

HPLC 法研究 DNA 及其甲基修饰物的酸性介质降解*

龙耀庭 赏 珩 杨广红** 沈 彤** 陆妙琴

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 用 HPLC 梯度洗脱法研究了 DNA 在盐酸、高氯酸、三氯乙酸、三氟乙酸以及甲酸等酸性介质中的降解碱基的分离和确定。给出了 MNU 与 DNA 的加合产物的降解产率。对流动相组成、流率、柱温、梯度速率、pH 值、盐浓度以及缓冲液浓度对容量因子(K')的影响分别进行了讨论。结果表明, DNA 在盐酸介质中可以得到最好的碱基回收率, MNU 与 DNA 的加合产物在 1 mol/L 盐酸介质中、20 min 条件下, 可获得较好的碱基回收效果。

关键词 高效液相色谱, DNA, 亚硝基脒, 降解。

化学致癌的分子生物学机制表明, 化学致癌物进入细胞内与 DNA 上的碱基(鸟嘌呤, 腺嘌呤, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶)的活性部位形成各种取代修饰物。它是化学致癌的关键一步^[1]。全面了解 DNA 的降解性质, 对于研究核酸以及与之有关的分子毒理学研究都是十分有用的。尽管过去陆续有过 DNA 降解方面的报道^[1-3], 但是大多不太系统, 方法也比较费时费事。本工作采用反相高效液相色谱(HPLC)分析法, 较系统地研究了 DNA 在盐酸, 高氯酸, 三氯乙酸, 三氟乙酸以及甲酸等酸性介质中深度降解至碱基的效果, 同时在此基础上, 研究了 DNA 与化学致癌物 MNU 和 DNA 加合产物在盐酸介质中的降解情况。本工作还观察了降解时间对这些降解过程的影响。

1 实验部分

1.1 仪器

(1) 高效液相色谱仪, PERKIN-ELMER 公司; 紫外检测器 LC-15B, 波长 254 nm; 高压泵, LC-65T; 显示器, SERIES 3B; 记录仪, Shimadzu C-RIB; 色谱柱, RP-18 10 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm。(2) 超声波清洗器。(3) 超级微量恒温器 HW-8B 型, 浙江省永嘉分析仪器厂。

1.2 试剂及标样

(1) 甲醇、磷酸二氢钾、氢氧化钾、磷酸、

三氟乙酸、三氯乙酸、甲酸、盐酸、高氯酸均为分析纯, 北京化工厂生产。(2) 鸟嘌呤(G), 含量不少于 98%, 上海试剂二厂。(3) 腺嘌呤(A)、腺苷(A')、鸟苷(G')、脱氧鸟苷(dG')、脱氧腺苷(dA')、脱氧胸苷(dT')、胞嘧啶(C)、胞苷(C')、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。(4) 1-甲基鸟苷(1-MG')、7-甲基鸟苷(7-MG')、7-甲基鸟嘌呤(7-MG)、6-羟基-2-甲基氨基嘌呤(N-MG、DNA 和甲基亚硝基脒(MNU)), 均为美国 Sigma 公司生产。

1.3 方法

(1) 标样溶液配制 分别取各固体单样, 配成约为 0.01 mmol/L 的水溶液作为单组分标样, (鸟嘌呤和脱氧鸟苷为 3×10^{-3} mmol/L)。然后分别取标准单样配成浓度均约为 10^{-3} mmol/L 的混合样。

(2) MNU-DNA 加合物的制备见文献[4]。

(3) 流动相 甲醇: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲体系(pH3—7; 甲醇: 0.02 mol/L 磷酸二氢铵缓冲体系(pH2.3); 甲醇: 0.01 mol/L 三氯乙酸体系(pH3.2)。

(4) 用梯度洗脱的方法, 比较不同流动相组成对 K' 值的影响。

* 国家自然科学基金资助项目

** 91、92 届北京大学分校毕业生

收稿日期: 1994-10-20

(5) 作流动相流速、梯度变化、pH 变化及柱温变化对分离的影响。梯度变化范围为 $0.5\% \cdot \text{min}^{-1}$ — $6\% \cdot \text{min}^{-1}$ ，线性扫描。

(6) 在最佳操作条件下，测定 DNA-MNU 在盐酸、高氯酸、甲酸、三氟乙酸、三氯乙酸等酸性介质中的水解产物。

2 结果和讨论

2.1 流动相组成对分离的影响

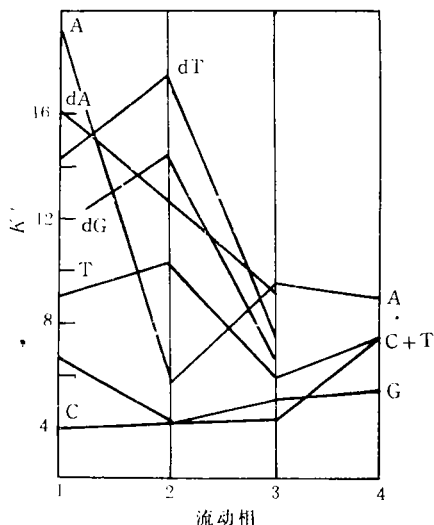


图 1 流动相组成对组分 K' 值的影响

流动相 1 为 $1\% \cdot \text{min}^{-1}$ 甲醇- 0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲体系 pH5.6；流动相 2 为 $1\% \cdot \text{min}^{-1}$ 甲醇- 0.02 mol/L 磷酸二氢铵缓冲体系 pH2.3；流动相 3 为 $3\% \cdot \text{min}^{-1}$ 甲醇- 0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲体系 pH5.6；流动相 4 为 $3\% \cdot \text{min}^{-1}$ 甲醇- 0.01 mol/L 三氯乙酸缓冲体系 pH3.2；柱温 30°C 流速 1.5 ml/min

用梯度淋洗的方法，选用 3 种不同组成的淋洗液，比较流动相组成对 K' 值的影响。实验结果示于图 1。

由图 1 可以看出，改变流动相组成，对某些组分的保留值会产生明显影响。以流动相 1 与流动相 2 比较，对胞嘧啶和胸腺嘧啶的 K' 值无大影响，而对其它组分的 K' 值都产生一定影响。如：鸟嘌呤的 K' 值明显降低，脱氧鸟苷和脱氧胸苷的 K' 值略有升高，而影响最大的是腺嘌呤和脱氧腺苷，二者 K' 值显著降低，并使出峰顺序发生了改变。腺嘌呤提前到 4 个组分之

前出峰，脱氧腺苷提前到 2 个组分之前出峰。当流动相 1 换成流动相 3 时，腺嘌呤和鸟嘌呤的 K' 值变化较小，胸腺嘧啶的 K' 值略有增加，胞嘧啶的 K' 值明显增加且与胸腺嘧啶的 K' 值相等，两者不能分开。

相比较，流动相 1 体系分离效果最好。当磷酸二氢钾缓冲液浓度在 0.01 — 0.02 mol/L 内，pH=5.6 时，各组分基本达到基线分离(图 2)。

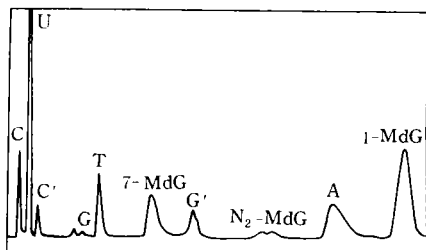


图 2 10 组分混合样色谱分离图

3.2 流动相流速、梯度及 pH 对 K' 值的影响

实验结果表明(图 3)，随着流速的增加， K' 值减小。流速在 0.5 — 1.5 ml/min 范围内，流速增大， K' 值变化较大，各组分的分离越趋完全。当流速在 1.5 — 2.0 ml/min 范围内， K' 值随流速变化很小，各组分的分离较为满意，因此实际选择流速为 1.5 ml/min 。

随着流动相梯度增大，甲醇浓度升高，使各个组分的 K' 值下降，并且对各组分的保留行为有一定影响(图 4)。当梯度在 $0.5\% \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $1\% \cdot \text{min}^{-1}$ 时，腺嘌呤和脱氧腺苷刚能分辨，其它组分能完全分开。但出峰时间太长，色谱峰太宽。当梯度在 $3\% \cdot \text{min}^{-1}$ 时，各组分分离情况最好。

流动相的 pH 值变化，会对组分 K' 值产生影响，这种影响，在很大程度上取决于各组分的 pK 值。由于各组分的 pK 值不同，因此 pK 值变化对各组分的保留行为会产生不完全相同的影响。

对于碱基、胞嘧啶、鸟嘌呤和腺嘌呤，其 pK 分别为 4.45、3.20 和 4.15。因多数碱基的 pK 均在硅胶填料的一般工作范围(2—7)之外，因此 pK 的作用很小。

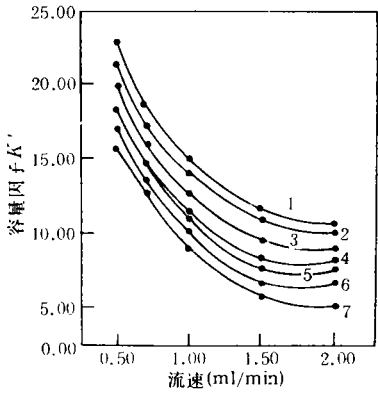


图 3 流动相流速对 K' 的影响

1. 腺嘌呤(A) 2. 腺苷(A') 3. 胸苷(T') 4. 鸟苷(G')
5. 胸腺嘧啶(T) 6. 鸟嘌呤(G) 7. 胞嘧啶(C)

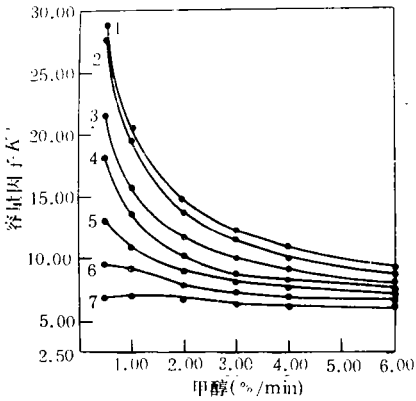


图 4 组分 K' 值随流动相梯度的变化

1. 腺嘌呤(A) 2. 腺苷(A') 3. 胸苷(T') 4. 鸟苷(G')
5. 胸腺嘧啶(T) 6. 鸟嘌呤(G) 7. 胞嘧啶(C)

本实验流动相 pH 从 3.0 到 7.0 之间变化，其 A、T、G、C 的 K' 值变化见图 5。

由图 5 可见，当流动相 pH 在 4.0—6.0 范围内变化时，A、T、G、C 组分的 K' 值变化不大，且相互分离也比较满意。

3.3 柱温对分离的影响

温度变化对 K' 值影响较大，在 25—50℃ 之间，随温度升高各组分的 K' 值明显降低。当温度升至 50℃ 时，某些组分就不能分开，如腺嘌呤和脱氧腺苷，胸腺嘧啶和脱氧鸟苷都分不开。在 25—40℃ 范围内，一般分离都比较满意。

3.4 盐浓度对分离的影响

由图 6 可见，氯化钾、磷酸二氢钾溶液在误差允许范围内浓度变化，对各组分的 K' 值基本无影响。

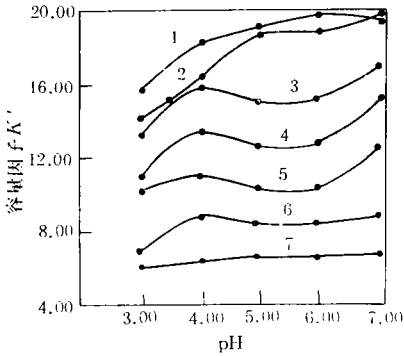


图 5 流动相 pH 值对 K' 值的影响

1. 腺嘌呤(A) 2. 腺苷(A') 3. 胸苷(T') 4. 鸟苷(G')
5. 胸腺嘧啶(T) 6. 鸟嘌呤(G) 7. 胞嘧啶(C)

3.5 盐酸、甲酸、高氯酸、三氯乙酸、三氟乙酸水解 DNA 的碱基回收

DNA 的水解步骤为^[4]：分别取 100 mg 的 DNA 和 10 mol/L 相应的酸性介质，在 100℃ 下安培瓶内密封，分别加热 10、20、40 和 60 min。其碱基含量结果列于表 1。在盐酸的情况下，1 mol/L 盐酸水解的碱基回收效果优于 0.1 mol/L 的盐酸。但无论哪种盐酸浓度，都是在 20—40 min 的水解时间范围为最好。过长的水解时间会导致某些自由碱基回收率的降低。其中腺嘌呤的降低最为明显。故本实验中 DNA 在其它酸性介质的水解时间均不超过 40 min。

从表 1 所得结果可以看出，盐酸介质可以得到较高的胸腺嘧啶回收，而三氟乙酸及甲酸可以获得较高的鸟嘌呤的回收率，但其它自由碱基的回收率则不如另外几种酸介质。

3.6 MNU 与 DNA 的加合产物的水解

选择 1 mol/L 盐酸介质进行 MNU 与 DNA 的加合产物水解效率的研究。表 2 给出了 MNU 与 DNA 的加合产物(一种重要的 DNA 烷基化产物)在 1 mol/L 盐酸介质下水解的分析结果。表明，MNU-DNA 加合产物的碱基与水解时间的关系很大。水解时间太长对修饰碱基的回收不利。20 min 水解时间可以得到较好的回收率。

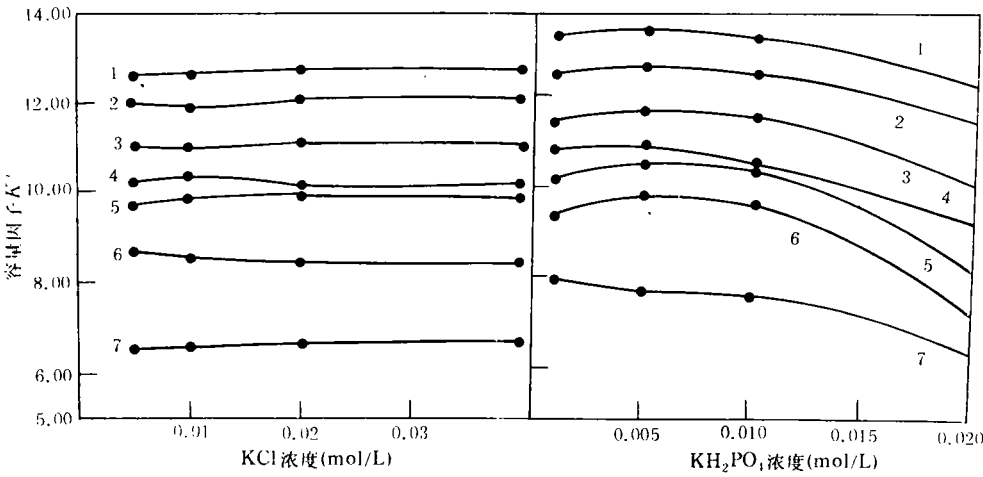


图 6 盐浓度对 K' 值的影响

1. 腺嘌呤(A) 2. 腺苷(A') 3. 胸苷(T') 4. 鸟苷(G') 5. 胸腺嘧啶(T) 6. 鸟嘌呤(G) 7. 胞嘧啶(C)

表 1 DNA 在酸性介质中水解的 HPLC 分析结果

介 质	时间 (min)	胞嘧啶 (C)	鸟嘌呤 (G)	胸腺嘧啶 (T)	腺嘌呤 (A)
0.1 mol/L HCl(100℃)	20	43.5	80.9	98.2	99.6
	40	50.0	69.0	81.3	91.7
	60	70.8	68.8	79.8	39.5
1.0 mol/L HCl(100℃)	20	97.3	95.7	92.7	96.8
	40	101.2	100.4	98.5	89.7
	60	90.8	77.5	99.8	71.4
10 mol/L 高氯酸(100℃)	40	89.9	92.6	91.7	94.4
7 mol/L 三氯乙酸(100℃)	40	41.1	45.8	11.8	13.6
8 mol/L 三氟乙酸(155℃)	40	99.9	95.5	45.6	32.7
10 mol/L 甲酸(175℃)	40	69.7	79.8	68.5	71.2

表 2 水解时间对碱基回收的影响¹⁾

碱 基	水解时间(min)	
	20	60
7-MG	1.6	0.2
G	1.8	0.9
A	2.6	1.1
C	12.0	2.6
T	13.2	3.1

1) 以峰高表示, 1 mol/L 盐酸介质

4 小结

DNA 及其致癌加合产物 MNU-DNA 水解产物在甲醇-磷酸二氢盐流动相体系下可以获得

好的 HPLC 分离。HPLC 的分析结果表明, DNA 在所研究的 5 种酸性介质: 盐酸, 高氯酸, 三氯乙酸, 三氟乙酸和甲酸中, 盐酸介质(0.1—1.0 mol/L、20—40 min 条件下), 可以得到最好的碱基回收率。MNU 与 DNA 的加合产物在 1 mol/L 盐酸介质中, 20 min 条件下可获得较好的碱基降解效果。

参考文献

1 龙耀庭. 环境科学进展. 1993, 1(4): 24
2 Vischer E, Chargaff E. J. Biol. Chem.. 1948, 176: 703
3 Chargaff E, Magasank B et al.. J. Am. Chem. Soc. 1949, 71: 1513
4 龙耀庭. 质谱学报. 1994, 15(3): 58

matter to form chloroform, the production of which increases with an increase in COD, pH, and chlorine dosage. The level of chloroform would exceed the national drinking water quality standard ($60 \mu\text{g/L}$), 48 hours after dosing 7 mg/L chlorine to water with a COD of 3 mg/L chlorine dioxide does not react with organic matter to form chloroform. After adding 11.33 mg/L of chlorine dioxide to a water having a COD of 2.67 mg/L for 48 hours, the level of chloroform was below detection limit. Moreover, a combined use of chlorine dioxide and chlorine can inhibit the formation of chloroform. However, chlorine dioxide was not able to remove chloroform already present in water.

Key words: chlorine dioxide, water disinfection, chloroform.

Study on the Degradation of DNA in an Acidic Medium by HPLC Using Gradient Elution. Long Yaotin et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16** (3), 1995, pp. 35–38

The determination and separation of bases from the degradation products of DNA in hydrochloric acid, perchloric acid, trichloroacetic acid, trifluoroacetic acid and formic acid were described. The hydrolysis yields of DNA adduct products of MNU also were presented. The effects of mobile phase composition, flow rate, column temperature, gradient ramp, pH value, salt concentration, and buffer concentration on capacity factors (K') were respectively discussed. The experimental results showed that hydrochloric acid is a favorable hydrolytical medium for DNA degradation and high recovery of DNA bases can be obtained. The optimum hydrolytical conditions for adduct products of DNA of MNU were 1 mol/L hydrochloric acid, 20 min, and $80\text{--}100^\circ\text{C}$.

Key words: HPLC, DNA, MNU, adduct.

A Study on Technology for Solidification of Pulverized-Coal Ash and Its Application. Guo Qingyun (Nanjing Institute of Environmental Protection Science for Electric Power, Ministry of Electricity Industry, Nanjing 210031); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4) 1995, pp. 39–41

Test and research have been made on a solidification technology for pulverized ash to be used in suppressing dust of ash ponds or landfills for coal-fired power plants. As a result, two series of ash-stabilizing agent have been already developed. The solidified ash has a compressive strength over

16 kg/cm^2 , with a maximum of 70 kg/cm^2 , and stability coefficients in water and in freezing state are over 0.90 and even up to 1.00. This process is highly efficient in dust suppression, durable in operation, low in cost, abundant in raw material supply, simple in application, and easy in popularization. It can be used for ash ponds or landfills in operation or being full, for reinforcing ash dykes and for preventing permeation of ash ponds.

Key words: solidification technology, pulverized-coal ash, stabilizing agent, stability coefficients.

Preliminary Study on the Biological Effects of Lignin Dressing Seed on Plant Growth. Fan Xiuying et al. (EIA Unit, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995, pp. 42–45

Lignin, extracted from the black liquor discharged from small and medium-sized pulp and paper mills, was used as a seed dressing agent to coat seeds at a rate of 0.4% by weight of seed and at pH 7.8, and the dressed seeds were grown in experimental plots containing a sand and soil culture and in fields. The results show that the seed dressing increased the rate of seed germination, accelerated the development of root systems, enhanced the effective tillering of wheat, increased the resistance to drought and to pests, the number of seeds in a single ear, and the weight per thousand seeds, and thus raised the yield. The treated wheat and maize grown in all experimental fields in Shandong and Hebei provinces and in Beijing were found to have an over 10% increase in yield as compared to control. The biological effects of seed dressing were found to be closely related to the process of extracting lignin from black liquor, the source of pulping raw materials, the rate of dressing agent used, the pH value of dressing solution, the variety of crops and the fertility of soil. The cost of lignin as a seed dressing agent is low due to its being from pulping waste and the dressing technology is quite simple, environmentally sound and easy to be diffused for agricultural purpose.

Key words: lignin, pulping waste, waste recycle, seed dressing agent, wheat, maize.

Development of A Concrete Water-Reducing Admixture Using Lignin from Alkaline Wheat Straw Pulping Black Liquor. Fan Yaopo et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(4), 1995,