质谱技术在核酸研究领域的应用

周江*

北京分子科学国家实验室; 北京大学分析测试中心; 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: zhoujiang@pku.edu.cn

收稿日期: 2014-01-19; 接受日期: 2014-02-19; 网络版发表日期: 2014-03-31

doi: 10.1360/N032014-00037

摘要 质谱技术具有快速、准确、灵敏度高等优点, 近年来在生物分析方面得到了广泛的应用. 核酸作为生命的基本物质, 一直是生命领域的研究热点, 进展日新月异. 而质谱方法也成为了科学家研究核酸的强有力工具, 具有广阔的发展前景. 本文介绍了核酸检测的质谱技术, 并简要综述了质谱在核酸的高级结构研究、与小分子相互作用、DNA 损伤与修饰等领域的应用, 重点介绍了中国学者的研究成果.

关键词
质谱
核酸
应用

1 引言

核酸是生命的最基本物质之一, 对生物体的生长、发育、繁殖、遗传及变异等重大生命现象起着至关重要的作用^[1, 2]. 现代生物技术发现, 大部分的生理或疾病性状, 都是由一系列存在于核酸序列上的基因调控而表现出来的, 因此目前在抗肿瘤、抗病毒领域, 核酸是最具发展潜力和最有可能获得重大突破的研究对象.

20 世纪 80 年代末以来, 电喷雾电离源(ESI)^[3]和基质辅助激光解吸电离源(MALDI)^[4, 5]的发明, 使得分子量上万乃至几十万的生物大分子质谱检测成为可能, 为质谱技术引入生物研究领域奠定了基础. 相比于其他检测技术而言, 质谱法具有快速、准确、灵敏度高、耗样量少、化学专一性高(可直接分析复杂生物样品或反应混合物)等优势, 因此广泛应用于蛋白质和多肽领域的研究^[6], 在生物分析领域占有越来越重要的地位. 虽然核酸的质谱分析相对蛋白质和多肽具有一定的难度^[7], 但近几年随着质谱技术的不断完善, 核酸的鉴定及其修饰物和复合物的质谱分析也成为了热点. 本文对核酸检测的质谱技术、质谱在核酸研究领域的应用, 特别是中国学者的工作进行

了简要综述.

2 核酸检测的质谱技术

2.1 核酸样品的前处理技术

与蛋白质和多肽样品的质谱分析相比, 核酸样品的质谱检测存在一定的难点: 其结构中含有大量的带负电荷的磷酸根基团, 容易与钾、钠等正电荷离子复合, 造成加合峰过多形成峰包, 离子化效率不高, 给质谱检测带来困难^[8], 因此对于样品的前处理要求较高. 研究人员在这方面投入了相当大的精力找出了多种核酸的纯化方法, 常见的应用于核酸质谱分析的方法有微量透析法(Microdialysis)^[9]、阳离子交换法^[10]、乙醇沉淀^[11]、ZipTips-C18 反相纯化法^[12, 13]、磁珠分离法^[14]、尺寸排阻色谱法^[10]等. 而微流控芯片技术集成了如固相萃取、富集和分离等操作, 与质谱联用后实现了低样品消耗的前处理, 有利于质谱的高灵敏度和高通量检测^[15].

2.2 核酸分析的质谱电离技术

目前核酸分析所使用的质谱电离技术主要还是采用 ESI 和 MALDI. 简单来讲, 两种电离技术都是

软电离, ESI 检测的特点是生物大分子带多个电荷, 质荷比范围基本在 2000 Da 以下区间, 从而能检测几万乃至更大的生物分子; 而 MALDI 常得到单电荷峰, 与飞行时间(TOF)分析器搭配, 检测范围可以到几十万道尔顿。

常规 ESI 技术的样品消耗量常常需要几到几十 $\mu\text{L}/\text{min}$, 这对于生物样品来说消耗较大, 于是纳升级电喷雾源应运而生^[16], 使得样品消耗量大大降低, 并且提高了检测灵敏度, 目前广泛应用于生物样品包括核酸的检测中。

对 MALDI 技术而言, 基质的选择很重要, 直接关系到生物样品谱图的强度、信噪比等, 有很多关于基质筛选的报道^[17]。如 Zhang 等^[18]设计、合成并测试了一种新基质 3-羟基香豆素(3-HC), 能够适用于含有 3~70 个碱基的核酸分析, 并能有效提高负离子的谱图质量。宋玉玲等^[19]则通过考察不同基质, 发展了一种适合 G-四链体测试的混合基质 3-羟基吡啶甲酸/柠檬酸氢二铵(3-HPA/DHC)。Fu 等^[20]发现了一种新的适合寡核苷酸分析的基质 3,4-二氨基二苯甲酮(DABP), 在提高检测灵敏度的同时增加样品结晶的均匀性。Ma 等^[21]将单壁碳纳米管作为基质, 发展了一种表面辅助激光解吸电离(SALDI)技术, 增强了对高盐样品的耐受性, 减少了基质效应, 相对其他基质有 3~5 倍的信号增强, 提高了检测 700 Da 以下生物样品(如 ATP)的灵敏度。

3 质谱技术在核酸领域的应用

3.1 核酸高级结构的研究

寡核苷酸不仅可以形成常规的双链 DNA 以及发夹型结构, 在阳离子存在的情况下, 一些富嘌呤序列还会形成三链体、四链体等二级结构^[22, 23], 这些特殊结构对正常生物学行为有着重要的调控功能和意义, 因此近年来成为生命领域的研究热点之一。这些年来利用质谱技术研究核酸高级结构这方面的报道也逐年增多, 其直观、快捷的优点也同时显现出来。国外在这方面起步较早^[24], 但国内学者在近 10 年来也在这个领域做出了重要的贡献。

Guo 等^[25]利用电喷雾质谱(ESI-MS)研究了发夹型 DNA 与相同碱基组成的单链 DNA 形成的多电荷峰电荷分布的差别, 发现发夹型 DNA 比单链 DNA

带有相对更多的负电荷, 因为发夹型的结构可以稳定更多电荷的负离子, 这项工作初步显示了质谱技术在鉴别核酸构象的应用。Zhou 等^[26]同样利用电喷雾质谱研究了四链体 DNA 的形成性质, 发现 XGGGGX 序列($X = \text{T}, \text{A}, \text{C}$)会自组装形成单纯的四链体, 而不是杂链四聚体, 并且验证了中心配位的铵离子数目为 G 平面个数减 1。此外, 还通过离子传输管的变温进行了各四链体的热稳定性测定。Wan 等^[27]则使用电喷雾傅里叶变换质谱联用(ESI-FT-MS)技术发现了二价阳离子对富嘌呤三链 DNA 形成的影响, 结果显示过渡金属二价离子如 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 最能稳定三链螺旋结构, 接下来是 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} , 然后是碱金属 Mg^{2+} , 而 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 都不能稳定三链结构。Guo 等^[28]还使用 ESI-FT-MS 研究发现, 对于 $(\text{G}_3\text{T}_4\text{G}_3)$ 等双分子形成的四链体, 中心阳离子不仅能够稳定四链体的结构, 还能在高浓度下诱导该结构解链形成三分子、四分子的高级结构。Li 等^[29, 30]也用质谱系统研究了四链体结构形成的影响因素, 得出铵离子的浓度逐渐增大会诱导一条无规卷曲的富 G 链形成四链体结构, 溶液 pH、有机相的比例以及 DNA 的浓度都会对四链体结构的稳定或转化产生较大影响。

这些工作都突显了质谱技术在鉴别核酸构象时快捷、灵敏和直观的优势, 如果通过其他检测方法获得这些结果的话, 将耗费大量的时间和样品。当然, 仅仅依靠质谱数据, 尚不能给出构象的完整有力证据, 常常需要结合圆二色谱、荧光光谱、电泳、NMR 等手段。而离子淌度质谱技术的引入, 则在一定程度上帮助质谱学家利用质谱就能得到足够的实验数据来验证核酸高级结构的形成^[31]。周江等^[32]利用离子淌度质谱验证了 *c-myc* 序列退火后构象从单体四链体转化形成二聚四链体。与国外相比, 目前国内在离子淌度质谱技术应用方面才刚起步, 关于核酸研究的报道不多, 但相信这会是研究生物大分子构象的有力工具, 今后会有越来越多这方面的成果。

3.2 寡核苷酸与小分子相互作用的研究

针对核酸的二级结构和功能, 筛选对其正常的生物学行为有干扰和阻滞作用的化学小分子是研究的热点之一。由于 MALDI 的基质与样品分子共结晶可能会破坏一些非共价的相互作用, 所以 ESI-MS 最为广泛地应用于研究各类生物分子之间或与小分子之间的相互作用。这方面有大量的文献报道^[33, 34], 涉

及双链、三链、四链等各种形式的寡核苷酸。

Zhou 等^[35]首次在一个端粒四链体与双链 DNA 的混合体系中观察到与不同小分子的复合物,从而直观快捷地判断出与四链体结构具有选择性结合的小分子 Tel03,同时还利用质谱发现 Tel03 分子更易与四链体某一种构象(反向平行)结合,这也凸显出质谱技术在这种混合体系分析中的优势. Xu 等^[36]用质谱研究了 6 种天然生物碱与平行 G-四链体之间的亲和性与化学计量比关系,得到了 5 种生物碱与四链体有一定亲和性的结论,并通过化学计量比关系推测了小分子结合模式. Li 等则利用质谱峰强定量研究了 7 种小分子与 *bcl-2* 序列四链体之间的亲和性强弱顺序,并从结合选择性出发找出了两个能够引起四链体与双链 DNA 转化的小分子. 质谱毛细管升温实验显示,结合较强的小分子能提高四链体结构的热稳定性^[29]. 此外,对于一条 HIV-1 整合酶抑制剂序列,还发现了分别诱导形成分子间或分子内四链体的两个小分子^[30]. Xu 等^[37]建立了一种高效液相色谱电喷雾质谱联用(HPLC-ESI-MS)配体钓鱼实验,可以快速从天然产物提取液中筛选出三链 DNA 的结合分子. 受这些小分子结构启发, Zhang 等^[38]设计并合成了一个环状寡聚酰胺分子,能够与 *c-myc* 序列四链体选择性结合. 此外,从 DNA 的研究工作引申, Cui 等^[39]还研究了几种天然环状分子与人类端粒 RNA 序列的结合强弱.

3.3 DNA 损伤与修饰的测定

DNA 加合物是一类重要的生物标志物,是 DNA 损伤的一种形式,关键基因的突变甚至会启动癌变. 质谱技术高灵敏度、高准确性的特点正好符合测定 DNA 损伤与修饰,结合高效液相色谱技术,能够实现高通量的检测^[40].

Yin 等^[41]利用稳定同位素稀释技术,发展了一种能灵敏、准确地同时识别人体细胞中 α -AcrdG, γ -AcrdG, α -AcrdC 和 α -AcrdA 的超高效液相色谱串联

质谱联用(UPLC-MS/MS)方法,同时发现碳酸氢铵不仅能有效提高丙烯醛-DNA 加合物与异构体的分离度,还能增强质谱检测修饰 2'-脱氧核糖核苷的能力. Lai 等^[42]建立了一种检测 DNA 与溴苯醌类加合物的 ESI-S 方法,这将有可能为快速鉴定生物标志物提供路径. Lai 等^[43]还用喷雾四级杆飞行时间质谱(ESI-QTOF-S)技术研究了多溴联苯醚(PBDEs)DNA 加合物的形成及其可能机制,结果表明,多溴联苯醚可以通过醌代谢物介入而共价结合到 DNA 上,并取决于溴取代度. Wu 等^[44, 45]采用基于质谱的梯状测序法和自上而下的质谱法鉴定了钌芳烃络合物在一系列 15 个碱基的 DNA 单链上的结合位点,找出了其中唯一的 G 碱基以及两个 T 碱基为竞争结合位点,同时还发现了在端粒四链体中的 T 碱基与 G 碱基也存在这种钌酸化竞争结合关系. 他们还探讨了双链 DNA 的钌络合物从一条链迁移到另一条链的机理为 SN1 途径^[46].

3.4 其他核酸研究领域的应用

此外,在核苷酸定量分析、核酸测序、核酸与蛋白相互作用以及单核苷酸多态性(SNP)分型的研究中,质谱都成为了常用乃至必备的手段,中国学者在这些领域也都占有一席之地^[47, 48].

4 结语

综上,质谱技术相比于其他检测技术具有快速、准确、灵敏度高、可以高通量等优点,近年来在核酸的高级结构鉴定、寡核苷酸与小分子的相互作用、DNA 损伤与修饰等领域有着广泛的应用. 特别值得一提的是,中国学者在这方面也开展了具有国际领先水平的工作. 同时,由于生物样品的复杂性,质谱技术还面临着一些挑战和困难. 但生物质谱技术作为科学家的有力工具,在未来几年里还将会在核酸研究领域实现突飞猛进的发展,为解开生命的密码做出贡献.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展计划(2012CB720600, 2012CB720601)和国家自然科学基金(21372021, 21002005)的资助,特此致谢.

参考文献

- 1 Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737-738

- 2 Venter C, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291: 1304–1351
- 3 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246: 64–71
- 4 Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 1988, 2: 151–153
- 5 Hillenkamp F, Karas M. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988, 60: 2299–2301
- 6 何美玉. 生物大分子分析研究领域的重大突破. *大学化学*, 2003, 18: 18–22
- 7 Henry C. Can MS really compete in the DNA world? *Anal Chem*, 1997, 69: 243A–246A
- 8 杨何义, 蔡耘, 钱小红. 生物质谱在核糖核酸领域的应用. *质谱学报*, 2004, 25: 52–60
- 9 Liu C, Wu Q, Harms AC, Smith RD. On-line microdialysis sample cleanup for electrospray ionization mass spectrometry of nucleic acid samples. *Anal Chem*, 1996, 68: 3295–3299
- 10 Cui Z, Theruvathu JA, Farrel A, Burdzy A, Sowers LC. Characterization of synthetic oligonucleotides containing biologically important modified bases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2008, 379: 196–207
- 11 Huang TY, Liu J, Liang X, Hodges BDM, McLuckey SA. Collision-induced dissociation of intact duplex and single-stranded sirna anions. *Anal Chem*, 2008, 80: 8501–8508
- 12 Jiang Y, Hofstadler SA. A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2003, 316: 50–57
- 13 Berhane BT, Limbach PA. Stable isotope labeling for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and post-source decay analysis of ribonucleic acids. *J Mass Spectrom*, 2003, 38: 872–878
- 14 Spottke B, Gross J, Galla HJ, Hillenkamp F. Reverse Sanger sequencing of RNA by MALDI-TOF mass spectrometry after solid phase purification. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e97
- 15 水雯菁, 苏佳, 黄珍玉, 黄懿, 杨芃原. 微流控芯片与生物质谱联用技术的发展与展望. *质谱学报*, 2002, 23: 100–111
- 16 Wilm M, Shevchenko A, Howthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 1996, 379: 466–469
- 17 Sauer S. The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70: 311–318
- 18 Zhang Z, Zhou L, Zhao S, Deng H, Deng Q. 3-Hydroxycoumarin as a new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of DNA. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17: 1665–1668
- 19 宋玉玲, 吕美玲, 汪海林. 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱分析寡核苷酸 G-四链体. *中国科学: 化学*, 2011, 41: 74–81
- 20 Fu Y, Xu S, Pan C, Ye M, Zou H, Guo B. A matrix of 3,4-diaminobenzophenone for the analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e94
- 21 Ma R, Lu M, Ding L, Ju H, Cai Z. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric detection of biomolecules by using functional single-walled carbon nanohorns as the matrix. *Chem Eur J*, 2013, 19: 102–108
- 22 Cheng AJ, Van Dyke MW. Monovalent cation effects on intermolecular purine-purine-pyrimidine triple-helix formation. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5630–5635
- 23 Davis JT. G-quartets 40 years later: from 5' -GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 668–698
- 24 Goodlett DR, Camp DG, Hardin CC, Corregan M, Smith RD. Direct observation of a DNA quadruplex by electrospray ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*, 1993, 22: 181–183
- 25 Guo X, Bruist MF, Davis DL, Bentzley CM. Secondary structural characterization of oligonucleotide strands using electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 3659–3666
- 26 Zhou J, Yuan G, Liu JJ, Zhan CG. Formation and stability of G-quadruplexes self-assembled from guanine-rich strands. *Chem Eur J*, 2007, 13: 945–949
- 27 Wan C, Cui M, Song F, Liu Z, Liu S. Evaluation of effects of bivalent cations on the formation of purine-rich triple-helix DNA by ESI-FT-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 1281–1286
- 28 Guo X, Liu S, Yu Z. Bimolecular quadruplexes and their transitions to higher-order molecular structures detected by ESI-FTICR-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18: 1467–1476
- 29 Li HH, Liu YQ, Lin S, Yuan G. Spectroscopy probing of the formation, recognition, and conversion of a G-quadruplex in the promoter region of the bcl-2 oncogene. *Chem Eur J*, 2009, 15: 2445–2452

- 30 Li HH, Yuan G, Du DM. Investigation of formation, recognition, stabilization, and conversion of dimeric G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 550–559
- 31 Baker ES, Bernstein SL, Bowers MT. Structural characterization of G-quadruplexes in deoxyguanosine clusters using ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 989–997
- 32 周江, 袁谷, Bowers MT. 电喷雾质谱法研究退火条件对 c-myc 启动子序列构象的影响. *质谱学报*, 2008, 29: 213–214
- 33 Gale DC, Goodlett DR, Light-Wahl KJ, Smith RD. Observation of duplex DNA-drug noncovalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 6027–6028
- 34 Yuan G, Zhang Q, Zhou J, Li H. Mass spectrometry of G-quadruplex DNA: formation, recognition, property, conversion, and conformation. *Mass Spectrom Rev*, 2011, 30: 1121–1142
- 35 Zhou J, Yuan G. Specific recognition of human telomeric G-quadruplex DNA with small molecules and the conformational analysis by ESI mass spectrometry and circular dichroism spectropolarimetry. *Chem Eur J*, 2007, 13: 5018–5023
- 36 Xu N, Yang H, Cui M, Song F, Liu Z, Liu S. Evaluation of alkaloids binding to the parallel quadruplex structure [d(TGGGGT)]₄ by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2012, 47: 694–700
- 37 Xu N, Yang H, Cui M, Wan C, Liu S. High-performance liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry ligand fishing assay: a method for screening triplex dna binders from natural plant extracts. *Anal Chem*, 2012, 84: 2562–2568
- 38 Zhang Q, Cui X, Lin S, Zhou J, Yuan G. Convenient method for the synthesis of a flexible cyclic polyamide for selective targeting of c-myc G-quadruplex DNA. *Org Lett*, 2012, 14: 6126–6129
- 39 Cui X, Lin S, Zhou J, Yuan G. Investigation of non-covalent interaction of natural flexible cyclic molecules with telomeric RNA G-quadruplexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2012, 26: 1803–1809
- 40 冯峰, 王超, 吕美玲, 汪海林. DNA 加合物检测. *化学进展*, 2009, 21: 503–513
- 41 Yin R, Liu S, Zhao C, Lu M, Tang M, Wang H. An ammonium bicarbonate-enhanced stable isotope dilution UHPLC-MS/MS method for sensitive and accurate quantification of acrolein–dna adducts in human leukocytes. *Anal Chem*, 2013, 85: 3190–3197
- 42 Lai Y, Lu M, Lin S, Wu H, Cai Z. Electrospray ionization tandem mass spectrometric characterization of DNA adducts formed by bromobenzoquinones. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 2011, 25: 2943–2950
- 43 Lai Y, Lu M, Gao X, Wu H, Cai Z. New evidence for toxicity of polybrominated diphenyl ethers: dna adduct formation from quinone metabolites. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 10720–10727
- 44 Wu K, Hu W, Luo Q, Li X, Xiong S, Sadler PJ, Wang F. Competitive binding sites of a ruthenium arene anticancer complex on oligonucleotides studied by mass spectrometry: ladder-sequencing versus top-down. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2013, 24: 410–420
- 45 Wu K, Liu S, Luo Q, Hu W, Li X, Wang F, Zheng R, Cui J, Sadler P, Xiang J, Shi Q, Xiong S. Thymine in single-stranded oligonucleotides and G - Quadruplex DNA are competitive with guanines for binding to an organoruthenium anticancer complex. *Inorg Chem*, 2013, 52: 11332–11342
- 46 Wu K, Luo Q, Hu W, Li X, Wang F, Xiong S, Sadler PJ. Mechanism of interstrand migration of organoruthenium anticancer complexes within a DNA duplex. *Metallomics*, 2012, 4: 139–148
- 47 杨何义, 蔡耘, 王杰, 周钢桥, 贺福初, 钱小红. 生物质谱作为 SNP 分型检测方法的研究. *质谱学报*, 2003, 24: 449–455
- 48 Zhao C, Yin R, Yin J, Zhang D, Wang H. Capillary monolithic bioreactor of immobilized snake venom phosphodiesterase for mass spectrometry based oligodeoxynucleotide sequencing. *Anal Chem*, 2012, 84: 1157–1164

Application of mass spectrometry in nucleic acids research

ZHOU Jiang^{*}

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences; Analytical Instrumentation Center; College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

^{*}Corresponding author (email: zhoujiang@pku.edu.cn)

Abstract: As a rapid, accurate and sensitive technique, mass spectrometry has been widely used in biological research area. Nucleic acids are the basic substance of life, and have been a hot research field in life science. In recent, mass spectrometry has become a powerful tool for scientists to study the nucleic acids, with rapid developments. This paper introduces the mass spectrometry for nucleic acids, and briefly review the application of mass spectrometry in the nucleic acids research of high order structures, interactions with small molecules, DNA damage and modification, mainly introducing the research achievements by Chinese scholars.

Keywords: mass spectrometry, nucleic acids, applications