

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用 测定 DNA 分子中 4 种脱氧核苷酸

梁峰^{1,2} 李玉兰*¹ 陆文伟³ 谈明光¹ 张桂林¹ 李燕¹

¹(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

²(中国科学院研究生院, 上海 201800) ³(上海交通大学, 上海 200030)

摘要 建立了用反相离子对色谱和电感耦合等离子体质谱的联用技术同时测定 DNA 分子中 4 种脱氧核苷酸的含量。液相流动相最佳条件是: pH 4.8, 甲醇 2.5%, 10 mmol/L NH_4Ac 。为了避免直接测定 ^{31}P 时 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 等复合离子的干扰造成信噪较差的问题, 利用碰撞-反应池技术 (CCT) 加入 O_2 和 ^{31}P 生成 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}$ 复合离子后测定该复合离子的信号可提高测定磷的信噪比。使用该联用技术测定 4 种脱氧核苷酸的检出限分别为 0.211 $\mu\text{mol/L}$ (dCMP)、0.204 $\mu\text{mol/L}$ (dTMP)、0.173 $\mu\text{mol/L}$ (dGMP) 和 0.225 $\mu\text{mol/L}$ (dAMP), 并且测定经过核酸酶酶解的质粒 DNA 后生成的 4 种脱氧核苷酸的含量分别是: $152.9 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ (dCMP)、 $228.2 \pm 4.0 \mu\text{mol/L}$ (dTMP)、 $125.3 \pm 3.0 \mu\text{mol/L}$ (dGMP) 和 $222.9 \pm 3.3 \mu\text{mol/L}$ (dAMP)。

关键词 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱, 核苷酸检测, 碰撞池技术

1 引言

磷元素是组成生物体的重要元素之一, 在生命体细胞中的信号传导、蛋白磷酸化及能量代谢等生命过程中起着重要的作用。生命遗传物质 DNA 和 RNA 的基本单位脱氧核苷酸就由磷酸、核苷组成。遗传物质 DNA 经生物酶催化水解反应生成脱氧腺苷酸 (dAMP)、脱氧鸟苷酸 (dGMP)、脱氧胞苷酸 (dCMP) 和脱氧胸苷酸 (dTMP) 4 种脱氧核苷酸。通常测定生物体中与磷相关的生理生化过程用 ^{32}P 和 ^{33}P 测定 β 射线^[1]。除了放射性标记方法外, 还可以用 ICP-AES 等技术测定生物样品中的总磷含量^[2]。由于生命过程中磷的存在形式各不相同, 不同形式的磷对生命活动起着不同的作用。利用 ICP-AES 只分析样品中总磷已无法满足相关的研究。目前已有研究利用高效液相和 ICP-SF-MS 联用检测磷来测定 DNA 加合物和经过修饰的核苷酸^[3]。Wind^[4] 等研究利用毛细液相色谱和 ICP-SF-MS 联用研究磷酸化蛋白的磷酸过程。由于受到磷的一级电离能很高 (10.5 eV), 电离效率较低以及多原子离子 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 等的干扰, 常规的四极杆 ICP-MS 检测磷受到限制。近几年发展了碰撞-反应池技术可解决多原子离子干扰的问题, 从而使 ICP-MS 在生命科学分析研究中能够更好的发挥作用。目前采用两种解决方法: 一种方法是加入如 H_2 或者 He 等气体减少干扰离子。Proffrock 等^[5] 利用 He 作为碰撞气结合比较了毛细管电泳-ORS-ICP-MS 与高效液相-ORS-ICP-MS 测定 4 种脱氧核苷酸。第二种方法是利用反应气和被测离子反应生成新的复合离子, 这种复合离子在检测时受到其它离子的干扰较少。已有报道利用氧气和 ^{31}P 反应生成 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 测定 P 的含量^[6]。

为了发展 ICP-MS 检测 DNA 样品中 4 种脱氧核苷酸的方法, 本研究利用 HPLC 分离 4 种脱氧核苷酸, 再利用 ICP-MS 结合碰撞反应池 (CCT) 技术加入 O_2 形成 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 检测分离得到的脱氧核苷酸, 利用上述方法测定了质粒 DNA 经过酶解后的产物中的 4 种脱氧核苷酸。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

PU2080i 高效液相色谱输液泵 (日本 Jasco 公司), 带有 20 μL 定量环的 Rheodyne 9725 型手动进样阀 (美国 Rheodyne 公司) 和 Lichrosorb RP18 反相色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 迪马公司)。X-7

2007-10-28 收稿; 2007-12-03 接受

本文系国家自然科学基金委重大项目 (No. 10490182)、国家自然科学基金面上项目 (No. 10675159) 和中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (No. KJCX3. SYW. N3) 资助

* E-mail: ly@sinap.ac.cn

电感耦合等离子体质谱仪(美国 Thermo Elemental公司); A-10型 MilliQ 超纯水装置(Millipore公司); PHS-3C pH计(上海精密科学仪器有限公司)。

2-脱氧胸苷-5-单磷酸二钠盐(dTMPNa, 纯度 $\geq 99\%$)、2-脱氧胞苷-5-单磷酸(dCMP, 纯度 $\geq 99\%$)购于 Hongene 生物技术有限公司、2-脱氧鸟苷-5-单磷酸(dGMP, 纯度 $\geq 97\%$)、2-脱氧腺苷-5-单磷酸(dAMP, 纯度 $\geq 98\%$)购于 SIGMA 公司、乙酸铵(ACROS 纯度 $\geq 97\%$)、冰醋酸(电子级, 苏州联创新材料有限公司); 甲醇(Scharlau, HPLC 级); S1 Nuclease(上海生物工程有限公司); pBR322DNA(上海华美生物工程公司)。高纯氧(纯度 $\geq 99.999\%$, 上海宝钢普莱克斯实用气体有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 质粒 DNA 酶解 20 μg DNA 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 min 然后保持在 37 $^{\circ}\text{C}$, 以 20 U/ μg 的比例加入 Nuclease S1, 将该反应体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 超速离心 25 min 滤去 Nuclease S1, 取滤液用于色谱分离测定。

2.2.2 色谱 质谱条件 流动相流速 1 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温采用室温 22 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱采用耐高温锥口, 先在标准操作模式下以 1 $\mu\text{g/L}$ 的 Be, Ca, In, Pb 和 U 溶液优化, 再在 CCT 模式下优化反应气流速等条件。

3 结果与讨论

3.1 ICP-MS 仪器工作参数优化

在 ICP-MS 与液相色谱联用时, 流动相中存在着大量的盐离子, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 计数增加数十倍; 空白流动相 $^{31}\text{P}/\text{s}$ 计数达到 1×10^6 , $\text{PO} (^{47}\text{T})$ 的空白计数也达到近 1×10^5 , 因而直接检测 P^+ 或 PO^+ 都会对检测器寿命造成很大的影响, 因而在引入 O_2 反应气的同时还采用了耐盐的环保采样锥接口。ICP-MS 环保采样锥接口具有高耐盐、低复合离子引入、高信噪比, 长期稳定性好的特点; 在样品分析过程中分析速率大, 能承受大批量样品分析, 而且在分析过程中工作曲线长时间无需再校正。虽然 X 锥接口能够部分减少复合离子的引入, 但是还不足以把 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 等 P 的干扰离子降低到能够直接检测 P 的水平, 还是需要加 O_2 反应来检测 PO^+ 。不过此时在 ^{47}T 处其它的复合离子干扰由于 X 接口的使用已经明显降低。因而本实验采用 X 锥采样锥接口以便采集到最多 ^{31}P 及 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 的同时, 引入最少的其它复合离子, 同时采用气体反应池加氧与 ^{31}P 复合生成更多 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 来检测磷。与标准锥口相比, X 锥采样锥口时离子提取电位更高。四极杆轴向电压较低, 六极杆电压较高。为使轻元素和氧化物离子有效进入, 采用了较大的采样深度, 以利于离子的吸入。在吸入 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 的同时某些干扰离子也会被吸入。同时比起常规的 X 锥接口测量模式, 本研究采用较低的等离子体功率, 由 1400 W 降到 1200 W, 其它优化参数见表 1。

表 1 优化的 ICP-MS 仪器的操作条件

Table 1 Optimized experimental conditions and parameters of ICP-MS

载气流速 Nebulizer gas flow	0.97 L/min	雾化室温度 Spray chamber temperature	30 $^{\circ}\text{C}$
辅助气流速 Auxiliary gas flow	0.90 L/min	计数采集间隔 Dwell time	200 ms
冷却气流速 Cool gas flow	14.0 L/min	反应气流速 CCT gas	0.93 mL/min

3.2 碰撞/反应池技术 CCT 参数优化

直接测定 ^{31}P 信号, 由于 P 的一级电离能很高, 电离效率较低以及多原子离子 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 等的干扰而受到限制。为了减少干扰复合离子的影响, 实验采用碰撞/反应池技术。在通入纯氧的情况下反应生成 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 而准确的检测 P 的含量。通入反应气体 O_2 的流速直接影响检测离子 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 的生成量, 调节气体的流量是准确测定的一个重要参数。实验调节 O_2 的流量分别从 1.25 到 0.89 mL/min, 实验结果见图 1。随着 O_2 减少, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 信号逐渐增强。但当将气体流量调为 0.89 mL/min 时, 离子信号出现如图 2 所呈现的上下波动的二元峰。综合各因素, 实验采用通入反应气体流量为 0.93 mL/min, 相对应的背景等效浓度 (BEC) 为 20 $\mu\text{g/L}$ 。

3.3 HPLC 色谱条件优化

为优化色谱条件, 利用紫外检测器 (256 nm) 检测 4 种脱氧核苷酸来优化 pH、甲醇含量、流动相流速和离子对浓度等条件。为减少流动相对 ICP-MS 测定产生的基体干扰, 尽量保持低水平的离子对浓

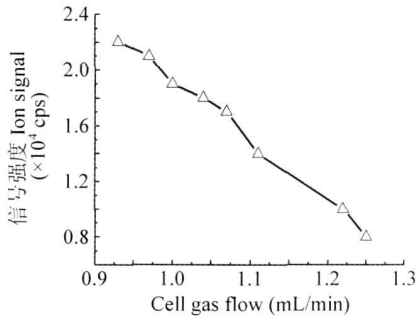


图 1 气体流量和信号强度关系

Fig. 1 Relationship between oxygen flow and signal intensity of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$

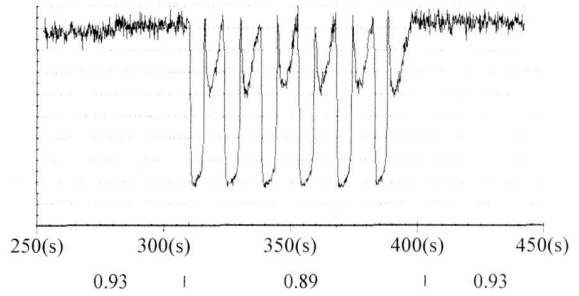


图 2 O₂ 流速由 0.93 变为 0.89 (mL/min) 时计数出现波动

Fig. 2 Signal fluctuation as O₂ flow changed from 0.93 to 0.89 (mL/min)

度,文献报道^[6]选用 15 mmol/L NH₄Ac 作为离子对,本实验发现将该离子对浓度降到 10 mmol/L,对

4 种目标分离物的影响不大。在流动相中加入一定量的甲醇可以增强信号,但也可能会增大基线噪声^[7]。选择 3 个浓度的甲醇含量 2%、2.5%、5%,甲醇的含量增加能提高各峰分离的理论塔板数,使峰形尖锐,并且可缩短 4 种脱氧核苷酸的保留时间,减少实验的时间,但随着甲醇浓度的升高,dTMP 和 dGMP 的分离度明显降低。文献报道 pH 对 4 种脱氧核苷酸分离时保留时间有影响^[8],实验选择了 4.5、4.8、5.1、5.4、5.7 等 5 个 pH 流动相,各条件下 4 种脱氧核苷酸的保留时间变化如图 3。4 种脱氧核苷酸随着流动相 pH 的升高,保留时间缩短,特别是 dAMP 受 pH 的影响最大,虽然随着 pH 的上升各分离物质的保留时间缩短,但分离度减少,在 pH 5.7 时,dTMP 和 dGMP 分离效果不佳,dCMP 也出现了奇怪的多峰现象,我们推测,dCMP 在 pH 5.7 条件下存在着多种离子形式,从而造成多峰现象。结合各种因素对分离效果和对 ICP-MS 检测条件的影响,最佳的分离条件为:pH 4.8,甲醇 2.5%,NH₄Ac 10 mmol/L,流速 1 mL/min。

3.4 4 种脱氧核苷酸的检出限及质粒 DNA 样品分析

利用上述优化的色谱条件,CCT 参数,ICP-MS 仪器参数对 4 种脱氧核苷酸标准和经过核酸酶 S1 酶解后 pBR322 DNA 产物的分析结果如图 4 所示。4 种脱氧核苷酸的检出限分别为 0.211 $\mu\text{mol/L}$ (dCMP)、0.204 $\mu\text{mol/L}$ (dTMP)、0.173 $\mu\text{mol/L}$ (dGMP) 和 0.225 $\mu\text{mol/L}$ (dAMP),相对应 P 的绝对检出量见表 2。图 4b 中的 pBR322 DNA 经过核酸酶 S1 降解经过超滤后得到产物的色谱图能很好地与图 4a 中的 4 种脱氧核苷酸的标准混合液色谱图各峰位置相对应,经过定量分析酶解产物 4 种脱氧核苷酸的量分别是 152.9 \pm 2.4 $\mu\text{mol/L}$ (dCMP)、228.2 \pm 4.0 $\mu\text{mol/L}$ (dTMP)、125.3 \pm 3.0 $\mu\text{mol/L}$ (dGMP) 和 222.9 \pm 3.3 $\mu\text{mol/L}$ (dAMP)。

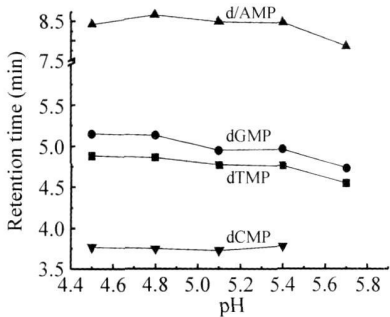


图 3 pH 对 4 种脱氧核苷酸保留时间的影响

Fig. 3 Effect of pH on the retention time of nucleotides

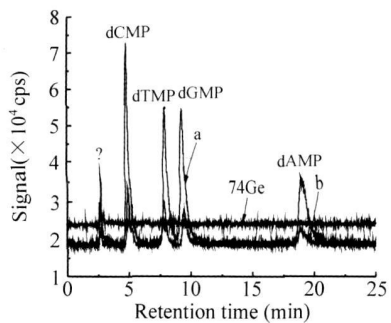


图 4 4 种脱氧核苷酸 (a) 和酶解 DNA 产物 (b) 分离色谱图

Fig. 4 Chromatography of four deoxynucleotides (a) and product of enzymolysis plasmid DNA (b)

a: mixture of dCMP, dTMP, dGMP, dAMP; b: enzymatic digest of pBR 322 DNA.

表 2 HPLC-ICP-MS 检测的 4 种核苷酸的检出限

Table 2 Detection limits for phosphorus in deoxynucleotides with HPLC-ICP-MS

Species of deoxynucleotide	Detection limit species ($\mu\text{mol/L}$)	Detection limit P absolute (μmol)
dCMP	0.211	4.2
dTMP	0.204	4.1
dGMP	0.173	3.4
dAMP	0.225	4.5

References

- 1 Wilson K, Walker J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press, **2000**, 319~322
- 2 Marina M A, Blanco Lopez M C. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 432, 157~163
- 3 Siethoff C, Felhmann I, Jakubowski N, Linscheid M. *J. Mass Spectrom.*, **1999**, 34, 421~426
- 4 Wind M, Edler M, Jakubowski N, Linscheid M, Wesch H, Lehmann W D. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 29~35
- 5 Profrock D, Leonhard P, Prange A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2003**, 18, 708~713
- 6 Bandura D R, Baranov V I, Tanner S D. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1497~1502
- 7 Richardson D D, Sadi B B M, Caruso J A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2006**, 21, 396~403
- 8 Guerin T, Astruc M, Batel A, Borsier M. *Talanta*, **1997**, 44(12): 2201~2208

Analysis of Deoxynucleotide in Plasmid Deoxyribonucleic Acid Using High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

LIANG Feng^{1,2}, LI YurLan^{*1}, LU WenWen³, TAN MingGuang¹, ZHANG GuirLin¹, LI Yan¹

¹(Shanghai Institute of Applied Physics Chinese Academy of Sciences Shanghai 201800)

²(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

³(Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030)

Abstract An ion pair reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method has been developed for the determination of deoxyribonucleotide in plasmid DNA. Optimum separation conditions for the four deoxyribonucleotides including 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP), 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP), 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) and 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate (dAMP) are obtained using a mobile phase containing 10 mmol/L ammonium acetate (pH 4.8) and 2.5% methanol. The hexapole collision/reaction cell technique (CCT) by adding O_2 is employed for the detection of $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ to avoid potential interferences of polyatomic isobaric m/z 31 by directly detecting $^{31}\text{P}^+$. By such HPLC-ICP-MS hyphenation technique, detection limits of four deoxyribonucleotides are 0.211 $\mu\text{mol/L}$ for dCMP, 0.204 $\mu\text{mol/L}$ for dTMP, 0.173 $\mu\text{mol/L}$ for dGMP and 0.225 $\mu\text{mol/L}$ for dAMP, respectively. This hyphenated HPLC-ICP-MS method has been successfully applied to the analysis of four deoxyribonucleotides in plasmid DNA, which contained $152.9 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$ of dCMP, $228.2 \pm 4.0 \mu\text{mol/L}$ of dTMP, $125.3 \pm 3.0 \mu\text{mol/L}$ of dGMP and $222.9 \pm 3.3 \mu\text{mol/L}$ of dAMP.

Keywords High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), nucleotides detection, collision cell technique

(Received 28 October 2007; accepted 3 December 2007)