

串联质谱用于 DNA 表观遗传修饰的定量表征研究

LCMSMS-875

摘要：使用岛津临床质谱，建立了肿瘤组织中胞嘧啶（C），5-甲基胞嘧啶（5mC）及 5-羟甲基胞嘧啶（5hmC）同时测定方法，使用标准品及样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 1.2%~3.2% 之间，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于 DNA 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 肿瘤

技术特点：

- ❖ 灵敏度高，可实现低至 pg/mL 的检测。
- ❖ 分析速度快，6 min 以内完成三个标记物的检测。

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。通常，甲基化 DNA 指 5-甲基胞嘧啶（5mC），它是在 DNA 甲基转移酶（DNMT）的作用下将甲基基团添加到胞嘧啶（C）的 5' C 位置上形成的。而 DNA 主动去甲基化呈周期性，从 5mC 开始，首先被氧化为 5-羟甲基胞嘧啶（5hmC），以未修饰的胞嘧啶（C）结束。已有的研究表明，各种肿瘤中都普遍存在 DNA 甲基化状态的异常改变，且异常的 DNA 甲基化状态是肿瘤的

重要特征之一。DNA 甲基化在维持正常细胞的功能、雌性个体 X 染色体失活、寄生 DNA 序列的抑制、基因组结构稳定、遗传印记、胚胎发育、及肿瘤和疾病的发生、发展紧密相关，具有至关重要的作用。

本文使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL，建立了肿瘤组织中胞嘧啶（C），5-甲基胞嘧啶（5mC）及 5-羟甲基胞嘧啶（5hmC）同时测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于 DNA 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-20A 5R
自动进样器：	SIL-40C XR CL	柱温箱：	CTO-20A
系统控制器：	CBM-40 CL		

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

进样体积：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
1.00	泵	B.Conc	0
1.50	泵	B.Conc	95
3.00	泵	B.Conc	95
3.10	泵	B.Conc	0
6.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器	: LCMS-8045 CL	DL 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	: 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)
C	228.1	112.05*	-12	-40	-22
	228.1	95.05	-12	-36	-11
5mC	242.1	126.10*	-13	-12	-14
	242.1	109.10	-13	-38	-23
5hmC	258.1	142.05*	-13	-10	-27
	258.1	124.05	-13	-21	-25

注: * 为定量离子对

1.3 校准曲线制备

取 C, 5mC, 5hmC 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

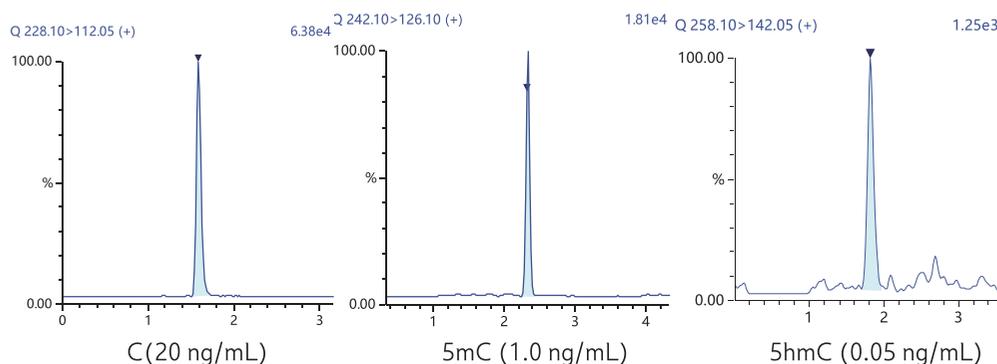


图 1 校准曲线最低点谱图

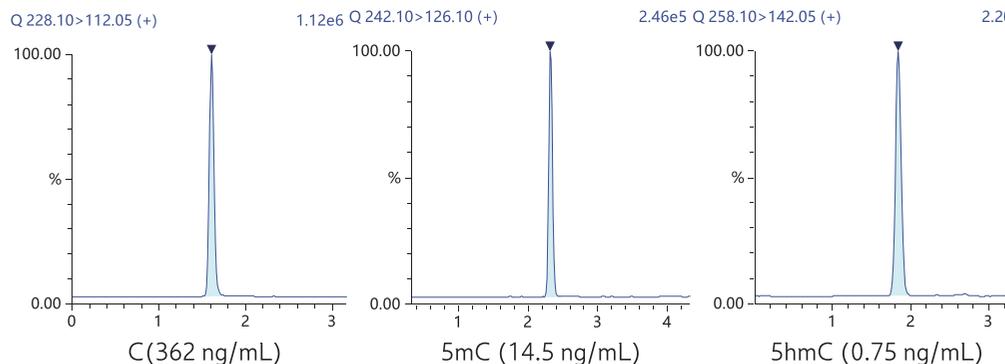


图 2 癌症组织样品谱图

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。校准曲线结果见表 3，C，5mC，5hmC 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 98.6%~101.2% 之间，满足测定需求。

表 3 校准曲线结果

编号	名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
1	C	20~500	0.9988	98.6~101.0
2	5mC	1.0~25	0.9994	99.0~101.2
3	5hmC	0.05~1.25	0.9992	99.1~100.4

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 C，5mC，5hmC 测定结果 RSD 在 1.2%~3.2% 之间，满足日常测定需求。

表 4 精密度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

项目	C	5mC	5hmC
测定浓度	20.0	0.80	0.050
RSD%	1.2	2.9	3.2

2.4 实际样品测定结果

取癌症组织样本及癌旁组织样本，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癌症组织样本中 C，5mC，5hmC。

表 5 癌症组织样本测定结果表 (ng/mL)

编号	样本类型	C	5mC	5hmC
1	癌症组织	362	14.5	0.75
	癌旁组织	224	9.7	0.59
2	癌症组织	482	12.5	0.20
	癌旁组织	334	12.3	0.18
3	癌症组织	239	7.4	0.15
	癌旁组织	316	12.3	0.59

■ 结论

使用岛津临床质谱 LCMS-8045 CL, 建立了肿瘤组织中胞嘧啶 (C), 5- 甲基胞嘧啶 (5mC) 及 5- 羟基甲基胞嘧啶 (5hmC) 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 1.2%~3.2% 之间, 该方法前处理简便, 分析速度快, 灵敏度高, 专属性强, 可用于 DNA 表观遗传修饰的定量表征研究。

岛津应用云

