

HPLC法测定不同年龄人参DNA的甲基化水平

董亚娟¹, 程舟², 李珊², 周铜水¹, 陈家宽¹, 万树文³, 顾敏³, 张文驹^{1*}

(1. 复旦大学生命科学院生物多样性研究所 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433; 2. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 3. 上海雷允上药业有限公司, 上海 200002)

甲基化是指由DNA甲基转移酶介导,在胞嘧啶或腺嘌呤碱基上的第5位碳原子上加上一个甲基的化学修饰过程,这种甲基化现象广泛存在于各种有机体中。DNA甲基化参与植物基因表达的调控,在植物的生长发育中起着非常重要的作用^[1,2],可以用来作为一个反应基因组表达的指标。近年来的研究表明,DNA的甲基化水平与植物年龄密切相关^[3,4]。因而,对不同生长年龄的植物基因组甲基化水平的研究将有助于更深入地认识不同年龄植物的基因的活动状况。

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 系五加科多年生植物,素有“百药之王”的美誉。人参的生长年龄被认为是影响和判断人参品质最为重要的因素之一,已有研究表明高年龄的人参确实比低年龄的人参含有更多的有效物质^[5]。其中,不同年龄人参DNA的甲基化水平可能扮演了重要的作用。本研究采用反相高效液相色谱法,对不同年龄人参的甲基化水平进行研究,建立了稳定有效的人参DNA甲基化水平的测定方法,对不同生长年龄的人参的甲基化水平进行了初步研究。

1 材料、仪器与试剂

5年栽培参(编号:XR-2、XR-6、XR-7)2004年8月采自辽宁省新宾满族自治县红升乡张家村,完全在人工栽培的条件下生长;8年移山参(编号:HR5-15、HR5-20、HR5-29)和12年移山参(编号:HR6-8、HR6-20、HR6-30)2005年8月均采自辽宁省桓仁满族自治县四平乡巨户沟村,移山参样品是人工将形态好的参苗移到近自然的环境中生长而成,生长过程中不用农药和肥料。样品自然风干后在4℃下保存。

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪,VWD检测器,柱温箱,紫外分光光度计(Eppendorf),微量天平(瑞士梅特勒托莱多公司)等。对照品A(腺嘌呤,

Sigma,批号094K0055,质量分数为99%),对照品T(胸腺嘧啶,Sigma,批号114K0757,质量分数为99%),对照品G(鸟嘌呤,ALDRICH,批号S04899-195,质量分数为98%),对照品C(胞嘧啶,Sigma,批号114K1088,质量分数为99%) and 对照品5-mC(5-甲基胞嘧啶,Sigma,批号034K1231,质量分数为99%);甲醇(色谱纯,Sigma),磷酸二氢钾(分析纯,汕头四院化工厂),高氯酸(分析纯,上海试剂四厂),氢氧化钾(分析纯,上海试剂四厂),SDS(上海生工),苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1,上海生工),超纯水。

2 方法与结果

2.1 DNA提取、水解:采用改良后的SDS法提取人参DNA^[6]。DNA的水解参照Demeulemeester等^[3]的方法并进行优化。在100 μL(含DNA约25 μg)的DNA溶液加入70%的高氯酸50 μL,在95℃下水解50 min,然后用浓度为1 mol/L KOH调节pH 3~5,12 000 r/min离心5 min,取上清液,注入HPLC中进行检测。

2.2 色谱条件:色谱柱为Zorbox×ODS柱子(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:8%甲醇、92%水、50 mmol/L磷酸二氢钾(pH 5.8);体积流量:0.4 mL/min;柱温:30℃;检测波长:285 nm;灵敏度:0.1;进样量:20 μL。

2.3 对照品溶液的制备:精确称取0.444 4 mg对照品C和0.051 45 mg对照品5-mC,分别溶解于10 mL 0.1%的高氯酸中,配成浓度为 4×10^2 μmol/L的对照品C母液和20 μmol/L的对照品5-mC母液。

2.4 线性关系考察:将C母液分别稀释至1.25、2.5、5、10、20 μmol/L,分别进样20 μL检测,以浓度为横坐标,积分面积为纵坐标绘制标准曲线,曲线的线性方程: $Y = 63.824 X + 0.404$ ($r = 0.999 9$, $n = 5$),说明C在1.25~20 μmol/L有良好的线性关系。

将5-mC母液分别稀释至0.125、0.25、0.5、1、2

收稿日期:2006-11-20

基金项目:上海市科学技术委员会资助项目(04DZ19834)

作者简介:董亚娟(1982—),女,云南宣威人,硕士,从事人参年龄鉴定和种质资源的研究工作。 Tel:(021)61442950 (021)65642809 E-mail:042023104@fudan.edu.cn

* 通讯作者 张文驹 E-mail:wjzhang@fudan.edu.cn

$\mu\text{mol/L}$, 分别进样 $20\ \mu\text{L}$ 检测, 以浓度为横坐标, 积分面积为纵坐标绘制标准曲线, 曲线的线性方程: $Y=129.37 X-0.0458$ ($r=0.9999$, $n=5$) 说明 5-mC 在 $0.125\sim 2\ \mu\text{mol/L}$ 有非常好的线性关系。

2.5 精密度试验: 选取浓度为 $5\ \mu\text{mol/L}$ 的对照品溶液 5-mC, 平行进样 5 次, 计算得到 5-mC 的峰面积 RSD 值为 0.68% , 说明仪器精密度非常好。

2.6 重现性试验: 将 5 年人参样品 XR-6, 平行制备 5 次, 上样检测, 计算得到 5-mC 的峰面积的 RSD 值为 0.50% , C 的峰面积的 RSD 值为 1.8% , 说明实验重现性良好。

2.7 稳定性试验: 将制备的 5 年人参样品 XR-6 每隔 2 h 测定 1 次, 结果 5-mC 的峰面积的 RSD 值为 0.84% , C 的峰面积的 RSD 值为 1.9% ($n=6$), 表明在 10 h 内仪器的稳定性良好。

2.8 人参甲基化水平的测定: 以 C 和 5-mC 对照品作对照, 对照品和供试品的色谱图见图 1, C 和 5-mC 的保留时间分别为 7.2、12.7 min。通过公式: $5\text{-mC}(\%) = C_{5\text{-mC}} / (C_{5\text{-mC}} + C_C) \times 100\%$, 计算出 5-mC 的量, 5-mC 的量即代表 DNA 的甲基化水平^[3], 见表 1。

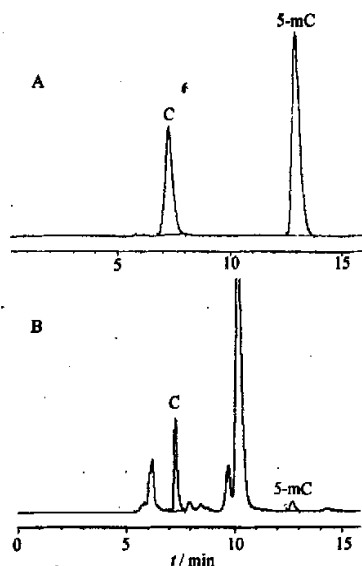


图1 对照品 C、5-mC(A)和人参 DNA 样品(B)的 HPLC 图

Fig.1 HPLC Chromatograms of C and 5-mC reference substance (A), as well as DNA specimens of *P. ginseng* (B)

结果显示, 5 年栽培参的甲基化水平分别为 10.02% 、 9.46% 、 9.47% , 平均值为 9.65% ; 8 年移山参的甲基化水平分别为 17.02% 、 17.27% 、 17.18% ,

表 1 不同年龄人参样品的甲基化水平 ($n=3$)

Table 1 Methylation level in *P. ginseng* at different ages ($n=3$)

样品编号	样品类型	年龄/年	甲基化水平/%	均值/%
XR-2	栽培参	5	10.02	9.65 ± 0.32
XR-6	栽培参	5	9.46	
XR-7	栽培参	5	9.47	
HR5-15	移山参	8	17.02	17.16 ± 0.13
HR5-20	移山参	8	17.27	
HR5-29	移山参	8	17.18	
HR6-8	移山参	12	8.11	9.78 ± 1.57
HR6-20	移山参	12	11.23	
HR6-30	移山参	12	10.00	

平均值为 17.16% ; 12 年移山参的甲基化水平分别为 8.11% 、 11.23% 、 10.00% , 平均值为 9.78% 。8 年移山参的甲基化水平显著高于 5 年栽培参和 12 年移山参 (t 检验, $P < 0.05$), 但 5 年栽培参和 12 年移山参的甲基化水平十分接近。另外, 结果还显示 5 年栽培参和 8 年移山参的同龄个体之间甲基化水平相差很小, 平均差异分别为均值 3.32% 和 0.75% , 但 12 年移山参的 3 个个体间平均差异则为 16.05% 。

3 讨论

3.1 人参总基因组 DNA 甲基化的检测方法: 目前, 基因组 DNA 甲基化检测方法主要有 SssI 甲基转移酶法/甲基化酶温育法、氯乙醛反应法、免疫学方法、高效液相法^[7]等。相比较而言, HPLC 法是目前测定基因组 DNA 中 5-mC 总量最标准的方法, 其原理是用核酸酶将总 DNA 降解为单个核苷酸后再用 HPLC 方法定量分析, 从而能够从总体上测定出基因组中胞嘧啶的甲基化程度, 用 HPLC 法测得的数值准确, 而且实验对人体伤害不大, 所以本实验便选择了 HPLC 进行检测。

3.2 DNA 的水解和检测条件探讨: 现有关于 DNA 的水解, 多采用 70% 的高氯酸在 $100\ ^\circ\text{C}$ 下水解 1 h^[3]。但在实验过程中发现, 在高热条件下 5-mC 极易发生脱氨基作用, 从而在对照品 5-mC 的保留时间处不能检测到, 这可能与人参 DNA 的质量有关。根据水解时间和水解温度的梯度实验, 认为 $95\ ^\circ\text{C}$ 、55 min 是人参 DNA 的最佳水解条件。在检测波长选择上 260、273、275、285 nm 等均有报道^[3,8,9], 通过 5-mC 的紫外吸收扫描, 5-mC 在 285 nm 处有最大的吸收波长, 所以选用 285 nm 作为人参甲基化的检测波长。

3.3 人参甲基化与年龄的关系: 结果显示人参总基因组 DNA 的甲基化水平并不随着年龄的增加而线性减少, 5 年的栽培参甲基化水平反而最低; 在移山参中, 8 年人参的平均甲基化水平显著高于 12 年人

参,随着衰老程度的增加,甲基化水平是降低的,这和以往在人和老鼠上的实验结果是一致的^[10,11]。这一结果表明不仅是生长年龄,生长条件也可能显著地影响人参总基因组 DNA 的甲基化水平。这似乎意味着栽培参的衰老和移山参的衰老并非同步,而是远远的早于移山参。

8 和 12 年人参虽然同属于移山参,但是 8 年人参个体间的甲基化水平变化较小,12 年人参个体间的甲基化水平变化相对较大,推测可能因为移山参生长的环境比较开放多变,受外界环境因子的干扰较大,随着生长年限的增加,外在环境的累积变化对 12 年人参个体的甲基化水平影响较大。除此之外,由于 DNA 的甲基化水平和植物生长发育期和生长状态密切相关^[2],在不同的生长时期和生长状态下, DNA 的甲基化的水平都会有差异,所以不同人参个体的生长状态可能也会影响人参个体间的甲基化水平。由于本研究所用材料年龄段和生境类型不多,因此甲基化水平与生长年龄以及生长环境的关系还有待获得更多样品来进一步研究。另外,已有研究表明 ER、RUNX3、MLH1 等^[8,9]基因的甲基化水平都和植物年龄密切相关,其中 ER、MLH1 的甲基化水平都随年龄的增加而增长,而且 ER 成线性增加。不同基因的甲基化状态是会随着不同的生理状态发生不同的变化,而总基因组的甲基化水平反映的是所有基因甲基化程度的综合反应,变化比较复杂。如能在人参的 DNA 中找到一些恰当的基因,研究他们的甲基化水平变化规律,或许会有助于确定甲基化与有效成分积累的关系。

4 结语

本实验建立的人参 DNA 甲基化水平的测定方

法,线性关系好,精密度、重现性及稳定性均符合要求。并测得人参总 DNA 的甲基化水平,为进一步研究人参生长年份与 DNA 甲基化水平之间的关系,及建立人参生长年份的精确鉴定方法奠定了基础。

鉴于本实验初步测定的人参总 DNA 的甲基化水平的变化比较复杂,特别在不同年龄的个体之间存在明显差异且幅度较大,人参生长环境、生长年份都可能影响人参总 DNA 的甲基化水平。因此有必要关注和分析一些特定的基因的甲基化水平随人参生长年份的变化规律。

References

- [1] Vanyushin B F. DNA Methylation in plants [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 301: 67-122.
- [2] Hou L P, Li M L. DNA Methylation and plant growth and development [J]. *Physiol Mol Biol* (植物生理学通讯), 2001, 37(6): 584-588.
- [3] Demeulemeester M A C, Van Stallen N, De Proft M P. Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L.), influence of plant age and vernalization [J]. *Plant Sci*, 1999, 142: 101-108.
- [4] Vincent L W, Ruth A W, Shuyi M. Genomic methyl-deoxycytidine decreases with age [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(21): 9946-9951.
- [5] Dong Y J, Zhang W J, Chen J K, et al. Advances of studies on the age of *Panax ginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(3): 467-470.
- [6] Wang Q, Cheng Z, Zhang L, et al. Distinguishing wild *Panax ginseng* from cultivated *Panax ginseng* based on direct amplification of length polymorphism (DALP) analysis [J]. *J Fudan Univ* (复旦大学学报), 2004, 43(6): 1030-1034.
- [7] Zhu Y. The analysis and detection of the methylation of DNA [J]. *Mod Prev Med* (现代预防医学), 2005, 32(9): 1070-1073.
- [8] Takayoshi W, Gen T, Makoto S, et al. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric Epithelia [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(4): 360-364.
- [9] Hidewaki N, Gerard J N, Emmanuel E Z. Age-related hypermethylation of the 5-Region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 6991-6995.
- [10] Li J, Pan X L, Pan Z M. Aging and methylation of DNA [J]. *Int J Genet* (国际遗传学杂志), 2007, 30(2): 134-136.
- [11] Mao Z B, Zhang Z Y. Methylation of DNA and aging [J]. *For Med Sci; Geriatr* (国外医学·老年医学分册), 1992, 13(1): 13.

《中国新药杂志》征订信息

《中国新药杂志》由国家食品药品监督管理局主管,中国医药科技出版社、中国医药集团总公司和中国药学会共同主办的国家级药理学学术核心期刊。《中国新药杂志》致力于架起药企与临床医院的桥梁,是国内率先为企业服务的药理学学术权威杂志。其宗旨是提供国际国内新药综合信息、传播医药领域新进展、宣传药监政策法规和新药报批技术、交流新药开发研究应用成果。主要报道国内外新的化学药物、中药及天然药物和生物制剂等在研制、生产、临床应用和评价等方面的最新研究成果,辟有综述与专论、实验研究、临床研究、新药述评、国际新药资讯、新药申报与药监管理、信息快递等栏目。

大 16 开本,每期定价 10 元,全年 240 元。邮发代号:82-488 国外代号:M4240 国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)。国内统一刊号:CN11-2850/R 国际标准刊号:ISSN 1003-3734。

地 址:北京市西城区北三环中路乙 6 号伦洋大厦七层 邮编:100011

发 行 部:010-82282303/2301 联系人:达娃卓玛

E-mail:xyzz711@sohu.com cndj@newdrug.cn