好,且这 3 个组分也没有相互干扰,色谱图示于图 3。

2.4 线性范围、检出限及定量限

分别配制 0.1、0.5、1、5、10、15、30 $\mu\text{g/L}$ 的 5hmC 标准溶液,各浓度标准溶液中内标 $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 的质量浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$,在优化条件下进行测定。本实验中 DNA 样品含有一定量的 5hmC,故采用标准溶液法绘制标准曲线。以 5hmC 的质量浓度($x, \mu\text{g/L}$)为横坐标,色谱峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得到 Cyt、5mC 和 5hmC 的回归方程列于表 1。Cyt、5mC 和 5hmC 的线性关系良好,相关系数均大于 0.99。以信噪比大于 3 确定样品的检出限(LOD),以信噪比大于 10 确定样品的定量限(LOQ),结果列于表 1。

2.5 重复性和精密度实验

取同一 DNA 样品在同一天 2、4、6、8、10 h 及第 1、2、3、4、5 d 进行重复测试;取 10 $\mu\text{g/L}$ 5hmC 标准溶液连续进样 6 次。结果表明,5hmC 测定值的日内相对标准偏差(RSD)和日间相对标准偏差分别为 3.42%和 4.12%,精密度 RSD 为 3.79%,说明方法的重现性和稳定性较好。

2.6 方法的回收率

为考察分析方法的准确性,在裂解瓶中分别加入 200 μL 25、5 和 1 $\mu\text{g/L}$ 的 5hmC 标准溶液,用 N_2 吹干,按 1.2.2 节 DNA 的水解及处理方法

操作,结果列于表 2。在不同的加标浓度下,Cyt、5mC 和 5hmC 的回收率均在 92%~103%之间,RSD 小于 7%,可见该方法的准确性较高。

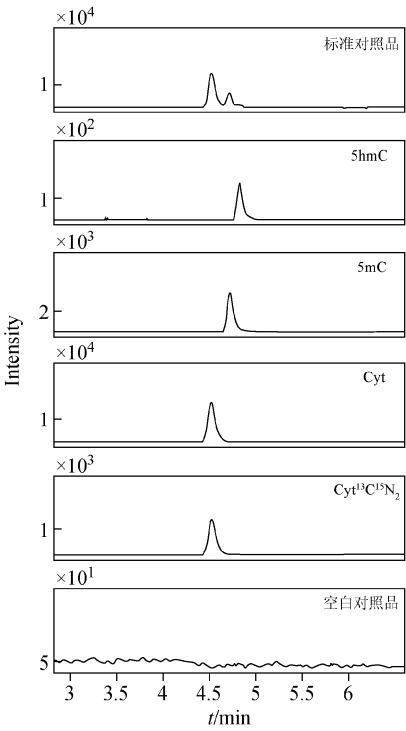


图3 化合物 Cyt, $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$, 5mC, 5hmC 的分离色谱图
Fig.3 Chromatographic separation of Cyt, $\text{Cyt}^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$, 5mC and 5hmC

2.7 血液样品分析

平行抽取 16 周龄 SPF 级的 SD 大鼠血液,按照 1.2 节的方法提取和处理样品,采用 LC-MS/MS 检测,并分别通过 2.4 节的线性方程得出 DNA 中 Cyt、5mC 和 5hmC 的摩尔浓度 M 。通过公式 $T = M_{5hmC} / [M_{\text{Cyt}} + M_{5mC} + M_{5hmC}] \times 100\%$ 计算 DNA 羟甲基化程度。结果表明,SD 大鼠血液基因组 DNA 中羟甲基化水平为 0.48%(RSD=3.42%, $n=10$),表明本方法适用于血液基因组 DNA 羟甲基化水平的分析。

表 1 Cyt、5mC 和 5hmC 的线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantification of Cyt, 5mC and 5hmC

化合物	线性方程	相关系数(R^2)	检出限/ $(\mu\text{g/L})$	定量限/ $(\mu\text{g/L})$
Cyt	$y=0.5158x-0.0669$	0.9999	0.001	0.005
5mC	$y=0.3813x+0.1951$	0.9978	0.050	0.100
5hmC	$y=0.1010x-0.0216$	0.9994	0.050	0.100

表 2 5hmC 加标回收率及精密度 ($n=6$)Table 2 Recoveries and precisions of 5hmC ($n=6$)

添加量/ng	测得量/ng	回收率/%	RSD/%
0.2	0.203 9 $\pm$ 0.013	102.19	6.2
1.0	0.925 1 $\pm$ 0.054	92.51	5.8
5.0	4.647 0 $\pm$ 0.188	92.91	4.0

3 结论

本研究建立了 LC-MS/MS 方法分析血液全基因组中的 5hmC,该方法可在 3 h 内完成 SD 大鼠血液中 5hmC 全过程的分析。结果表明,DNA 的甲酸水解方法较酶解法更节约样品处理时间,HILIC 柱适合保留和分离 Cyt、5mC 和 5hmC,该方法具有快速、灵敏、重现性好等优点,适用于血液中 5hmC 的分析检测。

参考文献:

- [1] TAHILIANI M, KOH K P, SHEN Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 [J]. *Science*, 2009, 324(5 929): 930-935.
- [2] JIN S G, WU X, LI A X, et al. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): 5 015-5 024.
- [3] ROBERTSON A B, DAHL J A, VAGBO C B, et al. A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8): e55.
- [4] JIN S G, KADAM S, PFEIFER G P. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(11): e125.
- [5] NESTOR C, RUZOV A, MEEHAN R, et al. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA [J]. *Biotechniques*, 2010, 48(4): 317-319.
- [6] KRIAUCIONIS S, HEINTZ N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain [J]. *Science*, 2009, 324(5 929): 929-930.
- [7] KIZAKI S, SUGIYAMA H. CGmCGCG is a versatile substrate with which to evaluate Tet protein activity[J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12(1): 104-107.
- [8] ALMEIDA R D, SOTTILE V, LOOSE M, et al. Semi-quantitative immunohistochemical detection of 5-hydroxymethyl-cytosine reveals conservation of its tissue distribution between amphibians and mammals[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(2): 137-140.
- [9] SONG C X, CLARK T A, LU X Y, et al. Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(1): 75-77.
- [10] TERRAGNI J, BITINAITE J, ZHENG Y, et al. Biochemical characterization of recombinant beta-glucosyltransferase and analysis of global 5-hydroxymethylcytosine in unique genomes[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(5): 1 009-1 019.
- [11] BOOTH M J, BRANCO M R, FICZ G, et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution [J]. *Science*, 2012, 336(6 083): 934-937.
- [12] WEN L, LI X, YAN L, et al. Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(3): R49.
- [13] 陈丽宇,张立坚,张良滔,等. 液相色谱-串联质谱分析组织中基因组脱氧核糖核酸羟甲基胞嘧啶水平[J]. *色谱*, 2012, 30(5): 533-537.
- CHEN Liyu, ZHANG Lijian, ZHANG Liang-tao, et al. Analysis of global deoxyribonucleic acid 5-hydroxymethylcytosine in tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30(5): 533-537.
- [14] ZHANG L, ZHANG L, ZHOU K, et al. Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(7): 877-884.
- [15] ZHANG L T, ZHANG L J, ZHANG J J, et al. Quantification of the sixth DNA base 5-hydroxymethylcytosine in colorectal cancer tissue and C-26 cell line[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(7): 839-845.
- [16] ZHANG J J, ZHANG L, ZHOU K, et al. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2011, 413(2): 164-170.