

面向 DNA 甲基化修饰分析的质谱技术

唐朝¹ 罗群^{2*}

(¹ 江汉大学环境与健康学院 武汉 430056; ² 中国科学院化学研究所 北京 100190)

摘要 DNA 甲基化作为表观遗传修饰中一种重要的调控方式,通过调控基因的表达,从而影响机体内一系列的生物学过程。色谱-质谱法是研究 DNA 甲基化修饰的重要研究手段。随着对哺乳动物 DNA 甲基化的生物学功能的深入研究,应用于研究表观遗传修饰的手段与仪器设备越来越先进。为了对 DNA 修饰进行定性与定量的分析检测,除了高效液相色谱整合不同种类质量分析器的质谱联用 (HPLC-MS) 技术外,目前还开发应用了基质辅助激光解析质谱技术 (MALDI-ToF-MS) 和气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS),从而极大拓展了 DNA 甲基化修饰研究的手段。本文对分析表观遗传 DNA 甲基化修饰的质谱技术发展进行综述,希望为 DNA 甲基化修饰分析提供有价值的研究策略。

关键词 表观遗传修饰 DNA 甲基化 同位素标记 液相色谱与质谱联用技术

Study on DNA Methylation Modification Analysis Based on Mass Spectrometry

Tang Chao¹, Luo Qun^{2*}

(¹ Institute of Environment and Health, Jiangnan University, Wuhan, 430056;

² Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100190)

Abstract As an important regulation mode in epigenetic modification, DNA methylation affects a series of biological processes in living systems by regulating gene expression. The chromatography tandem-mass spectrometry is an important technology to study DNA methylation modification. With delving into the biological functions of mammalian DNA methylation, more and more advanced approaches and instruments are used to study epigenetic modification. In order to carry out qualitative and quantitative analysis and detection of DNA modification, in addition to high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry technology (HPLC-MS) integrating different kinds of quality analyzers, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) and gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS) have also been developed and applied in this area, thus greatly expanding the methods for DNA methylation modification investigations. This paper summarizes the advancements of mass spectrometry technology for studying epigenetic DNA methylation modification, hoping to provide valuable research strategies for DNA methylation modification.

Keywords Epigenetic modification, DNA methylation, Isotopic labeling, LC-MS

表观遗传学是对潜在 DNA 序列变化以外的机制所引起的基因表达或细胞表型变化的研究,其本质上研究的是不依赖 DNA 序列差异的核继承性;表观遗传机制涉及 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑等^[1~3]。甲基化是 DNA 表观修饰中的最常见、普遍的修饰,其包括了:N⁶-甲基脱氧腺苷 (m⁶dA)、5-甲基脱氧胞嘧啶 (m⁵dC) 和 N⁴-甲

基脱氧胞嘧啶 (m⁴dC)。几乎所有的甲基化胞嘧啶残基都出现在对称序列的 5'-GC-3' 二核苷酸 (又称 CpG 二核苷酸,即胞嘧啶 (C)-磷酸 (p)-鸟嘌呤 (G)) 上,这种序列在 DNA 上集中于富含 GC 的区域,CpG 聚集在 CpG 岛上,位于相应基因的上游,集中分布于基因的启动子上。CpG 岛趋向于被甲基化保护,并且在该位点的甲基化等同于

* 联系人,罗群 女,博士,副研究员,主要从事基于质谱研究 DNA 损伤及细胞应答机制方面研究。E-mail: qunluo@iccas.ac.cn
国家自然科学基金项目(21275148)资助
2023-06-13 收稿,2023-07-12 接受

基因表达的沉默^[1,4-6]。

迄今为止,有许多方法用于研究 DNA 甲基化修饰,其中具有代表性的方法包括薄层色谱法(TLC)^[7-11]、液相色谱与质谱联用技术(LC-MS 和 LC-MS/MS)^[12-17]、修饰特异性抗体法^[18-21]、修饰依赖性限制性核酸内切酶法^[22-26]、化学标签法^[8,19,27-29]、单分子实时测序法^[30-33]、纳米孔测序^[32,34-37]等。在上述方法中,液相色谱与质谱联用技术具有高效、快速、灵敏并且检出限低等特点,无论定性分析与定量分析,该技术是研究 DNA 甲基化修饰最优方法之一。超高效液相色谱与二级质谱联用技术(UHPLC-MS/MS)拥有超高灵敏度,且可以精确地对已修饰核苷酸如 m⁶dA、m⁵dC 以及未修饰核苷酸如脱氧腺苷(deoxyadenosine, dA)、脱氧胞苷(deoxycytidine, dC)的数量进行定量分析。虽然 UHPLC-MS/MS 技术可能会因为其检出限低的特点而易受到干扰物的影响,但在研究 DNA 甲基化的定量分析中该技术仍然是常采用

的分析手段。

本文主要综述了基于质谱技术进行 DNA 甲基化分析,包括样品的不同前处理方法、不同种类的 LC-MS 技术、GC-MS 技术及其他质谱技术的研究工作,以帮助研究者了解采用质谱手段研究 DNA 甲基化的进展情况,便于应用开发这些质谱技术,进行更深入的 DNA 甲基化相关分析研究,促进表观遗传学研究的发展。

1 DNA 甲基化修饰分析的样品前处理

1.1 提取样品中 DNA 的处理方法

1.1.1 常规处理方法

在样品进入 LC-MS 分析前,需要将样品进行前处理。对于常见修饰的核苷,在此总结归纳了一般的处理流程(如图 1 所示):培养目标细胞或提取组织,对其进行裂解,分离提取 DNA,再将获得的 DNA 进行水解,酶切为核苷酸或核苷,将核苷酸或核苷进行 LC-MS 分析。

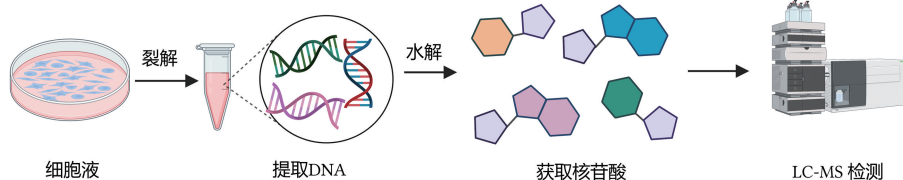


图 1 DNA 甲基化修饰检测的常规处理流程

Fig. 1 The routine process of DNA methylation modification detection

1.1.2 液相萃取处理方法

通过苯酚和氯仿的液相萃取提取 DNA 已成为一种获取核苷酸的基本方法。提取组织或细胞中的 DNA 的通用步骤是:首先将收集的组织和细胞依次加入裂解缓冲液、 β -巯基乙醇和蛋白酶 K,在 50℃ 下孵育;然后加入苯酚、氯仿、乙酰胺混合溶液,通过反转进行溶液混合,再高速离心。转移弃掉上层水相后,加入等体积的 -20℃ 纯乙醇,反转混合后高速离心,收集下层回收 DNA。再用 70% 乙醇洗去 DNA 沉淀中的盐,真空干燥 DNA,用 TE 缓冲液溶解 DNA 备用^[38]。虽然液相萃取方法是有效的,但该方法存在一定的局限性,如需要大量的样品,抑制剂消耗量大,操作时间长和繁琐,具有高污染和核酸降解的风险。

1.1.3 固相萃取处理方法

相比于液相萃取处理,固相萃取方法速度更快,工作强度更低,提取 DNA 的产量和纯度更高。

固相萃取处理主要基于固相材料作为 DNA 的吸附剂,并在特定条件下实现 DNA 与固相材料的“捕获与洗脱”^[39]。操作通用流程为:在含有组织或细胞的固相萃取柱中进行细胞裂解,固相萃取柱吸附 DNA;洗涤所得的 DNA 复合物以去除蛋白质、盐和细胞碎片;在低盐水性缓冲液中洗脱 DNA。

常见的固相材料包括:硅胶材料^[40-42]、金属纳米颗粒^[43-45]、聚合物材料^[46-48]等。近年来,官能团的表面改性和带正电荷材料的表面涂层提高了硅基吸附剂的性能,展现出广泛的应用前景^[49,50]。氨基表面功能化的硅基纳米颗粒表现出更强的 DNA 捕获能力,这是由于带正电荷的氨基和带负电荷的核酸分子之间的强静电力^[51,52]。但固相萃取处理存在着局限性,包括需要捕获与洗脱的条件苛刻、回收率相对较低和纳米颗粒容易发生团聚等。

1.2 检测样品的同位素标记处理

同位素标记处理是对在 DNA 序列中的特定位点上的碱基引入稳定同位素标记,对产生的加合物进行处理,然后通过液相色谱-电喷雾电离质谱 (HPLC-ESI-MS/MS) 分析检测特定 DNA 碱基上加合物的形成。

近期科研人员开发了一种新方法,将同位素 ^{15}N -dG 设计在寡核苷酸的特定位点上。在 p53 基因区域的特定位点上的 dG 标记上同位素 $^{15}\text{N}_5$, 修饰 BPDE ((+)-anti-7r, 8t-dihydroxy-c9, 10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene) 后进行酶切,得到了 4 类产物,即脱氧核苷、同位素 $^{15}\text{N}_5$ 标记的脱氧鸟苷、BPDE 修饰的 dG 与 BPDE 修饰的同位素标记的 dG,最后进行 LC-MS/MS 分析。如图 2 所示, N_2 -BPDE-dG 的二级质谱定量的原理是基于脱氧核糖在质谱中易碎裂,从 ^{15}N - N_2 -BPDE-dG 和 N_2 -BPDE-dG 的 HPLC-ESI-MS/MS 峰面积比确定 ^{15}N 标记鸟嘌呤的加合物形成程度^[53]。稳定同位素标记 HPLC-MS 方法适用于从简单烷化剂到药物损伤的大范围 DNA 修饰。虽然该方法适用于很大范围的 DNA 修饰,但受到合成 DNA 的限制。

Munzel 等^[54] 利用同位素 ^{18}O 和 CD_3 分别标记在 5hmdC 和 m^5dC , 定量分析脑内第六个 DNA 碱基羟甲基胞嘧啶。其中 ^{18}O 是通过在 H_2^{18}O 中来对目标化合物进行标记,而 CD_3 标记在最后一步脱保护过程中修饰为 $\text{D}_3\text{-m}^5\text{dC}$ 。用这些核苷酸来绘制质谱校正曲线,这使 LC-MS 的定量更加精准。根据天然核苷与标记核苷的不同浓度比,绘制了每种精确质量的核苷的质谱峰面积,成功测定了小鼠大脑中不同组织的 5hmdC 和 m^5dC 含量。

Liu 等^[55] 发展了一种稳定同位素标签的脱氧核苷 $^{15}\text{N}_5$ -2-脱氧腺苷 ($^{15}\text{N}_5$ -dA), 作为一种起始的示踪剂。这种 $^{15}\text{N}_5$ -dA 在哺乳动物的细胞中可以转换为 $^{15}\text{N}_4$ -dA 和 $^{15}\text{N}_4$ -dG, 由于扩增自细菌的质粒不含 ^{15}N 标记,所以质粒携带的 m^6dA 无 ^{15}N 标记,因此可以用于指示 $^{15}\text{N}_4$ - m^6dA 的形成。通过人肾上皮细胞 HK293T 暴露在含有 $^{15}\text{N}_5$ -dA 的培养基中,使基因组 DNA 标记上稳定同位素,提取 DNA 再酶解,得到各种脱氧核苷酸,最后进行 LC-MS 分析。质谱结果是,未被标记的 dA 的 m/z : 252.1093Da,而被 $^{15}\text{N}_4$ 标记的 dA 是 256.0969Da,并未发现 $^{15}\text{N}_5$ 标记的 dA (m/z : 257.0943Da)。基

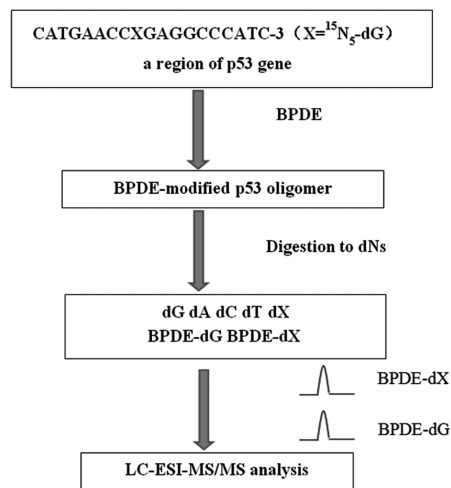


图 2 DNA 序列中特定位置 BPDE-dG 加合物的定量分析流程图^[53]

Fig. 2 Diagram for quantitative analysis of BPDE-dG adduct at specific location in DNA sequence^[53]

于此,科研人员继续探究在 $^{15}\text{N}_5$ -dA 到 $^{15}\text{N}_4$ -dA 过程中的其中一个 ^{15}N 原子丢失的位点。通过 HPLC 分离,从基因组 DNA 酶解后得到的脱氧核苷酸中,可以收集 dA 的组分。未标记的 dA 与标记 $^{15}\text{N}_4$ -dA 的保留时间相同,未标记的 dA 与 $^{15}\text{N}_4$ -dA 的分子量存在差异,可以通过 Q-ToF MS 的二级模式对碎片离子进行分析鉴定,从而区分 dA 与 $^{15}\text{N}_4$ -dA。通过比较和分析未标记的 dA 与 $^{15}\text{N}_4$ -dA 的碎片离子峰,可以推测和确定在 $^{15}\text{N}_5$ -dA 中一个 ^{15}N 原子丢失的位置。

1.3 检测样品的同位素稀释法处理

除了常规的处理和同位素标记的分析流程外,同位素稀释处理的流程也被应用于甲基化修饰核苷含量的定量分析。Kok 等^[56] 报道了一种用于测定 DNA 全甲基化的新方法:稳定同位素稀释 LC-ESI-MS/MS。其使用的内标包括 $^{13}\text{C}_2$, $^{15}\text{N}_3$ -胞嘧啶和 $^2\text{H}_4$ -5-甲基胞嘧啶。在 DNA 水解步骤中,通过加入内标水溶液并且真空干燥,残基溶解于甲酸中。用双面聚四氟乙烯硅酮膜和铝盖曲帽密封微孔,在电烤箱中加热,将 DNA 水解为游离碱基胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶,在微管冷却到室温时,将甲酸溶液进行离心,去除上清液,收集沉淀物进行真空干燥。产物复溶于九氟戊酸水溶液中, -20°C 储存,取样进行 LC-MS/MS 分析^[56]。加入胞嘧啶与 5-甲基胞嘧啶标记上的内标,测定了 5 份小牛胸腺 DNA 和 pBR322 DNA 的全甲基化含量。

Kotandeniya 等^[57]发展了一种新的稳定同位素稀释毛细管高效液相色谱-电喷雾串联质谱的方法,并用于分析 O₆-POB-dG 加合物体外 O₆-烷基鸟嘌呤 DNA 烷基转移酶 (AGT, 一种特异性的 DNA 修复蛋白) 的修复动力学与 DNA 序列的关系。将合成的含有特异性位点 O₆-POB-dG 的 DNA 双链与人源重组的 AGT 蛋白进行孵育,反应由 HCl 来中止。DNA 在酸性条件下水解释放嘌呤,如在修复反应之后的 O₆-POB-dG 加合物,通过稳定同位素稀释毛细管高效液相色谱-电喷雾串联质谱的方法进行定量分析(图 3)。该方法定量的原理是根据 O₆-POB-dG 和含氘化的内标 (D₄-O₆-POB-dG) 的对应峰面积进行计算。利用液相-质谱联用技术,分析获得标准 O₆-POB-G 和内标 D₄-O₆-POB-G 质谱图,比较 O₆-POB-G 和 D₄-O₆-POB-G 内标的 HPLC-ESI⁺-MS/MS 峰面积。合成的 DNA 双链 (5'-ACCCGCGTCCGCGCCATG GCC-3' 及其互补链) 与相应的含 O₆-POB-dG 的双链 (5'-ACCCGCGTCC [O₆-POB-G] CGCCATGGCC-3' 及其互补链) 和酸性失活的重组 AGT 蛋白混合加入。将混合物在酸性条件下水解,样品进行处理,再使用毛细管 HPLC-ESI⁺-MS/MS 分析。将 O₆-POB-G/D₄-O₆-POB-G 的峰面积比值与 O₆-POB-G/D₄-O₆-POB-G 的理论峰面积比值进行对比。Yin 等^[58]使用稳定同位素稀释 HPLC-MS/MS 的手段测定人尿中的 5-羟甲基胞嘧啶的含

量。实验流程是将尿液样品通过固相萃取进行脱盐和富集,再利用 5hmdC 和 m⁵dC 的稳定同位素稀释 HPLC-MS/MS 分析(图 4)。使用的稳定同位素标记为氘代内标 D₃-5hmdC 和 D₃-m⁵dC。将标准品 5hmdC 和标准品 m⁵dC 配置成混合标准溶液(共配置 6 种浓度梯度溶液),与 D₃-5hmdC 和 D₃-m⁵dC 进行混合作为内标,最后采用 LC-MS/MS 联用技术进行定量分析。通过 5hmdC 和 m⁵dC 与相应稳定同位素标准的峰面积比,与添加未标记同位素 5hmdC 和 m⁵dC 浓度的关系绘制校准曲线。根据式(1)计算回收率。

$$R = (C_{\text{measured}} - C_{\text{background}}) / C_{\text{added}} \times 100\% \quad (1)$$

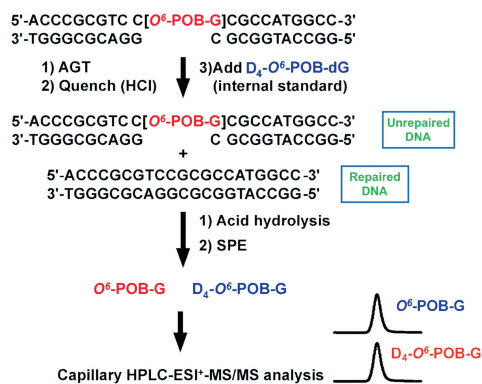


图 3 稳定同位素稀释-HPLC-ESI⁺-MS/MS 技术分析 DNA 中的 O₆-POB-G 加合物^[57]

Fig. 3 Quantitative analysis of O₆-POB-G adduct in DNA by stable isotope dilution HPLC-ESI⁺-MS/MS^[57]

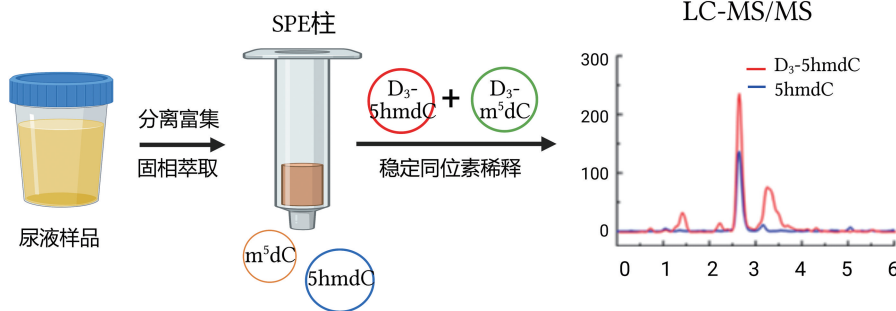


图 4 稳定同位素稀释-HPLC-MS/MS 的技术测定人尿中 5hmdC 含量^[58]

Fig. 4 Determination of 5hmdC content in human urine using stable isotope dilution HPLC-MS/MS technology^[58]

2 研究 DNA 甲基化修饰的质谱技术

2.1 基于 LC-MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

液相色谱是基于不同极性的 dA、m⁶dA、dC、m⁴dC、m⁵dC 在反向色谱柱上的保留时间不同进行分离(图 5 所示)^[13]。由于极性不同,上述组分

经过色谱柱分离后依次进入质谱检测分析。在加速电场和离子源的作用下,组分带上电荷进入锥孔,质量分析器对带电荷的组分进行筛选,这些带电的组分被检测器捕获,通过检测器的响应值大小和计算机的数据处理,得到上述组分的质谱数据^[59]。

研究 DNA 甲基化水平普遍采用 LC-MS。在

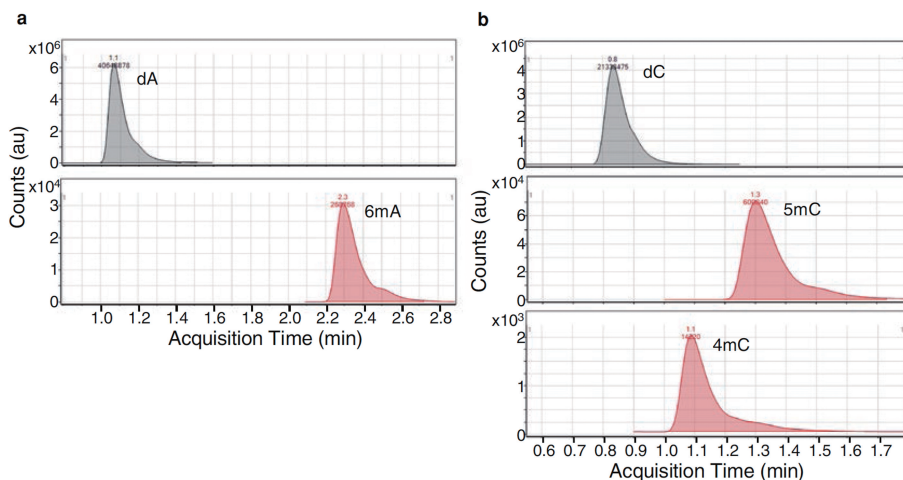


图 5 MassHunter 定性分析反相色谱柱上 dA、 m^6 dA、dC、 m^4 dC、 m^5 dC 的保留时间^[13]

Fig. 5 MassHunter qualitative analysis of the retention times of dA, m^6 dA, dC, m^4 dC, and m^5 dC on a reverse phase chromatographic column^[13]

液相色谱部分的色谱柱中,根据组分在色谱柱的保留时间的不同,用不同梯度的流动相依次将其洗脱。LC-MS 技术通过从色谱柱洗脱出的组分进入质谱中,根据保留时间、 m/z 和质谱信号相对强度的大小进行数据分析和整理,从而得到该样品的液相色谱图以及质谱图。LC-MS 联用技术是把液相色谱的高效分离富集与质谱的精准分析、速度快、灵敏度高的分析特点相结合,且 LC-MS 所需样品量少。该方法适用于研究 DNA 甲基化修饰,可得到样品的定性与定量的分析数据^[60,61]。

在 LC-MS 分析中,应用最为广泛的是超高效液相色谱与二级质谱的联用技术 (UHPLC-MS/MS),UHPLC-MS/MS 常见的质量分析器包括三种,为四极杆串联飞行时间分析器 (Q-ToF)^[62-65]、三重四极杆分析器 (QQQ)^[15,66-72]、轨道阱质量分析器 (Orbitrap)^[12,73]。

2.1.1 基于 UHPLC-Q-ToF-MS/MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

由四极杆 (Quadrupole) 串联飞行时间分析器 (Time-of-Flight, ToF) 构成了质谱的质量分析器,通过 UHPLC 的液相色谱分离和离子源电离后进入 (quadrupole time-of-flight, Q-ToF) 质量分析器。ToF 是通过脉冲电场排斥所有带电离子,离子的质量大小不同、在空间中飞行所需的时间长短不等,由此将离子进行区分、排列以及检测。Q-ToF 质量分析器可进行 MS/MS 分析检测,用于定性和定量分析。Chen 等^[62] 采用 UHPLC-Q-ToF-MS/MS 研究肝癌组织基因组

DNA 中 m^5 dC 和 5hmdC 的含量。该方法灵敏度高,仅用微量 DNA 样品即可测定痕量的 m^5 dC 和 5hmdC。研究者应用这种方法揭示了 m^5 dC 是一种重要的表观遗传学修饰,它涉及肿瘤的发生和发展;揭示了 5hmdC 在人肝癌组织及相应对照组织中的分布情况。

2.1.2 基于 UHPLC-QQQ-MS/MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

三重四极杆 (triple quadrupole, QQQ) 是通过 3 个四极杆串联所构成的,四极杆质量分析器是由直流电压和射频电压所形成的四极场,将不同质量的带电离子进行分离、排列和检测。通过调整相关参数,实现对特定带电离子的扫描和检测。三重四极杆中间的四极杆起到了离子聚焦和碰撞的作用,第三级四极杆选择离子检测,配合第一级的四极杆可以进行多反应离子监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 检测。相比于 Q-ToF 质谱质量分析器,QQQ 具有更高灵敏度。

近期科研人员运用同位素稀释质谱法精确定量未标记的 DNA 核苷酸,采用的 UHPLC-MS/MS 质量分析器为三重四极杆。与 ToF 和离子阱质量分析器相比,QQQ 质量分析器具有更高的灵敏度,但分辨率较低,不能区分两离子间小于 1 个原子质量单位 (AMU) 的差别。QQQ 质量分析器在 MRM 模式下实现监测多种核苷的质谱信号,并且对母离子碎裂和产生的碎片离子进行监测。第一级四极杆在不同特定 m/z 值的母离子之间快速切换,被选择的目标分子离子在第二级四极杆中碎裂。随后,第三级四极杆识别由碰撞单元中的

目标分子产生的特定碎片离子。实验中将丰度较高的未标记的 DNA 核苷酸用灵敏度较低的紫外检测器进行定量,而将丰度较低的未标记的 DNA 核苷酸使用灵敏度较高的三重四极杆进行定量分析^[74]。Fu 等^[14]采用 HPLC-QQQ-MS/MS,分析 mRNA 中 hm⁶A 和 f⁶A。在多反应监测(MRM)-正电喷雾电离模式下,使用 282.1~150.1(m⁶A)、268.0~136.0(A)、296.1~164.1(f⁶A)和 198.1~136.1(hm⁶A)的核苷及碎片离子对,进行各种核苷的定量分析。

2.1.3 基于 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

除了 Q-ToF 以及 QQQ 以外,科研工作者还采用轨道阱(Orbitrap)作为质量分析器^[12]。Orbitrap 通过将不同 m/z 的离子在静电场内向 z 方向运动的频率差别使质荷比不同的离子分离。相比于 Q-ToF 和 QQQ,轨道阱质谱具有的优势在于其具有更高的分辨率、更快的扫描速度以及更加精准的质量测定。

Li 等^[73]在研究 DNA 全甲基化的实验中比较了 QQQ 与 Orbitrap 质量分析器的效果。在实验中将全 DNA 甲基化程度以 m⁵dC 与 2'-脱氧鸟苷(dG)的比值表示。经 DNA 提取和水解后,用 LC-ESI-QQQ-MS/MS 测定。使用内标¹⁵N₃-dC 和¹⁵N₅-dG 分别用于 m⁵dC 和 dG 的准确定量。使用 orbitrap LC-MS 在精确质量全扫描模式下进行分析,结果表明该灵敏度与使用多反应监测(MRM)的串联 LC-ESI-QQQ-MS 相当。Orbitrap LC-MS 和

LC-ESI-QQQ-MS/MS 显示出相似的检测限和线性范围,而 orbitrap 具有良好的定量线性分析性能,表明其更适用于检测 DNA 甲基化的含量。

2.1.4 基于 2D-UHPLC-MS/MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

二维液相色谱(2D-UHPLC)与质谱联用的方法适用于分析含有大量共洗脱干扰物的溶液^[75]。在色谱体系中,某些金属阳离子(如 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺)可能与羧酸形成盐,这些金属阳离子的缺失会影响方法的准确度和灵敏度。二维色谱法的应用有助规避来自样品中阳离子对质谱检测的影响。例如测定样品中 2'-脱氧尿苷(dU)和 5-(羟甲基)-2'-脱氧尿苷(5hmdU)的含量,这两种物质容易形成钠/钾的加合物,使 dU 和 5-hmdU 信号降低,质谱分析数据失去准确度。相比于一维液相色谱,2D-UHPLC 具有更好的分辨率、灵敏度、精密度,能将所有组分更好的分离,在除盐除杂方面效果显著^[76]。

Gackowski 等^[77]在研究内源性 DNA 碱基修饰的过程中采用同位素稀释-2D-UHPLC-MS 的方法(图 6)。其是一种直接、可靠、高通量的方法,该方法结合同位素标记的内标物,可用于测定 DNA 修饰。它的优点是相对较短的运行时间、更高的灵敏度和选择性。而且,全自动二维分离液相色谱与质谱联用适用于分析生物样品,特别是含有大量干扰物的样品。同位素稀释-2D-UHPLC-MS 的技术还可以有效提升未标记和标记化合物的信噪比。

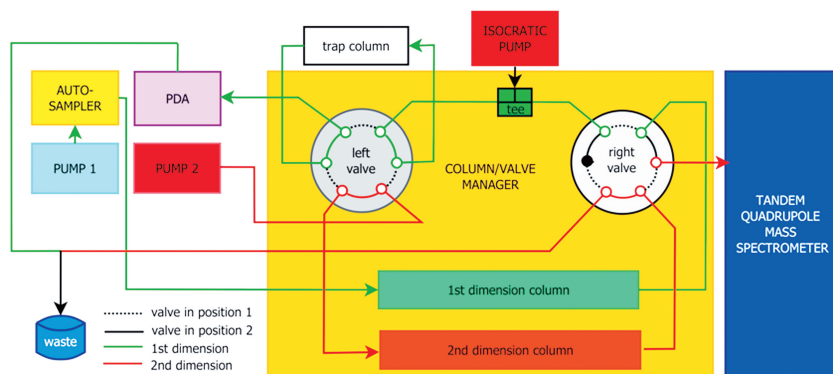


图 6 2D-UHPLC-MS/MS 仪器中流动相的流路图^[77]

Fig. 6 Flow diagram of mobile phase in 2D-UHPLC-MS/MS instrument^[77]

2.2 基于 MALDI-ToF-MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

Ehrich 等^[78]提出了一种利用 MALDI-ToF-MS 质谱分析碱基特异性裂解扩增产物的高通量

DNA 甲基化分析方法(图 7)。通过碱基特异性裂解和 MALDI-ToF 质谱分析 DNA 甲基化。使用位于 CpG 岛外的引物和一个亚硫酸氢盐处理后的带有 T7 启动子序列标记的引物进行 PCR 扩

增。PCR 产物转录为 RNA 并特异性地切割碱基。用 MALDI-ToF 质谱对裂解产物进行分析,得到特征质量数的质谱图。在图 7 中,PCR 产物从反向链转录并特异性切割 U;甲基化模板携带保守的胞嘧啶,PCR 产物的逆转录包含 CG 序列;在非甲基化模板中,胞嘧啶转化为尿嘧啶;序列由 G 变为 A,产生 16Da 的质量位移。例如,裂解产物#1 有两个甲基化位点,则当两个 CpG 位点甲基化或非甲基化时,裂解产物的质量信号将相差 32Da。而对于裂解产物#2 和#3,则只观察到 16Da 的质量位移,因为#2 和#3 都仅包含一个甲基化位点。因此,采用 MALDI-ToF-MS 技术可以分析质谱中是否存在质量信号,以确定模板序列中哪些 CpG 被甲基化,并且基于相应质量信号的峰面积比率用于评估相对的甲基化程度^[78]。Coolen 等^[79] 使用碱基特异性裂解并且运用 MALDI-ToF-MS 技术实现了一种高灵敏和高通量的 DNA 甲基化分析方法,对每个 CpG 残基进行定量分析。经过对实验设计的优化,整理出一个用于准确测量 CpG 甲基化的公式。该实验方案适用于多个基因组区域和大样本群体的 DNA 甲基化分析,这对于分析常人和患者的人类表观基因组 DNA 甲基化修饰具有十分重要的应用价值。

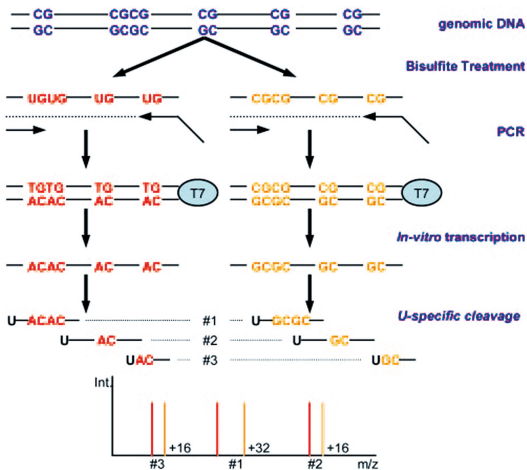


图 7 碱基特异性裂解和 MALDI-ToF 质谱分析 DNA 甲基化^[78]

Fig. 7 Base specific cleavage and MALDI-ToF mass spectrometry analysis for DNA methylation^[78]

2.3 基于 GC-MS 技术研究 DNA 甲基化修饰

液相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 已经广泛应用于分析 DNA 表观遗传的修饰,但 GC-MS 技术需要昂贵的液相色谱仪器和训练有素的专业人

员。此外,由于碱基和核苷酸的分子量较小和极性较高,在液相色谱部分的保留时间较短。液相色谱可能受到色谱分离和定量分析的基质效应的负面影响。GC-MS 技术的优点包括气相色谱的仪器价格与维护成本较低,气相色谱的色谱柱是毛细管柱,该色谱柱具有良好的柱效,使组分能达到更好的分离效果。然而,GC-MS 的缺点是要求流动相是具有挥发性的组分,因此,核苷酸不能用 GC-MS 进行分析,但具有极性的碱基及其衍生物在转化为挥发性的化学物质后,可以使用 GC-MS 检测和分析^[80,81]。

Rossella 等^[82] 将 GC-MS 应用于 DNA 甲基化检测中。在样品前处理的过程中将含有 DNA 的溶液的 EP 管在 N₂ 流下干燥,向残渣中加入含水的甲酸,样品在高温下水解,在室温下冷却并用 N₂ 蒸发。添加内标溶液并再次蒸发样品,向残渣中加入 N-(特丁基二甲基硅)-N-甲基三氟乙酰胺 +1% 三甲基氯硅烷,加乙腈和吡啶进行衍生化,在 40℃ 下反应。将 1μL 体积的衍生化溶液注入 GC/MS 进样口进行分析,根据 GC-MS 所分析得出的数据计算出甲基化的百分比。

$$\text{甲基化 \%} = \frac{Q_{5\text{mcyt}}}{Q_{5\text{mcyt}} + Q_{\text{cyt}}} \times 100\% \quad (2)$$

3 总结与展望

本文介绍了甲基化修饰的核苷前处理流程以及液相色谱 (或气相色谱) 与带有不同质量分析器的质谱联用技术及 MALDI-ToF-MS 用于检测 DNA 表观遗传修饰。质谱法对 DNA 的分析已发展到用来分析每种已知类型 DNA 的情况。目前质谱技术可以高效地应用于 DNA 多态性、单倍型、DNA 甲基化修饰等分析。虽然质谱分析技术也存在一定的局限性,如质谱能分析基因组中的核苷组成,但无法提供长 DNA 的序列组成;质谱对样品的分离和纯化要求高等。目前,液相色谱与质谱联用技术已经广泛的应用于 DNA 表观遗传学的研究之中,在未来随着新兴质谱技术和设备的研发,对于测定基因的 DNA 序列和解析生命的遗传信息发挥至关重要的作用,进而在对揭示疾病的产生、进展、抗治疗性、复发的关键机制和发现精准标志物对疾病进行早期检测等方面具有巨大的应用前景。希望本文中所述质谱技术和方法可以为 DNA 表观遗传修饰领域研究起到一些推动作用。

参 考 文 献

- [1] Jena N R. J. Biosci. , 2012, 37: 503~517.
- [2] Goodwin S, McPherson J D, McCombie W R. Nat. Rev. Genet. , 2016, 17: 333~351.
- [3] Jones P A. Nat. Rev. Genet. , 2012, 13: 484~492.
- [4] Ehrlich M, Turner J, Gibbs P, et al. PNAS, 2008, 105: 4844~4849.
- [5] Milagro F I, Campion J, Cordero P, et al. FASEB J. , 2011, 25: 1378~1389.
- [6] Ming X, Zhang Z Q, Zou Z N, et al. Cell Res. , 2020, 30: 980~996.
- [7] Gowher H, Leismann O, Jeltsch A. EMBO J. , 2000, 19: 6918~6923.
- [8] He Y F, Li B Z, Li Z, et al. Science, 2011, 333: 1303~1307.
- [9] Ito S, D'Alessio A C, Taranova O V, et al. Nature, 2010, 466: 1129~1151.
- [10] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Science, 2011, 333: 1300~1303.
- [11] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y H, et al. Science, 2009, 324: 930~935.
- [12] Bennetzen M V, Larsen D H, Bunkenborg J, et al. Mol. Cell. Proteomics, 2010, 9: 1314~1323.
- [13] Boulias K, Greer E L. Detection of DNA methylation in genomic DNA by UHPLC-MS/MS//DNA Modifications: Methods and Protocols, 2021: 79~90.
- [14] Fu Y, Jia G F, Pang X Q, et al. Nat. Commun. , 2013, 4: 1798.
- [15] Intarasunanont P, Navasumrit P, Waraprasit S, et al. Environ. Health, 2012, 11: 31.
- [16] Liu R J, Zhao F, Wei J Y, et al. J. Sep. Sci. , 2019, 42: 2668~2678.
- [17] Su D, Chan C T Y, Gu C, et al. Nat. Protoc. , 2014, 9: 828~841.
- [18] Jia G F, Fu Y, Zhao X, et al. Nat. Chem. Biol. , 2011, 7: 885~887.
- [19] Pastor W A, Pape U J, Huang Y, et al. Nature, 2011, 473: 394~397.
- [20] Shechter D, Dormann H L, Allis C D, et al. Nat. Protoc. , 2007, 2: 1445~1457.
- [21] She Ln, Wu H, Diep D, et al. Cell, 2013, 153: 692~706.
- [22] Bourniquel A A, Bickle T A. Biochimie, 2002, 84: 1047~1059.
- [23] Cohen-Karn Di, Xu D, Apone L, et al. PNAS, 2011, 108: 11040~11045.
- [24] Sun Z Y, Terragni J, Borgaro J G, et al. Cell Rep. , 2013, 3: 567~576.
- [25] Tsai R, Corrêa I R, Xu M Y, et al. Sci. Rep. , 2017, 7 (1): 8348.
- [26] Wang H, Guan S, Quimby A, et al. Nucl. Acids Res. , 2011, 39: 9294~9305.
- [27] Dai N, Bitinaite J, Chin H G, et al. ChemBioChem, 2013, 14: 2144~2152.
- [28] Song C X, Sun Y, Dai Q, et al. ChemBioChem, 2011, 12: 1682~1685.
- [29] Song C X, Szulwach K E, Fu Y, et al. Nat. Biotechnol. , 2011, 29: 68~72.
- [30] Clark T A, Murray I A, Morgan R D, et al. Nucl. Acids Res. , 2012, 40: e29.
- [31] Flusberg B A, Webster D R, Lee J H, et al. Nat. Methods, 2010, 7: 461~472.
- [32] Simpson J T, Workman R E, Zuzarte P C, et al. Nat. Methods, 2017, 14: 407.
- [33] Song C X, Clark T A, Lu X Y, et al. Nat. Methods, 2012, 9: 75~188.
- [34] Jain M, Kore S n, Miga K H, et al. Nat. Biotechnol. , 2018, 36: 338.
- [35] Laszlo A H, Derrington I M, Brinkerhoff H, et al. PNAS, 2013, 110: 18904~18909.
- [36] Rand A C, Jain M, Eizenga J M, et al. Nat. Methods, 2017, 14: 411~413.
- [37] Shim J, Humphreys G I, Venkatesan B M, et al. Sci. Rep. , 2013, 3(1): 1389.
- [38] Yuan H F, Kuete M, Su L, et al. J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. , 2015, 35: 938~942.
- [39] Li P, Li M, Yue D, et al. J. Sep. Sci. , 2022, 45: 172~184.
- [40] Melzak K A, Sherwood C S, Turner R F B, et al. J. Colloid Interf. Sci. , 1996, 181: 635~644.
- [41] Sahoo S L, Liu C H. Colloid. Surf. A, 2015, 482: 184~194.
- [42] Wang X D, Yan C Y, Wang X K, et al. Anal. Bioanal. Chem. , 2020, 412: 6927~6938.
- [43] Zhang M, Chen J, Pi X M, et al. Electroanalysis, 2019, 31: 477~484.
- [44] Sandstrom P, Boncheva M, Akerman B. Langmuir, 2003, 19: 7537~7543.
- [45] Yang W J, Shen C C, Ji Q L, et al. Nanotechnology, 2009, 20: 085102.
- [46] Diamantino T, Pereira P, Queiroz J A, et al. J. Sep. Sci. , 2016, 39: 3544~3549.
- [47] Zou Y, Mason M G, Wang Y, et al. PLoS Biology, 2018, 16: e1002630.
- [48] Zandieh M, Liu J W. Bioconj. Chem. , 2021, 32: 801~809.
- [49] Abbas M, Abdel-Hamed M O, Chen J G. Appl. Phys. A, 2017, 123: 775.
- [50] Dehghan M, Motaharnejad Ad, Saadat M, et al. RSC Adv. , 2015, 5: 92335~92343.
- [51] Arriagada F J, Osseo-Asare K. Colloids Surf. A, 1999, 154: 311~326.
- [52] Stober W, Fink A, BohE n. J. Colloid Interf. Sci. , 1968, 26: 1.
- [53] Tretyakova N, Matter B, Jones R, et al. Biochemistry,

2002, 41: 9535~9544.

[54] Munzel M, Globisch D, Bruckl T, et al. Angew. Chem. Int. Ed. , 2010, 49: 5375~5377.

[55] Liu B, Liu X, Lai W, et al. Anal. Chem. , 2017, 89: 6203~6210.

[56] Kok R M, Smith D E C, Barto R, et al. Clin. Chem. Lab. Med. , 2007, 45: 903~911.

[57] Kotandeniya D, Murphy D, Seneviratne U, et al. Chem. Res. Toxicol. , 2011, 24: 1966~1975.

[58] Yin R C, Mo J Z, Lu M L, et al. Anal. Chem. , 2015, 87: 1846~1852.

[59] O’Brown Z K, Boulias K, Wang J, et al. BMC Genomics, 2019, 20: 445.

[60] Dou X Y, Boyd-Kirkup J D, McDermott J, et al. Genome Res. , 2019, 29: 1622~1634.

[61] Fraga H P F, Vieira L N, Caprestano C A, et al. Plant Cell Rep. , 2012, 31: 2165~2176.

[62] Chen M L, Shen F, Huang W, et al. Clin. Chem. , 2013, 59: 824~832.

[63] Glish G L, Goeringer D E. Anal. Chem. , 1984, 56: 2291~2295.

[64] Hwang N R, Yim S H, Kim Y M, et al. Biochem. J. , 2009, 423: 253~264.

[65] Lu Y C, Feng S J, Zhang J J, et al. Sci. Rep. , 2016, 6: 18985.

[66] Lafaye C, Barbier E, Miscioscia A, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 2014, 446: 341~346.

[67] Li J Y, Tian M P, Cui L, et al. Sci. Rep. , 2016, 6 (1): 20207.

[68] Li Z, Lyu C, Ren Y, et al. Environ. Health Perspect. , 2020, 128: 027008.

[69] Mo J Z, Liang Z Y, Lu M L, et al. Anal. Chem. , 2020, 92: 7430~7436.

[70] Prins G S, Ye S H, Birch L, et al. Environ. Health Perspect. , 2017, 125(7): 077007.

[71] Tian M P, Liu L P, Zhang J, et al. Chemosphere, 2019, 220: 459~467.

[72] Zeng L D, Ma H M, Pan S X, et al. Toxicol. Vitro, 2016, 34: 35~44.

[73] Li X, Franke A A. Anal. Chim. Acta, 2011, 703: 58~63.

[74] Traube F R, Schiffrers S, Iwan K, et al. Nat. Protoc. , 2019, 14: 283.

[75] Rozalski R, Gackowski D, Siomek-Gorecka A, et al. ChemistryOpen, 2016, 5: 550~553.

[76] Dziaman T, Gackowski D, Guz J, et al. Clin. Epigenetics, 2018, 10: 72.

[77] Gackowski D, Starczak M, Zarakowska E, et al. Anal. Chem. , 2016, 88: 12128~12136.

[78] Ehrich M, Nelson M R, Stanssens P, et al. PNAS, 2005, 102: 15785~15790.

[79] Coolen M W, Statham A L, Gardiner-Garden M, et al. Nucl. Acids Res. , 2007, 35: e119.

[80] Singer J, Schnute W C, Shively J E, et al. Anal. Biochem. , 1979, 94: 297~301.

[81] Tang Y, Gao X D, Wang Y S, et al. Anal. Chem. , 2012, 84: 7249~7255.

[82] Rossella F, Polledri E, Bollati V, et al. Mass Spectrom. , 2009, 23: 2637~2646.

(上接第 66 页)

[93] 岳旭, 王胜, 刘旭, 等. 燃料化学学报, 2020, 48(1): 120~128.

[94] Kasozi G N, Zimmerman R R, Gao P N K B. Environ. Sci. Technol. , 2010, 44(16): 6189~6195.

[95] 吴世权, 周志敏, 吴磊. 材料导报, 2017, 31(07): 1287~1293.

[96] Rezaee A, Rangkooy H, Jonidi-Jafari A, et al. Appl. Surf. Sci. , 2013, 286: 235~239.

[97] 孙忠慧, 申书昌, 吕伟超. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2019, 35 (3): 57~60.

[98] Gomez-Delgado E, Nunell G, Cukierman A L, et al. Bioresource Technol. Rep. , 2022, 18: 101008.

[99] Zhu J, Li Y, Xu L, et al. Ecotoxicol. Environ. Safety, 2018, 165: 115~125.

[100] Du W, Sun J, Zan Y, et al. RSC Adv. , 2017, 7(74): 46629~46635.

[101] Yang F, Li W, Zhang L, et al. Sep. Purif. Technol. , 2021, 276: 119280.