

# 串联质谱用于 RNA 表观遗传修饰的定量表征研究

## LCMSMS-680

**摘要：**使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL，建立了临床组织样本中腺苷（A），N6-甲基腺嘌呤（m6A）及 N6,2'-O-二甲基腺苷（m6Am）同时测定方法，使用标准品进行了方法的线性及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，校准曲线相关系数均大于 0.998，RSD 在 2.8%~4.9% 之间，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于 RNA 表观遗传修饰的定量表征研究。

**关键词：**串联质谱 表观遗传 RNA 甲基化 肿瘤

RNA 修饰是表观遗传学中调控转录后基因表达的关键过程，其中 RNA 甲基化是其重点研究之一，目前对 m6A RNA 甲基化的研究已全面展开，但除了 m6A 以外仍有多种热门 RNA 修饰类型参与调控转录后的基因表达。RNA 甲基化是指在甲基转移酶的催化下，RNA 的甲基腺嘌呤被选择性的添加甲基基团的化学修饰现象，主要形式为 m6A 甲基化。m6A 甲基化修饰是可逆化的，包括甲基化转移酶（Writers）、去甲基化酶（Erasers）和甲基化阅读蛋白（Readers）等共同参与。迄今为止，已有 160 多种 RNA 修饰被发现，真核生物中除了最常见的 m6A 修饰以外，科学家也发现了一种位于真核生物 mRNA 5'帽端的 RNA 可逆修饰 m6Am，即在 m6A 修饰的基础上，同一个

腺苷酸残基的核糖的 2' 羟基也被甲基化，产生 2' 甲氧基结构（2'-O-CH<sub>3</sub>）。研究发现 m6Am 修饰在 50-80% 的哺乳动物中都存在，并在细胞生命过程中通过影响 mRNA 的蛋白翻译效率发挥重要作用。RNA 修饰与人类的发育，免疫，肿瘤生成和转移，干细胞更新，脂肪分化等过程息息相关，而 RNA 甲基化研究是 RNA 修饰研究热点，已有研究显示，RNA 甲基化与癌症的发生、发展、和药物应答等密切相关。

本文使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL，建立了临床组织样本中腺苷（A），N6-甲基腺嘌呤（m6A）及 N6,2'-O-二甲基腺苷（m6Am）同时测定方法，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于 RNA 表观遗传修饰的定量表征研究。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用临床质谱 LCMS-8045 CL 联用系统。具体配置为：

输液泵：	LC-40D XR CL×2	在线脱气机：	DGU-405 CL
自动进样器：	SIL-40C XR CL	柱温箱：	CTO-40C CL
系统控制器：	CBM-40 CL	软件版本：	Labsolutions Ver.1.30

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm)  
P/N: 227-30807-02, 岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液；B 相为 0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：0.4 mL/min

柱温：45°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 0%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.5	泵	B.Conc	0
2.00	泵	B.Conc	95
3.00	泵	B.Conc	95
3.10	泵	B.Conc	0
7.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器：	LCMS-8045 CL	DL 温度：	150℃
离子源：	ESI (+)	加热模块温度：	400℃
雾化气流速：	3.0 L/min	离子源温度：	300℃
干燥气流速：	10.0 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
加热气流速：	10.0 L/min	MRM 参数：	见表 2

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
A	268.1	136.1*	-14	-55	-27
		119.1	-14	-30	-23
m6A	282.1	150.1*	-14	-30	-29
		123.1	-14	-42	-23
m6Am	296.1	150.1*	-15	-44	-29
		123.1	-15	-42	-26

注：\* 为定量离子

1.3 校准曲线制备

取 A, m6A, m6Am 标准品, 精密称定, 用水稀释并定容, 得到 1 mg/mL 标准品母液, 再用水稀释成系列校准曲线浓度点。

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

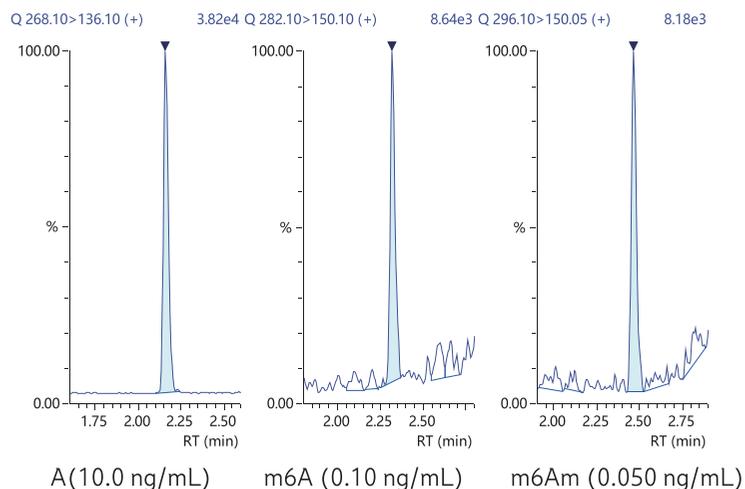


图 1 校准曲线最低点谱图

## 2.2 线性测定结果

对标准品按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法制作校准曲线。校准曲线结果见表 3，A，m6A，m6Am 在校准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.998，准确度在 92.5%~105.5% 之间，满足测定需求。

表 3 校准曲线结果

编号	名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	A	$Y = (6773.88)X + (10719.1)$	10.0~1000	0.9986	92.5~105.5
2	m6A	$Y = (173396)X + (-933.921)$	0.10~10	0.9999	98.2~101.9
3	m6Am	$Y = (80386.9)X + (-3.49764)$	0.050~5	0.9999	99.2~101.5

## 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.2 中的分析条件对校准曲线最低浓度点连续进样测定 6 次，准确度及精密度结果如表 4 所示，结果显示 A，m6A，m6Am 测定结果准确度 98.9%~103.0% 之间，RSD 在 2.8%~4.9% 之间，满足日常测定需求。

表 4 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

项目	C	5mC	5hmC
理论测定浓度	10.0	0.10	0.050
实际测定浓度	9.89	0.103	0.0496
准确度 %	98.9	103.0	99.2
RSD%	2.8	4.9	3.7

## 2.4 实际样品测定结果

取裸鼠细胞皮下移植瘤组织样品，经前处理，按 1.2 中的分析条件进行测定，结果见图 2，该方法可准确定量测定临床组织样品中 A，m6A，m6Am。

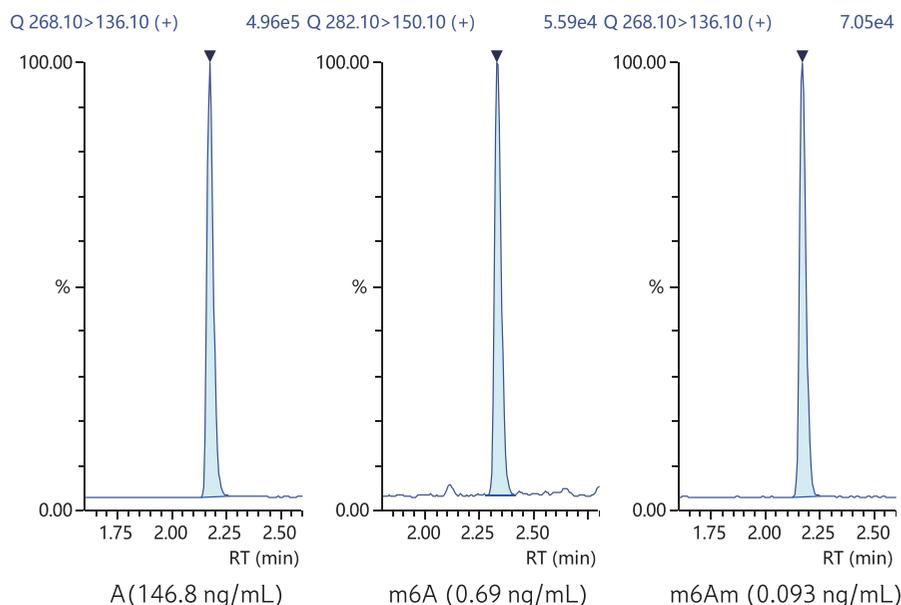


图 2 裸鼠细胞皮下移植瘤组织样品谱图

## ■ 结论

使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL, 建立了临床组织样本中腺苷 (A), N6- 甲基腺嘌呤 (m6A) 及 N6,2' -O- 二甲基腺苷 (m6Am) 同时测定方法, 使用标准品进行了方法的线性及精密度的考察。结果显示该方法线性良好, 校准曲线相关系数均大于 0.998, RSD 在 2.8%~4.9% 之间, 该方法分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 可用于 RNA 表观遗传修饰的定量表征研究。

岛津应用云

