

# 基于纳升电喷雾质谱的 DNA 甲基 化分析方法研究

(申请清华大学理学博士学位论文)

培 养 单 位： 化 学 系

学 科： 化 学

研 究 生： 司 星 宇

指 导 教 师： 张 新 荣 教 授

二〇一八年四月

# **DNA Methylation Analysis Based on Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry**

Dissertation Submitted to

**Tsinghua University**

in partial fulfillment of the requirement

for the degree of

**Doctor of Philosophy**

in

**Chemistry**

by

**Si Xingyu**

Dissertation Supervisor: Professor Zhang Xinrong

**April, 2018**

## 摘要

DNA 甲基化是一类重要的表观遗传学机制。DNA 中胞嘧啶 (Cyt) 5 号碳上发生的甲基化是最常见也是目前研究最多的 DNA 甲基化存在形式。5-甲基胞嘧啶 (5mCyt) 能够调控基因的表达和沉默、参与维持染色体的稳定性, 因而参与到了发育、衰老、癌变等诸多重要的生物学过程之中。发展 DNA 甲基化的分析方法对于表观遗传学基础研究以及疾病的早期诊断和预后评价有重要意义。质谱技术因其良好的选择性和定量能力, 已经成为了进行基因组 DNA 甲基化程度分析的主流技术。但是目前基于质谱的 DNA 甲基化分析方法仍面临样品需求量大、方法耗时繁琐、灵敏度不够高的挑战。针对这些问题, 本文从三个角度提出了解决方案, 研究了三种不同的基于 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化程度分析方法, 具体内容如下:

1. 建立了一种基于 NanoESI-MS 的人类细胞基因组 DNA 甲基化程度的检测方法。该方法将 DNA 酸解的前处理反应在 NanoESI 的喷针中在线进行, 之后直接进行 NanoESI-MS 检测, 从而大大减少了样品稀释和样品需求量。该方法能够应用于 100 个 MCF7、MCF10A、HepG2 和 HeLa 细胞的基因组 DNA 甲基化检测, 全程检测仅需 2 小时, 因而该方法可以成为判定临床中少量分离细胞是否为癌细胞的潜在分析方法, 在实际临床应用中有应用潜力。

2. 建立了一种基于小体积快速衍生化和 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化程度快速分析方法。前人研究报导衍生剂 BDAPE 可以提高 2'-脱氧胞苷 (dC)、5-甲基-2'-脱氧胞苷 (5mdC) 等在质谱中的检测灵敏度, 但衍生反应耗时较长。本文发现 BDAPE 对 dC 和 5mdC 的衍生化反应可以在小体积反应体系下得到大幅度的反应加速, 反应时间可缩短 360 倍。并且, 小体积反应模式下 BDAPE 所需浓度远远小于常量反应, 从而减小了衍生剂本身对检测的干扰。本文运用这一技术对 6 种细胞系的 DNA 甲基化程度进行了分析, 相较于前人方法分析时间大大缩短。

3. 建立了一种基于离子重复富集技术和 NanoESI-MS 的单细胞水平 DNA 甲基化程度分析方法。该方法对商品化的离子阱质谱进行了改造, 使离子阱可以重复多次富集某一特定质荷比的离子, 实现了对低浓度离子的富集, 多类型的离子检测灵敏度可提高 3-22 倍。应用这一技术, 本文实现了对 0.2 个 MCF7 单细胞水平的基因组 Cyt 和 5mCyt 含量的检出。该方法不仅在单细胞分析领域有广阔应用前景, 而且有潜力应用于未知 DNA 修饰类型的发现。

**关键词:** 纳升电喷雾质谱; DNA 甲基化; 在线样品前处理; 衍生化反应; 线性离子阱

# Abstract

---

## Abstract

DNA methylation is an important epigenetic modification, which is commonly presented as the methylation of the fifth carbon of cytosine in DNA. Mounting researches demonstrated that 5-methylcytosine can regulate gene expression and silencing, and take part in many biological processes, including mammalian development, aging, and carcinogenesis. Therefore, establishing analytical methods to characterize DNA methylation would greatly aid fundamental researches in the field of epigenetics and early diagnosis and prognosis of related diseases. One technique to measure the degree of genomic DNA methylation is mass spectrometry (MS), due to its high selectivity and sensitivity. MS is now widely used in the analysis of DNA methylation, but it still faces many challenges, including large sample consumption, time-consuming procedure, and limited sensitivity to discover new modifications of DNA. In this thesis, three different analytical methods based on NanoESI-MS were established in order to solve the problems mentioned above.

The main development resulting from this thesis are as follows.

1. A method sensitive enough to analyze DNA methylation degree of only 100 human cells was established, which was based on on-line sample hydrolysis and NanoESI-MS. The key strategy employed in this method was to conduct the hydrolysis of genomic DNA directly in the NanoESI spray emitter, thus minimizing the dilution during sample pretreatment. This method was successfully applied to the DNA methylation analysis of 100 MCF7, MCF10A, HepG2, and HeLa cells within 2 hours. The small sample consumption of this method meant it may be suitable for detection of rare cancer cells in clinical environment or special samples in fundamental researches.

2. A method to enable rapid analysis of DNA methylation degree was established, which was based on accelerated derivatization of 2'-deoxycytidine in confined volumes and NanoESI-MS. BDAPE, a derivative agent for 2'-deoxycytidine and 5-methyl-2'-deoxycytidine, can improve the detection sensitivity of DNA methylation in MS. It was found that the derivatization reaction by BDAPE could be greatly accelerated in confined volumes such as spray droplets. By conducting derivatization in spray droplets, the time needed to finish the reaction can be reduced by 360 folds. Additionally, the concentration

## Abstract

---

of BDAPE needed for confined-volume reactions was much less than that for bulk reactions, thus reducing the matrix effect caused by BDAPE. By combining confined-volume derivatization reaction with NanoESI-MS, this method successfully measured the DNA methylation of 6 cell lines, consuming much less time than conventional HPLC-MS method.

3. A method capable of analyzing the DNA methylation degree at single-cell level was developed, which was based on repeated ion accumulation in linear ion trap and NanoESI-MS. In this method, commercial mass spectrometer was modified to make the ion trap isolate and accumulate a specific ion repeatedly, thus improving the detection sensitivity of low-concentration molecules. The detection sensitivity of multiple kinds of molecules could be improved by 3-22 folds by this method. The cytosine and 5-methylcytosine hydrolyzed from sample equivalent to 0.2 MCF7 cell could be detected by this method. This method is promising to be used in single-cell analysis of other metabolites and the discovery of new DNA modification.

**Key words:** Nanoelectrospray ionization; DNA methylation; On-line sample pretreatment; Derivatization; Linear ion trap

## 目 录

第 1 章 引言 .....	1
1.1 表观遗传学及 DNA 甲基化概述 .....	1
1.1.1 表观遗传学概述 .....	1
1.1.2 基因组 DNA 甲基化概述 .....	3
1.1.3 DNA 中 5-甲基胞嘧啶的生物学功能 .....	7
1.1.4 DNA 甲基化与疾病、发育和衰老的密切联系 .....	8
1.2 DNA 甲基化分析方法发展概述 .....	10
1.2.1 特定 DNA 位点甲基化分析方法概述 .....	11
1.2.1.1 甲基敏感的内切酶法 .....	11
1.2.1.2 亚硫酸氢钠还原法 .....	13
1.2.1.3 亲和富集法 .....	13
1.2.2 全基因组水平的 DNA 甲基化程度分析方法概述 .....	15
1.2.2.1 高效液相色谱-质谱联用技术 .....	15
1.2.2.2 气相色谱-质谱联用技术 .....	18
1.2.2.3 高效液相色谱-光谱联用技术 .....	18
1.2.2.4 毛细管电泳技术 .....	19
1.2.2.5 免疫介导技术 .....	19
1.3 基于质谱的 DNA 甲基化分析方法研究所面临的挑战 .....	19
1.4 本论文的主要内容 .....	20
第 2 章 在线酸解-质谱法分析稀有癌细胞的 DNA 甲基化程度 .....	22
2.1 本章引言 .....	22
2.2 实验部分 .....	23
2.2.1 仪器与材料 .....	23
2.2.2 细胞培养与收集 .....	23
2.2.3 群体细胞的 DNA 甲基化程度测定 .....	23
2.2.4 MCF10A 细胞和 MCF7 细胞的荧光免疫染色 .....	24
2.2.5 毛细管内少量细胞的酸解及 DNA 甲基化测定 .....	24
2.2.6 对照实验 .....	25

2.2.7	实验条件的优化 .....	25
2.2.8	工作曲线及定量 .....	25
2.3	结果与讨论 .....	26
2.3.1	乳腺癌细胞与正常细胞的表皮抗原荧光染色效果对比 .....	26
2.3.2	乳腺癌细胞与正常细胞的基因组 DNA 甲基化程度对比 .....	27
2.3.3	基于在线酸解反应的少量细胞 DNA 甲基化质谱方法研究 .....	29
2.3.4	在线细胞酸解反应的反应条件优化及结果验证 .....	31
2.3.5	方法的最低取样量摸索 .....	33
2.3.6	测定少量细胞时的方法喷雾稳定性考察 .....	33
2.3.7	多种细胞在少量细胞取样下的 DNA 甲基化程度检测 .....	36
2.3.8	少量乳腺正常细胞和癌细胞混合情况下的 DNA 甲基化程度检测 .....	38
2.4	本章结论 .....	39
第 3 章	小体积衍生-质谱法快速分析细胞的 DNA 甲基化程度 .....	40
3.1	本章引言 .....	40
3.2	实验部分 .....	41
3.2.1	仪器与材料 .....	41
3.2.2	气动喷雾小体积反应装置的搭建及反应流程 .....	42
3.2.3	常量反应、液滴小体积反应和气动喷雾小体积反应的操作流程 .....	42
3.2.4	细胞的培养及收集 .....	43
3.2.5	细胞前处理、DNA 酶解及核苷衍生化的操作流程 .....	43
3.2.6	工作曲线及定量 .....	44
3.3	结果与讨论 .....	45
3.3.1	小体积下胞苷类化合物的快速衍生化 .....	45
3.3.2	气动喷雾装置的结构和气动喷雾小体积反应方式的表现 .....	48
3.3.3	基于小体积衍生化反应的 NanoESI-MS 方法的灵敏度的提高 .....	52
3.3.4	衍生剂 BDAPE 浓度的优化最佳值 .....	55
3.3.5	基于小体积衍生化的多种细胞 DNA 甲基化程度检测 .....	56
3.4	本章结论 .....	57
第 4 章	离子重复富集-质谱法分析单细胞水平的 DNA 甲基化程度 .....	59
4.1	本章引言 .....	59

---

4.2 实验部分 .....	60
4.2.1 仪器和材料 .....	60
4.2.2 质谱扫描函数的更改 .....	61
4.2.3 离子注入时间的优化 .....	62
4.2.3 离子重复富集检测模式和普通检测模式的对比 .....	62
4.2.4 细胞培养和酸解 .....	63
4.2.5 单细胞水平的 DNA 甲基化分析 .....	63
4.3 结果与讨论 .....	65
4.3.1 离子阱内离子的多次循环富集 .....	65
4.3.2 高浓度组分在离子重复富集模式下的表现 .....	70
4.3.3 各类型离子在离子重复富集检测模式下的检测结果考察 .....	71
4.3.4 离子重复富集技术对于检测灵敏度的提高 .....	76
4.3.5 单细胞水平 DNA 甲基化检测 .....	78
4.3.6 离子重复富集技术的其它应用前景讨论 .....	81
4.4 本章结论 .....	84
第 5 章 结论 .....	85
参考文献 .....	87
致 谢 .....	103
声 明 .....	104
附录 A 离子重复富集技术的实现和操作方法 .....	105
个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果 .....	111

## 主要符号对照表

MS	质谱(Mass Spectrometry)
HPLC	高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	高效液相色谱-质谱联用技术(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
GC-MS	气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
CE	毛细管电泳(Capillary Electrophoresis)
NanoESI	纳升电喷雾离子化(Nanoelectrospray Ionization)
NanoESI-MS	纳升电喷雾离子源质谱(Nanoelectrospray Ionization-Mass Spectrometry)
MS <sup>2</sup>	二级质谱
MS <sup>3</sup>	三级质谱
SRM	单反应监测模式(Single Reaction Monitoring)
TIC	总离子流图(Total Ion Current Chromatogram)
EIC	提取离子流图(Extracted Ion Chromatogram)
CID	碰撞诱导解离(Collision Induced Dissociation)
MALDI-MS	基质辅助激光解吸附电离质谱(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry)
DNA	脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)
RNA	核糖核酸(Ribonucleic Acid)
Cyt	胞嘧啶(Cytosine)
Adc	腺嘌呤(Adenine)
Thy	胸腺嘧啶(Thymine)
Gua	鸟嘌呤(Guanine)
5mCyt	5-甲基胞嘧啶(5-Methylcytosine)
5hmCyt	5-羟甲基胞嘧啶(5-Hydroxymethylcytosine)
5fCyt	5-醛基胞嘧啶(5-Formylcytosine)
5caCyt	5-羧基胞嘧啶(5-Carboxycytosine)
Ura	尿嘧啶(Uracil)
5hmUra	5-羟甲基尿嘧啶(5-Hydroxymethyluracil)

主要符号对照表

DNMT	DNA 甲基转移酶(DNA Methyltransferase)
SAM	S 腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine)
SAH	S 腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine)
TET	TET 酶(Ten-eleven Translocation)
BER	碱基切除修复(Base Excision Repair)
DME/ROS1	DME/ROS1(Demeter/Repressor of Silencing 1)
MBDs	甲基结合蛋白(Methylated CpG Binding Proteins)
HDACs	组蛋白去乙酰化酶(Histone Deacetylases)
N <sup>6</sup> mAde	N <sup>6</sup> -甲基腺嘌呤(N <sup>6</sup> -Methyladenine)
PCR	聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)
CTCs	循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells)
dC	2'-脱氧胞苷(2'-Deoxycytidine)
dA	2'-脱氧腺苷(2'-Deoxyadenosine)
dT	2'-脱氧胸苷(2'-Deoxythymidine)
dG	2'-脱氧鸟苷(2'-Deoxyguanosine)
5mdC	5-甲基-2'-脱氧胞苷(5-Methyl-2'-deoxycytidine)
5hmdC	5-羟甲基-2'-脱氧胞苷(5-Hydroxymethyl-2'-deoxycytidine)
5fdC	5-醛基-2'-脱氧胞苷(5-Formyl-2'-deoxycytidine)
5cadC	5-羧基-2'-脱氧胞苷(5-Carboxy-2'-deoxycytidine)
BDAPE	2-溴-1-(4-二甲氨基苯基)-乙酮(2-bromo-1-(4-dimethylamino-phenyl)-ethanone)
TEA	三乙胺(Triethylamine)
ATP	腺苷三磷酸(Adenosine Triphosphate)

## 第1章 引言

### 1.1 表观遗传学及DNA甲基化概述

#### 1.1.1 表观遗传学概述

细胞内的染色质由脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 和蛋白质组装压缩而成<sup>[1-5]</sup>。其中, DNA 是细胞内遗传信息储存的主要载体, 具有遗传效应的 DNA 被称为基因<sup>[6,7]</sup>。现代生物学的“中心法则”认为遗传信息之所以能够在细胞分裂的过程中得到维持, 是因为 DNA、核糖核酸 (Ribonucleic Acid, RNA)、蛋白质之间存在着严格的转变过程<sup>[8]</sup>: (1) DNA 通过半保留复制的方式进行自我复制, 在细胞分裂的过程中分配到子代细胞内, 保证遗传信息的严格复制<sup>[9,10]</sup>; (2) 细胞以 DNA 为模板按照 5'端到 3'端的顺序转录为相应的信使 RNA<sup>[11,12]</sup>; (3) 细胞将信使 RNA 按照和转录相同的顺序翻译为多肽或蛋白质, 由蛋白质执行各项生命活动<sup>[13,14]</sup>。换言之, 细胞的表型由 DNA 序列, 也就是基因型所决定。经典的孟德尔遗传定律认为个体间表型的差异, 是 DNA 发生突变导致基因组差异所造成的<sup>[15]</sup>。换言之, 基因突变是表型发生变化的决定因素。

上述经典理论可以解释许多遗传学现象, 使研究者对于生命有了深入认识。尤其是随着近几年测序技术的快速发展及人类基因组计划的完成, 人们对于基因的了解更加深入<sup>[16]</sup>。现在, 研究者可通过基因组的差异和变化解释许多疾病和生物学过程的成因, 也可依据基因组图谱提出新的治疗疾病的策略<sup>[17]</sup>。然而, 尽管如此, 越来越多的科学研究发现很多遗传现象仍无法用经典的遗传学理论加以解释, 除了 DNA 序列改变 (即基因突变) 之外, 还有其他可遗传的因素会改变或影响生命或细胞的表型 (图 1.1) <sup>[18-21]</sup>。例如, 1930 年 Muller 等人观察到一些果蝇有花斑眼的表型, 经过遗传学分析后他们发现这一现象是部分细胞中 *white* 基因发生染色体转移所导致的, 这些细胞中基因本身的序列并未改变只是发生了 DNA 重排<sup>[18]</sup>。另一个例子是 X 染色体随机失活, 雌性哺乳动物细胞中含有两条 X 染色体, 其中一条会呈现沉默状态, 以确保雌性与雄性细胞中 X 染色体表达量相同<sup>[19,21]</sup>。Riggs、Holliday 和 Pugh 等人经过研究认为是 DNA 甲基化在基因表达沉默中起了重要作用, 且 DNA 甲基化可通过半保留复制传递给子代细胞<sup>[22,23]</sup>。除此之外, 还有一些研究表明染色体中的组蛋白乙酰化、甲基化、泛素化也会对基因表达产生调控<sup>[20,24]</sup>, 且组蛋白修饰也可在 DNA 复制的同时得到维持, 其中的机制已经有一些研究给出了合理解释<sup>[25-27]</sup>。

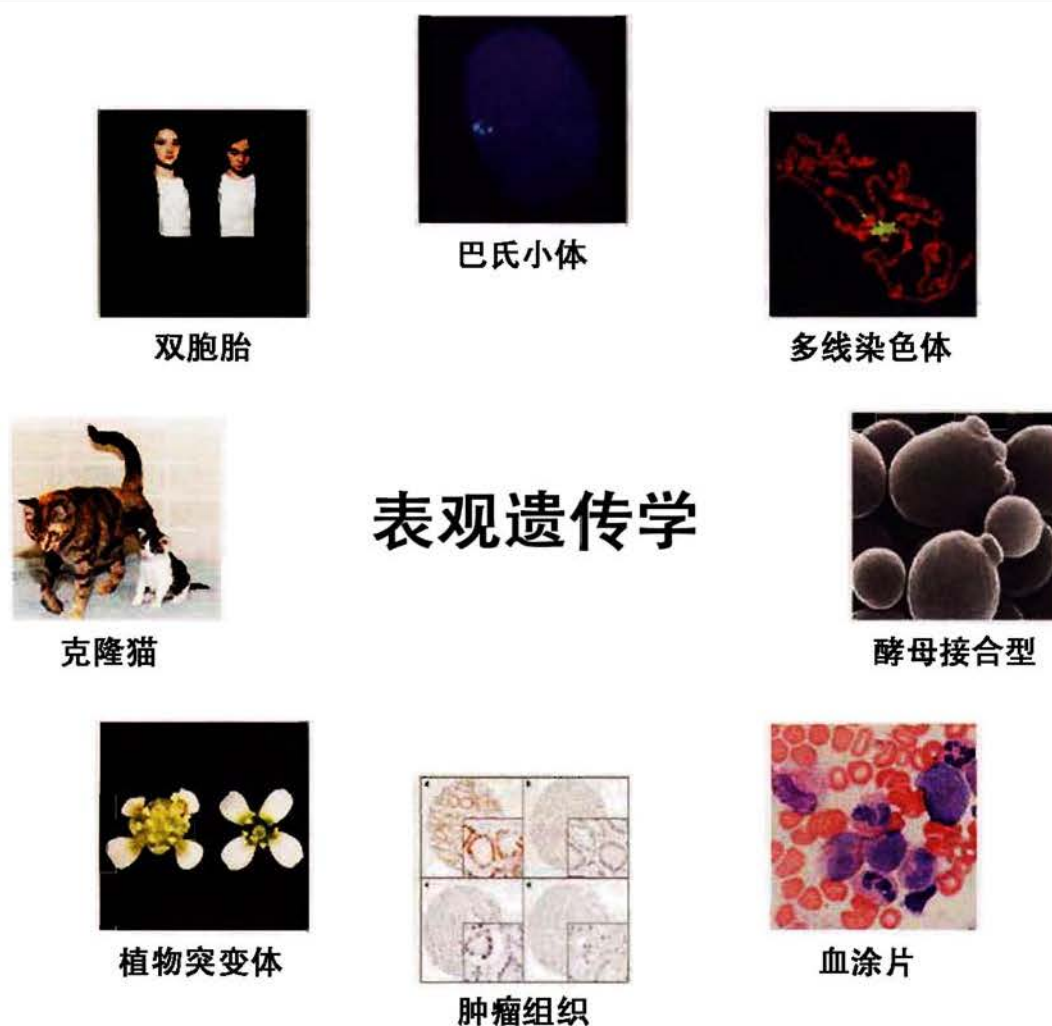


图1.1 典型的表观遗传学现象<sup>[28]</sup>。双胞胎：同卵双胞胎之间细微的表型差异主要来源于表观遗传学因素（©Randy Harris, 纽约）。巴氏小体：哺乳动物雌性细胞中含有两条X染色体，其中一条会发生失活形成致密的异染色质，即巴氏小体。多线染色体：果蝇唾液腺细胞中的巨大染色体称之为多线染色体，是进行表观遗传学研究的理想材料（©Springer）<sup>[29]</sup>。酵母接合型：酵母细胞中活性的接合基因（即酵母接合型）决定了细胞性行为，接合基因的激活与沉默由表观遗传学因素控制（©Alan Wheals, 巴斯大学）。血涂片：不同类型的血细胞拥有同样的基因组，然而表观遗传学因素决定了它们的不同类型和功能（引自Christian Sillaber教授）。肿瘤组织：图左的转移性肿瘤细胞体现出了表观遗传学标记水平的升高（©Macmillan）<sup>[30]</sup>。植物突变体：由表观遗传因素导致的拟南芥花朵突变体，图中两朵花基因型相同（©Macmillan）<sup>[31]</sup>。克隆猫：克隆猫基因组相同，但是具有不同表型的毛皮颜色（©Macmillan）<sup>[32]</sup>。

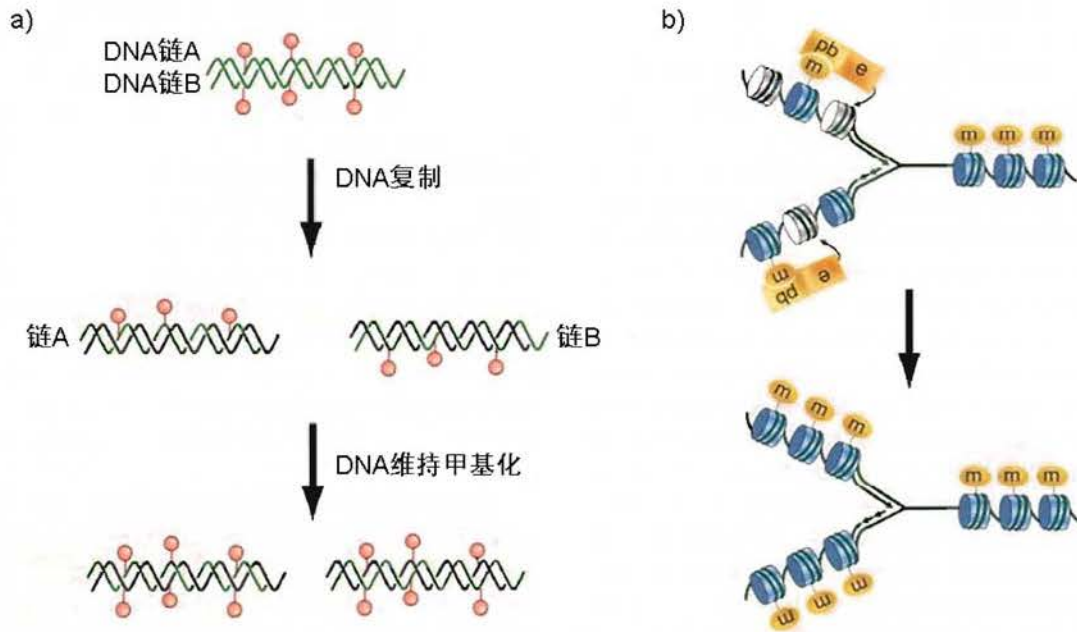


图1.2 DNA复制期间DNA甲基化及组蛋白修饰的遗传机制<sup>[28]</sup>。(a) DNA复制期间DNA甲基化的维持机制：在DNA复制期间，由于母链的两条DNA在CpG或CpXpG残基相同位置存在甲基化，半保留复制后两条子链中均有一条来自母链的DNA存在甲基化位点，之后DNMT会识别这些半甲基化位点，完成相对位置CpG或CpXpG残基位置的甲基化；(b) DNA复制期间组蛋白修饰的维持机制：在DNA复制期间，亲本的已修饰组蛋白散在分布于两条子链DNA上，未修饰组蛋白新插入到子链中。亲本组蛋白的修饰位点(m)会募集修饰位点结合蛋白(pb)，pb进一步募集组蛋白修饰酶(e)，e会进一步将相邻的新插入组蛋白进行修饰，实现组蛋白修饰在DNA复制期间的维持。

上述诸多研究均证实了一个事实，就是生命体或细胞的表型不仅仅由DNA序列单独决定，还受到其他遗传因素的共同影响，且这些因素可通过某些机制得到维持(图1.2)。由此，表观遗传学的概念也应运而生<sup>[28,33-35]</sup>。从概念上讲，表观遗传学是研究DNA序列不发生改变的情况下可遗传表型的学科，其机制包含上述提到的DNA重排、DNA甲基化、组蛋白修饰等等多种调控DNA表达的可遗传机制<sup>[33]</sup>。近期越来越多的研究发现，表观遗传学与癌变、衰老、发育等众多重要生物学过程相关，因此越来越受到研究者的关注<sup>[33,36-40]</sup>。

### 1.1.2 基因组DNA甲基化概述

从大类上分，表观遗传学机制分为DNA甲基化、组蛋白修饰、RNA干扰等几大类。其中，基因组DNA的甲基化是一种重要的表观遗传学分子机制，在高等生物中普遍存在<sup>[41]</sup>。许多研究表明DNA甲基化与发育、衰老、癌变等诸多重要的生物学过程密切相关，因而最近几年引起了研究者的关注，也成为了表观遗传学的热点之一<sup>[42-45]</sup>。

在真核细胞中，DNA 中胞嘧啶（Cytosine, Cyt）分子的 5 位碳原子可以被甲基化，形成 5-甲基胞嘧啶（5-Methylcytosine, 5mCyt）（图 1.3a）<sup>[46]</sup>。这是真核细胞中含量最高的 DNA 甲基化存在形式，也是最早被研究者发现且目前研究最多、维持和调控机制也较为清楚的一类 DNA 甲基化<sup>[22, 23, 47, 48]</sup>。5mCyt 被称为腺嘌呤（Adenine, Ade）、胸腺嘧啶（Thymine, Thy）、Cyt、鸟嘌呤（Guanine, Gua）之后的第五类 DNA 碱基，哺乳动物细胞中主要出现在 DNA 的 CpG 或者 CpXpG 残基序列上，对于绝大多数位点而言通常两条配对 DNA 分子的对应位置均会出现甲基化（图 1.3c）。在不同生物中胞嘧啶甲基化的比例各不相同，如人类细胞的基因组中大概 4%-5% 的 Cyt 会发生甲基化，线虫中则尚未发现 5mCyt，而某些植物细胞中 Cyt 甲基化比例可能高达 30%<sup>[49]</sup>。

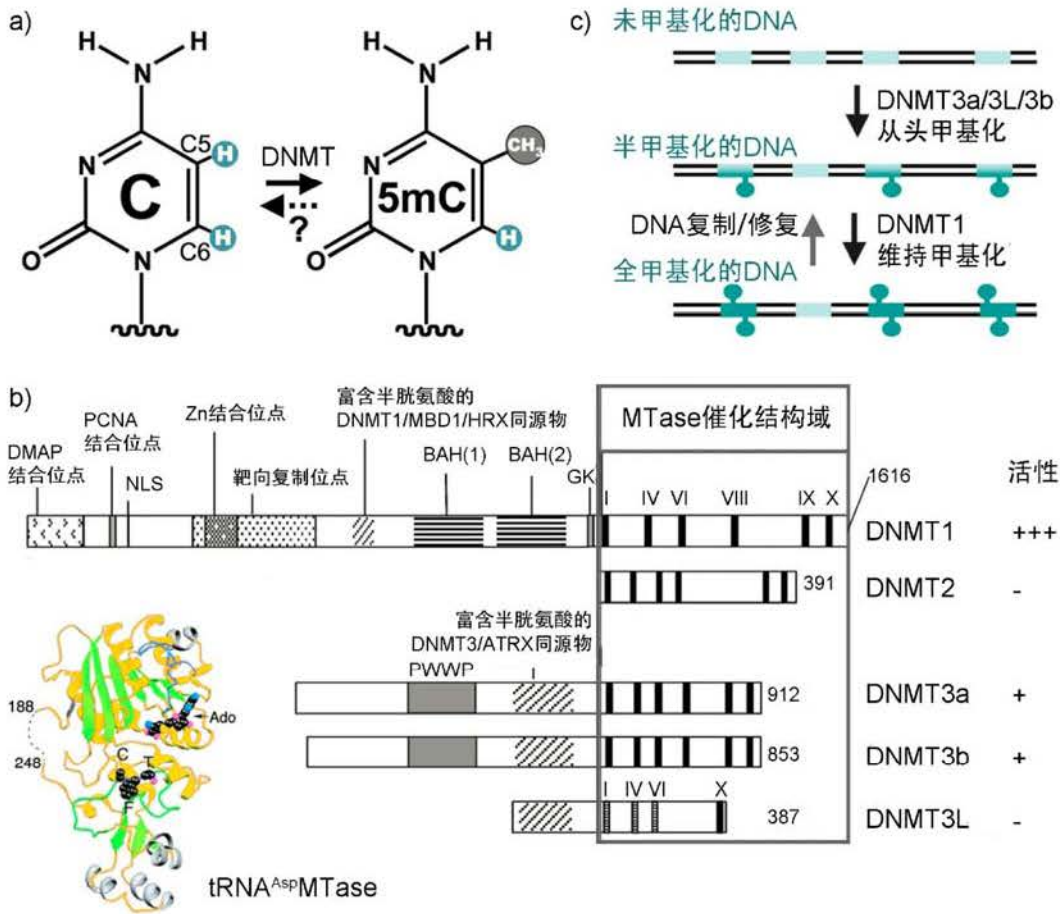


图1.3 DNA甲基化的两种机制<sup>[50]</sup>。(a) 基因组DNA中的Cyt主要依赖DNMT实现甲基化修饰；(b)DNMT有多种亚型(DNMT1、DNMT2、DNMT3a、DNMT3b和DNMT3L)，这些亚型的序列结构和DNA甲基化活性各不相同；(c) 细胞中存在两种DNA甲基化过程，从头甲基化依赖于DNMT3a、DNMT3b和DNMT3L，维持甲基化依赖于DNMT1。

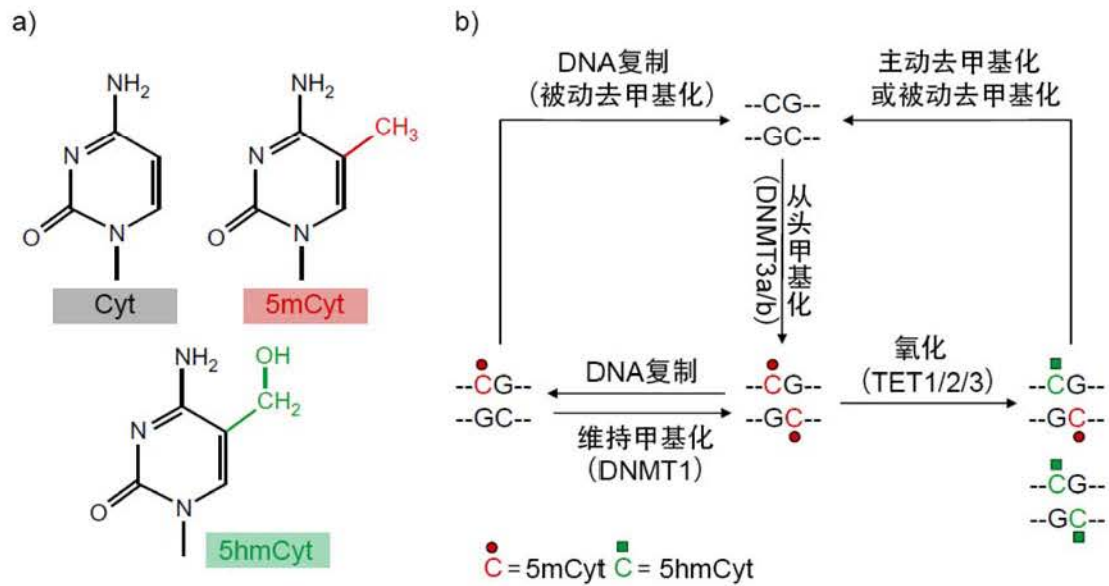


图1.4 5mCyt去甲基化的两种机制<sup>[51]</sup>。(a) Cyt、5mCyt和第六种碱基5hmCyt的结构，5hmCyt与5mCyt的主动去甲基化过程密切相关；(b) 去甲基化的两种机制示意，图左为基于DNA复制的被动去甲基化，图右为基于TET酶氧化的主动去甲基化。

在 Cyt 甲基化的过程中，DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferase, DNMT）会将 S 腺苷蛋氨酸（S-adenosylmethionine, SAM）的活性甲基转移到 Cyt 上，生成 5mCyt 和 S 腺苷同型半胱氨酸（S-adenosylhomocysteine, SAH）<sup>[46]</sup>。细胞中存在两种 DNA 甲基化过程——维持甲基化和从头甲基化，两个甲基化过程由不同种类的 DNMT 催化（图 1.3）<sup>[50]</sup>。第一类维持甲基化过程与 DNA 甲基化在亲代和子代间的遗传密切相关。在 DNA 分子半保留复制的过程中，一半的亲代 DNA 模板链会保留在子代细胞中，此时亲代的模板链上保留着 5mCyt，而新合成的子代 DNA 链则不存在 5mCyt。DNA 复制完成后，DNMT1 会识别亲代模板链中 CpG 序列上的 5mCyt 位点，在子代链的相应位置完成甲基化（图 1.2）。第二类从头甲基化机制中，完全非甲基化的位点也可在某些情况下形成甲基化，这个机制控制的酶是 DNMT3a 和 3b。

细胞中 Cyt 甲基化是一个可逆过程，最近几年的研究发现哺乳动物细胞中 5mCyt 也可通过两种机制发生去甲基化，使基因组 DNA 甲基化程度明显降低（图 1.4b）<sup>[50,52]</sup>。去甲基化机制可在哺乳细胞特定发育时期观察到，如植入前胚胎时期和原生殖细胞<sup>[53-57]</sup>。

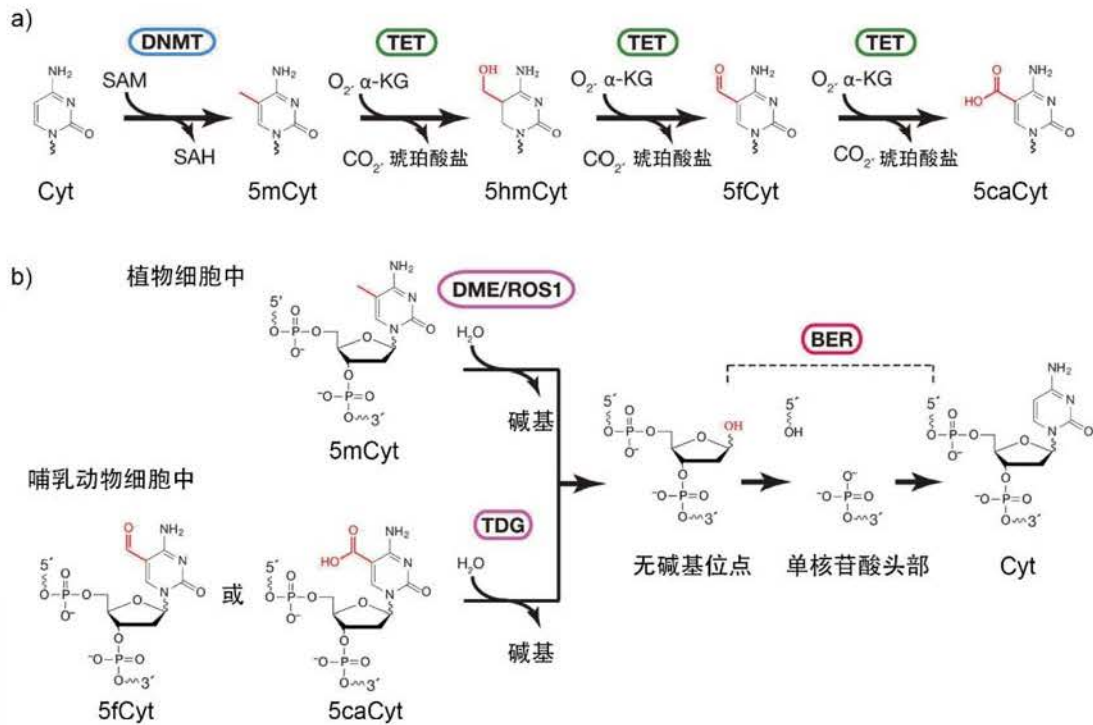


图1.5 基因组DNA主动去甲基化的多种路径<sup>[52]</sup>。(a) 5mCyt可在TET的作用下发生逐步氧化生成5hmCyt、5fCyt和5caCyt，其中5hmCyt可通过抑制DNMT1的活性来促进依赖于DNA复制的被动去甲基化，也可在DNMT3a/DNMT3b的作用下失去羟甲基；(b) 植物细胞中5mCyt可以经由DME/ROS1通路切断形成无碱基位点，之后无碱基位点再经由BER通路恢复为Cyt，哺乳动物细胞中5fCyt和5caCyt可被TDG切断形成无碱基位点，之后无碱基位点再经由BER通路恢复为Cyt，实现主动去甲基化过程。

第一种机制是依赖于DNA复制的被动去甲基化<sup>[58,59]</sup>。上文提到DNA在完成半保留复制后，需要由DNMT1完成子代链的Cyt甲基化过程。被动去甲基化就是DNA完成复制后细胞内缺失活性DNMT1，导致子代细胞甲基化缺失，随着DNA复制不断进行最终导致基因组水平DNA甲基化程度降低。这种机制的一个典型例子是小鼠胚胎细胞在着床前发育过程中母本基因组会发生大规模的5mCyt去甲基化<sup>[60]</sup>。

第二种机制是主动去甲基化<sup>[41,61]</sup>。这一主动机制的发现得益于2009年第六类DNA碱基——5-羟甲基胞嘧啶(5-Hydroxymethylcytosine, 5hmCyt)的发现(图1.4a)<sup>[62]</sup>。Kriaucionis、Heintz和Tahiliani等通过实验证明5hmCyt是由5mCyt氧化得到且这个过程由TET酶(Ten-eleven Translocation, TET)催化<sup>[62,63]</sup>。进一步的研究显示，TET酶还会进一步催化5hmCyt氧化为5-醛基胞嘧啶(5-Formylcytosine, 5fCyt)和5-羧基胞嘧啶(5-Carboxycytosine, 5caCyt)(图1.5a)<sup>[64-66]</sup>。5mCyt氧化为5hmCyt后又通过两种路径实现去甲基化。第一条路径是促进了上述的依赖于

DNA 复制的被动去甲基化, 研究表明 DNMT1 更难识别 5hmCyt 位点, 因而倘若 DNA 复制后亲代链的 5mCyt 被氧化为 5hmCyt 则子代链难以继承 5mCyt 的图谱, 最终导致子代链 5mCyt 缺失<sup>[67, 68]</sup>。第二条路径是主动去甲基化, 研究已发现多条子路径(图 1.5)。5hmCyt 可在 DNMT 的作用下直接失去羟甲基, 恢复为 Cyt<sup>[69, 70]</sup>。5hmCyt 也可进一步氧化为 5caCyt, 5caCyt 可在脱羧酶的作用下脱去羧基恢复为 Cyt<sup>[71, 72]</sup>。5hmCyt 还可发生去氨基化形成 5-羟甲基尿嘧啶(5-Hydroxymethyluracil, 5hmUra), 5hmUra、5fCyt 和 5caCyt 可被切断形成无碱基位点, 之后无碱基位点再经由碱基切除修复(Base Excision Repair, BER) 通路得到修复, 恢复为 Cyt, 最终也实现了去甲基化<sup>[64, 73, 74]</sup>。这一路径已经在小鼠胚胎干细胞发育过程中发现<sup>[64, 75, 76]</sup>。

植物细胞中基因组 DNA 的主动去甲基化机制与哺乳动物细胞并不相同(图 1.5b)。植物细胞基因组中 5mCyt 可以经由 DME/ROS1 (Demeter/Repressor of Silencing 1, DME/ROS1) 通路切断, 形成无碱基位点, 之后无碱基位点再经由 BER 通路得到修复, 恢复为 Cyt<sup>[77]</sup>。

### 1.1.3 DNA 中 5-甲基胞嘧啶的生物学功能

DNA 甲基化之所以能够对表型产生影响并成为表观遗传学的机制, 是因为 5mCyt 可以调控 DNA 表达。研究发现 DNA 中启动子区域的 5mCyt 对许多基因的沉默有决定性作用<sup>[78-82]</sup>。目前已经发现的沉默机制有两种:(1) 基因启动子的 CpG 序列发生甲基化后会抑制转录因子对启动子序列的结合, 从而抑制基因表达<sup>[83]</sup>;

(2) 启动子区域的甲基化 CpG 序列还会吸引并结合细胞中的甲基结合蛋白(Methylated CpG Binding Proteins, MBDs) 和组蛋白去乙酰化酶(Histone Deacetylases, HDACs), 这些转录抑制蛋白会导致基因表达下调(图 1.6)<sup>[84, 85]</sup>。

多数情况下 DNA 甲基化是基因表达抑制的标志, 而一些情况下 DNA 甲基化也可能促进基因表达。基因组中沉默子和隔离子元件发生甲基化时会阻止相关蛋白在 DNA 的结合, 从而阻挡了这些蛋白对基因表达的抑制作用(图 1.6)<sup>[86-88]</sup>。

另外, 5mCyt 还对维持染色体的稳定起到重要作用。一些研究表明当 DNMT1 或 DNMT3b 基因突变导致 DNA 甲基化程度降低时, 染色体会出现非整倍性、断裂、融合等异常现象<sup>[89, 90]</sup>。这说明 DNA 甲基化有着稳定染色体结构的重要作用。

上述 5mCyt 的生物学功能决定了 DNA 甲基化参与了众多重要生物学过程。

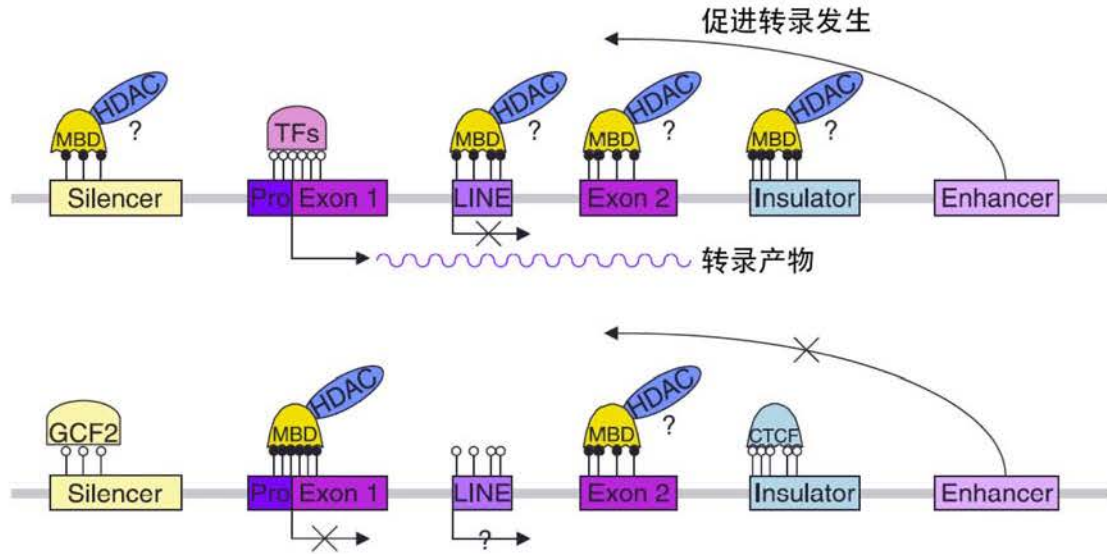


图1.6 DNA甲基化影响基因转录的机制示意图<sup>[78]</sup>。(上图) DNA甲基化促进基因转录的情形。在基因启动子CpG序列未甲基化的情形下,启动子(Pro)可以和转录因子(TFs)结合,促使转录的发生。该情形下,即使基因下游各元件是甲基化的并结合有MBDs和HDACs蛋白,转录依旧可以发生。另一方面,沉默子(Silencer)和隔离子(Insulator) CpG序列发生了甲基化功能得到抑制,因而增强子(Enhancer)可以发挥促进基因转录的功能。(下图) DNA甲基化导致基因沉默的情形。在基因启动子CpG序列发生甲基化的情形下,启动子会和MBDs、HDACs或其他转录抑制蛋白相结合,TFs则无法结合到启动子元件上,导致基因转录受到抑制<sup>[84,85]</sup>。另一方面,Silencer和Insulator元件缺少甲基化修饰,可以结合到相应蛋白发挥抑制转录的作用,如GC结合因子2(GCF2)或者CTC结合因子(CTCF)等蛋白<sup>[87,88]</sup>。

#### 1.1.4 DNA甲基化与疾病、发育和衰老的密切联系

DNA甲基化与癌症有着密切的关系<sup>[36,91-93]</sup>。大量的研究已经证实基因组整体DNA甲基化程度的降低是多种癌症的普遍特征,这意味着癌症发展的过程中发生了大量的5mCyt向Cyt的转变(图1.7)<sup>[36,94,95]</sup>。低甲基化的发生将对癌细胞产生四方面的影响:第一,会导致CpG序列周围基因表达的激活<sup>[96,97]</sup>;第二,会导致基因组DNA错配修复的机制缺失<sup>[98]</sup>;第三,会导致染色体结构的不稳定<sup>[99]</sup>;第四,会导致癌细胞抗药性增加<sup>[100]</sup>。另一方面,抑癌基因的启动子区、同源异形盒基因以及其他一些序列的DNA甲基化程度显著升高也是许多癌症的特征(图1.7)<sup>[101-103]</sup>。上述两个DNA甲基化程度变化的特征可以在多种类型癌症的发展早期观测到,DNA甲基化程度的变化会随着癌症的发展而更加显著,因而这些特征可能成为癌变早期临床诊断或预后治疗的依据<sup>[99,104-107]</sup>。进一步的研究证明癌细胞中DNA整体甲基化程度的降低主要是源于大量DNA重复序列中5mCyt向Cyt的转变,这些重复序列大概占据了整个基因组序列的一半<sup>[104,105,108-110]</sup>。研究发现发生大量去甲基化的机制至少有一部分是通过主动去甲基化过程<sup>[104]</sup>。

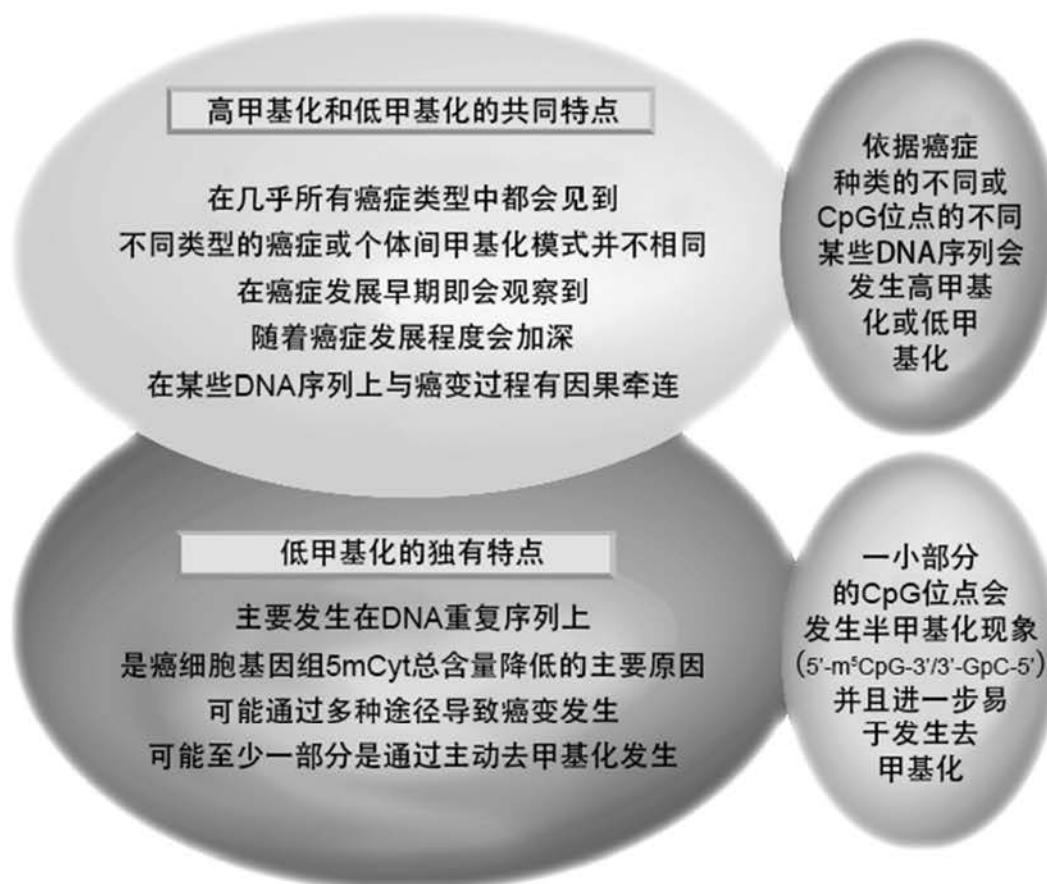


图1.7 DNA甲基化在癌变过程中的变化特点<sup>[104]</sup>。

DNA 甲基化在肥胖症的发展和治疗中也发挥着重要功能<sup>[111, 112]</sup>。饮食中的各类物质如甜菜碱、胆碱、甲硫氨酸、锌元素和叶酸等参与到了甲基供体 SAM 的代谢通路中，因而会对 DNA 甲基化的通路产生影响，进而影响基因表达。例如，如果叶酸摄入缺乏就会导致细胞内 SAM/SAH 的比例降低，从而抑制了 DNA 甲基化过程和 DNMT 的活性。

DNA 甲基化在细胞发育过程中不断在发生变化，对生殖细胞成熟和胚胎发育等过程至关重要<sup>[51, 54-57]</sup>（图 1.8）。在胚胎发育早期，基因组整体 DNA 甲基化会发生重编程。研究表明，受精过程发生后受精卵中来自亲本生殖细胞的基因组 DNA 甲基化整体程度会出现大幅下降，之后在胚胎着床后发育时期整体 DNA 甲基化程度才会逐渐上升，甲基化位点得到重建<sup>[113]</sup>。另一方面，生殖细胞成熟过程中 DNA 甲基化也会发生重编程。研究证明小鼠原生殖细胞在 E7.5 至 E13.5 时期会不断丢失 DNA 甲基化，E13.5 时期的原生殖细胞的 DNA 甲基化程度远远低于体细胞<sup>[114]</sup>。而后形成精子或卵细胞的过程中 DNA 甲基化程度会得到恢复。

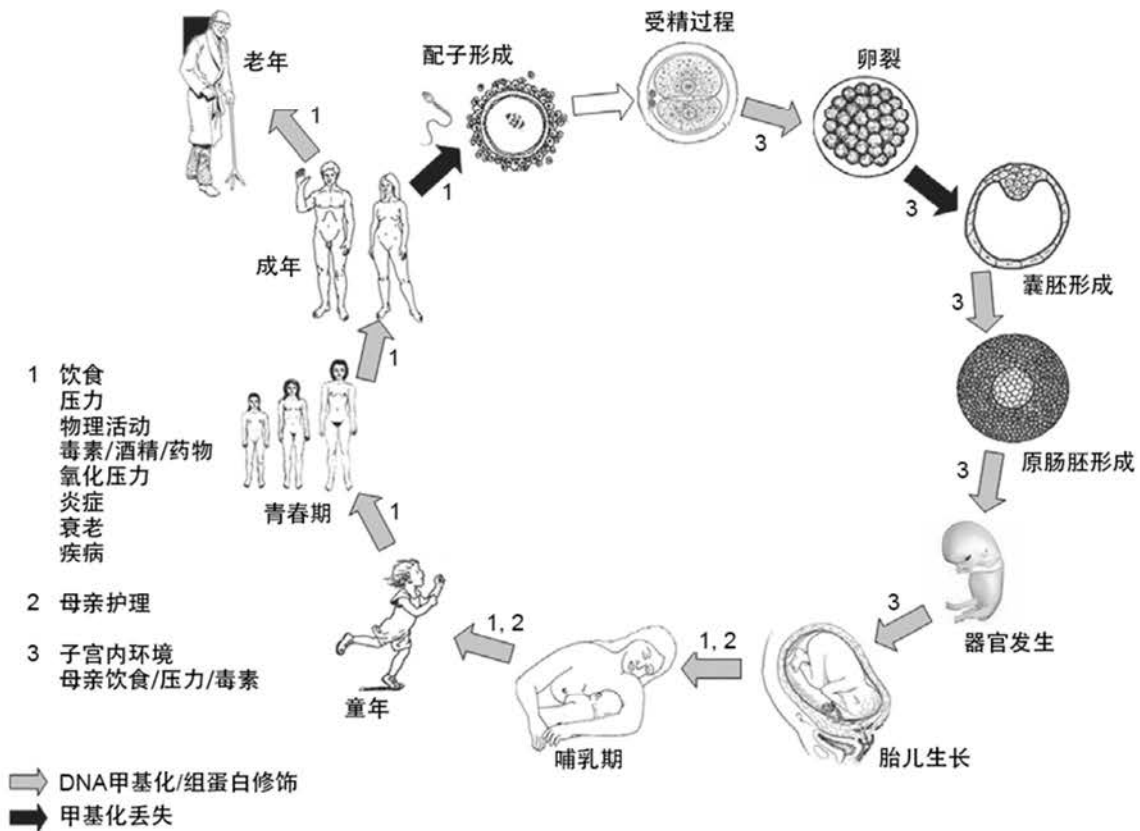


图1.8 人类一生中各个发育阶段细胞基因组DNA甲基化程度的变化<sup>[111]</sup>。

体内实验和体外实验均证实，随着细胞不断衰老，基因组 DNA 甲基化程度呈现整体下降<sup>[115-117]</sup>。年龄增加导致 DNA 去甲基化的机制尚不完全清楚，但已有证据表明可能与 DNMT 活性的降低、一碳代谢通路以及基因组的协同作用有关<sup>[115]</sup>。

## 1.2 DNA甲基化分析方法发展概述

基因组范围的 DNA 甲基化分析方法对于表观遗传学基础研究、癌症等重要疾病的机理研究、疾病的早期诊断和预后至关重要<sup>[118]</sup>。从分析的范围来分类，DNA 甲基化的分析方法分为特定 DNA 位点甲基化分析和全基因组水平的 DNA 甲基化程度分析。对于前者，目前的技术能进行 5mCyt 及其氧化产物 5hmCyt、5fCyt 和 5caCyt 的分析，其他甲基化存在形式还尚未发展出成熟方法。对于后者，主流技术适用于所有甲基化存在形式，包括最近研究较多的 N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤（N<sup>6</sup>-Methyladenine, N6mAde）等。

### 1.2.1 特定DNA位点甲基化分析方法概述

对于特定 DNA 位点是否发生甲基化的 DNA 甲基化分析,过去 20 年一直发展较快,应用也比较广泛<sup>[119]</sup>。相比于 Ade、Thy、Cyt、Gua 四个碱基而言,5mCyt 在聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增的过程中无法和 Cyt 区分,在 DNA 合成酶的作用下 Cyt 和 5mCyt 均是和 Ade 配对,多轮 PCR 扩增后的子链会完全丢失母链的 5mCyt 位点信息,这是 5mCyt 无法通过简单测序技术进行分析的根本原因。因此对特定位点的 5mCyt 分析,关键是通过某种途径将 5mCyt 位点识别出来,使得甲基化的位点可以被后续分析方法读出<sup>[120-123]</sup>。目前较为常用的有三种识别方法:甲基敏感的内切酶法、亚硫酸氢钠还原法以及亲和富集法。

#### 1.2.1.1 甲基敏感的内切酶法

甲基敏感的内切酶法是早期研究中 DNA 甲基化分析的常用方法<sup>[124-127]</sup>。DNA 内切酶是指识别特定 DNA 序列并将其切断的酶。在细菌和古生菌中,某些 DNA 内切酶的活性可以被 DNA 甲基化抑制。换言之,当内切酶所识别的 DNA 序列不含有 5mCyt 时, DNA 分子可以被内切酶所切断,而当该序列中含有 5mCyt 时, DNA 分子则无法被切断。这一机制为检测特定 DNA 位点的甲基化有无提供了一种途径。例如,2013 年 Messerschmidt 等在小鼠胚胎八细胞时期进行了单细胞水平的 DNA 甲基化分析,使用 *Bst*UI 这一内切酶对 6 个感兴趣的 DNA 位点一一进行检测 (图 1.9)<sup>[128]</sup>。当 CGCG 这一序列被甲基化时, *Bst*UI 无法将序列切断,使用 3 个引物进行 PCR 扩增后会有两种长度的 DNA 分子。而当 CGCG 这一序列不含甲基化时, *Bst*UI 将 DNA 切断,此时 PCR 扩增后就只有一种长度的 DNA 分子。通过判断 DNA 分子的长度就可以检测感兴趣 DNA 位点的甲基化信息。研究最终通过一系列分析说明,对于早期胚胎细胞,如果亲代 DNA 甲基化模式没有顺利遗传给子代细胞,将导致生命体嵌合现象的出现。

利用甲基敏感的内切酶法发展起来的成熟 DNA 甲基化分析技术包括限制性标记基因组扫描 (RLGS)<sup>[129]</sup>、甲基化敏感性随机引物法 (MS-AP-PCR)<sup>[130]</sup>、甲基化间区位点扩增法 (AIMS)<sup>[131]</sup>、甲基化 CpG 岛扩增法 (MCA)<sup>[132]</sup>、差异甲基化杂交法 (DMH)<sup>[133]</sup>、连接子介导 PCR 的 *Hpa*II 小片段富集分析法 (HELP) 等等<sup>[134]</sup>。这些方法的发展趋势是能够进行基因组范围的大量 DNA 位点甲基化分析。内切酶法是最早被研究者发展起来的 DNA 甲基化分析方法,具有很高的灵敏度和较低的 DNA 样品需求量,至今仍有不少研究使用这一技术。但这一方法的局限性在于内切酶的识别序列是有限的,对于无法被现有内切酶识别的 DNA 序列而言,其甲基化信息无法被该技术识别。

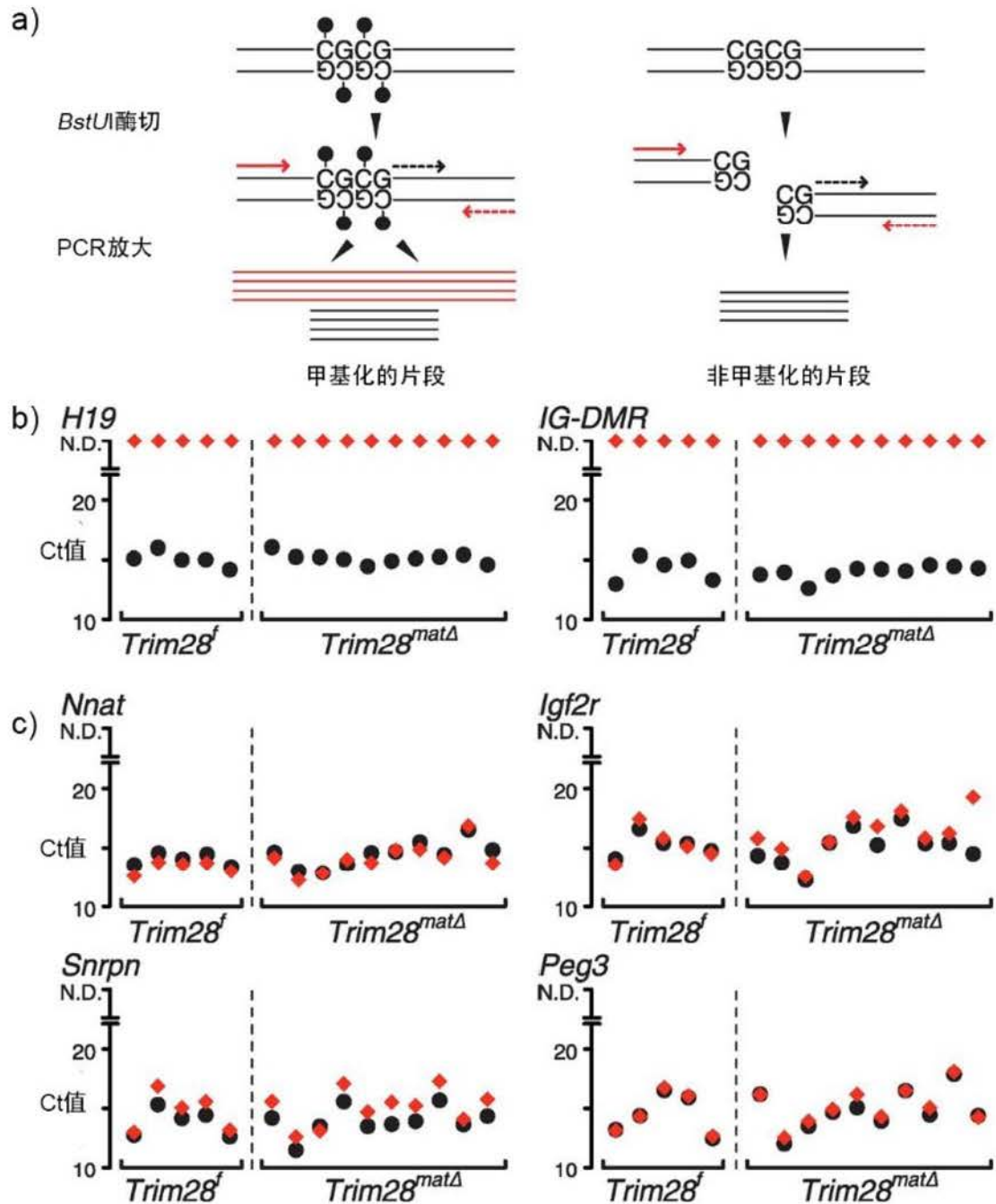


图1.9 将甲基敏感的内切酶法与定量PCR技术相结合，可以实现单细胞水平的特定基因DNA甲基化分析<sup>[128]</sup>。(a) 甲基敏感内切酶*Bst*UI进行特定位点甲基化分析的原理示意图。其中黑点代表甲基化位点，可以抑制*Bst*UI的酶切活性，进而PCR扩增后可得到一长一短两段DNA。如果序列不含有5mCyt则会被*Bst*UI切断，扩增后仅得到一段短DNA；(b) 运用这一原理对胚胎细胞的父本基因*H19*和*IG-DMR*进行分析。红点代表长DNA片段的Ct值，Ct值无限大代表未检出该片段，黑点代表短DNA片段的Ct值，测定到了Ct值说明该片段被检出。结果证明两个基因均未被甲基化 (c) 运用相同原理对胚胎细胞的母本基因*Nnat*、*Igf2r*、*Snrpn*、*Peg3*进行分析。长片段均被检出，证明四个基因均被甲基化。

### 1.2.1.2 亚硫酸氢钠还原法

亚硫酸氢钠还原法是最近 20 年发展较快的 DNA 甲基化分析方法，现在已经成为进行单碱基分辨率 DNA 甲基化分析的黄金方法<sup>[135]</sup>。这一方法的建立最早源于上世纪 90 年代一个重要化学反应的发现，即 Cyt 可以与亚硫酸氢钠发生还原反应，再经由一步去氨基化和一步脱磺酸化作用转化为尿嘧啶 (Uracil, Ura)<sup>[136, 137]</sup>。5mCyt 虽然也可以发生类似反应，但是反应速率远远小于 Cyt。通过控制反应条件可以使得 DNA 中所有 Cyt 转变为 Ura，而 5mCyt 不发生转化。此后再通过 PCR 对转化后的 DNA 链进行扩增，由于 Ura 会与 Ade 发生配对，5mCyt 与 Gua 配对，扩增的结果是子代 DNA 链中 Cyt 转变为 Thy，5mCyt 转变为 Cyt (图 1.10)。之后再结合探针技术或测序技术确定原序列中 5mCyt 的位点。早期研究中，亚硫酸氢钠还原法与 Sanger 测序法相结合能获得单碱基分辨率的 DNA 甲基化信息<sup>[138]</sup>。经过多年的发展，亚硫酸氢钠还原法已经可以实现基因组范围的大量 DNA 位点分析，具体的方法包括亚硫酸氢钠甲基谱分析法 (BiMP)<sup>[139]</sup>、简化代表性重亚硫酸盐测序法 (RRGS)<sup>[140]</sup>、MethyLight 法<sup>[110]</sup>、亚硫酸氢盐转化、捕获与测序法 (BC-seq)<sup>[141]</sup>、全基因组鸟枪亚硫酸氢钠测序法 (WGSBS) 等等<sup>[142]</sup>。尽管亚硫酸氢钠还原法是进行 5mCyt 分析的黄金方法，对任何 DNA 序列均适用，但是这一技术步骤复杂，价格较为昂贵。

近几年随着 5hmCyt、5fCyt 和 5caCyt 的相继发现，研究者对这几类 DNA 甲基化氧化产物的特定位点分析方法非常关注。芝加哥大学的何川等对亚硫酸氢钠还原法做了改进，引入了有机化学中的基团保护的想法，从原理上实现了特定位点 5hmCyt、5fCyt 和 5caCyt 的检测，在这方面发表了许多颇有影响力的工作<sup>[143-147]</sup>。

### 1.2.1.3 亲和富集法

进行特定位点 DNA 甲基化分析的第三类方法是亲和富集法。亲和富集法是使用 5mCyt 的抗体或者使用对甲基有亲和作用的蛋白质来进行 DNA 甲基化的基因组分析，因此对各种 DNA 序列均适用，但相对于亚硫酸氢钠还原法而言无法对 CpG 甲基化和非 CpG 甲基化进行区分。常见的做法是使用 5mCyt 的抗体来免疫共沉淀甲基化的基因组 DNA，然后使用探针或测序技术对沉淀得到的 DNA 做分析。目前发展出的成熟技术是甲基化 DNA 免疫共沉淀法 (MeDIP) 等<sup>[148]</sup>。

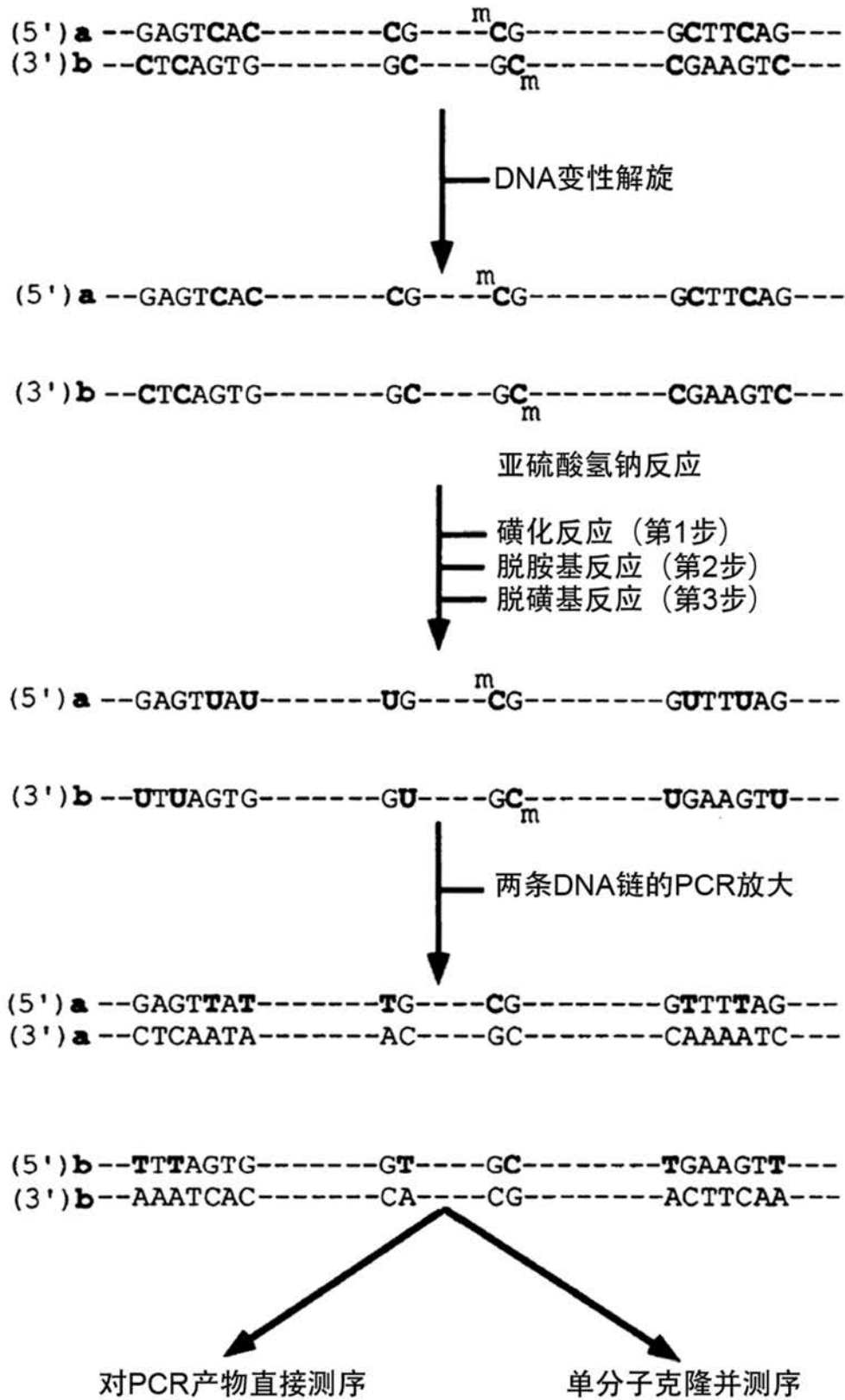


图1.10 亚硫酸氢钠还原法的原理示意图<sup>[137]</sup>。

## 1.2.2 全基因组水平的DNA甲基化程度分析方法概述

全基因组的 DNA 甲基化程度分析就是测定基因组内某种甲基化碱基(5mCyt、5hmCyt、5fCyt、N6mAde 等等)的总量,而不考虑具体 DNA 甲基化的位点。主流技术包括高效液相色谱-质谱联用技术、气相色谱-质谱联用技术、高效液相色谱-光谱联用技术、毛细管电泳技术、免疫介导技术等多种。

### 1.2.2.1 高效液相色谱-质谱联用技术

目前最主流的全基因组 DNA 甲基化程度分析方法是高效液相色谱-质谱联用技术(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS),它具有强定量能力,高选择性和高灵敏度的优点<sup>[149-158]</sup>。基本策略通常是对 DNA 进行水解,使 DNA 分子分解为核苷或碱基的单体分子,再经由 HPLC-MS 分析后根据色谱峰面积确定各单体分子的含量。运用 HPLC-MS 技术进行基因组整体范围的 DNA 甲基化检测,仅需要掌握各个甲基化产物质谱峰的质荷比以及二级谱的出峰信息,因此适用于所有 DNA 甲基化存在形式。质谱技术具有不需标记、同时测定多种 DNA 甲基化产物以及定量的优势,因此最近几年受到了研究者的关注。尤其近几年新的 DNA 甲基化存在形式的重大发现主要是依赖于质谱方法,如 5hmCyt 存在的确认、N6mAde 存在的确认等等<sup>[62, 159]</sup>。按照样品前处理过程中 DNA 水解策略的不同可分为酸解方法、酶解方法和衍生化方法三大类。

第一类酸解方法中, DNA 分子直接在较高温度下与甲酸反应,反应条件较为剧烈,因而碱基分子直接从 DNA 分子上解离下来。之后由质谱检测其中 Cyt、5mCyt、5hmCyt 等碱基的信号强度,计算 DNA 甲基化程度<sup>[151-153]</sup>。蔡春等在 DNA 酸解前增加了亚硫酸氢钠还原过程和 PCR 流程,之后再对 PCR 产物进行 HPLC-MS 分析,从而实现了特定 DNA 区域的 DNA 含量分析(图 1.11)<sup>[154]</sup>。

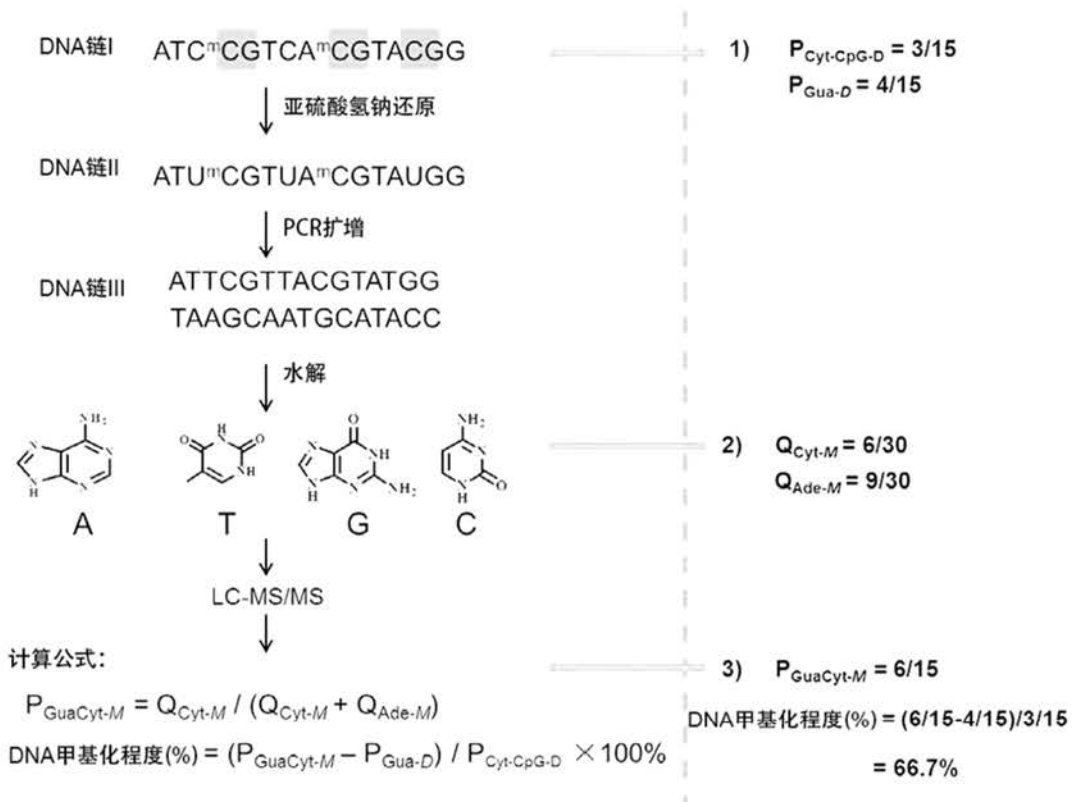


图1.11 基于DNA酸解反应和HPLC-MS技术的全基因组DNA甲基化程度分析方法与亚硫酸氢钠还原法相结合，实现了特定区域的DNA甲基化程度分析<sup>[154]</sup>。

第二类酶解方法中，DNA 分子的前处理反应条件相对温和。首先，DNA 分子解旋为单链，再酶解为单核苷酸，之后单核苷酸的磷酸基团被进一步酶解生成核苷。色谱分离后由质谱检测其中 2'-脱氧胞苷（2'-Deoxycytidine, dC）和 5-甲基-2'-脱氧胞苷（5-Methyl-2'-deoxycytidine, 5mdC）的信号强度，进而计算 DNA 甲基化程度<sup>[155-158]</sup>。相比于 Cyt 和 5mCyt，dC 和 5mdC 在二级质谱（MS<sup>2</sup>）中拥有更高的灵敏度，因而可以实现更低的检出限。最近几年有很多研究进一步提高了质谱的灵敏度，以发现 DNA 甲基化的更多存在形式。2015 年中科院生态中心的汪海林等与其他课题组合作在《Cell》发文报道第一次用高分辨 HPLC-MS 技术确定了线虫基因组 DNA 中 N6mAde 的存在<sup>[159]</sup>。这一发现有赖于其课题组之前在 HPLC-MS 高灵敏度 DNA 甲基化检测方面的工作积累<sup>[160-162]</sup>。同时在这篇文章中作者报道线虫基因组中发现了与 TET 酶类似的基因，这意味着线虫细胞中存在着与 TET 酶类似的蛋白来催化 N6mAde 发生去甲基化。由于线虫 DNA 中尚未发现 5mCyt 的存在，因此去甲基化很可能发生在 N6mAde。这样的发现进一步暗示线虫基因组 DNA 中有可能存在着 N6mAde 的氧化形式，但这些新的 DNA 存在形式的发现可能需要更高灵敏度的质谱技术才能确认。

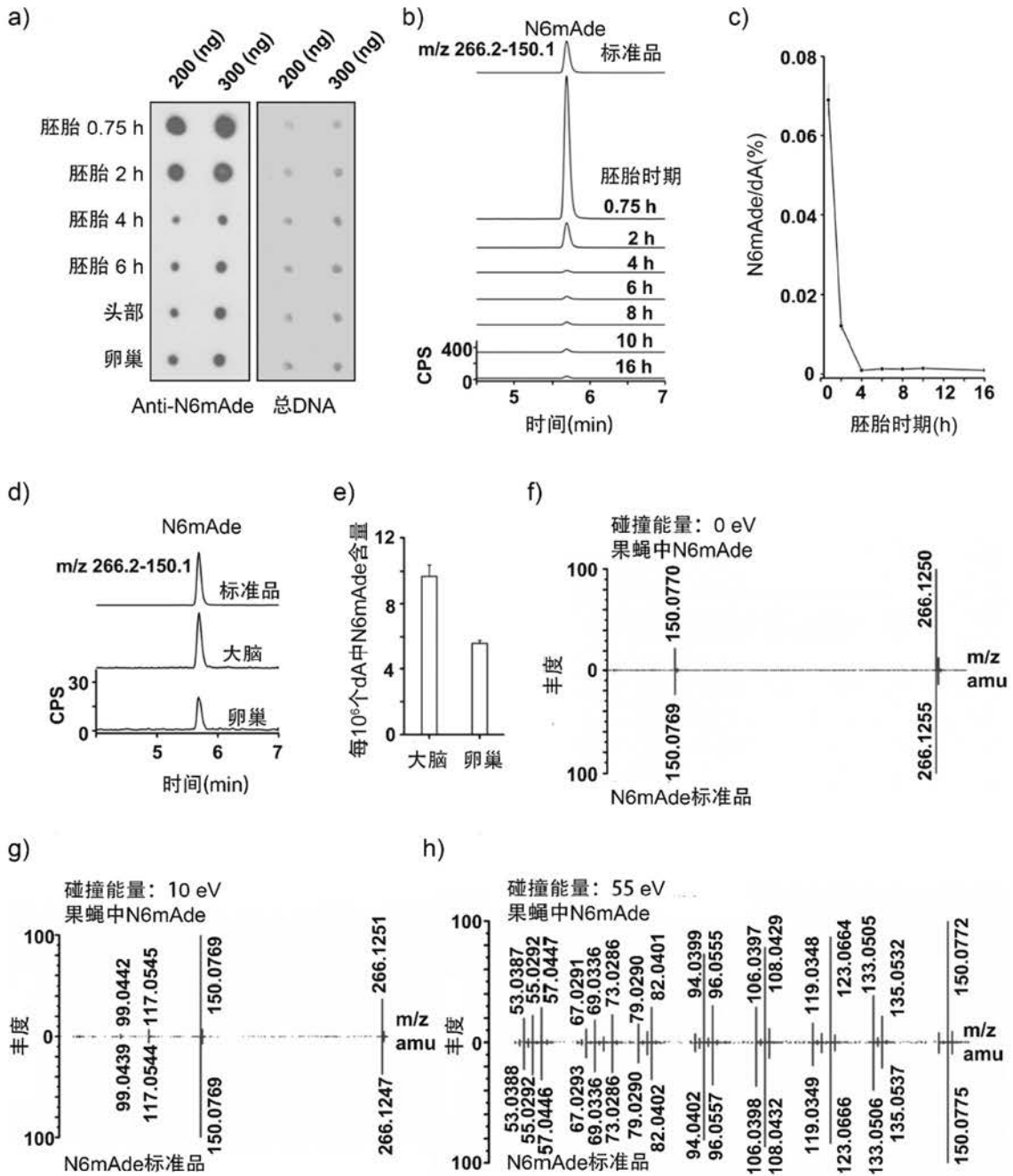


图1.12 运用高分辨的HPLC-MS技术确认了线虫基因组中N6mAdA的存在，并对其进行了定量<sup>[159]</sup>。(a)提取了线虫胚胎和成年时期的细胞基因组DNA，图左使用特异性的N6mAdA抗体进行染色，图右使用亚甲基蓝对DNA总量进行染色；(b-e)使用UHPLC-MRM-MS/MS技术对胚胎时期的和成年时期的基因组DNA中N6mAdA进行定量；(f-h)将胚胎时期细胞提取DNA中N6mAdA的MS<sup>2</sup>谱图与标准对照品的MS<sup>2</sup>谱图做对比。

前两类方法是使用 HPLC-MS 对 DNA 的水解产物直接进行分析，尽管 HPLC-MS 的灵敏度很高，但是对于少量样品的 DNA 甲基化分析，或者含量较低的 DNA 甲基化存在形式的分析仍不能达到足够的灵敏度。而在第三类衍生化方法中，研究

者们通过衍生化反应在 DNA 水解产物上添加离子化效率较高的基团,从而提高了待测物的离子化效率,进而能够实现 HPLC-MS 技术对 DNA 甲基化更高灵敏度的分析<sup>[163, 164]</sup>。武汉大学袁必锋等擅长用衍生化技术结合 HPLC-MS 来提高 DNA 甲基化产物的检测灵敏度<sup>[163, 164]</sup>。他的一项研究中发展了一种对于 5mdC、5hmdC、5fdC、5cadC 均适用的衍生剂——2-溴-1-(4-二甲氨基苯基)-乙酮 (2-bromo-1-(4-dimethylamino-phenyl)-ethanone, BDAPE), 使用 BDAPE 对 DNA 酶解产物进行衍生后,相比于衍生前 HPLC-MS 的检出限分别提高了 35、93、89 和 123 倍(图 1.13)<sup>[163]</sup>。他最近的研究中将衍生化技术用于了 RNA 甲基化的研究,发展了一系列衍生剂,将衍生化反应与 HPLC-MS 技术相结合证明了 RNA 中 5mCyt、5hmCyt、5caCyt 及其它一些甲基化存在形式,拓展了表观遗传学中有关 RNA 甲基化的认识<sup>[165-167]</sup>。

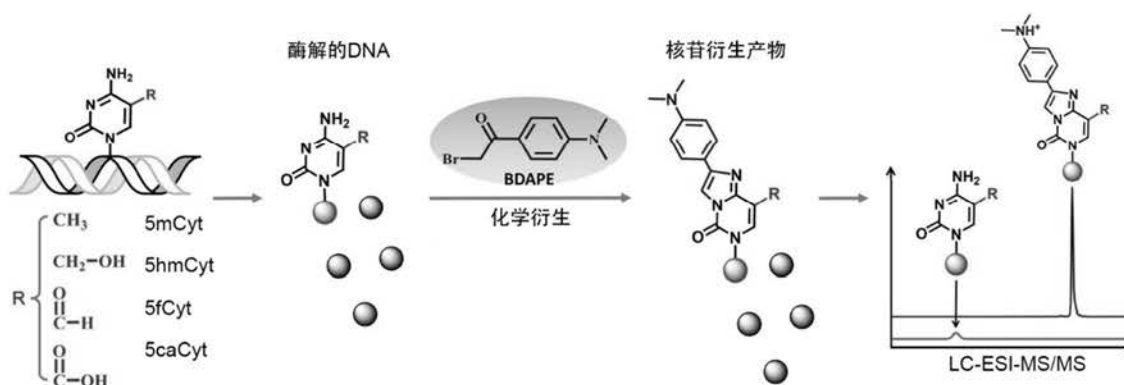


图1.13 使用衍生剂BDAPE对5mdC、5hmdC、5fdC和5cadC进行衍生化反应, HPLC-MS的灵敏度可大大提高<sup>[163]</sup>。

### 1.2.2.2 气相色谱-质谱联用技术

气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) 也已经被用于基因组 DNA 甲基化程度分析<sup>[168-170]</sup>。相比于 HPLC 技术, GC-MS 的分离效果较好, 不过缺点在于需要在 GC-MS 进样前将分析物转化为可挥发性的衍生物。一般而言分析前 DNA 会先被酸解为碱基, 反应条件与 1.2.2.1 节中介绍的酸解方法相似。可用的衍生剂有 TBDMS、BSTFA、MTBSTFA 等等<sup>[168-170]</sup>。

### 1.2.2.3 高效液相色谱-光谱联用技术

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 还可以与 UV 等光谱检测器串联进行基因组 DNA 甲基化程度分析<sup>[171-175]</sup>。相比于上述基于质谱的技术而言较为便宜, 同样具有重复性好、定量等力强的优点, 但灵敏度稍逊于质谱技术<sup>[171-175]</sup>。因此通常情况下使用液相色谱-光谱联用技术时需要较大量的 DNA

样品 (1-50  $\mu\text{g}$  DNA)。有一些研究对这一技术进行了改进,提高了检测灵敏度。如 Wrobel 等使用 2-溴苯乙酮对 Cyt、5mCyt、dC 和 5mdC 进行衍生化,在待测物分子上添加了一个荧光标签<sup>[169]</sup>。运用这一方法可以大大提高这些待测物的检测灵敏度,仅需要 80 ng DNA 就可以实现检出。

#### 1.2.2.4 毛细管电泳技术

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 也是进行基因组 DNA 甲基化程度分析的常用技术,可以和 UV、LIF 等多种检测器联用<sup>[176-178]</sup>。它的优点在于操作简单、分辨率高,是一种高效进行 DNA 甲基化程度分析的定量技术。但局限性在于重复性不佳,容易受到外界条件干扰,技术还有待进一步优化。

#### 1.2.2.5 免疫介导技术

免疫介导技术是一种快速进行 DNA 甲基化程度分析的方法,在基础研究中也有广泛应用<sup>[62, 159, 179]</sup>。基本原理是使用可以特异性结合甲基化的抗体识别甲基化位置,然后通过染色或者荧光等技术测定甲基的含量。例如 1.2.2.1 节中提到的线虫基因组中 N6mAde 的发现工作中,有一项数据就是使用特异性结合 N6mAde 的抗体染色确认了 N6mAde 存在,并显示了其含量在不同发育时期的变化,与质谱得到的数据可以相互佐证 (图 1.12a) <sup>[159]</sup>。

### 1.3 基于质谱的DNA甲基化分析方法研究所面临的挑战

如前所述, HPLC-MS 技术因其良好的选择性和定量能力,成为了进行基因组 DNA 甲基化程度分析的主流技术,已经在基础科学研究中得到广泛应用。但是目前基于质谱的 DNA 甲基化分析方法的研究仍面临以下三方面的挑战:

首先,基于 HPLC-MS 的 DNA 甲基化分析技术对 DNA 样品的需求量较大,以人类细胞为例,一次 HPLC-MS 测试通常需要  $10^6$  个细胞。然而在很多基础研究和临床检测情形下,样品量无法达到这样一个量级,这就对分析检测造成了困难。例如, DNA 整体甲基化程度的降低是癌变早期的普遍性标志,因此 DNA 甲基化程度的变化可以作为癌症早期诊断和预后评价的重要指标。然而,实际临床运用中,从癌症病人提取的癌细胞数目非常有限,如 10 毫升血液中循环肿瘤细胞 (CTCs) 的总量至多只有 100 个左右,细针穿刺取样大约也只能取到 1000 个左右的病灶细胞<sup>[180]</sup>。如何通过有限的细胞样品测定 DNA 甲基化程度信息就显得尤为重要。再比如,表观生物学研究对干细胞进行测试,提取到的细胞总量也常常是非常有限的。例如 2017 年《Nature》上一项工作研究了抗坏血酸对小鼠造血干细胞的影响,发

现抗坏血酸的缺失导致 TET 酶活性降低, 进而导致基因组 5hmCyt 和 5mCyt 比例变化, 促使了白血病患病风险升高<sup>[180]</sup>。在这项工作中进行一次基因组 5hmCyt 和 5mCyt 含量测定使用了  $5 \times 10^6$  个小鼠骨髓细胞, 这些小鼠细胞取自大量的小鼠。这样的工作无疑是工作量巨大且耗时的, 且淹没了小鼠个体之间的差异。如果能够发展出取样量少的质谱技术, 对于类似的研究将是很大的助力。

其次, 目前基于 HPLC-MS 的 DNA 甲基化主流分析方法均耗费大量时间且步骤繁琐, 无法满足临床对快速方法和高通量的要求。尤其是使用衍生化方法进行 HPLC-MS 测定前, 衍生化反应要耗费数个小时。建立测试速度更快的质谱技术对于推进 DNA 甲基化在临床实际中的应用意义很大。

最后, 近几年新的 DNA 修饰形式的发现很大程度上依赖于 HPLC-MS 技术的发展。5hmCyt、N6mAde 的逐渐发现得益于 HPLC-MS 技术灵敏度的提高。种种证据表明, 细胞基因组 DNA 中的修饰形式不止于目前已发现的 5mCyt、5hmCyt、N6mAde 这几种。尚未被人类发现的新的 DNA 修饰形式在基因组中含量会更低, 这就需要研究者不断提高 MS 的灵敏度, 以测定这些含量更低的未知 DNA 修饰形式。

#### 1.4 本论文的主要内容

针对 1.3 节中提到的目前基于质谱的 DNA 甲基化分析方法所面临的挑战, 本文从三个角度提出了解决方案, 研究了三种不同的基于纳升电喷雾离子源质谱 (Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry, NanoESI-MS) 的 DNA 甲基化程度分析方法, 具体内容如下:

论文第二章介绍了一种基于 NanoESI-MS 的能够检测 100 个人类细胞 DNA 甲基化程度的方法。该方法核心创新点是将 DNA 酸解前处理反应在 NanoESI 的喷针中进行, 之后直接进行 NanoESI-MS 检测。在线的样品前处理大大减少了样品稀释, 从而减少了样品的需求量, 这一优势为 DNA 甲基化的基础研究和临床检测应用提供了便利。本章研究首先使用群体细胞样品印证了正常的乳腺细胞系 MCF10A 和乳腺癌细胞系 MCF7 的基因组 5mCyt 含量的显著性差异, 因而 DNA 甲基化程度可以作为区分稀有癌细胞和正常细胞的方法。然而传统的 HPLC-MS 检测通常需要大约  $10^6$  个细胞的样品, 这样的样品量需求在实际临床应用中无法满足。本章研究的基于在线样品前处理和 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化分析方法样品量大大缩减, 能够应用于 100 个 MCF7、MCF10A、HepG2 和 HeLa 细胞的检测, 因而可以成为判定少量分离细胞是否为癌细胞的潜在分析方法。这一方法可以在 2 小时内区分 MCF10A 和 MCF7 细胞的 DNA 甲基化差异, 有潜力为临床应用提供

可靠信息。

论文第三章介绍了一种基于小体积快速衍生化和 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化程度快速分析方法。前人研究报导 BDAPE 是一种适用于所有 Cyt 甲基化类型的衍生剂,可以提高 dC、5mdC 等在 HPLC-MS 中的离子化效率和检测灵敏度,但衍生化反应冗长耗时。本章研究发现 BDAPE 对 dC 和 5mdC 的衍生化反应可以在小体积反应体系下得到大幅度的反应加速。常量反应体系下 BDAPE 衍生化反应需要加热进行 6 小时,而在室温下的气动喷雾液滴中可以在 1 分钟内完成。并且,小体积反应模式下反应物浓度在不断浓缩, BDAPE 所需浓度远远小于常量反应,从而减小了衍生剂本身对 NanoESI-MS 检测的干扰。将小体积衍生化反应和直接的 NanoESI-MS 检测相结合,本章对 HeLa、A549、MCF10A、MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-468 这 6 种细胞系的 DNA 甲基化程度进行了分析。由于采用了小体积快速反应的策略并省去了色谱分离的步骤,这一方法相较于前人的 HPLC-MS 技术分析时间大大缩短,更适用于实际临床应用。

论文第四章介绍了一种基于离子重复富集技术和 NanoESI-MS 的单细胞水平 DNA 甲基化程度分析方法。本章研究的核心创新点是使用离子阱多次富集离子,从而提高了商品化离子阱质谱仪的检测灵敏度。研究对商品化的离子阱质谱进行了改造,改变扫描函数使离子阱可以重复多次的富集某一特定质荷比的离子,实现了对低浓度离子的富集,包括 Cyt、5mCyt、5hmCyt、N6mAde 在内的多类型的离子检测灵敏度可提高 3-22 倍。通过应用这一技术,本研究实现了对 0.2 个 MCF7 单细胞水平的基因组 Cyt 和 5mCyt 含量的检出。与其他分离技术联用,离子重复富集技术不仅在单细胞分析领域有广阔应用前景,而且有潜力应用于未知 DNA 修饰类型的发现。

## 第 2 章 在线酸解-质谱法分析稀有癌细胞的 DNA 甲基化程度

### 2.1 本章引言

在癌症预后、恶性肿瘤早期诊断以及抗癌药物评估等领域,从大量正常细胞中提取和识别稀有癌细胞的技术显得越来越重要,如从骨髓中提取分散肿瘤细胞的技术,以及从外周血中富集循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)的技术等等<sup>[181-184]</sup>。对于某一种特定类型的肿瘤细胞而言,使用器官特异性的抗原来富集癌细胞是一种具有特异性的方法,但对于在癌变早期未知类型的癌细胞,器官特异性的抗原可能会导致假阴性的结果<sup>[185, 186]</sup>。另一种策略是使用表皮抗原或类似标记物来分离癌细胞,但是这些标记物并非癌症特异性的,有可能会产生假阳性的结果<sup>[185]</sup>。比如,从血液中分离和计数 CTCs 的商品化方法通常使用表皮抗原<sup>[187, 188]</sup>。但是在这个方法中 CTCs 并不能和循环非癌表皮细胞有效分离,因为这些非癌的表皮细胞同样在细胞表面表达表皮抗原,细胞大小和密度与 CTCs 相当,并且也有可能存在于血液中循环<sup>[183, 185, 189-191]</sup>。简而言之,由于缺少一种在所有癌细胞中都表达却不在任何正常组织中表达的生物标记物,使用免疫学方法特异性分离稀有癌细胞仍是一个尚未解决的问题。

基因组 DNA 的 Cyt 甲基化是一种常见的表观遗传学修饰,与癌变等多种生物学过程均有关联<sup>[104, 108, 192-201]</sup>。很多研究显示许多癌症都会普遍性的出现整体 DNA 甲基化程度的改变<sup>[104, 108, 194, 196]</sup>。这个现象可以在癌变早期观察到,并且随着癌变加深或恶性程度的变化而有所加大<sup>[104]</sup>。这种整体 DNA 甲基化程度的变化可以作为判断几乎所有类型细胞癌变与否的标准,进而可以在知晓癌症类型之前判定分离细胞是否为癌细胞。

然而, DNA 甲基化很少用于临床诊断,因为用 DNA 甲基化程度来区分癌细胞和正常细胞仍然面临几个挑战。首先,癌细胞的数量通常非常少,尤其是在癌变早期。以 CTCs 为例,人类血液中癌细胞数目非常有限,平均下来每毫升全血中大约有 1-10 个细胞<sup>[202]</sup>。如此少的细胞数目并不能为传统的 DNA 检测方法提供足够的样品量,例如 HPLC-MS 的方法、免疫学方法通常需要微克级的 DNA<sup>[156, 177, 179]</sup>。其次,目前的整体 DNA 甲基化程度的分析方法通常耗时耗力,并不适用于癌症快速的临床检测。因为为了得到足够量的纯 DNA,通常需要若干繁琐的样品前处理步骤。因此,从病人体内分离的如此少的癌细胞数量,以及对临床检测的快速需求都要求研究者建立一种灵敏、快速且方便的 DNA 甲基化分析方法,这种方法须能

够分析如此少量细胞样品的DNA甲基化程度。

本章研究了一种基于NanoESI-MS的灵敏快速的DNA甲基化检测方法,该方法可以通过检测100个细胞平均基因组DNA甲基化程度的不同来区分稀有癌细胞和正常细胞。将该方法与传统的稀有癌细胞富集技术相结合可以避免传统免疫学方法中假阳性结果的产生,从而为早期癌细胞的临床诊断提供可靠信息。

## 2.2 实验部分

### 2.2.1 仪器与材料

Cyt和5mCyt标准品、甲醇、乙醇、2-丙醇和乙腈均购买于Sigma-Aldrich公司。分析纯的乙酸购买于北京化工厂。实验中使用的纯水是由ThermoFisher公司的纯水机纯化得到。HepG2、HeLa、MCF10A细胞购买于国家实验细胞资源共享平台。MCF7细胞购买于ABGENT公司。细胞培养所用的培养基、胰蛋白酶-EDTA、DPBS、PBS缓冲液等购买于Corning公司。anti-EpCAM-FITC抗体购买于Miltenyi生物技术公司。

用于NanoESI-MS喷针的毛细管大约5cm长,毛细管针尖直径约2 $\mu$ m。这些毛细管是使用拉制仪由标准化的硼玻璃管拉制而成。硼玻璃管长度10cm,外径1.0mm,内径0.59mm,购买自Vitalsense公司。拉制仪是由SUTTER仪器公司研制的P-2000型号仪器,拉制参数为Heat = 300, Fil = 5, Vel = 30, Del = 128, Pul = 70。

### 2.2.2 细胞培养与收集

MCF7、HepG2和HeLa细胞培养于含有10%FBS和1%双抗的DMEM培养基中。MCF10A细胞含有5%马血清、10 $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup>胰岛素,20mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>表皮生长因子,100ng $\cdot$ L<sup>-1</sup>霍乱毒素和1%双抗的DMEM/F-12(1:1)培养基中。四类细胞的培养箱环境均为37 $^{\circ}$ C,含有5%CO<sub>2</sub>。当收集细胞时,移去细胞培养基,在生长有10<sup>6</sup>个细胞的6cm培养盘中加入1mL胰蛋白酶-EDTA溶液。室温下3分钟孵育后,1mL的细胞悬液转移至1.5mL小管中。2000rpm离心10分钟后移去含有胰蛋白酶的上清液。

### 2.2.3 群体细胞的DNA甲基化程度测定

收集到的MCF10A和MCF7细胞用1mL0.9%NaCl溶液重悬。从细胞悬液中吸取0.5–1.0 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞转移至一个新的离心管。2000rpm离心10分钟后移去含

有 NaCl 的上清液。在离心管中加入 1 mL 甲酸重悬细胞。将所有悬液转移至一个新的 1.5 mL 玻璃瓶中。整个玻璃瓶放入马弗炉 140 °C 下反应 1.5 小时。反应结束后残余的甲酸在 60 °C 真空干燥箱中蒸干直到酸解物完全挥发。重新加入 1 mL 甲醇萃取其中的 Cyt 和 5mCyt。之后样品直接进样到商品化的 ESI-MS 质谱仪中 (Orbitrap 质谱仪, 型号 Q-Exactive, Thermo Scientific 公司) 进行测定。DNA 甲基化程度通过一级质谱中 [Cyt + H]<sup>+</sup> 和 [5mCyt + H]<sup>+</sup> 的强度经过校正计算。

#### 2.2.4 MCF10A细胞和MCF7细胞的荧光免疫染色

MCF10A 细胞和 MCF7 细胞的荧光免疫染色流程主要参考了抗体生产厂家的说明书, 有少许修改。具体而言, 收集到的 MCF10A 或 MCF7 细胞分别使用 1 mL DPBS 重悬并计数。根据细胞悬液中两种细胞的浓度配制了 1:1 的 MCF10A 细胞和 MCF7 细胞的混合悬液。之后 MCF10A、MCF7 和两类细胞的混合悬液在 2000 rpm 下离心 10 分钟移去上清液。三个样品中的细胞用 100 μL 的含有 0.5% BSA 和 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 PBS 缓冲液重悬。之后加入 10 μL anti-EpCAM-FITC 抗体溶液混匀。混合细胞悬液放入 4 °C 的冰箱中孵育了 10 分钟, 之后加入 1 mL 前述的缓冲液停止反应。2000 rpm 离心 10 分钟, 彻底移去上清液。染色后的细胞沉淀用适当体积的 DPBS 稀释, 之后加到载玻片上进行荧光显微镜成像观察 (Olympus IX81 confocal 显微镜)。

#### 2.2.5 毛细管内少量细胞的酸解及DNA甲基化测定

收集的细胞用水稀释至每毫升  $1 \times 10^5$  个细胞。将上述细胞悬液 1 μL 注入到毛细管尖端, 在其后加入 15 μL 的乙酸至毛细管中。之后将毛细管尾端用玻璃胶封口。将整根毛细管置于马弗炉中 200 °C 酸解 1.5 小时, 之后冷却几分钟至室温。通常情况下, 酸解结束后所有的乙酸都被烧干。在毛细管中加入 15 μL 甲醇萃取酸解物中的 Cyt 和 5mCyt, 萃取过程为 15 分钟。

所有的质谱数据是使用一台 Orbitrap 质谱仪测定 (型号 Q-Exactive, Thermo Scientific 公司)。质谱检测参数如下: 离子传输管温度: 320 °C, tube lens 电压: 50 V, 质量分辨率: 35000, 最大进样时间: 50 ms, Microscans: 1。当检测 100 个人类细胞的样品时, 仪器自带的商品化 ESI 离子源会被移去。将含有细胞酸解物萃取液的毛细管置于质谱仪离子传输管前方, 毛细管针尖距离质谱进样口的距离大约 5 mm。毛细管内插入一根细铜丝以导入高压直流电, 外接 +2 kV 的高压电源以导致 NanoESI 的发生。

进行喷雾前, 质谱扫描模式设为 AIF-MS/MS 模式。二级参数如下: Cyt 母离

子质量数设定为 112.05, 5mCyt 母离子质量数设定为 126.05, 母离子隔离宽度为 0.4 个质量数, 碰撞母离子电荷为 1, HCD 归一化碰撞能量为 80 eV。每一个样品在喷雾时, 母离子会交替调整为 112 和 126, 交替至少 6 次。

### 2.2.6 对照实验

为了证明酸解反应确实发生了, 本章一共做了 4 组对照实验。第一, 单纯的甲醇做了直接的 NanoESI-MS 测试, 来测定喷雾溶剂中的背景信号。第二, 在空毛细管中加入约 15  $\mu\text{L}$  的乙酸, 封口后 200  $^{\circ}\text{C}$  酸解 1.5 小时。之后加入 15  $\mu\text{L}$  甲醇室温下萃取 15 分钟作为空白对照。第三, 将 1  $\mu\text{L}$  含有 100 个 MCF7 细胞的细胞悬液加入到毛细管尖端, 室温下放置 5 小时直至液体完全蒸干。之后加入 15  $\mu\text{L}$  甲醇室温下萃取 15 分钟作为对照实验。这一对照主要是为了证明酸解反应是之后检出 Cyt 或 5mCyt 的必要条件。第四, 将酸解用的乙酸替换为乙醇重复上述 2.2.5 的步骤酸解 100 个 MCF7 细胞。最后实验组是严格重复 2.2.5 的步骤酸解并测定 DNA 甲基化程度, 与上述四组对照相比较。

### 2.2.7 实验条件的优化

所有的条件优化实验是使用 500 个 MCF7 细胞进行的, 每一个条件进行了 5 次平行实验。首先, 细胞在 160  $^{\circ}\text{C}$  下分别酸解了不同时间 (1 小时、1.5 小时、2 小时、3 小时、5 小时), 并由乙醇萃取了 5 分钟以优化酸解时间。其次, 实验尝试了不同的酸解温度 (120  $^{\circ}\text{C}$ 、160  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $^{\circ}\text{C}$ 、240  $^{\circ}\text{C}$ 、280  $^{\circ}\text{C}$ ), 以选择最佳温度。再次, 实验调整了不同的萃取时间 (0 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟), 在综合考虑信号强度和分析方法速度的情况下选择了最佳萃取时间。最后, 实验改变了不同的萃取溶剂 (水、甲醇、乙醇、2-丙醇、乙腈) 以挑选出最适合的萃取溶剂和喷雾溶剂。

### 2.2.8 工作曲线及定量

实验配制了不同浓度的 Cyt 标准甲醇溶液 (20  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、40  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、200  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1000  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 5mCyt 标准甲醇溶液 (1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、20  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 溶液中加入 5  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸铵来模拟细胞萃取液中的缓冲环境。之后分别依据  $\text{MS}^2$  中  $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  的信号强度进行了工作曲线的绘制, 之后使用外标法对样品中待测物浓度进行确定。DNA 甲基化程度由 Cyt 和 5mCyt 的浓度计算得到。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 乳腺癌细胞与正常细胞的表皮抗原荧光染色效果对比

尽管免疫学方法广泛应用于癌细胞的分离与识别，但本节实验证明这样的方法会产生假阳性结果。实验选择了两个细胞系：一个是正常乳腺细胞系 MCF10A，另一个是乳腺癌细胞系 MCF7。这两种细胞系以及它们 1:1 混合物分别用 anti-EpCAM-FITC 抗体染色（图 2.1）。明场和暗场荧光照片的叠加显示，焦平面上每个细胞的细胞膜均显示出 FITC 的荧光信号，说明每个细胞均可被 anti-EpCAM-FITC 抗体染色，即 EpCAM 在两种细胞的细胞膜上均有表达（图 2.1）。两种细胞的混合物中，两类细胞并不能互相区分。考虑到 EpCAM 是从骨髓或外周血中分离提取癌细胞的最常用表皮抗原，这个实验充分说明非癌表皮细胞和癌细胞并不能通过基于表皮抗原的传统方法分开。

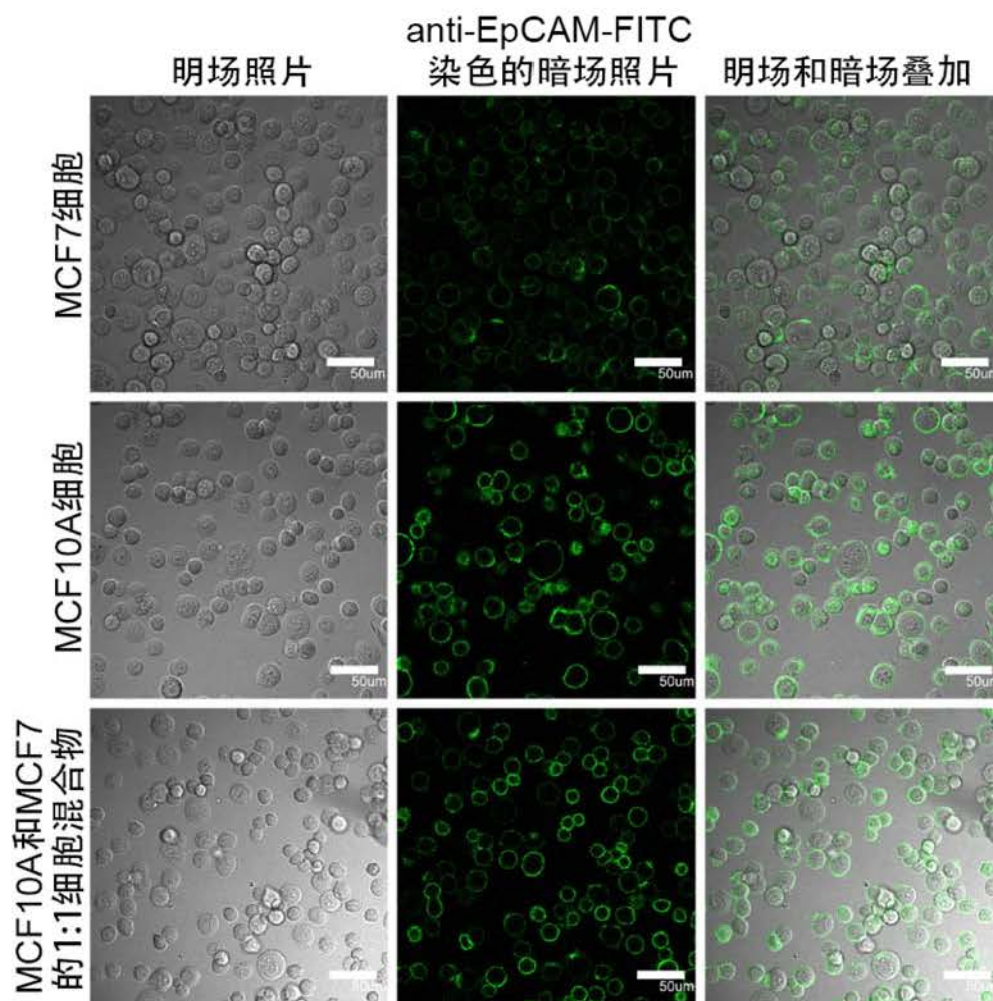


图2.1 MCF7、MCF10A和两种细胞1:1混合物被EpCAM抗体-FITC染色后的荧光照片（比例尺 = 50 µm）。

这样的结果与之前的研究报道是一致的。例如，之前曾有报道指出，如果使用商品化的表皮抗原的特异性抗体来分离 CTCs 细胞，就会同时无差别的富集到 CTCs 细胞和良性表皮细胞，导致假阳性的结果<sup>[185, 189-191]</sup>。一些研究论文已经在没有恶性肿瘤的患者血液循环系统中发现了游离的表皮细胞，如患有良性结肠炎<sup>[191]</sup>、良性肠道疾病<sup>[203]</sup>、上皮增生性疾病的病人<sup>[204, 205]</sup>、以及接受过良性乳腺癌手术的病人<sup>[206]</sup>。这些表皮正常细胞可以由现有的 CTCs 检测方法检出，需要进一步进行鉴定才能够确认是否为癌症细胞。上述实验证明仅仅依靠免疫学的方法还不能够特异性的分离癌细胞，需要后续对这些分离的细胞进行鉴定才能够进一步确认。

### 2.3.2 乳腺癌细胞与正常细胞的基因组DNA甲基化程度对比

为了建立一种区分癌细胞和正常细胞的快速方法，本节实验考察了 DNA 甲基化程度在两种细胞中的差异，因为诸多研究显示癌细胞会显现出具有显著性差异的 DNA 甲基化程度<sup>[104, 108, 196]</sup>。实验使用前人研究中报道的方法将约  $10^6$  个 MCF10A 和 MCF7 细胞的 DNA 酸解为碱基<sup>[170]</sup>。经过检测和校正，结果发现 MCF10A 和 MCF7 细胞显示出 DNA 甲基化程度的显著性差异 ( $p < 0.02$ ,  $n = 8$ )，证明 DNA 甲基化程度可以作为区分正常和癌细胞的依据 (表 2.1)。

尽管 DNA 甲基化的变化是一种早期出现的普遍的癌细胞特征，但是目前用质谱定量 DNA 甲基化程度的方法并不适用于临床检测，因为从病人身上分离到的癌细胞数目非常少。本节的实验试图用以上方法分析 100 个 MCF10A 和 100 MCF7 细胞的整体 DNA 甲基化程度。但即使实验使用了更小体积的溶剂，例如 200 微升甲醇来溶解细胞裂解物，5mCyt 的信号依旧无法得到。一般而言，每毫升全血中平均有 1-10 个 CTCs，即使取了 10 毫升血液样品，之后用于检测的细胞至多只有约 100 个<sup>[202]</sup>。如果期望一个 DNA 甲基化检测方法适用于大部分的癌症病人，这个方法必须能够检测至少 100 个细胞。目前的方法还不能检测这么少的细胞。因此改进现有的质谱技术，使其能够检测少量细胞的 DNA 甲基化程度，将有助于 DNA 甲基化应用于临床应用。

表2.1 MCF7和MCF10A细胞的DNA甲基化程度差异。

组	MCF7			MCF10A		
	Cyt/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5mCyt/nmol $\cdot\text{L}^{-1}$	DNA 甲基化程度 (%) <sup>[a]</sup>	Cyt/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5mCyt/nmol $\cdot\text{L}^{-1}$	DNA 甲基化程度 (%) <sup>[a]</sup>
1	0.775 ± 0.064	9.34 ± 0.77	1.191 ± 0.011	1.463 ± 0.144	17.55 ± 1.84	1.185 ± 0.011
2	0.647 ± 0.003	7.70 ± 0.15	1.177 ± 0.024	1.098 ± 0.058	11.87 ± 0.66	1.069 ± 0.015
3	1.851 ± 0.035	21.85 ± 0.28	1.167 ± 0.022	2.076 ± 0.081	23.55 ± 0.93	1.122 ± 0.001
4	2.033 ± 0.096	24.22 ± 1.31	1.177 ± 0.008	1.962 ± 0.209	23.06 ± 2.23	1.162 ± 0.016
5	1.611 ± 0.090	18.80 ± 1.02	1.153 ± 0.007	1.288 ± 0.037	14.38 ± 0.34	1.104 ± 0.016
6	0.977 ± 0.025	11.58 ± 0.18	1.173 ± 0.014	2.545 ± 0.028	28.55 ± 0.75	1.109 ± 0.022
7	1.746 ± 0.064	20.60 ± 0.75	1.166 ± 0.029	1.730 ± 0.095	19.63 ± 1.15	1.122 ± 0.016
8	2.283 ± 0.606	26.96 ± 7.39	1.166 ± 0.021	2.483 ± 0.638	28.85 ± 7.70	1.147 ± 0.013
平均值			1.171 ± 0.011			1.128 ± 0.036
显著性	p < 0.02, n = 8 <sup>[b]</sup>					

[a] DNA 甲基化程度 (%) = 5mCyt × 100% / (5mCyt + Cyt), [b] MCF7 和 MCF10A 两个细胞系的 5mCyt 比例差异显著性。

## 2.3.3 基于在线酸解反应的少量细胞DNA甲基化质谱方法研究

为了达到 2.3.2 提出的测定少量细胞的目标, 本节实验对经典的 NanoESI-MS 技术做了适当改进。具体而言, 本研究将 DNA 酸解反应直接引入了 NanoESI 的纳喷雾喷嘴, 从而尽可能减少了样品稀释, 使纳喷雾成为能够检测约 100 个细胞 DNA 甲基化程度的简便快速方法。从采样到获得谱图, 整个过程在 2 小时之内(图 2.2)。图 2.3a 显示了 100 个 MCF7 细胞在正离子模式下典型的质谱谱图, 由于样品的复杂性以及 100 个细胞中 Cyt 和 5mCyt 相对比较低的含量,  $[\text{Cyt} + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} + \text{H}]^+$  的信号在一级谱中很难找到 ( $m/z$  分别为 112 和 126) (图 2.3b)。然而, 当 112 和 126 被设定为母离子时,  $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  则很容易在  $\text{MS}^2$  图谱中找到 ( $m/z$  分别为 95 和 109) (图 2.3c)。除此之外,  $[\text{Cyt} - \text{CONH} + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{CONH} + \text{H}]^+$  两个特征子离子 ( $m/z$  分别为 69 和 83) 也能够检出。这四个峰的精确质量数与标准品完全一致, 证明该方法确实检测到了 100 个细胞裂解物中的 Cyt 和 5mCyt (图 2.4)。

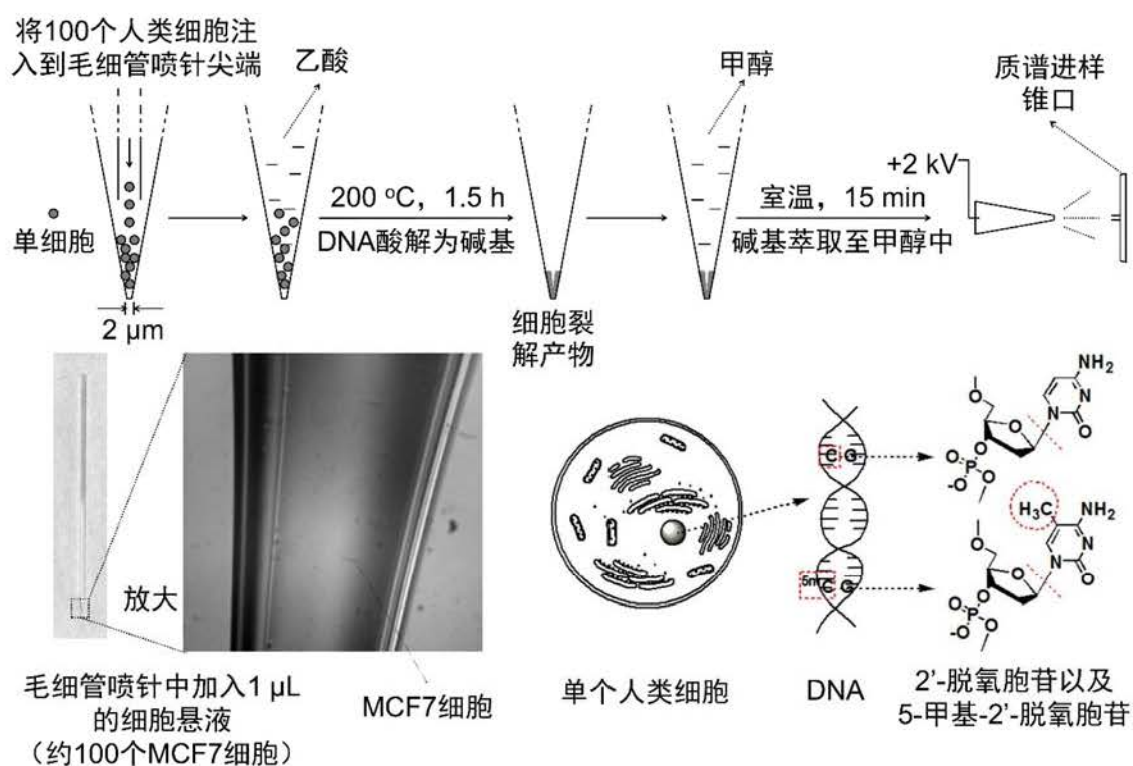


图2.2 毛细管内100个细胞酸解反应和纳喷雾质谱流程图。将基因组DNA酸解为碱基后, dC和5mC被水解为Cyt和5mCyt, 它们的分子量分别为111和125。之后两个分子就可以由质谱区分开, 根据两者信号强度就可计算出100个细胞的DNA甲基化程度。

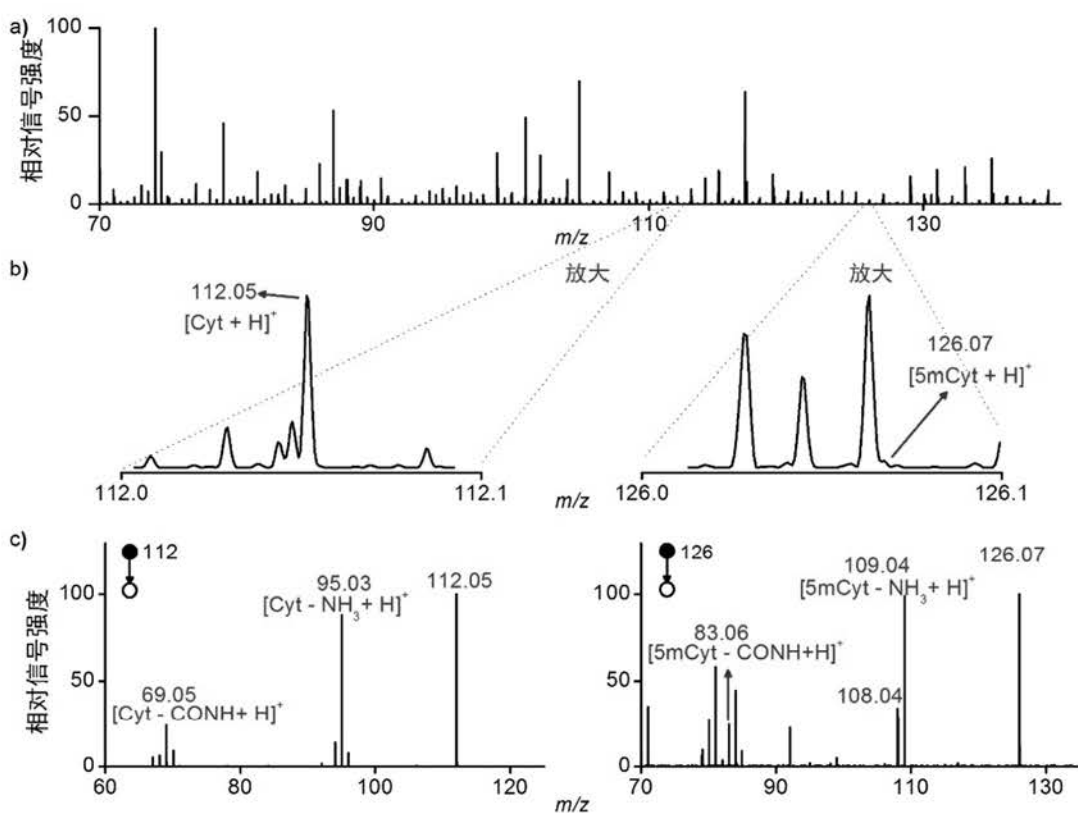


图2.3 (a) 100个MCF7细胞酸解后20次扫描的平均质谱图；(b) 质谱图局部放大以显示[Cyt + H]<sup>+</sup>和[5mCyt + H]<sup>+</sup>的峰；(c) [Cyt + H]<sup>+</sup>和[5mCyt + H]<sup>+</sup>离子的MS<sup>2</sup>谱图(20次扫描平均)。

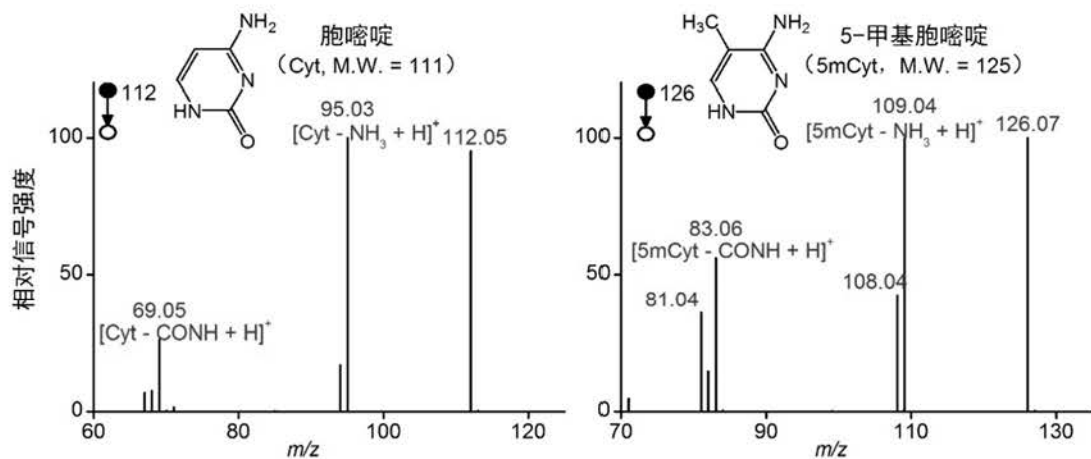


图2.4 Cyt和5mCyt标准品的MS<sup>2</sup>谱图。

为了加快方法的检测速度，传统的DNA提取、纯化步骤均被省去。细胞裂解和DNA水解被合成了一步完成。另外，为了提高方法灵敏度并降低样品损失，100个细胞中的DNA直接在NanoESI的喷针中被酸解，进而最大程度的减少样品损失

和样品稀释(图2.2)。除此之外,该方法尽可能避免了因样品复杂性造成的基质效应<sup>[207]</sup>,这是由于以下两点原因:1)无机盐等基质难溶于纯甲醇中,这使得方法对基质有一定耐受;2)在MS<sup>2</sup>谱图中识别Cyt和5mCyt始终采用单反应监测模式(Single Reaction Monitoring, SRM)。

### 2.3.4 在线细胞酸解反应的反应条件优化及结果验证

本节实验对酸解温度、酸解时间、溶剂萃取时间、喷雾溶剂四个变量进行优化以得到最佳的[Cyt - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>和[5mCyt - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>信号(图2.5)。经过优化最佳的实验条件是200 °C下乙酸酸解2小时,甲醇萃取15分钟。

酸解温度过低或者时间不足反应无法进行完全,而过高的酸解温度或者过长酸解时间将有可能导致产物的分解。萃取时间较短时萃取效率会较低,而如果采用更长的萃取时间一方面导致分析时间过长,另一方面酸解结束后产物主要集中在针尖部分,长时间萃取后待测物会向毛细管尾部扩散导致稀释反而降低信号。甲醇之所以是最优化的溶剂选择,一方面是由于其萃取效率较好,另一方面也是由于电喷雾性质优良。

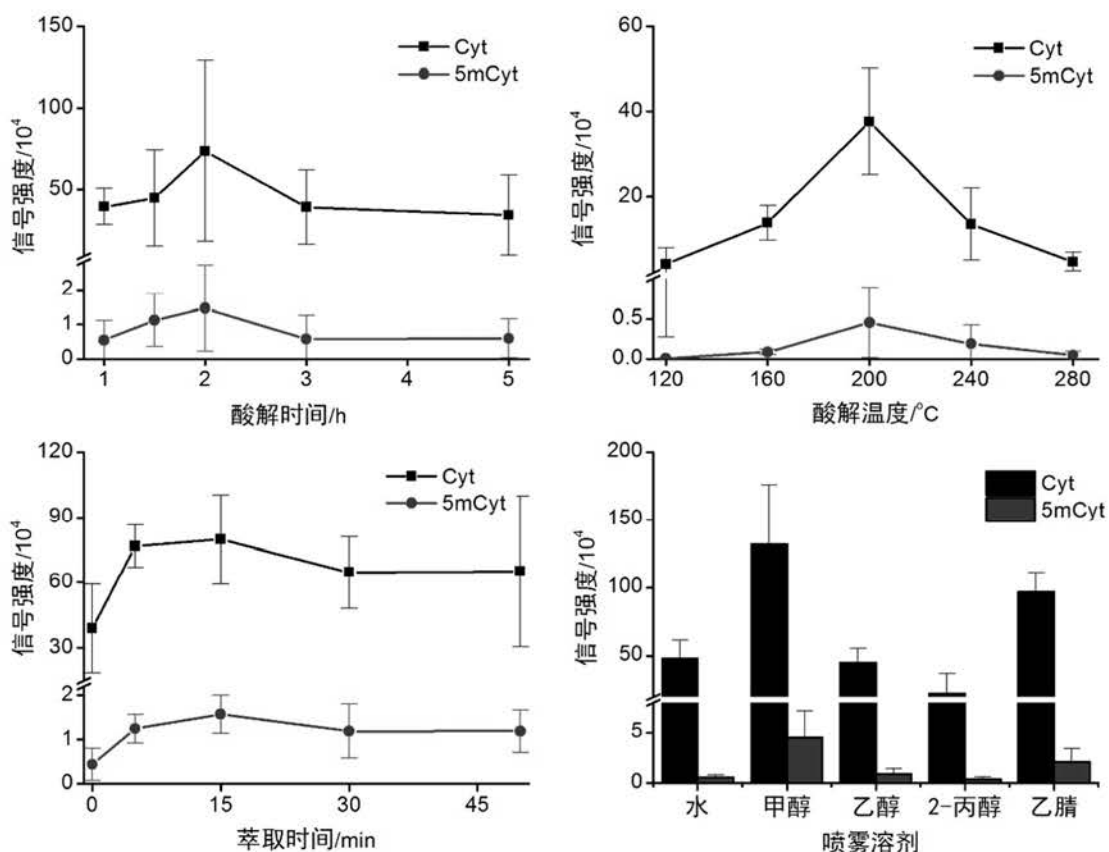


图2.5 条件优化实验。在不同实验条件下对[Cyt - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>和[5mCyt - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>的强度进行检测 (n = 5)。对酸解时间和温度、萃取时间、喷雾溶剂进行了优化。

在喷针中酸解 100 个细胞是这个方法的关键一步，因为喷针不仅是一个微反应器，还是进行电喷雾的场所。在喷针内直接酸解细胞可以最大程度地减少样品的稀释和浪费。另一方面，喷针内还有潜力进行其他类型的样品前处理反应。为了证明酸解反应确实发生了，本节做了一些对照试验（图 2.6）。如果将 100 个细胞的悬液加入到喷针中之后挥发 5 小时左右至溶液完全挥发，不加入乙酸，细胞也会沉积在喷针的尖端。在保持其他实验步骤不变的情况下， $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的信号几乎无法检出。当使用乙醇代替乙酸做酸解时，由于乙醇的酸性远远小于乙酸，尽管会检测到 $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的微弱信号，但信号远远小于使用乙酸的情况。这说明产物离子的信号与溶液的酸性有很大关系。从另一方面来说，DNA 在喷针中确实如实验所设计的那样发生了酸解反应，两个子离子的信号确实来自于细胞基因组 DNA 的酸解，而非其他来源。

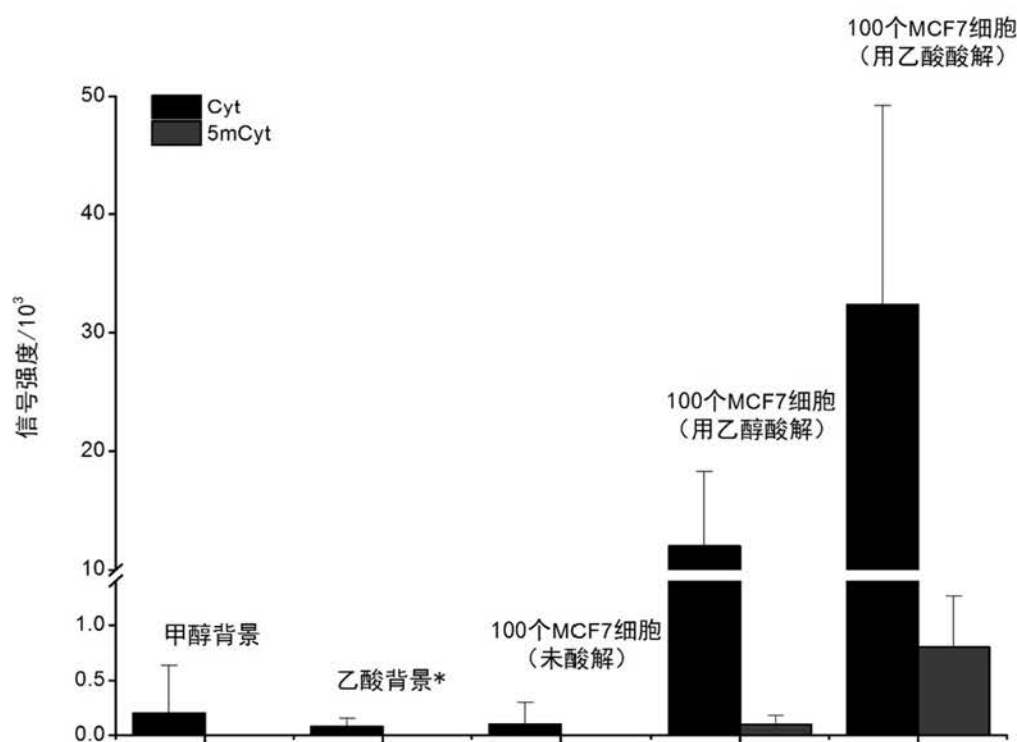


图2.6 对照实验。在不同实验条件下得到的 $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的平均信号强度。当100个MCF7细胞注入到毛细管中而不酸解时，SRM模式下 $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的信号强度与纯甲醇差不多。另一方面，如果使用乙醇或者乙酸水解细胞，则两个子离子的信号会非常明显，其中使用乙酸的信号更强。\*大约15  $\mu\text{L}$ 的乙酸加入到空毛细管中但是并没有加入细胞，其他实验步骤与正常流程一致。

### 2.3.5 方法的最低取样量摸索

在最优化条件下, 本节实验取了不同量的 MCF7 细胞 (10 个、20 个、50 个、100 个、500 个) 以探究方法的最低取样量。结果显示毛细管在线酸解的 NanoESI-MS 方法最少可以检测出 10 个 MCF7 细胞的  $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  信号 (图 2.7 和图 2.8)。如果只考虑 Cyt 的信号, 那么甚至 MCF7 单细胞的信号依旧可以检出。这一结果充分证明通过在线酸解来提高方法灵敏度以及降低取样量的思路是有效的。

但是另一方面 10 个细胞取样量的情况下  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  信号比较短暂, 来不及交替采集到  $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  两个离子的信号。因此实际上, 如果希望得到  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  的稳定信号并计算相应的甲基化程度, 至少 100 个人类细胞是必不可少的。毛细管在线酸解的 NanoESI-MS 方法在测定 100 个 MCF7 细胞和 100 个 MCF10A 细胞的标准偏差分别为 14% 和 18% ( $n = 7$ ), 质谱图中特征峰信噪比大于 3。检测 100 个人类细胞的灵敏度意味着该方法可以用于少量分离癌细胞的 DNA 甲基化程度检测。

### 2.3.6 测定少量细胞时的方法喷雾稳定性考察

如果需要测定细胞的 DNA 甲基化程度, 则需要在同一样品的测定过程中同时对 Cyt 和 5mCyt 进行测定。换言之, 稳定喷雾的时间需要足够长。图 2.9 记录了 100 个 MCF7 细胞酸解后喷雾检测的总离子流图 (Total Ion Current Chromatogram, TIC) 和提取离子流图 (Extracted Ion Chromatogram, EIC)。在整个喷雾过程中  $m/z = 112$  和 126 的母离子交替进行碰撞诱导解离 (Collision Induced Dissociation, CID) 扫描。通常在酸解 100 个细胞的情况下,  $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  和  $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  的信号可以持续一分钟以上。在加电喷雾后的第一分钟通常两个离子的信号均非常稳定。于是, 在喷雾第一分钟, 实验依次选择 112 和 126 作为扫描的母离子并交替变换若干次, 同时记录子离子的强度。DNA 甲基化程度通过两者的信号强度进行计算。

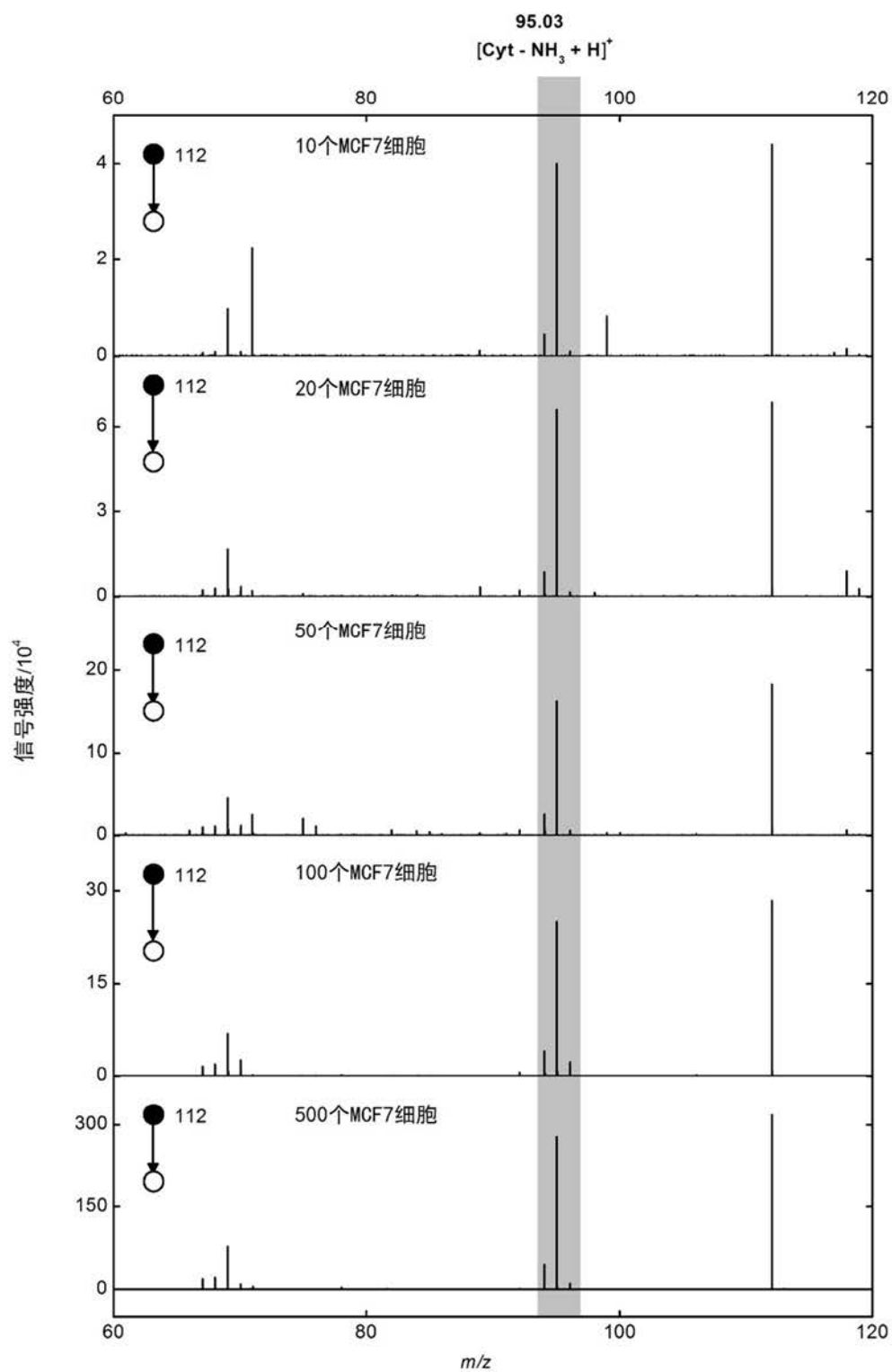


图2.7 当采样不同量的细胞时[Cyt + H]<sup>+</sup>的MS<sup>2</sup>谱图（分别采样10个、20个、50个、100个、500个MCF7细胞，谱图为20次扫描平均结果）。

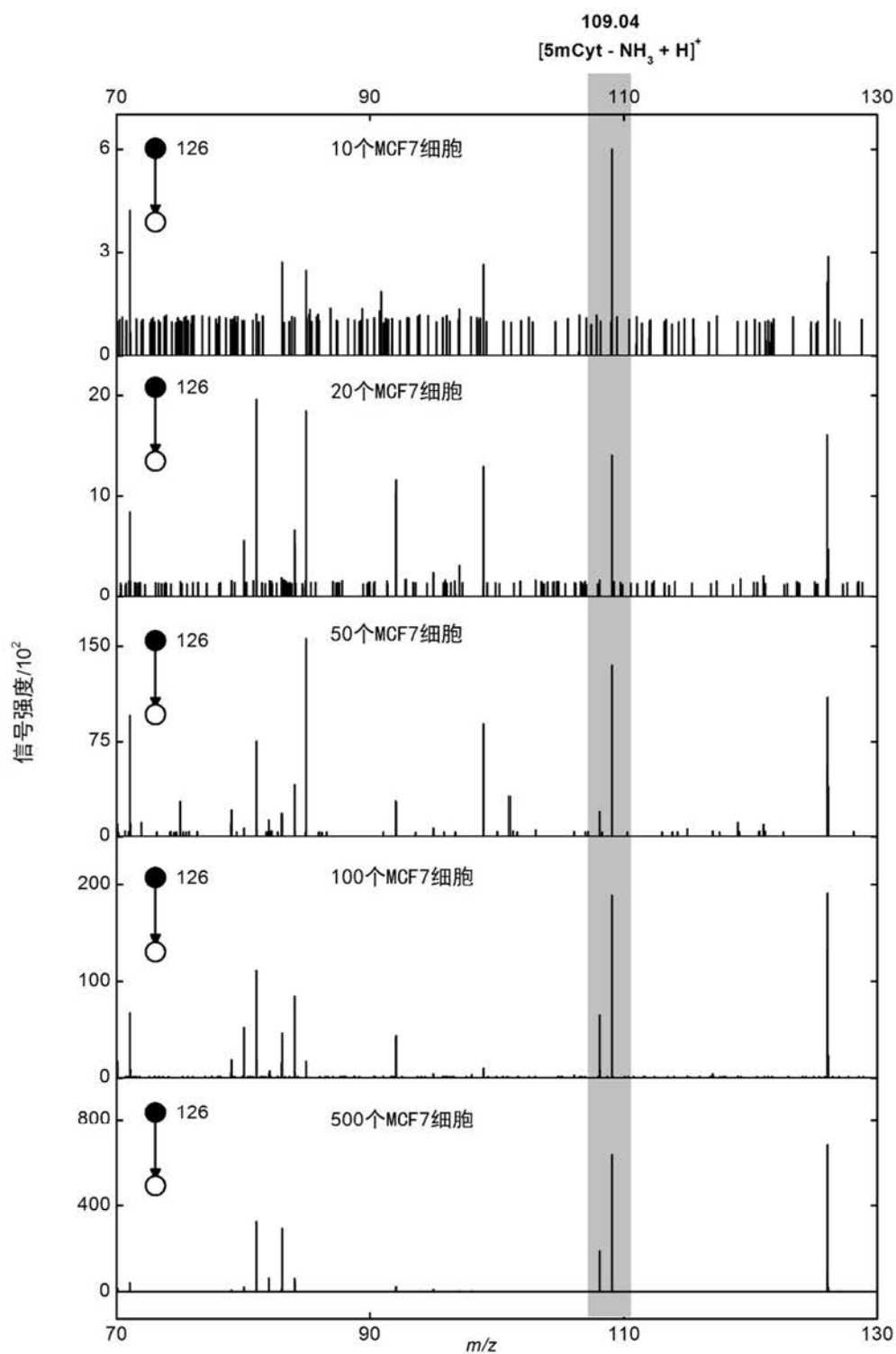


图2.8 当采样不同量的细胞时[5mCyt + H]<sup>+</sup>的MS<sup>2</sup>谱图（分别采样10个、20个、50个、100个、500个MCF7细胞，谱图为20次扫描平均结果）。

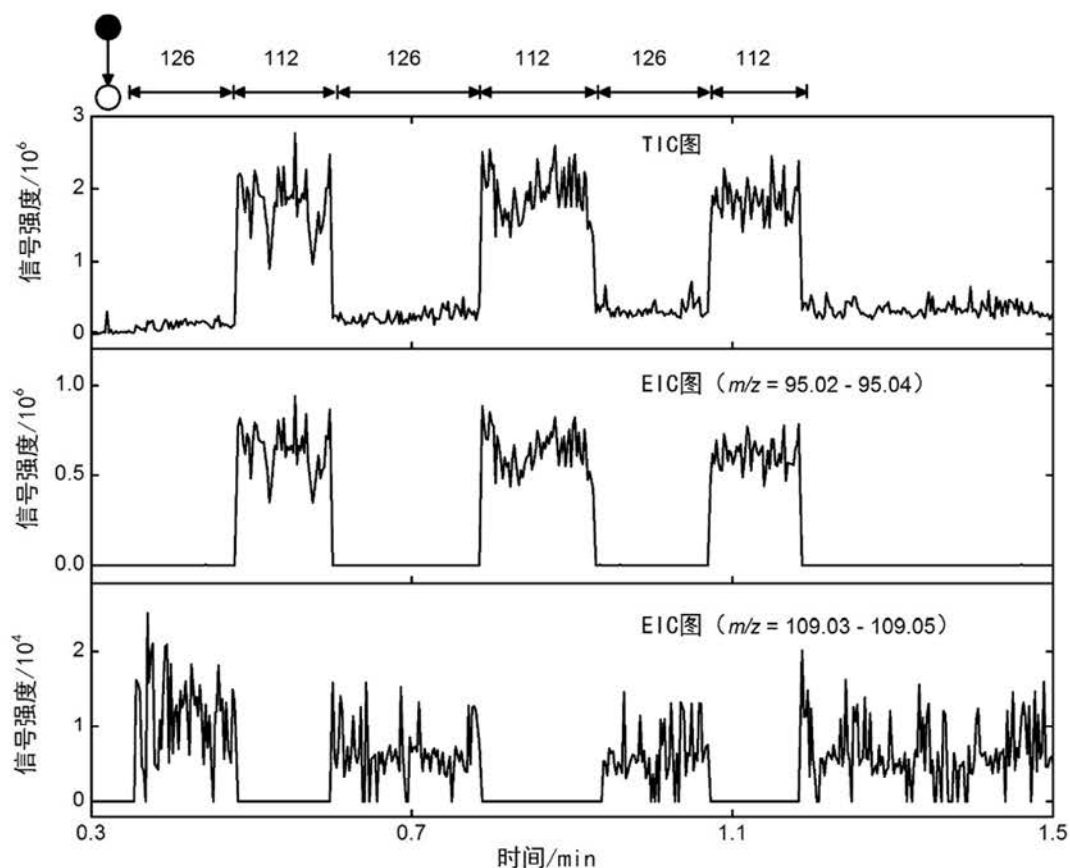


图2.9 100个MCF7细胞酸解后，质谱检测过程中 $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的TIC图和EIC图。从离子化一开始 $[\text{Cyt} + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} + \text{H}]^+$ 被交替选为母离子。通常情况下，两个离子的信号可以稳定持续几分钟。实验通常在信号稳定的区间记录 $[\text{Cyt} + \text{H}]^+$ 和 $[\text{5mCyt} + \text{H}]^+$ 的信号强度以计算DNA甲基化程度。

### 2.3.7 多种细胞在少量细胞取样下的DNA甲基化程度检测

为了对细胞内 Cyt 和 5mCyt 进行定量，本节实验首先用标准溶液绘制了两条工作曲线（图 2.10）。

之后本节实验运用毛细管在线酸解的方法对 MCF7、MCF10A、HepG2、HeLa 四种细胞进行了 DNA 甲基化程度的检测，每种细胞均取样 100 个细胞（图 2.11）。实验可以区分 100 个 MCF10A 细胞和 100 个 MCF7 的 DNA 甲基化程度差异（两种细胞分别为 1.10%和 0.93%），也可以检测其他类型癌细胞，如 HepG2 和 HeLa 细胞（分别为 1.12%和 1.06%）。这样的结果说明基于在线样品酸解反应和 NanoESI-MS 的方法具有高灵敏度和普适性，有可能用于乳腺癌之外的其他类型癌症检测。

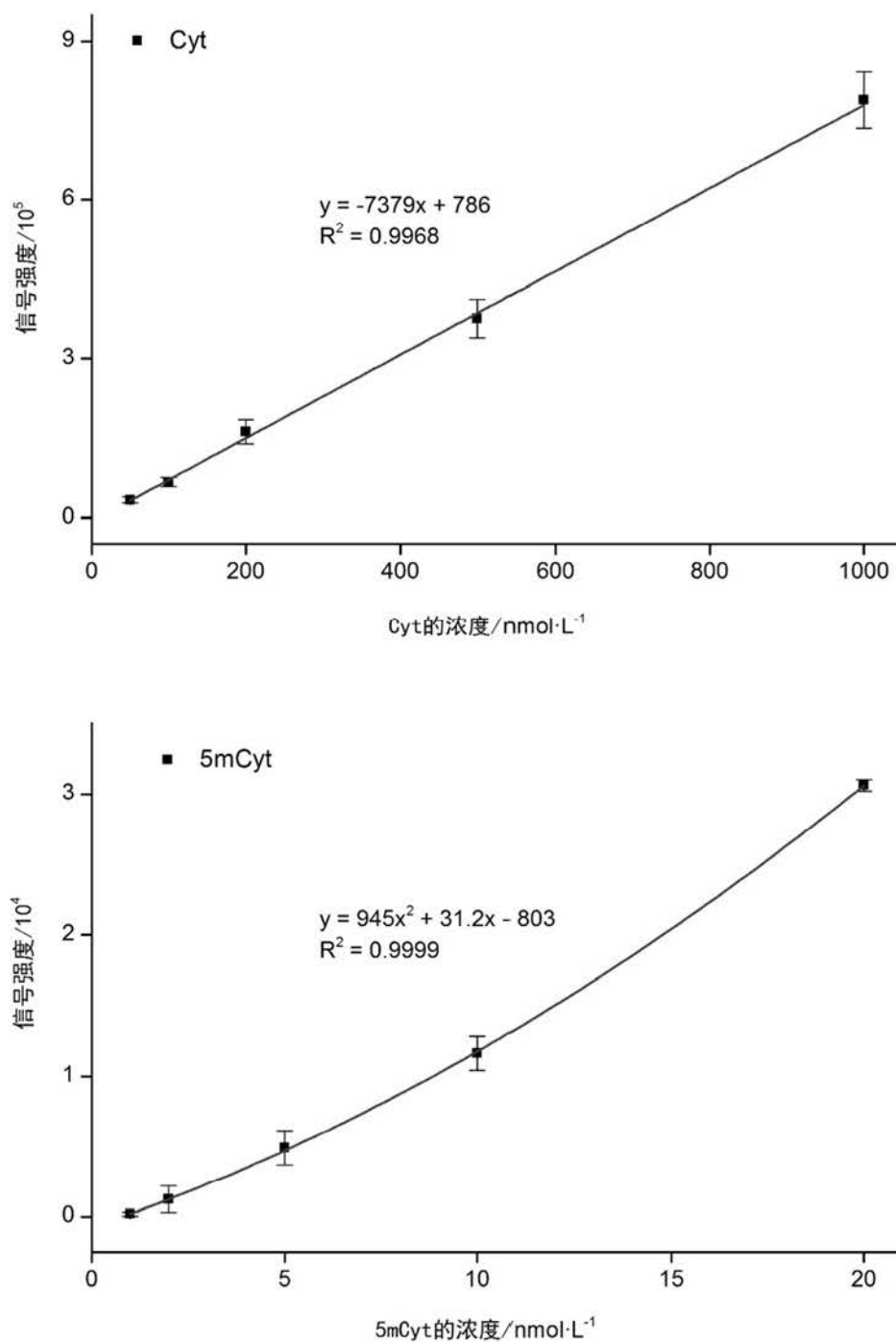


图2.10 Cyt和5mCyt标准品溶液的工作曲线。

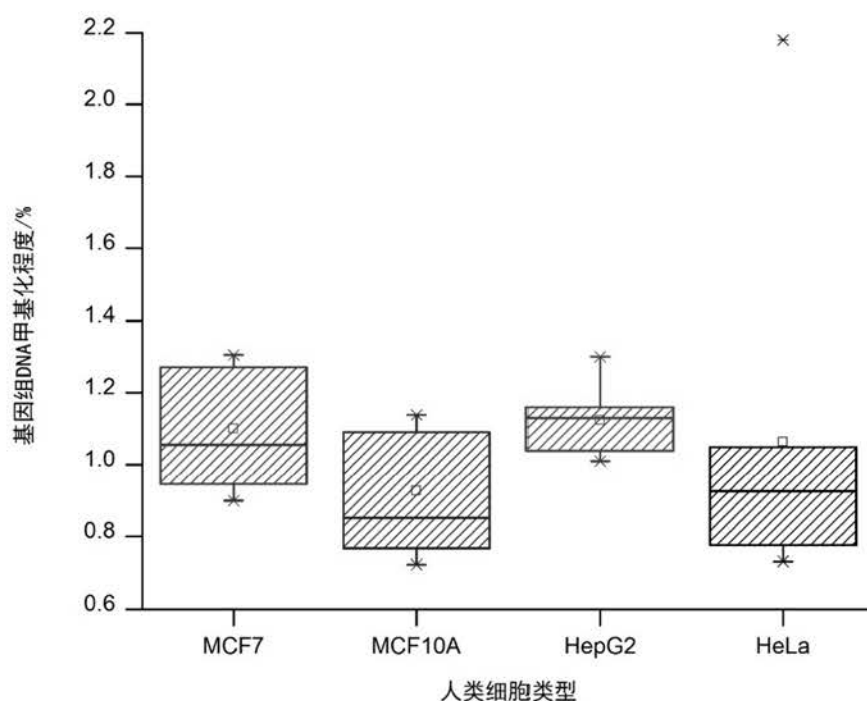


图2.11 MCF7、MCF10A、HepG2、HeLa四种细胞在取样100个细胞时的DNA甲基化检测结果。

### 2.3.8 少量乳腺正常细胞和癌细胞混合情况下的DNA甲基化程度检测

在实际临床应用中,当基于 CTCs 细胞筛选出现假阳性结果的时候,有可能出现正常表皮细胞与癌细胞共同存在的情况。在这种情况下,100个混合细胞的平均DNA甲基化程度介于癌细胞和正常细胞之间。本节实验证明基于在线样品酸解反应和 NanoESI-MS 的方法可以依据测定的结果估计混合细胞中两种细胞的比例。

为了证明本章技术依旧适应于 MCF10A 和 MCF7 混合细胞的情形,本节做了如下实验。将 MCF10A 和 MCF7 以 5 种不同比例混合在一起(100:0、75:25、50:50、25:75 以及 0:100),然后每类混合细胞分别取样 100 个进行 DNA 甲基化程度测定(图 2.12)。结果显示混合细胞的 DNA 甲基化检测结果与两类细胞的混合比例呈现明显的相关关系。这一结果意味着基于在线样品酸解反应和 NanoESI-MS 的方法可以依据 DNA 甲基化测定结果估计两类细胞的混合细胞中癌细胞和正常细胞的比例。

在实际临床应用中,CTCs 细胞的筛查不仅仅是癌症早期诊断的依据,也是癌症病人接受治疗后预后的依据。如果本章技术应用于临床实践,将有潜力为 CTCs 细胞诊断提供更准确的信息。

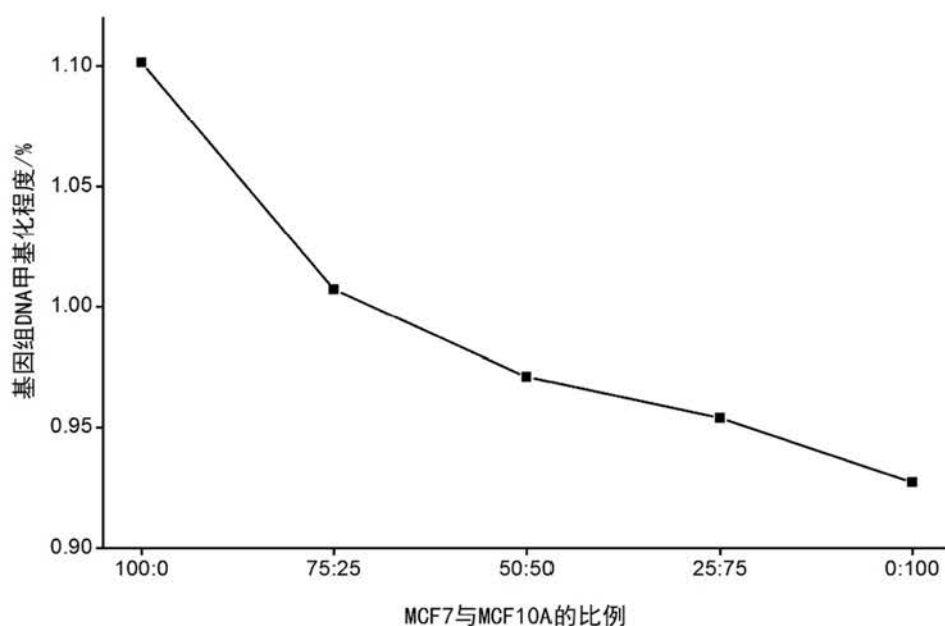


图2.12 MCF10A与MCF7细胞以不同比例混合后应用在线酸解进行100个细胞水平的DNA甲基化程度检测。DNA甲基化程度与两类细胞的混合比例密切相关。

## 2.4 本章结论

综上所述,本章提出了一种根据基因组DNA甲基化程度区分稀有正常细胞和稀有癌细胞的NanoESI-MS的新方法。这一方法将毛细管内的直接酸解反应融合到了经典的纳升电喷雾质谱分析过程中,实现了仅仅100个人类细胞的基因组DNA甲基化程度快速检测。该方法最低可检出10个MCF7细胞的Cyt和5mCyt信号。当取样100个细胞时稳定喷雾时间可以达到1分钟以上,该喷雾时间足够分别重复采集Cyt和5mCyt信号三次以上。该方法能够检出MCF7、MCF10A、HepG2、HeLa四种细胞的DNA甲基化程度,且可以区分几种细胞间DNA甲基化程度的不同。对于癌细胞与正常细胞混合的情形。可以依据DNA甲基化程度来估计两类细胞的比例。

该方法具有以下优点:1)流程快速简单;2)最大程度的节约样品,因此能够检测仅100个细胞;3)对多种类型人类细胞均适用,可以在100个细胞的水平区分MCF10A和MCF7细胞;4)由于选用DNA甲基化作为筛选细胞的依据,因此该方法有潜力用于稀有癌细胞和正常细胞的区分,为癌细胞早期诊断提供可靠依据和更详细信息。

## 第3章 小体积衍生-质谱法快速分析细胞的DNA甲基化程度

### 3.1 本章引言

基因组DNA主要由dA、dT、dC、dG四种单核苷酸构成，其中dC的嘧啶环5位碳上可发生甲基化，形成第五种单核苷酸——5mdC<sup>[52]</sup>。这一保守的DNA甲基化形式广泛存在于植物、动物和酵母细胞中<sup>[41]</sup>。基因组DNA中dC和5mdC可以经由不同通路相互转化，从而维持基因组DNA整体甲基化的动态平衡<sup>[52]</sup>。5mdC的动态变化对基因组的稳定性、基因表达和细胞发育等生物学过程有很大影响<sup>[44, 45, 208]</sup>，异常的5mdC含量将导致许多疾病的发生，如心脑血管疾病、糖尿病、癌症等<sup>[42, 48]</sup>。因此，对细胞内基因组中5mdC及其衍生物进行鉴定和定量，对于研究DNA甲基化的生物学功能和相关疾病的早期诊断和预后评价非常必要。

目前基因组内5mdC的检测技术以HPLC-MS方法为主。第一类方法是将DNA酶解为核苷后进行HPLC-MS的直接检测。例如，汪海林等使用UHPLC-MRM-MS/MS技术对细胞基因组内5mdC及其氧化产物5hmdC、5fdC进行定量，进而研究了抗坏血酸对5mdC去甲基化代谢通路的影响<sup>[162]</sup>。第二类方法在第一类方法的基础上使用衍生剂对核苷进行衍生化，进一步提高了其在质谱检测中的响应。例如，袁必锋等使用BDAPE先对5mdC及其氧化产物进行衍生化，增加其在质谱中的离子化效率，之后用LC-ESI-MS/MS对衍生化产物进行定量，实现了人结肠癌细胞中5mdC、5hmdC、5fdC和5cadC的检出<sup>[163]</sup>。这一类方法可以获得更高的5mdC及其氧化产物的检测灵敏度，然而衍生化过程冗长耗时，增加了检测时长。上述两类方法在很多研究中得到了改进和应用，然而由于HPLC-MS和衍生化过程的存在整体检测过程步骤繁琐耗时。如果可以在以往DNA甲基化质谱检测技术的基础上发展出更简单省时的高灵敏度质谱检测技术，将大大推进DNA甲基化的基础研究并拓宽其临床应用前景。

微液滴小体积反应加速和反应监测是最近几年质谱领域新的研究方向<sup>[209]</sup>。越来越多的研究工作发现一些经典的有机反应可以在微液滴的小体积反应环境中得到大幅度的反应加速，如Michael加成反应、Mannich缩合反应、Hantzsch反应等等<sup>[209-224]</sup>。通过构建小液滴<sup>[210-213]</sup>、ESI喷雾液滴<sup>[214-218]</sup>、DESI喷雾液滴<sup>[219]</sup>、EESI喷雾液滴<sup>[220]</sup>、纸喷雾液滴<sup>[221-224]</sup>等小体积反应体系，常量下需要若干小时才能完成的反应可以在几分钟甚至瞬间完成。这一反应加速现象提示本章研究可以考虑在小体积反应体系下实现dC及5mdC的快速衍生化反应，之后使用NanoESI-MS

技术对衍生化产物进行分析，从而实现DNA甲基化程度的快速检测。

本章研究发现BDAPE对dC和5mdC的衍生化反应可以在小液滴或气动喷雾的小体积反应体系下实现反应加速。衍生化反应可以在室温下1分钟内完成，相比于常量反应时间缩短了360倍，且条件更为温和。由于小体积反应的浓缩效应，衍生剂所需浓度是常量反应的1%，进而降低了衍生剂在质谱检测过程中的基质效应影响，5mdC在NanoESI-MS下的检出限可达到0.12 fmol。在以上新发现的基础上，本章研究将小体积下BDAPE快速衍生化反应与直接的NanoESI-MS检测技术相结合，对HeLa、A549、MCF10A、MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-468这6种细胞系的DNA甲基化程度进行了分析。由于采用了小体积快速反应的策略，这一方法相较于前人的HPLC-MS技术分析时间大大缩短，更适用于实际临床应用。

## 3.2 实验部分

### 3.2.1 仪器与材料

本章所用到的dC和5mdC标准品购买自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。2-溴-1-(4-二甲氨基苯基)-乙酮(2-bromo-1-(4-dimethylamino-phenyl)-ethanone, BDAPE)标准品、乙腈(色谱纯)、甲酸购买于Sigma-Aldrich公司。三乙胺(Triethylamine, TEA)购买于北京化工厂。醋酸钠、氯化镁购买自北京百灵威科技有限公司，氯化钠购买自天津市福晟化学试剂厂，一水合硫酸锌购买自STREM化学试剂公司，Tris购买自VWR生命科学公司。实验中使用的超纯水是由ThermoFisher公司的纯水机纯化得到。HeLa、A549、MCF10A和MCF7细胞购买于国家实验细胞资源共享平台。MDA-MB-468、SK-BR-3细胞购买自上海酶研生物科技有限公司。细胞培养所用的DMEM、F-12、L-15培养基、胰蛋白酶-EDTA、DPBS缓冲液等购买于Corning公司。Protease K购买自VWR生命科学公司，配制为20 mg·mL<sup>-1</sup>的水溶液备用。S1核酸酶及其缓冲液、碱性磷酸酶及其缓冲液购买自TaKaRa生物技术公司。蛇毒磷酸二酯酶购买自Sigma-Aldrich公司，配制为1 mg·μL<sup>-1</sup>水溶液备用。气动喷雾装置的金属三通和毛细管peck套管均购买于郑州英诺高科有限公司。内外毛细管均是购买自Polymicro Technologies公司的标准聚酰亚胺涂层石英毛细管，内毛细管型号TSP-100200(内径100±4 μm，外径193±7 μm，涂层厚12 μm)，外毛细管型号TSP-320450(内径320±6 μm，外径435±10 μm，涂层厚18 μm)。

所有的质谱数据是使用一台Orbitrap质谱仪测定(型号Q-Exactive, Thermo Scientific公司)。NanoESI离子源是使用了商品化的离子源。NanoESI参数如下：

喷雾电压: 正离子模式下+2.5 kV, 离子传输管温度: 300 °C, S-lens RF level: 50.0, 质量分辨率: 35000, 最大进样时间: 50 ms, Microscans: 1。NanoESI 喷针针尖距离质谱进样口的距离大约 5 mm。扫描模式设为 AIF-MS/MS 模式。二级参数如下: dC 衍生物母离子质量数设定为 371.0, 5mdC 衍生物母离子质量数设定为 385.0, 母离子隔离宽度为 1 个质量数, 碰撞母离子电荷为 1, HCD 归一化碰撞能量为 20 eV。用于 NanoESI-MS 喷针的毛细管大约 5 cm 长, 毛细管针尖直径约 2  $\mu\text{m}$ 。这些毛细管是使用拉制仪由标准化的硼玻璃管拉制而成。硼玻璃管购买自 SUTTER 仪器公司, 型号为 B150-110-10, 管长度 10 cm, 外径 1.5 mm, 内径 1.1 mm。拉制仪同样购买自 SUTTER 仪器公司, 型号 P-1000, 拉制参数为 Heat = 481, Pul = 0, Vel = 40, Time = 250, Pressure = 500。

所有的酶解反应是在恒温混匀仪中完成, 混匀仪购买自杭州奥盛仪器有限公司, 型号 MS-100。进行气动喷雾实验时使用的恒流泵购买自 Harvard 设备公司, 型号为 Pump11 Elite。喷雾吹扫的  $\text{N}_2$  购买自液化空气(天津)有限公司。

### 3.2.2 气动喷雾小体积反应装置的搭建及反应流程

气动喷雾装置由一个金属三通构成(图 3.5), 三通相对的两端中的一端通过 peek 套管(内径 250  $\mu\text{m}$ , 外径 1/16")旋紧内毛细管, 相对的另一端通过 peek 套管(内径 500  $\mu\text{m}$ , 外径 1/16")旋紧外毛细管。内毛细管穿过整个三通和外毛细管, 尾端伸出外毛细管尾端 2 mm 构成喷嘴。三通最后一段旋紧金属管路(外径 1/16")并进一步连接气路。内毛细管另一端通过另一个 peek 套管旋紧一个两通, 两通另一端连接进样针的进样口。

喷雾时, 由 250  $\mu\text{L}$  进样针吸取反应物混合溶液, 在恒流泵的推动下以 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速经过内毛细管注入到喷嘴处。同时由金属管路通入 0.2 MPa 的  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2$  经过三通从内外毛细管间的空隙喷出。在  $\text{N}_2$  吹扫气的作用下, 涌出喷嘴的溶液被分散为大量小液滴, 形成喷雾。喷嘴外放置一小离心管以收集蒸干的小液滴。

### 3.2.3 常量反应、液滴小体积反应和气动喷雾小体积反应的操作流程

常量反应中, 配制 200  $\mu\text{L}$  的 dC 或 5mdC、BDAPE 和 TEA 的反应物混合乙腈溶液于 500  $\mu\text{L}$  离心管中。离心管放入恒温混匀仪中 200 rpm 60 °C 反应 6 小时。反应后冷却至室温, 加入 1  $\mu\text{L}$  甲酸于反应体系中混匀, 使甲酸浓度达到 0.5%。之后取 10  $\mu\text{L}$  注射到 NanoESI 喷针顶端, 进行产物  $\text{MS}^2$  分析。

液滴小体积反应中, 配制 200  $\mu\text{L}$  的 dC 或 5mdC、BDAPE 和 TEA 的反应物混

合乙腈溶液于 500  $\mu\text{L}$  离心管中。取其中 10  $\mu\text{L}$  反应物溶液滴加在 parafilm 封口膜疏水表面，室温下静待 15 分钟直至溶液完全蒸干沉淀。取 10  $\mu\text{L}$  含有 0.5%甲酸的乙腈溶液复溶沉淀，反复吹打沉淀处直至沉淀完全溶解。将 10  $\mu\text{L}$  溶液全部转移至 NanoESI 喷针顶端，进行产物 MS<sup>2</sup> 分析。

气动喷雾小体积反应中，配制 200  $\mu\text{L}$  的 dC 或 5mdC、BDAPE 和 TEA 的反应物混合乙腈溶液于 500  $\mu\text{L}$  离心管中。用进样针吸取全部溶液，进样到气动喷雾装置中。按照 3.2.2 的操作进行喷雾，并在喷嘴处用 500  $\mu\text{L}$  离心管收集喷雾液滴。喷雾全部完成后在离心管内加入 200  $\mu\text{L}$  含有 0.5%甲酸的乙腈溶液复溶沉淀，涡旋整个离心管直至沉淀完全溶解。之后取 10  $\mu\text{L}$  注射到 NanoESI 喷针顶端，进行产物 MS<sup>2</sup> 分析。

### 3.2.4 细胞的培养及收集

HeLa、A549、MCF7、SK-BR-3 四类细胞培养于含有 10%FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养基中。MDA-MB-468 细胞培养于含有 10%FBS 和 1%双抗的 L-15 培养基中。MCF10A 细胞培养于含有 5%马血清、10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素，20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  表皮生长因子，100  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  霍乱毒素和 1%双抗的 DMEM/F-12 (1:1) 培养基中。六类细胞的培养箱环境均为 37  $^{\circ}\text{C}$ ，含有 5%  $\text{CO}_2$ ，其中 MDA-MB-468 细胞培养皿需要封口以隔绝  $\text{CO}_2$ 。当收集细胞时，移去细胞培养基，在生长有  $10^6$  个细胞的 6 cm 培养皿中加入 2 mL DPBS 缓冲液冲洗细胞两次，移去缓冲液。之后加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液。室温下孵育一段时间后 (HeLa、A549、MCF7、MDA-MB-468、SK-BR-3 五类细胞约 3 分钟，MCF10A 细胞约 20 分钟)，将 1 mL 的细胞悬液转移至 1.5 mL 小管中。2000 rpm 离心 5 分钟后移去含有胰蛋白酶-EDTA 的上清液。之后加入 1 mL DPBS 缓冲液重悬细胞，2000 rpm 离心 5 分钟后移去上清液，细胞沉淀收集待用。

### 3.2.5 细胞前处理、DNA酶解及核苷衍生化的操作流程

收集的细胞中加入 200  $\mu\text{L}$  超纯水，涡旋混匀，之后在 90  $^{\circ}\text{C}$  的恒温混匀仪中 200 rpm 加热 10 分钟使细胞破裂。细胞悬液冷却后加入 20  $\mu\text{L}$  的 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Proteinase K 水溶液，涡旋混匀，在 58  $^{\circ}\text{C}$  的恒温混匀仪中 200 rpm 加热 1 小时，此步反应将染色体组蛋白酶解释放 DNA。之后将小管的盖子打开，继续在 100  $^{\circ}\text{C}$  的恒温混匀仪中 200 rpm 加热 20-30 分钟，直到管中细胞溶液仅余约 100  $\mu\text{L}$ 。合上小管盖子，迅速将小管置于冰水浴中 2 分钟。此时细胞 DNA 已解旋成单链，Proteinase K 也因高温失活。

涡旋小管将细胞溶液混匀,取其中 8  $\mu\text{L}$  于另一个新的 0.5 mL 的小管中,此时管中基因组 DNA 的量大约来自于  $10^5$  个细胞。在管中加入 1  $\mu\text{L}$  的  $10\times$  S1 核酸酶缓冲液 ( $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $280\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ ,  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ , pH 4.6) 和 1  $\mu\text{L}$  的  $180\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 S1 核酸酶,在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  的恒温混匀仪中 200 rpm 加热 4 小时。再加入 4  $\mu\text{L}$  的  $10\times$  碱性磷酸酶缓冲溶液 ( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Tris-HCl}$ ,  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , pH 9.0)、1  $\mu\text{L}$  的蛇毒磷酸二酯酶水溶液、0.3  $\mu\text{L}$  的  $30\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  碱性磷酸酶及 24.7  $\mu\text{L}$  超纯水,在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  的恒温混匀仪中 200 rpm 加热 1 小时。此时 DNA 已完全酶解为单核苷。紧接着在管中加入 160  $\mu\text{L}$  超纯水和 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷,涡旋 1 分钟进行液液萃取并沉淀蛋白,12000 rpm 离心 10 分钟。取水层后再加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷重复抽提一次。此时水相中为酶解得到的核苷。

大约 200  $\mu\text{L}$  的水层冷冻干燥约 4 小时直至水分完全升华。向管中再加入 200  $\mu\text{L}$  含有  $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 和  $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEA 的乙腈溶液,超声萃取 15 分钟。用进样针吸取萃取溶液,进样到气动喷雾装置中。按照 3.2.2 的操作进行喷雾,并在喷嘴处用 500  $\mu\text{L}$  离心管收集喷雾液滴。喷雾全部完成后在离心管内加入 200  $\mu\text{L}$  含有 0.5% 甲酸的乙腈溶液复溶沉淀,涡旋整个离心管直至沉淀完全溶解。之后取 10  $\mu\text{L}$  注射到 NanoESI 喷针顶端,进行产物  $\text{MS}^2$  分析。每种细胞做了 15 次平行实验。

### 3.2.6 工作曲线及定量

细胞中基因组 DNA 的 dC 和 5mdC 含量是通过外标法进行定量。配制了含有  $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、 $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ 、 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ 、 $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Tris-HCl}$  和  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  的水溶液以模仿细胞酶解液中的缓冲体系,加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷,涡旋 1 分钟进行液液萃取。取水层后再加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷重复抽提一次。大约 200  $\mu\text{L}$  的水层冷冻干燥约 4 小时直至水分完全升华。向管中再加入 200  $\mu\text{L}$  含有  $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 和  $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEA 的乙腈溶液,同时分别加入 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dC 以及 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  5mdC。按照 3.2.5 中的步骤模拟细胞实验完成萃取、喷雾衍生化和 NanoESI-MS 检测操作。每个浓度进行了 9 次平行实验。根据实验结果确定工作曲线范围,根据细胞实验检测结果计算每种细胞酶解产物中 dC 和 5mdC 含量,根据以下公式计算基因组 DNA 甲基化程度:

$$\text{DNA 甲基化程度 (\%)} = \frac{\text{5mdC 含量}}{(\text{dC 含量} + \text{5mdC 含量})} \times 100\%$$

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 小体积下胞苷类化合物的快速衍生化

将 dC 及 5mdC 进行化学衍生，在分子上加成一个 ESI-MS 下离子化效率很高的基团，之后再行质谱分析是一种高灵敏度检测 DNA 甲基化的策略。本节实验中发现，基于 BDAPE 的 2'-脱氧胞苷类化合物衍生化反应在小体积反应体系中速率可以得到很大程度的加速（图 3.1）。实验配制了含有  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dC 或 5mdC 和  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 的反应物混合乙腈溶液，以两种不同方式进行了衍生化反应：第一种方式是参考前人文献，将  $200 \mu\text{L}$  混合溶液放在小离心管中  $60^\circ\text{C}$  反应 6 小时；第二种方式是取  $10 \mu\text{L}$  反应物混合溶液滴加在封口膜疏水表面，在室温下等待 15 分钟左右至液滴完全蒸干沉淀，之后用  $10 \mu\text{L}$  乙腈将沉淀重溶。图 3.2a 和 b 分别是两种方式衍生产物的  $\text{MS}^2$  检测结果，可观测到 dC 的  $\text{MS}^2$  特征峰 ( $m/z = 255.1234$ ) 及 5mdC 的  $\text{MS}^2$  特征峰 ( $m/z = 269.1391$ )，精确质量数和理论计算的质量数偏差分别为  $2.4 \text{ ppm}$  和  $2.2 \text{ ppm}$ ，可确认为两个化合物在  $\text{MS}^2$  下脱去糖基的特征峰。比较两种反应方式的  $\text{MS}^2$  谱图，可看出小液滴的反应方式与常量反应方式得到了同样的衍生产物，且信号强度不亚于常量反应。这说明液滴小体积反应下的 BDAPE 衍生化反应产率不低于常量反应，且只需要温和的反应条件（室温下）和更短的反应时间。

从上述结果看，液滴小体积反应所得到的衍生产物信号强度略强于常量反应。其中的原因可能是：反应体系中添加的催化剂  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEA 离子化效率很高，对 NanoESI-MS 检测干扰很大。相比于常量反应，液滴小体积反应方式中，TEA 在液滴挥发的过程中也同时挥发了一些，从而减少了 TEA 对最终衍生产物检测的干扰。

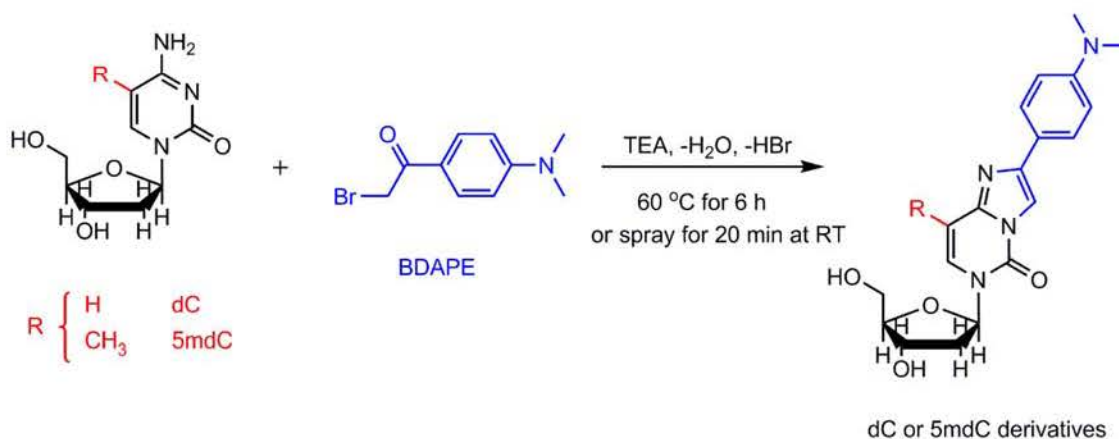


图3.1 基于BDAPE的胞苷类化合物衍生化反应。

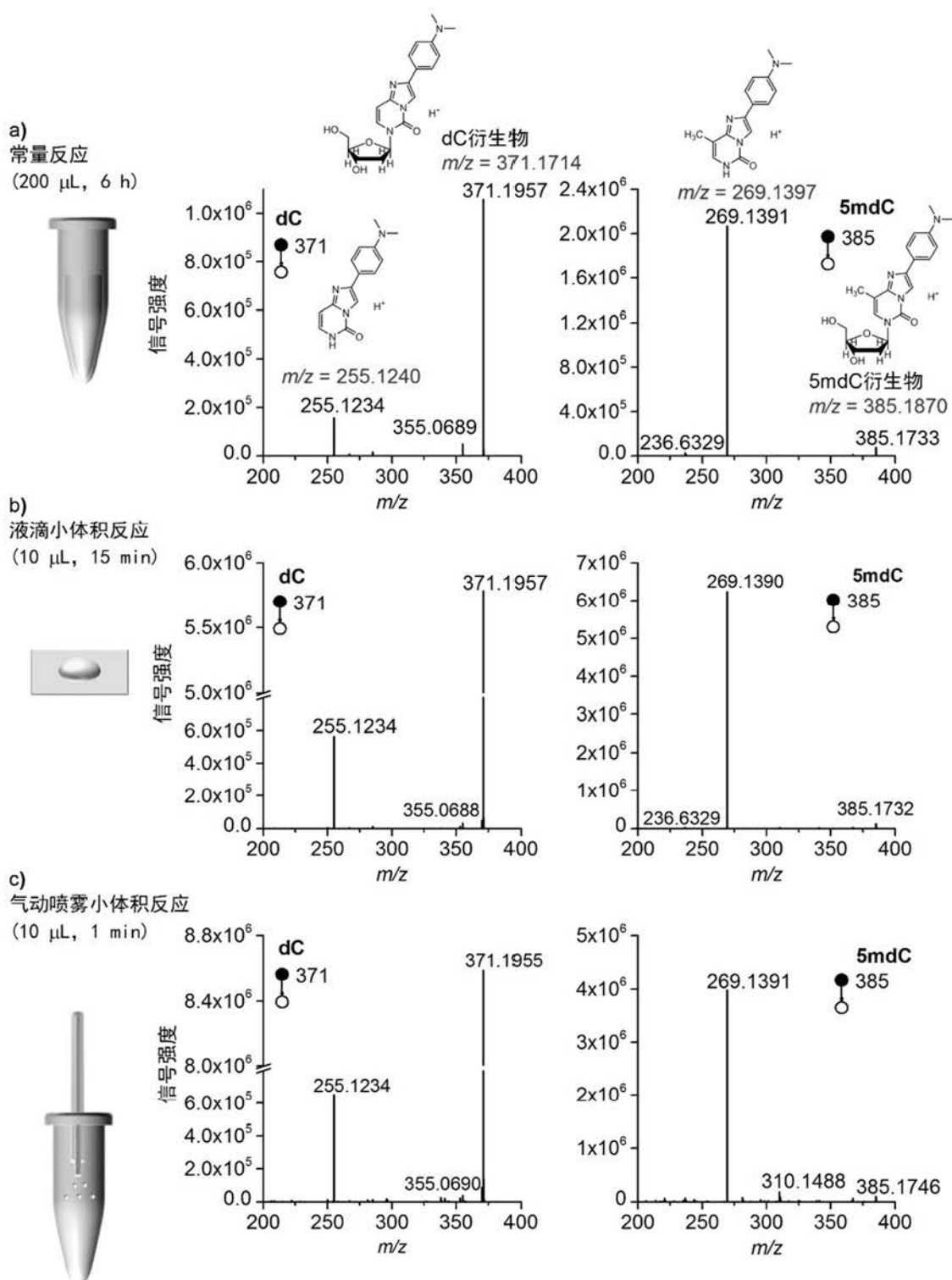


图3.2 运用 (a) 常量反应、(b) 液滴小体积反应和 (c) 气动喷雾小体积反应三种方式进行dC或5mdC和BDAPE的衍生化反应，之后采用NanoESI-MS进行产物分析的结果。

随后实验对液滴小体积反应的过程进行了仔细的研究，发现小体积反应速率的加快主要是开始于液滴接近完全干的阶段。实验同样配制了含有  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  5mdC 和  $4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 的反应物混合乙腈溶液，并取若干  $10 \mu\text{L}$  溶液滴加在封口膜疏水表面，室温下等待液滴自然蒸干。在滴加液滴后的不同挥发时间下，用  $100 \mu\text{L}$  乙腈重溶液滴停止反应，并使用 NanoESI 对反应产物进行检测。图 3.3 显示了不同挥发时间下液滴的照片，可以看出随着时间推移液滴在逐渐蒸干。图 3.4 是不同时间下重溶液滴后 NanoESI-MS 测得的 5mdC 衍生产物  $\text{MS}^2$  特征峰信号。结果显示在挥发进行的前 9 分钟，尽管液滴体积在逐渐缩小，但是 5mdC 衍生产物的信号并没有测到，这说明衍生化反应几乎没有发生。直到 9 分钟时衍生产物信号才显著增加，反应得到明显加速，直到第 14 分钟反应基本完成。对应于图 3.3 的照片，9 分钟恰好对应于液滴刚刚蒸干的时间点。这说明小体积反应速率的加快主要是开始于液滴接近完全干的阶段。

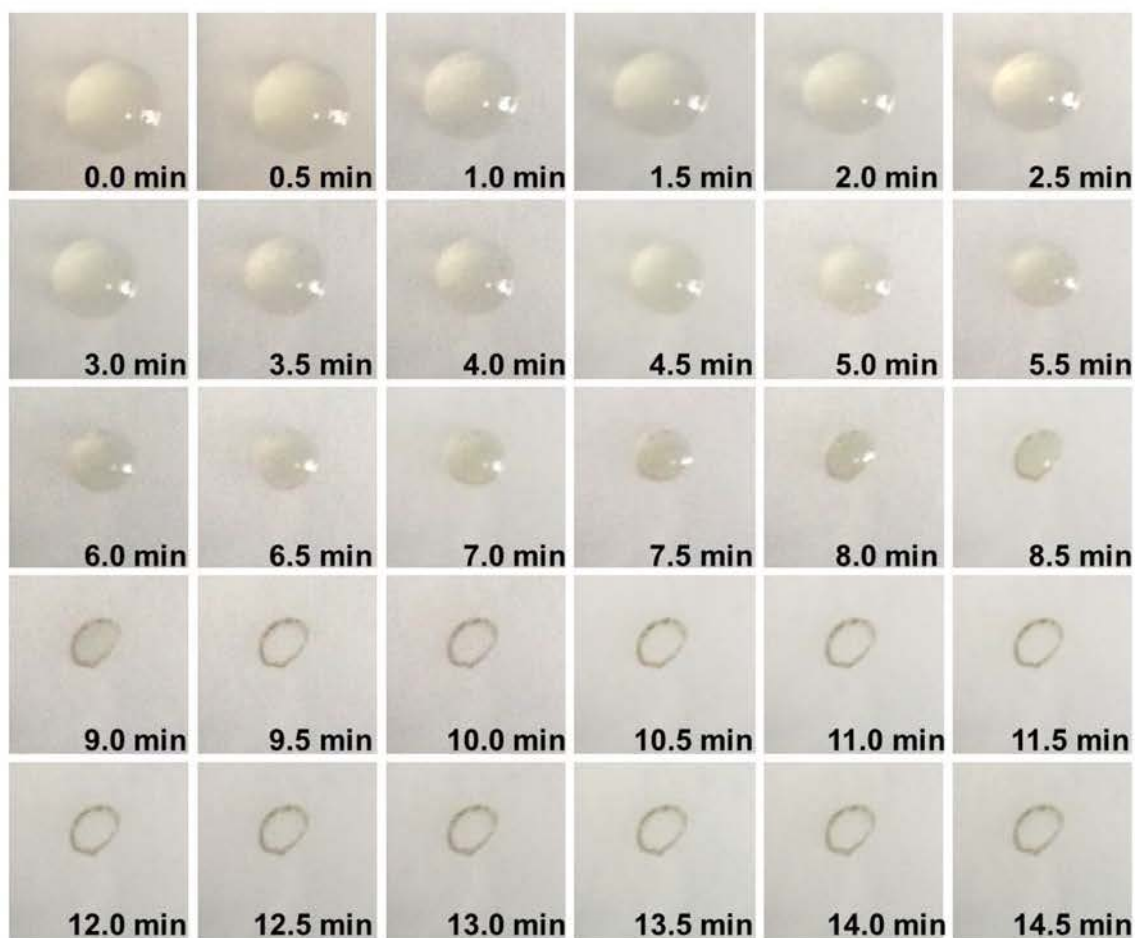


图3.3 液滴滴加后不同挥发时间下的照片（0.0 min时液滴为 $10 \mu\text{L}$ 的 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  5mdC和 $4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE的反应物混合溶液）。

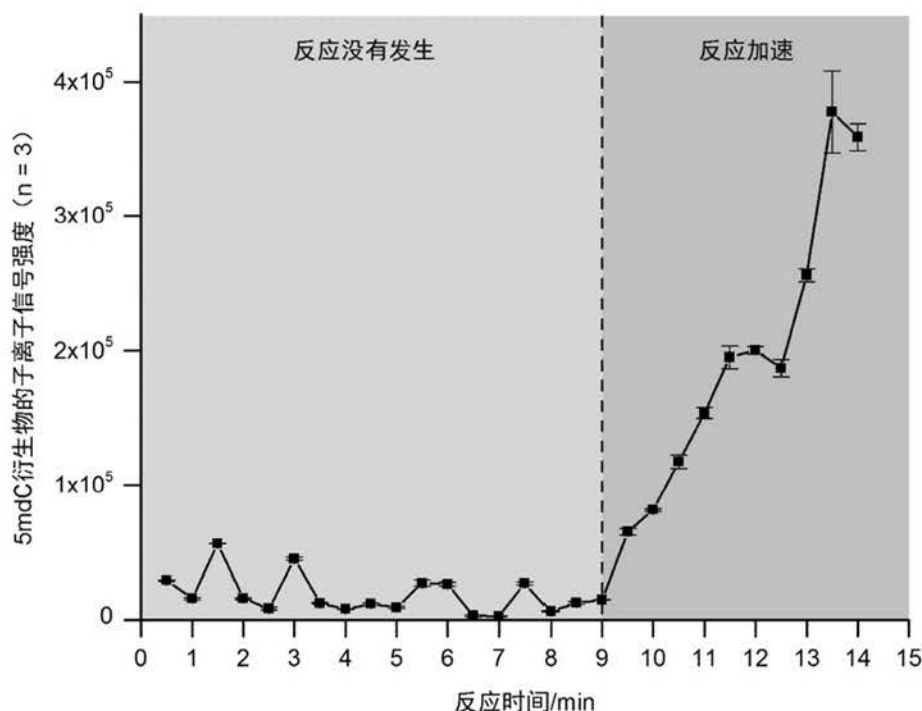


图3.4 液滴滴加后不同挥发时间下，用100  $\mu\text{L}$ 含有0.5%甲酸的乙腈溶液重溶液滴停止反应，并使用NanoESI-MS检测5mdC衍生化产物的信号（液滴为10  $\mu\text{L}$ 的50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  5mdC和4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE的反应物混合溶液）。

由上述结果，本研究推测小体积反应体系下推动反应加速的核心要素是相变的发生，而不主要是反应物浓度的升高。具体而言，由于溶剂乙腈的挥发，反应物逐渐析出，这导致反应物之间的分子距离相比于溶液中显著缩小，反应速率加快。

### 3.3.2 气动喷雾装置的结构和气动喷雾小体积反应方式的表现

既然小体积溶液在挥发过程中反应基本不会加速，反应加速主要发生在反应物接近蒸干的时间点，那么若能够将反应体系分散为大量更小的液滴，让溶剂挥发过程快速完成，则有可能加快整个反应过程，更快的完成反应。为了实现这一目的，本节实验设计了一个气动喷雾装置以产生大量小液滴（图 3.5）。这一装置由一个金属三通构成，三通一端旋紧内毛细管，相对的另一端旋紧外毛细管。内毛细管穿过整个三通和外毛细管，尾端伸出外毛细管 2 mm 构成喷嘴。三通最后一端旋紧金属管路并进一步连接气路。喷雾时，反应物混合溶液由内毛细管以  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速注入到喷嘴处。同时由金属管路通入 0.2 MPa 的  $\text{N}_2$ ， $\text{N}_2$  经过三通从内外毛细管间的空隙喷出。在  $\text{N}_2$  吹扫气的作用下，涌出喷嘴的溶液被分散为大量小液滴，形成喷雾。喷嘴外放置一小离心管以收集蒸干的小液滴。

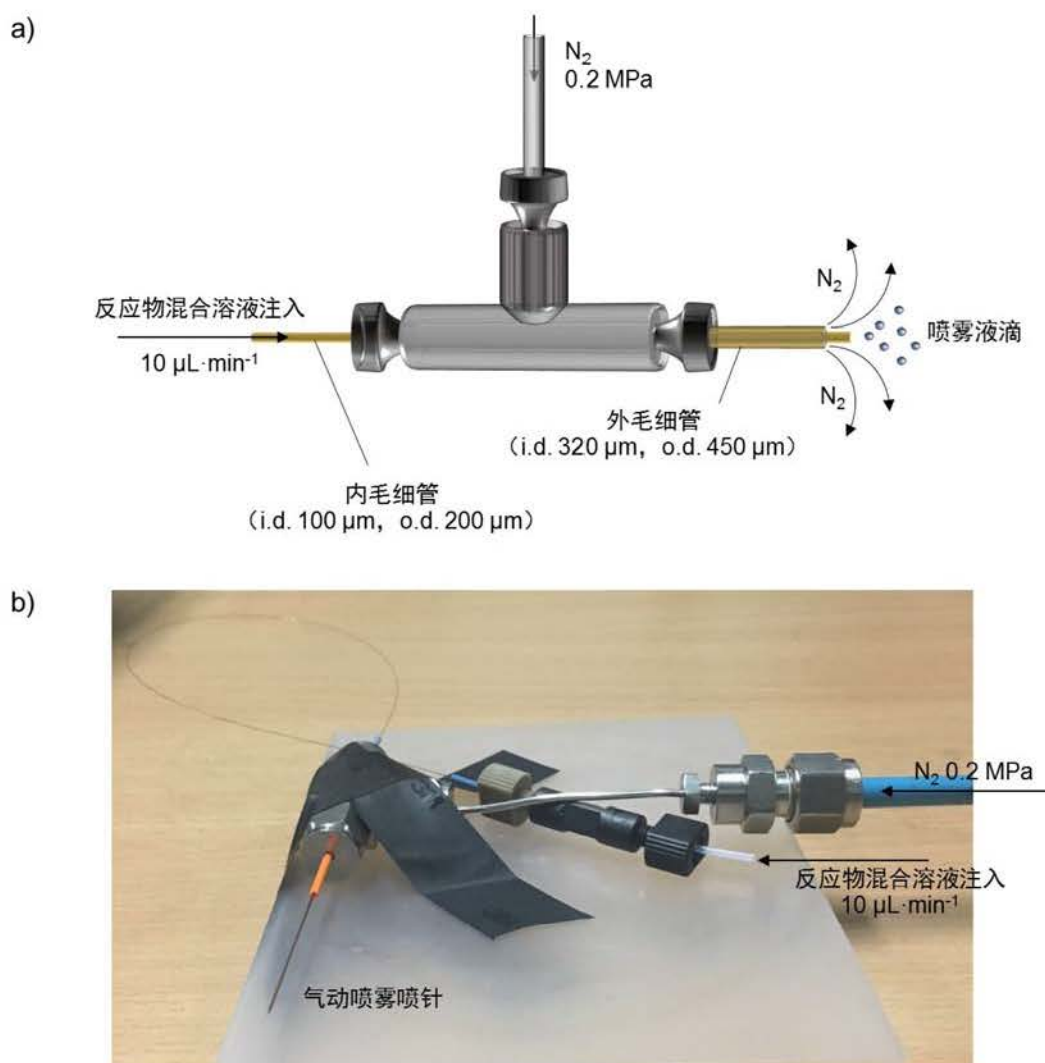


图3.5 气动喷雾小体积反应装置。(a) 示意图；(b) 实物图。

实验表明气动喷雾小体积反应装置有着和液滴小体积反应体系相似的反应产率。本研究又配制了含有  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dC 或  $5\text{mdC}$  和  $4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 的反应物混合乙腈溶液，用图 3.5 的喷雾装置喷雾了  $200 \mu\text{L}$  反应物溶液并用小管收集液滴沉淀。之后用  $200 \mu\text{L}$  乙腈重溶沉淀。图 3.2c 记录了产物溶液中衍生化产物的  $\text{MS}^2$  特征峰信号，三种反应模式下各浓度 dC 和  $5\text{mdC}$  的信号强度相差不多。这样的结果说明气动喷雾小体积反应模式与液滴小体积反应模式有着同样的反应产率。另一方面，气动喷雾装置可以在 1 分钟内完成  $10 \mu\text{L}$  的反应体系的反应，衍生化反应的速率相比于液滴反应进一步得到提高，且同样有着温和的反应条件。

表3.1 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dC及5mdC和4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE的反应物混合溶液,运用常量反应和气动喷雾反应分别完成衍生化过程后,dC及5mdC衍生物信号强度和检出限的比较。表最后一行的检出限是按照1  $\mu\text{L}$ 的进样量估算。

dC 或 5mdC 的浓度 ( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	dC 衍生物的 $\text{MS}^2$ 信号强度		5mdC 衍生物的 $\text{MS}^2$ 信号强度	
	常量反应	气动喷雾反应	常量反应	气动喷雾反应
50000	221000 $\pm$ 29000	543000 $\pm$ 85000	1260000 $\pm$ 290000	2780000 $\pm$ 210000
5000	58600 $\pm$ 2200	60500 $\pm$ 15900	160000 $\pm$ 18000	167000 $\pm$ 22000
500	1420 $\pm$ 339	1450 $\pm$ 97	9630 $\pm$ 2761	11900 $\pm$ 2100
50	232 $\pm$ 72	256 $\pm$ 68	748 $\pm$ 93	374 $\pm$ 87
检出限	32.2 fmol	29.3 fmol	10.0 fmol	20.0 fmol

本节研究进一步考察了气动喷雾小体积反应模式在低浓度反应物的情形下的表现,发现其与常量反应在检测灵敏度上基本保持一致。实验配制了5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dC及5mdC和4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE的反应物混合溶液,运用常量反应和气动喷雾反应依次完成了衍生化过程。图3.6a-d依次显示了dC和5mdC溶液在两种反应模式下的 $\text{MS}^2$ 特征峰谱图,表3.1列出了两种反应模式下各浓度dC及5mdC的信号强度。对比两种反应模式会发现在各个浓度下dC和5mdC信号强度比较接近,从检测灵敏度来看两者没有明显优劣。表3.1还根据50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dC及5mdC衍生物特征峰信噪比估算了两者在两种反应模式下的检出限。如果进样量按照1  $\mu\text{L}$ 计算,那么在此条件下,常量反应模式NanoESI-MS对dC及5mdC的检出限分别为32.2 fmol和10.0 fmol,气动喷雾小体积反应模式NanoESI-MS对dC及5mdC的检出限分别为29.3 fmol和20.0 fmol。两种反应模式的检出限相差不大。

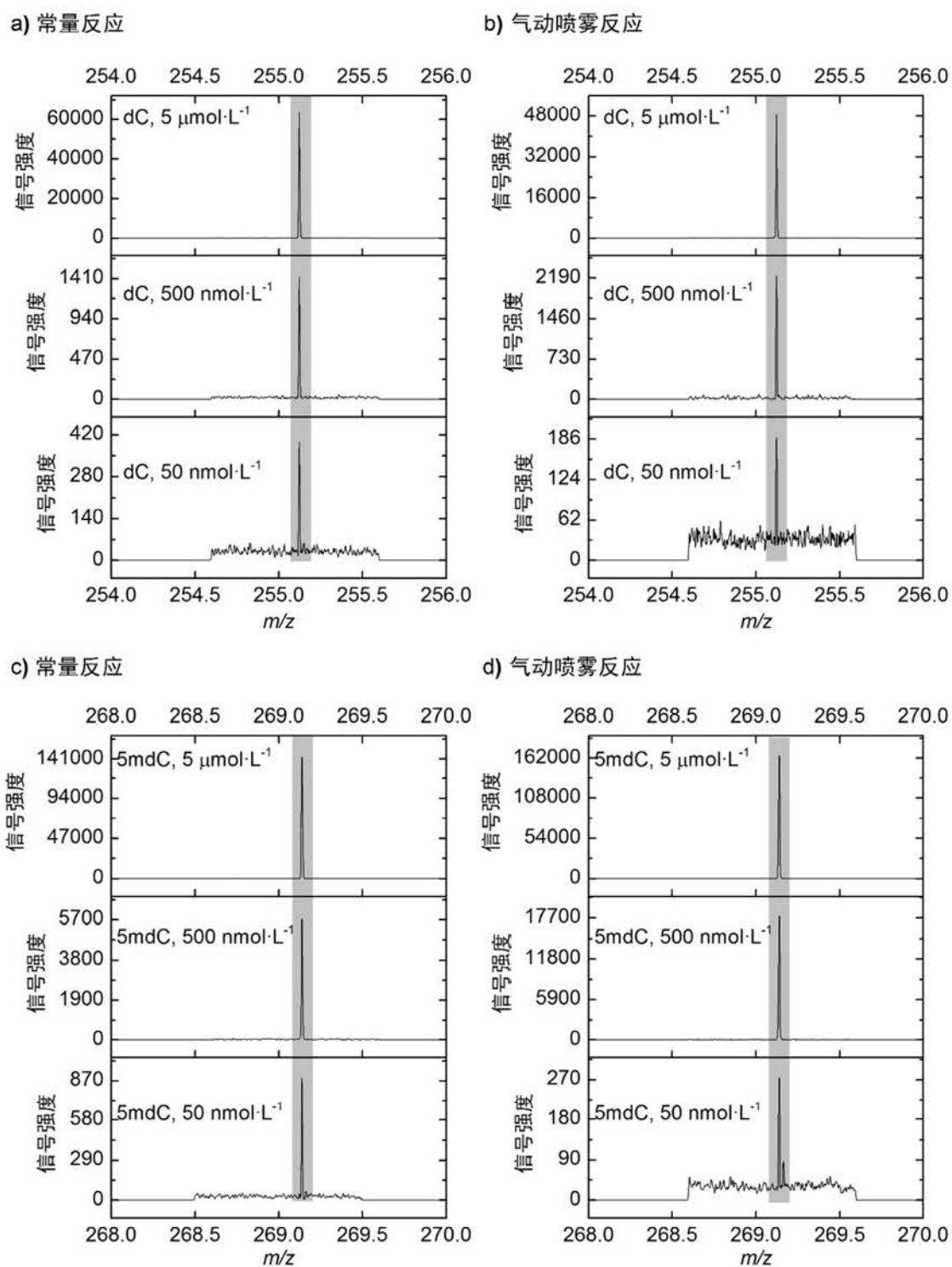


图3.6  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dC及5mdC和 $4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE的反应物混合溶液, 运用常量反应和气动喷雾反应分别完成了衍生化过程。(a) 常量反应模式下dC衍生化产物MS<sup>2</sup>特征峰谱图; (b) 气动喷雾小体积反应模式下dC衍生化产物MS<sup>2</sup>特征峰谱图; (c) 常量反应模式下5mdC衍生化产物MS<sup>2</sup>特征峰谱图; (d) 气动喷雾小体积反应模式下5mdC衍生化产物MS<sup>2</sup>特征峰谱图。

### 3.3.3 基于小体积衍生化反应的NanoESI-MS方法的灵敏度的提高

小体积反应的另一个优势是可以大大降低衍生剂的用量，从而降低衍生剂本身对衍生产物检测的干扰，进一步提高了灵敏度。本节做了如下实验来验证了上述思路的可行性。实验配制了如表 3.2 中“逐步降低 BDAPE 浓度的情况下”这一列所示的 5 份 5mdC 反应物混合溶液，其中 5mdC 的浓度依次 10 倍降低，BDAPE 和 TEA 的浓度也依次 10 倍降低。5 份溶液中 5mdC 和 BDAPE 的物质的量之比保持在 1:80，这一比例与 3.3.1 节中的常量反应和小体积反应一致。过量的 BDAPE 能够确保衍生化反应的产率，同时浓度又有所降低以尽可能减少基质效应。5 份溶液（各 200  $\mu\text{L}$ ）使用气动喷雾装置进行小体积反应了 20 分钟，5mdC 衍生化产物  $\text{MS}^2$  特征峰的 NanoESI-MS 检测谱图如图 3.7 所示，表 3.2 列出了相应信号强度。5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  5mdC 衍生化产物的特征峰的平均强度分别为  $2.64\times 10^6$  counts、 $5.00\times 10^5$  counts 和  $2.35\times 10^4$  counts。这三者的信号强度均强于使用 4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 来衍生化同样浓度 5mdC 的情形（分别为  $1.67\times 10^5$  counts、 $1.19\times 10^4$  counts 和 374 counts，表 3.2），信号强度分别提高了 16、42 和 63 倍。5  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 500  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mdC 衍生化产物的特征峰依旧可以检出，强度分别为  $7.90\times 10^3$  counts 和 654 counts，而相同浓度的 5mdC 在使用 4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BDAPE 衍生化后直接用 NanoESI-MS 检测已无法检出信号。500  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mdC 衍生化产物的  $\text{MS}^2$  特征峰的信噪比为 13，由此估算当逐级降低 BDAPE 浓度后，可以使气动喷雾小体积反应的 NanoESI-MS 检测对 5mdC 的检出限降低至 0.12  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按照纳喷雾 1  $\mu\text{L}$  的进样量计算，则绝对量的检出限可达到 0.12 fmol，相比于高浓度 BDAPE 的情形提高了 167 倍。

在常量反应中，前人研究报道衍生剂 BDAPE 的最佳浓度是 4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，之所以使用如此高浓度的衍生剂是因为：一方面要确保液相反应体系中 BDAPE 和反应物需要有足够的碰撞几率，另一方面要使衍生剂过量，促使衍生化反应向右移动。然而，小体积反应过程中溶剂不断挥发，换言之反应物和衍生剂浓度都在快速升高。因此本研究考虑小体积反应不需要使用常量反应中如此之高的衍生剂浓度就可以达到足够的反应速率和产率。尤其是当测定低浓度的 dC 或 5mdC 时，衍生剂浓度可相应大大降低。由于衍生剂本身在 NanoESI-MS 中离子化效率极高，对衍生产物的检测造成了比较强的基质效应。降低衍生剂浓度的好处在于减少了最后产物体系中基质效应的影响，实现灵敏度的进一步提高。在常量反应中这样的策略则不易实行，因为衍生剂浓度的降低将导致反应速率大大降低，需要更高的反应温度或更长的反应时间才能弥补。小体积反应的情形下降低衍生剂浓度则不需要付出如此代价。

表3.2 逐级降低BDAPE和TEA的浓度对各浓度5mdC溶液进行衍生化，并比较不同BDAPE浓度下5mdC衍生物的信号强度（n = 3）。表最后一行的检出限是按照1  $\mu\text{L}$ 的进样量估算。

5mdC 的浓度 ( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	使用 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BDAPE 的情况下		逐步降低 BDAPE 浓度的情况下		信号强度或检出限 的提高倍数
	BDAPE 和 TEA 的 5mdC 衍生物的 $\text{MS}^2$ 浓度 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	信号强度	BDAPE 和 TEA 的 5mdC 衍生物的 $\text{MS}^2$ 浓度 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	信号强度	
5000	4000	$167000 \pm 22000$	400	$2640000 \pm 200000$	16
500	4000	$11900 \pm 2100$	40	$500000 \pm 23000$	42
50	4000	$374 \pm 87$	4	$23500 \pm 600$	63
5	4000	n. d.	0.4	$7900 \pm 1580$	n/a
0.5	4000	n. d.	0.04	$654 \pm 106$	n/a
检出限		20.0 fmol		0.12 fmol	167

n. d., 未检出; n/a, 不适用。

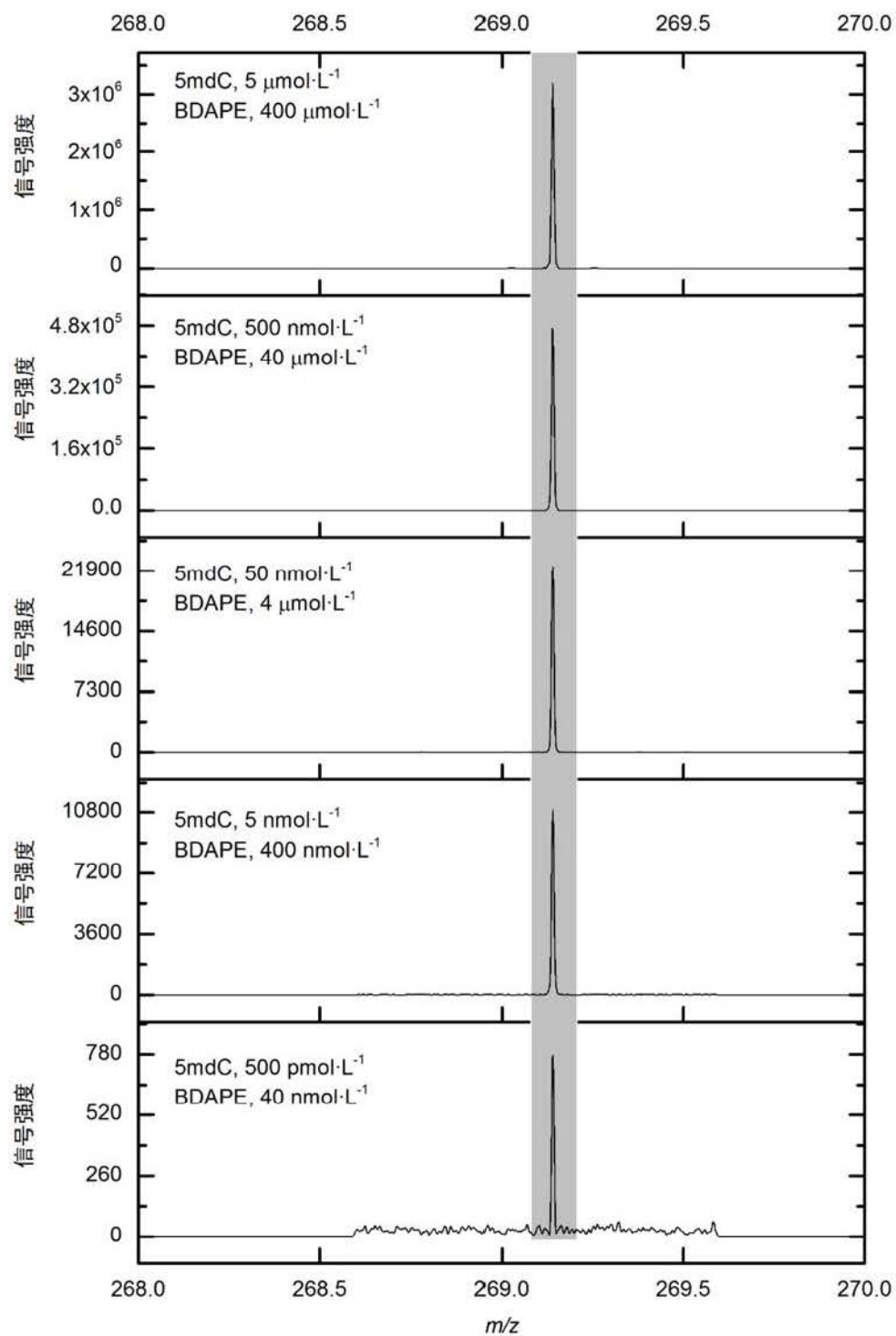


图3.7 使用低浓度BDAPE和TEA来衍生化低浓度5mdC后，衍生化产物NanoESI-MS检测的MS<sup>2</sup>谱图。

### 3.3.4 衍生剂BDAPE浓度的优化最佳值

在小体积衍生化反应中，衍生剂的用量实际上是寻求反应产率和基质干扰的平衡。理论上讲不同浓度范围的5mdC所对应的最佳衍生剂浓度应不同，表3.2所示的BDAPE浓度未必是最优的。接下来的实验中，实验选取 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的5mdC反应物溶液为例来优化BDAPE的浓度，以进一步论证优化衍生剂浓度对于最优化小体积衍生化反应检测灵敏度的重要性。实验在不同的BDAPE浓度下对5mdC做了衍生化，图3.8记录了不同浓度BDAPE下完成气动喷雾小体积衍生化反应后，所测得的5mdC衍生产物的 $\text{MS}^2$ 特征峰信号强度( $n=3$ )。显而易见最优化的BDAPE浓度是 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，这一浓度只是常量反应所需浓度的1%。当采用更高的BDAPE浓度(如 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时，BDAPE本身由于极强的离子化效率将对衍生产物的信号造成很大的抑制，从而得不到较好的信号。而采用更低的BDAPE浓度时，衍生化反应向右进行的趋势减弱会造成一部分产率的损失。

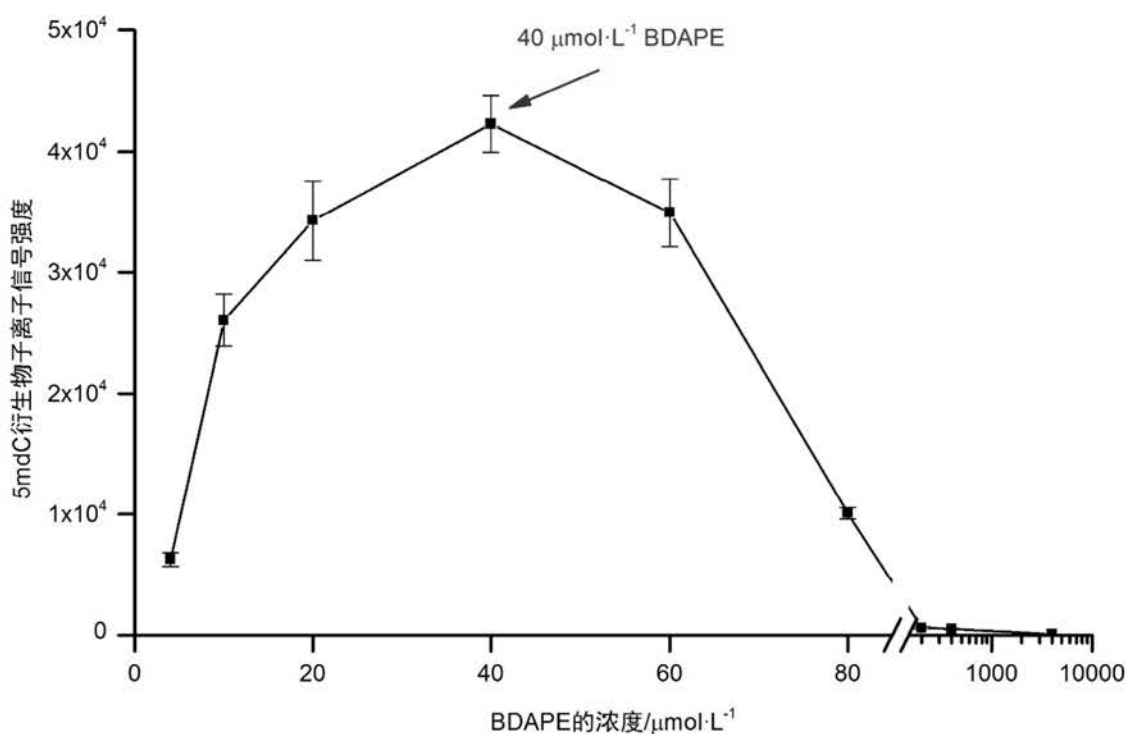


图3.8 以 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的5mdC反应物溶液为例优化衍生剂BDAPE的浓度。在4、10、20、40、60、80、200、400、4000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同浓度的BDAPE下完成气动喷雾小体积衍生化反应，监测5mdC衍生产物的 $\text{MS}^2$ 特征峰信号强度( $n=3$ )。图中 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳的BDAPE浓度。

## 3.3.5 基于小体积衍生化的多种细胞DNA甲基化程度检测

实验首先确定了 dC 及 5mdC 的工作曲线 (图 3.9)。dC 及 5mdC 的定量曲线分别为  $y = 45996x - 11452$  和  $y = 197.61x + 864.05$ ,  $R^2$  值分别为 0.9943 和 0.9868。

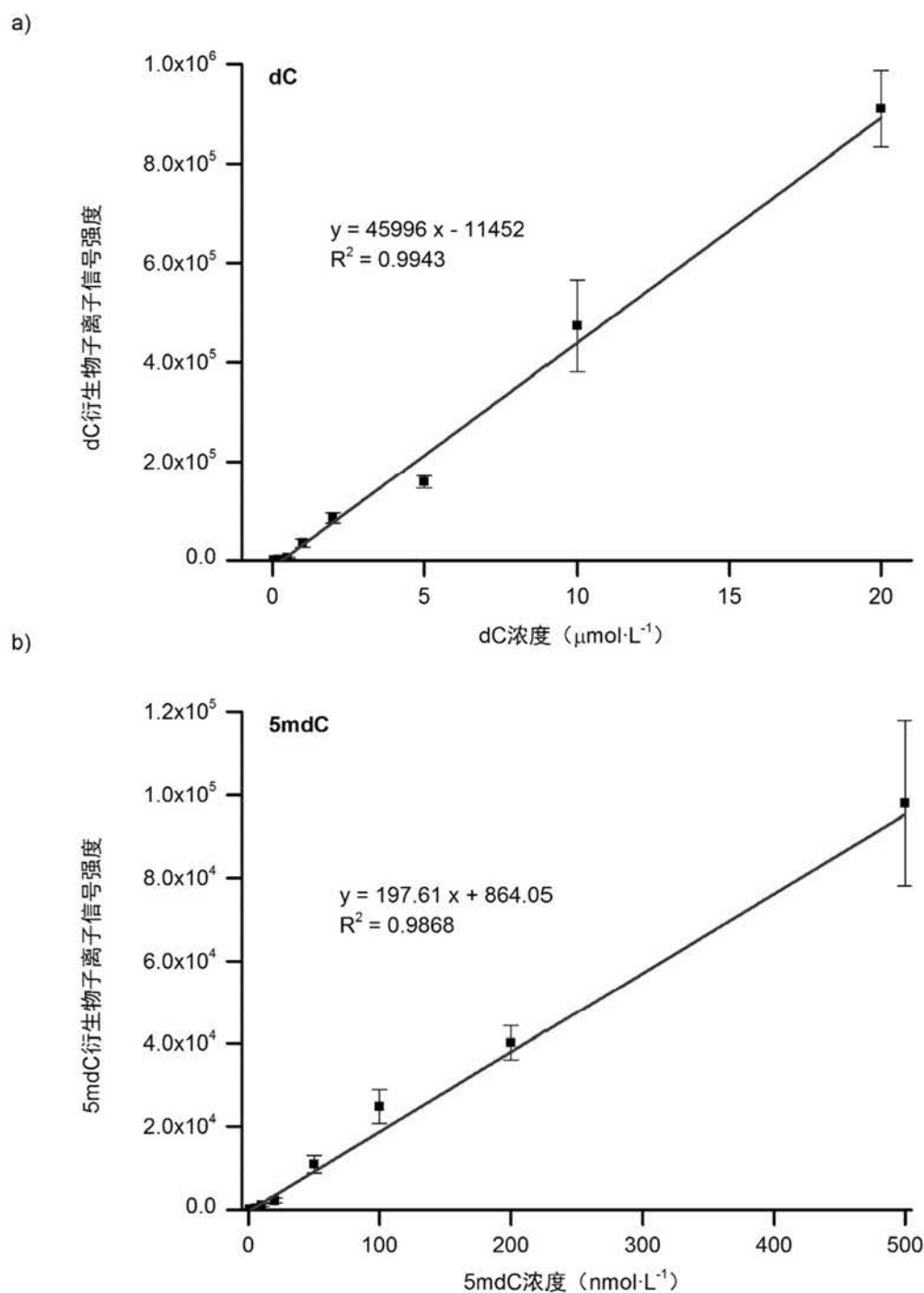


图3.9 定量工作曲线 ( $n = 9$ )。(a) dC; (b) 5mdC。

实验随后进一步按照 3.2.5 的步骤对 HeLa、A549、MCF10A、MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-468 这 6 种细胞系的基因组 DNA 甲基化程度进行了分析(图 3.10)。在小体积反应和 NanoESI-MS 直接检测的策略下,从细胞基因组 DNA 酶解完成到获得质谱检测结果,衍生化和检测过程仅需不到 30 分钟,相比于 HPLC-MS 的常规方法时间大大缩短。

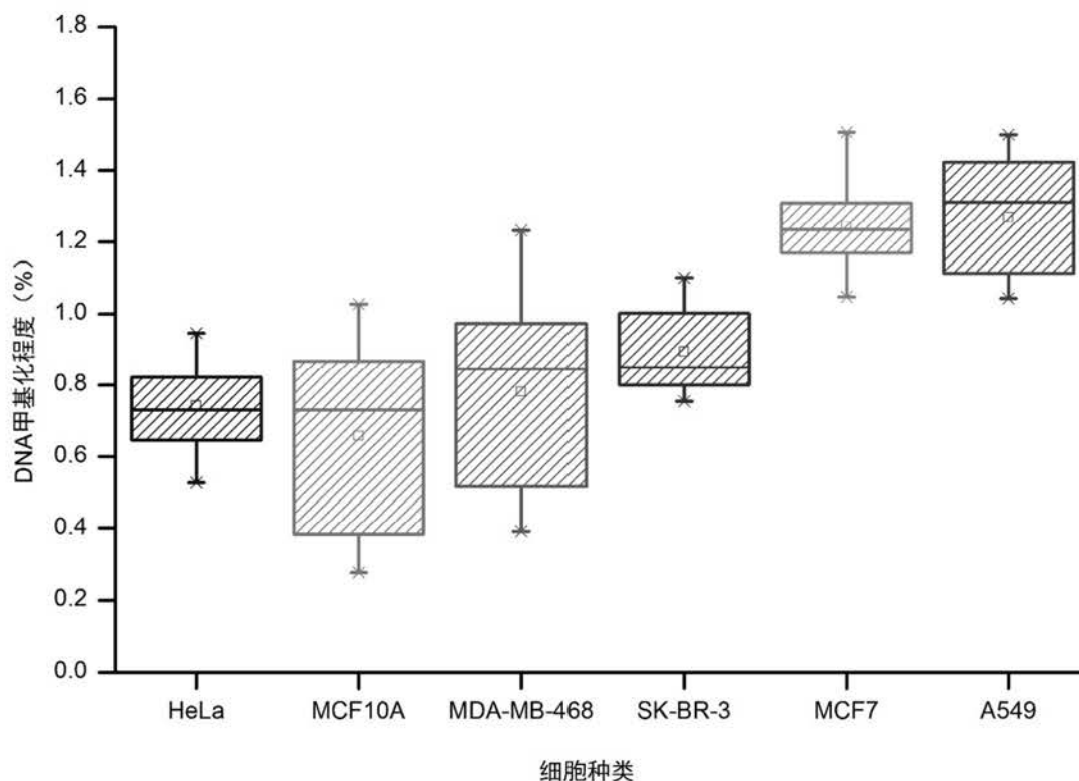


图3.10 运用气动喷雾小体积反应模式和NanoESI-MS技术对6种细胞的基因组DNA甲基化程度进行了分析 (n = 15)。

### 3.4 本章结论

本章发现了一类反应——即基于 BDAPE 对 dC 和 5mdC 的衍生化反应——可以在小液滴或气动喷雾的小体积反应体系下实现大幅度的反应加速。在这一发现的基础上,本章建立了一种基于小体积快速衍生化和 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化质谱快速检测方法。与基于 HPLC-MS 常量方法相比,这一方法中衍生化反应时间可缩短 360 倍,反应条件更为温和,且衍生剂所需浓度是常量反应的 1%,进而降低了衍生剂基质效应的影响,5mdC 检出限可达到 0.12 fmol。运用该方法,本章对

HeLa、A549、MCF10A、MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-468 这6种人类细胞的DNA甲基化程度进行了分析，由于采用了气动喷雾小体积的衍生化反应模式，分析时长大大缩短，更适用于实际临床应用。

## 第4章 离子重复富集-质谱法分析单细胞水平的 DNA 甲基化程度

### 4.1 本章引言

生命科学研究已经进入了单细胞时代，分析对象从群体细胞样品变为了单细胞尺度的样品<sup>[225,226]</sup>。这种变化意味着分析学家需要发展更多能够进行单细胞水平代谢组、转录组或蛋白质组学分析的方法<sup>[225, 226]</sup>。在这个浪潮中，DNA 甲基化分析也从群体细胞水平走向了单细胞水平，这是因为单细胞水平的 DNA 甲基化程度信息对于癌症早期诊断和预后评价均有很大价值<sup>[227]</sup>。从目前主流分析方法来看，质谱因其无需标记的特点、以及多组分分析的能力已然成为了单细胞分析的重要方法之一<sup>[228-230]</sup>。目前已有的单细胞质谱方法包含基于 ESI-MS 的方法<sup>[227, 231-242]</sup>、基于激光解吸附电离质谱（Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, MALDI-MS）的方法<sup>[243-247]</sup>和基于二次离子质谱的方法<sup>[243, 248, 249]</sup>等等。尽管激光剥蚀电喷雾<sup>[245, 246]</sup>、探针电喷雾<sup>[234-237]</sup>、直接电喷雾<sup>[241, 242]</sup>等少数方法可以做到样品不稀释直接检测，但大部分的单细胞质谱技术通常在检测前需要将单细胞（约 10 pL）稀释到一个较大的体积（nL- $\mu$ L 级别）。这样的稀释通常发生在细胞裂解、溶剂萃取等样品前处理过程中。以基因组 DNA 甲基化程度分析为例，细胞裂解、DNA 提取、酶解等操作通常是在  $\mu$ L 级别的溶液中进行。样品前处理阶段的稀释最终会导致待测物浓度的降低。浓度的降低即意味着研究者需要进一步提高商品化质谱的灵敏度才有可能检出低浓度待测物的信号。

低浓度的分子之所以无法检出，并不是因为分子没有被离子化，而是因为离子源产生的离子总量过少。如果有办法获取更多的离子并将其传输至质量分析器，那么检测低浓度物质就会成为可能<sup>[250]</sup>。很多前人的研究已经通过直接或间接的增加离子总量来提高质谱的灵敏度。例如，激光诱导后电离技术可以通过提高离子产率来提高 MALDI-MS 的灵敏度，这一策略对于脂质、脂溶性维生素、和多糖类分子均效果显著<sup>[251]</sup>。在离子回旋共振质谱中联用射频电离技术可以高效的产生离子，从而提高挥发性和半挥发性有机分子的检测灵敏度<sup>[252]</sup>。利用报告分子标记的金微球来捕获蛋白质分子，可以实现目标蛋白质的阿摩尔级别检测<sup>[253]</sup>。除此之外，之前曾有研究报道离子阱拥有选择性的捕获和累积离子的潜能，从而可以提高质谱的灵敏度<sup>[254,255]</sup>，例如，王玉琢等设计了一套空间串联离子阱质谱仪，可实现离子

选择性传输与富集,三次选择性离子富集可达到 222%的离子捕获效率<sup>[254]</sup>。这样的研究结果为本章研究提供了一条思路,即可以研究一种基于离子阱富集离子的质谱技术来提高质谱的检测灵敏度,进而实现单细胞中 Cyt、5mCyt 等低浓度组分的检测。

本章研究了基于离子重复富集技术和 NanoESI-MS 的单细胞水平质谱分析方法。这一方法是一种基于离子阱离子富集能力的质谱技术。研究对商品化的离子阱质谱进行了改造,改变扫描函数使离子阱可以重复多次的富集某一特定质荷比的离子,实现了对低浓度离子的富集。通过线性离子阱的 1.8 秒 25 次富集,包括 Cyt、5mCyt、5hmCyt、N6mAde 在内的多类型的离子检测灵敏度可提高 3-22 倍。通过应用这一技术,本研究实现了对 0.2 个 MCF7 单细胞水平的基因组 Cyt 和 5mCyt 含量的检出。与其他分离技术联用,离子重复富集技术不仅在包括 DNA 甲基化分析的单细胞分析领域有广阔应用前景,而且有潜力应用于未知 DNA 修饰类型的发现。

## 4.2 实验部分

### 4.2.1 仪器和材料

利血平、5mCyt、血管紧张素 II、苹果酸、腺苷三磷酸(Adenosine Triphosphate, ATP)、Ade、Cyt 标准品,以及甲醇、甲酸、醋酸铵标准品均购买自 Sigma-Aldrich 公司。咖啡因标准品购买自 Chem Service 公司。伊马替尼标准品购买自北京百灵威科技有限公司。MCF7 细胞购买于 ABGENT 公司。细胞培养所需的培养基、DPBS 等试剂均购买自 Corning 公司。实验中使用的纯水是由 ThermoFisher 公司的纯水机纯化得到。搭建 NanoESI-MS 管路和定量环的毛细管购买于 SGE Analytical Science 公司(管路用的毛细管内径 100  $\mu\text{m}$ , 外径 363  $\mu\text{m}$ , 定量环用的毛细管内径 25  $\mu\text{m}$ , 外径 285  $\mu\text{m}$ , 图 4.1)。商品化的 NanoESI 的喷针购买自 SilicaTip 公司,型号为 FS360-75-10-N-20-C12, 针尖直径  $10 \pm 1 \mu\text{m}$ 。

所有的质谱数据是由一台双压线性离子阱质谱仪采集(型号 Orbitrap Elite, Thermo Scientific 公司)。本章中所有检测仪使用离子阱作为检测器。质谱参数如下: NanoESI 为正离子模式+1.80 kV, 或负离子模式-1.80 kV; 离子传输管温度为 300  $^{\circ}\text{C}$ ; S-lens RF level 为 65%; Microscans 为 1; AGC 模式始终关闭。实验中使用了商品化的 NanoESI。NanoESI 针尖距离质谱进样口的距离约为 5 mm。样品由一个恒流泵注入,流速为  $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。



图4.1 自行搭建的定量环装置。

#### 4.2.2 质谱扫描函数的更改

考虑到离子阱质谱的扫描函数是非常复杂的，其中许多参数是系统自动优化，因此实现离子重复富集的最佳策略是在不改变每一参数值的情况下改变扫描函数。在本章中，实际上离子重复富集技术的实现仅仅是将离子注入、离子隔离的原始参数进行拷贝，反复加入到 CID 的扫描函数之前，以实现选定离子在离子阱内的逐渐富集。

本章开发了一款名为 ITCL 的软件（附录 A 中详细介绍操作流程）。这款软件将原始质谱扫描函数当作模板。当进行离子重复富集功能时，软件将离子初始化、离子注入和离子隔离的扫描参数（共 16 段扫描函数）进行拷贝，并多次反复插入到质谱扫描序列中。每多重复 16 段扫描函数意味着母离子在离子阱中多富集一次循环。后续的 CID 和质量分析的扫描函数保持不变。通过以上流程最终实现了离子在离子阱内的重复富集。在本章中，离子重复富集至多只能有 25 个循环，这主要受限于商品化质谱仪的内存限制。使用 ITCL 的一个好处在于普通检测模式和离子重复富集检测模式可以自由切换，并不会对质谱的硬件造成任何影响。

### 4.2.3 离子注入时间的优化

离子注入时间这一参数对于最大化的实现离子重复富集至关重要。以  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mCyt 溶液为例，在  $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  流速的 NanoESI-MS 检测中，其在普通检测模式下离子注入时间为 15 ms 时信号得到最优化。但当开启 25 次循环的离子重复富集检测模式时，离子注入时间需要调整至 5 ms 才能得到最优化的信号（图 4.2）。本章中讨论的所有实验结果都是在最优化的离子注入时间下得到的。

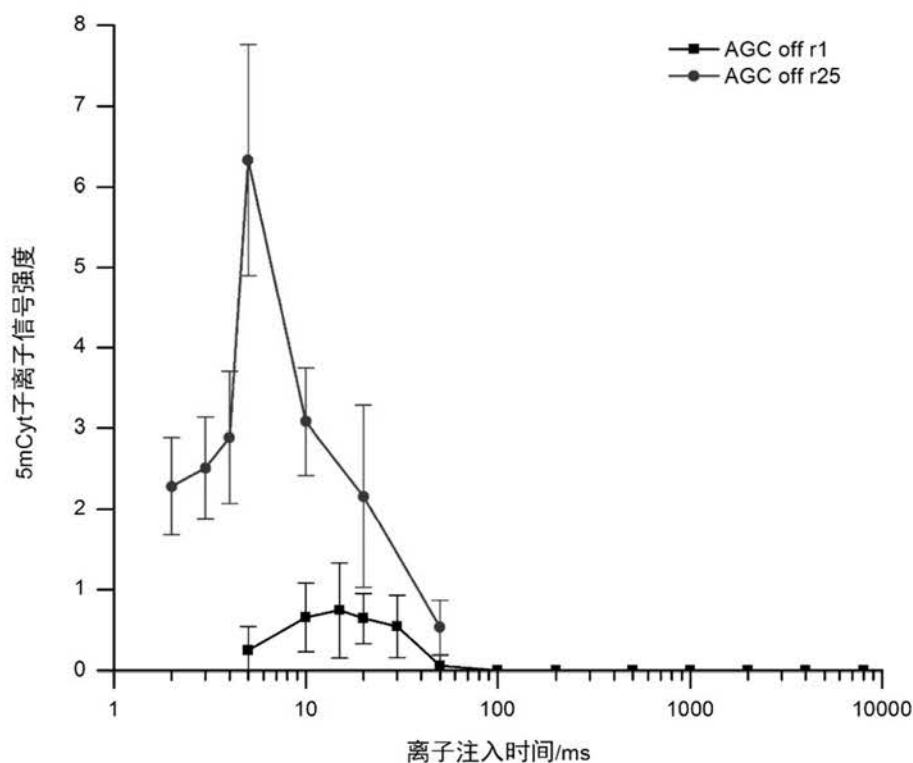


图4.2 离子注入时间的优化（以  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mCyt 溶液为例）。在普通检测模式下和 25 次循环的离子重复富集检测模式下， $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$  的信号强度随离子注入时间的变化。

### 4.2.4 离子重复富集检测模式和普通检测模式的对比

5mCyt、Cyt、利血平、咖啡因、血管紧张素 II、Ade 标准溶液是配制在添加有 0.1% 甲酸的甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ ) 中。苹果酸、ATP 标准溶液是配制在添加有  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸铵的甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ ) 中。所有离子是在最优化的离子注入时间、NCE 和 activation Q 参数下由 NanoESI-MS 测定（表 4.1）。当进行离子重复富集检测时，循环的富集次数设为 25 次。

#### 4.2.5 细胞培养和酸解

MCF7 细胞培养于含有 10%FBS 和 1%双抗的 DMEM 培养基中。培养箱环境为 37 °C，含有 5% CO<sub>2</sub>。当收集细胞时，移去细胞培养基，在生长有 10<sup>6</sup> 个细胞的 6 cm 培养盘中加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液。室温下 3 分钟孵育后，1 mL 的细胞悬液转移至 1.5 mL 小管中。2000 rpm 离心 10 分钟后移去含有胰蛋白酶的上清液。剩余的细胞沉淀用 1 mL 0.9%NaCl 水溶液重悬并进行细胞计数。从其中吸取 1.0 × 10<sup>6</sup> 细胞至新的小管中并在 2000 rpm 下离心 10 分钟，去上清液。之后加入 1 mL 甲酸溶解细胞。将全部溶液转移至玻璃瓶中，在马弗炉中 140 °C 酸解 1.5 小时。反应结束后剩余的甲酸在 60 °C 真空干燥箱内烘干。之后加入 1 mL 甲醇萃取其中 5mCyt、Cyt 和 Ade。之后将萃取液稀释 500 倍，折算后细胞浓度约为每毫升 2000 个细胞。

#### 4.2.6 单细胞水平的DNA甲基化分析

为了实现单细胞水平的进样量，实验截取了 20 cm 长的内径为 25 μm 外径为 285 μm 的毛细管作为六通阀上的定量环，经过计算其容积约为 98 nL (图 4.1)。依照 4.2.4 的细胞处理流程，500 nL 细胞酸解液含有大约 1 个细胞的量。将上述酸解液充满定量环则相当于进样了 0.2 个 MCF7 细胞的量。通常而言，一个 MCF7 单细胞的体积大约是 4 pL，因此在样品前处理过程中细胞被稀释了约 10<sup>5</sup> 倍。在进行单细胞水平的 5mCyt、Cyt 和 Ade 检测时，MS<sup>3</sup> 质谱条件已经由标准溶液进行了优化 (表 4.2)。单细胞水平进样是采用六通阀和手工制备的定量环进样约 100 nL 的细胞裂解液。

伊马替尼定量实验是配制了 0.5、5、50、500、2000、5000 nmol·L<sup>-1</sup> 这 6 个浓度的标准溶液，每一种溶液都加入了 100 nmol·L<sup>-1</sup> 的伊马替尼-d<sub>8</sub> 做内标。MS<sup>2</sup> 的母离子隔离宽度设为了 12 以便 [Imatinib + H]<sup>+</sup> (*m/z* = 494.4) 和 [Imatinib-d<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup> (*m/z* = 502.4) 两个离子能同时隔离到离子阱中。回收率的计算是将 300 nmol·L<sup>-1</sup> 伊马替尼和 100 nmol·L<sup>-1</sup> 伊马替尼-d<sub>8</sub> 同时加入到细胞酸解液中，再进行计算。

表4.1 普通检测模式及离子重复富集模式下各离子离子注入时间、NCE和activation Q的最优化值。

母离子或子离子	NCE (eV)	Activation Q	离子注入时间 (ms)	
			普通检测 模式	离子重复富 集检测模式 <sup>[a]</sup>
[5mCyt + H] <sup>+</sup>	0	-	15	5
[5mCyt - NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	45	0.55	15	5
[5mCyt - NH <sub>3</sub> - HCN + H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> : 35 MS <sup>3</sup> : 25	MS <sup>2</sup> : 0.25 MS <sup>3</sup> : 0.35	15	5
[Reserpine + H] <sup>+</sup>	0	-	15	3
[Reserpine - C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ON + H] <sup>+</sup>	30	0.25	15	3
[Reserpine - C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> + H] <sup>+</sup>	30	0.25	15	3
[Angiotensin + H] <sup>+</sup>	0	-	100	100
[Angiotensin - NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	30	0.25	100	100
[Angiotensin - Asp + H] <sup>+</sup>	30	0.25	100	100
[Angiotensin - Phe + H] <sup>+</sup>	30	0.25	100	100
[Angiotensin - Phe - Pro + H] <sup>+</sup> <sup>[b]</sup>	30	0.25	100	100
[Angiotensin + 2H] <sup>2+</sup>	0	-	400	20
[Angiotensin - Phe - Pro + H] <sup>+</sup> <sup>[c]</sup>	20	0.25	400	20
[Pro - Phe + H] <sup>+</sup>	20	0.25	400	20
[Caffeine + H] <sup>+</sup>	0	-	10	3
[Caffeine - CH <sub>3</sub> CNO + H] <sup>+</sup>	35	0.25	10	3
[Caffeine - CH <sub>3</sub> CNO - CO + H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> : 35 MS <sup>3</sup> : 25	MS <sup>2</sup> : 0.25 MS <sup>3</sup> : 0.35	10	3
[Malic acid - H] <sup>-</sup>	0	-	25	20
[Malic acid - H <sub>2</sub> O - H] <sup>-</sup>	25	0.25	25	20
[ATP - H] <sup>-</sup>	0	-	25	25
[ATP - H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - H] <sup>-</sup>	20	0.25	25	25

[a] 指 25 次循环的离子重复富集模式； [b] 解离自[Angiotensin + H]<sup>+</sup>； [c] 解离自[Angiotensin + 2H]<sup>2+</sup>。

表4.2 普通检测模式及离子重复富集模式下单细胞水平样品中各离子离子注入时间、NCE和activation Q的最优化值。

子离子	NCE (eV)	Activation Q	离子注入时间 (ms)	
			普通检测 模式	离子重复富集 检测模式 <sup>[a]</sup>
[Ade - NH <sub>3</sub> - HCN + H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> : 50	MS <sup>2</sup> : 0.50	25	5
	MS <sup>3</sup> : 40	MS <sup>3</sup> : 0.50		
[Cyt - NH <sub>3</sub> - HCN + H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> : 45	MS <sup>2</sup> : 0.55	20	5
	MS <sup>3</sup> : 30	MS <sup>3</sup> : 0.45		
[5mCyt - NH <sub>3</sub> - HCN + H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> : 45	MS <sup>2</sup> : 0.55	20	5
	MS <sup>3</sup> : 30	MS <sup>3</sup> : 0.45		
[Imatinib - C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> + H] <sup>+</sup>	40	0.25	-	0.5
[Imatinib-d <sub>8</sub> - C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> + H] <sup>+</sup>				

[a] 指 25 次循环的离子重复富集模式。

## 4.3 结果与讨论

### 4.3.1 离子阱内离子的多次循环富集

在一次普通离子阱串联质谱二级扫描过程中，由离子源产生的离子会经过八级杆注入至高压离子阱中，设定的母离子会由离子阱隔离出来。之后母离子在高压阱中完成 CID 碰撞，子离子传输至低压离子阱进行质量分析（图 4.3a）。而在本章的方法中，离子阱串联质谱仪的扫描函数被更改，使得离子阱将某一特定质荷比的母离子隔离后先不进行 CID 碰撞或进入低压阱进行质量分析，而是再重复八级杆注入离子和高压阱隔离离子的过程，再隔离一批母离子在高压阱中（图 4.3b）。经过反复多次重复离子注入和隔离的循环，高压阱中的母离子得到多轮富集，之后再再进行 CID 碰撞和质量分析，信号表现出较大提高。

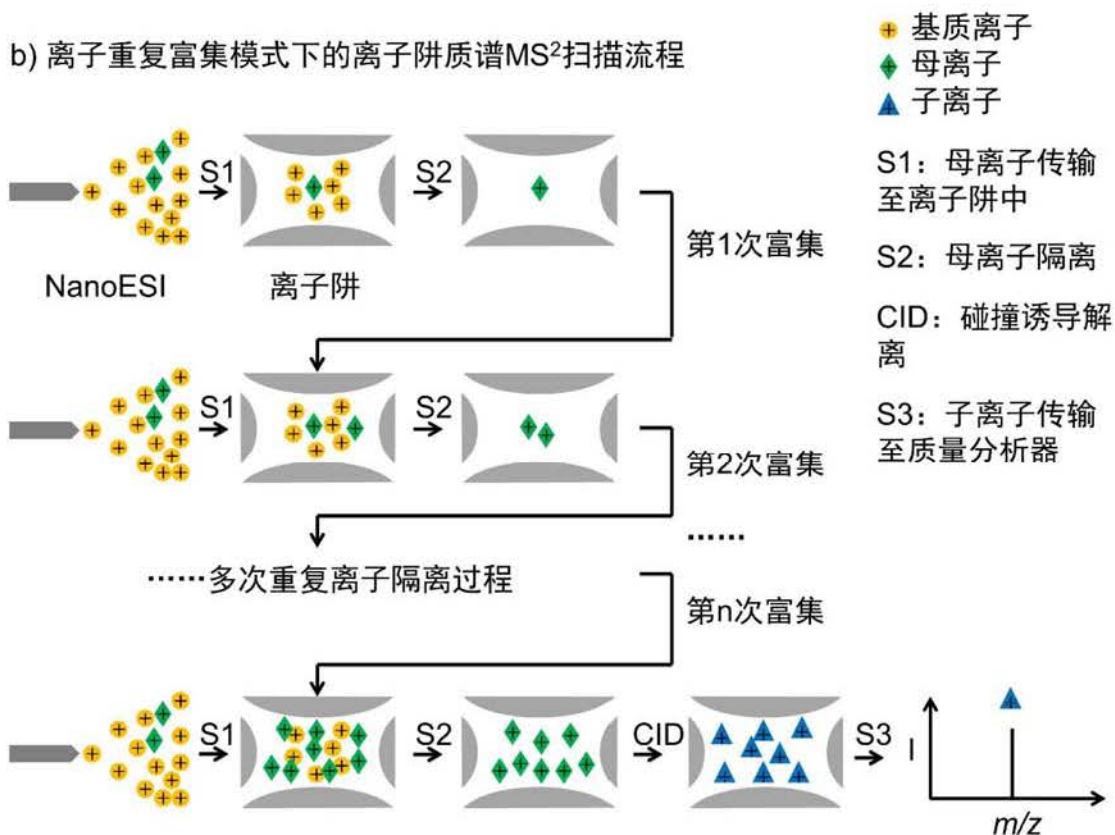
a) 通常模式下的离子阱质谱MS<sup>2</sup>扫描流程b) 离子重复富集模式下的离子阱质谱MS<sup>2</sup>扫描流程

图4.3 离子重复富集技术的原理示意图。(a) 一次普通离子阱串联质谱二级扫描过程；(b) 离子重复富集技术的流程示意。

为了证明随着离子注入和隔离循环次数的增加离子确实得到了富集，本节进行了如下实验。实验配制了  $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 5mCyt 和  $10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的利血平标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有 0.1% 甲酸)，之后设定不同的重复富集循环次数进行扫描 (1-25 次)。图 4.4a 和图 4.5a 分别显示了  $[5\text{mCyt} + \text{H}]^+$  和  $[\text{Reserpine} + \text{H}]^+$  在重复富集 1 个、5 个、10 个、15 个、20 个和 25 个循环时的质谱图。实验结果表明随着重复次数的增加离子信号不断提高 (图 4.4, 图 4.5)。

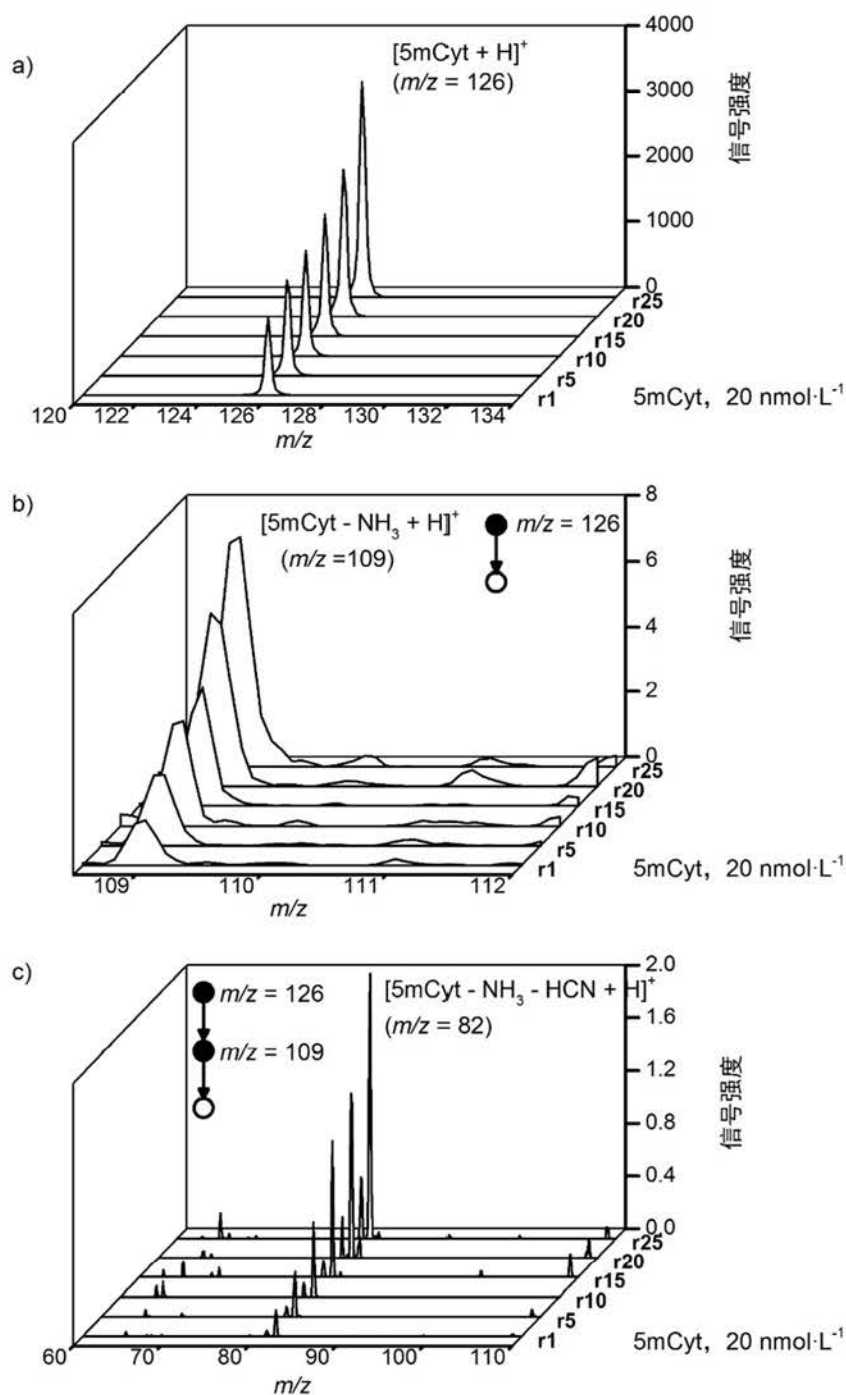


图4.4 应用离子重复富集技术对 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的5mCyt标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有0.1%甲酸) 进行质谱检测。(a) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时 $[5mCyt + H]^+$ 的质谱图; (b) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时二级离子 $[5mCyt - NH_3 + H]^+$ 的质谱图; (c) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时三级离子 $[5mCyt - NH_3 - HCN + H]^+$ 的质谱图。

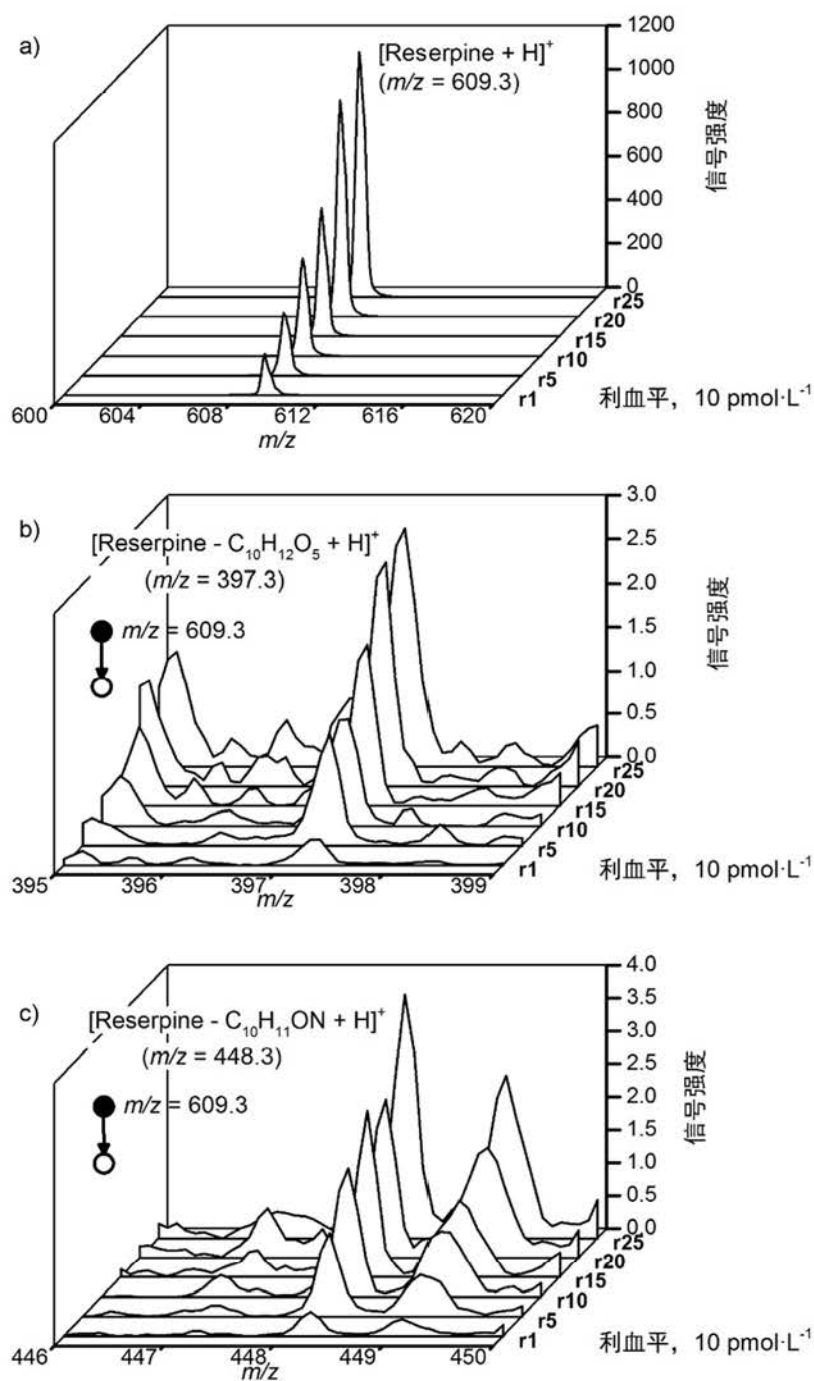


图4.5 应用离子重复富集技术对10 pmol·L<sup>-1</sup>的利血平标准甲醇/水溶液 (v/v = 1:1, 含有0.1%甲酸) 进行质谱检测。(a) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时[Reserpine + H]<sup>+</sup>的质谱图; (b) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时二级离子[Reserpine - C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup>的质谱图; (c) 在富集1个、5个、10个、15个、20个和25个循环 (r1-r25) 时二级离子[Reserpine - C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ON + H]<sup>+</sup>的质谱图。

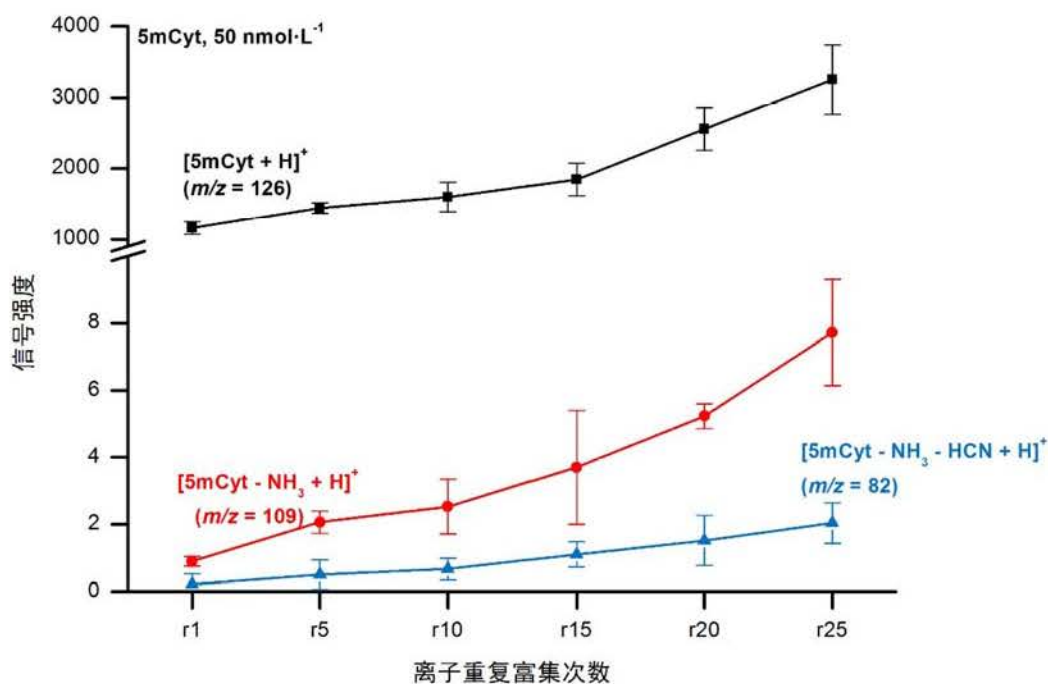


图4.6 母离子 $[5mCyt + H]^+$ 、二级离子 $[5mCyt - NH_3 + H]^+$ 、三级离子 $[5mCyt - NH_3 - HCN + H]^+$ 的质谱信号强度与重复富集循环次数的关系。

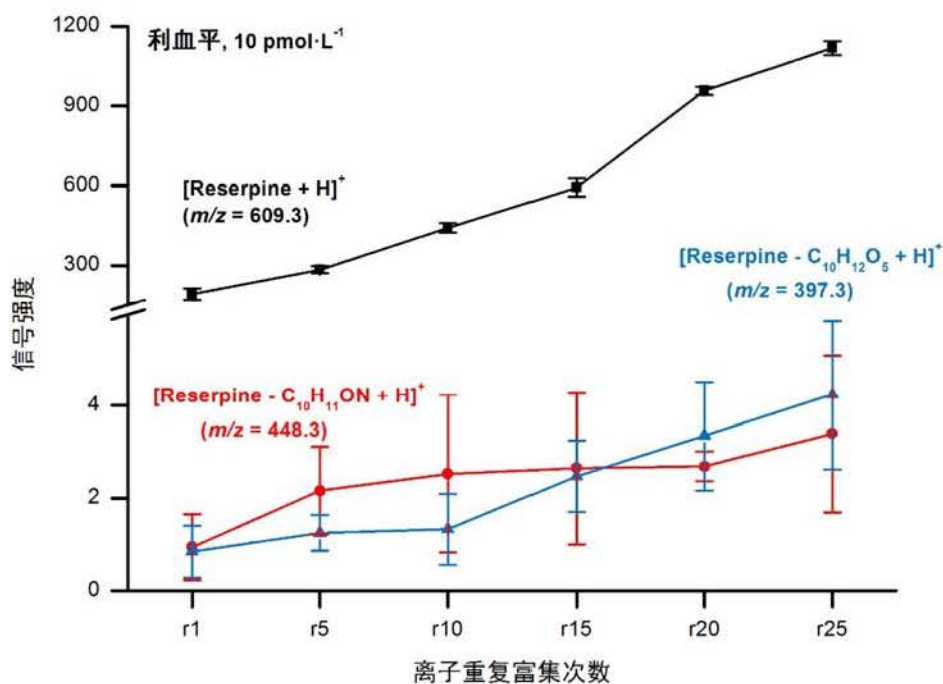


图4.7 母离子 $[Reserpine + H]^+$ 、二级离子 $[Reserpine - C_{10}H_{12}O_5 + H]^+$ 、二级离子 $[Reserpine - C_{10}H_{11}ON + H]^+$ 的质谱信号强度与重复富集循环次数的关系。

与上述现象类似的是，5mCyt 和利血平的子离子强度也会随着富集循环次数的增加而逐渐增高（图 4.4，图 4.5）。图 4.6 和图 4.7 分别记录了 5mCyt 和利血平各级离子的 5 次扫描平均信号强度随富集循环次数的变化。富集循环 25 次后， $[5\text{mCyt} + \text{H}]^+$  的信号强度提升了 2.8 倍， $[\text{Reserpine} + \text{H}]^+$  的强度提升了 6.3 倍。二级离子  $[5\text{mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 、 $[\text{Reserpine} - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ON} + \text{H}]^+$  和  $[\text{Reserpine} - \text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5 + \text{H}]^+$  的强度分别提高了 8.6、7.3 和 7.3 倍。如果富集次数能够进一步提高，那么质谱绝对信号仍有可能得到进一步提高，本章实验只进行了 25 次循环是因为仪器内存的限制。

### 4.3.2 高浓度组分在离子重复富集模式下的表现

当使用离子重复富集技术富集高浓度的离子时，可观测到离子阱的空间电荷效应。本节实验配制了一个高浓度的溶液  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mCyt 甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ ，含有 0.1% 甲酸)。在普通检测模式和离子重复富集的检测模式下， $[5\text{mCyt} + \text{H}]^+$  的信号强度在 20 ms 的离子注入时间下大概都在 6000 左右，离子重复富集并没有提高信号强度。与此同时，质谱峰在两种模式下的半峰宽是不同的，分别为 0.36 和 0.88（图 4.8）。经过计算两种模式下的质量分辨率分别是 350 和 140。分辨率的降低说明离子重复富集检测模式下存在比较强的空间电荷效应。

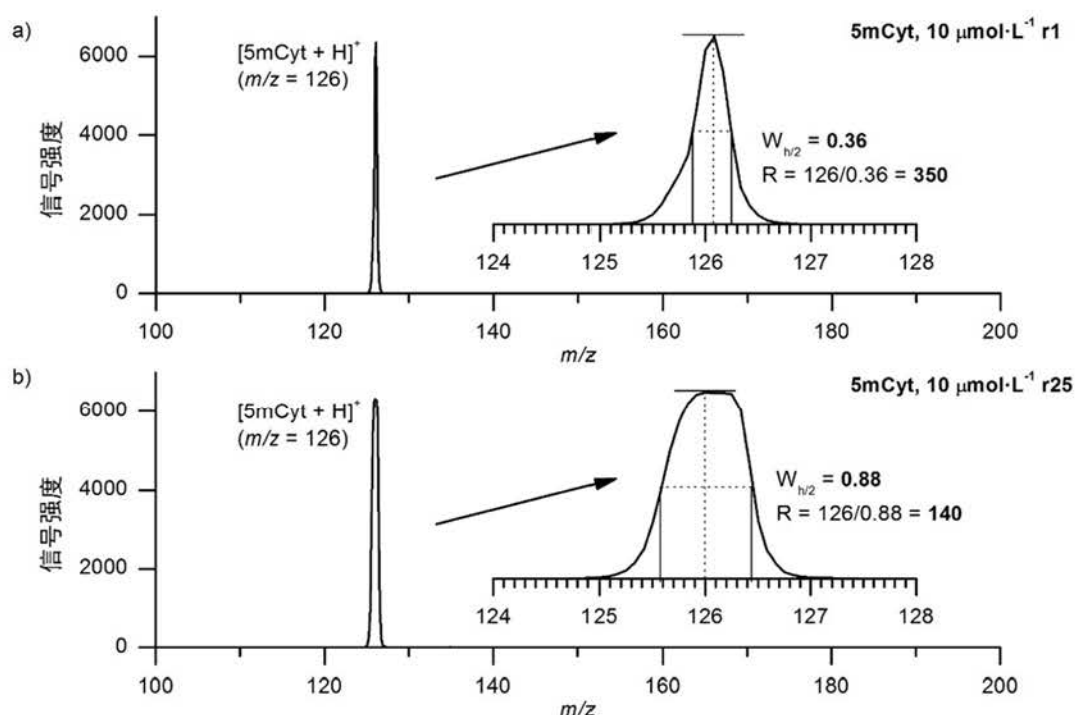


图4.8 应用离子重复富集技术对  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5mCyt 标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ ，含有 0.1% 甲酸) 进行质谱检测。(a) 普通检测模式下  $[5\text{mCyt} + \text{H}]^+$  的结果；(b) 离子重复富集 25 次  $[5\text{mCyt} + \text{H}]^+$  的结果。

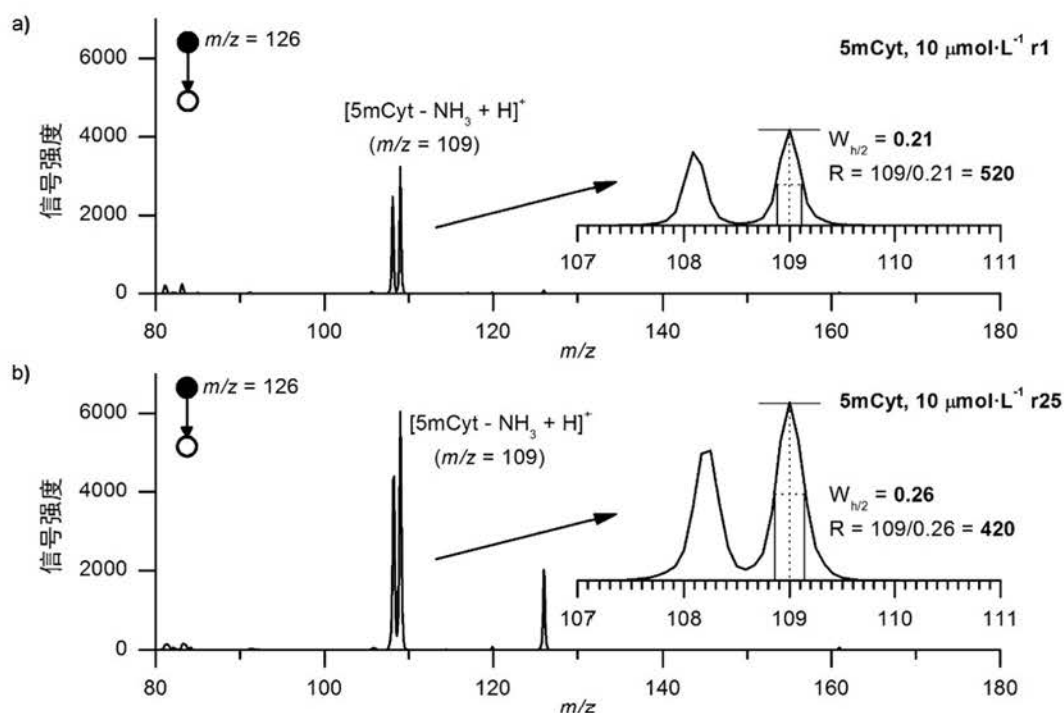


图4.9 应用离子重复富集技术对 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的5mCyt标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有0.1%甲酸) 进行质谱检测。(a) 普通检测模式下 $[5\text{mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的结果; (b) 离子重复富集25次 $[5\text{mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的结果。

当使用离子重复富集技术检测 5mCyt 的二级离子时也能观测到类似的空间电荷效应。CID 后, 普通检测模式下 $[5\text{mCyt} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$ 的质谱峰分辨率是 520, 而在离子重复富集检测模式下分辨率是 420 (图 4.9)。空间电荷效应的出现说明阱内离子总量超过了阈值, 即离子确实得到了富集。另一方面, 这一现象也说明空间电荷效应会导致分辨率下降, 在离子重复富集后离子量超过离子阱阈值的高浓度待测物不适用于本研究的方法。换言之, 对于高浓度待测物而言, 离子重复富集的循环次数或者离子注入时间需要在检测过程中仔细调整。

#### 4.3.3 各类型离子在离子重复富集检测模式下的检测结果考察

本章所研究的离子重复富集技术适用于很多类型的离子, 包括大分子离子和多电荷离子。本节实验使用离子重复富集技术对  $10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的血管紧张素 II 的标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有 0.1%甲酸) 做了检测。结果表明血管紧张素 II 在 NanoESI-MS 下的单电荷离子和双电荷离子及它们相应的子离子均可在重复富集模式下得到信号提高 (图 4.10)。血管紧张素 II 的单电荷离子、双电荷离子及它们的子离子的信号强度可以在 25 次循环的离子重复富集扫描模式下提高 6.2 到 10.1 倍 (表 4.3)。

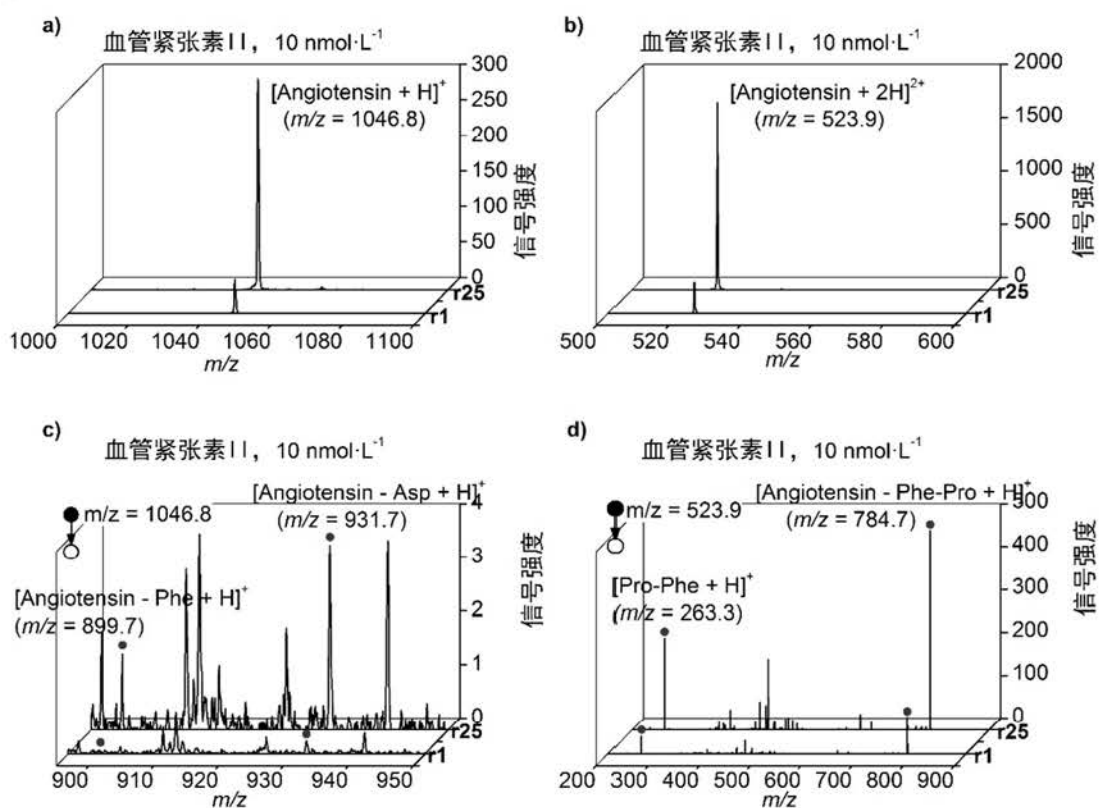


图4.10 应用离子重复富集技术对10 nmol·L<sup>-1</sup>的血管紧张素II标准甲醇/水溶液 (v/v = 1:1, 含有0.1%甲酸) 进行质谱检测。(a) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的单电荷离子质谱图；(b) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的双电荷离子质谱图；(c) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的单电荷离子的二级离子的质谱图；(d) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的双电荷离子的二级离子的质谱图。

实验也测试了三级离子的信号是否可以在离子重复富集的模式下得到信号提高。这个测试配制了 1 nmol·L<sup>-1</sup> 的咖啡因标准甲醇/水溶液 (v/v = 1:1, 含有 0.1% 甲酸) 并使用离子重复富集技术对其做了检测。从质谱检测结果可以清楚的看出, 在 25 次循环的离子重复富集检测模式下, 母离子 [Caffeine + H]<sup>+</sup>、二级离子 [Caffeine - CH<sub>3</sub>CNO + H]<sup>+</sup> 和三级离子 [Caffeine - CH<sub>3</sub>CNO - CO + H]<sup>+</sup> 的信号得到了 5.3-16.7 倍的提高 (图 4.11)。这样的结果与实验预期是比较一致的。通常情况下, 生物样品可能含有大量的代谢物, 在质谱检测过程中多个物质可能对应同一个质量数。因此, 经常需要多级质谱来确认某个特定分子。多级质谱依旧适用于离子重复富集技术意味着本章所研究的技术可以帮助进行物质的鉴定和定量。

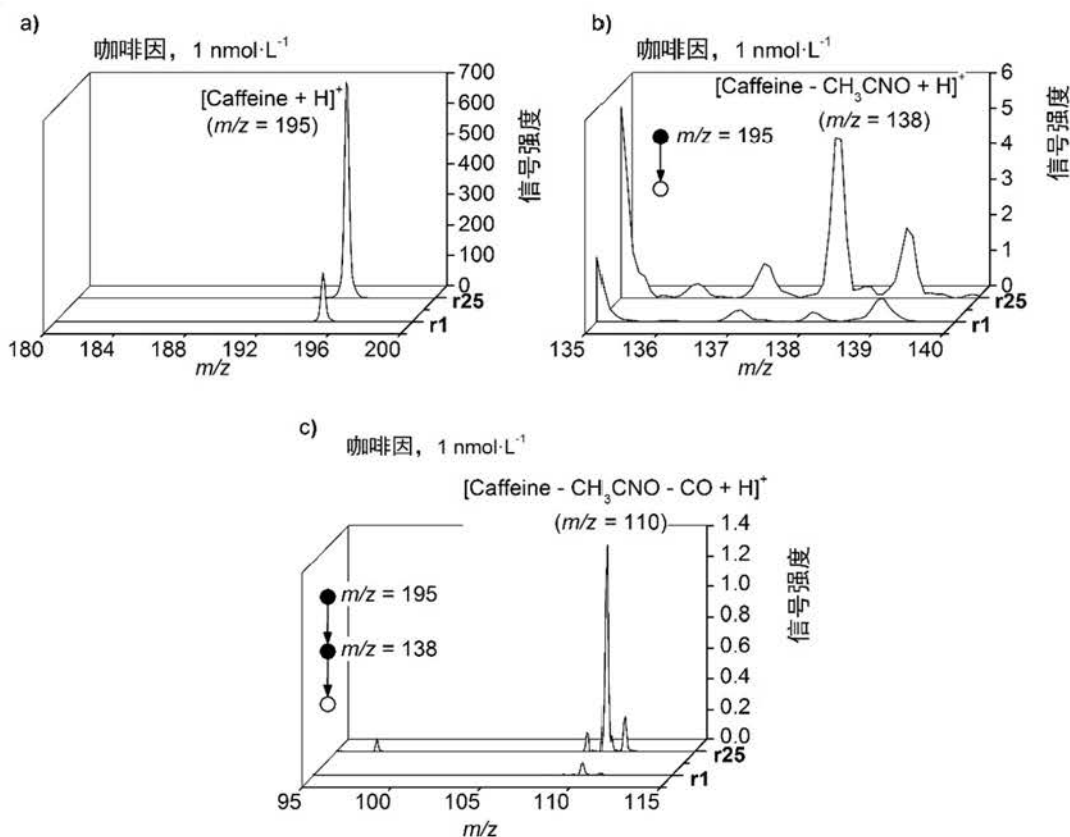


图4.11 应用离子重复富集技术对 $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咖啡因标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有0.1%甲酸) 进行质谱检测。(a) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的一级离子质谱图; (b) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的二级离子质谱图; (c) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的三级离子的质谱图。

最后, 实验验证了离子重复富集技术在负离子模式下依旧适用。实验测试了 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苹果酸和 ATP 标准甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵)。结果显示, 在 25 次循环的离子重复富集模式下, 一级离子 $[\text{Malic acid} - \text{H}]^-$ 和 $[\text{ATP} - \text{H}]^-$ 的信号可分别提高 5.6 和 13.8 倍, 二级离子 $[\text{Malic acid} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$ 和 $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$ 的信号可分别提高 11.5 和 22.6 倍 (图 4.12)。

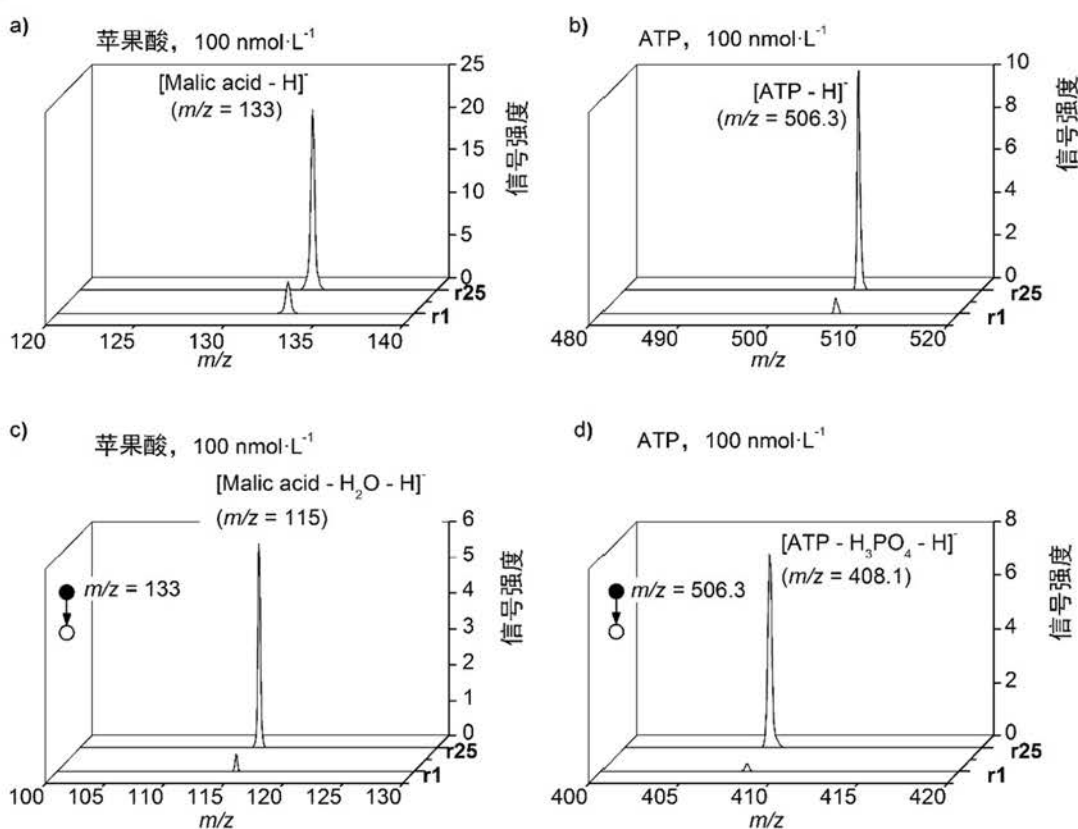


图4.12 应用离子重复富集技术对100 nmol·L<sup>-1</sup>的苹果酸和ATP标准甲醇/水溶液 (v/v = 1:1, 含有1 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸铵) 进行质谱检测。(a) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的苹果酸一级离子质谱图；(b) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的ATP一级离子质谱图；(c) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的苹果酸二级离子的质谱图；(d) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集检测模式下的ATP二级离子质谱图。

以上实验中涉及的数据汇总在了表 4.3 中。这些实验结果证明离子重复隔离富集技术是一个对正负离子、大小分子离子、多级离子、多电荷离子均适用的普适的高灵敏度质谱技术。从表中数据可以看出不同离子的信号提高倍数是不同的, 这可能与离子的稳定性和在离子阱中的寿命有关。

表4.3 多种离子在普通检测模式和25次循环的离子重复富集模式下的质谱信号度。

母离子或子离子	<i>m/z</i>	MS <sup>n</sup>	信号强度 (n = 5)		信号强度提高倍数
			普通检测模式	离子重复富集检测模式 <sup>[a]</sup>	
[5mCyt + H] <sup>+</sup>	126		(1.16 ± 0.08) × 10 <sup>3</sup>	(3.25 ± 0.43) × 10 <sup>3</sup>	2.8
[5mCyt – NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	109	MS <sup>2</sup>	0.901 ± 0.126	7.72 ± 1.41	8.6
[5mCyt – NH <sub>3</sub> – HCN + H] <sup>+</sup>	82	MS <sup>3</sup>	0.222 ± 0.272	2.04 ± 0.54	9.2
[Reserpine + H] <sup>+</sup>	609.3		(1.79 ± 0.18) × 10 <sup>2</sup>	(1.12 ± 0.02) × 10 <sup>3</sup>	6.3
[Reserpine – C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ON + H] <sup>+</sup>	448.3	MS <sup>2</sup>	0.464 ± 0.315	3.39 ± 1.52	7.3
[Reserpine – C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> + H] <sup>+</sup>	397.3	MS <sup>2</sup>	0.583 ± 0.538	4.23 ± 1.45	7.3
[Angiotensin + H] <sup>+</sup>	1046.8		49.5 ± 2.67	(3.06 ± 0.18) × 10 <sup>2</sup>	6.2
[Angiotensin – NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	1029.7	MS <sup>2</sup>	0.231 ± 0.250	2.25 ± 0.99	9.7
[Angiotensin – Asp + H] <sup>+</sup>	931.7	MS <sup>2</sup>	0.664 ± 0.556	3.83 ± 1.64	5.8
[Angiotensin – Phe+H] <sup>+</sup>	899.7	MS <sup>2</sup>	0.151 ± 0.202	1.53 ± 0.77	10.1
[Angiotensin – Phe – Pro + H] <sup>+</sup> <sup>[b]</sup>	784.6	MS <sup>2</sup>	0.651 ± 0.409	5.77 ± 0.74	8.9
[Angiotensin + 2H] <sup>2+</sup>	523.9		(3.22 ± 0.41) × 10 <sup>2</sup>	(2.04 ± 0.14) × 10 <sup>3</sup>	6.3
[Angiotensin – Phe-Pro + H] <sup>+</sup> <sup>[c]</sup>	784.7	MS <sup>2</sup>	76.0 ± 19.3	(4.75 ± 0.29) × 10 <sup>2</sup>	6.2
[Pro-Phe + H] <sup>+</sup>	263.3	MS <sup>2</sup>	37.2 ± 10.0	(2.33 ± 0.17) × 10 <sup>2</sup>	6.3
[Caffeine + H] <sup>+</sup>	195		(1.46 ± 0.08) × 10 <sup>2</sup>	(7.77 ± 0.23) × 10 <sup>2</sup>	5.3
[Caffeine – CH <sub>3</sub> CNO + H] <sup>+</sup>	138	MS <sup>2</sup>	0.511 ± 0.245	2.77 ± 0.73	5.4
[Caffeine – CH <sub>3</sub> CNO – CO + H] <sup>+</sup>	110	MS <sup>3</sup>	0.0782 ± 0.1428	1.30 ± 0.44	16.7
[Malic acid – H] <sup>-</sup>	133		3.78 ± 0.47	21.1 ± 1.8	5.6
[Malic acid – H <sub>2</sub> O – H] <sup>-</sup>	115	MS <sup>2</sup>	0.521 ± 0.037	5.97 ± 0.44	11.5
[ATP – H] <sup>-</sup>	506.3		0.788 ± 0.033	10.9 ± 0.9	13.8
[ATP – H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> – H] <sup>-</sup>	408.1	MS <sup>2</sup>	0.314 ± 0.035	7.11 ± 1.10	22.6

[a]25次循环的离子重复富集模式； [b] 解离自[Angiotensin + H]<sup>+</sup>； [c] 解离自[Angiotensin + 2H]<sup>2+</sup>。

## 4.3.4 离子重复富集技术对于检测灵敏度的提高

离子重复富集技术不仅可以提高待测离子的信号，还可以提高检测灵敏度，检测到普通模式下难以检出的信号。为了证明这一点本节进行了如下实验。实验配制了两份低浓度溶液，第一份是  $10 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的咖啡因甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有  $0.1\%$ 甲酸)，第二份是  $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 ATP 甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵)。在普通检测模式下， $10 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的咖啡因溶液的三级离子已经不易被质谱检出，从 EIC 图上可看出并不是每一个扫描都可以扫到这一信号(图 4.13, 表 4.4)。在 3 分钟内进行的 1463 次扫描中，703 次扫描都没有检出这一信号(表 4.4)。而随着重复隔离次数的增加，质谱每次扫描能够扫到信号的概率逐渐增加，当重复 25 次时每次扫描均能扫到信号，且信号绝对强度也得到提高。

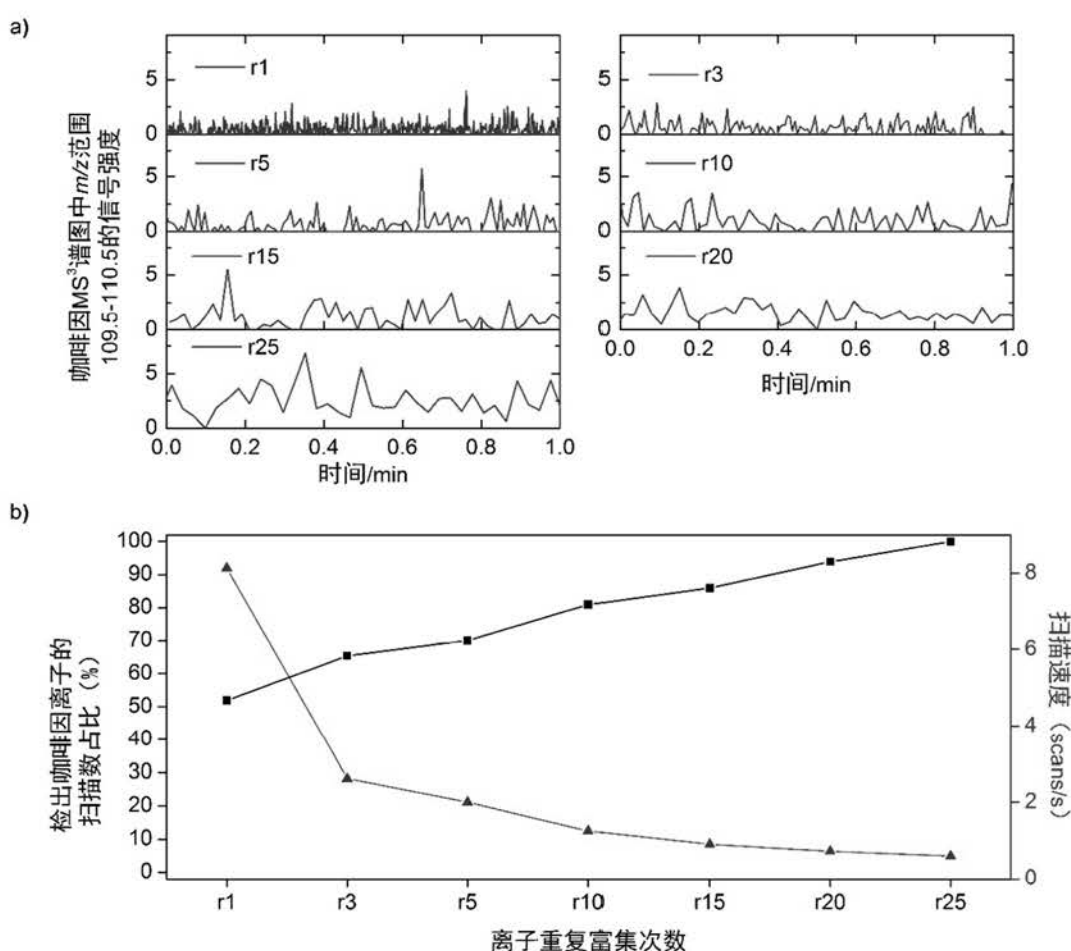


图4.13 应用离子重复富集技术对 $10 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咖啡因甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有  $0.1\%$ 甲酸) 进行质谱检测。(a) 重复富集1个、3个、5个、10个、15个、20个和25个循环后,  $[\text{Caffeine} - \text{CH}_3\text{CNO} - \text{CO} + \text{H}]^+$ 的EIC图; (b) 检出咖啡因离子的扫描数占比和质谱扫描速度与循环次数的变化关系。r1指循环1次离子重复富集的情形, 即普通检测模式。

检测 ATP 溶液时现象更为明显。在普通检测模式下, 3 分钟的扫描时间内完成的 1623 次扫描中仅有 4 次扫描检出了  $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$  的信号 (图 4.14, 表 4.5)。然而, 随着离子重复富集循环次数的增加, 尽管扫描速度在逐渐减慢,  $m/z = 408$  的待测离子信号被逐步扫到。当重复富集 25 次时,  $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$  的信号在全部 102 次扫描的每一次扫描中均能得到信号 (图 4.14)。从质谱图来看, 离子重复富集 5 次循环以上时,  $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$  可以比较明显的检出, 而 15 次循环以上时,  $[\text{ATP} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$  才能够较为明显的检出。

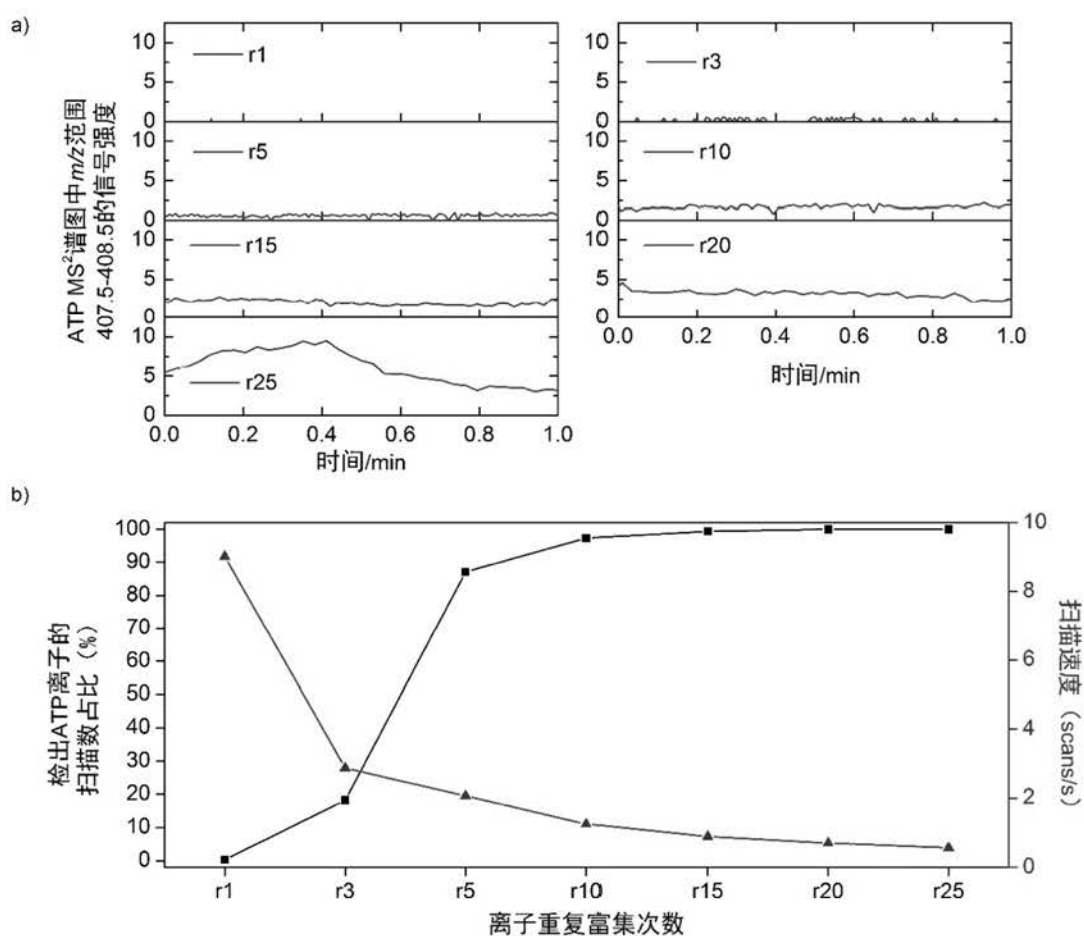


图4.14 应用离子重复富集技术对  $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ATP 甲醇/水溶液 ( $v/v = 1:1$ , 含有  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵) 进行质谱检测。(a) 重复富集 1 个、3 个、5 个、10 个、15 个、20 个和 25 个循环后,  $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$  的 EIC 图; (b) 检出  $[\text{ATP} - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}]^-$  的扫描数占比和质谱扫描速度与循环次数的变化关系。r1 指循环 1 次离子重复富集的情形, 即普通检测模式。

表4.4 在不同循环次数的离子重复富集检测模式下, 10 pmol·L<sup>-1</sup>咖啡因溶液在3分钟扫描时间内的MS<sup>3</sup>离子[Caffeine - CH<sub>3</sub>CNO - CO + H]<sup>+</sup>离子检出频度统计。r1指普通检测模式。

离子重复富集的循环次数	3分钟内完成的扫描数	3分钟内没有检出咖啡因的扫描数	检出的扫描数频度 <sup>[a]</sup>	<i>m/z</i> 109.5-110.5的信号强度 (n = 105)
r1	1463	703	52%	0.37 ± 0.46
r3	471	163	65%	0.64 ± 0.62
r5	360	108	70%	0.67 ± 0.86
r10	225	43	81%	1.02 ± 0.95
r15	163	23	86%	1.11 ± 1.01
r20	130	8	94%	1.47 ± 0.97
r25	107	0	100%	2.43 ± 1.40

[a] 检出[Caffeine - CH<sub>3</sub>CNO - CO + H]<sup>+</sup>的扫描次数占总扫描数的百分比。

表4.5 在不同循环次数的离子重复富集检测模式下, 10 nmol·L<sup>-1</sup>ATP溶液在3分钟扫描时间内的MS<sup>2</sup>离子[ATP - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup>检出频度统计。r1指普通检测模式。

离子重复富集的循环次数	3分钟内完成的扫描数	3分钟内没有检出咖啡因的扫描数	检出的扫描数频度 <sup>[a]</sup>	<i>m/z</i> 407.5-408.5的信号强度 (n = 105)
r1	1623	1619	0.2%	0.00 ± 0.03
r3	517	423	18%	0.14 ± 0.22
r5	372	48	87%	0.60 ± 0.19
r10	225	6	97%	1.67 ± 0.23
r15	161	1	99%	1.99 ± 0.49
r20	126	0	100%	2.34 ± 0.83
r25	102	0	100%	3.78 ± 2.11

[a] 检出[ATP - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup>的扫描次数占总扫描数的百分比。

#### 4.3.5 单细胞水平DNA甲基化检测

单细胞水平的样品通常由大量组分组成。具有不同元素组成的组分或者同分异构体有可能会对应于质谱图中的一个质量数。因此, 实验通常需要进行 MS<sup>2</sup> 或

者 MS<sup>3</sup> 分析来鉴定或定量某一组分。对于一个稀释倍数较大的单细胞样品而言，低浓度组分，如 5mCyt 等的 MS<sup>2</sup> 或 MS<sup>3</sup> 离子通常难以检出。这时采用重复富集技术则可能稳定的得到 5mCyt 的信号，帮助进行 5mCyt 的确认和定量。

在优化好各项条件后，本节实验尝试用离子重复富集技术检测单细胞样品中的 DNA 甲基化标志物 5mCyt 进行检测。在这个实验中，实验将相当于 0.2 个 MCF7 细胞量的细胞酸解物通过六通阀进样到质谱中检测，进行了 3 次平行进样。图 4.15，图 4.16 和图 4.17 记录了检测过程中 MS<sup>3</sup> 离子 [Ade - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup>、[Cyt - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 和 [5mCyt - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的 EIC 图，和三者的平均质谱图。经过计算，在普通检测模式和离子重复富集检测模式下，[Ade - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的 EIC 色谱峰面积分别是 1106 ± 127 和 6937 ± 621 (n = 3)，[Cyt - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的 EIC 色谱峰面积分别是 102 ± 8 和 590 ± 68 (n = 3)。而对于 5mCyt 而言，普通检测模式下 [5mCyt - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的 EIC 色谱峰几乎无法识别，处在噪音水平。然而在离子重复富集检测模式下，[5mCyt - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的色谱峰相对容易识别，峰面积为 52 ± 9 (n = 3)。

上述实验结果说明离子重复富集技术不仅可以提高单细胞水平 Cyt 的信号强度，还可以提高质谱对于 5mCyt 的检测能力。

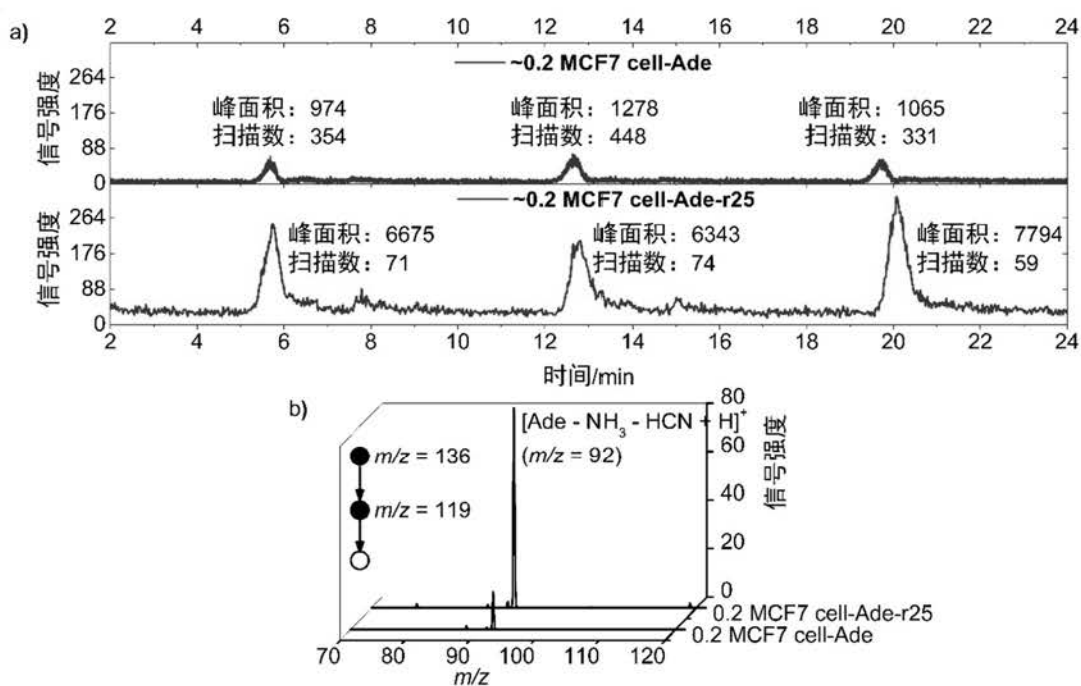


图4.15 应用离子重复富集技术对0.2个细胞量的MCF7细胞酸解物进行分析。(a) 普通检测模式和25次循环的离子重复富集模式下平行进样3次的[Ade - NH<sub>3</sub> - HCN + H]<sup>+</sup> 的EIC图；(b) 两个模式下的平均质谱图。

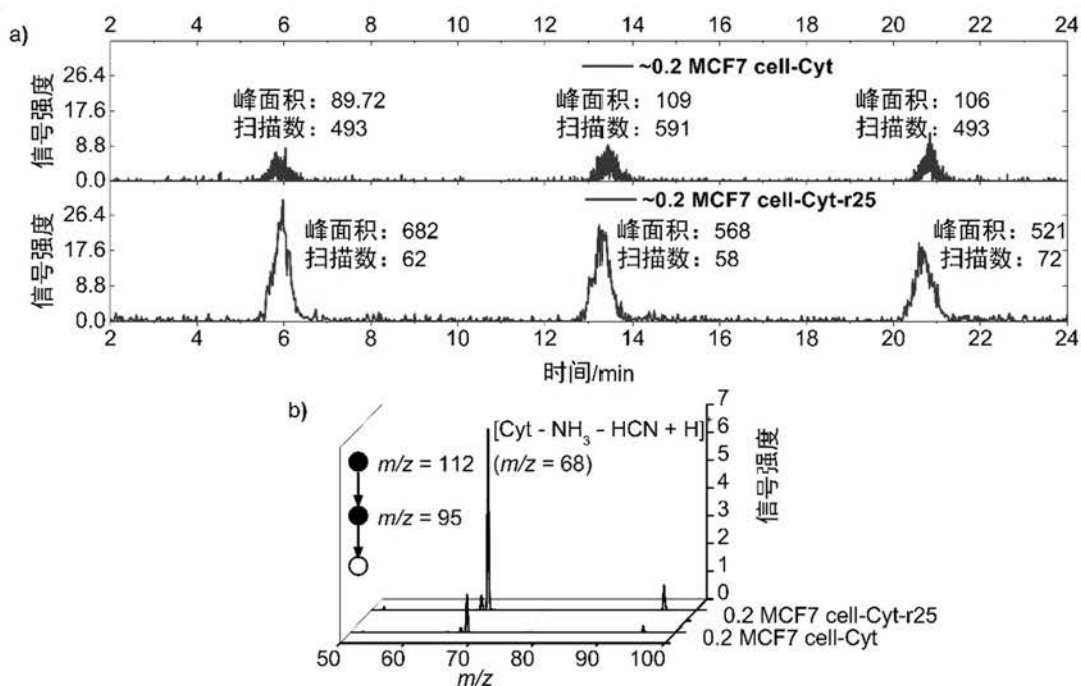


图4.16 应用离子重复富集技术对0.2个细胞量的MCF7细胞酸解物进行分析。(a) 普通检测模式和25次循环的离子重复富集模式下平行进样3次的 $[\text{Cyt} - \text{NH}_3 - \text{HCN} + \text{H}]^+$ 的EIC图；(b) 两个模式下的平均质谱图。

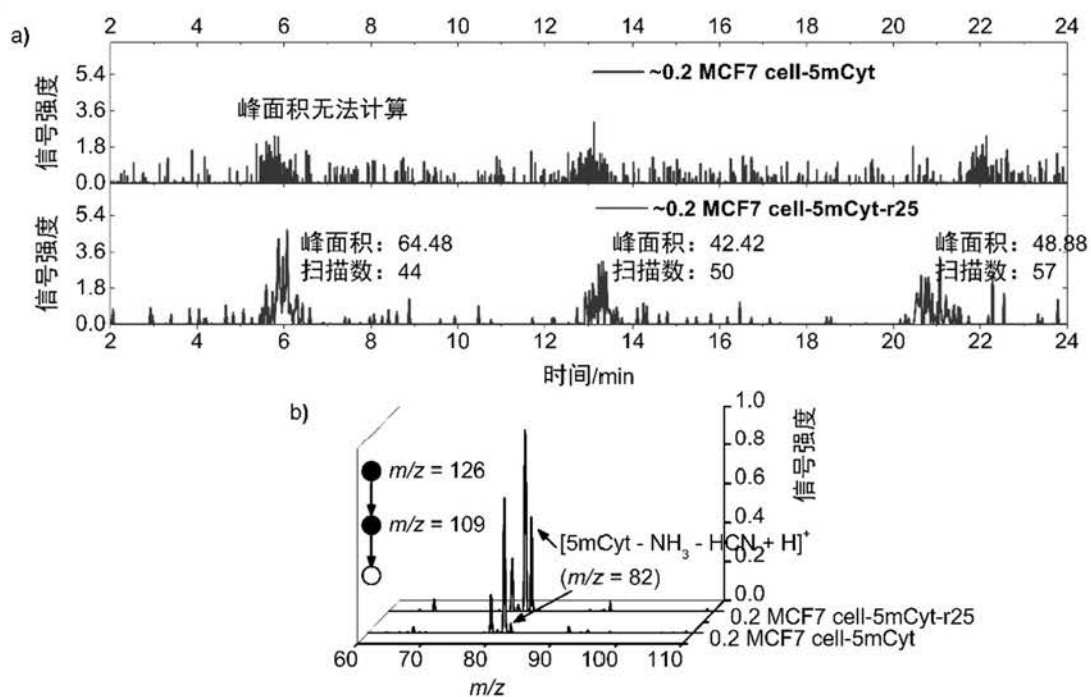


图4.17 应用离子重复富集技术对0.2个细胞量的MCF7细胞酸解物进行分析。(a) 普通检测模式和25次循环的离子重复富集模式下平行进样3次的 $[\text{5mCyt} - \text{NH}_3 - \text{HCN} + \text{H}]^+$ 的EIC图；(b) 两个模式下的平均质谱图。

## 4.3.6 离子重复富集技术的其它应用前景讨论

离子重复富集技术是一个普适的技术，它本质上是一种提高商品化离子阱质谱检测灵敏度的方法，因此可能用于新的更低含量的DNA甲基化修饰类型的发现。本节实验尝试用离子重复富集技术对5hmCyt和N6mAde这两类最近几年新发现的DNA甲基化存在形式进行了检测（图4.18）。结果表明，这两类分子在该技术下信号强度也有很大提高。这样的结果显示了离子重复富集技术有潜力应用于核酸新修饰类型的发现。

本节实验还尝试用离子重复富集技术测定了其他单细胞样品。本节用自行拉制的毛细管吸取了单个洋葱鳞片叶表皮细胞的内容物（图4.19a）。将单洋葱细胞的洋葱稀释到100  $\mu\text{L}$  甲醇/水溶液中，之后通过六通阀进样到质谱中进行检测。图4.19b-c记录了样品中二糖和三糖的二级质谱图。它们分别的子离子分别为203和365。相比于普通检测模式，这两个子离子在离子重复富集模式下的信号有很大的提升。这一实验结果说明离子重复富集技术在除DNA甲基化之外的其他单细胞检测对象上依旧有较大应用前景。

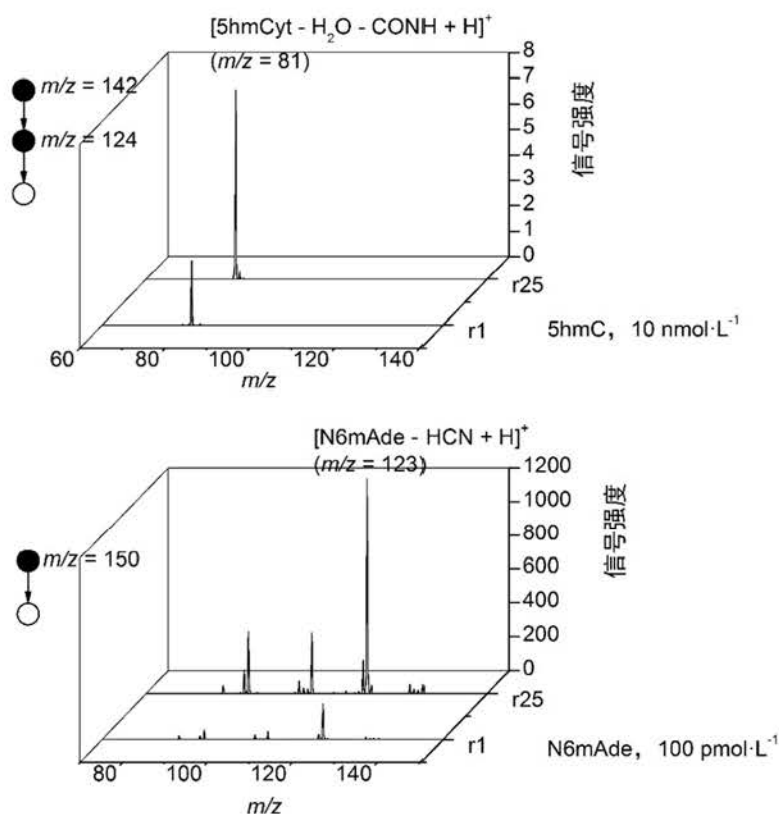


图4.18 应用离子重复富集技术和NanoESI-MS对5hmCyt和N6mAde两种DNA甲基化存在形式进行了检测。

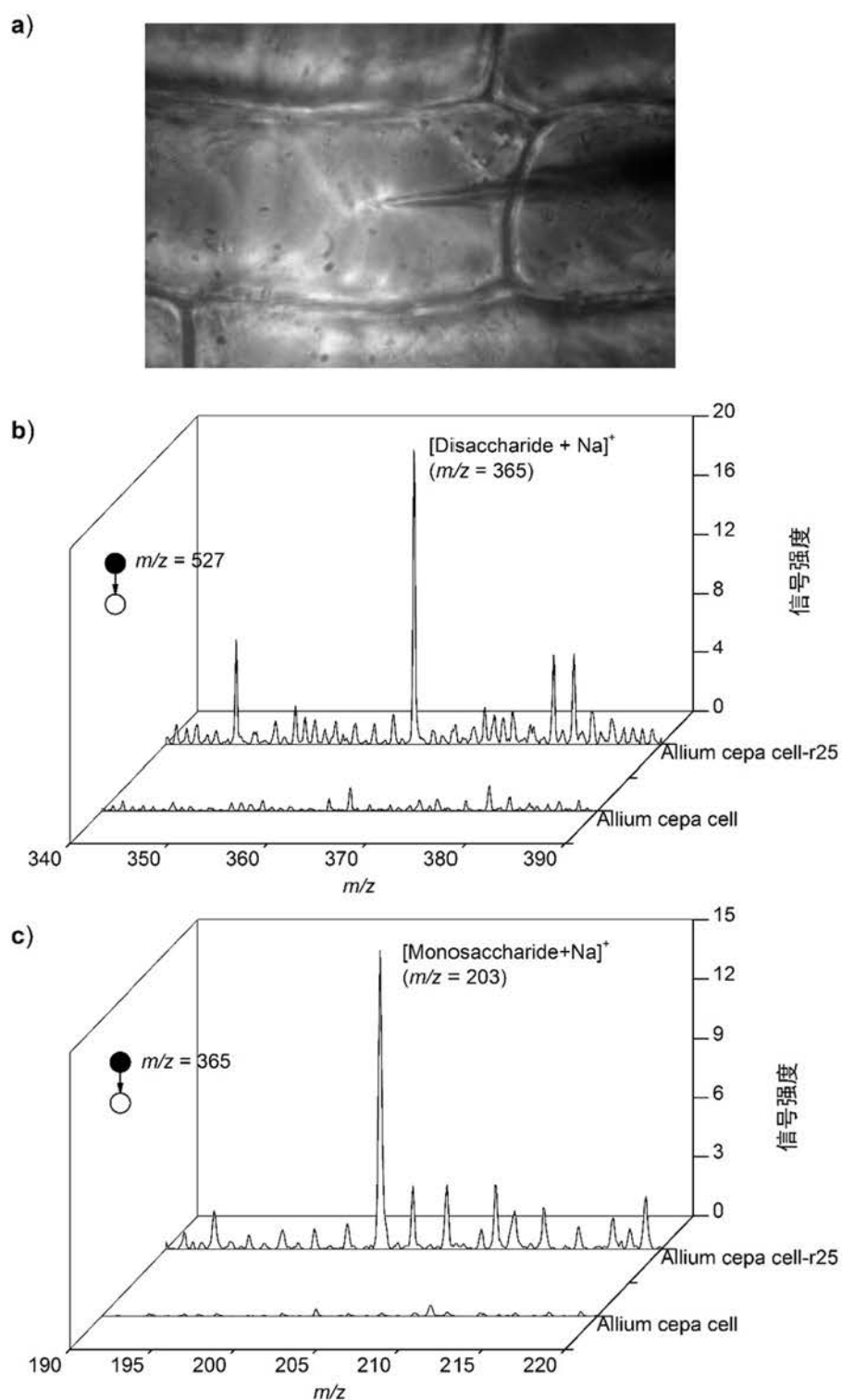


图4.19 应用离子重复富集技术对洋葱鳞片叶表皮单细胞中寡糖分子进行检测。(a) 用毛细管吸取单个洋葱细胞内容物的显微镜照片；(b) 在普通检测模式和25次循环的离子重复富集模式下的三糖MS<sup>2</sup>谱图；(c) 两种模式下二糖MS<sup>2</sup>谱图。

除此之外，离子重复富集技术具有较好的定量能力。本节实验做了一个概念性实验。实验将一种抗癌药——伊马替尼添加到了 MCF7 细胞裂解液中，同时还加入了伊马替尼-d<sub>8</sub> 作为同位素内标以便进行定量。实验选用 217.2 和 225.2 两个伊马替尼和伊马替尼-d<sub>8</sub> 的子离子作为定量的依据。图 4.20 显示了离子重复富集检测模式下伊马替尼的相对信号强度在 0.5–5000 nmol·L<sup>-1</sup> 的范围内呈现良好线性 ( $R^2 = 0.9839$ )。为了计算方法回收率，实验在 MCF7 细胞裂解液中加入 300 nmol·L<sup>-1</sup> 伊马替尼和内标，测定后经过计算回收率为  $102.3\% \pm 4.8\%$  ( $n=3$ )。以上结果说明离子重复富集技术在离子阱的线性范围内能够保持较好的定量能力。

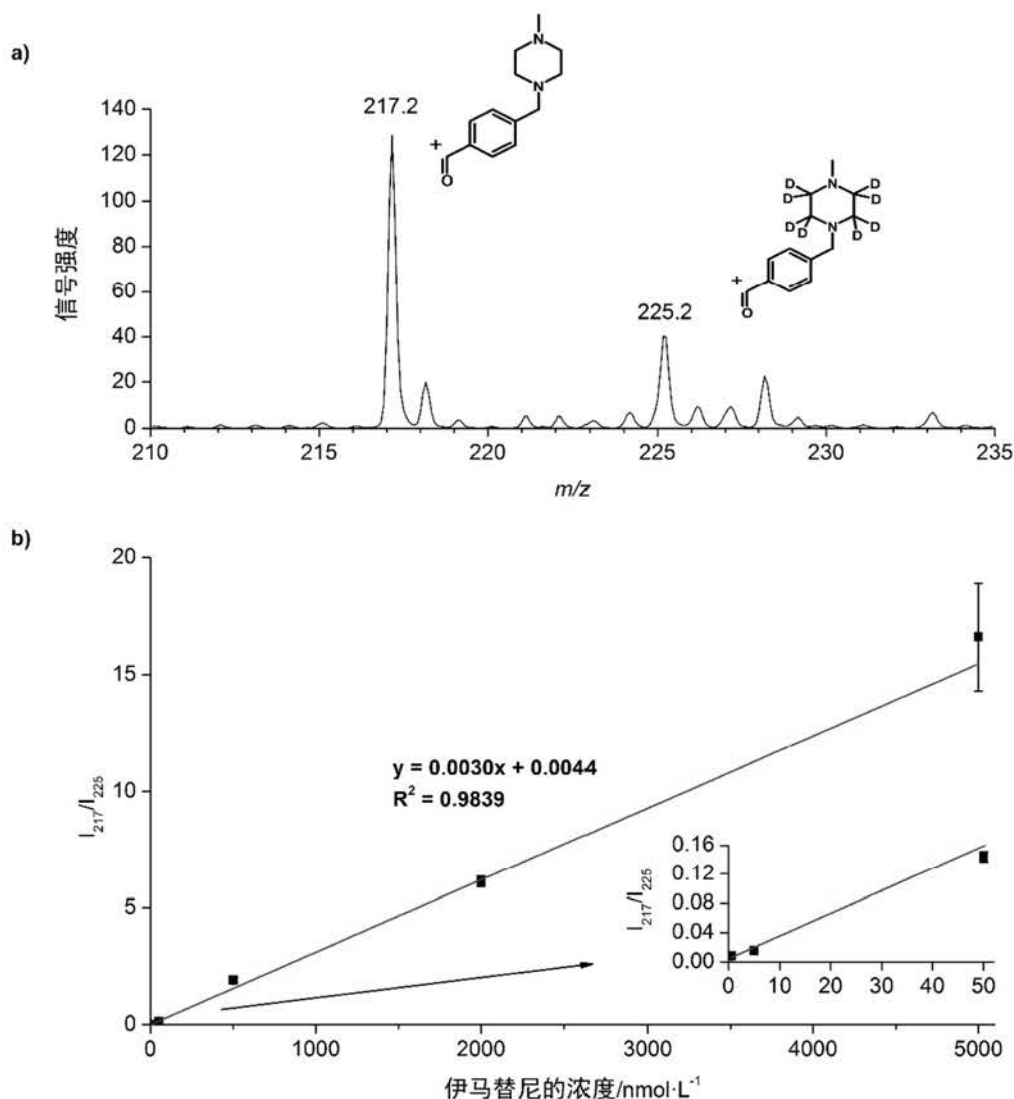


图4.20 离子重复富集模式下的伊马替尼定量实验。(a) 在MCF7细胞裂解液中加入 300 nmol·L<sup>-1</sup>伊马替尼和100 nmol·L<sup>-1</sup>伊马替尼-d<sub>8</sub>，并在离子重复富集检测模式下的质谱图；(b) 在离子重复富集模式在测定0.5–5000 nmol·L<sup>-1</sup>范围的伊马替尼溶液所绘制的标准曲线。

#### 4.4 本章结论

本章研究了一种基于离子阱多次重复富集离子功能的提高质谱检测灵敏度的方法——离子重复富集技术。这一方法中，质谱信号提高程度与重复富集的循环次数呈明显正相关，并且多种类型的离子，如大分子、多电荷离子、多级质谱离子、正负离子均能够通过离子重复富集技术得到信号的提高。离子重复富集技术显著地提高了质谱分析单细胞水平样品中低浓度组分的能力。当采用 25 次循环的离子重复富集检测模式时，该方法可以稳定检出 0.2 个细胞水平的 DNA 甲基化标志物 5mCyt 的质谱信号。离子重复富集技术是一个普适方法，除了在 DNA 甲基化检测上的应用外，它在单细胞分析领域和核酸新修饰类型的发现上拥有潜在应用前景。

## 第5章 结论

本文针对目前基于质谱的 DNA 甲基化分析方法所面临的挑战,建立了三个不同的基于 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化程度分析方法,实现了减少细胞样品需求量、快速衍生化质谱检测以及高灵敏度质谱检测的目的,得到如下结论:

1. 本文研究了一种基于 NanoESI-MS 的能够检测 100 个人类细胞 DNA 甲基化程度的方法。该方法核心创新点是将 DNA 酸解前处理反应在 NanoESI-MS 的喷针中进行,之后直接进行 NanoESI-MS 检测。在线的样品前处理大大减少了样品稀释,从而减少了样品的需求量,这一优势为 DNA 甲基化的基础研究和临床检测应用提供了便利。本文首先使用群体细胞样品证明了正常的乳腺细胞系 MCF10A 和乳腺癌细胞系 MCF7 的基因组 5mCyt 含量的显著性差异,因而 DNA 甲基化程度可以作为区分稀有癌细胞和正常细胞的方法。然而传统的 HPLC-MS 检测通常需要大约  $10^6$  个细胞的样品,这样的样品量需求在实际临床应用中无法满足。本文所研究的基于 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化分析方法样品量大大缩减,能够应用于 100 个 MCF7、MCF10A、HepG2 和 HeLa 细胞的检测,因而可以成为判定少量分离细胞是否为癌细胞的潜在分析方法。这一方法可以在 2 小时内区分 MCF10A 和 MCF7 细胞的 DNA 甲基化差异,有潜力为临床应用提供可靠信息。

2. 本文研究了一种基于小体积快速衍生化和 NanoESI-MS 的 DNA 甲基化程度快速分析方法。BDAPE 是一种适用于所有胞嘧啶甲基化类型的衍生剂,可以提高 dC、5mdC 等在 HPLC-MS 中的离子化效率和检测灵敏度。本文发现 BDAPE 对 dC 和 5mdC 的衍生化反应可以在小体积反应体系下得到大幅度的反应加速。常量反应体系下 BDAPE 衍生化反应需要加热进行 6 小时,而在室温下的气动喷雾液滴中可以在 1 分钟内完成。并且,小体积反应模式下反应物浓度在不断浓缩,BDAPE 所需浓度远远小于常量反应,从而减小了衍生剂本身对 NanoESI-MS 检测的干扰。在以上新发现的基础上,本文将小体积衍生化反应和直接的 NanoESI-MS 检测相结合,对 HeLa、A549、MCF10A、MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-468 这 6 种细胞系的 DNA 甲基化程度进行了分析。由于采用了小体积快速反应的策略并省去了色谱分离的步骤,这一方法相较于前人的 HPLC-MS 技术分析时间大大缩短,更适用于实际临床应用。

3. 本文研究了一种基于离子重复富集技术和 NanoESI-MS 的单细胞水平 DNA 甲基化程度分析方法。该方法的核心创新点是使用离子阱多次富集离子,从而提高

了商品化质谱仪的检测灵敏度。本文对商品化的离子阱质谱进行了改造, 改变扫描函数使离子阱可以重复多次的富集某一特定质荷比的离子, 实现了对低浓度离子的富集, 包括 Cyt、5mCyt、5hmCyt、N6mAde 在内的多类型的离子检测灵敏度可提高 3-22 倍。通过应用这一技术, 本文实现了对 0.2 个 MCF7 单细胞水平的基因组 Ade、Cyt 和 5mCyt 含量的检出。与其他分离技术联用, 离子重复隔离富集技术不仅在单细胞分析领域有广阔应用前景, 而且有潜力应用于未知 DNA 修饰类型的发现。

## 参考文献

- [1] Kornberg R D. Chromatin structure - repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974, 184: 868-871.
- [2] Kornberg R D, Thomas J O. Chromatin structure - oligomers of histones. *Science*, 1974, 184: 865-868.
- [3] Noll M. Subunit structure of chromatin. *Nature*, 1974, 251: 249-251.
- [4] Finch J T, Lutter L C, Rhodes D, et al. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 1977, 269: 29-36.
- [5] Oudet P, Grossbellard M, Chambon P. Electron-microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 1975, 4: 281-300.
- [6] Pearson H. What is a gene? *Nature*, 2006, 441: 398.
- [7] Pennisi E. DNA Study forces rethink of what it means to be a gene. *Science*, 2007, 316: 1556-1557.
- [8] Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*, 1970, 227: 561.
- [9] McCulloch S D, Kunkel T A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.*, 2008, 18: 148.
- [10] Huberman J A, Riggs A D. On mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol*, 1968, 32: 327.
- [11] Shandilya J, Roberts S G E. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819: 391-400.
- [12] Roeder R G. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16: 402-408.
- [13] Hansen T M, Baranov P V, Ivanov I P, et al. Maintenance of the correct open reading frame by the ribosome. *Embo. Rep.*, 2003, 4: 499-504.
- [14] Malys N, McCarthy J E G. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 991-1003.
- [15] Jones J S. The mendelian revolution - the emergence of hereditarian concepts in modern science and society. *Nature*, 1989, 342: 352-353.
- [16] Schmutz J, Wheeler J, Grimwood J, et al. Quality assessment of the human genome sequence. *Nature*, 2004, 429: 365.
- [17] Dulbecco R. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*, 1986, 231: 1055-1056.
- [18] Muller H J. Types of visible variations induced by x-rays in *Drosophila*. *J. Genet.*, 1930, 22: 299-U297.

- [19] Lyon M F. Gene action in X-chromosome of mouse (*mus musculus* L). *Nature*, 1961, 190: 372.
- [20] Allfrey V G, Faulkner R, Mirsky A E. Acetylation + methylation of histones + their possible role in regulation of rna synthesis. *PNAS*, 1964, 51: 786.
- [21] Beutler E. Gene inactivation - distribution of gene products among populations of cells in heterozygous humans. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1964, 29: 261.
- [22] Riggs A D. X-inactivation, differentiation, and dna methylation. *Cytogenet. Cell Genet*, 1975, 14: 9-25.
- [23] Holliday R, Pugh J E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 1975, 187: 226-232.
- [24] Brownell J E, Zhou J X, Ranalli T, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 1996, 84: 843-851.
- [25] Bannister A J, Zegerman P, Partridge J F, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001, 410: 120-124.
- [26] Lachner M, O'Carroll N, Rea S, et al. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 2001, 410: 116-120.
- [27] Nakayam J, Rice J C, Strahl B D, et al. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 2001, 292: 110-113.
- [28] Allis C D, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics*. New York: CSHL Press, 2007.
- [29] Schotta G, Ebert A, Reuter G. SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, 2003, 117: 149-158.
- [30] Seligson D B, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, 2005, 435: 1262-1266.
- [31] Jackson J P, Lindroth A M, Cao X, et al. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416: 556.
- [32] Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859.
- [33] Dupont C, Armant D R, Brenner C A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.*, 2009, 27: 351-357.
- [34] Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007, 447: 396-398.
- [35] Holliday R. Epigenetics - an overview. *Dev. Genet.*, 1994, 15: 453-457.
- [36] Feinberg A P, Tycko B. Timeline - The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 143-153.
- [37] Szyf M. Epigenetics, DNA methylation and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49: 243-263.
- [38] Cavalli G. Chromatin and epigenetics in development: blending cellular memory with cell fate plasticity. *Development*, 2006, 133: 2089-2094.
- [39] Sassone-Corsi P. When metabolism and epigenetics converge. *Science*, 2013, 339: 148-150.
- [40] Issa J P J, Baylin S B. Epigenetics and human disease. *Nat Med*, 1996, 2: 281-282.

- [41] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204-220.
- [42] Robertson K D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 597-610.
- [43] Robertson K D, Wolffe A P. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 2000, 1: 11-19.
- [44] Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J Cell Biochem*, 2009, 108: 43-51.
- [45] Smith Z D, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 204-220.
- [46] Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem. Cyto.*, 2007, 45: 149-158.
- [47] Razin A, Riggs A D. DNA methylation and gene-function. *Science*, 1980, 210: 604-610.
- [48] Scarano M I, Strazzullo M, Matarazzo M R, et al. DNA methylation 40 years later: its role in human health and disease. *J Cell Physiol*, 2005, 204: 21-35.
- [49] 蔡禄, 赵秀娟, 刘国庆. 表观遗传学前沿. Beijing: Tsinghua University Press. 2012.
- [50] Cheng X, Blumenthal R M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, 2008, 16: 341-350.
- [51] Guibert S, Weber M. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. // Heard E. *Epigenetics and Development*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2013: 47-83.
- [52] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 2014, 156: 45-68.
- [53] Hajkova P, Erhardt S, Lane N, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Develop.*, 2002, 117: 15-23.
- [54] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Embryogenesis - demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403: 501-502.
- [55] Oswald J, Engemann S, Lane N, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.*, 2000, 10: 475-478.
- [56] Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 129-140.
- [57] Feng S H, Jacobsen S E, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 2010, 330: 622-627.
- [58] Bostick M, Kim J K, Esteve P O, et al. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 2007, 317: 1760-1764.
- [59] Sharif J, Muto M, Takebayashi S I, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, 2007, 450: 908-U925.
- [60] Shearstone J R, Pop R, Bock C, et al. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science*, 2011, 334: 799-802.

- [61] Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Gene Dev.*, 2011, 25: 2436-2452.
- [62] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-930.
- [63] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y H, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-935.
- [64] He Y F, Li B Z, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-1307.
- [65] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-1303.
- [66] Pfaffeneder T, Hackner B, Truss M, et al. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50: 7008-7012.
- [67] Hashimoto H, Liu Y W, Upadhyay A K, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 4841-4849.
- [68] Valinluck V, Tsai H H, Rogstad D K, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 4100-4108.
- [69] Chen C C, Wang K Y, Shen C K J. The mammalian de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J Biol Chem*, 2012, 287: 33116-33121.
- [70] Liutkeviciute Z, Lukinavicius G, Masevicius V, et al. Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 400-402.
- [71] Schiesser S, Hackner B, Pfaffeneder T, et al. Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxylcytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 6516-6520.
- [72] Wu S C, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 607-620.
- [73] Guo J U, Su Y J, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011, 145: 423-434.
- [74] Maiti A, Drohat A C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*, 2011, 286: 35334-35338.
- [75] Shen L, Wu H, Diep D, et al. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*, 2013, 153: 692-706.
- [76] Song C X, Szulwach K E, Dai Q, et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell*, 2013, 153: 678-691.

- [77] Zhu J K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. // Annual Review Of Genetics. Palo Alto: Annual Reviews, 2009: 143-166.
- [78] Jones P A, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293: 1068-1070.
- [79] Harbers K, Schnieke A, Stuhlmann H, et al. DNA methylation and gene-expression - endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular-cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1981, 78: 7609-7613.
- [80] Wolf S F, Jolly D J, Lunnen K D, et al. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X-chromosome - implications for X-chromosome inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1984, 81: 2806-2810.
- [81] Mohandas T, Sparkes R S, Shapiro L J. Reactivation of an inactive human X-chromosome - evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science*, 1981, 211: 393-396.
- [82] Venolia L, Gartler S M, Wassman E R, et al. Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X-chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1982, 79: 2352-2354.
- [83] Watt F, Molloy P L. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa-cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Gene Dev.*, 1988, 2: 1136-1143.
- [84] Jones P L, Veenstra G J C, Wade P A, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 1998, 19: 187-191.
- [85] Nan X S, Ng H H, Johnson C A, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 1998, 393: 386-389.
- [86] Constancia M, Dean W, Lopes S, et al. Deletion of a silencer element in *Igf2* results in loss of imprinting independent of H19. *Nat Genet*, 2000, 26: 203-206.
- [87] Eden S, Constancia M, Hashimshony T, et al. An upstream repressor element plays a role in *Igf2* imprinting. *EMBO J*, 2001, 20: 3518-3525.
- [88] Hark A T, Schoenherr C J, Katz D J, et al. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/*Igf2* locus. *Nature*, 2000, 405: 486-489.
- [89] Gaudet F, Hodgson J G, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 2003, 300: 489-492.
- [90] Dodge J E, Okano M, Dick F, et al. Inactivation of *Dnmt3b* in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17986-17991.
- [91] Baylin S B. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science*, 1997, 277: 1948-1949.
- [92] Esteller M, Fraga M F, Paz M F, et al. Cancer epigenetics and methylation. *Science*, 2002, 297: 1807-1808.

- [93] Robertson K D, Jones P A. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 461-467.
- [94] Feinberg A P, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983, 301: 89-92.
- [95] Gamasosa M A, Slagel V A, Trewyn R W, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human-tumors. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11: 6883-6894.
- [96] Feinberg A P, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 111: 47-54.
- [97] DeSmet C, DeBacker O, Faraoni I, et al. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *PNAS*, 1996, 93: 7149-7153.
- [98] Kane M F, Loda M, Gaida G M, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, 1997, 57: 808-811.
- [99] Qu G Z, Grundy P E, Narayan A, et al. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet. Cytogen*, 1999, 109: 34-39.
- [100] Nakayama M, Wada M, Harada T, et al. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood*, 1998, 92: 4296-4307.
- [101] Baylin S B, Hoppener J W M, Debustros A, et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human-lung cancers and lymphomas. *Cancer Research*, 1986, 46: 2917-2922.
- [102] Greger V, Passarge E, Hopping W, et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum. Genet.*, 1989, 83: 155-158.
- [103] Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48: 880-888.
- [104] Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 2009, 1: 239-259.
- [105] Ehrlich M, Woods C B, Yu M C, et al. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*, 2006, 25: 2636-2645.
- [106] Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*, 2006, 9: 199-207.
- [107] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, et al. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res.*, 2008, 32: 487-490.
- [108] Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 2002, 21: 5400-5413.
- [109] Hoffmann M J, Schulz W A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83: 296-321.
- [110] Weisenberger D J, Campan M, Long T I, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 6823-6836.

- [111] Campion J, Milagro F, Martinez J A. Epigenetics and obesity. // Bouchard C. Genes and Obesity. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2010: 291-347.
- [112] Franks P W, Ling C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. *Bmc Medicine*, 2010, 8: 5.
- [113] Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 2012, 139: 15-31.
- [114] Hackett J A, Zyllicz J J, Surani M A. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet.*, 2012, 28: 164-174.
- [115] Pogribny I P, Vanyushin B F. Age-related genomic hypomethylation. New York: Springer, 2010.
- [116] Yan H, Bonasio R, Simola D F, et al. DNA methylation in social insects: how epigenetics can control behavior and longevity. // Berenbaum M R. *Annual Review of Entomology*, Vol 60. Palo Alto: Annual Reviews, 2015: 435-452.
- [117] Horvath S, Zhang Y F, Langfelder P, et al. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biology*, 2012, 13.
- [118] Deng D J, Liu Z J, Du Y T. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers. // Herceg Z, UShijima T. *Epigenetics and Cancer*, Pt B. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2010: 125-176.
- [119] Laird P W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 191-203.
- [120] Laird P W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 253-266.
- [121] Schones D E, Zhao K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 179-191.
- [122] Fraga M E, Esteller M. DNA methylation: A profile of methods and applications. *Biotechniques*, 2002, 33: 632.
- [123] Pomraning K R, Smith K M, Freitag M. Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods*, 2009, 47: 142-150.
- [124] Vanderploeg L H T, Flavell R A. DNA methylation in the human gamma-delta-beta-globin locus in erythroid and non-erythroid tissues. *Cell*, 1980, 19: 947-958.
- [125] Waalwijk C, Flavell R A. DNA methylation at a CCGG sequence in large intron of rabbit beta-globin gene - tissue-specific variations. *Nucleic Acids Res*, 1978, 5: 4631-4641.
- [126] Kaput J, Sneider T W. Methylation of somatic vs germ-cell DNAs analyzed by restriction endonuclease digestions. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7: 2303-2322.
- [127] Gautier F, Bunemann H, Grotjahn L. Analysis of calf-thymus satellite DNA - evidence for specific methylation of cytosine in C-G sequences. *Eur J Biochem*, 1977, 80: 175-183.
- [128] Lorthongpanich C, Cheow L F, Balu S, et al. Single-cell DNA-methylation analysis reveals epigenetic chimerism in preimplantation embryos. *Science*, 2013, 341: 1110-1112.

- [129] Hayashizaki Y, Hirotsune S, Okazaki Y, et al. Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. *Electrophoresis*, 1993, 14: 251-258.
- [130] Liang G G, Gonzalgo M L, Salem C, et al. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*, 2002, 27: 150-155.
- [131] Frigola J, Ribas M, Risques R A, et al. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res*, 2002, 30.
- [132] Estecio M R H, Yan P S, Ibrahim A E K, et al. High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res.*, 2007, 17: 1529-1536.
- [133] Yan P S, Potter D, Deatherage D E, et al. Differential methylation hybridization: profiling dna methylation with a high-density cpg island microarray. // Tost J. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2009: 89-106.
- [134] Oda M, Glass J L, Thompson R F, et al. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 3829-3839.
- [135] Li Y Y, Tollefsbol T O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. // Tollefsbol T O. *Epigenetics Protocols*, Second Edition. Totowa: Humana Press Inc, 2011: 11-21.
- [136] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS*, 1992, 89: 1827-1831.
- [137] Clark S J, Harrison J, Paul C L, et al. High-sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 2990-2997.
- [138] Paul C L, Clark S J. Cytosine methylation: Quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN(TM) analysis. *Biotechniques*, 1996, 21: 126-133.
- [139] Reinders J, Vivier C D, Theiler G, et al. Genome-wide, high-resolution DNA methylation profiling using bisulfate-mediated cytosine conversion. *Genome Res.*, 2008, 18: 469-476.
- [140] Meissner A, Gnirke A, Bell G W, et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 5868-5877.
- [141] Hodges E, Smith A D, Kendall J, et al. High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing. *Genome Res.*, 2009, 19: 1593-1605.
- [142] Lister R, Pelizzola M, Dowen R H, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462: 315-322.
- [143] Song C-X, Szulwach K E, Fu Y, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 68-72.
- [144] Yu M, Hon G C, Szulwach K E, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*, 2012, 149: 1368-1380.

- [145] Song C-X, Szulwach K E, Dai Q, et al. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell*, 2013, 153: 678-691.
- [146] Yu M, Hon G C, Szulwach K E, et al. Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Protoc*, 2012, 7: 2159-2170.
- [147] Lu X, Song C-X, Szulwach K, et al. Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq) for 5-carboxylcytosine detection in DNA. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 9315-9317.
- [148] Weber M, Hellmann I, Stadler M B, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, 2007, 39: 457-466.
- [149] Yuan B F. 5-Methylcytosine and its derivatives. // Makowski G S. *Advances in Clinical Chemistry*, Vol 67. Elsevier Inc, 2014: 151-187.
- [150] Yuan B F, Feng Y Q. Recent advances in the analysis of 5-methylcytosine and its oxidation products. *Trac-trend. Anal. Chem.*, 2014, 54: 24-35.
- [151] Zhang J J, Zhang L, Zhou K, et al. Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2011, 413: 164-170.
- [152] Zhang L, Zhang L, Zhou K, et al. Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Biomol Screening*, 2012, 17: 877-884.
- [153] Zhang L T, Zhang L J, Zhang J J, et al. Quantification of the sixth DNA base 5-hydroxymethylcytosine in colorectal cancer tissue and C-26 cell line. *Bioanalysis*, 2013, 5: 839-845.
- [154] Ye X X, Zhang L J, Chen B, et al. A quantitative method for detecting DNA methylation over targeted genomic regions using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2017, 169: 136-140.
- [155] Yang I, Fortin M C, Richardson J R, et al. Fused-core silica column ultra-performance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status. *Anal Biochem*, 2011, 409: 138-143.
- [156] Friso S, Choi S W, Dolnikowski G G, et al. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2002, 74: 4526-4531.
- [157] Song L G, James S R, Kazim L, et al. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005, 77: 504-510.
- [158] Magana A A, Wrobel K, Escobosa A R C, et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 209-220.
- [159] Zhang G Q, Huang H, Liu D, et al. N-6-methyladenine DNA modification in drosophila. *Cell*, 2015, 161: 893-906.

- [160] Yin R C, Mo J Z, Lu M L, et al. Detection of human urinary 5-hydroxymethylcytosine by stable isotope dilution HPLC-MS/MS analysis. *Anal Chem*, 2015, 87: 1846-1852.
- [161] Zhao B L, Yang Y, Wang X L, et al. Redox-active quinones induces genome-wide DNA methylation changes by an iron-mediated and Tet-dependent mechanism. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 1593-1605.
- [162] Yin R C, Mao S Q, Zhao B L, et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 10396-10403.
- [163] Tang Y, Zheng S J, Qi C B, et al. Sensitive and simultaneous determination of 5-methylcytosine and its oxidation products in genomic DNA by chemical derivatization coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem*, 2015, 87: 3445-3452.
- [164] Tang Y, Xiong J, Jiang H P, et al. Determination of oxidation products of 5-methylcytosine in plants by chemical derivatization coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem*, 2014, 86: 7764-7772.
- [165] Jiang H P, Liu T, Guo N, et al. Determination of formylated DNA and RNA by chemical labeling combined with mass spectrometry analysis. *Anal Chim Acta*, 2017, 981: 1-10.
- [166] Zhang H Y, Xiong J, Qi B L, et al. The existence of 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine in both DNA and RNA in mammals. *Chem Commun*, 2016, 52: 737-740.
- [167] Huang W, Lan M D, Qi C B, et al. Formation and determination of the oxidation products of 5-methylcytosine in RNA. *Chem Sci*, 2016, 7: 5495-5502.
- [168] San Romerio A, Fiorillo G, Terruzzi I, et al. Measurement of DNA methylation using stable isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2005, 336: 158-163.
- [169] Tang Y, Gao X D, Wang Y S, et al. Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 2012, 84: 7249-7255.
- [170] Rossella F, Polledri E, Bollati V, et al. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 2637-2646.
- [171] Iglesias T, Espina M, Montes-Bayon M, et al. Anion exchange chromatography for the determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine: application to cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 2423-2431.
- [172] Sotgia S, Zinellu A, Pisanu E, et al. A hydrophilic interaction ultraperformance liquid chromatography (HILIC-UPLC) method for genomic DNA methylation assessment by UV detection. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 2937-2941.
- [173] Rozhon W, Baubec T, Mayerhofer J, et al. Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 2008, 375: 354-360.
- [174] Torres A L, Barrientos E Y, Wrobel K, et al. Selective derivatization of cytosine and

- methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Anal Chem*, 2011, 83: 7999-8005.
- [175] Kovatsi L, Fragou D, Samanidou V, et al. Evaluation of 5-methyl-2'-deoxycytidine stability in hydrolyzed and nonhydrolyzed DNA by HPLC-UV. *Bioanalysis*, 2012, 4: 367-372.
- [176] Yuan F, Zhang X H, Nie J, et al. Ultrasensitive determination of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA by sheathless interfaced capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Chem Commun*, 2016, 52: 2698-2700.
- [177] Fraga M F, Uriol E, Diego L B, et al. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 2002, 23: 1677-1681.
- [178] Zinellu A, Sotgiu E, Assaretti S, et al. Evaluation of global genomic DNA methylation in human whole blood by capillary electrophoresis uv detection. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, DOI: 10.1155/2017/4065892.
- [179] Braunschweig M H. Quantification of global DNA methylation with infrared fluorescence in liver and muscle tissues of differentially fed boars. *Luminescence*, 2009, 24: 213-216.
- [180] Agathocleous M, Meacham C E, Burgess R J, et al. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*, 2017, 549: 476.
- [181] Singletary S E. Isolated tumor cells in bone marrow of early-stage breast cancer patients. *Journal Of the American College Of Surgeons*, 2006, 203: 240-249.
- [182] Zhang L L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18: 5701-5710.
- [183] Rhim A D, Mirek E T, Aiello N M, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 2012, 148: 349-361.
- [184] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, 331: 1559-1564.
- [185] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, 2007, 253: 180-204.
- [186] Riethdorf S, Muller V, Zhang L L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant geparquattro trial. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16: 2634-2645.
- [187] Allard W J, Matera J, Miller M C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 6897-6904.
- [188] Schiro P G, Zhao M, Kuo J S, et al. Sensitive and high-throughput isolation of rare cells from peripheral blood with ensemble-decision aliquot ranking. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 4618-4622.
- [189] Plaks V, Koopman C D, Werb Z. Circulating tumor cells. *Science*, 2013, 341: 1186-1188.

- [190] Alix-Panabieres C, Pantel K. Opinion challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 623-631.
- [191] Pantel K, Deneve E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem*, 2012, 58: 936-940.
- [192] Torano E G, Petrus S, Fernandez A F, et al. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine*, 2012, 50: 1733-1742.
- [193] Bedford M T, Vanhelden P D. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human-prostate. *Cancer Research*, 1987, 47: 5274-5276.
- [194] Severi G, Southey M C, English D R, et al. Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment*, 2014, 148: 665-673.
- [195] Jovanovic J, Ronneberg J A, Tost J, et al. The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, 2010, 4: 242-254.
- [196] Hakkarainen M, Wahlfors J, Myohanen S, et al. Hypermethylation of calcitonin gene regulatory sequences in human breast cancer as revealed by genomic sequencing. *International Journal Of Cancer*, 1996, 69: 471-474.
- [197] Bareyt S, Carell T. Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47: 181-184.
- [198] Aschenbrenner J, Drum M, Topal H, et al. Direct sensing of 5-methylcytosine by polymerase chain reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53: 8154-8158.
- [199] Shim J, Humphreys G I, Venkatesan B M, et al. Detection and quantification of methylation in DNA using solid-state nanopores. *Scientific Reports*, 2013, 3.
- [200] Lu T P, Chen K T, Tsai M H, et al. Identification of genes with consistent methylation levels across different human tissues. *Scientific Reports*, 2014, 4.
- [201] Olkhov-Mitsel E, Zdravic D, Kron K, et al. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Scientific Reports*, 2014, 4.
- [202] Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, 2005, 42: 155-196.
- [203] Hardingham J E, Hewett P J, Sage R E, et al. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *International Journal Of Cancer*, 2000, 89: 8-13.
- [204] Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *Journal of hematotherapy*, 1994, 3: 165-173.
- [205] Brandt B, Junker R, Griwatz C, et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Research*, 1996, 56: 4556-4561.
- [206] Crisan D, Ruark D S, Decker D A, et al. Detection of circulating epithelial cells after surgery

- for benign breast disease. *Molecular Diagnosis*, 2000, 5: 33-38.
- [207] Wei Z W, Han S, Gong X Y, et al. Rapid removal of matrices from small-volume samples by step-voltage nanoelectrospray. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 11025-11028.
- [208] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33: 245-254.
- [209] Yan X, Bain R M, Cooks R G. Organic reactions in microdroplets: reaction acceleration revealed by mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 12960-12972.
- [210] Crawford E A, Esen C, Volmer D A. Real time monitoring of containerless microreactions in acoustically levitated droplets via ambient ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 8396-8403.
- [211] Bain R M, Pulliam C J, Thery F, et al. Accelerated chemical reactions and organic synthesis in leidenfrost droplets. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 10478-10482.
- [212] Narayan S, Muldoon J, Finn M G, et al. "On water": unique reactivity of organic compounds in aqueous suspension. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 3275-3279.
- [213] Badu-Tawiah A K, Campbell D I, Cooks R G. Accelerated C-N bond formation in dropcast thin films on ambient surfaces. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23: 1461-1468.
- [214] Banerjee S, Zare R N. Syntheses of isoquinoline and substituted quinolines in charged microdroplets. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54: 14795-14799.
- [215] Mueller T, Badu-Tawiah A, Cooks R G. Accelerated carbon-carbon bond-forming reactions in preparative electrospray. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 11832-11835.
- [216] Wei Z W, Wleklinski M, Ferreira C, et al. Reaction acceleration in thin films with continuous product deposition for organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56: 9386-9390.
- [217] Bain R M, Pulliam C J, Ayrton S T, et al. Accelerated hydrazone formation in charged microdroplets. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 1875-1878.
- [218] Bain R M, Pulliam C J, Cooks R G. Accelerated Hantzsch electrospray synthesis with temporal control of reaction intermediates. *Chem Sci*, 2015, 6: 397-401.
- [219] Girod M, Moyano E, Campbell D I, et al. Accelerated bimolecular reactions in microdroplets studied by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Sci*, 2011, 2: 501-510.
- [220] Lee J K, Banerjee S, Nam H G, et al. Acceleration of reaction in charged microdroplets. *Q Rev Biophys*, 2015, 48: 437-444.
- [221] Yan X, Augusti R, Li X, et al. Chemical reactivity assessment using reactive paper spray ionization mass spectrometry: the katritzky reaction. *Chempluschem*, 2013, 78: 1142-1148.
- [222] Bain R M, Pulliam C J, Raab S A, et al. Chemical synthesis accelerated by paper spray: the haloform reaction. *J Chem Educ*, 2016, 93: 340-344.
- [223] Banerjee S, Basheer C, Zare R N. A Study of heterogeneous catalysis by nanoparticle-embedded paper-spray ionization mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 12807-12811.
- [224] Li Y, Yan X, Cooks R G. The role of the interface in thin film and droplet accelerated reactions

- studied by competitive substituent effects. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 3433-3437.
- [225] Ray L B. Cells go solo introduction. *Science*, 2013, 342: 1187.
- [226] Method of the Year 2013. *Nat Methods*, 2014, 11: 1.
- [227] Huang W, Qi C B, Lv S W, et al. Determination of DNA and RNA methylation in circulating tumor cells by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 1378-1384.
- [228] Zenobi R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science*, 2013, 342: 1201.
- [229] Rubakhin S S, Romanova E V, Nemes P, et al. Profiling metabolites and peptides in single cells. *Nat Methods*, 2011, 8: S20-S29.
- [230] Svatos A. Single-cell metabolomics comes of age: new developments in mass spectrometry profiling and imaging. *Anal Chem*, 2011, 83: 5037-5044.
- [231] Nemes P, Rubakhin S S, Aerts J T, et al. Qualitative and quantitative metabolomic investigation of single neurons by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2013, 8: 783-799.
- [232] Lombard-Banek C, Moody S A, Nemes P. Single-cell mass spectrometry for discovery proteomics: quantifying translational cell heterogeneity in the 16-cell frog (*Xenopus*) embryo. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 2454-2458.
- [233] Onjiko R M, Moody S A, Nemes P. Single-cell mass spectrometry reveals small molecules that affect cell fates in the 16-cell embryo. *PNAS*, 2015, 112: 6545-6550.
- [234] Gong X Y, Zhao Y Y, Cai S Q, et al. Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels. *Anal Chem*, 2014, 86: 3809-3816.
- [235] Chen F M, Lin L Y, Zhang J, et al. Single-cell analysis using drop-on-demand inkjet printing and probe electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 4354-4360.
- [236] Deng J W, Yang Y Y, Xu M Z, et al. Surface-coated probe nanoelectrospray ionization mass spectrometry for analysis of target compounds in individual small organisms. *Anal Chem*, 2015, 87: 9923-9930.
- [237] Nakashima T, Wada H, Morita S, et al. Single-cell metabolite profiling of stalk and glandular cells of intact trichomes with internal electrode capillary pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 3049-3057.
- [238] Wei Z W, Xiong X C, Guo C A, et al. Pulsed direct current electrospray: enabling systematic analysis of small volume sample by boosting sample economy. *Anal Chem*, 2015, 87: 11242-11248.
- [239] Zhang X C, Wei Z W, Gong X Y, et al. Integrated droplet-based microextraction with ESI-MS for removal of matrix interference in single-cell analysis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 9.
- [240] Si X Y, Zhao Y Y, Yang C D, et al. DNA methylation as a potential diagnosis indicator for rapid discrimination of rare cancer cells and normal cells. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8.
- [241] Fujii T, Matsuda S, Tejedor M L, et al. Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2015, 10: 1445-1456.

- [242] Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, et al. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification. *J Mass Spectrom*, 2008, 43: 1692-1700.
- [243] Altelaar A F M, Luxembourg S L, McDonnell L A, et al. Imaging mass spectrometry at cellular length scales. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1185-1196.
- [244] Amantonico A, Oh J Y, Sobek J, et al. Mass spectrometric method for analyzing metabolites in yeast with single cell sensitivity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47: 5382-5385.
- [245] Stolee J A, Vertes A. Toward single-cell analysis by plume collimation in laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2013, 85: 3592-3598.
- [246] Stolee J A, Shrestha B, Mengistu G, et al. Observation of subcellular metabolite gradients in single cells by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 10386-10389.
- [247] O'Brien P J, Lee M, Spilker M E, et al. Monitoring metabolic responses to chemotherapy in single cells and tumors using nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) imaging. *Cancer & metabolism*, 2013, 1: 4.
- [248] Passarelli M K, Newman C F, Marshall P S, et al. Single-cell analysis: visualizing pharmaceutical and metabolite uptake in cells with label-free 3D mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2015, 87: 6696-6702.
- [249] Brison J, Robinson M A, Benoit D S W, et al. TOF-SIMS 3D imaging of native and non-native species within HeLa cells. *Anal Chem*, 2013, 85: 10869-10877.
- [250] Page J S, Kelly R T, Tang K, et al. Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18: 1582-1590.
- [251] Soltwisch J, Ketting H, Vens-Cappell S, et al. Mass spectrometry imaging with laser-induced postionization. *Science*, 2015, 348: 211-215.
- [252] Zekavat B, Solouki T. Radio-frequency ionization of organic compounds for mass spectrometry analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 2426-2429.
- [253] Lee J R, Lee A, Kim S K, et al. Mass spectrometry signal amplification method for attomolar detection of antigens using small-molecule-tagged gold microparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47: 9518-9521.
- [254] Wang Y Z, Zhang X H, Zhai Y B, et al. Mass selective ion transfer and accumulation in ion trap arrays. *Anal Chem*, 2014, 86: 10164-10170.
- [255] Xu W, Li L F, Zhou X Y, et al. Ion Sponge: A 3-dimensional array of quadrupole ion traps for trapping and mass-selectively processing ions in gas phase. *Anal Chem*, 2014, 86: 4102-4109.

## 致 谢

由衷的感谢我的导师张新荣教授。五年博士生涯里，张老师敏锐的科学眼光、严谨的学术作风和积极的人生态度一直影响着我，让我懂得了一位科研工作者应具有的品质。同时，他对我的课题研究指导良多，既有启发性的引导，也有事无巨细的指点。我博士学位论文的完成与张老师的培养和关怀密不可分。

感谢张四纯教授五年来对我的指导和帮助。他对我的实验操作和论文撰写有很多细节上的指导，也常在我课题进展缓慢时勉励我，同我一起讨论攻克难题的办法，让我受益良多。

在中国计量科学研究院质谱工程技术研究中心进行合作研究期间，承蒙方向研究员和熊行创老师的帮助和指导，非常感谢。

感谢杨成对老师在质谱仪器操作使用和维护上对我的帮助和支持。

感谢赵瑶瑶师姐、杨燕师姐、蔡乐斯师弟、王瑞华师妹等对我研究工作的贡献。我学位论文的完成与他们的良好合作密不可分。

感谢张智平老师、马潇潇师兄、陆跃翔师兄、龚晓云师兄、李艳艳师姐、刘睿师兄、魏振威师兄、王松师兄等，在我学术研究起步阶段传授了我许多知识要点和实验方法，让我为五年的博士课题研究打下坚实基础。也感谢课题组其他兄弟姐妹对我平日的帮助和包容，让我时刻感受到来自身边人的温暖。

最后特别感谢我的家人。无论我处在何种境遇，心中无法抹去的始终是家人平日的关怀与鼓励。

本论文各项研究承蒙国家自然科学基金和科技部国家重大科学仪器专项资助，特此致谢。

## 声 明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，独立进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人享有著作权的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

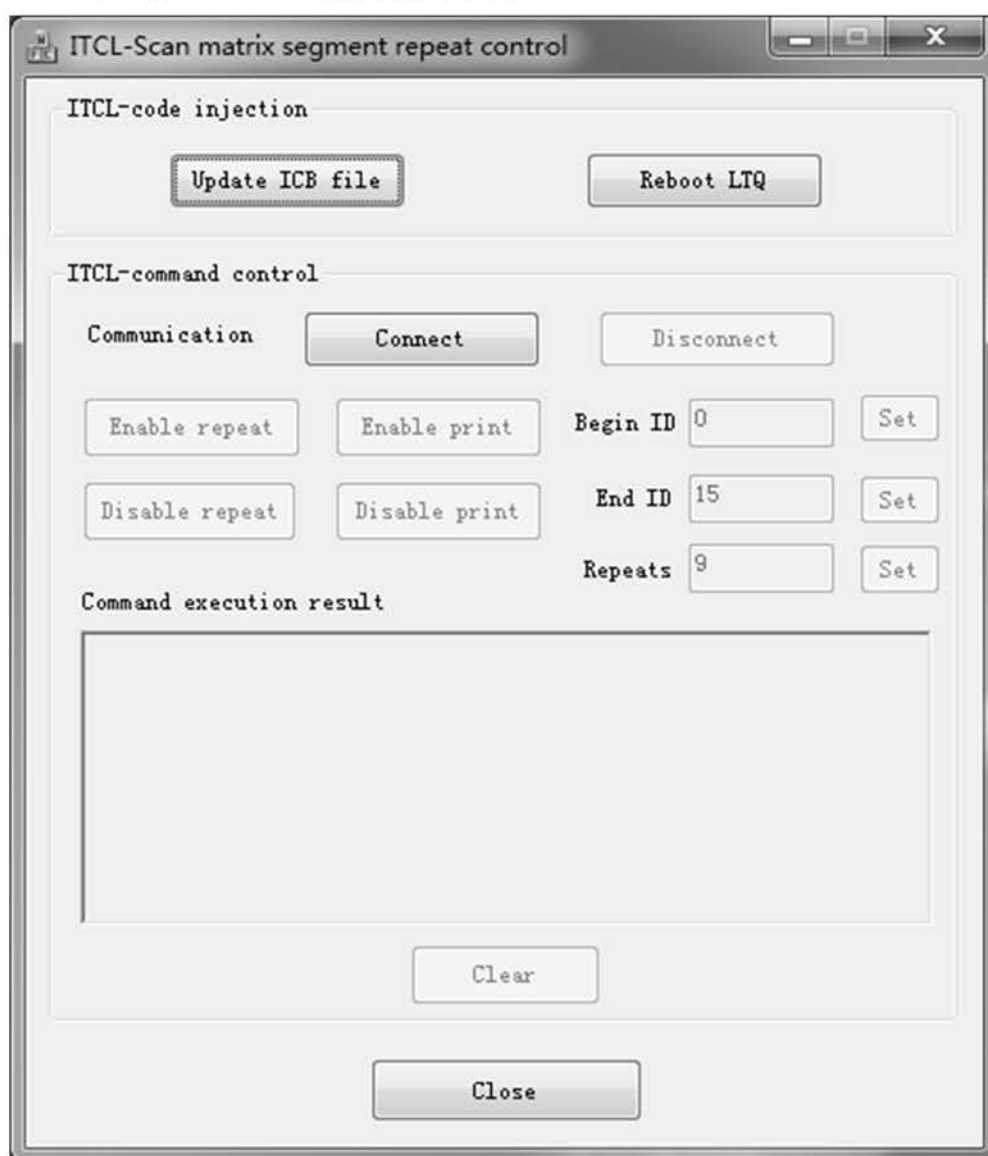
签 名：\_\_\_\_\_日 期：\_\_\_\_\_

## 附录 A 离子重复富集技术的实现和操作方法

### A.1 ITCL\_RepeatControl 软件功能介绍

离子重复富集技术是使用 ITCL\_RepeatControl 控制软件来实现，该软件安装包可在以下地址下载：<https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/acs.analchem.6b03390>。该软件的功能是对商品化质谱仪的扫描函数进行选择性的重复。目前，该软件仅适用于 Thermo Scientific 公司的 Orbitrap Elite 质谱仪器。

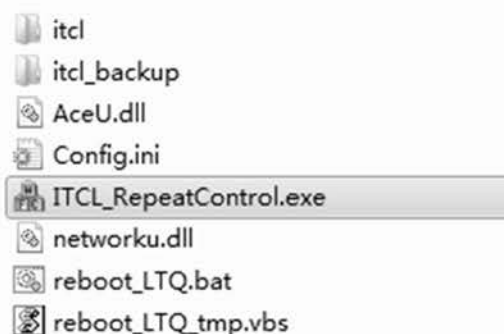
### A.2 ITCL\_RepeatControl 软件用户界面



图A.1 ITCL\_RepeatControl软件用户界面。

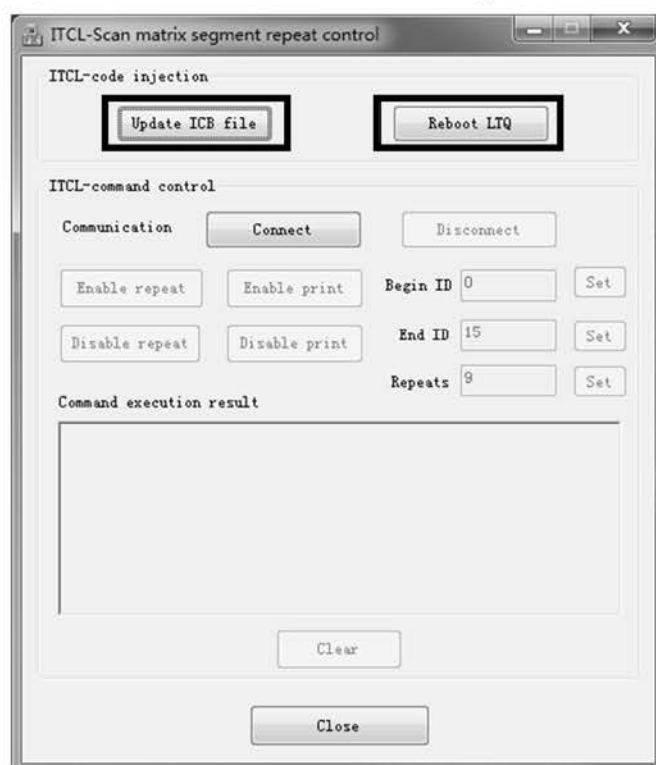
### A.3 ITCL\_RepeatControl 软件操作方法

(1) 双击 ITCL\_RepeatControl\_BIN\ITCL\_RepeatControl.exe 运行软件(图 A.2)。



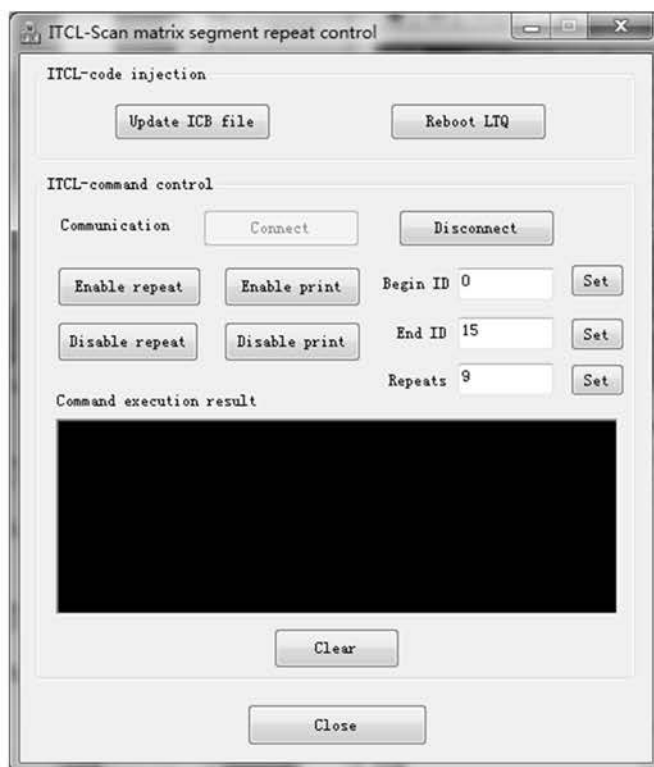
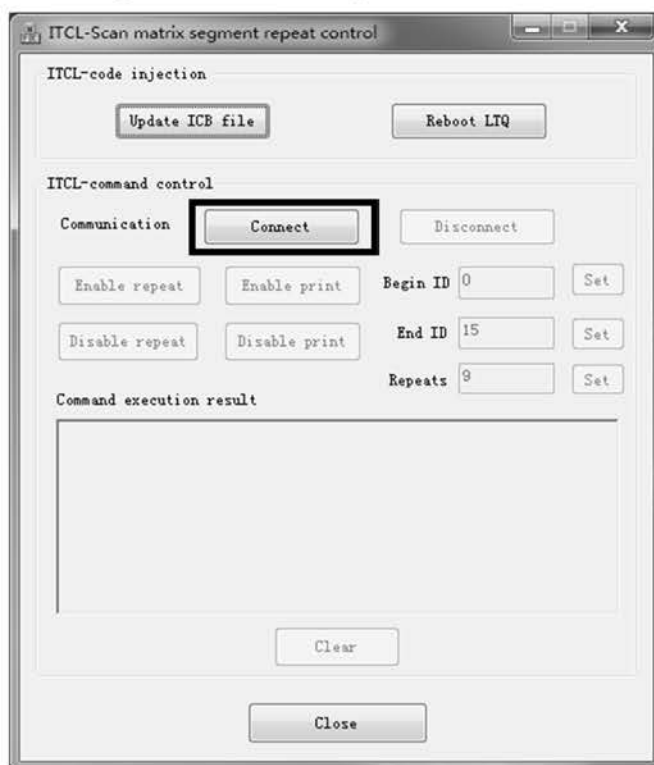
图A.2 双击ITCL\_RepeatControl\_BIN\ITCL\_RepeatControl.exe运行软件。

(2) (第一次使用才需要进行这一步) 首次使用软件须点击“Update ICB file”按钮，软件自动将 C:\Thermo\Instruments\LTQ\system\itcl 下的所有\*.ICB 文件备份至 ITCL\_RepeatControl\_BIN\itcl\_backup。并用当前 ITCL\_RepeatControl\_BIN\itcl 目录下的\*.ICB 文件替换 C:\Thermo\Instruments\LTQ\system\itcl 目录下的原文件。再点击“Reboot LTQ”按钮，将\*.ICB 文件下载到质谱仪下位机并重启下位机(图 A.3)。重启完成后 Orbitrap Elite Tune 软件显示处于 standby 状态。



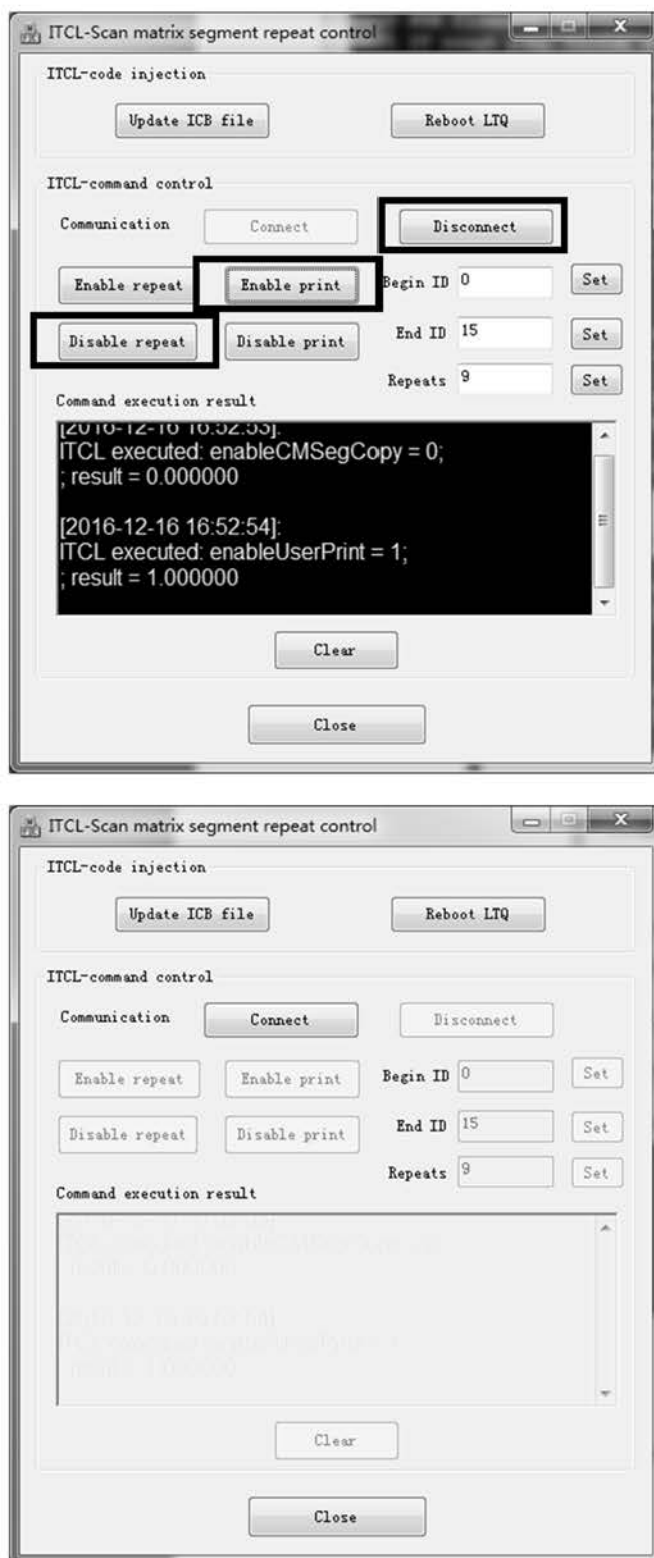
图A.3 首次使用软件须依次点击“Update ICB file”和“Reboot LTQ”按钮。

(3) 点击“Connect”按钮使软件与下位机连接。如果连接成功软件界面“Disconnect”、“Enable repeat”、“Disable repeat”等按钮将处于可用状态(图 A.4)。



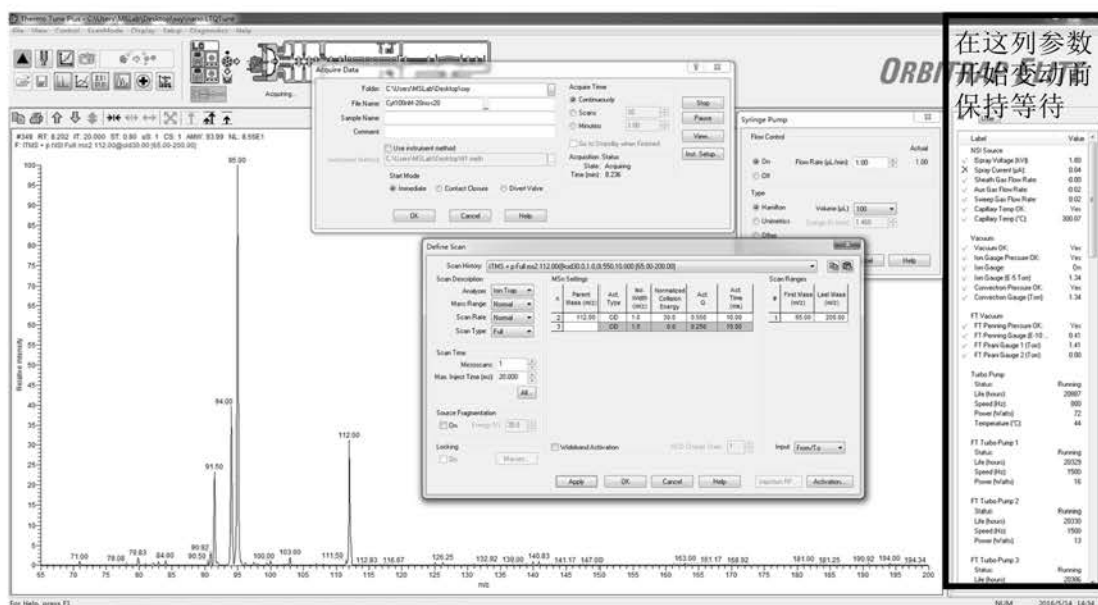
图A.4 点击“Connect”按钮成功后软件处于可用状态。

(4) 依次点击“Disable repeat”、“Enable print”、“Disconnect”按钮（图 A.5）。



图A.5 依次点击“Disable repeat”、“Enable print”、“Disconnect”按钮。

(5) 等待几秒钟，直到 Orbitrap Elite Tune 软件界面右侧状态参数开始变动 (图 A.6)。

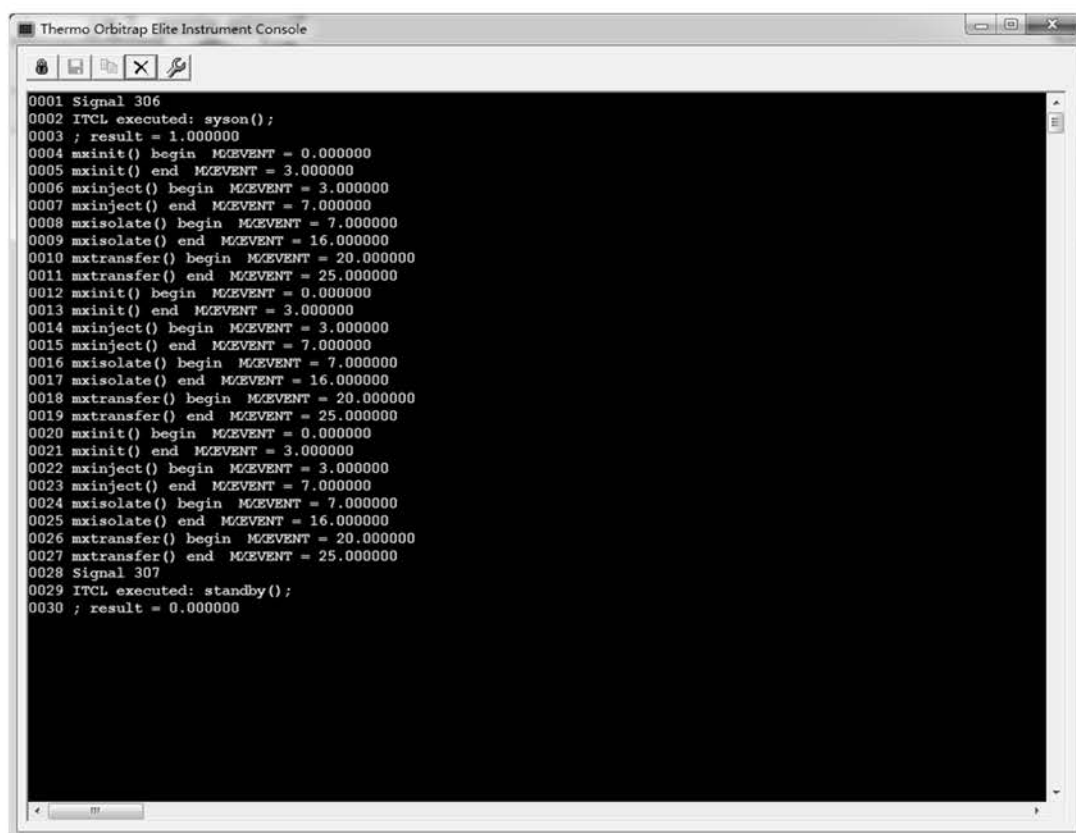


图A.6 Orbitrap Elite Tune软件界面右侧状态参数开始变动前保持等待。

(6) 在不改变任何扫描参数的情况下启动检测器完成一次扫描。观察并记录 Thermo Orbitrap Elite Instrument Console 控制台窗口相应扫描函数的起始段 ID 和终止段 ID (MXEVENT)。起始段 ID 号为控制台窗口中 begin MXEVENT 数值，终止段 ID 为控制台窗口中 end MXEVENT 数值减一。以图 A.7 出现的情况为例，各段扫描函数的起始段 ID 和终止段 ID 如表 A.1 所示。

表 A.1 观察并记录下图 A.7 所示的扫描函数起始段 ID 和终止段 ID。

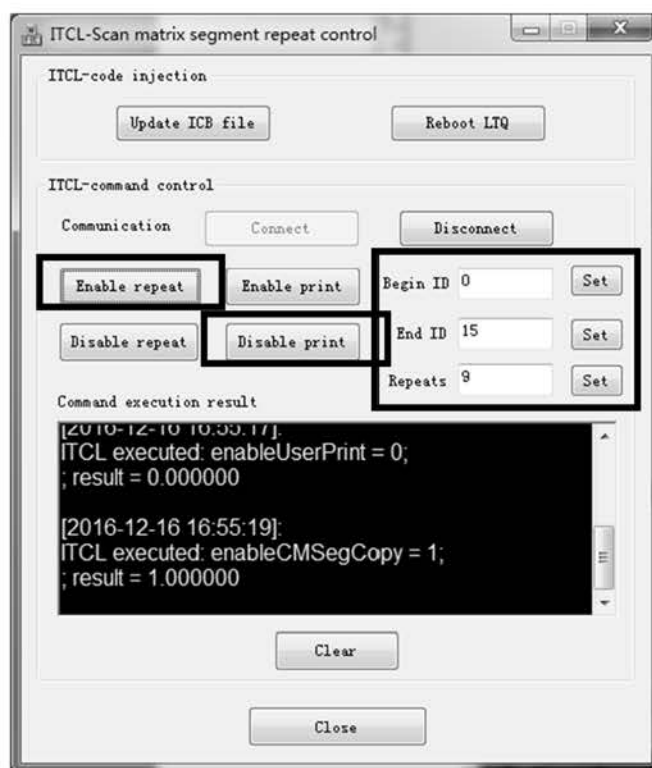
扫描函数	起始段 ID	终止段 ID
Mxinit (离子初始化)	0	2 (3 - 1 = 2)
Mxinject (离子注入)	3	6 (7 - 1 = 6)
Mxisolate (离子隔离)	7	15 (16 - 1 = 15)
Mxtransfer (离子传输)	20	24 (25 - 1 = 24)



```
Thermo Orbitrap Elite Instrument Console
0001 Signal 306
0002 ITCL executed: syson();
0003 ; result = 1.000000
0004 mxinit() begin M/EVENT = 0.000000
0005 mxinit() end M/EVENT = 3.000000
0006 mxinject() begin M/EVENT = 3.000000
0007 mxinject() end M/EVENT = 7.000000
0008 mxisolate() begin M/EVENT = 7.000000
0009 mxisolate() end M/EVENT = 16.000000
0010 mxtransfer() begin M/EVENT = 20.000000
0011 mxtransfer() end M/EVENT = 25.000000
0012 mxinit() begin M/EVENT = 0.000000
0013 mxinit() end M/EVENT = 3.000000
0014 mxinject() begin M/EVENT = 3.000000
0015 mxinject() end M/EVENT = 7.000000
0016 mxisolate() begin M/EVENT = 7.000000
0017 mxisolate() end M/EVENT = 16.000000
0018 mxtransfer() begin M/EVENT = 20.000000
0019 mxtransfer() end M/EVENT = 25.000000
0020 mxinit() begin M/EVENT = 0.000000
0021 mxinit() end M/EVENT = 3.000000
0022 mxinject() begin M/EVENT = 3.000000
0023 mxinject() end M/EVENT = 7.000000
0024 mxisolate() begin M/EVENT = 7.000000
0025 mxisolate() end M/EVENT = 16.000000
0026 mxtransfer() begin M/EVENT = 20.000000
0027 mxtransfer() end M/EVENT = 25.000000
0028 Signal 307
0029 ITCL executed: standby();
0030 ; result = 0.000000
```

图A.7 打开Thermo Orbitrap Elite Instrument Console控制台窗口观察并记录相应扫描函数的起始段ID和终止段ID。

(7) 重新点击“Connect”按钮，再点击“Enable repeat”、“Disable print”。根据要重复的扫描函数输入 Begin ID（起始段 ID）、End ID（终止段 ID）、Repeats 值（重复次数）并分别点击右侧“Set”按钮（图 A.8）。例如，如果期望使用离子阱对特定离子进行重复富集，那么离子初始化、离子注入和离子隔离这 3 个扫描函数应该被多次重复，于是在软件界面就应当设置这 3 段的 Begin ID 为 0，End ID 值为 15，Repeats 可以设置的范围为 0 至 25 次，图 A.8 中的情形是多重复了 9 次扫描函数。



图A.8 在软件中设置Begin ID（起始段ID）、End ID（终止段ID）和Repeats值。

（8）点击“Disconnect”按钮，待 Orbitrap Elite Tune 软件界面右侧状态参数开始变动时，打开检测器进行质谱扫描，则相应的扫描函数将按软件设置的起止 ID 和重复次数进行重复扫描。以图 A.8 中的情形为例，离子初始化、离子注入和离子隔离这 3 个扫描函数多重复进行了 9 次，而之后的离子传输扫描函数没有发生变化，仅进行了 1 次。

（9）当期望关闭扫描函数重复功能时，依次点击“Connect”、“Disable repeat”和“Disconnect”。

## 个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果

### 个人简历

1991年10月11日出生于北京市。

2009年8月进入清华大学精密仪器与机械学系学习，同年9月通过二次招生转入化学系化学生物学基础科学班学习，2013年7月本科毕业并获得理学学士学位。

2013年9月免试进入清华大学化学系攻读分析化学博士至今。

2016年4月至2017年1月在中国计量科学研究院质谱工程技术研究中心从事合作研究。

### 发表的学术论文

- [1] **Si X Y**, Xiong X C, Zhang S C, Fang X, Zhang X R. Detecting low-abundance molecules at single-cell level by repeated ion accumulation in ion trap mass spectrometer. *Anal Chem*, 2017, 89: 2275-2281. (SCI 收录, 检索号: 000394724700016, IF: 6.320)
- [2] **Si X Y**, Zhao Y Y, Yang C D, Zhang S C, Zhang X R. DNA methylation as a potential diagnosis indicator for rapid discrimination of rare cancer cells and normal cells. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8. (SCI 收录, 检索号: 000357319200002, IF: 4.259)
- [3] **Si X Y**, Cai L S, Yang Y, Yang C D, Zhang S C, Zhang X R. Ultra-Rapid Derivatization in Confined Volume for Analysis of DNA Methylation. (Submitted)
- [4] Zhang X C, Wei Z W, Gong X Y, **Si X Y**, Zhao Y Y, Yang C D, Zhang S C, Zhang X R. Integrated droplet-based microextraction with ESI-MS for removal of matrix interference in single-cell analysis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 9. (SCI 收录, 检索号: 000375159800001, IF: 4.259)
- [5] Wei Z W, Xiong X C, Guo C A, **Si X Y**, Zhao Y Y, He M Y, Yang C D, Xu W, Tang F, Fang X, Zhang S C, Zhang X R. Pulsed direct current electrospray: enabling systematic analysis of small volume sample by boosting sample economy. *Anal Chem*, 2015, 87: 11242-11248. (SCI 收录, 检索号: 000365151000012, IF: 6.320)
- [6] Zhao Y Y, Gong X Y, **Si X Y**, Wei Z W, Yang C D, Zhang S C, Zhang X R. Coupling a solid phase microextraction (SPME) probe with ambient MS for rapid enrichment and detection of phosphopeptides in biological samples. *Analyst*, 2015, 140: 2599-2602. (SCI 收录, 检索号: 000352141800005, IF: 3.885)