

# 生物大分子(DNA 及蛋白质)加和物的质谱分析鉴别\*

龙耀庭

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

**摘要** 本文论述了质谱在生物大分子(DNA 及蛋白质)加合物研究中的应用。讨论了烷基加合物、PAH 加合物、胺类加合物、蛋白加合物等方面的应用结果及特点, 同时评述了质谱法的新进展电喷雾电离质谱技术(ESIMS)在鉴别蛋白质加合物方面的某些成功例子。结果表明 ESIMS 在生物大分子加合物的研究方面将会带来更多的新结果。

**关键词** 加合物, 质谱, 生物大分子。

化学因素致癌与致突的分子生物学重要依据是 DNA 暴露在化学诱变剂下, DNA 上碱基与这些致癌性化学诱变剂(直接或在它们代谢活化后)发生相互作用后受到修饰而又得不到体内修复系统修复时就有可能导致 DNA 双链上互补碱基对的误配, 以致于最后表达形成突变及癌变。研究表明, 化学致癌物通常是亲电性化合物。DNA 碱基杂环上的 O、S、N 等杂原子除了 N<sup>9</sup>-C 键与核糖相连外, 其余的都能与化学诱变剂形成相应的 DNA 化学诱变剂加合物。其有关碱基可能产生修饰衍化部位示于图 1。体外试验表明, 不同的部位的加合物有着不同的生物毒性。

呤(O<sup>6</sup>-MeG)及 N<sup>3</sup>-腺嘌呤上(N<sup>3</sup>-MA)的修饰是造成细胞中毒及死亡的主要异构体<sup>[1]</sup>。前者会阻碍 DNA 聚合酶的功能<sup>[2]</sup>, 后者会造成互补碱基对的误配, 例如, O<sup>6</sup>-MeG 不再与胞嘧啶配对, 而与胸腺嘧啶配对。由前所述不难看出, 弄清化学诱变剂在 DNA 碱基中的具体修饰部位及分布, 对于深入了解它们的有关致癌途径和机制是十分重要的, 也是当前分子毒理学、流行病学非常关注的内容。为此发展了几种分析 DNA 加合物的重要方法: 免疫检验法<sup>[4]</sup>、荧光检验法<sup>[5]</sup>、以及<sup>32</sup>P 后标记法<sup>[6]</sup>。但是, 这些方法在定性方面缺少结构专一性, 无法鉴别由人体 DNA 分离的加合物<sup>[7]</sup>。而在现代发展的各种分析技术中, 质谱法在定性鉴别方面却能起着这种独一无二的重要作用。它的强有力的定性能力和极高的灵敏度使它成为当前唯一能在最少样品量情况下获得重要分子量和结构信息的工具, 在这一点上它是其它任何方法所无法比的。当它与诸如气相色谱、高效液相色谱和毛细管电泳这样重要的分离技术结合在一起时, 它就能给出非常有价值的异构体组分可靠信息。所以, 最近几年, 随着致癌、致突研究的深入, MS 技术已越来越广泛地受到重视, 并且一些著名学者对此进行了专门评述<sup>[9-10]</sup>。本文限于篇幅关系, 仅就近年来 MS 技术在致癌、致突方面的应用研究中较重要的发展情况进行综合评述与讨论。

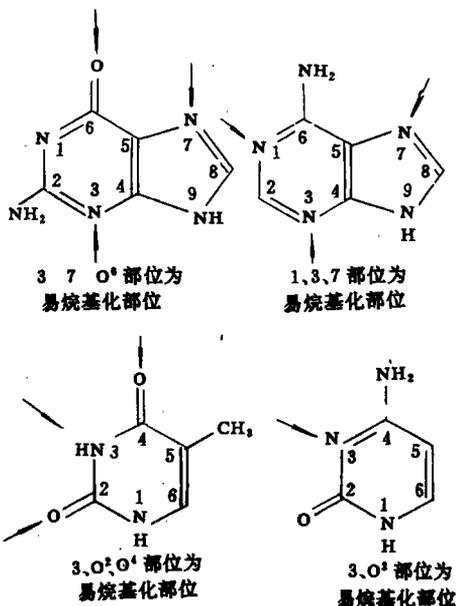


图 1 G、A、T、C 可能产生修饰的部位

现已发现在 DNA 鸟嘌呤烷化产物中, 以 O<sup>6</sup> 鸟嘌呤

## 1 烷基化加合物

质谱法在分析修饰的脱氧核苷的最早的应用是确定甲基在脱氧核苷上的取代位置。Robins 和 Trip<sup>[11]</sup>根据质谱数据确定了 O-甲基化的 N<sup>6</sup>-修饰的异戊烯-烷基

\* 国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 1995-02-20

化腺嘌呤(Ado)衍生物异构体(图 2),其核糖部位的甲基化可以通过核酸或脱氧核糖基的内部断裂途径来确定<sup>[12]</sup>。而碱基和脱氧核糖基甲基化则可由甲基质量丢失后的离子[BH]<sup>+</sup>区分。Lawley 等人用此法鉴别了一种新的甲基化产物,即 O<sup>4</sup>-甲基胸腺核苷,它是 N-甲基-N-亚硝基脒(MeNU)与胸苷(dThd)反应的次要产物<sup>[13]</sup>。Ashorth 等人<sup>[14]</sup>用同位素稀释法分析了 MeNU 与小牛胸腺 DNA 甲基化反应后的甲基化脱氧核苷。他们将 DNA 烷化 3 h,然后透析 20 h,加入标记内标物并将 DNA 酶解消化 18 h,变成脱氧核苷,用 HPLC 将各组分分开,收集馏分。除去馏分中的离子对试剂,用化学电离源质谱法(CIMS)分析鉴别。反应气体为异丁烷,实验未能观察到分子离子。采用了 BH<sub>3</sub><sup>+</sup> 的比率进行处理<sup>[14]</sup>。O<sup>6</sup>-甲基脱氧鸟苷(O<sup>6</sup>-MdGua)无法定量。用低能量对 BH<sub>3</sub><sup>+</sup> 进行活化碰撞可得到相当清晰的谱图,不过,量的问题仍然没有解决。脱氧腺苷类化合物中只有腺嘌呤烷化时的次要产物 m<sup>1</sup>dA 进行过考察,而主要产物 m<sup>3</sup>dA 和 m<sup>7</sup>dA 都不稳定<sup>[15]</sup>。由于透析时被丢失,7-甲基鸟嘌呤(7-MeGua)占甲基化总量的 9%<sup>[14]</sup>。Segal 和 Soloman 用电子轰击质谱法(EIMS)和 CIMS 相当广泛地研究了烷化致癌物处理过的 DNA 所分离出来的被修饰的核酸组分<sup>[16-24]</sup>。鉴别出 B-丙炔内脂(BPL)的胞嘧啶(Cyt)加合物。当 BPL 与小牛胸腺 DNA 反应时,只鉴别出碱基加合物 3-(2-羧乙基)胸嘧啶(3-CEC),这正是 3-(2-羧乙基)脱氧胸苷(3-CEdCyd)的水解产物。BPL 与 dCyd 反应时,观察到了 CEdCyd(图 3a)和 N<sub>4</sub>-顺式(2-羧乙基)dCyd(3, N<sub>4</sub>-BCEdCyd)(图 3b)。3-CEC 在 EIMS 或 CIMS 条件下,裂解为胞嘧啶和丙烯酸。3, N<sub>4</sub>-BCEdCyd 的检出是很有意义的实验结果,它首次报道了 BPL 在 DNA 碱基的环外原子上进行烷化。

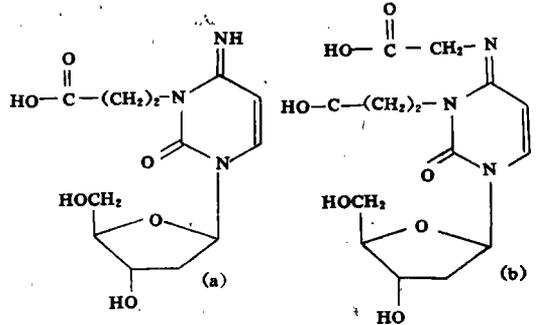


图 3 结构图

(a) 3-(2-羧乙基)胸嘧啶(3-CEdCyd)

(b) N<sub>4</sub>-顺式(2-羧乙基)胞嘧啶 dCyd(3, N<sub>4</sub>-BCEdCyd)

### 2 PAH 加和物

由 BaP 这类比较复杂的致癌物得到的核苷致癌物加合物也曾用电离源 EIMS 进行过研究。Straub 等人<sup>[25]</sup>用高分辨 EIMS 和全甲基化或全硅烷化衍生物,以及低分辨场解吸质谱法(FDMS)鉴别了 BaP 代谢物,7, 8-二羟基-9, 10-环氧-7, 8, 9, 10-四氢-BaP 与小牛胸腺 DNA 反应得到的 6 个微克级加合物。由于致癌物的代谢物被假定为 BaP 二醇环氧(BaPE),所以碱基的鉴别(而不是取代位置)可以由所观察到的每个加合物质量推测出来。但是精确的质量确认被用来鉴别碎片离子的元素组成。根据 VonMinden 和 McClosky 提出的甲基碱基的碎裂途径就能指出特定的碱基来<sup>[26]</sup>。最后根据全氘化甲基化作用来验证所增加的甲基基团数目,从而确认元素组成。用 dAde 全甲基化衍生物的数据来说明典型的碎裂过程。分子离子出现在 *m/z* 637 处(C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>)<sup>[27]</sup>。*m/z* 605 和 574 处的离子是失去 1 个和 2 个甲醇基团所致。而失去 1 个或 2 个甲醇基团和脱氧核糖而给出 *m/z* 461 和 430 的离子。在 *m/z* 149 (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>) 处的 1 个相应于单甲基腺嘌呤(Ade)的强峰和 1 个 *m/z* 119 (C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) 的离子(由于失去 CH<sub>4</sub>N)被用来做为碱基基团的特征。同时还观察到了由于致癌物-碱基键断裂而形成的三甲氧基四氢-BaP 的离子。BaP 取代位置是由含有单个氮原子的烃碎片(C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>N)推断的,尽管这个离子很弱,可以推断这是因为在同一部位断裂生成的碳鎓离子的稳定性的缘故,它的存在可以表明 Ade 的环外氮(N<sub>6</sub>)的取代。在用 TMS 基团衍生化后可以得到类似的结果。根据 BaPE 与 C-10 的亲核试剂反应的报告<sup>[28,29]</sup>,该结构被确认为 10-(脱氧腺嘌呤-N<sub>6</sub>-

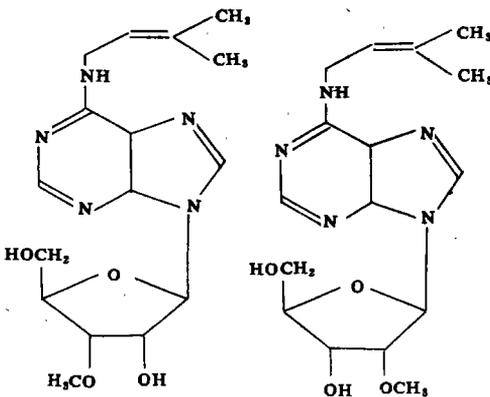


图 2 异戊烯-烷基化腺嘌呤(Ado)衍生物异构体

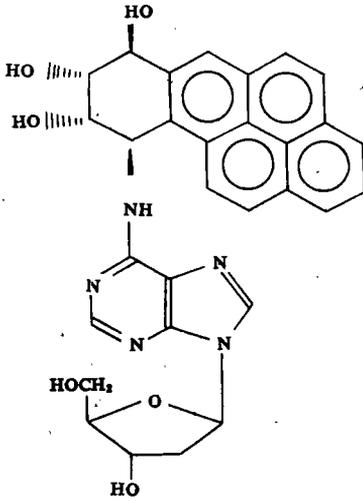


图 4 10-(脱氧腺嘌呤-N<sub>6</sub>-yl)-7, 8, 9-三甲基-7, 8, 9, 10-四氢-BaP

yl)-7, 8, 9-三甲基-7, 8, 9, 10-四氢-BaP(图 4)。

精确的质量数据可以鉴别致癌物 BaPE 与 DNA 反应中生成的其它加合物, 包括 Cyt 衍生物, 这是 PAH 致癌物和 DNA 间的反应形成物 Ade 或 Cyt 碱基的修饰的首篇报道。研究 DNA 加合物的最新进展是用毛细管区带电泳——动态 FAB 串联质谱法鉴定 DNA 加合物。毛细管电泳是一种强有力的分离技术。当它与动态快原子轰击串联质谱系统联用时, 可以对许多低于 pg 级的被分析物得出结果。可在 nl 进样水平下获得可用质谱图。这样就有可能在生理意义水平上(从 pg-ng 水平)分析生物基质中的活性物质。有实验研究了一些由于 PAH 和氨基-PAH 复合物结合到脱氧鸟苷形成的加合物。

### 3 芳胺加和物

芳胺致癌物主要是经过代谢后生成 N-羟基代谢物, 后者与细胞的 DNA 发生反应生成 DNA 加和物。有关 N-羟基代谢物(N-羟基芳胺)与核苷和 DNA 反应生成的脱氧核苷加和物已有不少人做过 EIMS 和 CIMS 研究。所研究的加和物衍生化成 TMS 衍生物后用 EIMS 分析其分子量加以证实。Kadlubar 等人<sup>[30]</sup>用此法鉴别了 DNA 与 N-羟基-1-萘胺反应生成的鸟嘌呤 O<sup>6</sup>-芳胺化和 O<sup>6</sup>-芳基化产物。同时还鉴别了鸟嘌呤和腺嘌呤分别与 N-羟基-2-萘胺作用后生成的 N<sub>2</sub>-和 N<sub>6</sub>-芳基化产物<sup>[31]</sup>。同样, Edwards 等人<sup>[32]</sup>用类似的 EIMS 观察了 1-硝基芘和 1-氨基芘的不同代谢中间体<sup>[32]</sup>。类似的测定有 N-甲基-4-氨基叠氮苯<sup>[32-35]</sup>, 联苯胺<sup>[36]</sup>, 以及 1-硝基

芘<sup>[37]</sup>。

### 4 致癌物-蛋白质加合物

近年来癌症流行病学家开始把致癌物造成的生物体损伤计量的注意力集中在与蛋白质的加合上。其主要原因是这些致癌物所造成的 DNA 变化在定量上十分困难, 一则是其 DNA 加合物水平很低, 而且体内对这些 DNA 的变化有一定的修复作用, 再加上细胞对之又有稀释作用从而造成体内 DNA 加合物的分析比较困难, 特别是在各种不同的靶器官中更是如此。由 Lars Ehrenberg 及其合作者提出了一种用致癌物与蛋白生成的加合物来模拟和反映致癌物 DNA 加合物的水平<sup>[36]</sup>, 因为能与 DNA 上亲核部位反应的亲电物质也与其它分子如血清蛋白或血红蛋白上的亲核部位进行反应。在最理想的情况下, 这种蛋白质加合物的水平能与 DNA 加合物的水平形成一定的比例关系, 从而可以用作为一种相对危险性的指标。许多研究表明, 它对于测量活性致癌物的相对暴露是一个很好的方法。这是由于许多蛋白的转化相当慢, 故而能提供在长周期(数周至数月)低暴露水平下的整个情况<sup>[39]</sup>。以 Hb 为例, 它在人体中的寿命大约为 120 d 左右, 故能反映出 4 个月内在活性致癌物暴露下的累计情况。Hb 在血液中含量甚大, 这对采样不会造成什么困难。芳胺与 Hb 的加合, 是此法成功得到应用的例证之一。许多芳胺对人和动物均有致癌作用, 并能与 Hb 生成其它加合物。芳胺与 Hb 的反应是通过细胞色素 P450 氧化为羟胺, 随后经氧络血红素生成芳香 C-亚硝基化合物。后者与 Hb 半胱氨酸反应并重排生成硫化物, 其典型加合物水平为每 g Hb 含有数 pmol 加合物。然而我们仍然很难对加成了的 Hb 本身进行定量, 需要进一步对之进行水解释放出原始的游离胺, 然后用五氟丙酸酐(pipa)衍生化, 其衍生物可用(GC/MS)负离子化学电离法(NICI)定量(见图 3b), 这种方法测定表明, 吸烟者体内的 Hb-氨基联苯加合物水平比不吸烟者高。收集吸烟者的胎儿血液中的 4-氨基联苯 Hb 加合物水平也增高。

多环芳烃与 Hb 的加合是通过致癌物与蛋白加合来研究致癌物对人体损伤的又一成功示例。某些人群中, 反-苯并(a)芘二醇环氧化物[anti-benzo(a)pyrene diol epoxide]的分析就是最常见的应用例子。在此应用中, Hb 上的羧基团被 PAHs 的环氧和二醇式环氧代谢物烷化成酯类, 然后水解为相应的醇而成为非常适合于人体中 PAH-蛋白加合物的定量化合物。这些方法主要用来定量那些已知的加合物或怀疑它是否由于暴露在某种致癌物后会生成的某种加合物。对完全未知的加合

物来说, 仍然有一定困难。主要是由于全谱扫描灵敏度比单离子检测(SIM)低得多, 故而无法进行全谱定性。曾有人报道成功地通过 GC, HPLC 和 MS 相结合的方法鉴别了 Hb 加合物<sup>[40]</sup>。

Springer 等人<sup>[41]</sup>最近报道了用电喷雾电离质谱法(ESIMS)鉴别血红蛋白丙烯酰胺加合物的某些成功结果, 它们将血红蛋白加合物从蛋白质上断裂下来, 然后用衍生化和 GC/MS 方法鉴别其物类。该方法采用了电喷雾电离技术测定丙烯酰胺与纯人体血红蛋白(AO 型)形成的加合物。血红蛋白用反相高效液相(HPLC)分离并给出放射性标记结果。ESIMS 测得结果是有 3 种主要加合产物, 其中一个的质量数比丙烯酰胺大 71, 而另外 2 个分别增加 102 和 135。

应该说明, 致癌物与蛋白质形成加合物的情况并不总是反映致癌物与 DNA 进行加合的相似性<sup>[42,43]</sup>。也就是说它并不是一种普遍存在的关系。然而, 尽管如此, 它在许多研究中的确获得了重要的结果, 从而正在进一步受到癌症流行病学及毒理学家们的重视。

参 考 文 献

1 Simith R D et al. . Mass Spectron Rev. . 1991, **10**: 359  
 2 Caprioli R M. Anal. Chem. . 1990, **62**: 477A  
 3 龙耀庭. 环境科学进展, 1993, **1**(4): 24  
 4 Harris C C et al. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. . 1985, **82**: 6672  
 5 Vahakangas K et al. . Carcinogenesis. 1985, **6**: 1109  
 6 Dunn B P et al. . Carcinogenesis. 1986, **7**: 1115  
 Gupta R C et al. . Carcinogenesis. 1982, **3**: 1081  
 7 Enerson R B et al. . Science. 1986, **231**: 54  
 8 John S. Wishmok Environmental Carcinogens: Luvivo Monitoring using GC/MS Anal. Chem. . 1992, **64**(23): 1126A  
 9 Pamela F et al. . Mass Spectrometric techniques in nucleic acid Rescarh. Mass Spectrometry Reviews, 1990, **9**: 505  
 10 M Poul chiarelli et al. . Jr Mass Spectrometry for the angsis of Carcinogen-DNA addacts. Mass Spectrometra Reviews. 1992, **11**: 447  
 11 Robins M J et al. . Biochemistry. 1973, **12**: 2179  
 12 Shaw S J et al. . Am. Chem. Son. . 1970, **92**: 2510

13 Lawley P D et al. . Biochem. J. . 1973, **135**: 193  
 14 Ashworth D J et al. Biomed. Mass Spectrom. 1985, **12**: 309  
 15 Singer B et al. . Molecology of Mutagens and Carcinogens, Plenum Press: New York, 1983. chapter 3  
 16 Segal A et al. . Chem. Biol. Interact. . 1979, **28**: 333  
 17 Segal A et al. . Chem. Biol. Interact. . 1980, **29**: 335  
 18 Segal A et al. . Chem. Biol. Interact. . 1981, **35**: 349  
 19 Segal A et al. . Chem. Biol. Interact. . 1982, **40**: 209  
 20 Solomon J J et al. . Chem. Biol. Interact. . 1988, **67**: 275  
 21 Segal A et al. . Cancer Biochem. Biophys. . 1990, **11**: 59  
 22 Li F et al. . Cancer Biochem. Biophys. . 1990, **11**: 253  
 23 Solomon J J et al. . Chem. Biol. Interact. . 1984, **51**: 167  
 24 Solomon J J et al. . Environ. Health Perspect. 1985, **62**: 227  
 25 Straub K M et al. . Proc. Ncad. Sci. . USA 1977, **74**: 5285  
 26 Von Minden D L et al. . J. Am. Chem. Soc. . 1973, **95**: 7480  
 27 Dino J J Jr et al. . Rapid. Commun. Mass Spectrom. 1987, **1**: 69  
 28 Yegi H et al. . J. Am. Chem. Soc. . 1977, **99**: 1604  
 29 Beland F A et al. . J. Chem. . Soc. . Chem. Commun. . 1976, 84  
 30 Kad lubar F F et al. . Cancer Res. . 1978, **38**: 3628  
 31 Kad lubar F F et al. . Carcinogenesis. 1980, **1**: 136.  
 32 Edwards M J et al. . Mutagenesis. 1986, **1**: 347  
 33 Beland F A et al. : Chem. Biol. Interact. 1980, **31**: 1  
 34 Straub K M et al. . Biomed. Mass Spectrom. 1981, **8**: 431  
 35 Tullis D;L et al. . Chem. Biol. Interact. 1981, **38**: 15  
 36 Martin C N et al. . Cancer Res. . 1982, **42**: 2678  
 37 Howard P C et al. . Cancer Res. . 1983, **43**: 2052  
 38 Osterman-Golkar S et al. . Mutat. Res. . 1976, **34**: 1  
 39 Skipper P L et al. . Carcinogenesis. 1990, **11**: 507  
 40 Day B W et al. . Chem. Res. Toxicol. . 1990, **3**: 340  
 41 Springer D L et al. . J. of Toxicology and Environmental Health. 1993, **40**: 243  
 42 Umemoto A et al. . Carcinogenesis. 1992, **13**: 1025  
 43 Talaska G et al. . Cancer Epidemicology Biomarkes and Prevention. 1991, **1**: 61

that in heavy loam, but the lead content of brown rice was more than that in heavy one. Correlation between the lead content of soil and that of brown rice had been shown in light loam. Based on it, the critical level of soil along road side had been discussed. The predicted value was 58 mg/kg, much less than that of pot experiments and the area irrigated with waste water.

**Key words:** soil, rice, lead, road, critical level.

#### **A Study on the Exchange Process of Heavy Metals Species in the Changjiang River Estuary.**

Shao Mihua (Institute of Marine Environment Protection, SOA, Dalian, 116023), Wang Zhengfang (The Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(6), 1995, pp. 69–72

The present paper deals with the exchange process and distribution of particulate species, soluble species, and various other species of suspended particles trace metals from waterbody across the main axis of the Changjiang river diluted water in flood season. The variation trend of its state shows that trace metals along horizontal profile tended to transfer from particulate forms into soluble form, and the translation priority of metals forms was Ni>Fe Co>Cu>Mn>Pb. The vertical changes of their chemical forms in aqueous environment was adsorbed by Fe-Mn oxides and organic detritus; the metals bound Fe-Mn oxides combined species was the most important speciation; and the transferable order of metals forms is pb>Cu>Mn>Fe>Ni>Co. Finally, the environmental status and pollution level in the water column of Changjiang estuary was discussed.

**Key words:** trace metals, soluble species, suspended particles, Changjiang river.

**Progress in the Investigation on Plant Availability of Soil Trace Metals.** Jin Qian et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(6), 1995, pp. 73–75

A review was given on the progress in the research on plant availability of soil trace metals. major factors influencing bioavailability such as plant species, physico-chemical characteristics of soil, and the nature and speciation of trace metals

were discussed. The relationship between soil extractable values and plant uptake, and the change of bioavailability resulting from the application of sewage sludge were also included.

**Key words:** soil, trace metals, bioavailability.

#### **Application and Development of Immobilized Microbial Cells Technology in the Biological Denitrification Process of Wastewater.**

Wang Lei and Lan Shucheng (Beijing Municipal Research Academy of Environmental Protection, Beijing 100037); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(6), 1995, pp. 76–78

A review was given on the application and development of immobilized microbial cells technology in the biological denitrification process of wastewater, including general conditions, peculiarities and existing problems of nitrification and denitrification of wastewater, technology and application of microbial cells immobilization in the denitrification process of wastewater; materials and process of immobilization, current situation of research and application practical application in large-scale wastewater treatment; the existing problems and solving ways, and the prospects and trend of this technology.

**Key Words:** microbial cells immobilization, wastewater, biological denitrification.

#### **Identification of Bio-macromolecular (DNA and protein) Adducts by Mass Spectrometry.**

Long Yaoting (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(6), 1995, pp. 79–82

Application of Mass Spectrometry in the study on biomacromolecular (DNA & Protein) adducts was described in the present paper. The recent results of alkyl adducts, aromatic amine adducts, and protein adducts studied by mass spectrometry were also discussed. The successful examples of applying the recently developed Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS) to identification of protein Adducts was also reviewed. The experimental results show that ESIMS provided new evidence of bio-macromolecular adducts.

**Key words:** adducts, mass spectrometry bio-macromolecule.