DNA损伤检测技术研究进展

王艺[1] 刘笑[2] 欧阳旺[1] 刘松柏[1] 朱清[3]
1. 苏州卫生职业技术学院 江苏 苏州 215009；
2. 苏州科技大学化学与生命科学学院 江苏 苏州 215009；
3. 苏州吴中区长桥人民医院 江苏 苏州 215000

摘 要 DNA作为遗传信息的载体，每日遭受约10^4次内源性与外源性损伤攻击，其损伤累积与衰老、神经退行性疾病、癌症等直接相关。精准检测DNA损伤对于疾病机制研究、环境毒理学评估及靶向药物开发至关重要。本文系统综述DNA损伤检测技术，依据信号模式（直接/间接）与检测层级（碱基—核苷酸—链）进行分类，评述相关技术的原理、性能参数、优势与局限性，重点讨论多技术联用策略，为研究者提供方法学选择依据。

关键词 DNA损伤；碱基损伤；DNA链断裂；DNA损伤检测技术

DNA作为遗传信息的核心载体，其结构的完整性对维持生命活动至关重要。然而，内源性与外源性因素每日可引发约10^4次DNA损伤，这些损伤的积累与衰老、癌症等多种疾病密切相关。因此，发展精准、高效的DNA损伤检测技术，对于揭示疾病机制、评估环境风险及推动靶向治疗具有重要意义。本文旨在系统综述当前DNA损伤检测技术的原理、进展与应用，以期为相关研究提供方法学参考。

1 DNA损伤直接检测法

DNA损伤直接检测法通过化学修饰、酶促反应或物理分离直接识别DNA损伤位点结构改变，聚焦于损伤结构本身。根据识别靶标的不同，分为碱基、核苷酸与链损伤3个层级。

1.1 碱基损伤检测方法

碱基损伤检测方法主要分为4类：核酸扩增类（PCR）、同位素标记类（^{32}P后标记）、免疫识别类（ELISA/IMF）和物理分析类（质谱、微流控、纳米探针等）。针对DNA碱基损伤的检测法可以评估细胞对内外源性因素的暴露水平，为修复机制研究与疾病风险预测提供分子依据。

1.聚合酶链式反应（PCR）。基于长片段PCR（LA-PCR）技术优化出了Damage-sensing PCR（dsPCR），其原理是碱基损伤会阻碍DNA聚合延伸，使下游序列无法有效扩增，导致扩增信号降低。该方法适用于检测阻碍DNA聚合酶延伸的损伤，如UV、顺铂和BPDE等诱导的聚合酶阻断性损伤。该方法适用于高通量筛选，自动化程度高，能够测量特定位点的修复活性，但其灵敏度受片段长度限制。结合数字PCR（ddPCR）与酶切预处理（如UDG/APE1），可进一步提升检测特异性与定量精度[1]。

2.^{32}P后标记法。^{32}P后标记法是一种检测和定量组织DNA中氧化损伤标志物8-oxo-dG与碱基加合物的方法。该方法的原理是先将DNA消化为3'-单磷酸核苷，利用T4多核苷酸激酶与[γ-^{32}P]ATP标记其末端，生成5'端带有^{32}P标记的二磷酸核苷。再经P1核酸酶转化后，产物通过色谱分离，放射自显影检测损伤斑点。通过在^{32}P标记前利用TLC富集8-oxo-dGp等优化手段，可提高检测灵敏度并降低背景干扰。该方法的优点是灵敏度高（可检测10^6核苷酸中少于1个8-oxo-dG），操作相对简便，但需专业设备且存在放射性污染风险。

3.金纳米颗粒比色法。该方法利用半胱氨酸稳定的金纳米颗粒的抗聚集作用，基于8-oxo-dG及其寡核苷酸的特异性识别来检测标志物水平。样品不含8-oxo-dG时，寡核苷酸吸附于颗粒表面引起聚集，形成紫色溶液；当目标分子存在时，寡核苷酸特异性结合8-oxo-dG，阻止纳米颗粒聚集，溶液呈现红色。该方法灵敏度高，检出限低至10.3 nM，且操作简单，可通过肉眼观察颜色变化和紫外–可见吸光度测定。尽管该方法对8-oxo-dG显示出卓越的特异性，但对其结构类似物的交叉反应性尚需系统验证。

4.微流控阵列检测（Microfluidic Array）。微流控阵列检测是一种通过化学传感器阵列检测DNA氧化损伤和碱基加合物的方法。该方法将OsPVP/RuPVP与DNA及代谢酶进行逐层结合，在微观尺度上实现对化学反应的精确控制。OsPVP选择性检测DNA链上的氧化鸟嘌呤，而RuPVP检测核苷酸上的代谢物加合物，通过测量电极电流或电压变化确定损伤程度。该方法操作简便、检测速度快（5 min），但电极稳定性与批次一致性需优化。

5.酶联免疫吸附试验（ELISA）与免疫荧光测定（IMF）。ELISA基于抗原与酶标抗体的特异性结合，通过检测样本吸光度反映相关指标。通过引入“夹心法”改良（将待测抗原夹在捕获抗体与检测抗体之间），显著提高了ELISA的灵敏度[2]。在此基础上发展出的免疫荧光测定法（IMF），利用荧光标记抗体可检测DNA氧化损伤产物（如胸腺嘧啶二醇、8-羟基鸟嘌呤），具有特异性强、操作简便、成本低的优点，但依赖特异性抗体，且可能发生交叉反应。

6.质谱。气相色谱−质谱联用（GC-MS）通过对DNA进行衍生化处理，利用GC分离样本中的化合物并通过MS进行鉴定，结合同位素稀释内标实现精确定量[3]，但操作相对复杂。液相色谱−质谱（LC-MS）适用于大分子与极性分子，无须衍生化但分辨率较低。近年来，同位素稀释—液相色谱—串联质谱（ID-LC-MS/MS）已成为该领域的金标准，灵敏度达0.1 fmol。

7.醛反应探针法（ARP Assay）。ARP Assay适用于检测ROS导致的氧化损伤，其原理是：DNA糖基化酶移除损伤的碱基后产生含醛基的AP位点，ARP试剂与其反应形成生物素标记产物，通过类ELISA技术进行显色定量。该方法灵敏度高且操作简便，但缺乏区分不同损伤类型的能力。至此，碱基损伤的直接检测策略已覆盖从信号放大到分子定量的多维度技术。

1.2 核苷酸损伤检测方法

碱基位点脱落（AP位点）是因N-糖苷键断裂导致碱基脱落而形成的DNA核苷酸损伤。AP位点是碱基切除修复（BER）通路的核心中间体，其累积水平可反映修复效率与损伤负荷的平衡。因此，针对此类核苷酸层级损伤的检测需采用特定策略。

1.共价反应探针法。共价反应探针法的原理是基于AP位点互变异构体（水合结构、开链醛型与半缩醛型），使用共价反应探针通过缩合反应标记脱碱基位点[4]。根据标记分子不同，可采用荧光/电化学基团直接检测或通过生物素—亲和素相互作用间接检测。该方法标记稳定，但化学修饰可能影响DNA的天然构象。

2.非共价反应探针法。非共价探针基于AP位点破坏DNA双螺旋的特性，通过弱相互作用（氢键、范德华力）补偿结构缺陷，利用探针信号变化实现检测。Barton等设计的电活性非共价探针雷德蒙红，可在金电极表面产生稳定可逆电流信号，无须共价标记，成本较低且适用性广，但结合能力相对较弱，灵敏度相对较低。

1.3 DNA链损伤检测方法

DNA链损伤主要包括DNA单链断裂、双链断裂及DNA交联等。研究DNA链损伤检测方法有助于揭示细胞应激适应机制以及疾病发生过程，本小节对此展开讨论。

1.彗星实验（Comet Assay）。彗星实验将细胞悬液与琼脂糖混合形成凝胶，裂解后电泳，断裂的DNA片段迁移形成拖尾的“彗星”图像。通过测量DNA迁移部分的光密度或尾部长度，可半定量DNA损伤程度。该方法适用范围广（所有真核细胞），但操作复杂、耗时长且结果分析主观性强。AI驱动的Comet Analyzer软件已将分析效率提升100倍，标志着单细胞检测进入高通量时代[5]。

2.修复辅助损伤检测（RADD）。RADD法利用DNA聚合酶将荧光标记核苷酸填入DNA损伤缺口，通过荧光显微镜量化损伤。该方法灵敏度高，可检测基础损伤水平与修复速率，但成本高且实验周期长。RADD与DNA折纸技术结合实现的单碱基分辨率图谱，为进一步解析损伤位点邻近序列效应开辟了新路径。

3.TUNEL检测。末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）介导的dUTP缺口末端标记法（TUNEL），利用TdT将标记的dUTP共价连接至双链断裂的3'末端，通过检测标记物的荧光信号定位DNA断裂位点。该方法速度快、可定量，但操作步骤复杂，可能产生假阳性。

4.碱性洗脱分析。碱性洗脱分析基于断裂的单链DNA更易被碱性溶液洗脱，通过测定样本洗脱速率可定量分析DNA断裂与修复情况。该方法可实时动态监测DNA损伤并进行可重复性定量，但需严格控制洗脱条件。

5.碱性蔗糖梯度检测。该技术利用DNA在碱性条件下的沉降速度与其分子量和构象密切相关，通过线性蔗糖梯度离心分离DNA，借助放射性示踪法分析DNA的沉降分布，从而推断DNA单链断裂情况。该方法分辨率高，但仅能检测单链断裂，通量低且易受DNA聚集现象干扰。

6.Southern blot分析。Southern blot分析通过限制性酶切、凝胶电泳与探针杂交检测DNA双链断裂，可定位断裂位点并定量。该方法特异性高，但步骤烦琐，目前主要用于基因编辑脱靶验证，正逐渐被NGS技术取代。

7.核酸完整性分析。核酸完整性分析（NLA）是基于二维特异性电泳技术（2D-SDE）评估复杂核酸样品质量和监测分子程序效率的方法。通过使用Mbo I酶对DNA样品进行处理，首维按构象分离DNA，次维按长度分离，使样本形成独特的迁移

模式，从而识别DNA损伤类型。该方法快速且成本较低，但对低丰度DNA损伤不敏感，且技术要求较高。

2 DNA损伤间接检测法

DNA损伤间接检测法通过测定细胞损伤应激蛋白标志物与修复基因的表达水平来评估DNA损伤，反映细胞对损伤的功能性应答。

2.1 染色质分散试验（CDT）

CDT法通过观察DNA断裂后形成的环状染色质光晕来量化DNA损伤。该方法操作更简便，但灵敏度低、特异性差，无法区分损伤类型，常需与其他损伤检测技术联用。

2.2 γ-H_2AX免疫检测技术

γ-H_2AX是组蛋白H2AX在Ser139位点磷酸化的产物，是DNA双链断裂（DSB）的核心标志物。DNA双链断裂将H2AX磷酸化为γ-H_2AX，形成显微镜下可视的离散灶点。该方法敏感且特异性高，但无法区分生理性DSB（如V(D)J重组）与病理性损伤，且灶点计数依赖于阈值设定。

3 结束语

DNA损伤检测技术有助于深入理解细胞应激适应机制，揭示疾病发生过程，评估环境致突变因素，指导环境保护和职业安全，推动生物技术与核医学的进步。目前，该类技术正经历从群体平均到单细胞精准、从静态终点到动态过程、从体外分析到活体监测的深刻变革。当前技术瓶颈主要包括灵敏度与通量难以兼顾、空间信息缺失及标准化不足。

未来突破方向包括：①多技术联用：如质谱提供化学结构信息，彗星实验反映单细胞损伤，γ-H_2AX指示修复应答，三者结合可实现损伤—响应—修复全流程解析。②智能化与自动化：AI驱动的图像分析（如Comet Analyzer）可极大提升分析效率；微流控芯片可实现样本制备、反应、检测一体化，降低人为误差。③临床转化：基于cfDNA损伤标志物的液体活检已用于癌症早筛，非侵入性活体监测技术（如皮肤贴片传感器）是未来重要发展方向。④标准化建设：欧洲DNA损伤研究网络（hCOMET）正推进标准操作流程（SOP）建设，推荐使用标准细胞株和AI辅助分析。

参考文献

[1]张静,吉旭瑶,迟伟群,等.数字聚合酶链反应技术在DNA甲基化检测中的应用[J].检验医学与临床,2025,22(19):2732-2736.

[2]梁羽,吴薇.基于高通量测序的DNA损伤及修复检测技术研究进展[J].遗传,2024,46(10):779-794.

[3]田国力,周卓,郭静,等.气相色谱-质谱联用技术在遗传代谢性疾病诊断中的应用[J].检验医学,2019,34(10):932-936.

[4]陈晓琳.用于检测DNA中异常碱基的荧光探针设计及其机理[D].济南:山东师范大学,2025.

[5]杨东平,张美辨,何继亮.彗星试验对4种化学物质诱导人淋巴细胞DNA损伤的检测[J].环境与健康杂志,2003(1):6-9.

（本文编辑　杜宇琪）

