

串联质谱用于 DNA 6mA 甲基化表观遗传修饰的定量表征研究

LCMSMS-925

摘要: 使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL 建立了肿瘤组织中 2'-脱氧腺苷 (dA) 及 N6-甲基-2'-脱氧腺苷 (6mA) 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, 分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 可用于 DNA 6mA 甲基化表观遗传修饰的定量表征研究。

关键词: 串联质谱 表观遗传 DNA 甲基化 6mA

技术特点:

- ❖ 串联质谱用于肿瘤诊断标志物研究。
- ❖ 分析速度快, 5 min 以内完成两个标记物的检测。
- ❖ 灵敏度高, 可实现低至 pg/mL 的检测。

DNA 甲基化是一种被广泛研究的表观遗传修饰方式, 与组蛋白修饰等方式一起, 在调控基因表达和染色质构象等方面发挥了重要作用。N6-甲基-2'-脱氧腺苷 (6mA) 是 6 位 N 被甲基修饰的 DNA 脱氧腺苷 (dA)。研究表明, 包括人、鼠胚胎、果蝇、水稻等真核生物的 DNA 中存在着 6mA 修饰, 如小鼠睾丸和胶质母细胞瘤中检测到了 6mA 的存在, 但不同组织中 6mA 的丰度有较大差异, 6mA 在生长发育和疾病调控中具有重要作用。目前, 检测 6mA

方法主要包括串联质谱、斑点杂交 (dot blot) 以及 DIP-seq 等测序方法。各种检测手段均存在一定局限性, 而串联质谱法以其特异性强、灵敏度高、准确度高等特点, 已成为 6mA 检测的金标准。

本文使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL, 建立了肿瘤组织中 2'-脱氧腺苷 (dA) 及 N6-甲基-2'-脱氧腺苷 (6mA) 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 DNA 6mA 甲基化表观遗传修饰的定量表征研究。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8050 CL 联用系统。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18-120(50 mm×2.1 mm I.D., 3.0 μm)
P/N: 227-31014-03, 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
0.50	泵	B.Conc	0
2.50	泵	B.Conc	95

3.00	泵	B.Conc	95
3.10	泵	B.Conc	0
5.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050 CL	D L 温度：150°C
离子源：ESI (+)	加热模块温度：400°C
雾化气流速：3.0 L/min	离子源温度：300°C
干燥气流速：5.0 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
加热气流速：15.0 L/min	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	dA	252.1	136.1*	-12	-37	-13
		252.1	119.0	-12	-44	-21
2	6mA	266.1	150.1*	-13	-17	-27
		266.1	123.1	-13	-42	-22

注：* 为定量离子对

1.3 校准曲线制备

取 dA, 6mA 标准品，精密称定，用水稀释并定容，得到 1mg/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

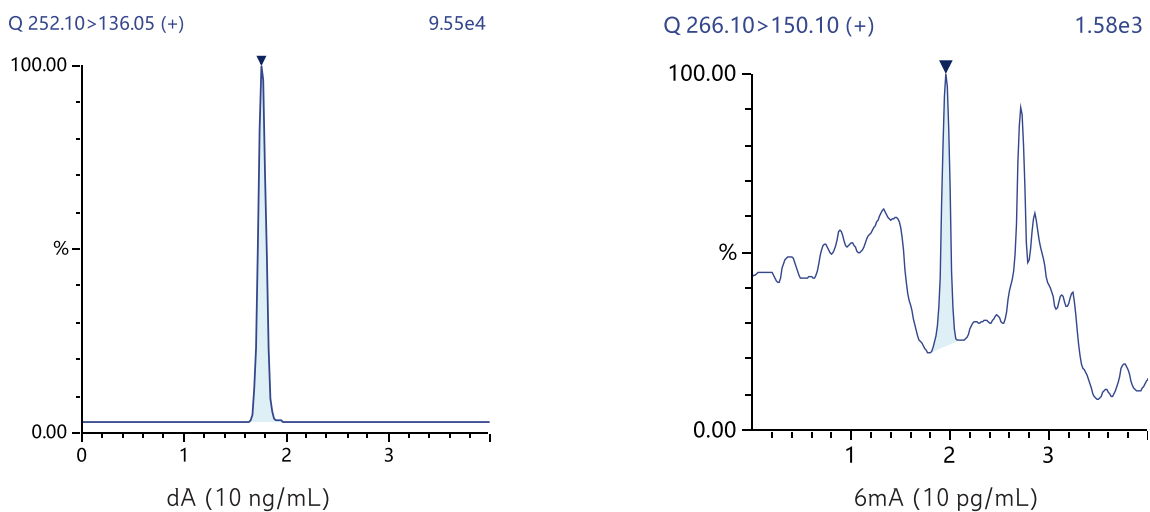


图 1 校准曲线最低点谱图

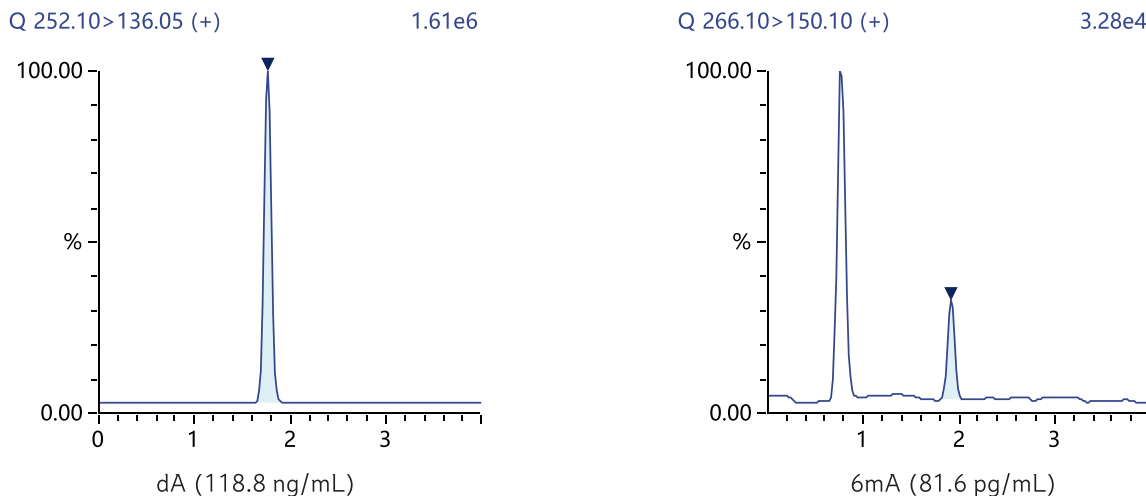


图 2 肿瘤组织样品谱图

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。校准曲线结果见图 3 及表 3，dA, 6mA 在校准曲线浓度范围内线性相关系数均大于 0.999，准确度在 95.7%~103.9% 之间，满足测定需求。

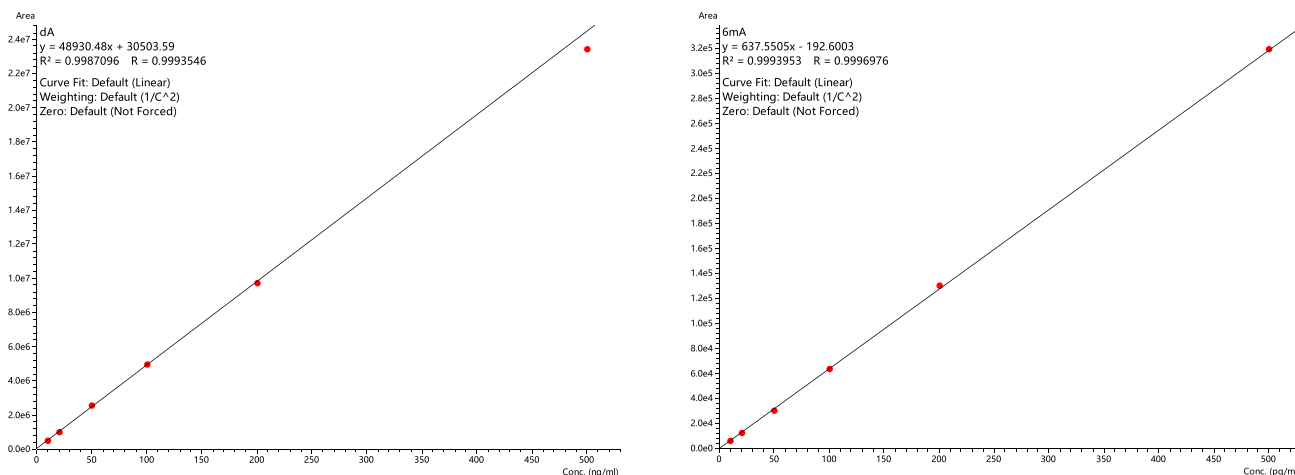


图 3 标准曲线

表 3 校准曲线结果

编号	名称	线性范围	浓度单位	相关系数	准确度 (%)
1	dA	10~500	ng/mL	0.9994	95.7~103.9
2	6mA	10~500	pg/mL	0.9997	96.2~103.2

2.3 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，精密度结果如表 4 所示，结果显示 dA, 6mA 峰面积 RSD 在 2.6%~2.7% 之间，满足日常测定需求。

表 4 精密度考察结果 (n=6)

项目	dA (ng/mL)	6mA (pg/mL)
测定浓度	10	10
RSD%	2.6	2.7

2.4 实际样品测定结果

取肿瘤组织样本，经前处理，按 1.2 中的分析条件进行测定，具体结果见表 5，该方法可准确定量测定肿瘤组织样本中 dA, 6mA。

表 5 肿瘤组织样本测定结果表

编号	dA (ng/mL)	6mA (pg/mL)
1	118.8	81.6
2	232.8	173.9
3	197.3	143.4

■ 结论

使用岛津临床质谱 LCMS-8050 CL，建立了肿瘤组织中 2'-脱氧腺苷 (dA) 及 N6-甲基-2'-脱氧腺苷 (6mA) 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 0.999，RSD 在 2.6%~2.7% 之间，该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于 DNA 6mA 甲基化表观遗传修饰的定量表征研究。

岛津应用云

