



DNA加合物分析技术与方法

张宁¹, 刘保东¹, 汪海林^{1,2*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

*通讯作者, E-mail: hlwang@rcees.ac.cn

收稿日期: 2017-07-28; 接受日期: 2017-11-06; 网络版发表日期: 2017-11-24

国家自然科学基金(编号: 21435008)和创新研究群体项目(编号: 21621064)资助

摘要 DNA加合物是由亲电性的小分子化合物与DNA链中的多种亲核性基团发生共价反应而形成的, 可作为遗传毒性标志物. DNA加合物的生成是一些有毒化学品引起基因突变、发育畸形、肿瘤和癌症效应过程中的重要阶段, 是医学、毒理学和环境健康研究的重要内容. 发展快速、灵敏、准确的检测技术和方法是理解和研究DNA加合物生物学作用的关键. 目前DNA加合物分析方法主要包括³²P后标记法、免疫分析法、免疫毛细管电泳-激光诱导荧光法、DNA测序以及色谱-质谱联用技术等. 本文对这些技术和方法及其在DNA加合分析中的应用进行了综合评述, 同时简要展望了DNA加合物分析技术和方法的发展.

关键词 DNA加合物, DNA损伤, 分析技术与方法, 液相色谱-质谱分析

1 引言

DNA加合物是一类极其重要的DNA损伤生物标志物, 是外源或内源亲电化合物与亲核性的DNA分子发生共价反应生成的加合物, 属于遗传毒性生物标志物^[1]. 生成的DNA加合物可以通过DNA修复的形式被消除, 从而保证DNA、细胞乃至整个生命体的稳定性. 如果形成的DNA加合物位于抑癌基因区段且不能通过上述途径及时去除或者准确修复, 有可能导致基因遗传信息的永久性改变(基因突变), 进而启动肿瘤的发展^[2,3]. 研究表明, DNA加合物的形成是有毒化学品致突变、致畸、致癌过程中的一个重要阶段. 它既可以作为暴露标志物, 反映毒物在靶位的实际暴露剂量, 又可以作为效应标志物, 反映DNA受到有毒化学品损伤的程度^[4,5]. 对DNA加合物进行准确的定性定量可

以为监测及评估有毒化学品的暴露水平提供依据, 也为有毒化学品接触所引发相关疾病的防御和治疗引导提供策略^[5]. 因此, DNA加合物的研究具有重要的生物学意义. 目前, 已报道的可诱发DNA加合物生成的化合物主要包括烷基化试剂^[6]、多环芳烃类^[7-12]、苯醌类^[13,14]、醛类^[15]、N-亚硝胺类^[16-19]、杂环芳香胺类^[20-25]、黄曲酶毒素^[26]和环氧化物衍生物^[27-30]等. 这些化合物在环境中广泛存在, 并且能够通过多种途径进入人体. 因此, DNA加合物的检测与分析也是毒理学与环境健康研究的重要内容. DNA加合物水平是生物体经受有毒化学品有效剂量暴露在体内产生有效作用的最终表现, 综合反映了有毒化学品暴露、吸收、分布、代谢以及生物体对DNA加合物的修复能力^[31].

由于暴露后生物体内所产生的DNA加合物丰度极低, 如何实现从大量的正常核苷酸中检测到含量极

引用格式: 张宁, 刘保东, 汪海林. DNA加合物分析技术与方法. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1432-1444

Zhang N, Liu B, Wang H. Technology and methodology of DNA adducts analysis. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1432-1444, doi: 10.1360/N032017-00132

低的加合物(约为0.1~1个加合物/ 10^8 个核苷酸)是一项极具挑战性的研究课题. 另外, 所发展的分析方法必须同时具备超高的灵敏度和准确性. 经过三十多年的研究与发展, 目前DNA加合物分析方法主要包括: ^{32}P 后标记法、免疫分析法、免疫毛细管-激光诱导荧光法、DNA测序以及色谱-质谱联用技术等. 其中, 免疫毛细管-激光诱导荧光法灵敏度最高. 随着质谱分析仪器与技术的发展, 液相色谱-质谱法以其高效分离、灵敏、准确度高、特异性强以及同时能够提供加合物的结构信息等优势, 逐渐成为DNA加合物分析的主要检测技术. 本文评述了以上DNA加合物分析方法的发展与应用, 并重点对本研究组近年来在DNA加合物分析方面的工作予以介绍.

2 DNA加合物检测方法

2.1 ^{32}P 后标记法

^{32}P 后标记法最早于1981年由Randerath等^[32]提出. 该方法的基本原理是利用多聚核苷激酶和放射性同位素 ^{32}P 标记的三磷酸腺苷(ATP)将DNA酶解形成的单核苷酸磷酸化, 产生 ^{32}P 标记的DNA核苷酸加合物, 再经薄层色谱等分离, 并通过放射自显影, 实现DNA加合物的定量分析. 该方法的基本流程为以下4步(图1). (1) 在内、外切酶的作用下, 将含有加合物的DNA酶切为3'-磷酸核苷酸; (2) 采用T4多聚核苷激酶将具有高度特异活性的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的磷酸基团转移到单核苷酸的5'-羟基末端, 从而形成可放射显影的5'- ^{32}P 标记-3',5'-二磷酸核苷酸; (3) 通过薄层色谱(TLC)或高效液相色谱(HPLC)等将含加合物的单核苷酸和正常的单核苷酸进行分离; (4) 对分离的加合物单核苷酸进行放射自

显影及定量分析. 通过加合物富集能够进一步提高方法的检测灵敏度. 例如, 在 ^{32}P 标记前可利用丁醇选择性地富集疏水性强的单核苷酸加合物; 另外采用核酸酶 P_1 或 S_1 处理酶解产物, 使正常的3'-单核苷酸去磷酸化, 不被随后的T4多核苷酸激酶进行5'- ^{32}P 标记, 而含加合物的单核苷酸由于加合物的阻碍作用不能被去磷酸化, 从而含有加合物的3'-单核苷酸可被选择性标记, 显著提高了方法的检测灵敏度(约3个数量级)^[33-35].

^{32}P 后标记法检测灵敏度高, 可达1个加合物/ 10^{10} 个核苷酸; DNA用量较小, 约1~10 μg DNA. 该方法可应用于多种混合DNA加合物的同时检测. ^{32}P 后标记法虽然具有以上优势, 但却不能准确提供样品的结构信息, 同时存在操作繁琐耗时、准确度低、重现性差、实验回收率低等缺点; 另外由于使用了放射性标记, 仅适用于具有放射性安全设施的实验室^[5,15].

^{32}P 后标记法已有许多应用. 例如, Nath等^[36,37]建立了一种 ^{32}P 后标记法, 可用于检测乙醛、丙烯醛及巴豆醛DNA环外加合物. Bacova等^[38]和Budiawan等^[39]对该方法进行了进一步改良与应用. 其步骤如下: 使用微球菌核酸酶和牛脾磷酸二酯酶(BSP)将DNA酶解为3'-磷酸核苷酸, 再通过固相萃取(SPE)选择性富集3'-磷酸加合物核苷酸, 然后添加 P_1 核酸酶、T4多核苷酸激酶和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 反应得到含加合物的5'- ^{32}P -3',5'-双磷酸核苷酸; 使用薄层色谱法(TLC)除去剩余的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 后, 再经HPLC制备纯化出5'- ^{32}P -3',5'-双磷酸加合物核苷酸, 干燥, 重新溶解, 最后再通过HPLC分离、辐射检测器检测, 对不同加合物进行定量. 该方法有两个特点: (1) 在 ^{32}P 标记前通过固相萃取对加合物的富集; (2) 通过加标后dG的开环反应对其进行最后的表征与定量. 利用该方法实现了不同生物样品中1, N^2 -丙基-dG

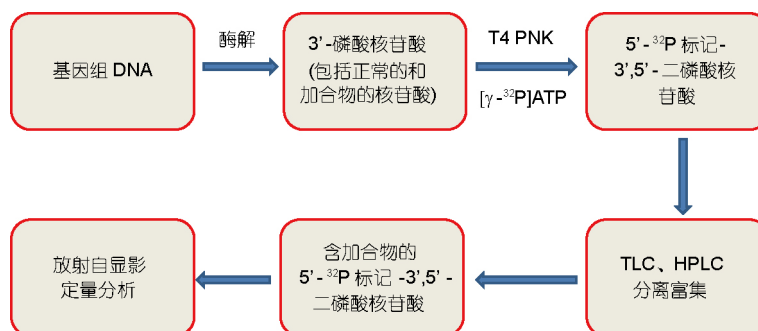


图1 ^{32}P 后标记法检测DNA加合物的一般流程(网络版彩图)

加合物的检测与分析.

2.2 免疫分析法

免疫分析法利用特异性的抗体选择性地结合DNA加合物,并将这种结合转换为可检测的光、电信号^[5]. 1977年, Poirier等^[40]采用竞争性放射免疫法(RIA)检测DNA加合物,利用放射性同位素标记的化合物修饰的核苷酸与未标记的核苷酸竞争结合特定的加合物抗体,通过测定标记的抗原-抗体复合物的放射性进行定量. 目前,已经建立和发展的DNA加合物免疫分析法还包括酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫吸附法(RIST)以及超敏促放射免疫法(USRIA)等. 免疫分析法操作简便易行、成本低,且不需要对DNA链进行酶解,检测灵敏度可达1~10个加合物/ 10^8 个核苷酸,所需DNA量为25~60 μg ;然而,抗体的合成与制备对免疫分析法的建立起到至关重要的作用,并且可能存在交叉免疫反应. 另外,免疫分析法无法实现非抗原性加合物及未知加合物的检测.

1987年, Foiles等^[41]成功合成出巴豆醛-DNA加合物((6*S*,8*S*)和(6*R*,8*R*) ProdG的单克隆抗体,结合HPLC和ELISA检测巴豆醛暴露所产生的ProdG加合物. 两年后,他们再次利用自制的单克隆抗体CA2,建立了一种免疫分析方法,用于监测丙烯醛暴露的鼠伤寒沙门氏菌中丙烯醛-DNA加合物(γ -AcrdG)的生成情况^[42]. Nakamura等^[43]采用荧光免疫组织化学染色的方法,通过抗体攻击乙醛-DNA加合物,并在酗酒者的额皮质和中脑细胞中检测到了乙醛-DNA加合物. Duhachek等^[44]发展了一种对DNA加合物进行定量检测并且直接读数的新方法,通过制备单克隆抗体金免疫传感器芯片及荧光谱线窄化光谱(FLNS)对致癌物-DNA加合物进行检测. Pan等^[45]利用自制的高活性、高特异性单克隆抗体建立了多种AcrdG加合物免疫分析方法. 结合快速流式细胞荧光分选技术(FACS)实现了细胞内AcrdG的直接检测;通过ELISA实现细胞和组织中AcrdG的高灵敏检测, DNA用量仅为1.0 μg 且不需要酶解和样品富集;此外,该课题组进一步发展了一种免疫组织化学法,实现了HT29细胞和人类口腔细胞中AcrdG的检测与成像. Lee等^[46]同时采用 ^{32}P 后标记法和免疫分析法,检测正常人尿路上皮黏膜(NMUM)和膀胱肿瘤组织(BTT)中AcrdG加合物和4-氨基联苯(4-ABP)-DNA加合物的含量,并测定这两类加合物对人膀胱上皮细胞的致突变性. 结果显示,所有检测样

品中AcrdG的水平是4-ABP-DNA的10~30倍; BTT中AcrdG的含量是NMUM中的2倍. 两类加合物均有致突变性,然而AcrdG的致突变性是4-ABP-DNA的5倍. 进一步研究发现,丙烯醛抑制尿路上皮细胞核苷酸切除和碱基切除修复及诱导修复蛋白降解,从而初步判定丙烯醛暴露是诱发膀胱癌的重要因素.

2.3 免疫毛细管电泳-激光诱导荧光法

免疫毛细管电泳-激光诱导荧光法是特异性将免疫识别与毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)结合起来. 该方法集合了CE的高效分离、LIF的高灵敏度以及免疫分析的高特异性,具有分析时间短、灵敏度高、重现性好、DNA用量少且无需酶解等诸多优势. 不仅如此,该项技术同时适用于DNA分析、蛋白质分析、适配体分析以及DNA-蛋白相互作用研究等^[47].

目前我们利用研制的CE-LIF检测装置系统(图2)开展了DNA加合物的快速高效、高灵敏分析方法学研究. Carnelley等^[48]合成了一种5'端荧光标记含一个邻二醇环氧苯并[α]苊-脱氧鸟苷(BPDE-dG)加合物长度为90个碱基的DNA探针. Tan等^[49]利用该探针发展了一种免疫CE-LIF法用于BPDE-DNA加合物的检测;研究发现,在低离子强度下探针-DNA复合物与游离探针能得到有效分离,并且甲酰胺能够有效提高DNA的变性效果,但不影响复合物的稳定;在优化的实验条件下复合物和游离探针的理论塔板数分别达到 $6 \times 10^5/\text{m}$ 和 $1 \times 10^6/\text{m}$. Wang等^[50]进一步通过竞争性免疫实验和非竞争性免疫实验利用该探针检测BPDE-DNA加合

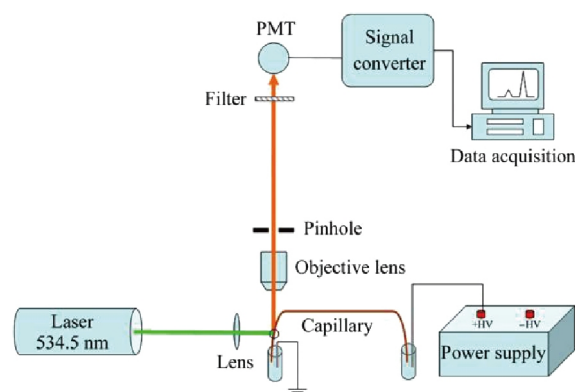


图2 自制的毛细管电泳-激光诱导荧光检测装置设计图^[45] (网络版彩图)

物, 并成功实现低剂量BPDE暴露下人肺癌细胞A549基因组DNA中加合物的检测. 在非竞争性免疫实验中, 使用荧光染料标记的二抗片段F(ab')₂作为探针来识别一抗和加合物的复合物, 形成的三元复合物经CE与游离的F(ab')₂有效分离并通过LIF实现检测. 采用该方法分析32 nM~1.0 μM BPDE暴露后的A549细胞中BPDE-DNA加合物的水平变化, 发现两者之间存在明显的剂量效应关系. 此外, Wang等^[51]通过合成的BPDE-16mer和90mer加合物探针深入探究了免疫CE-LIF中DNA加合物与抗体结合的化学计量关系. 研究发现, 16mer加合物能以1:1和2:1的化学计量与抗体结合, 并通过CE有效分离; 利用该方法检验了荧光标记和非荧光标记的BPDE-16mer加合物在抗体上的重分配和交换现象; 再将荧光标记的16mer加合物和非荧光标记的90mer加合物及抗体混合, 发现生成了16mer-抗体、(16mer)₂-抗体和16mer-抗体-90mer 3种复合物, 从而表明抗BPDE-dG IgG抗体的两个半抗原结合位点均可以结合含BPDE-dG加合物的DNA. Wang等的研究同时发现二元和三元复合物形成的比例与含BPDE-dG加合物DNA链的长短相关, 由于位阻效应长链DNA倾向形成二元复合物; 而短链DNA可同时形成二元和三元复合物, 并且两种复合物的比例依赖于加合物与抗体的相对量. 在免疫CE-LIF分析中痕量的抗原-抗体反应形成极低含量的复合物(低于10⁻¹⁸ mol), 直接影响方法的灵敏度与重现性. Wang等^[52]研究发现在免疫CE-LIF检测中低浓度的BPDE-dG加合物荧光探针与抗体反应所形成的复合物不稳定, 且不符合定量的化学平衡关系; 然而, 通过引入非特异性蛋白如牛血清白蛋白(BSA)或兔免疫球蛋白(RGG), 能够有效增强复合物的形成, 提高抗体和复合物的稳定性. 采用此方法显著提高检测灵敏度(~10倍)与重现性, 且抗体的使用浓度降低至原来的1/150而不影响抗体的活性和复合物的形成. 为进一步提高CE-LIF分析方法的检测灵敏度, Wang等^[53]通过电泳聚焦技术将有限的DNA加合物-抗体复合物聚焦于一狭窄区带, 显著提高了免疫CE-LIF的分离能力、检测灵敏度及分析速度; 对BPDE-dG加合物的检测灵敏度提高了30~70倍, 达到1.0 pM, 分析时间缩短至30 s.

2.4 DNA测序技术

DNA测序技术可以用于检测有毒化学品与DNA

形成加合物的损伤分布、结合位点、特异性酶促反应以及各种因素引起DNA所产生的生物化学效应^[54]. Denissenko等^[55]利用基因特异性的DNA测序方法研究了苯并[a]芘的致癌代谢物与细胞作用后p53基因上的加合物分布, 发现加合物频率最高的位点(157、248、273密码子上的鸟嘌呤)与吸烟肺癌患者的p53基因突变频率最高的位点一致. Smith等^[56]的研究工作同样证实了致癌多环芳烃与肺癌细胞作用后生成加合物最多的位点与p53基因突变频率最高的位点一致. 通过他们的工作直接确立了DNA加合物→基因突变→癌症之间的关系.

1977年, Maxam-Gilbert^[57]测序技术又称化学降解法与Sanger^[58]双脱氧链终止法DNA测序技术同时出现. 前者的测序原理是在选定的核苷酸碱基中引入化学基团, 经过化合物处理使DNA分子在被修饰的核苷酸位置降解; 后者是利用DNA聚合酶的聚合反应, 在反应体系中引入一定比例的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)作为终止剂, 由于DNA多聚酶不能区分dNTP和ddNTP, 因此ddNTP可以掺入新生单链中, 导致合成的新链在此终止, 终止点由反应中相应的ddNTP而定. 虽然两种方法原理不同, 但都是根据核苷酸在某一固定的点起始, 随机在某一特定碱基处终止, 形成一系列以某一特定脱氧核苷酸为末端的长度各异的寡脱氧核糖核苷酸混合物, 然后通过高分辨率的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 经放射自显影后直接从胶片上读出组成DNA的核苷顺序. 随着人类基因组计划的完成, 传统的测序方法已经不能满足深度测序和重复测序等大规模基因组测序的需求, 这促使了新一代DNA测序技术的诞生. 第二代测序技术主要包括罗氏454公司的GS FLX测序平台、Illumina公司的Solexa Genome Analyzer测序平台和ABI公司的SOL-iD测序平台^[59]. 第二代测序技术最显著的特征就是高通量, 一次能对几十万到几百万条DNA进行序列分析^[60]. 以单分子测序为特点的第三代DNA测序技术稳步发展, Pushkarev等^[61]利用Heliscope单分子测序仪, 对一名白人男子的基因组进行了测序, 测序覆盖90%的人类参考基因组, 序列读长24~70 bp, 平均读长为32 bp, 并鉴定出280万个SNP位点和752个拷贝数变异. DNA测序技术作为现代生命科学研究的核心技术之一, 其发展为DNA分析提供了先进的检测手段, 推动生命科学进入一个更加繁荣的时期.

1964年, Holley等^[62]提出了采用蛇毒磷酸二酯酶(核酸外切酶)对小片段DNA进行酶解, 然后通过紫外光谱仪对不同组分的酶解产物进行分析并整合, 最终得到小片段DNA的完整序列信息。1993年, Picles等^[63]采用基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)对核酸外切酶酶解产物进行分析, 从而建立起时间依赖的核酸外切酶酶解与MALDI-TOF MS相结合的DNA测序技术, 并适用于寡核苷酸和短链DNA的测序以及DNA修饰位点的研究。基于核酸外切酶酶解与质谱相结合的DNA测序技术, 酶解过程通常在溶液体系内进行, 酶解速度难以控制、高分子量酶解产物质谱响应较差以及金属离子复合物干扰严重。2013年, Zhao等^[64]为解决溶液体系酶解难以控制, 提出将蛇毒磷酸二酯酶固定于毛细管硅胶整体柱制备出应用于寡核苷酸酶解的固定化酶反应器。与溶液体系下的酶解相比, 固定化酶反应器在实现DNA样品的连续酶解的同时酶解速率得到很好的控制, 同时, 金属离子复合物得到有效抑制。此外, 固定化酶反应器的酶活性稳定, 反应器可以多次使用, 提高了蛇毒磷酸二酯酶的利用效率。将固定化酶反应器与MALDI-TOF MS结合用于环境污染物丙烯醛-DNA加合物的分析, 不但成功实现了含有丙烯醛-DNA加合物寡核苷酸的测序, 同时对丙烯醛高频加合的碱基位点进行序列分析(5'-TG*G3'和5'-TC*A3', *代表加合位点), 从而进一步证明丙烯醛诱导DNA形成加合物的序列选择性(图3(a))。2016年, Yin等^[65]通过3种固定化酶反应器联合使用构建了毛细管级联酶反应器, 该酶反应器能够在短时间内(<45 min)将基因组DNA酶解为单个核苷, 避免了长时间酶解过程中部分DNA氧化损伤(如8-oxo-dG/8-OH-dG)的生成或降解; 通过级联酶反应器酶解结合LC-MS/MS实现了Fenton反应处理的DNA中8-oxo-dG的定量分析(图3(b))。

Shu等^[66]发展了一种应用于顺铂-DNA加合物检测的“cisplatin-seq”测序方法, 其原理是利用高迁移率蛋白HMGB1的A域(domain A)优先结合由顺铂-DNA加合物引起的DNA结构扭曲位点, 从而选择性富集顺铂-DNA加合物实现高通量测序。该方法对全基因组顺铂加合位点的检测分辨率可以到达单个碱基。研究发现, 顺铂优先结合线粒体DNA, 在核DNA中顺铂-DNA加合物集中于启动子和转录终止位点附近的区域内。

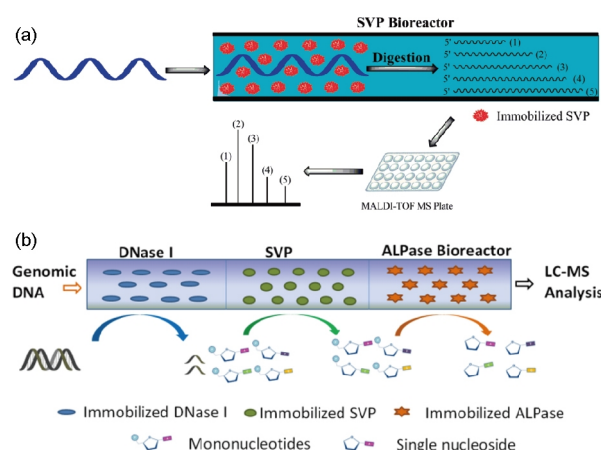


图3 毛细管固定化微酶反应器应用示意图。(a) SVP固定化酶反应器^[62]; (b) 级联酶反应器^[63] (网络版彩图)

2.5 液相色谱-质谱法

质谱技术可应用于未知DNA加合物的结构鉴定、已知DNA加合物的结构确认^[5]。随着与色谱接口技术的出现与发展, 实现了气相色谱、液相色谱与质谱的联用并逐渐成为DNA加合物定性定量分析的主要技术手段^[67]。与其他检测方法相比, 液相色谱-质谱法(LC-MS)无需衍生化, 且具有选择性好、灵敏度高、准确性强、重复性好等优势。根据不同需求通过仪器设备的选择搭配, 液相色谱与质谱可构建出多种结合方式, 包括毛细管液相色谱-质谱、纳流液相色谱-质谱、超高效液相色谱-质谱以及纳流超高效液相色谱-质谱联用等。

采用LC-MS检测DNA加合物主要经历以下3个过程: 液相色谱分离、样品离子化和质谱分析。

2.5.1 液相色谱分离

虽然质谱(MS)能够根据DNA加合物荷质比(m/z)的特定数值排除其他组分而选择性地检测目标分析物, 但是MS的信号响应会受到样品中复杂基质成分形成的大量带电粒子的抑制而衰减, 尤其是在目标物含量较低的情况下。通过与LC联用, 在线地将DNA加合物与其他组分分离(如正常核苷A、T、C和G等), 提高分析选择性的同时可部分解决基质带电粒子干扰这一问题。此外, 一些DNA加合物存在同分异构体, 如丙烯醛-脱氧鸟苷和巴豆醛-脱氧鸟苷加合物等, 通过LC分离, 能够实现DNA加合物异构体的分离和准确定

量,从而可进一步研究加合物异构体的基因毒性. 根据DNA加合物结构性质的不同,可选择合适的色谱固定相(色谱柱)与色谱分离模式,包括反相色谱、亲水作用色谱(HILIC)、离子交换以及混合模式等^[67]. 对一些在色谱柱上保留强的DNA加合物还可以起到富集的作用,并提高检测灵敏度. 总之,LC的作用是将待测DNA加合物与复杂的基质分离,提高质谱定性定量分析的准确性和检测灵敏度.

2.5.2 DNA加合物离子化

LC-MS联用技术广泛应用于DNA加合物分析在很大程度上归功于电喷雾离子源(ESI)的出现与发展^[67]. 电喷雾电离的离子化方式适用于极性有机小分子的离子化,在ESI过程中来自LC的馏分持续地以喷雾的形式进入一个狭窄的毛细管中,在毛细管出口端与对应电极之间施加数千伏的高电压,引发正负离子分离,从而生成带高电荷的液滴. 在加热/干燥气体的作用下,液滴中的溶剂被汽化,随着液滴体积逐渐缩小,液滴的电荷密度超过表面张力极限(雷利极限)引起液滴自发的分裂,亦可称为“库仑爆炸”. 分裂的带电液滴随着溶剂的进一步变小,最终导致离子从带电液滴中蒸发出来,产生单电荷或多电荷离子. 质子的加成可生成单价或多价正离子,而脱质子可生成单价或多价负离子,最终这些带电的离子被输送到质量分析器中被检测. 根据DNA加合物的化学结构,可选择合适的ESI离子化模式. 一般而言,碱基与核苷的检测可使用正离子模式,而核苷酸单磷酸盐选择负离子模式^[67,68].

我们发现,一些DNA结合物在电喷雾离子化过程中难以有效地形成可检测的目标离子. Yin等^[69]合成与制备了丙烯醛-DNA加合物包括 α -AcrdG、 γ -AcrdG、AcrdA、AcrdC和相应的稳定同位素加合物标准品. 利用这些标准品,发展了一种 NH_4HCO_3 增强的、稳定同位素稀释超高效液相色谱串联质谱方法(UHPLC-MS/MS),同时检测AcrdG、AcrdA和AcrdC加合物. 与常用的流动相添加剂 HCOOH 、 HCOONH_4 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 相比, NH_4HCO_3 不仅提高了AcrdG加合物异构体的分离度,还能显著抑制ESI过程中金属离子-AcrdG复合物的生成,进而增加AcrdG加合物的质子化效率,提高质谱检测灵敏度. 其机制可能是AcrdG优先与 NH_4^+ 形成复合物然后脱氨,抑制了ESI过程中金属离子-DNA加合物复合物的形成,并且 HCO_3^- 可快

速分解产生 H^+ ,加速了AcrdG的质子化. 该方法中,丙烯醛-DNA加合物的检测限(LOD)在40~80 amol,这与纳流液相色谱-纳流电喷雾-串联质谱方法的灵敏度相当. NH_4HCO_3 增强型UHPLC-MS/MS检测方法不仅限于丙烯醛-DNA加合物的分析,Zhang等^[70-72]利用合成的巴豆醛-dG(ProdG)加合物及其稳定同位素标准品沿用 NH_4HCO_3 增强的UHPLC-MS/MS方法,实现了多种生物样品中痕量ProdG非对应异构体(6S,8S)和(6R,8R)的准确定量. 此方法还可以提高DNA 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)的氧化产物分析的灵敏度,包括5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)和5-醛基胞嘧啶(5fC)^[73,74].

化学衍生法是提高LC-MS检测DNA核苷灵敏度的有效方法,其基本原理是利用化学衍生试剂改变目标化合物的性质,提高选择性、分离度及电离效率等^[75,76]. Tang等^[77]以杰拉德试剂(Girard's reagents)为化学衍生试剂发展了一种高灵敏检测5-醛基胞嘧啶(5fC)和5-羧基胞嘧啶(5caC)的LC-ESI-MS/MS方法,与未化学衍生的方法相比,检测灵敏度提高了52~260倍. 采用该方法他们发现,植物基因组DNA中5fC和5caC的普遍存在,这表明植物中可能存在与哺乳动物相似的DNA主动去甲基化途径. 此后,Tang等^[78]以2-溴-1-(4-二甲氨基-苯基)-乙酮(BDAPE)为化学衍生试剂发展了一种高灵敏的LC-ESI-MS/MS方法,同时检测5mC、5hmC、5fC和5caC,检测限分别为0.10、0.06、0.11和0.23 fmol. 接口技术的改进实现了多种分离技术包括CE、UHPLC以及NanoLC等与MS联用,并进一步提高检测灵敏度. Yuan等^[79]采用无鞘接口实现CE与ESI-MS联用,并通过多孔喷针技术将CE-MS的灵敏度提高到亚纳摩尔级别. 采用该技术仅需125 pg小鼠胚胎干细胞基因组DNA(约20个细胞)就能实现5mC和5hmC的定量分析.

2.5.3 质谱分析

可用于DNA加合物分析的质谱类型有很多,根据质量分析器的不同包括四极杆质谱(quadrupole)、离子阱质谱(ion trap)、轨道离子阱质谱(orbitrap)、飞行时间质谱(TOF)以及多种检测方式的组合等. 其中三重四极杆质谱(QQQ)以其极高的灵敏度和线性范围、高通量以及多种检测模式等优势,在DNA加合物及DNA表观遗传修饰的分析中得到了广泛应用. 三重四极杆包括两个四极杆(Q1, Q3)和一个碰撞池(q2, collision cell),每一个四极杆质量分析器有4根距离相等且平行

的棒状电极组成, 形成一个四极电场, 作为质量过滤器, 可以选择指定荷质比的离子或者全部离子通过. 碰撞池以高纯氮气(>99.999%)为碰撞气, 将通过第一个四极杆进入碰撞池中的带电离子打碎再选择性地或全部进入第二个四极杆完成MS/MS分析. 在空间上3个组件串联起来, 可以有很多种工作模式, 包括全扫(full scan)、选择离子监测(selected ion monitoring, SIM)、子离子扫描(product ion scan)、母离子扫描(precursor ion scan)、选择反应监测(selected reaction monitoring, SRM)以及多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)等^[68,80], 其中MRM是DNA加合物定量分析所采用的主要检测模式.

除三重四极杆质谱外, 四极杆-飞行时间(Q-TOF)质谱也在DNA加合物分析中发挥重要作用. TOF (time-of-flight)质量分析器根据离子动能相同而荷质比不同, 在同样长度的真空通道中飞行时间的差异实现对各个离子的检测^[81]. 与QQQ相比, Q-TOF灵敏度较低但具有更高的分辨率且能提供更为精确的碎片离子信息和更为全面的产物离子谱, 适用于未知DNA加合物的初步筛查、分子质量接近的DNA加合物的鉴定、DNA加合物标准品的表征以及DNA加合物碎裂方式的研究等.

2.5.4 LC-MS在DNA加合物分析中的应用

随着LC-MS联用技术的不断改进与发展, 使其成为目前DNA加合物分析领域最重要的检测技术. LC-MS在DNA加合物分析中的应用实例有很多, 本节

重点介绍本研究组在LC-MS方法开发及其在DNA加合物和DNA表观遗传修饰研究中取得的成果. LC-MS方法发展与应用的一般流程如图4所示.

DNA加合物标准品的合成与制备是建立准确测定该加合物LC-MS方法的重要基础, 稳定同位素内标的引入进一步提高了LC-MS定性定量分析的准确性. 2008年, Feng等^[82]利用活泼亲电的反式邻二醇环氧苯并[a]芘((±)-*anti*-BPDE)直接与脱氧鸟苷(dG)反应生成4种*anti*-BPDE-*N*²-dG立体异构体产物. 以硅烷酮膜包被硅胶基质的苯基固定相为分离色谱柱发展了一种可基线分离4种*anti*-BPDE-*N*²-dG异构体的高效液相色谱方法, 成功制备了4种加合的标准品及其稳定同位素内标. 采用HPLC-MS/MS鉴定了4种*anti*-BPDE-*N*²-dG的化学结构, 利用紫外光谱鉴定了*anti*-BPDE-*N*²-dG的顺反异构及利用圆二色谱鉴定了制备的4种*anti*-BPDE-*N*²-dG((+)-*trans*-、(-)-*trans*-、(+)-*cis*-、(-)-*cis*-)加合物的立体结构(图5(a)). 在此基础上, Feng等^[83]建立了一种快速、灵敏地检测BPDE-dG加合物的稳定同位素稀释-超高效液相色谱串联三重四极杆质谱分析方法(UHPLC-MS/MS). 与已有的方法相比, 以超高效液相色谱为基础的方法的分析速度和灵敏度均提高了10~20倍, 并且4种异构体的检测限均小于0.7 fmol (*S/N*=3). 该方法仅需30 μg DNA就可检测出人A549细胞暴露于1.0 μM B[a]P或0.1 μM (±)-*anti*-BPDE后的痕量加合物异构体. 研究发现, 暴露于(±)-*anti*-BPDE, 可形成4种立体异构体((+)-*trans*-、(-)-*trans*-、(+)-*cis*-、(-)-*cis*-), 而暴露于 B[a]P 仅生成

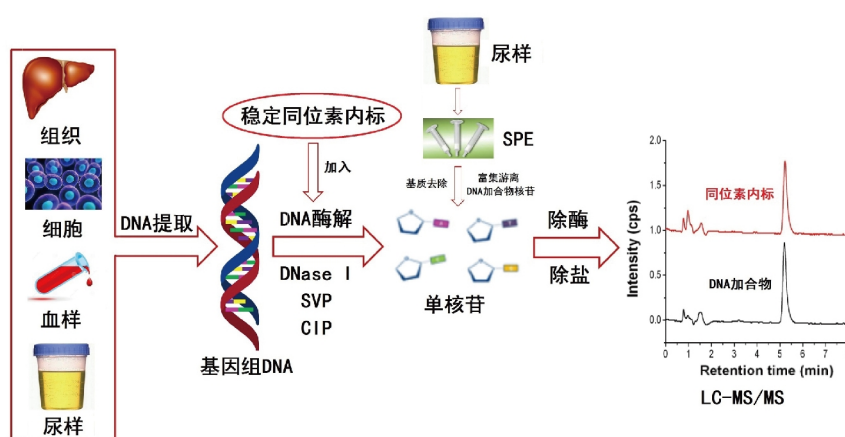


图4 本研究组LC-MS/MS分析DNA加合物的一般流程示意图(网络版彩图)

3种立体异构体((+)-*trans*-、(+)-*cis*-、(+)-*syn*-), 主要的立体异构体均为(+)-*trans*-型异构体, 所占比例在84%~94%之间. 研究初步揭示了B[a]P及其代谢产物BPDE与DNA反应生成加合物的活性和异构体选择性. Yin等^[69]采用同样的方式合成与制备了丙烯醛-DNA加合物包括 α -AcrdG、 γ -AcrdG、AcrdA、AcrdC (图5(b)) 和相应的稳定同位素加合物的标准品. 利用建立的高灵敏、快速UHPLC-MS/MS分析方法检测了A549和人白细胞基因组DNA中痕量丙烯醛-DNA加合的种类与含量, 发现 γ -AcrdG是所有样品中的主要加合物, 人白细胞样品也含有少量的 α -AcrdG. 此外, 在所有的人白细胞样品中均检测到了AcrdA, 其含量非常接近于 γ -AcrdG, 在大部分样品中均可检测到AcrdC. 这些数据表明, 在人体内存在这两种非dG加合物. Zhang等^[70-72]研究发现, 当MRC5细胞经乙醛或巴豆醛(1~100 μ M)暴露后, ProdG的水平明显提高, 且与暴露物浓度正相关. 另外, 将SPE与所发展的UHPLC-MS/MS方法结合用于尿液中ProdG加合物的检测, 结果显示在健康人类尿液样本中检测到较高含量的(6*S*,8*S*)和(6*R*,8*R*) ProdG加合物(图5(c)), 据此推测尿液排泄可能是清除人体内DNA加合物的重要途径.

目前, LC-MS法不仅广泛应用于DNA加合物的分析, 也成为DNA表观遗传修饰研究中不可或缺的检测技术. 与损伤性的DNA加合物不同, DNA表观遗传修饰是具有重要生理功能的DNA修饰形式, 其在不改变DNA一级结构的基础上, 引起DNA构象、DNA稳定性以及DNA-蛋白质相互作用方式的改变, 从而调控基因的表达^[84-86]. 其中, DNA甲基化是发现最早、研究最为深入的表观遗传修饰, 在X染色体失活、胚胎发育、基因印记、基因沉默、基因表达与调控等生理过程中发挥极其重要的作用. 5-甲基胞嘧啶(5mC)作为哺乳动物基因组DNA丰度最高的甲基化修饰, 具有重要的生物学功能^[87,88]. Wang等^[89]建立了快速、高灵敏的UHPLC-MS/MS方法检测人类精子的5mC甲基化水平, 当天与隔天的精确度维持在1.50%~5.70%之间. 2013年, Yin等^[73]利用UHPLC-MS/MS方法研究发现, 维生素C能够显著增强Tet酶活性, 进而加速5mC氧化和DNA主动去甲基化过程. NH_4HCO_3 的增强的ESI-MS方法适用于5mC氧化产物5hmC和5fC的高灵敏分析, 在此基础上, 结合SPE技术实现了健康人类尿液中5mC初级氧化产物5hmC的检测^[74]. 与哺乳动物

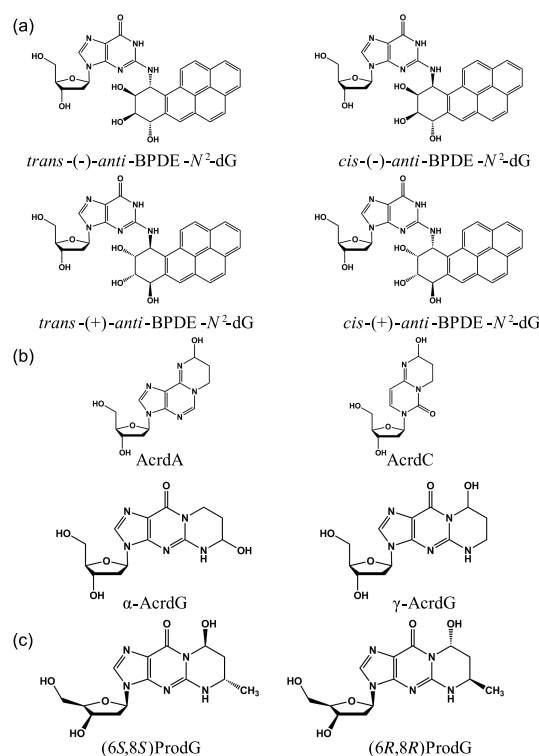


图5 本研究组合成、制备和检测了以下3类DNA加合物. (a) BPDE-dG加合物; (b) 丙烯醛-DNA加合物; (c) 巴豆醛-dG加合物

不同, 原核生物及低等真核生物DNA甲基化修饰的主要形式为腺嘌呤- N^6 甲基化即 N^6 -甲基腺嘌呤(N^6 -methyladenine, 6mA), 其表观遗传功能也得到了系统深入的研究^[90]. 近年来, 高等真核生物DNA-6mA的研究也取得了突破性进展. 2015年, 本课题组在与陈大华组的合作工作中, 通过UHPLC-MS/MS成功鉴定了果蝇基因组DNA中的6mA. 研究发现, 6mA水平的动态存在直接受果蝇Tet同源的DNA 6mA去甲基化酶(DMAD)的调控. 体外实验证明, DMAD可以直接催化6mA去甲基化, 并且优先移除导致果蝇卵巢转位子抑制区域内的6mA, 该研究结果表明6mA在调节果蝇基因表达过程中的潜在作用^[91].

由于真核细胞中6mA含量很低, 而在实验过程中广泛存在原核DNA (含有高丰度的6mA)污染, 这不利于确认真核细胞基因组DNA中是否存在6mA. 为了应对以上难题, Liu等^[92]以稳定同位素标记的腺嘌呤脱氧核苷($^{15}\text{N}_5$ -dA)作为起始示踪剂, 发展了一种代谢差异的示踪代码来监测人细胞中的DNA 6mA. 通过

UHPLC-MS/MS对同位素标记和非同位素标记6mA水平分布的检测,证实起始的示踪剂 $[^{15}\text{N}_5]\text{-dA}$ 经历了特别和有效的腺嘌呤脱氨反应,导致失去环外氨基的 ^{15}N ,并且进一步利用嘌呤的补救合成途径生成基因组中的 $[^{15}\text{N}_4]\text{-dA}$ 和 $[^{15}\text{N}_4]\text{-dG}$ 。然而,在培养的细胞和动物实验中经常出现的支原体DNA(原核DNA)主要保存的是 $[^{15}\text{N}_5]\text{-dA}$ 。由于dA的甲基化生成6mA保持代码模式不变,因此动物DNA 6mA能够与由支原体产生的6mA区分开来。该方法展示了一种很有前景的鉴定高等真核生物细胞真实的6mA水平及判断细胞是否感染支原体的方法。

3 不稳定DNA加合物的检测及其基因毒性研究

大多数DNA加合物化学性质稳定,能以DNA、碱基、核苷和核苷酸等多种形式稳定存在。也有一部分DNA加合物稳定性差、半衰期短(如席夫碱),直接采用LC-MS/MS等分析方法难以测定其在生物样品中的准确含量。对于不稳定DNA加合物的分析,目前采用的主要方法是首先通过化学转化的方式将不稳定的DNA加合物定量地转化为另一种稳定形式,并以检测到的转化物含量间接衡量不稳定DNA加合物的水平。

3.1 不稳定DNA加合物的分析与定量

甲醛和乙醛均为具有遗传毒性的醛类化合物,并且在环境中广泛存在。它们都是重要的工业原料,大量装修、装饰材料含有甲醛,成为室内环境中甲醛的主要来源;香烟烟气中含有一定量的甲醛和乙醛^[15];乙醛还是酒精(乙醇)氧化代谢的初级产物;此外,脂质过氧化与苏氨酸分解代谢也均会产生乙醛^[93]。在致癌物评级中甲醛和乙醛分别被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为1类、2B类致癌物^[15]。

甲醛化学性质活泼易进攻DNA中的鸟嘌呤(dG)和腺嘌呤(dA),分别形成 N^2 -羟甲基-鸟嘌呤(N^2 -hydroxymethyl-dG, 2hm-dG)和 N^6 -羟甲基-腺嘌呤(N^6 -hydroxymethyl-dA, 6mhdA)^[94,95]。这两种DNA加合在以核苷结构形式存在下不稳定,但是在DNA酶解阶段加入 NaBH_3CN 可将不稳定的6mhdA和2hm-dG还原为稳定的 N^6 -甲基-腺嘌呤(N^6 -methyl-dA, 6mdA)和 N^2 -甲基-鸟

嘌呤(N^2 -methyl-dG, 2mdG)(转化率约为50%~80%)^[96]。羟甲基形式的加合物也可能被细胞内还原性物质还原为甲基形式,与加入 NaBH_3CN 之后的甲基形式加合物的转化量相比,细胞内还原量仅为6%~8%^[96]。当乙醛与DNA反应时,优先进攻DNA中的dG形成一种Schiff碱类加合物称为 N^2 -亚乙基-鸟嘌呤(N^2 -ethylidene-dG, EtidG),该加合物相对不稳定,在生物体内37℃条件下的半衰期为24 h,但是通过还原的方式可将不稳定的EtidG加合物转化为稳定的 N^2 -乙基-鸟嘌呤(N^2 -ethyl-dG, EthdG)^[97]。同样在体内一些还原性小分子或酶,如维生素C和谷胱甘肽(GSH)催化作用下能够将EtidG部分转化为EthdG^[98,99]。然而,对于DNA中EtidG加合物的检测需要通过化学还原的方法在体外将EtidG定量转化为EthdG,该过程通过加入化学还原剂 NaBH_4 或 NaBH_3CN 来实现^[97,100]。基于以上方法,Wang等^[97]在没有经过外源乙醛暴露的人类肝脏基因组DNA中检测到相对丰度较高的EthdG加合物,约为0.1个/ 10^6 个核苷酸,表明了肝脏细胞正常代谢过程中乙醛的产生及内源性乙醛-DNA加合物的生成。此外,动物实验研究表明,肝细胞内EthdG的水平与乙醛的生成量有直接关系^[101]。Fang等^[102]在人类白细胞中也检测到了EthdG加合物,结果显示,酗酒人群EthdG加合物的水平远高于非酗酒人群。Matsuda等^[99]在健康人类提供的尿样中检测到了EthdG加合物,进一步证明了内源性EthdG加合物的存在。

3.2 不稳定DNA加合物的基因毒性研究

以不稳定的乙醛-DNA加合物EtidG为例,由于EtidG加合物在以核苷形式存在下不稳定,目前还没有关于该加合物致突变、致癌或潜在致癌性的直接证据,所有的研究均以稳定的EthdG加合物为模型。然而EtidG与EthdG除结构相似,还有3点显著差异:(1)存在于dG环外的氮和乙醛 α -碳之间的双键移除了两个氢,因此,在EtidG与dC碱基互补配对时只形成两个氢键;(2)在EthdG中C-N单键可以发生轴向旋转,而EtidG的C=N双键将阻止轴向旋转;(3)双键使EtidG的疏水性比EthdG更强,这些差异将导致EtidG加合物的致突变机理与EthdG加合物不完全相同^[93,103]。因此,要实现不稳定DNA加合物的准确定量分析还需要开发新的检测技术和方法,从而进一步揭示不稳定DNA加合物的基因毒性及其与诱导化合物的毒理效应关系。

4 结论与展望

作为DNA损伤最重要的内容之一, DNA加合物的研究反映了有毒化学品及其代谢产物的基因毒性和潜在的致病机理, 从基因损伤的层面涉及毒理学、流行病学和职业病学的研究内容. DNA加合物的形成被认为是有毒化学品致突变、致畸、致癌效应过程中的一个重要阶段, 它既可以作为接触性生物标志物, 反映毒物在靶位的实际接触剂量, 又可以作为效应标志物, 反映DNA受到毒物损伤的程度. DNA加合物的研究有助于人们深入理解多种环境污染物的基因毒性, 为环境污染物致病机理、疾病预防、环境与健康风险评估提供重要依据, 因此在环境污染物致癌研究中具有极其重要的应用价值. 准确高效、高灵敏、稳定的DNA加合物分析技术和方法的建立与发展是DNA加合物研究的重要基础, 目前LC-MS以其具有分析速度快、特异性强、灵敏度高、定量准确等优势, 成为DNA加合物分析领域最重要的检测手段. 此外, 基于

生物样品的复杂性, 发展高效、高选择性的样品前处理方法将进一步提高质谱方法的检测灵敏度和维持仪器的稳定性.

DNA加合物分析的研究取得了一定的进步, 但仍然存在部分关键科学问题需要完善. (1) 不稳定DNA加合物的检测及其与有毒化学品基因毒性的关系, 需要发展新的检测方法; (2) 人体内形成的DNA加合物能够被DNA修复系统及时准确地移除, 从而维持生命系统的稳定性, DNA加合物水平、修复效率和基因突变之间的关系还需系统深入地研究; (3) 尿液分析广泛应用于临床诊断, 其中, 核苷检测是尿液成分分析的一项重要指标, 如8-羟基鸟苷, 被证明为潜在的生物标志物, 尿液当中同样检测到多种DNA加合物, 这些加合物的准确来源以及是否可以作为生物标志物用于相关疾病的诊断还需进一步证明. 正因为研究过程中不断出现的科学难题, 持续激励着科研工作者努力探索、不断创新, 用一项项成果为人类的健康事业作出贡献.

致谢 感谢钟上伟博士对本文图片绘制提供的帮助.

参考文献

- 1 王美娥, 周启星. 应用生态学报, 2004, 15: 1983–1987
- 2 Hemminki K. *Arch Toxicol*, 1983, 52: 249–285
- 3 Dipple A. *Carcinogenesis*, 1995, 16: 437–441
- 4 Au WW, Oberheitmann B, Harms C. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2002, 509: 153–163
- 5 Feng F, Wang C, Lu ML, Wang HL. *Prog Chem*, 2009, 21: 503–513
- 6 Zhang F, Bartels MJ, Pottenger LH, Gollapudi BB, Schisler MR. *Rapid Commun Mass Sp*, 2005, 19: 2767–2772
- 7 Chen YL, Wang CJ, Wu KY. *Rapid Commun Mass Sp*, 2005, 19: 893–898
- 8 Singh R, Gaskell M, Le Pla RC, Kaur B, Azim-Araghi A, Roach J, Koukouves G, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA, Farmer PB. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 868–878
- 9 Beland FA, Churchwell MI, Von Tungeln LS, Chen S, Fu PP, Culp SJ, Schoket B, Gyroff E, Minárovits J, Poirier MC, Bowman ED, Weston A, Doerge DR. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18: 1306–1315
- 10 Zhang SM, Chen KM, Aliaga C, Sun YW, Lin JM, Sharma AK, Amin S, El-Bayoumy K. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24: 1297–1303
- 11 Arlt VM, Stiborová M, Henderson CJ, Thiemann M, Frei E, Aimová D, Singh R, Gamboa da Costa G, Schmitz OJ, Farmer PB, Wolf CR, Phillips DH. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 656–665
- 12 Monien BH, Müller C, Engst W, Frank H, Seidel A, Glatt H. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 2017–2025
- 13 Glover RP, Lamb JH, Farmer PB. *Rapid Commun Mass Sp*, 1998, 12: 368–372
- 14 Siethoff C, Feldmann I, Jakubowski N, Linscheid M. *J Mass Sp*, 1999, 34: 421–426
- 15 刘鲁娟, 陈欢, 侯宏卫, 胡清源. 中国烟草学报, 2015, 21: 110–118
- 16 Thomson NM, Mijal RS, Ziegel R, Fleischer NL, Pegg AE, Tretyakova NY, Peterson LA. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17: 1600–1606
- 17 Dennehy MK, Loeppky RN. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18: 556–565
- 18 Stepanov I, Hecht SS. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22: 406–414

- 19 Lao Y, Villalta PW, Sturla SJ, Wang M, Hecht SS. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 674–682
- 20 Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA. *Carcinogenesis*, 1999, 20: 1055–1061
- 21 Soglia JR, Turesky RJ, Paehler A, Vouros P. *Anal Chem*, 2001, 73: 2819–2827
- 22 Paehler A, Richoz J, Soglia J, Vouros P, Turesky RJ. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15: 551–561
- 23 Means JC, Olsen PD, Schoffers E. *J Am Soc Mass Sp*, 2003, 14: 1057–1066
- 24 Ricicki EM, Soglia JR, Teitel C, Kane R, Kadlubar F, Vouros P. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18: 692–699
- 25 Bessette EE, Spivack SD, Goodenough AK, Wang T, Pinto S, Kadlubar FF, Turesky RJ. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23: 1234–1244
- 26 Egner PA, Yu X, Johnson JK, Nathasingh CK, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16: 1174–1180
- 27 Goggin M, Swenberg JA, Walker VE, Tretyakova N. *Cancer Res*, 2009, 69: 2479–2486
- 28 Sangaraju D, Goggin M, Walker V, Swenberg J, Tretyakova N. *Anal Chem*, 2012, 84: 1732–1739
- 29 Powley MW, Li Y, Upton PB, Walker VE, Swenberg JA. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 1573–1580
- 30 Goggin M, Sangaraju D, Walker VE, Wickliffe J, Swenberg JA, Tretyakova N. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24: 809–817
- 31 徐立红. 中国科学基金, 1999, 5: 274–278
- 32 Randerath K, Reddy MV, Gupta RC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 6126–6129
- 33 Reddy MV. *Carcinogenesis*, 1991, 12: 1745–1748
- 34 Reddy MV, Randerath K. *Carcinogenesis*, 1986, 7: 1543–1551
- 35 Reichert WL, Stein JE, French B, Goodwin P, Varanasi U. *Carcinogenesis*, 1992, 13: 1475–1479
- 36 Nath RG, Chung FL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7491–7495
- 37 Nath RG, Ocando JE, Guttenplan JB, Chung FL. *Cancer Res*, 1998, 58: 581–584
- 38 Bacova G, Segerback D. *Toxicol Appl Pharm*, 2004, 197: 184–184
- 39 Budiawan, Schuler D, Eder E. *Archives Toxicol*, 2000, 74: 404–414
- 40 Poirier MC, Yuspa SH, Weinstein IB, Blobstein S. *Nature*, 1977, 270: 186–188
- 41 Foiles PG, Chung FL, Hecht SS. *Cancer Res*, 1987, 47: 360–363
- 42 Foiles PG, Akerkar SA, Chung FL. *Carcinogenesis*, 1989, 10: 87–90
- 43 Nakamura K, Iwahashi K, Itoh M, Ameno K, Itoh K, Iwahashi K. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, 24: 93S–96S
- 44 Duhachek SD, Kenseth JR, Casale GP, Small GJ, Porter MD, Jankowiak R. *Anal Chem*, 2000, 72: 3709–3716
- 45 Pan J, Awoyemi B, Xuan Z, Vohra P, Wang HT, Dyba M, Greenspan E, Fu Y, Creswell K, Zhang L, Berry D, Tang MS, Chung FL. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 2788–2795
- 46 Lee HW, Wang HT, Weng M, Hu Y, Chen W, Chou D, Liu Y, Donin N, Huang WC, Lepor H, Wu XR, Wang H, Beland FA, Tang M. *Oncotarget*, 2014, 5: 3526–3540
- 47 汪海林, 章大鹏, 王智鑫, 李涛, 冯峰, 王超, 高海燕. 色谱, 2009, 27: 642–647
- 48 Carnelley TJ, Barker S, Wang H, Tan WG, Weinfeld M, Le XC. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 1513–1522
- 49 Tan WG, Carnelley TJ, Murphy P, Wang H, Lee J, Barker S, Weinfeld M, Le XC. *J Chromatogr A*, 2001, 924: 377–386
- 50 Wang H, Lu M, Mei N, Lee J, Weinfeld M, Le XC. *Anal Chim Acta*, 2003, 500: 13–20
- 51 Wang H, Xing J, Tan W, Lam M, Carnelley T, Weinfeld M, Le XC. *Anal Chem*, 2002, 74: 3714–3719
- 52 Wang H, Lu M, Weinfeld M, Le XC. *Anal Chem*, 2003, 75: 247–254
- 53 Wang H, Lu M, Le XC. *Anal Chem*, 2005, 77: 4985–4990
- 54 Wilkins RJ. *Anal Biochem*, 1985, 147: 267–279
- 55 Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. *Science*, 1996, 274: 430–432
- 56 Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 803–811
- 57 Maxam AM, Gilbert W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 560–564
- 58 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463–5467
- 59 Shendure J, Ji H. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 1135–1145
- 60 Schuster SC. *Nat Methods*, 2008, 5: 16–18
- 61 Pushkarev D, Neff NF, Quake SR. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 847–850
- 62 Holley RW, Madison JT, Zamir A. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964, 17: 389–394
- 63 Pielles U, Zürcher W, Schär M, Moser H. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 3191–3196
- 64 Zhao C, Yin R, Yin J, Zhang D, Wang H. *Anal Chem*, 2012, 84: 1157–1164
- 65 Yin J, Xu T, Zhang N, Wang H. *Anal Chem*, 2016, 88: 7730–7737
- 66 Shu X, Xiong X, Song J, He C, Yi C. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 14246–14249

- 67 Tretyakova N, Goggin M, Sangaraju D, Janis G. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 2007–2035
- 68 Gavina JMA, Yao C, Feng YL. *Talanta*, 2014, 130: 475–494
- 69 Yin R, Liu S, Zhao C, Lu M, Tang M, Wang H. *Anal Chem*, 2013, 85: 3190–3197
- 70 Zhang N, Song Y, Wu D, Xu T, Lu M, Zhang W, Wang H. *J Chromatogr A*, 2016, 1450: 38–44
- 71 Zhang N, Song Y, Zhang W, Wang H. *J Chromatogr B*, 2016, 1023–1024: 68–71
- 72 张宁, 张园, 张维冰. 色谱, 2016, 34: 757–761
- 73 Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, Zhang D, Huang H, Gao J, Li Z, Jiao Y, Li C, Liu S, Wu D, Gu W, Yang YG, Xu GL, Wang H. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 10396–10403
- 74 Yin R, Mo J, Lu M, Wang H. *Anal Chem*, 2015, 87: 1846–1852
- 75 Yuan BF, Feng YQ. *Trends Anal Chem*, 2014, 54: 24–35
- 76 Qi BL, Liu P, Wang QY, Cai WJ, Yuan BF, Feng YQ. *Trends Anal Chem*, 2014, 59: 121–132
- 77 Tang Y, Xiong J, Jiang HP, Zheng SJ, Feng YQ, Yuan BF. *Anal Chem*, 2014, 86: 7764–7772
- 78 Tang Y, Zheng SJ, Qi CB, Feng YQ, Yuan BF. *Anal Chem*, 2015, 87: 3445–3452
- 79 Yuan F, Zhang XH, Nie J, Chen HX, Zhou YL, Zhang XX. *Chem Commun*, 2016, 52: 2698–2700
- 80 Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. *Appl Spec Rev*, 2015, 50: 158–175
- 81 Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. *J Mass Spectrom*, 2001, 36: 849–865
- 82 Feng F, Yin J, Song M, Wang H. *J Chromatogr A*, 2008, 1183: 119–128
- 83 Feng F, Wang X, Yuan H, Wang H. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2104–2112
- 84 Vaissière T, Sawan C, Herczeg Z. *Mutat Res/Rev Mutat Res*, 2008, 659: 40–48
- 85 Breiling A, Lyko F. *EpiGenet Chromatin*, 2015, 8: 24
- 86 Jones PA, Baylin SB. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 900–900
- 87 Jones PA, Baylin SB. *Genes Dev*, 2002, 16: 6–21
- 88 Jones PA, Baylin SB. *Cell*, 2007, 128: 683–692
- 89 Wang X, Suo Y, Yin R, Shen H, Wang H. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 1647–1652
- 90 Ratel D, Ravanat JL, Berger F, Wion D. *Bioessays*, 2006, 28: 309–315
- 91 Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J, Li C, Liu B, Luo Y, Zhu Y, Zhang N, He S, He C, Wang H, Chen D. *Cell*, 2015, 161: 893–906
- 92 Liu B, Liu X, Lai W, Wang H. *Anal Chem*, 2017, 89: 6202–6209
- 93 Brooks PJ, Zakhari S. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55: 77–91
- 94 Beland FA, Fullerton NF, Heflich RH. *J Chromatogr B*, 1984, 308: 121–131
- 95 Zhong W, Hee SQ. *Biomed Chromatogr*, 2004, 18: 462–469
- 96 Wang M, Cheng G, Villalta PW, Hecht SS. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20: 1141–1148
- 97 Wang M, Yu N, Chen L, Villalta PW, Hochalter JB, Hecht SS. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 319–324
- 98 Lorenti Garcia C, Mechilli M, Proietti De Santis L, Schinoppi A, Katarzyna K, Palitti F. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2009, 662: 3–9
- 99 Matsuda T, Terashima I, Matsumoto Y, Yabushita H, Matsui S, Shibutani S. *Biochemistry*, 1999, 38: 929–935
- 100 Chen L, Wang M, Villalta PW, Luo X, Feuer R, Jensen J, Hatsukami DK, Hecht SS. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20: 108–113
- 101 Matsuda T, Matsumoto A, Uchida M, Kanaly RA, Misaki K, Shibutani S, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Tomokuni K, Ichiba M. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 2363–2366
- 102 Fang J, Vaca CE. *Carcinogenesis*, 1997, 18: 627–632
- 103 Brooks PJ, Theruvathu JA. *Alcohol*, 2005, 35: 187–193

Technology and methodology of DNA adducts analysis

Ning Zhang¹, Baodong Liu¹, Hailin Wang^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author (email: hlwang@rcees.ac.cn)

Abstract: DNA adducts are formed from the covalent reaction of electrophilic molecules to a variety of nucleophilic groups in DNA strands. They could be used as biomarkers for genotoxicity. The formation of DNA adducts caused by toxic chemicals is a critical initiator in the process of gene mutation, developmental malformation and tumor. The development of fast, sensitive and accurate detection technologies and methodologies is the key to understand and study the adverse health effects of DNA adducts. At present, analytical technologies for the detection of DNA adducts mainly include ³²P post-labeling, immunoassay, immuno-capillary electrophoresis-laser induced fluorescence, DNA sequencing, and Chromatography-mass spectrometry. In this article, the applications and development prospects of these techniques and methods in DNA adducts analysis are briefly reviewed and discussed.

Keywords: DNA adducts, DNA damage, analytical technology and methodology, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

doi: [10.1360/N032017-00132](https://doi.org/10.1360/N032017-00132)