

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

質譜法發展新穎的基因鍵結體學(DNA Adductomics)：全面評估
檳榔及香菸所造成的DNA鹼基修飾(第4年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 100-2628-B-040-001-MY4
執行期間：103年08月01日至104年07月31日
執行單位：中山醫學大學職業安全衛生學系暨碩士班

計畫主持人：趙木榮
共同主持人：巖正傑、張耀仁
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：蔡依虹
學士級-專任助理人員：謝明宴
博士後研究：許又文

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 31 日

中文摘要：本研究運用LC-MS/MS搭配連線固相萃取(on-line solid phase extraction, SPE)建立新穎的DNA adductomics研究方法，並克服DNA adductomics目前的分析難題，接著運用於探討檳榔及香菸暴露所造成的DNA鹼基修飾。以adductome map的疊圖比對探究檳榔及香菸暴露造成DNA鹼基修飾特徵，並試圖以修飾鹼基的結構鑑定，追朔人類尚未發現的重要致癌成分。

中文關鍵詞：基因鍵結體學、DNA鹼基修飾、液相層析串聯質譜儀、檳榔、香菸

英文摘要：Cellular DNA is highly vulnerable to modification by exposure to electrophilic molecules that originate from both exogenous and endogenous sources, either directly or following metabolic activation. These modifications result in the formation of DNA adducts. If DNA adducts are not repaired properly, they can lead to mutations in critical genes such as those involved in the regulation of cellular growth and subsequent development of cancer. The strategy, named the DNA adductome approach, is based on chromatographic separation of a nucleoside mixture combined with the detection of the constant neutral loss (CNL) of 2'-deoxyribose from positively ionized 2'-deoxynucleoside adducts over a certain range of transitions. This has led to the concept of producing an adductome map of all DNA adducts in a sample. This approach holds great potential for gaining further insight into DNA adduct profile differences between human populations exposed to mixtures of environmental genotoxins, but until now has been constrained by a variety of factors such as lower sensitivity, limited structural information and regional differences in matrix effects along the chromatogram. In this study, we developed a novel DNA adductomics method, which overcome the drawbacks of previous works, for assessing external exposure to areca nuts and cigarette smoke.

英文關鍵詞：DNA adducts, DNA damage, adductomics, LC-MS/MS, areca nuts, cigarette smoke

一、前言

(1) 基因鍵結物的量測

細胞內正常的鹼基負責了多種生命現象，但在各種化學反應下，正常鹼基結構可能被某些官能基團取代，進而產生共價鍵結，這些被修飾過的鹼基都可稱為 DNA 鍵結物 (DNA adducts) (陳皓君&洪嘉良，2001)。DNA adducts 的形成是基因毒物致癌的關鍵起始步驟，當致癌物進入體內後大多可藉由代謝方式去毒排出體外，而代謝過程也有機會將致癌物活化進而與 DNA 產生共價鍵結。如果細胞內的 DNA 受到嚴重損傷，有可能造成細胞凋亡或停止分裂；但若細胞依然存活，DNA adducts 未經修復，在細胞複製後將容易產生誤鑄代碼 (miscoding) 而造成突變，經年累月的突變基因累積是後續癌化的重要原因。

DNA adducts 的量測分析一直是項重要議題。然而生物樣本中的 DNA adducts 通常非常微量，且分析時遭遇的基質干擾極為嚴重，因此要精確且快速地分析 DNA adducts 則備受挑戰。目前 DNA adducts 的量測分析法眾多，如免疫組織化學 (immunohistochemistry) 方法直接在組織上染色標定 adducts，但其特異性不足，屬半定量方法；彗星試驗 (comet assay) 方法於單顆細胞上量測 DNA 損傷概況，但缺乏檢量線可以量化，也無法得知特定 adduct 所造成損傷。因此將細胞中的 DNA 萃取出後再執行分析是量化 adducts 較佳的方式。從 1980 年代開始，³²P 後標定法 (³²P-postlabeling) 便是普遍用來量測 DNA adducts 的技術且沿用至今 (Beach and Gupta 1992)，其方法雖然敏感度佳，但過程中需操作放射性物質危險且特異性差。免疫分析法 (immunoassay) 由於被開發出的抗體種類有限，只能運用於特定 DNA adducts，同時也因會與其他 adducts 交叉反應也遭遇特異性差的問題 (Evans et al. 2010)。

層析法搭配不同偵測器進行分析是公認較準確的量測方法，係萃取出樣本中的 DNA 並進行水解，再以高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 或氣相層析儀 (Gas Chromatography, GC) 搭配各式偵測器 (如：HPLC 搭配螢光偵測器或電化學偵測器；GC 搭配質譜儀) 分析 (Klaene et al. 2013)。其中以 GC 的量測方法較為繁瑣，因大部份的 adducts 待測物皆溶於水相中且揮發度低，因此必須事先將待測物進行化學衍生化，改變其化學結構性質，降低沸點與增加揮發性，使其易於後續 GC 的分析。通常衍生化步驟流程短則 30 分鐘，長可到 1-2 個小時，因此前處理步驟流程較為冗長；若採用 HPLC 則能直接分析水相基質中的待測物。其中尤以 HPLC 搭配串聯質譜儀 (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) 最適合分析 DNA adducts，準確且高敏感度，同時可提供分子結構訊息。

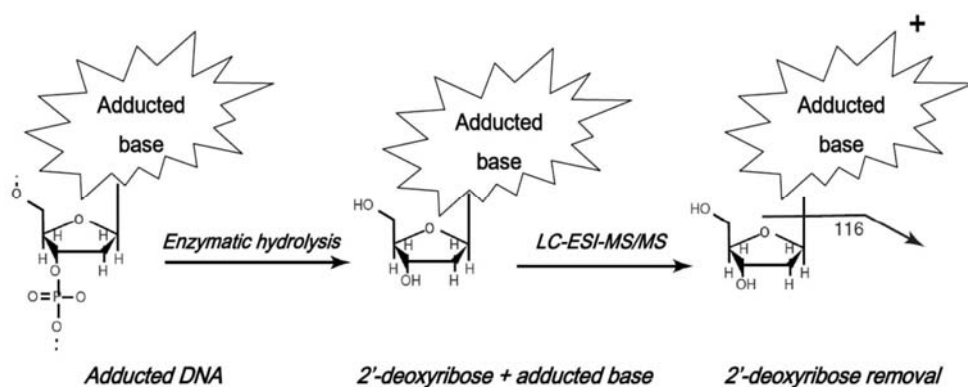
然而 DNA adducts 種類眾多，上述的方法都無法完整且於同一時間描述外來毒物暴露或疾病所造成的基因損傷全貌。因此類似蛋白質學與代謝體學的研究

概念，於 2006 年首先被提出應用於 DNA adducts 的研究，亦即同一時間分析基因組上所有的 DNA adducts (Kanaly et al. 2006)；最近學者們開始將這樣的觀念統稱為基因鍵結體學 (DNA adductomics) (Balbo et al. 2014)。而目前 DNA adductomics 的全面分析技術開發及運用仍處於萌芽階段，近幾年來文獻發表還不多，且此項分析任務只能藉由高選擇性及高靈敏度的 LC-MS/MS 才有機會能達成。

(2) 基因鍵結體學

當以液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 於正電荷電噴灑離子化 (electrospray ionization, ESI) 進入 MS/MS 分析時，正常的與被修飾鍵結的去氧核苷 (2'-deoxynucleosides)，皆有碎裂丟失結構斷片 2'-去氧核糖 (2'-deoxyribose) 的共同特徵。因此 Kanaly (2006) 首先提出可將去氧核苷分子碎裂後丟失 2'-deoxyribose 的特性，作為 adducted 2'-deoxynucleosides 的分析策略，便能運用質譜進行大範圍的質量篩選，以達同時間能偵測所有可能的 adducted 2'-deoxynucleosides。

如下圖一所示為運用質譜進行 DNA adductomics 的分析概念。由於 adducted 2'-deoxynucleosides 經由碰撞皆容易掉下 2'-deoxyribose (分子量 116 Da)，此掉下的去氧核糖結構屬於不帶電的中性分子，因此非常適合使用液相層析串聯質譜儀特有的中性丟失掃描模式 (constant neutral loss, CNL)。利用將母離子經碎裂後質荷比 (m/z) 能減少 116 者 ($[M+H]^+ \rightarrow [M+H-116]^+$) 作為特徵。利用大範圍的質荷比掃描可得到每一層析時間下進入 ESI-MS/MS 所有可能的 DNA adduct 訊號。最後將中性丟失質量 116 Da 質譜掃描的結果，透過軟體將原始數據轉換輸出成三維圖像以顯示層析時間、母離子質荷比與波峰面積強度的鍵結體地圖 (adductome map)，藉由鍵結體地圖比對便能呈現所有可能基因損傷的全貌。



圖一、運用質譜進行 DNA adductomics 分析概念

二、研究目的

本研究的目的是在於運用 LC-MS/MS 開發新穎且能廣泛量測 DNA 鍵結物的 DNA adductomics 研究方法，克服 DNA adductomics 目前的分析難題，進而運用於探討各種毒物 (如甲基化劑) 及混合物 (如檳榔萃取液) 於體外及動物試驗所造成的 DNA adduct 全貌。利用 adductome map 的疊圖比對探究造成 DNA 鹼基修飾的重要特徵。

本研究順利完成：

- (1) 建立能同時偵測 2'-deoxynucleosides 的 CNL 掃描模式。
- (2) CNL 掃描模式下將偵測 2'-deoxynucleosides 的質譜參數進行最佳化。
- (3) 針對 DNA adductomics 分析法建立 on-line SPE (solid phase extraction) 系統，其可將所有 2'-deoxynucleoside adducts 自動萃取淨化，以減低分析時生物基質所造成的基質效應或干擾，線上送入 LC-MS/MS 進行分析。
- (4) 挑選出代表性內標，使其能在不同層析時段出現，當作分析時的區段校正內標，修正各層析區段滯留時間 (retention time) 及基質效應 (matrix effects)。
- (5) 成功建立資訊轉換輸出系統，將分析結果質譜訊號快速轉換成含有層析時間、掃描質荷比與離子強度三維資訊的 adductome map。
- (6) 將小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA) 處理直接甲基化劑 (methylmethane sulfonat, MMS)，驗證本研究開發的 DNA adductomics 方法可行性。
- (7) 將檳榔萃取液直接與 calf thymus DNA 混合反應，以 DNA adductomics 技術首先發現並證實檳榔中存有直接造成 DNA 烷基化物質 (direct-acting DNA alkylating agent)。
- (8) DNA adductomics 拓展到動物實驗上，小鼠分別餵食致癌物質二甲基亞硝胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA) 與氘化二甲基胺 (deuterium labeled dimethylamine, d₆-DMA) 與亞硝酸鹽 (nitrite, NO₂⁻)，犧牲後分析肝臟檢體。
- (9) CNL 掃描搭配資料依靠收集模式 (information dependent acquisition, IDA) 以針對特定 DNA adducts 進行 (enhanced product ion, EPI) 掃描，獲取離子斷片訊息，藉此運用 CNL-IDA-EPI 模式進行結構定性分析。

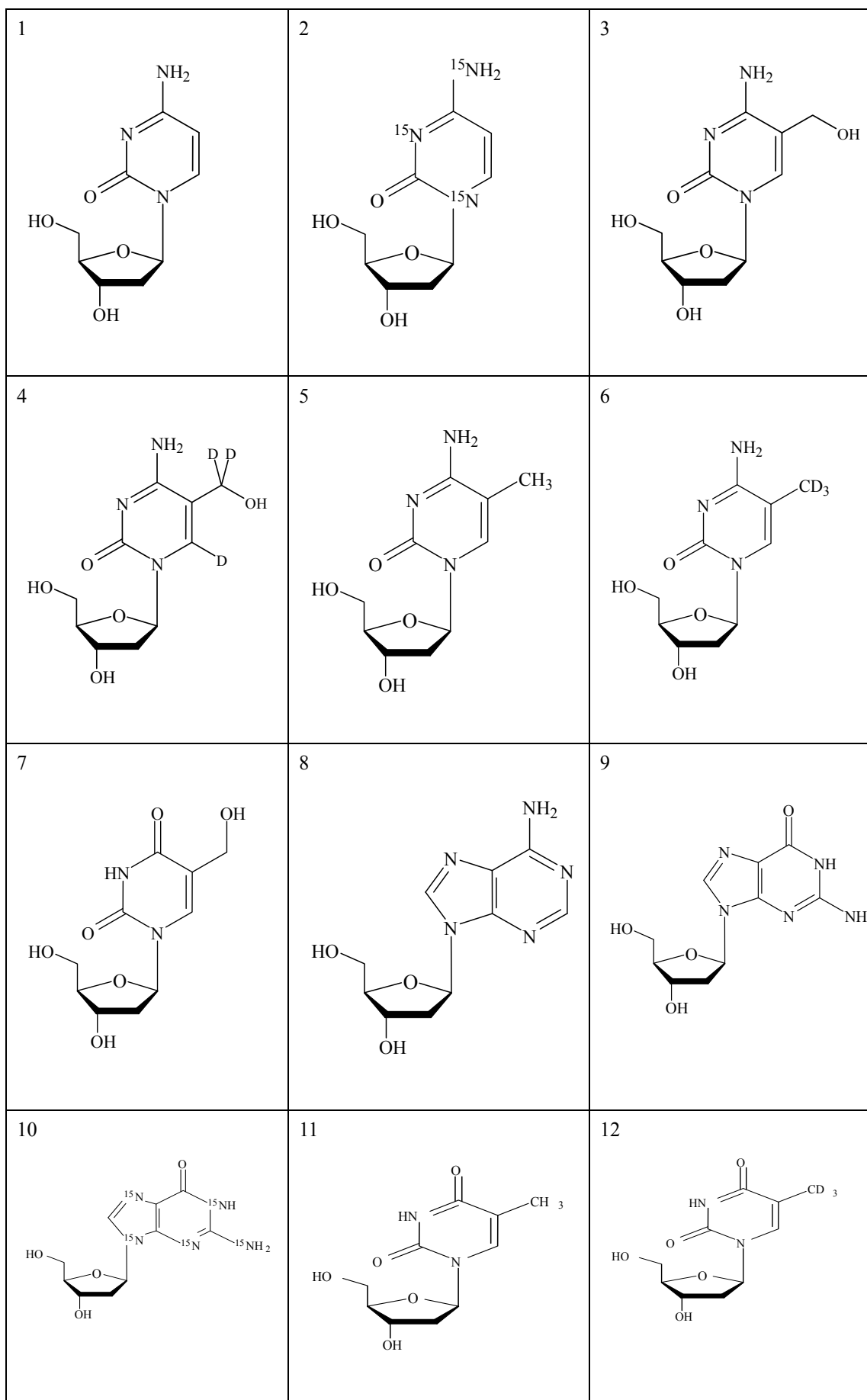
三、研究方法

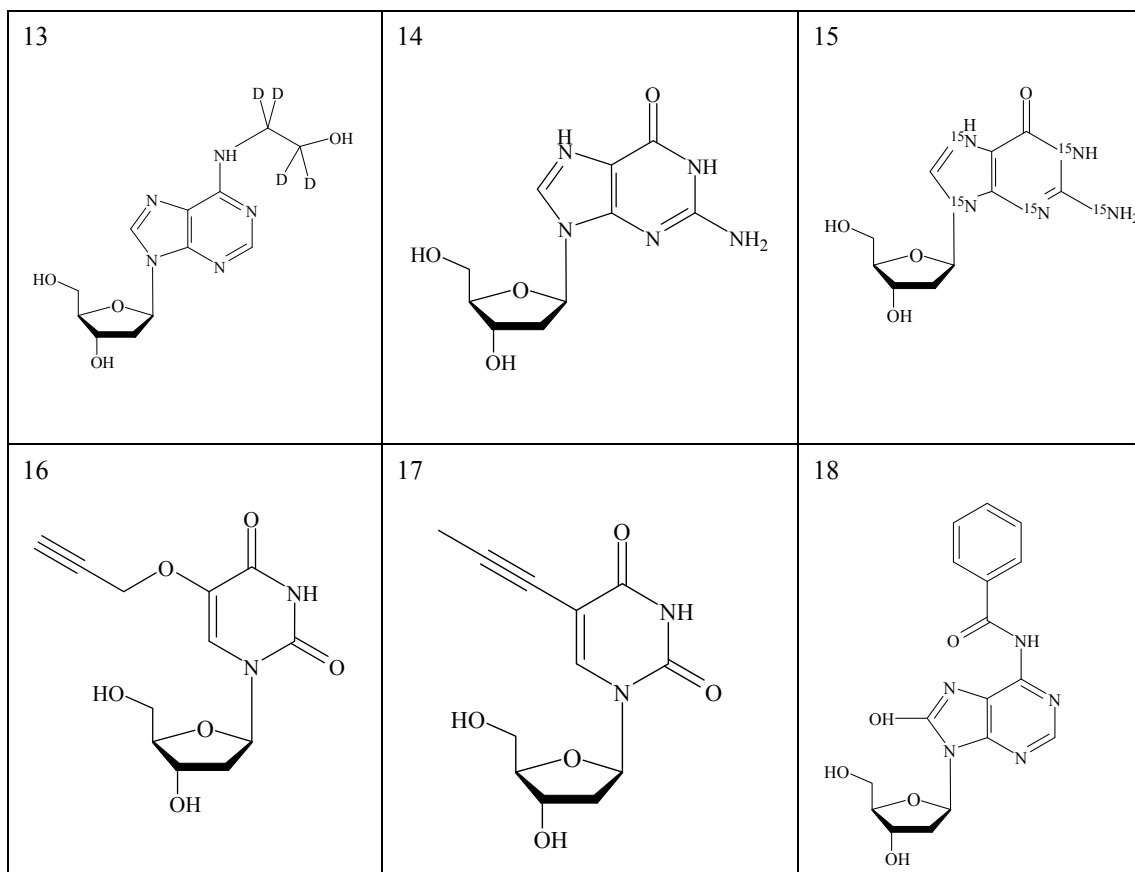
(1) 材料

本研究所使用的化學藥劑均為分析級，所採用的去氧核苷(2'-deoxynucleosides)測試標準品及同位素標準品共 18 種(下表一)。各種標準品的結構列於圖二。

表一、18 種標準品與內標準品名稱與購買來源

Standard	Source
<ul style="list-style-type: none">● 2'-deoxyguanosine (dG)● 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)● $^{15}\text{N}_5$-2'-deoxyguanosine ($^{15}\text{N}_5$-dG)● 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU)	Sigma-Aldrich
<ul style="list-style-type: none">● 2'-deoxycytidine (dC)	MP Biomedicals
<ul style="list-style-type: none">● 5-Methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC)	Tokyo Chemical Industry
<ul style="list-style-type: none">● 2'-deoxyadenosine (dA)● thymidine (dT)	Alfa Aesar
<ul style="list-style-type: none">● 2'-deoxy-5-propynyluridine (5-ppn-dU)● 2'-deoxy-5-propargyloxyuridine (5-ppg-dU)● N6-benzoyl-2'-deoxy-8-oxoadenosine (N6-bz-8-oxodA)	Carbosynth
<ul style="list-style-type: none">● $^{15}\text{N}_3$-2'-deoxycytidine ($^{15}\text{N}_3$-dC)● $^{15}\text{N}_5$-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ($^{15}\text{N}_5$-8-oxo-dG)● 5-Hydroxyethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC)● 5-Methyl-d_3-2'-deoxycytidine (d_3-5-mdC)● 5-Hydroxymethyl-2'-deoxycytidine-d_3 (d_3-5-hmdC)● deoxythymidine-d_3 (d_3-dT)● N6-(2-hydroxyethyl-d_4)-2'-deoxyadenosine (d_4-N6-2HE-dA)	Toronto Research Chemicals



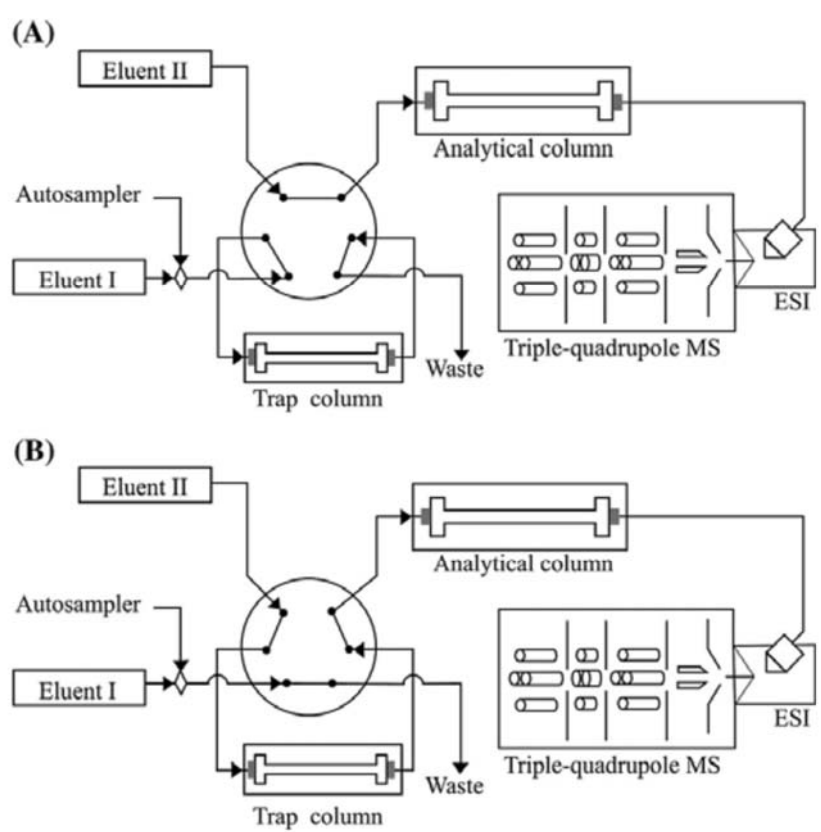


圖二、本研究所使用的 18 個 2'-deoxynucleosides 標準品及同位素標準品

- 1、2'-deoxycytidine；2、¹⁵N₃-2'-deoxycytidine；3、5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine；
4、5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine-d₃；5、5-methyl-2'-deoxycytidine；
6、5-methyl-2'-deoxycytidine-d₃；7、5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine；8、2'-deoxyadenosine
9、2'-deoxyguanosine；10、¹⁵N₅-2'-deoxyguanosine；11、thymidine；12、deoxythymidine-d₃
13、N6-(2-hydroxyethyl-d₄)-2'-deoxyadenosine；14、8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
15、¹⁵N₅-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine；16、2'-deoxy-5-propargyloxyuridine
17、2'-deoxy-5-propynyluridine；18、N6-benzoyl-2'-deoxy-8-oxoadenosine

(2) 自動化連線固相萃取連接液相層析串聯質譜儀 (Automated On-line SPE LC-MS/MS)

本研究所採用的 on-line SPE LC-MS/MS 由 Agilent 1100 series 自動注射器、二雙幫浦送液系統 (binary pump, Agilent 1100 series) 並搭配 API 4000 Q-trap 三級式四極柱混合離子阱質譜儀 (triple-quadrupole mass spectrometer, Applied Biosystems) 所組成。SPE trap column 為 Inertsil ODS-3 管柱 (75 mm × 2.1 mm, 5 μm particle size) 而 analytical column 亦為 Inertsil ODS-3 管柱 (150 × 2.1 mm i.d., 5 μm particle size)，如下圖三所示。

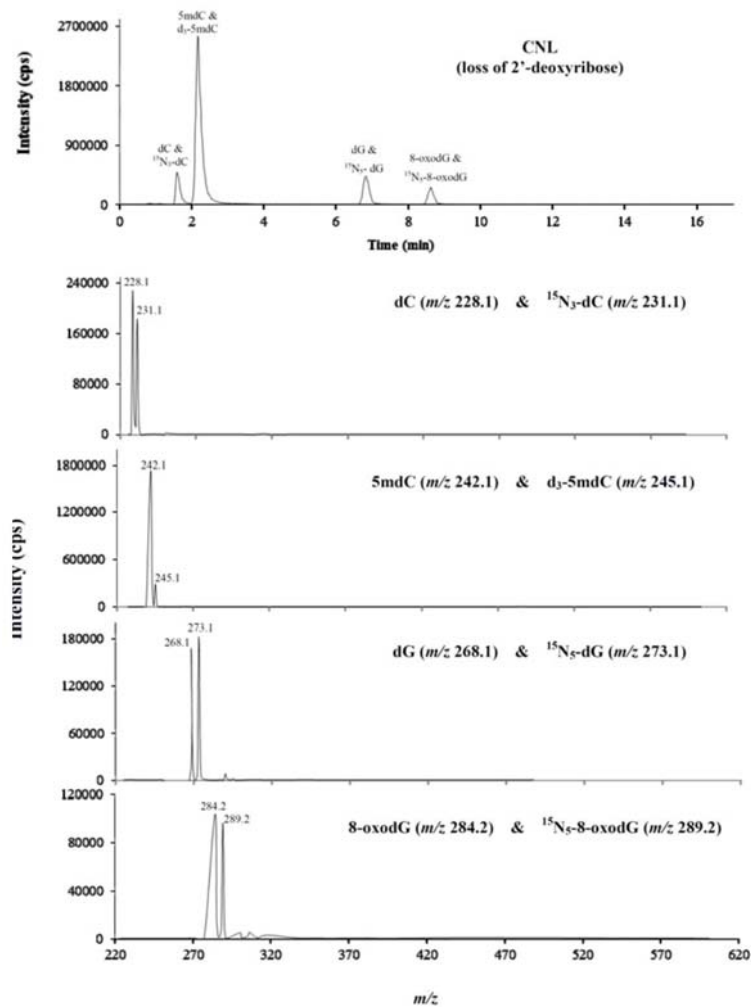


圖三、On-line SPE LC/MS/MS 之自動系統架構圖：(A) 樣本濃縮與淨化；(B) 待測物沖提進入 HPLC 管柱以 MS/MS 進行分析。(Hu et al. 2010)

四、結果與討論

(1) 利用 CNL 模式建立能同時掃描偵測 2'-deoxynucleosides 的分析方法

在 CNL 模式下，我們初步設定 2'-deoxynucleosides 母離子經碎裂後質荷比 (m/z) 減少 116 Da (亦即會丟失 2'-deoxyribose : $[M+H]^+ \rightarrow [M+H-116]^+$) 作為特徵。我們先將 8 種濃度皆為 250 ng/mL 的 2'-deoxynucleosides 標準品及其對應的同位素內標，以 20 μ L 的體積注射進行分析，質荷比 (m/z) 的掃描範圍為 220-620。下圖四為 CNL 模式下的層析圖譜，4 種標準品及其同位素 (共 8 種) 因層析而順利分離，且 CNL 皆能準確地找出每個母離子的質荷比 (m/z)。各標準品及其對應同位素的層析時間雖極為相同，但在 CNL 模式下仍可被分開偵測出，因此 CNL 模式對於不同 2'-deoxynucleosides 具很好的辨識效果。



圖四、利用 CNL 模式建立同時掃描偵測 2'-deoxynucleosides 的層析範例

(2) CNL 模式下偵測 2'-deoxynucleosides 參數最佳化

為使 CNL 模式達到最佳的靈敏度，我們進一步將 2'-deoxynucleosides 的掃描條件進行最佳化。由於去氧核糖是一個極不穩定的鍵結基團，容易受到高溫度與電壓的影響而丟失，因此本實驗分析敏感度的最佳化將焦點置於電噴灑離子化的溫度 (turbogas temperature)、去簇電壓 (declustering potential, DP)、碰撞能量 (collision energy, CE) 與掃描時間 (scan time) 此四個重要參數。首先，將以下參數設定於常設經驗值：curtain gas flow = 10；nebulizer gas (Gas 1) flow = 50；turbo gas (Gas 2) flow = 50；collision-activation dissociation (CAD) gas flow = medium；entrance potential (EP) voltage = 10 V；collision cell exit potential (CXP) = 15V。接著，我們在正離子模式 (positive ion) 下評估電噴灑離子化的溫度、DP、CE 與掃描時間對 CNL 分析敏感度的影響。

針對 18 種的 2'-deoxynucleosides 標準品或同位素標準品進行參數的最佳化。如表二所示，ESI 加熱溫度經不同條件測試 (350°C、400°C、450°C)，發現 18 個待測物中有 15 個在 400°C 的加熱溫度下，有較好的分析強度；而表三為去簇電壓 (DP) 經不同條件測試 (10、20、30、40、10-30、20-40)，發現 18 個待測物普遍在 30 V 的 DP 電壓下，有較好的分析強度；而表四為碰撞能量 (CE) 經不同條件測試 (10、15、20、25、30、35、40、45、10-30、20-40)，發現以 10-30 V 區間範圍的碰撞能量較能涵蓋所有化合物的中性丟失需求。掃描時間越長則訊號強度越佳 (data not shown)，但過長的掃描時間會造成各層析時間的資訊擷取過少。表五為最佳化結果的總結，ESI 加熱溫度為 400°C、DP 為 30 V、CE 為 10-30 V 及掃描時間為 1 秒，可讓 18 個 2'-deoxynucleosides 待測物，於 CNL 模式下分析有均衡的最佳靈敏度。

ESI 的溫度越高，雖有利於離子化後形成帶電液滴的揮散效率，增加帶電離子進入質譜的機會，但在先前我們的研究發現 ESI 的溫度越高，也越容易使得 2'-deoxynucleosides 上的去氧核糖在進入 Q0 前就掉落，亦即在源內產生熱裂解 (in-source thermolysis) 反應。此外，過大的 DP 也會因源內碰撞誘導解離 (collisionally induced dissociation) 讓 2'-deoxynucleosides 上的去氧核糖在進入 Q0 前就丟失 (Hu et al. 2010)。適當溫和的 CE 能量可讓 2'-deoxyribose 在 Q2 碰撞室順利碎裂丟失，過大的 CE 能量則會讓母離子在 Q2 時過度碎裂，造成 2'-deoxynucleosides 的鹼基也被碎裂，因此減少了鹼基的子離子進入 Q3 的量。表六為經最佳化後的 CNL 掃描方法的條件，後續實驗皆採用此方法分析。

表二、電噴灑 (ESI) 溫度的最佳化

Nucleosides	Relative intensity(%)		
	Temperature		
	350°C	400°C	450°C
dC	84	100	60
¹⁵ N ₃ -dC	100	40	44
5hmdC	100	45	49
d ₃ -5hmdC	81	85	100
5mdC	58	100	88
d ₃ -5mdC	82	100	86
5hmdU	48	100	78
dA	99	100	61
dG	96	100	75
¹⁵ N ₅ -dG	100	64	71
dT	100	64	80
d ₃ -dT	99	100	83
d ₄ -N6-2HE-dA	95	100	77
8-oxodG	44	43	100
¹⁵ N ₅ -8-oxodG	47	86	100
5-ppg-dU	78	100	75
5-ppn-dU	99	100	93
N6-bz-8-oxodA	53	100	31

表三、去簇電壓 (DP) 的最佳化

Nucleosides	Relative intensity(%)					
	Declustering potential (DP), V					
	10	20	30	40	10-30	20-40
dC	39	15	76	100	72	65
¹⁵ N ₃ -dC	50	43	100	38	42	73
5hmdC	49	72	90	37	38	100
d ₃ -5hmdC	50	46	100	76	58	43
5mdC	49	60	83	53	50	100
d ₃ -5mdC	48	100	94	67	55	54
5hmdU	42	100	40	31	69	36
dA	57	79	100	95	59	62
dG	42	52	100	65	56	82
¹⁵ N ₅ -dG	67	55	67	54	50	100
dT	100	69	59	60	146	64
d ₃ -dT	71	100	51	77	49	75
d ₄ -N6-2HE-dA	51	72	65	44	73	100
8-oxodG	70	100	69	77	69	89
¹⁵ N ₅ -8-oxodG	85	48	100	68	58	55
5-ppg-dU	100	89	64	70	83	67
5-ppn-dU	100	42	78	35	83	40
N6-bz-8-oxodA	46	56	58	100	42	93

表四、碰撞能量 (CE) 的最佳化

Nucleosides	Relative intensity(%)									
	Collision energy (CE), V									
	10	15	20	25	30	35	40	45	10-30	20-40
dC	49	51	56	57	38	38	44	27	100	46
¹⁵ N ₃ -dC	49	40	100	37	34	38	36	24	37	18
5hmdC	95	85	60	48	27	28	8	2	100	8
d ₃ -5hmdC	100	76	84	42	25	13	6	3	80	51
5mdC	100	77	99	77	91	52	60	69	86	41
d ₃ -5mdC	49	100	71	61	73	90	43	68	74	87
5hmdU	68	29	9	4	2	0	0	0	100	4
dA	24	54	58	55	100	35	60	29	32	41
dG	26	17	16	39	31	44	33	27	100	20
¹⁵ N ₅ -dG	46	64	39	75	73	65	56	21	100	19
dT	88	73	52	41	42	35	23	23	100	21
d ₃ -dT	77	71	71	53	62	33	30	28	100	23
d ₄ -N ₆ -2HE-dA	15	27	51	100	67	83	73	24	23	25
8-oxodG	58	68	81	87	85	70	100	40	80	26
¹⁵ N ₅ -8-oxodG	71	80	100	94	56	61	82	30	79	22
5-ppg-dU	83	60	20	21	7	6	0	0	100	11
5-ppn-dU	92	76	66	29	10	6	4	8	100	35
N ₆ -bz-8-oxodA	41	63	66	100	55	56	49	19	93	33

表五、各種 2'-deoxynucleosides 的最佳化條件

Nucleosides	ESI temperature (°C)	DP (V)	CE (V)
2'-deoxycytidine	400	40	10-30
¹⁵ N ₃ -2'-deoxycytidine	350	30	20
5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine	350	20-40	10-30
5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine-d ₃	450	30	10
5-methyl-2'-deoxycytidine	400	20-40	10
5-methyl-2'-deoxycytidine-d ₃	400	20	15
5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine	400	20	10-30
2'-deoxyadenosine	400	30	30
2'-deoxyguanosine	400	30	10-30
¹⁵ N ₅ -2'-deoxyguanosine	350	20-40	10-30
thymidine	350	10	10-30
deoxythymidine-d ₃	400	20	10-30
N6-(2-hydroxyethyl-d ₄)-2'-deoxyadenosine	400	20-40	25
8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	450	20	40
¹⁵ N ₅ -8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	450	30	20
2'-deoxy-5-propargyloxyuridine	400	10	10-30
2'-deoxy-5-propynyluridine	400	10	10-30
N6-benzoyl-2'-deoxy-8-oxoadenosine	400	40	25

表六、經最佳化後 CNL 的分析方法參數

CNL	Start (amu) ~ stop (amu)	220-600
	Loss of (amu)	116
	Declustering potential, V	30
	Entrance potential voltage, V	10
	Scan time (s)	1.0
	Collision-induced dissociation gas flow	Medium
	Collision energy, V	10-30
	Collision cell exit potential, V	15

(3) On-line SPE LC-MS/MS 分析法建立

由於 DNA adducts 的 LC-ESI-MS/MS 分析，常受到樣本基質的抑制干擾，如鹽類、蛋白質或未經修飾的核酸，加上待測物又極為微量，造成分析困難。因此，前處理流程中需要進行樣品的萃取淨化，將可能的基質干擾去除。但前處理步驟可能造成樣品中待測物的損失，且通常冗長又耗時。所以發展成熟的自動化連線固相萃取 (on-line SPE) 方式，應用在 adductomic 分析是非常好的解決方案；自動化的完成樣品淨化並直接輸送至後端質譜分析，不僅減少樣品損失的機會，也大大增加樣品的分析通量 (Tretyakova et al. 2013)。

本研究中建立 on-line SPE 連結 LC-MS/MS 分析方法，自動連線式固相萃取裝置包含一六向閥 (valco) 與一 trap column 組成 (下圖 3)，六向閥的控制系統採用 PE-SCIEX 控制軟體 (Analyst™, Applied Biosystems)。

表七詳列分析樣本時自動連線式固相萃取裝置的運作程序。當六向閥開關位於 A (Load) 時，20 μ L 的樣本藉由自動進樣裝置及一台流速設定為 0.2 mL/min 的幫浦輸送 100% solvent Ia，將樣本連同溶液送至接有保護管柱 (guard column) 的固相萃接管柱，同時利用溶液沖洗將雜質與待測物分離。當 solvent Ia 將內含待測物的萃接管柱沖洗 2.5 分鐘後，六向閥轉向位置 B，此時注入液相層析系統的移動相溶液 eluent II 進行梯度沖提 (100% solvent IIa 到 100% IIb)，將 trap column 中的待測物輸送至 LC-MS/MS。經過 72.6 分鐘的沖提後，六向閥再度轉回位置 A，此時注入 elute I (100% Ib) 清洗固相萃接管柱。最後以 100% Ia 的溶液使管柱平衡，等待下一次分析。總分析時間為 90 分鐘。

圖五為本研究開發之 On-line SPE LC-MS/MS 方法針對 18 種待測物標準品之 CNL 掃描層析圖。

表七、2'-deoxynucleosides 分析所採用的閥件切換時程與層析梯度

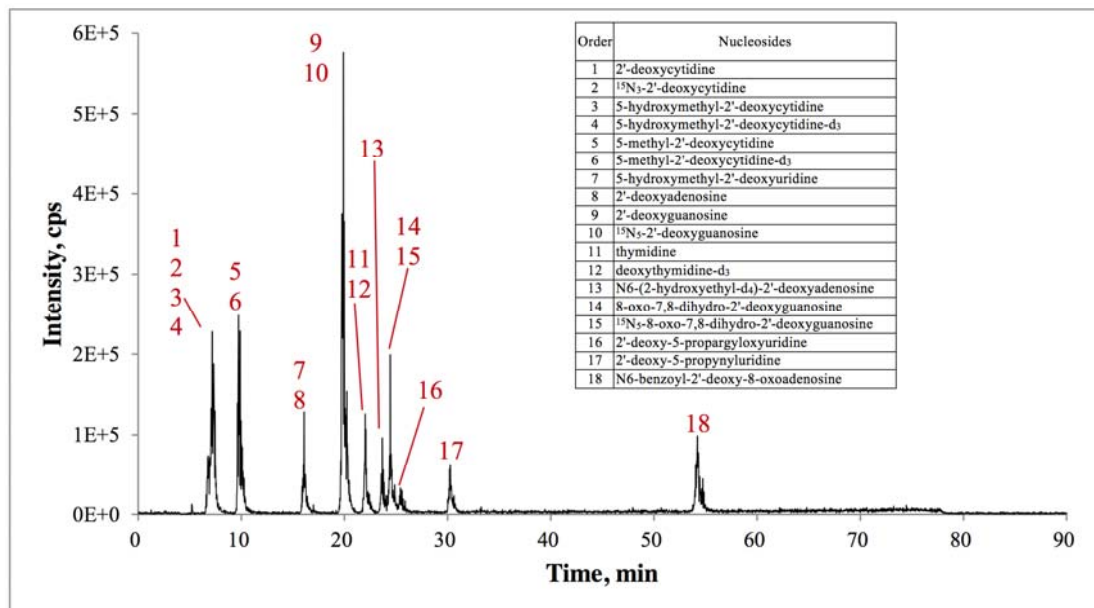
Time (min)	Eluent I (trap column)		Eluent II (analytical column)		Valve position	Flow rate (μ L/min)	Remarks
	Solvent Ia ^a (%)	Solvent Ib ^b (%)	Solvent IIa ^c (%)	Solvent IIb ^d (%)			
0.0	100	0	100	0	A	200	Injection and washing of sample. Start of elution of the sample to the analytical column.
2.5	100	0	100	0	B	200	
2.6	100	0	100	0	B	200	End of elution; trap column cleanup and reconditioning.
5.0	100	0	100	0	B	200	
70.0	100	0	0	100	B	200	
71.9	100	0	0	100	B	200	
72.0	0	100	0	100	B	200	
75.0	0	100	0	100	B	200	
75.1	0	100	100	0	A	200	
80.0	0	100	100	0	A	200	
80.1	100	0	100	0	A	200	
90.0	100	0	100	0	A	200	

^a3% (v/v) MeOH containing 1 mM ammonium acetate (AA).

^b95% (v/v) MeOH containing 1 mM ammonium acetate (AA).

^c2% (v/v) MeOH containing 0.1% Formic acid (FA).

^d95% (v/v) MeOH containing 0.1% Formic acid (FA).



圖五、利用 on-line SPE LC-MS/MS 分析 18 個 2'-deoxynucleosides

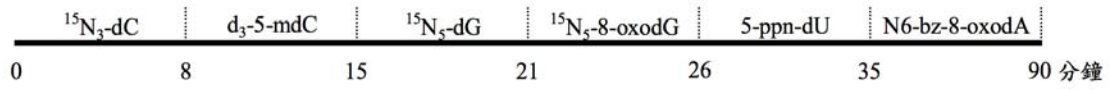
(4) 利用不同層析時間內標準品進行區段訊號校正

當運用 LC-ESI-MS/MS 分析時，DNA 樣本中含有的基質可在不同層析時間析出而干擾（離子抑制或增強）adducts 的電灑離子化效率，進而影響每一層析區段中 adducts 的訊號強度。甚或幫浦及基質也可能影響 adducts 的滯留時間，皆不利於後續運用 adductome map 進行生物樣本間疊圖的量化比對。本研究採用連線固相萃取（on-line SPE）系統雖能大幅減低基質效應，亦即將 DNA 樣本在線上萃取純化後再進入 LC-MS/MS 分析，但依然無法完全免除基質效應。

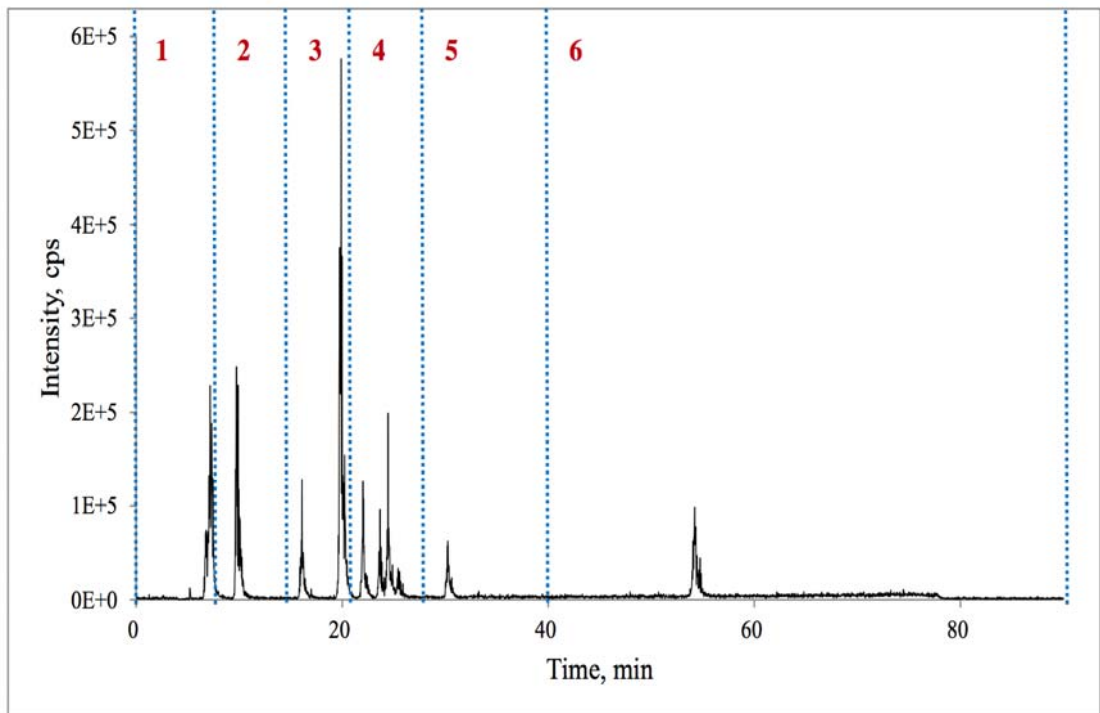
理想上，分析時若能針對每一種待測的 DNA adducts 添加穩定同位素內標（stable isotope internal standards），可幫助修正基質效應及滯留時間的影響。然而面對眾多或未知的 adducts 去合成穩定同位素內標於實務上是不可行的。此外，液相層析常因固定相及流動相間的些微變化，造成滯留時間的飄移。由 adductome map 的定性觀點，母離子相同但滯留時間不同，將被視為特徵不同的 adducts。因此，添加數種可在不同層析時間區段出現的代表性內標準品來作為校正內標，是修正各區段基質效應及滯留時間的重要策略。

本研究以層析時間挑選出 6 種標準品（含 4 種同位素與 2 種非同位素修飾核酸），作為各層析區段滯留時間及基質效應的內標。如下圖六及圖七所示。0.1~8.0、8.1~15.0、15.1~21.0、21.1~26.0、26.1~35.0 及 35.1~90.0 分鐘分別由 ¹⁵N₃-dC、d₃-5-mdC、¹⁵N₅-dG、¹⁵N₅-8-oxodG、5-ppn-dU 及 N6-bz-8-oxodA 作

為校正內標。



圖六、6 種不同層析時間出現的校正內標

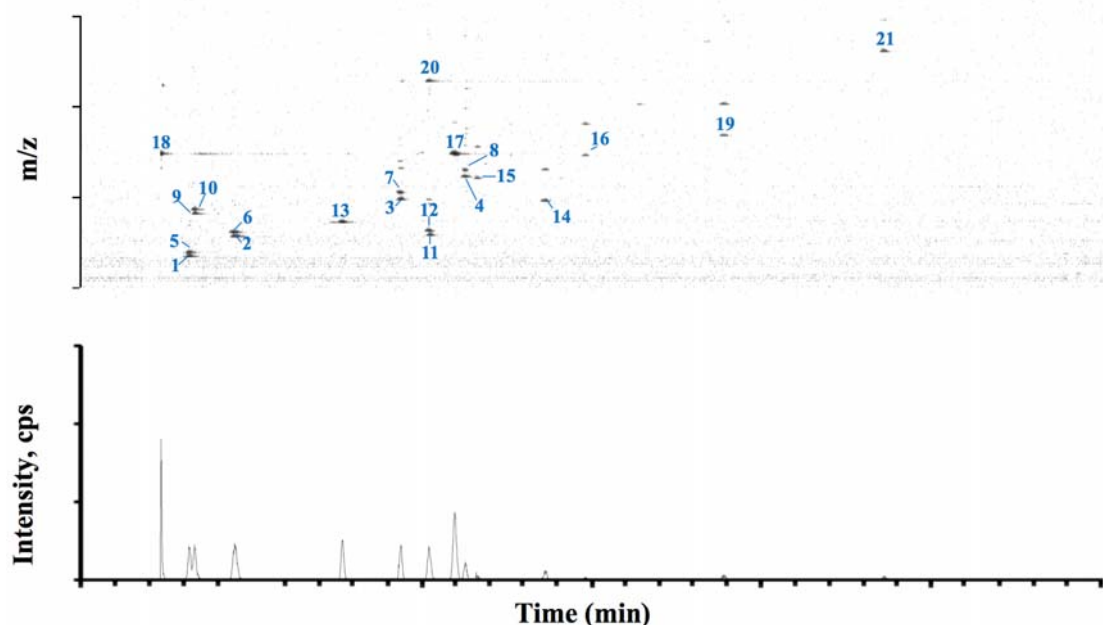


圖七、利用 6 種不同層析時間出現內標作為各區段待測 adducts 校正示意

(5) 質譜分析數據轉換輸出成 Adductome map

由於 adductomic 分析後，其數據量極為龐大且複雜，因此得透過軟體進行轉換輸出成易判讀辨識的圖像。先前大多研究的 adductome map 皆使用圓泡圖來呈現含母離子 m/z 、滯留時間與訊號強度(Kanaly et al. 2006; Singh et al. 2010; Carlsson et al. 2014; Kanaly al. 2015)。

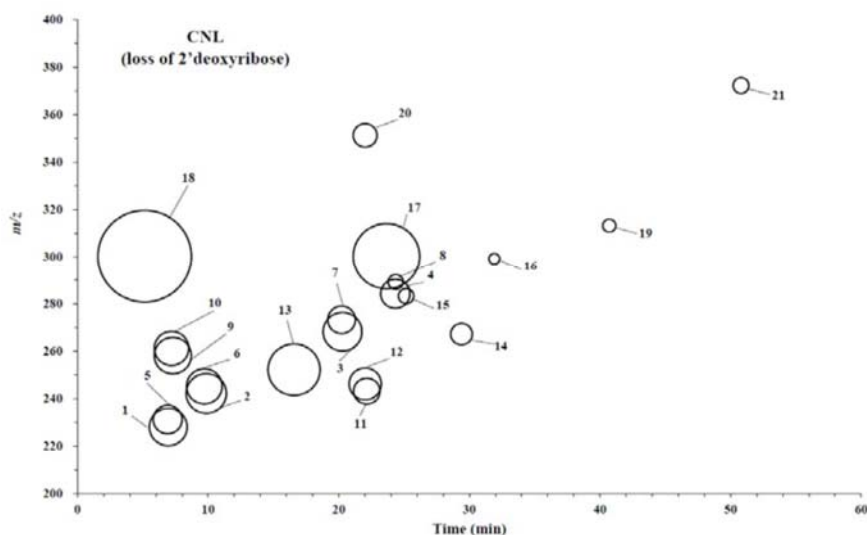
本研究試圖利用各式軟體將數據轉換成不同呈現方式的 adductome map 來比較優略。DNA 樣本利用 on-line SPE LC-MS/MS 分析後，先從原廠軟體 Analyst 輸出原始數據，初步經由 msInspect (mass spectrometry In silico peptide characterization tool) (<http://proteomics.fhcr.org/CPL/home.html>) 網站所提供的免費轉檔軟體，轉以帶狀圖呈現 adductome map (圖八)，X 軸代表的是時間，Y 軸代表掃描離子質荷比 (m/z)。經由此軟體轉換後，其呈現格式 (X 軸與 Y 軸) 皆無法調整與修正，也無法提供量化的訊號強度資訊，只能作為初篩比對工具。此 adductome map 雖能提供訊號量化的數據，但可能因為 DNA 中正常的 nucleoside (如 dA、dT、dC 與 dG 等) 強度太高而無法辨識微量的 DNA 鍵結物。



圖八、運用 msInspect 軟體將 CNL 訊號轉換成 adductome map 帶狀圖範例

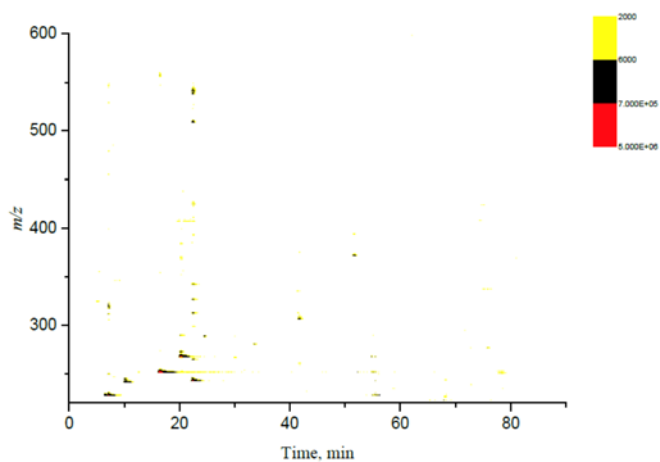
接著我們也嘗試將 Analyst 輸出的原始數據，導入到 Microsoft Excel 中對層析訊號一一積分，便可以將 CNL 分析得到的層析面積訊號轉換成 adductome

map 圓泡圖 (圖九)，圓圈的中心點 X 軸為層析時間，Y 軸為掃描離子質荷比 (m/z)，圓圈的大小代表訊號強度 (積分面積)。



圖九、運用 excel 將 CNL 訊號轉換成 adductome map 圓泡圖範例

另外，利用本計畫購置的 Originlab 軟體 (<http://www.originlab.com/>) 將 Analyst 輸出的原始數據轉換繪製成 adductome map 強度色帶圖，也能產生易於判讀比對的圖像(見下圖十)。X 軸為層析時間，Y 軸為母離子 (Q1) 質荷比，顏色代表訊號的強度；圖中色帶的窄跟寬表示層析訊號的範圍。

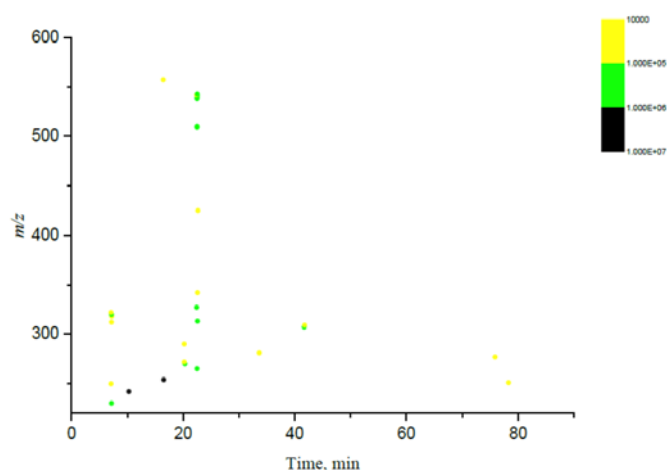


圖十、Adductome map 強度色帶圖

上述的原始數據，可進一步運用 AB Sciex 所提供 MarkerViewTM 軟體 (<http://sciex.com/products/software/markerview-software>)，以上述 6 種內標校正滯留時間為基準，在不同層析時間區段中修正滯留時間，並扣除正常 nucleosides

及內標訊號後將訊號積分輸出。下圖十一為經扣除背景訊號並區段修正滯留時間、離子抑制及 DNA 含量後，以 Originlab 繪製的 adductome map 強度點狀圖。此種呈現方式較不易受圖譜中波峰拖尾干擾，能幫助快速辨別找出 DNA 鍵結物。

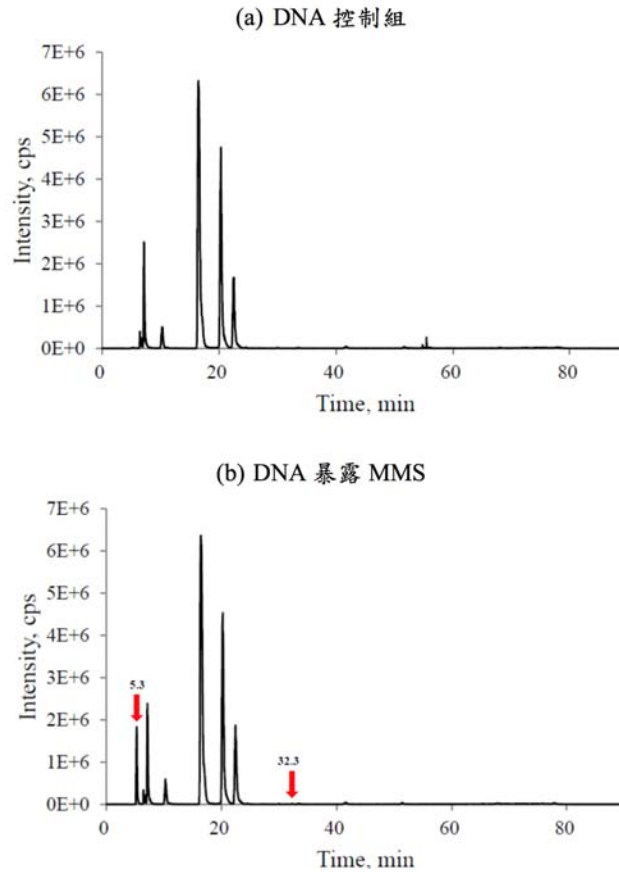
對於特徵母離子的圖間比對，可利用 AB Sciex 所出版軟體 Metabolite ID for Analyst (Version 1.4 Prototype 2)，直接找出控制組與處理組的特徵母離子（範例詳見圖十八）。



圖十一、Adductome map 強度點狀圖 (扣除正常 nucleosides 及內標訊號)

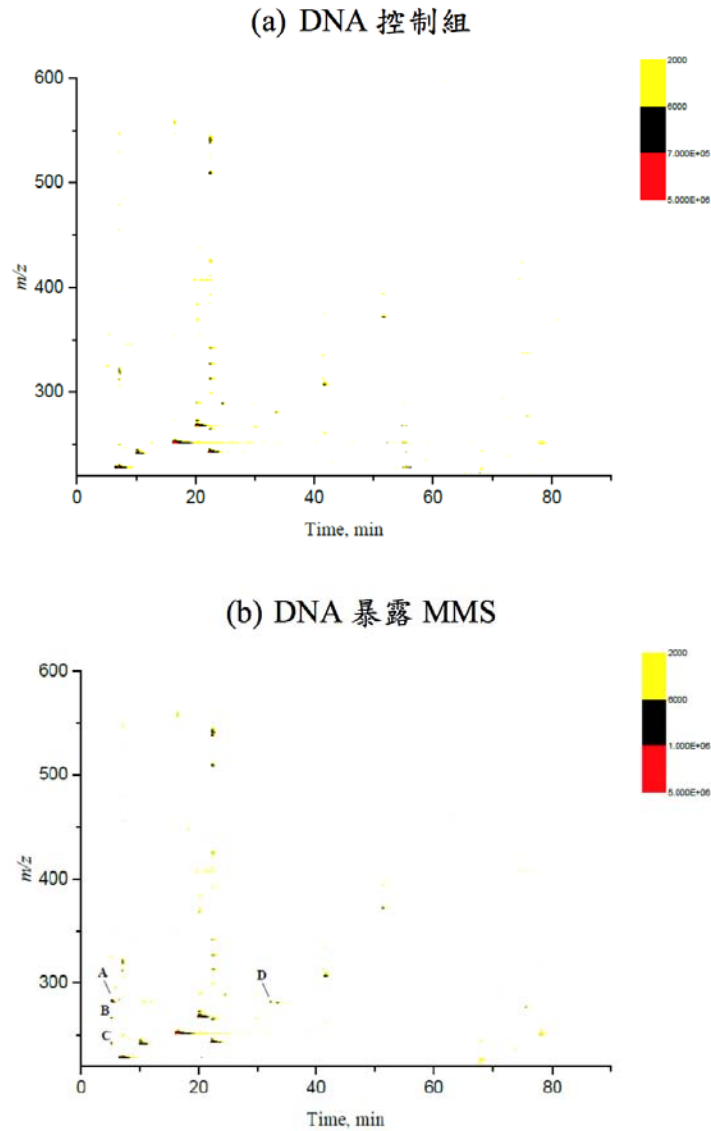
(6) DNA adductomics 運用於 calf thymus DNA 暴露直接甲基化試劑

Methylmethane sulfonate (MMS) 係反應性強的直接甲基化劑 (direct-acting methylating agent)，可直接作用 DNA 屬於 S_N2 (雙分子親和性取代機制) 的作用試劑 (Beranek 1990)。下圖十二為 calf thymus DNA 與 MMS 反應後，水解添加校正內標，在 CNL 模式下掃描偵測 2'-deoxynucleosides 的全離子掃描累加 (total ion chromatography, TIC) 質譜圖。由 TIC 圖可初步比對總離子掃描訊號特徵，暴露 MMS (b) 相較於 DNA 控制組 (a) 在總層析時間 5 及 32 分鐘附近有新的質譜訊號產生。



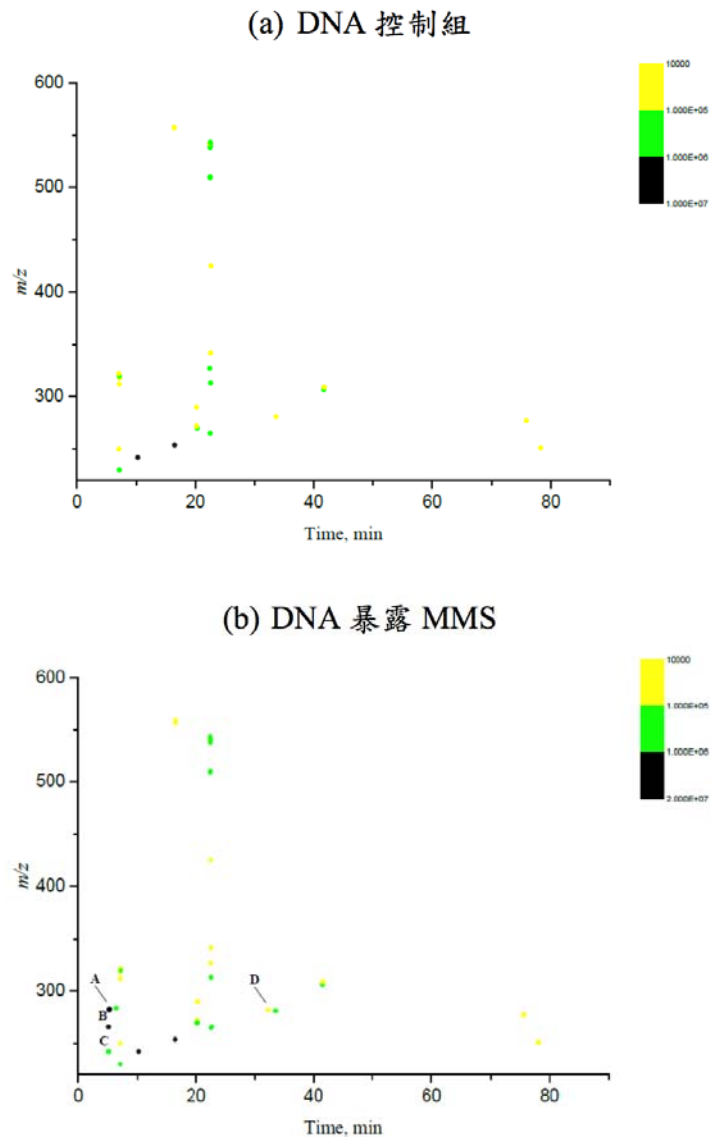
圖十二、DNA 經 CNL 掃描 (丟失質量:116 Da) 的 TIC 圖譜

上述的 TIC 圖譜資訊可進一步提取轉換為 adductome map 強度色帶圖 (未扣除 normal nucleosides: dA、dT、dC 與 dG 及內標訊號); X 軸為層析時間, Y 軸為母離子 (Q1) 質荷比, 顏色代表訊號強度, 如圖十三所示。相較於控制組, MMS 處理組在層析時間 5 分鐘附近產生新訊號 A、B 與 C, 其 m/z 分別為 282、266 及 242, 亦即原本分子量為 281、265 及 241; 32 分鐘產生新訊號 D 其 m/z 為 282, 亦即分子量為 281。



圖十三、DNA adductome map 強度色帶圖

上述 adductome map 強度色帶圖可進一步透過 MarkerView™ 軟體轉換，利用 6 種校正內標進行在不同層析時間區段的滯留時間校正；將訊號積分並扣除 normal nucleosides (dA、dT、dC 與 dG) 及內標訊號後並修正滯留時間、離子抑制及 DNA 含量後的 adductome map。DNA 經 MMS 暴露後，大部分的特徵訊號與控制組相似，但經由 adductome map 的疊圖比對後，找出 A、B、C 與 D 四個重要特徵的 DNA adduct。推測 A、B、C 與 D 可能分別是 N7-methyl-2'-deoxyguanosine、N3-methyl-2'-deoxyadenosine、N3-methyl-2'-deoxycytidine 及 O⁶-methyl-2'-deoxyguanosine 四個甲基化鍵結的 DNA adducts，也證實本研究所開發的 DNA adductomics 方法可行性。

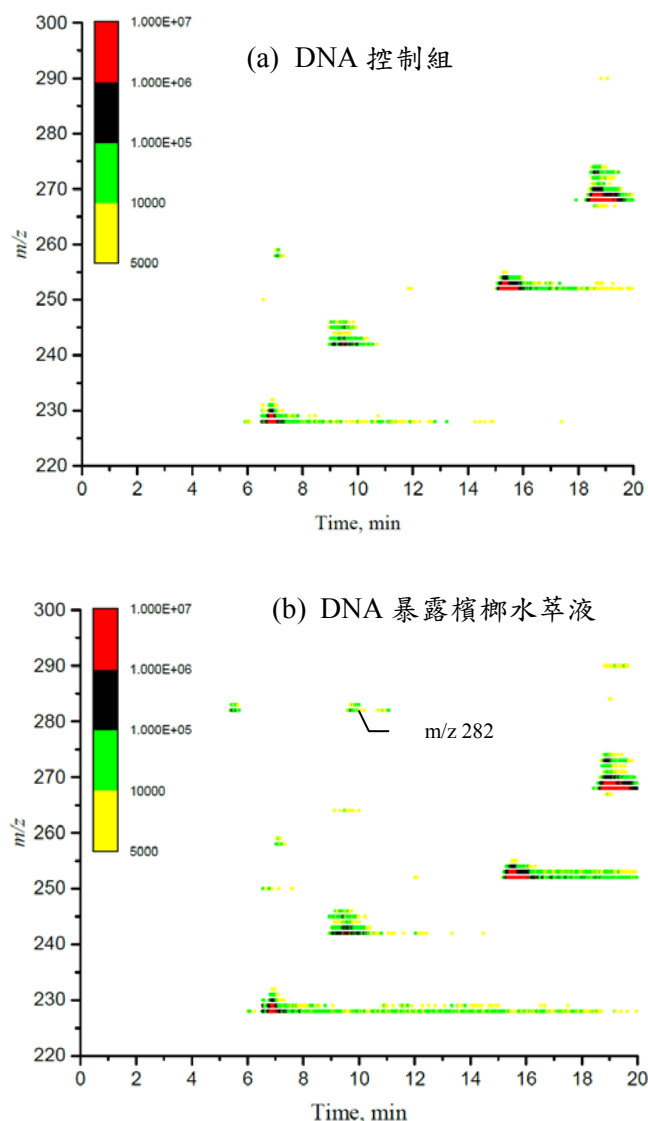


圖十四、DNA adductome map 訊號強度點狀圖

(7) DNA adductomics 運用於 calf thymus DNA 直接暴露檳榔萃取液分析

檳榔嚼食在亞洲地區 (南方) 極為盛行，主要是因為檳榔被廣用為來提振精神，因此是繼吸菸、酒精及咖啡因後的第四大生活習性 (Winstock 2002)。檳榔嚼塊組成檳榔子 (areca nut)，其主成份為檳榔鹼 (areca nut alkaloids) 及多酚類化合物被認為跟口腔癌最有關聯 (Nair et al. 2004)。此外，檳榔成分中也可能含能與 DNA 反應生成 adducts 的毒物，運用 DNA adductomic 方法可試圖找出未知的致癌物。

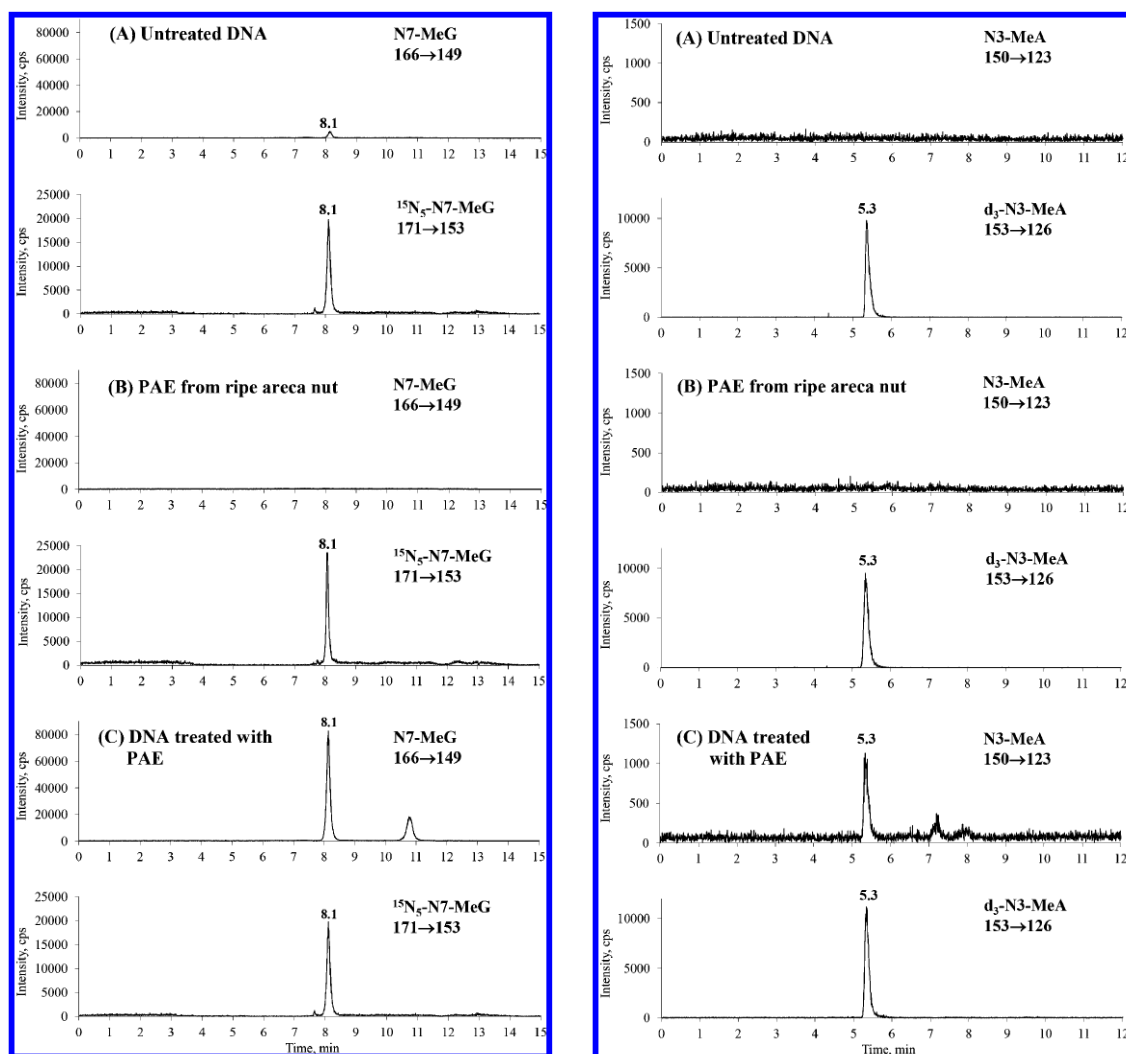
本研究中我們利用 calf thymus DNA 直接與未成熟檳榔水萃液進行混合。下圖十五為 DNA 經檳榔水萃液直接暴露後，利用 on-line SPE LC-MSMS 進行 CNL 分析，再提取轉換為 adductome map 強度色帶圖（未扣除 normal nucleosides 及內標訊號）來檢視。將控制組 (a) 與檳榔水萃液處理後 (b) 做一比較，可發現在層析時間約 10 分鐘附近產生新訊號，其 m/z 為 282，亦即原本分子量為 281。推測可能是檳榔水萃液可能存有甲基化劑，而 dG 的 N7 位置最易與甲基化劑鍵結。因此我們推測此 adduct 為 N7-methyl-2'-deoxyguanosine，但 N7-methyl-2'-deoxyguanosine 在常溫下並不穩定，極易去嘌呤為 N7-methylguanine。因此如果詳細確認檳榔水萃液中有未知甲基化劑存在，分析經檳榔水萃液的 DNA 中 N7-methylguanine (N7-MeG) 及 N3-methyladenine (N3-MeA) 是更準確的方法，同時本實驗室先前針對這兩個 adducts 已有準確的 LC-MS/MS 測定法 (Chao et al. 2007; Hu et al. 2011)。



圖十五、檳榔萃取液直接與 DNA 混合反應後的 adductome map

為了進一步確認檳榔水萃液中確實存有未知的甲基化劑，我們大量製造檳榔水萃液並將其濃縮，與 DNA 反應後添加同位素內標並以 LC-MS/MS (multiple reaction monitoring mode, MRM) 測定是否會生成 N7-methylguanine 及 N3-methyladenine。令人驚訝地，不管是未成熟的檳榔(菁仔)、成熟的檳榔種子、印度檳榔種子商業性小巧包零食 (*pan masala*) 及加入菸草的印度檳榔種子商業性小巧包零食 (*gutkha*) 皆能使 DNA 產生顯著地 N7-methylguanine 及 N3-methyladenine；下圖十六為以 LC-MS/MS 證實未成熟的檳榔水萃液能使 DNA 生成 N7-methylguanine 及 N3-methyladenine (Hu and Chao 2012)。

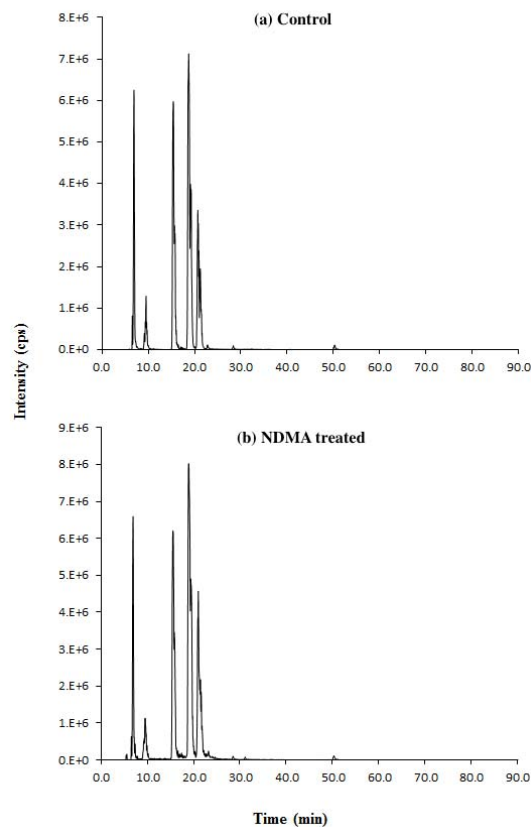
全球約有 6 億人口嚼食檳榔，檳榔早被證實會引起口腔癌，先前的研究皆推測可能是檳榔中的物質經人體轉化代謝為致癌物。本研究領先發現檳榔的水萃物不須經由代謝就能直接造成 DNA 烷基化損傷，且此致癌物濃度不容忽視。此物質對人體健康產生潛在的致癌因子，讓檳榔食用者容易罹患口腔癌。



圖十六、未成熟的檳榔水萃液直接與 DNA 混合反應後生成 N7-methylguanine 及 N3-methyladenine (Hu and Chao 2012)

(8) DNA adductomics 運用於餵食二甲基亞硝胺的小鼠肝臟研究

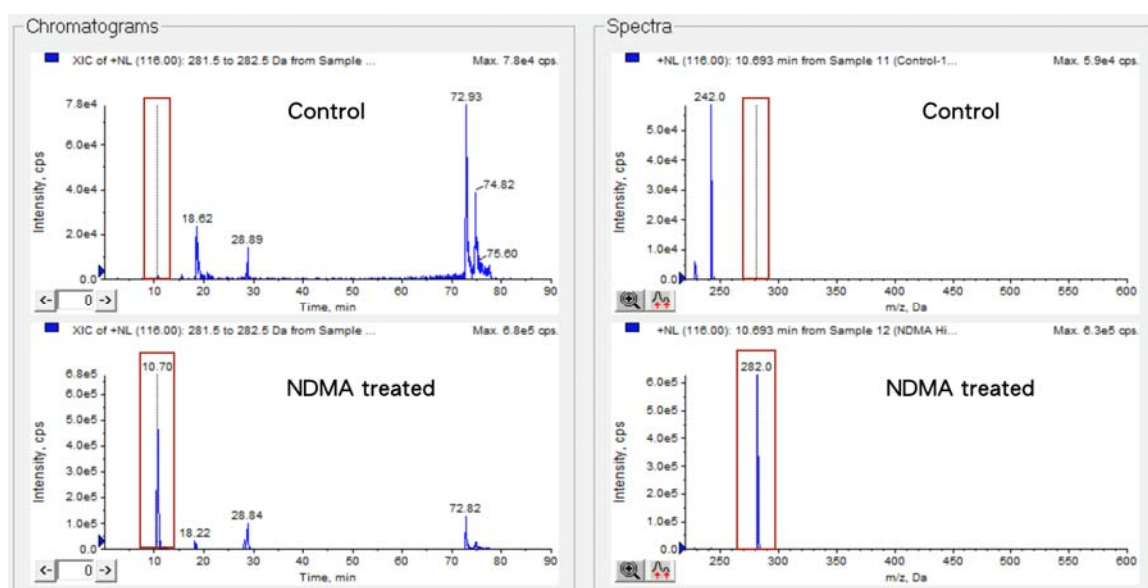
亞硝胺是一種普遍存於香菸煙霧且毒性強烈的致癌物質，其中又以二甲基亞硝胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA) 被廣泛研究，每支香菸的主煙流約有 6.3~76 ng 的 NDMA (Tricker et al. 1991)。國際癌症中心 (IARC) 將 NDMA 歸類為 Group 2A，NDMA 經體內代謝後可造成 DNA 的烷基化傷害，可產生造成鹼基結構上的甲基化修飾鍵結。因 NDMA 需經由代謝才具反應性，本研究將 NDMA 管餵小鼠 (10 mg/kg)，24 小時後犧牲後取其肝臟進行 DNA adductomic 分析，希望能進一步驗證本方法的廣用度且找出所有可能的 DNA adducts。下圖十七為控制組與餵食 NDMA 後小鼠肝臟的分析結果，發現從 TIC 圖中無法立即找出明顯差異。



圖十七、控制組與經 NDMA 處理後小鼠肝臟的 CNL 分析結果

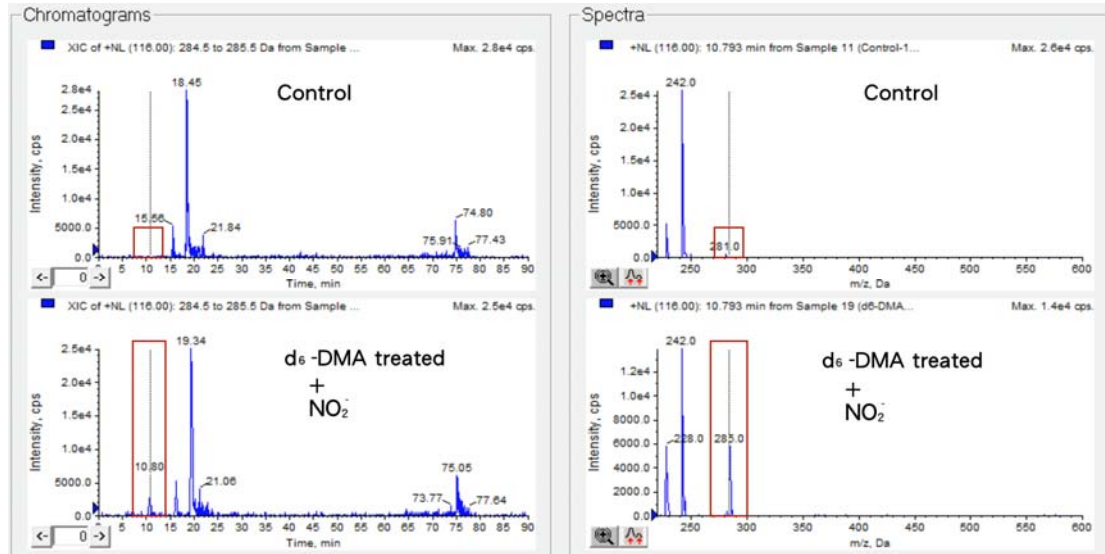
根據先前的分析經驗，發現 CNL 模式下質譜分析的 TIC 圖中訊號雜亂，往往無法有效快速地找出差異性，導致於 TIC 比對效果不好。因此在本實驗在取得質譜分析結果後，進一步利用軟體 Metabolite ID for Analyst (Version 1.4 Prototype 2) 直接進行特徵圖譜比對。

下圖十八為控制組與處理 NDMA 組的比對結果，軟體快速地找出有差異的波峰訊號。以最顯著的訊號為例，相對於控制組在層析時間 10.70 分鐘，NDMA 組出現一個非常強的特徵訊號。此訊號主要來自 m/z 282.0 ($[M+H]^+$)，推斷可能為 N7-methyl-2'-deoxyguanosine (N7-MedG) 或 O⁶-methyl-2'-deoxyguanosine (O⁶-MedG)。因 NDMA 經代謝後可生成反應性強的甲基偶氮離子，DNA 中的 2'-deoxyguanosine (dG) 含氮鹽基上 N7 及 O⁶ 位置最易與甲基偶氮離子形成共價鍵結，其分子量會由 dG 的 267 變為 N7-MedG 或 O⁶-MedG 的 281，經 ESI 帶電後 m/z 為 282。



圖十八、控制組與經 NDMA 處理後的小鼠肝臟比對結果

為了驗證小鼠肝臟中所測得的甲基化鍵結物，本研究進一步提供小鼠 NDMA 的前驅合成物質，餵食小鼠二甲基胺的氘化內標 (deuterium labeled dimethylamine, d₆-DMA) 與亞硝酸鹽 (Nitrite, NO₂⁻)，劑量濃度為 200 mg/kg (d₆-DMA) 與 100 mg/kg (NO₂⁻)，使其在小鼠體內反應形成 d₆-NDMA，24 小時後犧牲後取其肝臟進行 DNA adductomic 分析，下圖十九為控制組及同時給予 d₆-DMA 與 NO₂⁻ 後的差異比對結果。



圖十九、控制組與經 d_6 -DMA+NO₂⁻ 處理後的小鼠肝臟比對結果

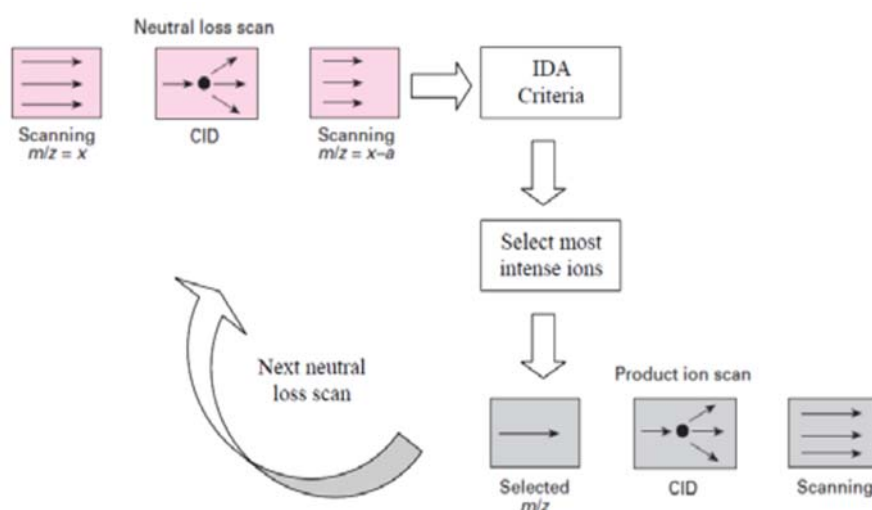
由於本研究使用的是二甲基胺的氘化內標 (d_6 -DMA)，結構上原本的氫被取代成氘，因此與亞硝酸鹽反應後，會形成 d_6 -NDMA，再經由體內代謝後形成接上氘化甲基 (CD₃) 的 DNA 鍵結物，因此若在相同層析時間能看到 m/z 285 的 CNL 離子訊號 (m/z 282+3，源自 d_3)，便能更加證實是 d_3 -N7-MedG 或 d_3 -O⁶-MedG 的存在。圖十九中我們也發現與控制組比對之下 d_6 -DMA 加 NO₂⁻ 組， m/z 285 的離子訊號有非常顯著的差異性。我們的動物實驗(圖十八及十九)皆驗證可能的 N7-MedG 或 O⁶-MedG 確實來自亞硝胺暴露代謝後體內形成的鍵結物，也驗證此分析方法在動物實驗上的可行性。

(9) 利用 CNL-IDA-EPI 模式分析進行定性分析

CNL 模式分析所得到的 adductome map，展現所有可能 DNA adducts 的層析時間、離子強度與母離子質荷比 (m/z)。若母離子帶電方式為普遍的 $[M+H]^+$ ，則可推測此 2'-deoxynucleosides 的分子量為 $[M+H]^+ - 1$ ；但無法提供足夠的資訊來確認修飾鹼基的分子結構。因此只能在有限的資訊下猜測可能的修飾鹼基，進而購買已知的標準品或同位素內標，在 LC-MS/MS 的 MRM 模式下執行比對確認。然而，若此修飾鹼基是未知的分子，則不可能有標準品或同位素內標可進行比對。先前的幾個研究在 adductome map 上雖可找出具特殊意義的 DNA adducts，但有些修飾鹼基在缺乏標準品的情況下依然無法進一步確認結構，只能由毒物代謝活化途徑猜測其可能的鍵結物 (Kanaly et al. 2006)。

本研究引入質譜分析特有的掃描模式：資料依靠收集模式 (information

dependent acquisition, IDA) 於 DNA adductomics 分析系統。所謂 IDA 模式，指當 LC-MS/MS 進行 CNL 分析時，同時會根據 CNL 掃描到的瞬間訊號強度、質荷比或帶電荷數，將符合設定篩選條件的母離子提取以進行碰撞裂解並量測其裂解後片段質量分布。因此當執行 CNL 模式時可經 IDA (預設篩選條件)自動提列出符合條件的母離子，並執行子離子掃描 (enhance product ion scan, EPI)，如下圖二十所示。如此，便可在一次注射分析中同時獲得 adductome map 及每一可能 DNA adducts 的離子斷片資訊，這將十分有助於修飾鹼基分子結構的推定。

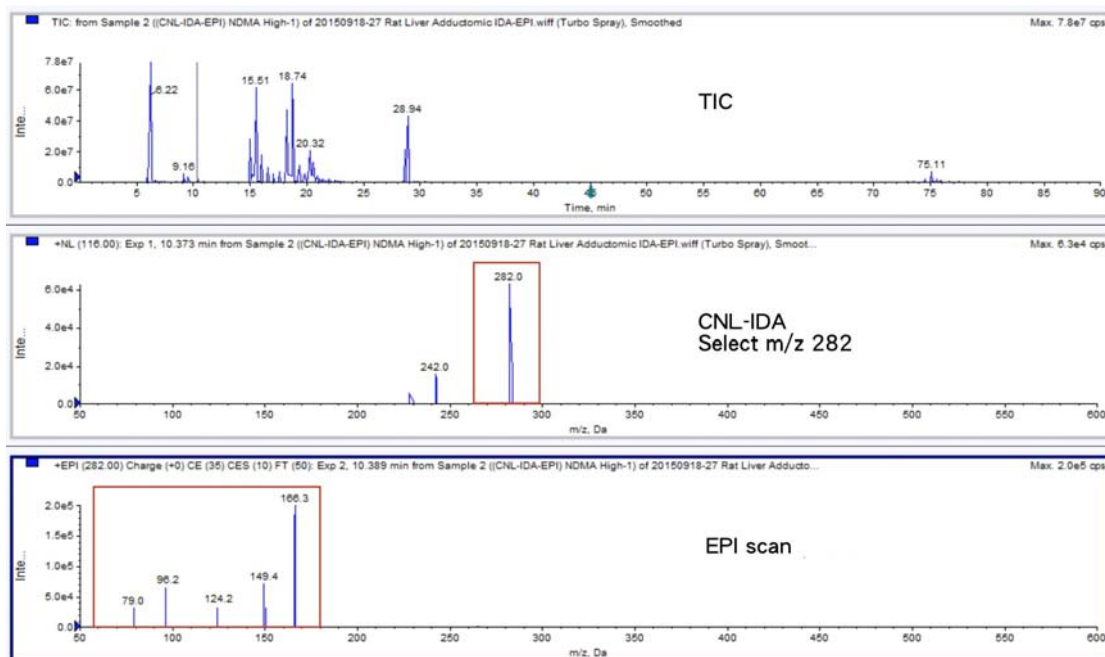


圖二十、運用資料依靠收集模式 (IDA) 於 DNA adductomics 分析

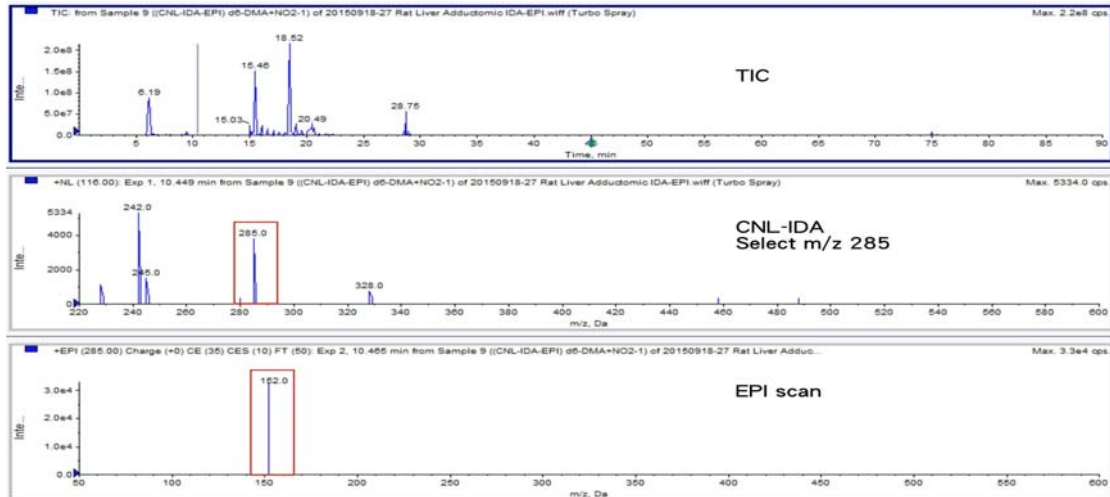
本研究利用 CNL-IDA-EPI 模式針對小鼠暴露 NDMA 後的肝臟進行分析量測，IDA 設定的篩選條件門檻為訊號高度大於 2000 cps，且在一次 CNL 掃描裡的前三名最大的訊號，皆會被挑選出來在 Q2 碰撞並收集 EPI 的碎片分析。設定條件參數於表八。例如，經 NDMA 暴露 (圖二十一) 或給予 d_6 -DMA+NO₂⁻ (圖二十二) 後的小鼠肝臟 DNA 經 CNL-IDA-EPI 分析，m/z 282 被 IDA 系統挑選出並進行 EPI 斷片掃描。從結果中可發現，m/z 282 經碰撞後的斷片指紋與先前本實驗室分析 N7-methylguanine 的斷片文獻相符合 (Chao et al. 2007)；皆會產生 m/z 149 與 m/z 124 等主要斷片。經由所得到的結構斷片訊息，我們進而推定 m/z 282 (RT=10.70 min) 的訊號應為 N7-methyl-2'-deoxyguanosine。而給予 d_6 -DMA+NO₂⁻ 後，雖然 m/z 285 母離子強度較低，導致碰撞後的碎片訊息較少，但依然有看到 m/z 152 (m/z 149+3) 的訊號。

表八、CNL-IDA-EPI 分析參數表

CNL	Start (amu) ~ stop (amu)	220-600
	Loss of (amu)	116
	Declustering potential, V	30
	Entrance potential voltage, V	10
	Scan time (s)	1.0
	Collision-induced dissociation gas flow	Medium
	Collision energy, V	10-30
	Collision cell exit potential, V	15
IDA	Abundance above (cps)	2000
	Most of intense peak	3
	Exclusion for (s)	20
EPI	Collision energy	CE spread (35 ± 10V)
	Start (amu) ~ stop (amu)	50-600
	Declustering potential, V	30
	Entrance potential voltage, V	10
	Collision-induced dissociation gas flow	High
	Collision cell exit potential, V	15

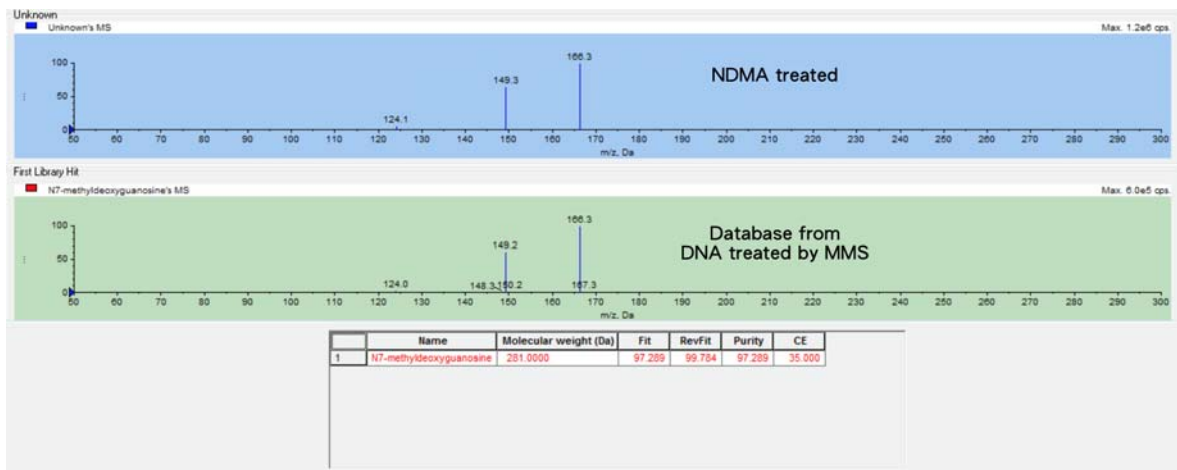


圖二十一、CNL-IDA-EPI 分析 NDMA 暴露後的小鼠肝臟



圖二十二、CNL-IDA-EPI 分析 d_6 -DMA+NO₂⁻ 暴露後的小鼠肝臟

本研究進一步利用資料庫進行比對，此資料庫係先前實驗 DNA 直接與強甲基化劑 MMS 直接反應後分析建立。我們將小鼠肝臟以 CNL-IDA-EPI 分析得到 N7-MedG 斷片訊息放到資料庫中進行比對，如圖二十三顯示 NDMA 暴露組 m/z 282 的斷片指紋與資料庫內的 N7-MedG 比對是一致的，特徵吻合 (Fit) 高達 97.289%，且反向搜尋 (RevFit) (用資料庫圖譜與該數據反向比對) 的特徵吻合也有 99.784%。未來將持續建置更多的 DNA 鍵結物結構斷片訊息進入資料庫，相信將極有助於 DNA adductomic 在生物醫學領域的定性研究應用。



圖二十三、CNL-IDA-EPI 斷片訊息與資料庫進行特徵比對

五、成果自評

本研究四年來成功發展 DNA adductomics 分析法，所開發 DNA adductomics 質譜研究法，將可提供生物醫學領域嶄新的技術平台，以作為臨床(如化療)、化學預防或毒物暴露評估的重要研究工具。

本研究計劃經費支持下共發表 SCI 期刊論文 9 篇，成果豐碩：

1. Chiung-Wen Hu, Marcus S. Cooke, Yi-Hung Tsai and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Archives of Toxicology*, 2015, 89:201-210. (SCI; Impact factor = **5.980**, Ranking in Toxicology = 6/87 = 6.9%).
2. Chiung-Wen Hu, Jian-Lian Chen, Yu-Wen Hsu, Cheng-Chieh Yen and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 2015, 465:39-47. (SCI; Impact factor = **4.396**, Ranking in Biochemistry & Molecular Biology = 67/289 = 23.2%).
3. **Mu-Rong Chao**, Domniki Fragou, Panos Zanos, Chiung-Wen Hu, Alexis Bailey, Sofia Kouidou and Leda Kovatsi. Epigenetically modified nucleotides in chronic heroin and cocaine treated mice. *Toxicology Letters*, 2014, 229:451-457. (SCI; Impact factor = **3.262**, Ranking in Toxicology = 21/87 = 24.1%).
4. Chiung-Wen Hu, Yu-Wen Hsu, Jian-Lian Chen, Lai-Man Tam and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Direct analysis of tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in human urine by LC-MS/MS: evidence of linkage to methylated DNA lesions. *Archives of Toxicology*, 2014, 88:291-299. (SCI; Impact factor = **5.980**, Ranking in Toxicology = 6/87 = 6.9%).
5. **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**), Pavel Rossner Jr., Siamak Haghdoost, Hueiwang Anna Jeng and Chiung-Wen Hu. Nucleic acid oxidation in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013:368651. (SCI; Impact factor = **3.516**, Ranking in Cell Biology = 82/184 = 44.6%)
6. Chiung-Wen Hu, Huei Lee, Jian-Lian Chen, Yi-Jie Li and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Optimization of global DNA methylation measurement by LC-MS/MS and its application in lung cancer patient. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 8859-8869. (SCI; Impact factor = **3.436**, Ranking in Chemistry, analytical = 13/74 = 17.6%)
7. Chiung-Wen Hu and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Direct-acting DNA alkylating agents present in aqueous extracts of areca nut and its products. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25, 2386-2392. (SCI; Impact factor = **3.529**, Ranking in Chemistry, medicinal = 10/59 = 16.9%).
8. Chiung-Wen Hu, Hung-Hsin Liu, Yi-Jie Li and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Direct analysis of 5-methylcytosine and

5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25, 462-470. (SCI; Impact factor = **3.529**, Ranking in Chemistry, medicinal = 10/59 = 16.9%).

9. Chiung-Wen Hu, Chih-Ming Chen, Hsin Hui Ho and **Mu-Rong Chao*** (**Corresponding Author**). Simultaneous quantification of methylated purines in DNA by isotope dilution LC-MS/MS coupled with automated solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402, 1199-1208. (SCI; Impact factor = **3.436**, Ranking in Chemistry, analytical = 13/74 = 17.6%).

其中論文 "Chiung-Wen Hu and Mu-Rong Chao*. Chemical Research in Toxicology, 2012, 25, 2386-2392." 領先證實檳榔水萃物不須經由代謝能直接造成 DNA 烷基化損傷。榮獲美國化學會(ACS)以新聞特稿發佈"Chewing betel quid exposes half a billion people to direct carcinogens" http://portal.acs.org/portal/PublicWebSite/pressroom/presspacs/CNBP_031032，同步刊登於全球專業新聞網站，並獲全球發行量最大英文報 The Times of India 選為"8 most popular health news of 2012"。



FOR IMMEDIATE RELEASE

ACS News Service Weekly PressPac: October 24, 2012

Chewing betel quid exposes half a billion people to direct carcinogens

"Direct-Acting DNA Alkylating Agents Present in Aqueous Extracts of Areca Nut and Its Products"
Chemical Research in Toxicology

Chewing betel quid — the fourth most popular psychoactive substance in the world after tobacco, alcohol and caffeine — exposes its 600 million users to substances that act as direct carcinogens in the mouth, scientists are reporting in a new study. It appears in ACS' journal *Chemical Research in Toxicology*.

Mu-Rong Chao and Chiung-Wen Hu explain that betel quid (BQ) consists of nuts from the areca tree, sometimes combined with spices, such as cardamom or saffron, and other ingredients. Available in commercial forms, BQ is

popular among people in China, India and other Asian countries, and people of Asian heritage living in the U.S. and other countries. Scientists have known for decades that chewing BQ can lead to oral cancer, and showed recently that the substances in BQ could be changed into carcinogens in the body. The authors of this study explored whether there were any substances in the areca nut that can cause cancer directly, without any need for the body to change or "activate" them.

They discovered that compounds in the areca nut can "alkylate" the genetic material DNA, causing changes that increase the risk of cancer, and they are present in betel quid in amounts high enough to do so. "Our study showed that these alkylating agents are present at levels sufficient to cause DNA damage and could potentially have adverse implications to human health, particularly in the case of the development of oral cancer for BQ chewers," they say.

The authors acknowledge funding from the **National Science Council, Taiwan**.



Credit: iStockphoto/Thinkstock

Contact

Science Inquiries: **Michael Woods**, Editor, 202-872-6293

General Inquiries: **Michael Bernstein**, 202-872-6042

六、參考文獻

- Balbo, S., R. J. Turesky, et al. (2014). "DNA adductomics." Chemical Research in Toxicology **27**(3): 356-366.
- Beach, A. C. and R. C. Gupta (1992). "Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay." Carcinogenesis **13**(7): 1053-1074.
- Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **231**(1): 11-30.
- Carlsson, H., H. von Stedingk, et al. (2014). "LC-MS/MS Screening Strategy for Unknown Adducts to N-Terminal Valine in Hemoglobin Applied to Smokers and Nonsmokers." Chemical Research in Toxicology **27**(12): 2062-2070.
- Chao, M., C. Wang, et al. (2007). "Simultaneous determination of N7-alkylguanines in DNA by isotope-dilution LC-tandem MS coupled with automated solid-phase extraction and its application to a small fish model." Biochemical Journal **402**: 483-490.
- Evans, M. D., R. Olinski, et al. (2010). "Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress." The FASEB Journal **24**(4): 1249-1260.
- Hu, C. W., M. R. Chao, et al. (2010). "Urinary analysis of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: Study of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine stability." Free Radical Biology and Medicine **48**(1): 89-97.
- Hu, C. W., B. H. Lin, et al. (2011). "Quantitative determination of urinary N3-methyladenine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction." International Journal of Mass Spectrometry **304**: 68-73.
- Hu, C. W. and M. R. Chao (2012). "Direct-acting DNA alkylating agents present in aqueous extracts of areca nut and its products." Chemical Research in Toxicology **25**: 2386-2392.
- Kanally, R. A., T. Hanaoka, et al. (2006). "Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans." Antioxidants & Redox Signaling **8**(5-6): 993-1001.
- Kanally, R. A., R. Micheletto, et al. (2015). "Application of DNA adductomics to soil bacterium *Sphingobium* sp. strain KK22." Microbiology Open.
- Klaene, J. J., V. K. Sharma, et al. (2013). "The analysis of DNA adducts: The transition from ³²P-postlabeling to mass spectrometry." Cancer Letters **334**(1): 10-19.
- Nair, U., H. Bartsch, et al. (2004). "Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative mechanisms." Mutagenesis **19**(4): 251-262.
- Singh, R., F. Teichert, et al. (2010). "Development of a targeted adductomic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **24**(16): 2329-2340.
- Tretyakova, N., P. W. Villalta, et al. (2013). "Mass spectrometry of structurally modified DNA." Chemical Reviews **113**(4): 2395-2436.
- Tricker, A., C. Ditrich, et al. (1991). "N-Nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke." Carcinogenesis **12**(2): 257-261.
- Winstock, A. (2002). "Areca nut-abuse liability, dependence and public health." Addiction Biology **7**(1): 133-138.
- 陳皓君 & 洪嘉良 (2001). "內生的 DNA 加成產物之形成與其在體內含量之分析." Chemistry **59**(3): 299-310.

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：104 年 6 月 1 日

計畫編號	NSC 100-2628-B-040-001-MY4		
計畫名稱	質譜法發展新穎的基因鍵結體學(DNA Adductomics):全面評估檳榔及香菸所造成的 DNA 鹼基修飾		
出國人員姓名	趙木榮	服務機構及職稱	中山醫學大學職業安全衛生系 教授
會議時間	104 年 5 月 25 日至 104 年 5 月 29 日	會議地點	日本，Kyoto
會議名稱	The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015)		
發表論文題目	Quantitative analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human urine by automated online solid-phase extraction LC-MS/MS		

一、參加會議經過 & 與會心得

2015 年國際輻射研究年會在日本京都國際會議廳(Kyoto International Conference Center)舉辦，今年的主軸為“Radiation Science Shaping the Future of the Earth and Mankind”。輻射科學的範疇廣大，含括許多分支例如輻射相關物理、化學、生物及醫藥，每個領域近年來都有極大的進展。

由於日本在 2011 年 3 月 11 日的地震引發福島第一原子力發電所(Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant)的重大核災事件，成為本次研討會的關注重點。有幾個場次特別針對該事件進行熱烈討論並交換意見，試圖找出學界與社會的能源共識。此外輻射在醫療上的應用是今年的另一亮點。

輻射對於 DNA 的損傷長久以來備受關注。本實驗室近來對於量測表觀遺傳(epigenetics)的鹼基修飾極感興趣。最新的研究證實 5-methyl-2'-deoxycytidine 在體內經 Tet 酵素氧化為 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine 是重要的 DNA 去甲基化機制；但外在暴露游離輻射也可造成 5-methyl-2'-deoxycytidine 氧化為 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine。因此在 ICRR 2015 我們發表了在尿液中量測 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine 的質譜技術。相似的概念也在 ICRR 2015 中由加拿

大的著名學者 Jean Cadet 提出，他量測了四個 cytosine 經輻射造成的氧化產物 5-hydroxycytosine、5,6-dihydroxy-5,6-dihydrouracil、5-hydroxyhydantoin 及 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine。此外還有 5-methylcytosine 的氧化產物 5-amino-5-methylhydantoin、5-hydroxymethylcytosine 及 5-formylcytosine。這皆暗示著輻射的暴露可能影響表觀遺傳，亦即基因的表現。



二、所發表之論文

Mu-Rong Chao, Yi-Hung Tsai, Chiung-Wen Hu. “Quantitative analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human urine by automated online solid-phase extraction LC-MS/MS”. the 15th International Congress of Radiation Research, 3-PS3B-08, May 25-29, 2015, Kyoto, Japan.



ICRR2015

3-PS3B-08

Quantitative Analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Automated Online Solid-phase Extraction LC-MS/MS

Mu Rong Chao¹, Yi Hung Tsai¹, Chiung Wen Hu²

¹Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taiwan,

²Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taiwan

Methylation of the C5 position of cytosine in genomic DNA is one of the most fundamental epigenetic characteristics. Aberrant methylation of certain genes has been associated with various diseases, especially cancers. Recent study showed that 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC) in cellular DNA exposed to ionizing radiation generated a variety of oxidation products. Of the 5-mdC oxidation products, the main radiation-induced modified nucleoside was 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC). Meanwhile, 5-hmdC is also an important intermediate of the demethylation of 5-mdC. However, limited information is available concerning the 5-hmdC measurement in human. In this study, we developed an isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with online solid-phase extraction (online SPE) for rapid analysis of 5-hmdC in human urine.

Crude urine sample was added with stable isotope-labeled internal standard (d3-5-hmdC) and then directly injected into the online SPE LC-MS/MS. The online SPE consisted of a switching valve and a C18 trap column (33 × 2.1 mm i.d., 5 μm; Inertsil, ODS-3). The switching valve function was controlled using PE-SCIEX control software. After automatic sample cleanup, the sample was automatically transferred onto a C18 column (150 × 2.0 mm i.d., 5 μm; Inertsil, ODS-3) using a Agilent 1100 series HPLC system that was interfaced with a API 4000 QTRAP linear ion trap mass spectrometer (Applied Biosystems). The samples were analyzed in the positive ion multiple reaction monitoring mode. 5-HmdC was monitored at m/z 258>142 (quantifier ion) and m/z 258>124 (qualifier ion), while d3-5-hmdC was monitored at m/z 261>145.

The detection limit of 5-hmdC was estimated to be 0.13 fmol on column. This method was further applied to determine the urinary levels of 5-hmdC in 30 healthy adults. The results showed that the mean background urinary level of 5-hmdC was 3.7 ± 2.6 ng/mg creatinine. Overall, the measurement of 5-hmdC in urine may help to investigate the radiation-induced oxidation of 5-mdC as well as the changes of DNA methylation status in human.



Wednesday, May 27 17:00 - 18:00 (Event Hall)

[Back](#)

Poster Session 2

03. Life Sciences
DNA damage

3-PS3B-08 Quantitative Analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Automated Online Solid-phase Extraction LC-MS/MS

Mu Rong Chao¹, Yi Hung Tsai¹, Chiung Wen Hu²

¹Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taiwan, ²Department of Public Health, Chung Shan Medical University, Taiwan

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/19

科技部補助計畫	計畫名稱: 質譜法發展新穎的基因鍵結體學(DNA Adductomics): 全面評估檳榔及香菸所造成的DNA鹼基修飾
	計畫主持人: 趙木榮
	計畫編號: 100-2628-B-040-001-MY4 學門領域: 公共衛生及環境醫學
無研發成果推廣資料	

100年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：趙木榮		計畫編號：100-2628-B-040-001-MY4				計畫名稱：質譜法發展新穎的基因鍵結體學(DNA Adductomics)：全面評估檳榔及香菸所造成的DNA鹼基修飾		
成果項目		量化			單位	備註(質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)		
		實際已達成數(被接受或已發表)	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比				
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇		
		研究報告/技術報告	0	0	100%			
		研討會論文	1	100	60%			
		專書	0	0	100%	章/本		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件		
		已獲得件數	0	0	100%			
	技術移轉	件數	0	0	100%	件		
		權利金	0	0	100%	千元		
	參與計畫人力(本國籍)	碩士生	3	100	100%	人次		
		博士生	0	0	100%			
		博士後研究員	1	100	100%			
		專任助理	2	100	100%			
國外	論文著作	期刊論文	9	0	70%	篇	2篇為本計畫獨力完成，7篇為2個計劃的共同成果；有兩篇Impact factor大於5。	
		研究報告/技術報告	9	0	60%			
		研討會論文	0	0	100%			
		專書	0	0	100%	章/本		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件		
		已獲得件數	0	0	100%			
	技術移轉	件數	0	0	100%	件		
		權利金	0	0	100%	千元		
	參與計畫人力(外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次		
		博士生	0	0	100%			
		博士後研究員	0	0	100%			
		專任助理	0	0	100%			
其他成果 (無法以量化表達之 成果如辦理學術活動)	本計畫研究成果發表於Chemical Research in Toxicology (2012)主題Direct-acting DNA alkylating agents present in aqueous extracts of areca nut and its products，首先證實檳榔子水草物不須經由代謝能直接造成DNA烷基化							

、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)	損傷。榮獲美國化學會(ACS)以新聞特稿發佈""Chewing betel quid exposes half a billion people to direct carcinogens"" ""http://portal.acs.org/portal/PublicWebSite/pressroom/presspacs/CNBP_031032，同步刊登於全球專業新聞網站，並獲全球發行量最大英文報 The Times of India 選為""8 most popular health news of 2012""。
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以100字為限）

本研究計畫經費支持下共發表SCI期刊論文9篇，成果豐碩。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

本研究四年來成功發展DNA adductomics分析法，所開發DNA adductomics質譜研究法，將可提供生物醫學領域嶄新的技術平台，以作為臨床(如化療)、化學預防或毒物暴露評估的重要研究工具。

香菸與檳榔暴露對人體的健康危害，已經無庸置疑。它們在生物體內可形成的DNA adducts種類繁多，先前的研究皆由鎖定特定化合物來探討各別形成的DNA adducts，但都無法完整且同一時間描述香菸與檳榔暴露所造成的DNA鹼基修飾全貌。本研究將可運用於檳榔及香菸暴露所造成的DNA adducts特徵探討，追朔在檳榔及香菸中尚未知曉的重要致基因毒物作為疾病預防或暴露指標的重要參考。