

蛋白修饰定量质谱法研究两种不同作用模式基因毒化合物 对组蛋白H3乙酰化的影响

瞿敏敏 陈佳 徐斌 李治 郭磊 徐华* 谢剑炜

(军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

摘 要 建立了细胞中组蛋白 H3 的 9 位 (H3K9ac) 或 14 位 (H3K14ac) 赖氨酸乙酰化及其相应原型特征多肽片段的高效液相色谱-三重四级杆质谱同时定量分析方法。样品经胰酶消化、丙酰化衍生、除盐及肽段富集等前处理后, 在 ACQUITY UPLCBEH C₁₈ 色谱柱上分离, 采用质谱技术在正离子多反应监测模式 (MRM) 下检测。空白细胞样品中组蛋白 H3 的各特征肽段在 1~250 ng/mL 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.99$), 检出限 (LOD, $S/N=3$) 均为 0.1 ng/mL, 准确度、精密度、基质效应及提取回收率均符合方法学要求。本方法具有操作简便、灵敏度高、检测速度快及定量分析准确等优势。将本方法应用于 2 种典型的具有不同作用模式的基因毒性化合物 (喜树碱和秋水仙碱) 对 2 种人源细胞株即肝癌细胞 HepG2 和宫颈癌细胞 HeLa 中组蛋白 H3 的 9 位或 14 位赖氨酸乙酰化修饰影响的研究, 测得了组蛋白 H3 中 H3K9ac 及 H3K14ac 修饰含量的变化, 探讨了其与不同基因毒性化合物作用模式的关系, 为基因毒性化合物的 DNA 损伤/修复及转录研究提供了技术支持。

关键词 高效液相色谱; 质谱; 组蛋白 H3; 乙酰化; 基因毒性化合物

基因毒性物质是一类直接或间接导致细胞 DNA 损伤的有毒化学物质, 可引起基因突变、染色体断裂或非整倍体损伤, 阻碍基因组的复制和转录, 具有诱发癌症、畸形等重大疾病的潜在威胁^[1-3]。在众多的基因毒性物质中, 有两类作用模式不同的基因毒性物质导致的 DNA 损伤最为严重, 即致染色体断裂化合物和非整倍体化合物^[4]。研究表明, 这两类不同作用模式的基因毒性物质其致癌性存在显著差异, 因此在候选药物的前期筛选过程中, 具有染色体毒性即致染色体断裂的化合物会被直接淘汰, 而仅具有纺锤体毒性的非整倍体化合物则可继续开展后续非临床前研究^[5]。

基因组稳定性的维持是细胞存活的关键因素之一。从原核生物到真核生物, 细胞已进化出有效的分子生物学机制, 可修复各种内外部因素引起的 DNA 损伤。其中, 组蛋白翻译后修饰 (PTMs) 是一种重要的修复机制^[6-7]。组蛋白是负责包装 DNA 的蛋白质, 目前发现的 PTMs 包括甲基化、乙酰化、泛素化、磷酸化、类泛素蛋白修饰分子 (SUMO) 化和腺苷二磷酸 (ADP) 核糖基化等, 其目的在于调控组蛋白与 DNA 的相互作用, 进而影响 DNA 的结构和基因激活^[8-9]。在众多的 PTMs 中, 蛋白质的乙酰化研究备受关注^[10]。

组蛋白乙酰化优先发生在转录活性染色质中核心组蛋白的 N-末端赖氨酸残基。乙酰化使得从核小体延伸出的 N-末端组蛋白尾部的赖氨酸残基带负电荷, 而这些负电荷会排斥带负电荷的 DNA, 导致染色质结构松弛^[6,10]。组蛋白 H3 结构表面上存在多个赖氨酸位点, 可发生多种乙酰化修饰。研究表明, 组蛋白 H3 不同位点的乙酰化参与细胞周期调控、细胞增殖和凋亡, 并在调节细胞分化、DNA 复制/修复和核运输等多种细胞过程中发挥重要作用^[11]。例如, 组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸 (H3K9ac) 和组蛋白 H3 的第 14 位赖氨酸 (H3K14ac) 位点的乙酰化是活性染色质的标志, 其乙酰化可创建一个开放的染色质环境, 有利于基因的转录^[10]。

通常基于免疫学的检测方法如免疫印迹、酶联免疫吸附及免疫荧光在组蛋白乙酰化的表征分析中占主导地位, 然而这些方法受限于抗体, 不可避免地存在免疫学检测方法的常见缺陷^[12]。更重要的是, 这些方法无法准确地对组蛋白乙酰化修饰进行定量分析, 组蛋白乙酰化修饰量的动态变化不仅参

与了基因表达和细胞复制, 而且与包括癌症在内的多种疾病的发生有关^[13-14]。因此, 组蛋白乙酰化修饰研究的重要内容之一是精确测量组蛋白乙酰化修饰量的变化, 进而深入了解生物系统发挥作用的分子机制。

质谱(MS)具有高灵敏度、高精度、高分辨率鉴定及定量分析目标分析物等突出优势, 可实现对组蛋白PTMs的准确定量分析^[15]。本研究组前期通过MS技术对磷酸化组蛋白H2AX(γ -H2AX)与磷酸化组蛋白H3(p-H3)的特征性多肽片段进行定量检测时发现, 基于MS技术的测定方法不仅可灵敏区分并准确定量检测具有不同基因毒作用模式的化合物, 还可动态监测基因毒性化合物对DNA的损伤/修复和转录过程的影响^[16-17]。近期, 通过比较 γ -H2AX质谱定量检测技术与 γ -H2AX高内涵分析技术分别应用于评估化合物基因毒性的特点和性能, 本研究组发现采用MS技术检测 γ -H2AX以评价化合物的基因毒性具有可行性及优越性, 为化合物的基因毒性评估提供了一种新技术^[18]。

本研究采用高效液相色谱-三重四极杆质谱法, 通过优化样品前处理方法和分析条件, 建立了一种可同时测定细胞中组蛋白H3的9位(H3K9ac)或14位(H3K14ac)乙酰化及其相应原型特征性多肽片段的分析方法。本方法具有快速、准确及灵敏的优势。将本方法应用于评估2个具有不同毒性作用模式的典型基因毒性化合物, 即致染色体断裂化合物喜树碱和非整倍体化合物秋水仙碱, 对细胞中H3K9ac占H3的比例(H3K9ac/H3)及H3K14ac占H3的比例(H3K14ac/H3)的影响研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Q-TRAP 5500型三重四极杆-离子阱串联质谱仪(美国AB Sciex公司); ACQUITY型超高效液相色谱仪(美国Waters公司); CO₂培养箱(美国Thermo-Fisher公司); Milli-Q A10型水净化系统(美国Millipore公司); 恒温振荡水浴(瑞士Gingko公司); CKX41倒置显微镜(日本Olympus公司); 3k30高速冷冻离心机(美国Sigma-Aldrich公司); 0.22 μ m聚四氟乙烯微孔滤膜及C₁₈膜(上海安谱科学仪器有限公司)。

肽段⁹KSTGGKAPR¹⁷(命名为K9)、⁹K(ac)STGGKAPR¹⁷(命名为K9ac)和⁹KSTGGK(ac)APR¹⁷(命名为K14ac)(分别为H3、H3K9ac及H3K14ac经胰蛋白酶酶切后的待测肽段)及稳定同位素标记的肽段⁹KSTGGKAPR¹⁷[¹³C6和¹⁵N4](南京杰肽工程股份有限公司); 喜树碱和秋水仙碱(纯度>95%, 中国食品药品检定研究院); Dulbecco's Modified Eagle Medium高糖培养基(DMEM)、Roswell Park Memorial Institute 1640培养基(1640)、胎牛血清(FBS)(美国Thermo-Fisher公司); 细胞核提取试剂盒与BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 丙酸酐(北京伊诺凯科技有限公司); 测序级胰蛋白酶(北京普洛麦格生物技术有限公司); 乙腈(色谱纯, 德国Merck公司); 甲酸(纯度98%, 美国Sigma-Aldrich公司)。其余试剂均为分析纯或以上纯度(国药集团北京化学试剂公司)。实验用水为Mill-Q系统制备的超纯水(电阻率18.2 M Ω ·cm)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理

将HepG2和HeLa细胞分别采用含10% FBS的DMEM和含10% FBS的1640培养基于37℃、5% CO₂培养箱中培养, 定期换液传代。待10 cm培养皿中的细胞贴壁生长至对数生长期时, 即约 5×10^6 细胞, 分别与1 μ mol/L喜树碱或1 μ mol/L秋水仙碱孵育, 孵育时间分别为0.5、1、2、4、8、12和24 h, 并设置空白对照, 于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养。

1.2.2 组蛋白提取

经相应的孵育时间处理后, 采用磷酸盐缓冲液漂洗细胞3次, 刮下细胞, 收集于1.5 mL离心管中, 1000 r/min离心3 min。依照细胞核提取试剂盒说明书步骤提取细胞核, 获得细胞核后, 加入400 μ L 0.2 mmol/L H₂SO₄提取组蛋白, 通过逐滴加入132 μ L 100%三氯乙酸沉淀组蛋白。上述步骤均在4℃条件下进行。沉淀后的组蛋白经预冷的1 mL丙酮洗涤2次, 在通风橱中干燥约15 min。

1.2.3 组蛋白H3丙酰化及胰酶酶解

将异丙醇与丙酸酐按体积比 1:3 混合, 制成丙酰化试剂(现配现用), 取 20 μL 丙酰化试剂添加至 40 μL H3 样品中, 涡旋振荡混匀, 51 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; 真空离心浓缩至 5 μL , 加入 25 μL 水重新溶解; 加入 10 μL 丙酰化试剂, 涡旋离心, 51 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; 按照酶/底物质量比为 1:10~1:30 加入测序级胰蛋白酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切; 6~10 h 后, 加入 20% 醋酸终止酶切反应; 真空离心浓缩至 5 μL ; 重复丙酰化反应。经 C_{18} -Stage-tips 脱盐, 离心浓缩至干, 以水复溶, 加入含 500 ng/mL $^9\text{KSTGGKAPR}$ [$^{13}\text{C}6$ 和 $^{15}\text{N}4$] 肽段内标溶液, 使内标终浓度为 50 ng/mL, 混匀, 待测。上述丙酰化反应均在 $\text{pH}\approx 8$ 的条件下进行, 使用 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 调节 pH 值。为确保最大反应效率, 丙酰化过程不可中断。

1.2.4 液相色谱-质谱检测

HPLC 分离采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱 (0~8.0 min, 1%~30 % B; 8.0~8.5 min, 30%~80% B; 8.5~10.1 min, 80%~1% B; 10.1~12.0 min, 1% B); 进样体积 10 μL ; 流速 0.25 mL/min。质谱离子源温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 电离模式: ESI 正离子源; 采集模式: MRM; 雾化气 (Gas 1) 276 kPa; 辅助加热干燥气 (Gas 2) 414 kPa; 去簇电压 (Declustering potential, DP): 100 eV; 碰撞室出口电压 (Collision cell exit potential, CEX): 15 eV, 入口电压 (Entrance potential, EP): 10 eV。

1.3 统计学分析

所有实验均重复至少 3 次, 实验结果数据以平均值 $\pm$ 标准偏差 (Standard deviation, SD) 表示, 以 0.1% DMSO 处理组为细胞对照组, 进行数据归一化处理, 两样本均数比较采用 Fisher 最小显著差异法, 统计检验采用 SPSS 19.0 软件完成, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法优化

由于组蛋白 H3 的 N-末端富含大量碱性氨基酸, H3 经胰蛋白酶酶切后会生成较小分子量的肽段, 而小分子量肽段在反相色谱柱上保留时间很短, 难以进行后续的 MS 分析^[19]。基于文献[20]报道, 在胰蛋白酶酶切前后对 H3 进行化学修饰可解决此问题, 即在胰蛋白酶裂解前后将 H3 的自由氨基 (包括 N-端氨基、未修饰和单甲基化修饰赖氨酸的 ϵ -氨基) 转化成丙酰胺, 进而保护赖氨酸使其不被胰蛋白酶酶切, 保证酶切后肽段分子量的均一性, 并得到分子量较大的肽段, 实现在色谱柱上的保留。参照文献[20], 对于细胞样品, 本研究对 H3 丙酰化处理策略进行条件优化。首先考察了异丙醇和丙酸酐比例对反应回收率的影响, 结果表明, 异丙醇与丙酸酐体积比为 1:3 时, 提取回收率最高。进一步比较了不同反应时间 (15、20、25 和 30 min) 的提取效果, 如图 1 所示, 反应时间为 20 min 时, 对 K9、K9ac 及 K14ac 的提取回收率均大于 80.0%。通过优化样品前处理方法, 实现了上述 3 种肽段的完全分离及灵敏检测, 选择离子色谱图如图 2 所示, 1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱与细胞孵育后, 细胞样品提取组蛋白 H3 经胰蛋白酶酶解后的 3 种靶肽段可实现分离检测。

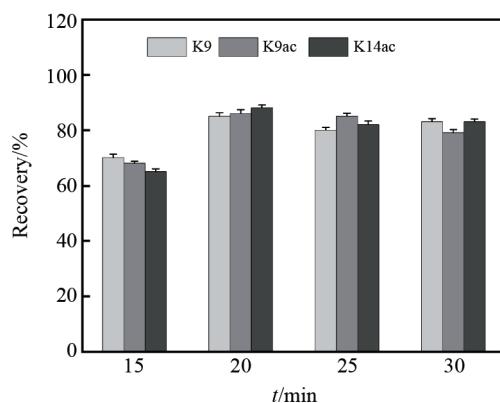


图1 不同反应时间下的提取效果对比图

Fig.1 Comparison of extraction efficiency at different reaction time

2.2 H3、H3K9ac和H3K14ac检测方法的建立

采用胰蛋白酶酶解肽段 $^9\text{KSTGGKAPR}$ ¹⁷, 测定组蛋白 H3 及其乙酰化产物 H3K9ac 和 H3K14ac。合成了 4 种不同形式的肽段标准品 (表1), 包括 9 位与 14 位未发生乙酰化肽段、9 位发生乙酰化肽段、14 位发

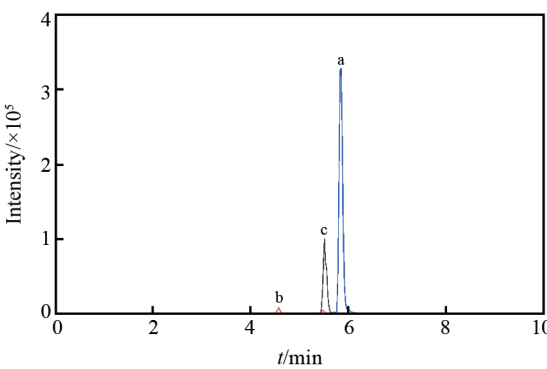


图2 1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱与HepG2细胞孵育后，组蛋白H3的3种胰蛋白酶酶解肽段的选择离子色谱图：(a) 9位与14位未发生乙酰化肽段；(b) 9位发生乙酰化肽段；(c) 14位发生乙酰化肽段
Fig.2 Selected-ion chromatograms of three histone H3 tryptic peptides in HepG2 cells after continuous incubating with 1 $\mu\text{mol/L}$ colchicine; (a) Peptide without acetylation at K9 and K14; (b) Peptide with acetylation at K9; (c) Peptide with acetylation at K14

生乙酰化肽段及同位素标记肽段。其中，4条肽段的N-端游离氨基、赖氨酸的游离氨基及单甲基化胺均进行了丙酰化修饰。在优化的LC-MS/MS条件下，采用MRM模式，选取特异性母离子与子离子，建立细胞样品中H3、H3K9ac和H3K14ac的检测方法。对应的肽段质谱参数见表1。

表1 肽段质谱参数
Table 1 Mass spectroscopic parameters for determination of peptides

序号 No.	肽段序列 Peptide sequence	修饰 Modification	衍生化 Derivatization	缩写 Abbreviation	离子对 Ion pair (<i>m/z</i>)	碰撞电压 Collision energy (eV)
1	⁹ KSTGGKAPR ¹⁷	/	pr (N-term, K9, K14)	K9	535.5/241.2	20
					535.5/829.5*	20
2	KSTGGKAPR	ac(K9)	pr (N-term, K14)	K9ac	528.4/227.0	20
					528.4/829.4*	25
3	KSTGGKAPR	ac(K14)	pr (N-term, K19)	K14ac	528.3/241.0	20
					528.3/815.4*	23
4	KSTGGKAPR	¹³ C6和 ¹⁵ N4(R17)	pr (N-term, K9, K14)	K9 (IS)	540.5/241.2	21
					540.5/839.5*	21

注：ac，乙酰化；pr，丙酰化；IS，内标；*，定量离子对。
Note: ac, acetylation; pr, propionylation; IS, internal standard; *, ion pair for quantification.

2.3 线性范围、检出限、基质效应及提取回收率

以空白细胞基质分别配制8个浓度梯度的K9、K9ac和K14ac肽段混合溶液，加入终浓度为500 ng/mL的K9 (IS)肽段IS溶液，采用HPLC-MS/MS检测，根据信噪比(*S/N*)大于3的标准确定检出限(LOD)。如表2所示，K9、K9ac和K14ac肽段在细胞中的检出限均为0.1 ng/mL，线性范围均为1~ 250 ng/mL。3种肽段在各自浓度范围内均呈良好的线性关系，相关系数(*R*²)为0.991~0.996。本方法可同时测定细胞基质中的K9、K9ac和K14ac 3种肽段，灵敏度高且线性范围宽。

当采用液相色谱-质谱法对生物样品进行检测时，常存在较严重的基质干扰。采用初始比例流动相溶剂、标准样品溶液和细胞基质样品溶液评价基质效应。将3种混合标准肽段溶液配制在初始比例的流动相中得到样品A；对空白细胞进行处理得到空白基质，再在空白基质中加入3种肽段混合标准溶液得到样品B；在空白基质中加入3种肽段混合标准溶液后再进行处理得到样品C；对样品A和B同时进行检测，基质效应(ME)= 响应值[(*B*-*A*)/*A* × 100%]；对B和C同时进行检测，回收率(RE)= 响应值(*C/B*) × 100%。结果如表2所示，细胞基质中3种肽段的基质效应为3.1% ~7.1%，提取回收率为86.5%~114. 0%，满足测定要求。

表2 K9、K9ac及K14ac肽段分析方法的线性方程、检出限、回收率及基质效应

Table 2 Regression equation, limit of detection (LOD), recovery (RE) and matrix effect (ME) of target peptides for K9, K9ac and K14ac

肽段 Peptide	线性范围 Linear range (ng/mL)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	检出限 LOD (ng/mL)	加标浓度 Spiked (ng/mL)	回收率 RE (%)	基质效应 ME (%)
K9	1 ~ 250	$y=0.039x-0.075$	0.996	0.1	2	86.5	4.3
					50	87.8	3.1
					225	108.0	5.8
K9ac	1 ~ 250	$y=0.019x-0.073$	0.991	0.1	2	91.7	6.4
					50	114.0	3.7
					225	102.6	7.1
K14ac	1 ~ 250	$y=0.028x-0.058$	0.992	0.1	2	104.2	5.6
					50	93.8	3.8
					225	105.2	6.3

2.4 准确度和精密度

采用细胞空白基质进行准确度和精密度实验,按照生物分析方法学指导原则^[21],准确度和精密度采用低、中、高浓度质控样品进行评估,包括日内准确度和日间准确度,以及日内精密度和日间精密度。每个分析批次包括3个浓度水平,每个浓度点由5份独立样品组成,采用标准加入法,计算对应肽段的准确度与精密度。其中,精密度用相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)表示,结果见表3。3种肽段的准确度为87.6%~109.1%,RSD在2.8%~7.3%之间。上述结果表明,所建立的方法准确度高、重现性好,符合分析方法的要求,可应用于后续细胞样品检测。

表3 K9、K9ac及K14ac靶标肽段分析方法的准确度及精密度

Table 3 Accuracy and precision of target peptides K9, K9ac and K14ac for H2AX and γ -H2AX

肽段 Peptide	日内 Intra-day ($n=5$)			日间 Inter-day ($n=5$)		
	浓度 Concentration (ng/mL)	准确度 Accuracy (%)	精密度 RSD (%)	浓度 Concentration (ng/mL)	准确度 Accuracy (%)	精密度 RSD (%)
K9	2	89.3	2.9	2	87.6	5.9
	50	92.5	2.8	50	90.8	3.7
	225	98.2	3.4	225	95.7	4.5
	288.6		3.8	292.9		7.3
K9ac	50	101.3	4.2	50	103.4	5.2
	225	90.7	6.1	225	91.9	6.7
	298.9		5.6	288.5		7.3
K14ac	50	101.5	4.9	50	100.8	3.7
	225	109.1	3.6	225	95.7	6.5

2.5 基因毒化合物对组蛋白H3乙酰化的影响

采用优化的液相色谱-质谱方法对喜树碱与秋水仙碱孵育HepG2细胞和HeLa细胞后的乙酰化样品进行分析。如图3所示,经作用模式不同的基因毒性化合物处理后,H3K14ac/H3变化显著,喜树碱使该比值降低约1.0~1.6倍,秋水仙碱则使该比值升高约1.0~1.4倍。本研究组前期研究表明,当喜树碱与细胞孵育后,在前期,即0.5~8.0 h期间,DNA修复占主导地位,而DNA转录受到抑制^[16],H3K14ac作为转录激活标志物,因此在此阶段H3K14ac/H3呈现下降趋势;在8~24 h期间,随着细胞周期的进展,DNA修复能力渐达到饱和,DNA转录上调^[16],因此H3K14ac/H3呈现上升趋势。前期研究表明,秋水仙碱与细胞孵育后,其导致细胞中转录激活标志物组蛋白H3的10位丝氨酸磷酸化(p-H3)水平增加,并且p-H3/H3时效曲线呈现类“S”形^[16],在本研究中,秋水仙碱处理细胞后,H3K14ac/H3水平也呈现先上升而后趋于不变的趋势。

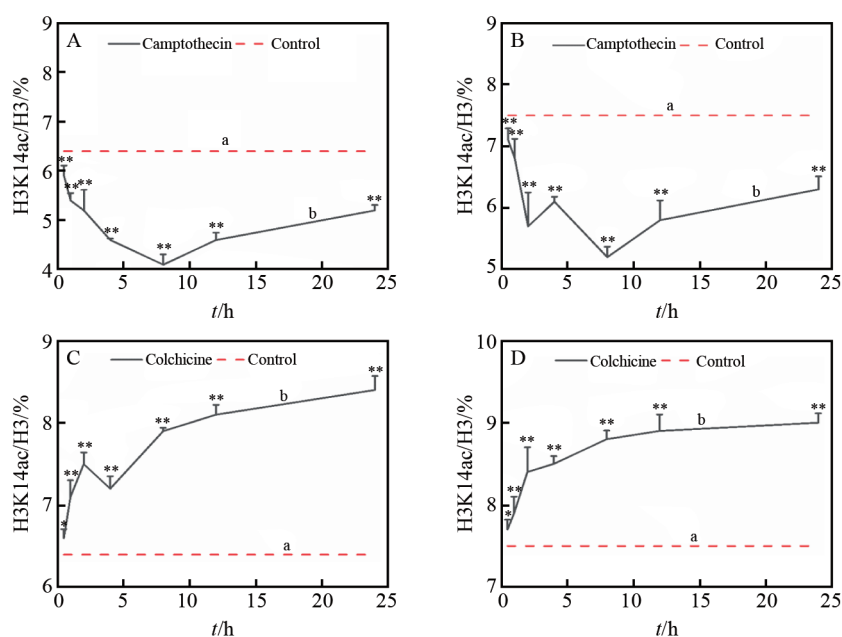


图3 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱与(A) HepG2和(B) HeLa细胞孵育或1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱与(C) HepG2和(D) HeLa细胞孵育后, H3K14ac/H3时效变化 ($n \geq 3$, 平均值 $\pm$ 标准偏差; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$): (a) 0.1% DMSO与细胞孵育后, H3K14ac/H3时效变化; (b) 基因毒性化合物与细胞孵育后, H3K14ac/H3时效变化

Fig.3 Time-dependent changes of H3K14ac/H3 after continuous incubating of 1 $\mu\text{mol/L}$ camptothecin with (A) HepG2 cells and (B) HeLa cells, or continuous incubating of 1 $\mu\text{mol/L}$ colchicine with (C) HepG2 cells and (D) HeLa cells (Mean $\pm$ standard deviation (SD); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$): (a) Time-dependent changes of H3K14ac/H3 after continuous incubating of 0.1% DMSO with cells; (b) Time-dependent changes of H3K14ac/H3 after continuous incubating of genotoxic compound with cells

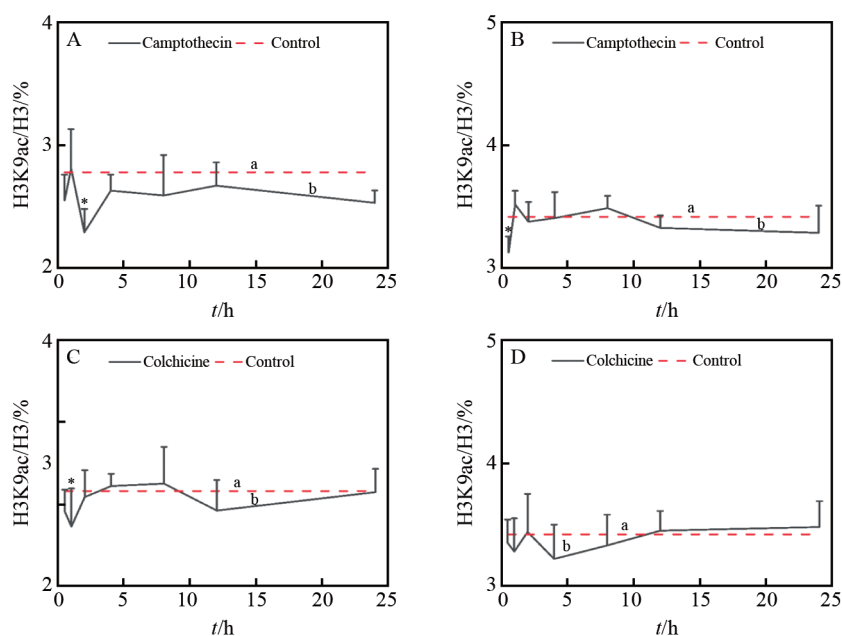


图4 1 $\mu\text{mol/L}$ 喜树碱与(A) HepG2和(B) HeLa细胞孵育或1 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱与(C) HepG2和(D) HeLa细胞孵育后, H3K9ac/H3时效变化 ($n \geq 3$, 平均值 $\pm$ 标准偏差; * $p < 0.05$): (a) 0.1% DMSO与细胞孵育后, H3K9ac/H3时效变化; (b) 基因毒性化合物与细胞孵育后, H3K9ac/H3时效变化

Fig.4 Time-dependent changes of H3K9ac/H3 after continuous incubating of 1 $\mu\text{mol/L}$ camptothecin with (A) HepG2 cells and (B) HeLa cells, or continuous incubating of 1 $\mu\text{mol/L}$ colchicine with (C) HepG2 cells and (D) HeLa cells (Mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$): (a) Time-dependent changes of H3K9ac/H3 after continuous incubating of 0.1% DMSO with cells; (b) Time-dependent changes of H3K9ac/H3 after continuous incubating of genotoxic compound with cells

经计算, 在 HepG2 和 HeLa 两种细胞株中, H3K9ac 占 H3 总含量的百分比分别为 $2.78\% \pm 0.15\%$ 和 $3.42\% \pm 0.12\%$ 。如图 4 所示, 在不同时间段, 喜树碱与秋水仙碱对两种细胞中的 H3K9ac/H3K9 含量水平的影响均不明显。此结果与文献[22]报道一致, 即在哺乳动物细胞中基因毒性化合物诱导 DNA 损伤后, H3K9 不发生乙酰化。

3 结论

建立了组蛋白 H3 的 9 位 (H3K9ac) 或 14 位 (H3K14ac) 乙酰化及其相应原型特征多肽片段的高效液相色谱-三重四极杆质谱同时定量分析方法, 优化了丙酰化等样品前处理方法。本方法具有简便、灵敏度高及定量准确等优点, 可为基因毒性化合物的 DNA 损伤/修复及转录研究提供新的检测方法。

References

- [1] PHILLIPS D H, ARLT V M. *EXS*, 2009, 99: 87-110.
- [2] SZEKELY G, AMORES D, GIL M, FERREIRA F C, HEGGIE W. *Chem. Rev.*, 2015, 115(16): 8182-8229.
- [3] QU Min-Min, CHEN Jia, XU Bin, ZHANG Ya-Jiao, XU Hua, XIE Jian-Wei. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(9): 1531-1539.
瞿敏敏, 陈佳, 徐斌, 张雅姣, 徐华, 谢剑炜. *分析化学*, 2021, 49(9): 1531-1539.
- [4] MISHIMA M. *Front. Biosci.*, 2017, 9(1): 1-16.
- [5] MOTOYAMA S, TAKEIRI A, TANAKA K, HARADA A, MATSUZAKI K, TAKETO J, MATSUO S, FUJII E, MISHIMA M. *Genes Environ.*, 2018, 40: 10.
- [6] KOUZARIDES T. *Cell*, 2007, 128(4): 693-705.
- [7] SHIN D M, KUCIA M, RATAJCZAK M Z. *Gerontology*, 2011, 57(1): 76-84.
- [8] PETERSON C L, LANIEL M A. *Curr. Biol.*, 2004, 14(14): R546-R551.
- [9] KIMURA H. *J. Hum. Genet.*, 2013, 58(7): 439-445.
- [10] GRUNSTEIN M. *Nature*, 1997, 389(6649): 349-352.
- [11] WANG Z, ZANG C, ROSENFELD J A, SCHONES D E, BARSKI A, CUDDAPAH S, CUI K, ROH T Y, PENG W, ZHANG M Q. *Nat. Genet.*, 2008, 40(7): 897-903.
- [12] FUCHS S M, KRAJEWSKI K, BAKER R W, MILLER V L, STRAHL B D. *Curr. Biol.*, 2011, 21(1): 53-58.
- [13] SAWAN C, HERCEG Z. *Adv. Genet.*, 2010, (70): 57-85.
- [14] FISCHLE W, WANG Y, ALLIS C D. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003, 15(2): 172-183.
- [15] ZHANG C, MOLASCON A J, GAO S, LIU Y, ANDREWS P C. *Mol. Cell Proteomics*, 2013, 12(6): 1678-1688.
- [16] QU M M, XU H, CHEN J, ZHANG Y J, XU B, GUO L, XIE J W. *Chem. Res. Toxicol.*, 2020, 33(8): 2108-2119.
- [17] QU M M, XU H, LI W J, CHEN J, ZHANG Y J, XU B, LI Z, LIU T, GUO L, XIE J W. *Arch. Toxicol.*, 2021, 95(11): 3559-3573.
- [18] QU Min-Min, CHEN Jia, ZHANG Ya-Jiao, XU Bin, XU Hua, XIE Jian-Wei. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(12): 2039-2047.
瞿敏敏, 陈佳, 张雅姣, 徐斌, 徐华, 谢剑炜. *分析化学*, 2021, 49(12): 2039-2047.
- [19] LIN S, GARCIA B A. *Methods Enzymol.*, 2012, 512(3): 3-28.
- [20] GARCIA B A, MOLLAH S, UEBERHEIDE B M, BUSBY S A, MURATORE T L, SHABANOWITZ J, HUNT D F. *Nat. Protoc.*, 2007, 2(4): 933-938.
- [21] US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [EB/OL]. www.fda.gov/cvm. 2019.
- [22] VEMPATI R K, HALDAR D. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39(1): 303-308.

Determination of Genotoxic Compounds with Different Modes of Action on Histone H3 Acetylation by Protein Modification Quantitative Mass Spectrometry

QU Min-Min, CHEN Jia, XU Bin, LI Zhi, GUO Lei, XU Hua*, XIE Jian-Wei

(State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Three target peptides, H3K9ac, H3K14ac and H3, in human cell lines were determined by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry under positive ion multiple reaction monitoring mode(MRM). The cell samples were pre-treated by trypsin digestion, propionylation derivatization, desalination, peptide enrichment, and then separated by ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column. The results indicated that the three peptides in cells had good linear relationship within the concentration range of 1-250 ng/mL ($R^2>0.99$). The detection limits ($S/N=3$) of the peptides were 0.1 ng/mL. Accuracy, precision, matrix effects and recoveries meet the methodological requirement for biological samples analysis. The established method had many advantages such as simple operation, high sensitivity, fast detection and accurate quantification, which had been initially applied to evaluate the effects of two classic genotoxic compounds (camptothecin and colchicine) with different modes of action on the acetylation at position 9 and position 14 of histone H3 in cells. This method provided important technical support for DNA damage/repair and transcription research of genotoxic compounds.

Keywords High performance liquid chromatography; Mass spectrometry; Histone H3; Acetylation; Genotoxic compounds

(Received 2022-01-14; accepted 2022-03-31)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21974151).