

液相色谱-串联质谱法测定生物样本全基因组 DNA 甲基化

彭思远 张洁* 田美平 王展林 申河清

(中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室 厦门 361021)

摘 要 建立了基于液相色谱-电喷雾串联质谱的分析方法,对生物样本中全基因组 DNA 甲基化水平进行定量测定。首先将 DNA 从生物样本中提取出来,将 DNA 片段酶解为单核苷,利用液相色谱-串联质谱测定胞嘧啶核苷和 5-甲基胞嘧啶核苷的含量,从而计算出其全基因组 DNA 甲基化率。利用该法研究了暴露于全氟辛酸磺酸的 L-02 细胞、10 例原发性肝癌病例血浆样本和 10 例对照血浆样本的全基因组 DNA 甲基化水平,得出了它们的总甲基化率变化的初步结果。本方法操作简单,具有很高的灵敏度和稳定性,为研究生物样本,尤其是临床上易得但 DNA 含量极低的血浆样本的总甲基化水平提供了思路。

关键词 DNA 甲基化;液相色谱;质谱;血浆;细胞;全氟辛酸磺酸

1 引 言

生物基因组的表观遗传信息在基因表达的调控中具有重要作用,它可以随着外界环境因素的变化而改变,与环境暴露有密切关系。通过表观基因组(Epigenome)的变化,可以更深入地理解环境污染物对生物的负面影响。DNA 甲基化是最常见的一种表观遗传学修饰,在 DNA 甲基转移酶的催化作用下,胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶。全基因组 DNA 的低甲基化被认为会导致染色体不稳定和基因突变高发^[1]。表观遗传修饰可以影响罹患疾病的风险。而 DNA 甲基化的变化是正常细胞转化为病变细胞的过程中最早发生的变化之一,在作为可导致不良健康效应的环境毒物暴露的生物标志物方面很有潜力。与此同时,癌细胞的全基因组通常呈低甲基化状^[1]。各类研究还证实了环境化学物质的暴露会引起包括 DNA 甲基化改变在内的表观遗传修饰。目前,研究表明,异常的 DNA 甲基化状态作为一种表观遗传机制和持久性有机污染物暴露造成的疾病之间具有紧密联系^[2~4],人群血液中的某些持久性有机污染物的水平和全基因组 DNA 甲基化水平存在明显的负相关关系^[5]。

焦磷酸测序法(Pyrosequencing)是近年来研究全基因组 DNA 甲基化水平的最常用的方法。利用该方法测定在人类基因组中大量存在且 DNA 甲基化高发的重复元件 Alu 和 LINE-1(Long interspread nucleotide element)的甲基化率,以它们的甲基化水平代表人类基因组 DNA 甲基化的总体水平^[6]。但是该方法得到的不是严格意义上的全基因组 DNA 甲基化率,并不能精确反映全基因组 DNA 甲基化水平的实际情况。Sss I 甲基转移酶法^[7]和免疫化学法^[8]也有部分应用,但是它们的检测灵敏度较低且结果不够精确。高效液相色谱法(HPLC)能够准确定量测定基因组整体的 DNA 甲基化水平,并可用于高通量混合样本检测,能够明确显示目的片段中所有 CpG 位点甲基化的情况^[9]。但是受紫外检测器本身灵敏度的限制,该法对于 DNA 含量较低的生物样品的分析不够理想。本研究组最近采用串联质谱作为检测器,测定了 3 种细胞系以及人类精子样本的全基因组 DNA 甲基化率^[10]。本研究在以前的基础上改进了液相色谱-串联质谱法,使用酶将 DNA 水解为单核苷,快速高效,易于操作,使用的四级杆线性离子阱质谱具有很高的灵敏度和精密度,能检测到极微量的目标核苷,不仅适用于大批量样品的 DNA 甲基化率检测,而且能够对含痕量 DNA 的生物样本,如血浆进行全基因组 DNA 甲基化率的精确测定。

2011-11-07 收稿,2012-03-05 接受

本文系中国科学院知识创新工程重要方向项目(No.KZCX2-EW-QN408)、"百人计划"项目和厦门市科技项目(No.3502Z20112017)资助

* E-mail: jzhang@iuc.ac.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-20AD 液相色谱(日本岛津公司) 3200 QTRAP 串联质谱(美国 ABI 公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD 公司)。生物安全柜(海尔公司); 倒置显微镜(上海长方光学仪器); CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司); 恒温水浴锅(上海梅香仪器); 离心机(德国 Hettich 公司); 含 L-谷氨酰胺和丙酮酸钠的 DMEM 高糖型培养基, 胎牛血清, 青霉素链霉素溶液(10000 units/mL 青霉素, 10000 mg/L 链霉素), 胰蛋白酶-EDTA 消化液(南京凯基生物科技发展有限公司); 杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS), 全氟辛烷磺酸(Perfluorooctane sulfonate, PFOS, 纯度 98%, 日本东京化学工业有限公司); DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司); RNase A (天根生化(北京)科技有限公司); DNase I (RNase-free), FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Exonuclease I (加拿大 Fermentas 公司); 脱氧胞嘧啶核苷(2'-Deoxycytidine, dC, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 5'-甲基脱氧胞嘧啶核苷(2'-deoxy-5-methylcytidine, 5-mdC, 日本东京仁成工业株式会社); 甲醇(色谱纯, 美国 Honeywell 公司)。

2.2 标准溶液的配制

分别精确称取 1 mg 2'-Deoxycytidine (dC) 和 2'-Deoxy-5-methylcytidine (5-mdC), 用超纯水定容至 1 mL。分别取适量两种标准溶液, 以体积比 1:1 混合后, 用超纯水稀释得到 0.2、0.1、0.05 和 0.01 mg/L 的混合标样。

2.3 L-02 细胞培养及 PFOS 处理

用含 10% (V/V) 胎牛血清及 1% (V/V) 青霉素链霉素的 DMEM 高糖型培养液(含 L-谷氨酰胺和丙酮酸钠)于 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。待细胞生长至 90% 密度时, 用胰蛋白酶-EDTA 消化液消化, 传代。实验时取生长状况良好的对数生长期细胞。

用甲醇配制浓度为 10、25 和 50 g/L 的 PFOS 储存液, 4 °C 保存。临用时用 DMEM 高糖型培养液稀释千倍, 使甲醇浓度为 1%。根据实验设计分组, 每组设 3 个平行实验。待细胞生长满培养皿 80% 时进行药物处理。用培养液稀释 PFOS 储备液, 使 PFOS 的浓度分别为 10、25 和 50 mg/L, 另设甲醇浓度为 1% 的对照组。置于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的二氧化碳培养箱中进行静置培养 72 h。

2.4 人血浆样本

血浆样本包括 10 例病例样本和 10 例对照样本。病例样本来源于厦门大学附属中山医院通过病理诊断确诊的新发原发性肝细胞型癌(Hepatocellular carcinoma, HCC) 病例, 对照样本是在医院接受治疗的除肝、胃肠、肺或头颈癌症(与吸烟有关的癌症)之外病人的健康非血缘亲属, 尤其是配偶。对照样本的纳入标准, 除对照没有病例所患癌症之外, 其他与病例均相同。每位调查对象抽取 5 mL 静脉血, 病例和对照均为空腹采血, 由专业护士采集。5 mL 含抗凝剂的血液经 3000×g 离心 8 min, 然后吸取上层血浆, 置入 1.5 mL 离心管, 署名编号登记, 于 -80 °C 保存待用。

2.5 DNA 的提取和酶解

2.5.1 L-02 细胞 DNA 提取 弃去加药培养 72 h 的细胞培养液, 用 DPBS 缓冲液清洗后, 用细胞刮子刮下细胞, 收集于 1.5 mL 离心管中。采用 DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN) 试剂盒提取 DNA。提取流程遵照试剂盒说明书。由于 tRNA 和 rRNA 中都含有 5-mdC, 所以样品过试剂盒提供的分离柱前需加入 RNase A, 以免干扰实验结果。提取后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检验提取结果。

2.5.2 人血浆 DNA 的提取 取 100 μL 人血浆样本, 再加 100 μL DPBS。采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN) 试剂盒提取 DNA。样品过试剂盒提供的分离柱前需加入 RNase A, 以除去 RNA 的干扰, 提取流程遵照试剂盒说明书。

2.5.3 DNA 的酶解 参照文献[11]的方法, 1 μg DNA 样本在 100 °C 下加热 3 min, 然后冰浴 10 min; 加入 1/10 体积的 0.1 mol/L 醋酸铵(pH 7.5); 依次加入 2 units DNase I, 37 °C 孵育 3 h; 2 units Alkaline Phosphatase, 37 °C 孵育 3 h; 40 units Exonuclease I, 37 °C 孵育过夜以保证酶解完全。酶解后再进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检验酶解结果。

2.6 液相色谱-串联质谱检测

色谱柱采用 kinetex C₁₈ 柱(100 mm×4.60 mm 2.6 μm, 平均孔径 100, 美国 Phenomenex 公司); 流速为 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 20 μL; 流动相 A: 超纯水; 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序: 0 ~ 0.01 min 3% B, 0.01 ~ 5.00 min 5% B, 5.00 ~ 12.00 min 50% B。

串联质谱采用电喷雾电离源; 正离子扫描; 多反应检测模式(MRM); 离子对为 m/z 228.1/111.9 (dC) 和 242.1/126 (5-mdC); 驻留时间为 100.0 ms。毛细管电喷雾电压 4000.0 V; 源温 400 °C; 气帘气 CUR(N₂) 15.0; 碰撞气 CAD(N₂) Medium; GS1 45.0 L/h; GS2 40.0 L/h; 去簇电压 DP 40.0 V; 入口电压 EP 3.0 V; 碰撞能量 15.0 eV; 碰撞池出口电压 2.0 V。

2.7 全基因组 DNA 甲基化率的计算与统计分析

按实验方法制备标准溶液, 按外标法计算样品中胞嘧啶核苷和 5-甲基胞嘧啶核苷的浓度, 并根据下式计算全基因组 DNA 甲基化率(MR):

$$MR = 100\% \times C_{5\text{-mdC}} / (C_{5\text{-mdC}} + C_{\text{dC}}) \quad (1)$$

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。L-02 细胞各组 DNA 甲基化水平采用单因素方差分析法(One-way ANOVA) 进行比较。病例组和对照组的人血浆样本 DNA 甲基化水平采用独立样本 t 检验法(t-test) 进行比较。

3 结果与讨论

3.1 DNA 提取及酶解结果对比

由于该液相色谱-串联质谱法测定结果的准确度源于 DNA 必须完全分解为单个的核苷酸, 因此为验证试剂盒提取生物样本 DNA 以及酶解 DNA 片段的效果, 对酶解前后的 DNA 样本进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以检验提取和酶水解 DNA 的效果。电泳结果见图 1。经过酶解后, DNA 片段基本上完全水解为单核苷。由于人血浆样本中的游离 DNA 含量极低, 因而即使是在 DNA 酶解前也不能在凝胶上显示出条带, 这也提示要对血浆中的游离 DNA 进行提取和分析检测的难度之大, 需要更精密的仪器和先进的检验方法。

3.2 液相色谱-串联质谱条件的优化

采用针泵连续进样, 在正离子模式下, 分别对 1 mg/L 的标准溶液进行母离子全扫描, 确定其分子离子, 优化各分子离子的锥孔电压。分别以上述离子为母离子, 对其子离子进行全扫描。选取其中信号较强、干扰较小的子离子与母离子组成监测离子对, 以 MRM 模式优化去簇电压、碰撞气能量、入口电压、碰撞池出口电压等各种质谱参数(见 2.6 节)。实验中所需要分离的核苷为强亲水性的弱碱性物质, 在 C₁₈ 柱上不易保留。对乙腈-水、甲醇-水、酸化甲醇-甲酸溶液等流动相组合进行了考察, 结果发现乙腈-水的洗脱能力过强, 核苷难以在柱上获得合适的保留, 酸化甲醇-甲酸溶液会导致信号强度的降低。相比之下, 以甲醇-水作为流动相时得到的峰形最好, 信号强度最高。如图 2a 所示, 当流动相流速为 0.5 mL/min, 梯度洗脱条件为 8 min, 5% ~ 50% 甲醇时, dC 与 5-mdC 可以完全分离。

3.3 检出限与定量限

逐步稀释标准品进行测试, 以信噪比为 3 和 10 的要求确定脱氧胞嘧啶核苷的检出限(LOD) 和定量限(LOQ) 分别为 0.017 和 0.05 μg/L, 脱氧甲基胞嘧啶核苷的检出限(LOD) 和定量限(LOQ) 分别为 0.07 和 0.2 μg/L。

3.4 定量标准曲线与回收率

配制浓度为 0.025, 0.25 和 0.5 mg/L 的脱氧胞嘧啶核苷和浓度为 0.25, 2.5 和 12.5 μg/L 的脱氧甲基胞嘧啶核苷, 每个浓度均配制 5 份, 依照实验方法进行回收率测定。定量标准曲线和回收率测定结果见表 1。

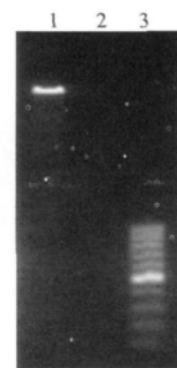


图 1 DNA 提取及酶解结果对比: (1) 从细胞中提取出的 DNA (2) 酶解后的 DNA (3) DNA 标记

Fig. 1 Contrast of results of DNA extraction and DNA digestion by enzymes: (1) DNA extracted from cells, (2) DNA digested by enzymes, (3) Marker: 100 bpDNA Ladder

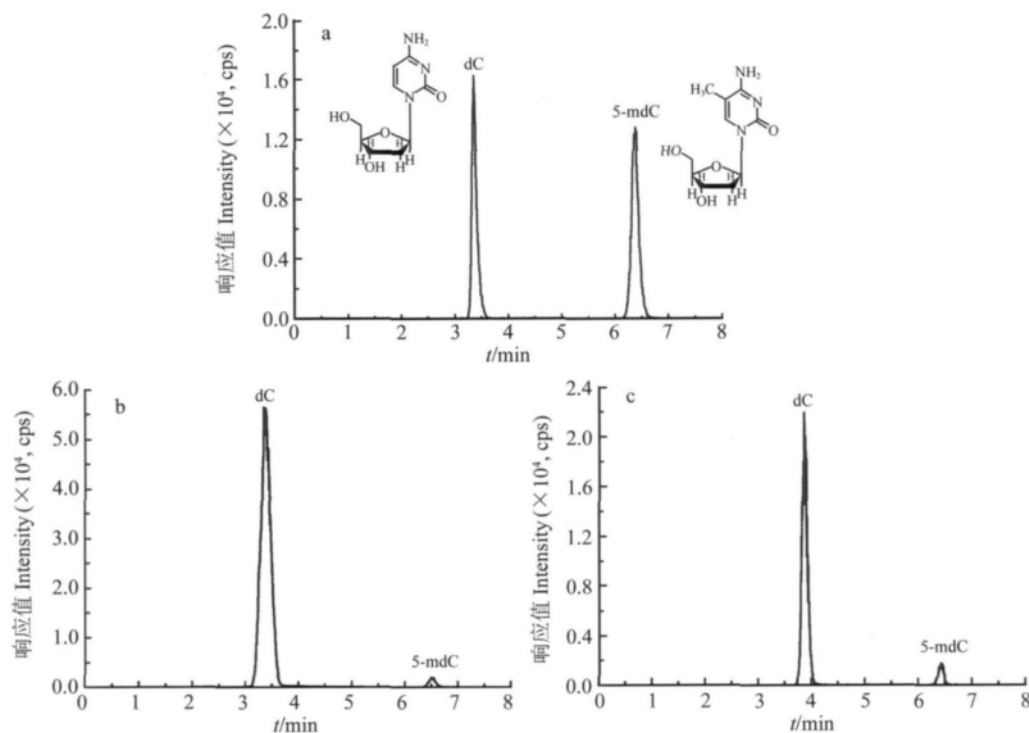


图 2 脱氧胞嘧啶核苷和脱氧甲基胞嘧啶核苷标准品 (a), L-02 细胞 DNA 样品 (b) 和入血清 DNA 样品 (c) 的色谱图

Fig. 2 Typical chromatograms of 2'-deoxycytosine and 2'-deoxy 5-methylcytosine in Standard samples (a), DNA sample of normal human liver cell L-02 (b) and DNA samples of human plasma (c)

表 1 定量标准曲线与回收率测定

Table 1 Linear equations and correlation coefficients and results of recovery of 2'-deoxycytosine and 2'-deoxy-5-methylcytosine

样本 Sample	平均回收率 Average recovery (% , n=5)			线性方程 Linear equation ^a	相关系数 Correlation coefficients (R ²)
dC	0.025 (mg/L) 104.0±4.6	0.25 (mg/L) 85.5±8.0	0.5 (mg/L) 96.33±3.87	Y=0.0018X	0.9998
5-mdC	0.25 (μg/L) 115.6±20.1	2.5 (μg/L) 99.9±5.9	12.5 (μg/L) 88.5±6.4	Y=0.0009X	0.9990

^a Y: 浓度 (Concentration, mg/L); X: 色谱峰面积 (Peak area, ×10⁴).

3.5 方法应用

3.5.1 L-02 细胞样品分析 全氟辛烷磺酸 (Perfluorooctane sulfonate, PFOS) 是新型的持久性有机污染物, 在多种环境介质、生物体和人体中被检出, 并呈现出全球广泛分布的趋势。PFOS 具有明显的生物富集性, 会对实验动物造成肝脏毒性^[12]、神经毒性^[13]、胚胎发育^[14]与生殖毒性^[15]等不良健康效应。目前, 关于 PFOS 对生物表观基因组影响的了解尚不多。在本研究中, 选用人正常肝细胞 L-02 作为研究对象, 用含不同浓度的 PFOS 的培养液培养 72 h 后, 提取细胞 DNA, 利用发展的液相色谱串联质谱法测定各样本中 dC 和 5-mdC 的含量, 以评估 PFOS 暴露对 L-02 肝细胞中全基因组 DNA 甲基化水平的影响, 典型色谱图见图 2b。对照组的全基因组 DNA 以及 PFOS 浓度为 10, 25 和 50 mg/L 的甲基化率见表 2。与对照组相比, PFOS 暴露组细胞全基因组 DNA 甲基化率均显著降低 (p<0.05), 可见 PFOS 对 L-02 细胞全基因组 DNA 具有一定去甲基化作用。相关的实验动物研究也显示, PFOS 会降低全基因组的 DNA

表 2 PFOS 作用后 L-02 细胞全基因组 DNA 甲基化率的变化

Table 2 Changes of global DNA methylation ratio of normal human liver cell L-02 after treated by PFOS

甲基化率 Methylation ratio (%)	PFOS Concentration			
	对照组 Control	10 (mg/L)	25 (mg/L)	50 (mg/L)
	2.824±0.129	1.792±0.152	1.343±0.025	1.570±0.235

甲基化率, 例如, Wan 等^[16]发现被饲养了 2.0 mg/(kg·d) PFOS 的母鼠后代的全基因组甲基化水平

(LINE-1 基因甲基化率)和 LINE-1 基因调控区域的甲基化水平相比对照组显著降低。这与本研究得到的 PFOS 对细胞模型的去甲基化效果结论一致。

3.5.2 人血浆样品分析 绝大多数研究使用基于聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的方法研究血浆或血清 DNA 单基因启动子区甲基化的变化,通过提取血浆中的 DNA 进行全基因组 DNA 甲基化水平分析的报道较少。到目前为止,尚未发现有利用液相色谱-串联质谱联用法测定血浆的全基因组 DNA 甲基化率的报道,这可能与血浆这种无细胞生物样本中的游离 DNA 的含量极低以至于较难提取和检测有很大关系。本研究收集了 10 例 HCC 病例和 10 例对照病例的血浆样品,利用液相色谱串联质谱法(LC/MS)对其 DNA 总甲基化率进行了测定,典型色谱图见图 2c。表 3 显示了 HCC 组和对照组的 DNA 总甲基化率, HCC 组血浆 DNA 甲基化率为 $3.067\% \pm 0.569\%$, 对照组血浆 DNA 甲基化率为 $2.481\% \pm 0.526\%$, 病例组全基因组甲基化水平显著高于对照组($p < 0.05$)。该实验结果与文献 [1] 报道的肿瘤发生时基因组整体甲基化水平降低的观点并不相符。但是,考虑到血浆样本为无细胞体系这一特

质,血浆样本的 DNA 总甲基化水平及其在癌症患者中的变化很可能与其他生物样本大不相同。此外,在各种肿瘤与非肿瘤的生物样本中,代表全基因组 DNA 甲基化水平的 LINE-1 基因甲基化率事实上存在着高度差异性^[17]。Aparicio 等^[18]利用焦磷酸测序法测定了肿瘤病人的血浆、外周血单核细胞、颊黏膜细胞和唾液中 LINE-1 基因的甲基化率,发现其中血浆样本的 LINE-1 甲基化率最高。也就是说,不同种类癌症中以及不同生物样本中,全基因组 DNA 甲基化率及其变化具有较大差异性。以上结果表明,血浆样本的 DNA 总甲基化水平亟待进行深入研究和探讨。本研究采用液相色谱-串联质谱联用技术成功测定了血浆样本中 dC 和 5-mdC,为血浆全基因组 DNA 甲基化水平的研究提供了一个先例和新思路。

4 结 论

本研究建立了基于液相色谱-电喷雾串联质谱的生物样品中基因组 DNA 总甲基化水平分析方法。在生物样品中提取的总 DNA 经过完全酶解后,注入进行 LC/MS 分析,通过测定胞嘧啶和甲基胞嘧啶的浓度可计算获得基因组 DNA 总甲基化水平。利用此方法测定了 L-02 细胞系在 PFOS 胁迫作用前后基因组 DNA 总甲基化水平的变化,初步证明了 PFOS 对 L-02 细胞全基因组 DNA 甲基化水平有一定影响。而且,利用发展的方法对原发性肝癌患者和对照组的血浆中痕量 DNA 总甲基化率进行了测定,发现两组的甲基化率存在着显著差异,提示在实际人体当中全基因组 DNA 甲基化水平与肝癌的发生和发展具有紧密联系。本方法具有良好的选择性、灵敏度和稳定性,适用性广泛,且操作简便,不但适合含有高丰度 DNA 的细胞系、组织等生物样品中 DNA 甲基化率的测定,还适用于血浆等含极低浓度 DNA 的生物样本中的全基因组 DNA 甲基化率的分析。

References

- 1 Esteller M. *Nature Reviews Genetics*. ,2007 ,8: 286 ~ 298
- 2 Balada E , Ordi-Ros J , Vilardell-Tarres M. *Ann. N Y Acad. Sci.* ,2007 ,1108: 127 ~ 136
- 3 LIU Shu-Na , TU Yun-Qiu , LI Wen , WU Ping , ZHANG Hui , CAI Chen-Xin. *Chinese J. Anal. Chem.* , 2011 , 39(9) : 1451 ~ 1458
刘姝娜,屠蕴秋,李文,吴萍,张卉,蔡称心. *分析化学* 2011 , 39(9) : 1451 ~ 1458
- 4 Wilson A S , Power B E , Molloy P L. *Biochim. Biophys. Acta* ,2007 ,1775(1) : 138 ~ 162
- 5 Rusiecki J A , Baccarelli A , Bollati V , Tarantini L , Moore L E , Bonfeld-Jorgensen E C. *Environ. Health Perspect.* , 2008 , 116: 1547 ~ 1552
- 6 Yang A S , Estecio M R H , Doshi K , Kondo Y , Tajara E H , Issa J P J. *Nucleic Acids Res.* ,2004 ,32(3) : e38
- 7 Wu J , Issa J P , Hermen J , Bassett D E , Nelkin B D , Baylin S B. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* ,1993 ,90(19) : 8891 ~

8895

- 8 Oakeley E J , Podesta A , Jost J P. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* , **1997** , 94: 11721 ~ 11725
- 9 Kuo K C , McCune R A , Gehrke C W , Midgett R , Ehrlich M. *Nucleic Acids Res.* , **1980** , 8: 4763 ~ 4776
- 10 Wang X L , Suo Y S , Yin R C , Shen H Q , Wang H L. *J. Chromatogr. B* , **2011** , 897(19) : 1647 ~ 1652
- 11 Friso S , Choi S W , Dolnikowski G G , Selhub J. *Anal. Chem.* , **2002** , 74(17) : 4526 ~ 4531
- 12 Du Y B , Shi X J , Liu C S , Yu K , Zhou B S. *Chemosphere* , **2009** , 74(5) : 723 ~ 729
- 13 Johansson N , Fredriksson A , Eriksson P. *Neurotoxicology* , **2008** , 29(1) : 160 ~ 169
- 14 Shi X J , Liu C S , Wu G Q , Zhou B S. *Chemosphere* , **2009** , 77(7) : 1010 ~ 1018
- 15 Ankley G T , Kuehl D W , Kahl M D , Jensen K M , Linnum A , Leino R L , Villeneuve D A. *Environ. Toxicol. Chem.* , **2005** , 24(9) : 2316 ~ 2324
- 16 Wan Y J , Li Y Y , Wei X , Chen C , Lv Z Q , Zeng H C , Zhang L , Yang W J , Chen T , Lin Y , Wei J , Xu S Q. *Toxicology* , **2010** , 274(1-3) : 57 ~ 64
- 17 Chalitchagorn K , Shuangshoti S , Hourpai N , Kongruttanachok N , Tangkijvanich P , Thong-ngam D , Voravud N , Sriuranpong V , Mutirangura A. *Oncogene* , **2004** , 23(54) : 8841 ~ 8846
- 18 Aparicio A , North B , Barske L , Wang X M , Bollati V , Weisenberger D , Yoo C , Tannir N , Horne E , Groshen S , Jones P , Yang A , Issa J P. *Epigenetics* , **2009** , 4(3) : 176 ~ 184

Determination of Global DNA Methylation in Biological Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

PENG Si-Yang , ZHANG Jie* , TIAN Mei-Ping , WANG Zhan-Lin , SHEN He-Qing

(Key Lab of Urban Environment and Health , Institute of Urban Environment ,
Chinese Academy of Sciences , Xiamen 361021 , China)

Abstract A method based on liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS) was developed to determine global DNA methylation level in biological samples. DNA was extracted from biological samples and digested by three enzymes into single nucleotides. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was used to measure the concentrations of 2′-deoxycytidine and 2′-deoxy-5-methylcytidine respectively , so as to calculate the global DNA methylation ratios. The developed method was further used to explore the global DNA methylation level in normal human liver cell L-02 exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and plasma samples from 10 hepatocellular carcinoma patients and 10 control cases. This approach has high sensitivity and stability , and is easy to operate , enabling us to analyze the global DNA methylation level in various biological samples , especially those valuable samples (such as serum , plasma etc.) with extremely low concentration of DNA.

Keywords Deoxyribonucleic acid methylation; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Plasma; Cell; Perfluorooctane sulfonate

(Received 7 November 2011; accepted 5 March 2012)