

组织中全基因组 DNA 甲基化的液相色谱-串联质谱分析

张俊杰, 张立坚, 刘春安, 张良滔, 蔡 春

(广东医学院, 广东 湛江 524023)

摘要:建立液相色谱-串联质谱测定组织中全基因组 DNA 甲基化水平的方法。采用苯酚氯仿提取组织 DNA, 提取的 DNA 用 88% 甲酸在 140 °C 下裂解, DNA 裂解液加入同位素胞嘧啶作内标, 经 N₂ 吹干后, 用甲醇溶解, 以液相色谱-串联质谱检测胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的含量, 并计算全基因组中 DNA 甲基化的水平。结果表明, 胞嘧啶的线性范围为 1~100 μg · L⁻¹, 相关系数为 0.997 4, 相对标准偏差为 0.70%~4.09%; 5-甲基胞嘧啶的线性范围为 1~50 μg · L⁻¹, 相关系数为 0.994 8, 相对标准偏差为 0.60%~4.81%。胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的检出限为 1 pg, 日内相对标准偏差为 1.86%~4.67%, 日间相对标准偏差为 3.72%~4.68%, 胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的加样回收率为 86.52%~105.14%。本研究所建立的方法检测组织中 DNA 甲基化程度, 具有专一性强、操作简便的优点, 能较好的满足全基因组 DNA 甲基化检测的要求。

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

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2010)06-0326-05

Analysis of Global DNA Methylation in Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Jun-jie, ZHANG Li-jian, LIU Chun-an, ZHANG Liang-tao, CAI Chun

(Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Global DNA methylation in tissue was determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). DNA was extracted by phenol-chloroform, hydrolyzed using 88% formic acid at 140 °C, spiked with cytosine-2, 4-¹³C₂, ¹⁵N₂ as internal standard, reconstituted in methanol and analyzed by LC-MS/MS with multiple reaction monitoring mode, to reflect the global DNA methylation level of the tissue. Results show that the limit of quantification is 1 μg · L⁻¹ for both Cytosine (Cyt) and 5-methylcytosine (5mCyt), and the linear ranges of calibration curve are 1—50 μg · L⁻¹ and 1—100 μg · L⁻¹ for 5mCyt and Cyt, respectively, with correlation coefficient higher than 0.99. The relative standard deviations (RSDs) are 0.70%—4.09% and 0.60%—4.81% for Cyt and 5mCyt, respectively. The intra-day precision expressed as RSD ranges from 1.86% to 4.67%,

收稿日期: 2010-06-30; 修回日期: 2010-09-29

作者简介: 张俊杰(1985~), 男(汉族), 广东东莞人, 硕士研究生, 药物分析与仪器分析专业。E-mail: zhjunjie357753@163.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

while the inter-day values from 3.72% to 4.68%. The recovery ratio of method varies from 86.52% to 105.14%. The method is simple, and can be used for detection of Cyt and 5mCyt, thus enabling the evaluation of global DNA methylation.

Key words: DNA methylation; liquid chromatography-tandem mass spectrum(LC-MS/MS); cytosine; 5-methylcytosine

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶介导,在碱基上结合一个甲基的化学修饰过程。高等生物中的甲基化以胞嘧啶 5 位甲基化为主。DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分,它是有核细胞特有的复制和转录后修饰,能够在不改变基因组中碱基排序的情况下影响基因转录和表达,它涉及到个体发育,细胞增殖、分化、基因印迹、X 染色体失活,基因表达调控和碱基突变等多方面的生物学功能^[1-4],特别是对肿瘤的发生和发展具有重要的生物学意义。肿瘤中 DNA 甲基化模式发生改变,表现为全基因组低甲基化和某些基因启动子 CpG 岛区的高甲基化。这种甲基化模式的改变与肿瘤变化的关系已成为肿瘤研究的一个热点。

DNA 甲基化的准确检测对于研究 DNA 甲基化变化极为重要。有文献^[5-7]报道, DNA 经酶解后,运用 LC-MS/MS 技术检测 5'-甲基胞嘧啶核苷和胞嘧啶核苷的含量,从而计算 DNA 甲基化程度。此外,也有文献^[8]报道, DNA 通过化学方法裂解后,采用 GC/MS 方法进行 5'-甲基胞嘧啶和胞嘧啶含量的检测。本工作使用化学方法将 DNA 裂解后,运用 LC-MS/MS 法测定 5'-甲基胞嘧啶和胞嘧啶的含量,评价 DNA 的甲基化程度,并用所建立的方法分析 6 例结肠癌病人肿瘤组织和正常结肠组织中全基因组 DNA 甲基化的变化。

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;UV-2100 型紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司产品;Aglient 1200-6430A 液相色谱-串联质谱仪:美国安捷伦公司产品。

胞嘧啶(cytosine, Cyt)和 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mCyt):购于 Sigma 公司;同位素胞嘧啶(cytosine-¹³C¹⁵N₂):购于 Toronto research chemicals inc.。

氯仿,异戊醇,十二烷基磺酸钠(SDS),无水

乙醇,甲酸,乙二胺四乙酸二钠(EDTA)和盐酸(HCl)均为分析纯;乙腈(色谱纯)/甲酸胺和甲酸(色谱纯);实验用水为 Milli-Q 超纯水;三羟甲基胺基甲烷(Tris)和 Tris 饱和酚为生化试剂。

1.2 储备液和工作液的配制

1.2.1 储备液的配制 准确称取 10 mg Cyt 和 5mCyt,用甲醇溶解定容至 250 mL,得 40 mg · L⁻¹ Cyt 和 5mCyt 标准储备液;取 10 mg Cyt¹³C¹⁵N₂内标物,用甲醇溶解后,置于 250 mL 容量瓶中,定容至刻度,得 40 mg · L⁻¹ Cyt¹³C¹⁵N₂标准储备液。所有储备液在 -20 °C 冰箱保存,待用。

1.2.2 工作液的配制 临用时取 Cyt 储备液,加入甲醇,稀释成浓度为 100、75、50、40、25、10、7.5、5、2.5 和 1 μg · L⁻¹工作液;取 5mCyt 储备液,加入甲醇,稀释成浓度为 50、40、25、10、7.5、5、4、2.5、1 和 0.5 μg · L⁻¹工作液;临用时取 40 mg · L⁻¹的 Cyt¹³C¹⁵N₂标准储备液,加入甲醇,稀释成浓度为 40 μg · L⁻¹的 Cyt¹³C¹⁵N₂内标工作液。

1.3 样品处理

取结肠癌病人手术后的少量肿瘤组织和肿瘤旁正常结肠粘膜组织,置于 -70 °C 冰箱保存。

1.3.1 DNA 提取 取 0.05 mg 组织,加入 0.12 mL 蛋白酶 K(20 g · L⁻¹)、4 mL Tris-HCl-EDTA(TE)缓冲液和 0.48 mL 10% SDS, 45 °C 水浴过夜,加入 V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1 进行提取,摇匀 6 000 × g 离心 5 min,取上清,重复提取 1 次;再加入 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1,摇匀 6 000 × g 离心 5 min;取上清加入 1/10 倍体积的 3 mol · L⁻¹醋酸钠和 2.5 倍的水乙醇,12 000 × g 离心 5 min,倒去溶液,加入 1 mL TE 缓冲液溶解。用紫外可见分光光度计检测 DNA 纯度,当 A_{260 nm}/A_{280 nm}=1.7~1.9 时,视为纯 DNA。若有 RNA 污染加入 RNase A,重复以上步骤。

1.3.2 DNA 裂解 取约 2.5 μg DNA 放入反

应瓶中,用 N_2 吹干,然后加入 0.2 mL 88% 甲酸,140 °C 反应 90 min,待其冷却至室温后,用 N_2 吹干,加入 400 μ L 甲醇溶解,15 000 \times g 离心 4 min,取上清液,LC/MS 分析。

1.4 仪器条件

1.4.1 液相色谱条件 BEH HILIC 色谱柱 (1.7 μ m \times 2.1 m \times 100 mm, Waters 公司产品);流动相:A 为 0.1% 甲酸铵,B 为乙腈;流速:0.4 mL \cdot min $^{-1}$;柱温为室温,进样量 5 μ L;洗脱程序:0~1 min A 为 10%,1~2 min A 从 10%变为 50%,2~2.5 min A 为 50%,2.5~8 min A 从 50%变为 10%。

1.4.2 质谱条件 电喷雾正离子电离模式,离子源温度 300 °C;喷雾电压 3.5 kV,喷雾气流量 9 L \cdot min $^{-1}$;入口电压:Cyt 和 5mCyt 为 114 V, Cyt $^{13}C^{15}N$ 为 115 V。采用多反应监测模式检测;碰撞能量:Cyt 和 5mCyt 为 20 V, Cyt $^{13}C^{15}N$ 为 16 V。Cyt 定量离子 m/z 112/95,辅助定量离子 m/z 69;5mCyt 定量离子 m/z 126/109,辅助定量离子 m/z 83; Cyt $^{13}C^{15}N$ 定量离子 m/z 115/97,辅助定量离子 m/z 115/70。

1.5 数据处理

采用内标法定量,以 $w(5mCyt)/[w(5mCyt)+w(Cyt)]\times 100\%$ 的方式表示 DNA 甲基化程度,Excell 进行统计分析。

2 结果

2.1 5mCyt 和 Cyt 质谱图

分别加入 5 μ L 1 mg \cdot L $^{-1}$ Cyt,40 μ g \cdot L $^{-1}$ Cyt $^{13}C^{15}N_2$ 和 1 mg \cdot L $^{-1}$ 5mCyt 标准溶液,经 LC-MS/MS 分析,其质谱图示于图 1。图 1 中, m/z 112($[M+H]^+$)、 m/z 115($[M+H]^+$) 和 m/z 126($[M+H]^+$) 分别为 Cyt, Cyt $^{13}C^{15}N_2$ 和 5mCyt 分子离子峰; m/z 112/95 和 m/z 126/109

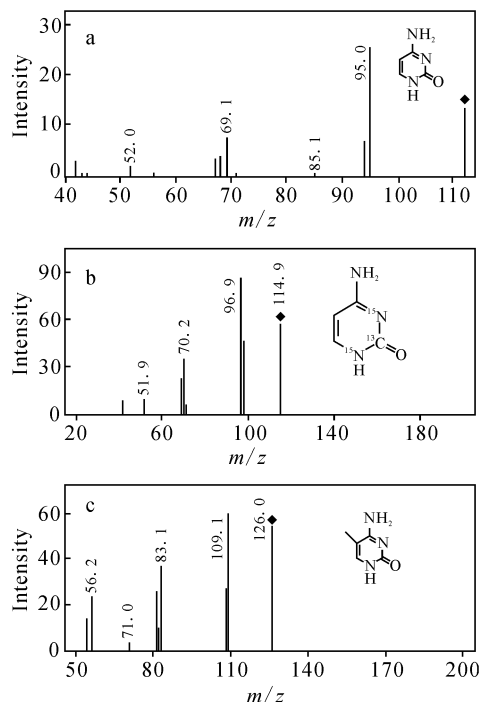


图 1 Cyt(a)、Cyt $^{13}C^{15}N_2$ (b) 和 5mCyt(c) 的子离子图
Fig. 1 Product ion scan of Cyt(a), Cyt $^{13}C^{15}N_2$ (b) and 5mCyt(c)

分别为 Cyt 和 5mCyt 的主要碎片离子,因此选用 m/z 112/95 和 126/109 作为 Cyt 和 5mCyt 的定量检测。

2.2 Cyt 和 5mCyt 色谱条件

实验中所需分离的嘧啶为碱性物质,因此采用适合于低 pH 值流动相的 HILIC 柱,对甲酸铵-乙腈、乙腈-甲酸溶液等多种流动相进行实验。结果表明,以乙腈-0.1% 甲酸铵溶液为流动相,流速 0.4 mL \cdot min $^{-1}$;洗脱条件:0~1 min A 为 10%,1~2 min A 从 10%变为 50%,2~2.5 min A 为 50%,2.5~8 min A 从 50%变为 10%时得到的峰形最好,示于图 2。

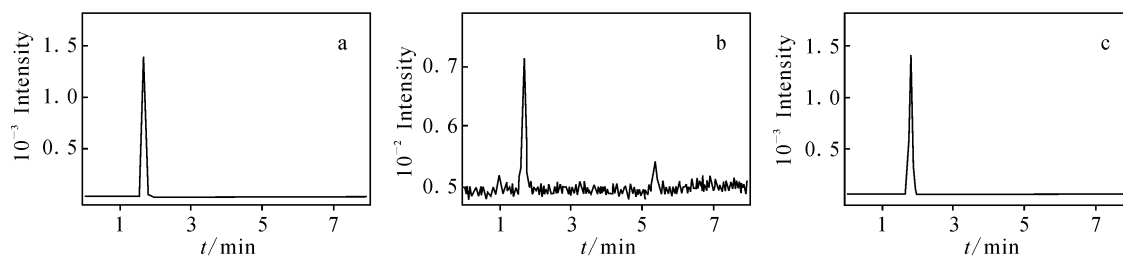


图 2 标准品 Cyt(a), Cyt $^{13}C^{15}N_2$ (b) 和 5mCyt(c) 的 MRM 图
Fig. 2 MRM of Cyt(a), Cyt $^{13}C^{15}N_2$ (b) and 5mCyt(c) in standard solution

2.3 线性范围及精密度实验

混合标准液包括 5mCyt 和 Cyt,其中质量浓度系列为 0.5、1、2.5、4、5、7.5、10、25、40 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,Cyt 质量浓度系列为 1、2.5、4、5、7.5、10、25、40、50、75 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,加入 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cyt¹³C¹⁵N₂ 作内标,进样 5 次。分别以 Cyt 和 5mCyt 质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并以信噪比为 3 确定样品的最低检测限。结果表明,Cyt 和 5mCyt 的检出限为 1 μg ,Cyt 的线性范围为 1~100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,标准曲线为 $y=1.2580x-0.6255$,相关系数 R^2 为 0.9974,相对标准偏差 RSD 为 0.70%~4.09%;5mCyt 的线性范围为 1~50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,标准曲线为 $y=1216.6212x-593.6998$,相关系数 R^2 为 0.9948,相对标准偏差 RSD 为 0.60%~4.81%。

2.4 重现性实验

取同一样品,按 1.3 方法制备 3 份,测定 Cyt 和 5mCyt 两个色谱峰相对丰度的 RSD 列于表 1。

表 1 定量测定结肠癌组织中 Cyt 和 5mCyt 的重现性

Table 1 Reproducibility of Cyt and 5mCyt in colon cancer

份数	Cyt/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	5mCyt/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
1	31.479 8	1.514 9
2	31.865 9	1.525 6
3	32.283 6	1.491 2
RSD/%	1.261 1	1.165 4

2.5 稳定性实验

取同一 DNA 样品试液,在 -20 °C 分别保存 2、4、6、8、10 h 后,测定 Cyt 和 5mCyt 两个定量质谱峰相对丰度的 RSD 分别为 1.86% 和

4.67%。

取同一 DNA 样品试液,在 -20 °C 分别保存 1、2、3、4、5 d 后,测定 Cyt 和 5mCyt 两个定量质谱峰相对丰度的 RSD 分别为 3.72% 和 4.68%。

2.6 回收率实验

取同一结肠癌病人的肿瘤 DNA 溶液,经 88% 甲酸在 140 °C 下裂解后,分别加入 400 μL 50、10、1 和 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cyt 和 5mCyt,N₂ 吹干,加入甲醇溶解,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,用于 LC/MS 分析。测定 Cyt 回收率分别为 87.38%、105.14% 和 96.18%;5mCyt 回收率分别为 89.58%、86.52% 和 94.52%,其结果列于表 2。

2.7 结肠癌组织样品分析

利用上述方法检测了 6 例结肠癌组织中 DNA 甲基化水平,结肠癌患者正常组织和肿瘤组织甲基化分析结果列于表 3。实验结果表明,癌组织的甲基化水平低于相应的正常组织,这与文献^[9]报道一致,说明本方法可以很好地用于全基因组 DNA 甲基化水平的检测。

表 2 样品添加回收率实验 ($n=3$)

Table 2 Recoveries of Cyt and 5mCyt from spiked samples ($n=3$)

样品	样品量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	加标量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	测定平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%
Cyt		1	30.39	87.38
	29.49	10	40.00	105.14
		50	77.58	96.18
5mCyt		1	2.03	89.58
	1.14	10	9.79	86.52
		50	48.40	94.52

表 3 结肠癌和正常组织样品甲基化分析结果

Table 3 Results of contents in colon cancer tissues and normal tissues

样品	正常组织	肿瘤组织
Cyt/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	29.800 1~32.283 6	29.852 6~31.105 3
5mCyt/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.529 0~1.879 7	1.029 7~1.454 7
5mCyt/(Cyt+5mCyt)/%	4.88%~5.50%	3.33%~4.46%

3 讨论

目前检测基因组 DNA 甲基化主要有 SssI 甲基转移酶法和测序法,其中 SssI 甲基转移酶法由于 SAM 和 SssI 甲基转移酶性质不稳定,易造成实验结果误差比较大,必须设立自身对照来标化实验数据;测序法需要大量的克隆测序,较为繁琐^[10]。最近报道^[11-13],LC-MS/MS 测定嘧啶核苷,此方法需要核酸酶、磷酸二酯酶和碱性磷酸酶等酶水解 DNA,由于酶活性的影响可能存在由于酶解不完全带来的误差。另有报道^[8]将 DNA 用化学方法裂解为嘧啶后,通过衍生用 GC/MS 测定甲基化胞嘧啶和胞嘧啶的含量,该方法中嘧啶的衍生增加了操作的难度。本方法通过化学裂解 DNA,既排除酶解法可能带来的误差,又不需要衍生,大大简化了操作。

胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶在 C 18 柱上没有保留,改变洗脱溶剂也无法解决,改用适合碱性化合物分析的 HILIC 柱后,胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶实现了分离,并发现 HILIC 柱比 C 18 柱的灵敏度高,这可能与 HILIC 柱使用高比例有机相有关。

用乙腈和 0.1% 甲酸作为流动相时,胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶在柱上的保留时间基本相同;当用 pH 4.5~6 的乙酸-乙酸铵缓冲液作流动相时,色谱峰发生分岔的现象;而用 pH 3.6 的乙酸-乙酸铵缓冲液作为流动相,色谱峰没有分岔,但是重现性不好,提示 pH 值和缓冲体系对胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的分析影响比较大;当改用乙腈和 0.1% 甲酸铵水溶液作流动相时,胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶基本分离,且重现性较好。

参考文献:

- [1] BOUMIL R M, LEE J T. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(20): 2 225-2 232.
- [2] LIM H N, VAN O A. A multistep epigenetic switch enables the stable inheritance of DNA methylation states [J]. *Nat Genet*, 2007, 39 (2): 269-275.
- [3] FLANAGAN J M, POPENDIKYTE V, POZDNIAKOVAITE N, et al. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(1): 67-84.
- [4] SHA K. A mechanistic view of genomic imprinting[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 197-216.
- [5] SONG L, JAMES S R, KAZIM L, et al. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(2): 504-510.
- [6] FRISO S, CHOIS W, DOLNIKOWSKI G G, et al. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(17): 4 526-4 531.
- [7] KOK R M, SMITH D E, BARTO R, et al. Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(7): 903-911.
- [8] ROSSELLA F, POLLEDRI E, BOLLATI V, et al. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(17): 2 637-2 646.
- [9] HERNANDEZ-BLAZQUEZ F J, HABIB M, DUMOLLARD J M, et al. Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis [J]. *Gut*, 2000, 47(5): 689-693.
- [10] 李海飞. DNA 甲基化的分析与状态检测[J]. *医学综述*, 2004, 10(3): 131-133.
- [11] QUINLIVAN EP, 3rd GJF. DNA methylation determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using novel biosynthetic [¹⁵N]deoxycytidine and [¹⁵N]methyldeoxycytidine internal standards[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(18): e119.
- [12] LIU Z, LIU S, XIE Z, et al. Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(5): e31.
- [13] MA H, ZHANG W, SONG R, et al. Characterization of methylated and unmethylated CpG-ODNs by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, 2005, 11(6): 581-589.