

LC-MS/MS法测定DNA中胞嘧啶及其修饰物

Determination of cytosine and its modifiers in DNA by LC-MS/MS

查海红, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Haihong Zha, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

关键词: cytosine; modifiers; SCIEX Triple Quad™ System;

引言

核酸的表观遗传学修饰参与调控许多生理过程, 在体内扮演着重要的角色。比如 DNA 上的 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5-mC) 与许多生理过程和疾病相关, 包括衰老、癌症、X 染色体失活、分化和发育等。当基因中的 5-mC 为正常水平时, 抑癌基因可正常表达, 而当其高度甲基化时, 则会抑制抑癌基因的表达, 使其沉默, 从而导致癌症的发生。DNA 中研究最普遍的表观遗传修饰是 5-mC 及其去甲基化路径上的中间产物 (图1)。哺乳细胞内, 5mC/C 约3%, 5hmC/C 约0.1%, 5fC/C 和 5caC/C 只有百万分之一^[1-2]。

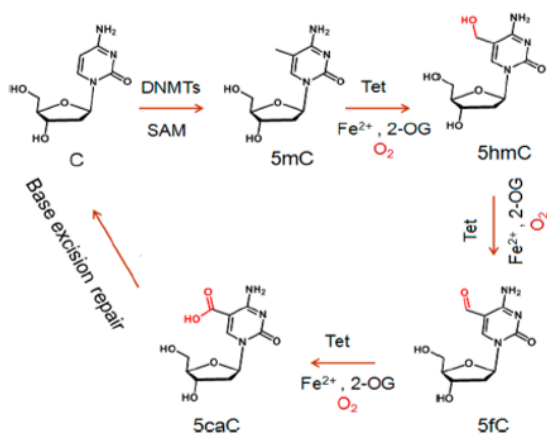


图1. 胞嘧啶 (C) 甲基化及5-mC去甲基化通路

本文建立了一种同时检测DNA中胞嘧啶及其修饰物的快速检测方案, 方法的定量下限可低至 pM 级别, 仪器灵敏度高, 可以很好的满足检测需求。

本实验方法特点:

1. 使用三重四极杆质谱 (SCIEX Triple Quad™ 系统) 测定DNA中胞嘧啶及其修饰物, 具有较好的色谱保留, 见图2。
2. 本方法灵敏度低至pM级别, 灵敏度高, 很好的满足检测需求。

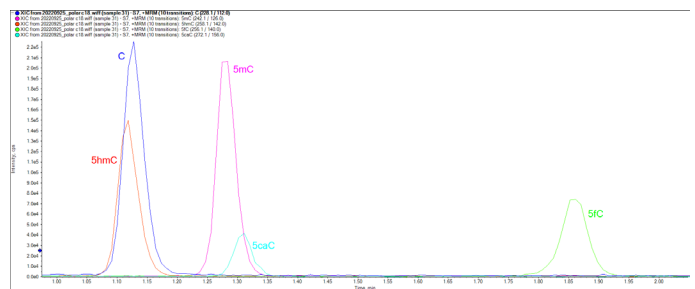


图2. 胞嘧啶及其修饰物的典型色谱图

仪器设备

Exion LC™ AD 系统 + SCIEX Triple Quad™ 系统



液相方法

色谱柱: Kinetex Polar C18 100 × 2.1 mm, 2.6 μm

流动相: A相: 水 (含0.1% 甲酸)

B相: 甲醇:乙腈 1:1 (含0.1% 甲酸)

进样体积: 10 μL

柱温: 40°C;

流动相梯度:

Time (min)	Flow (ml/min)	A (%)	B (%)
0.00	0.3	95	5
1.00	0.3	95	5
3.50	0.3	5	95
4.20	0.3	5	95
4.50	0.3	95	5
6.00	0.3	95	5

质谱方法

离子源: ESI源, 正离子模式

离子源参数:

电喷雾电压 IS: 5500 V

气帘气 CUR: 40 psi

雾化气 GS1: 55 psi

辅助加热气 GS2: 55 psi

碰撞气 CAD: 9

源温度 TEM: 350°C

表1. 胞嘧啶及其修饰物的质谱参数

化合物名称	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE
C	228.1	112	18	18
5mC	242.1	126	18	17
5hmC	258.1	142	17	14
5fC	256.1	140	17	17
5caC	272.1	156	17	17

实验结果

1. 灵敏度:

胞嘧啶及其修饰物的最低定量下限为pM级别, 典型色谱图见图3。

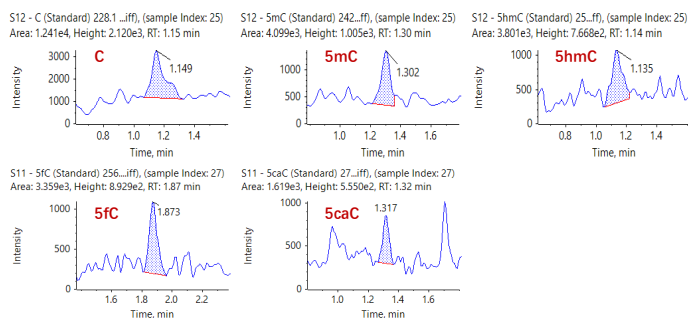


图3. 胞嘧啶及其修饰物最低定量限色谱图

表2. 胞嘧啶及其修饰物的定量下限和线性范围

	LLOQ (定量下限)	线性范围
C	11.2 pM	11.2-8200 pM
5mC	5.6 pM	5.6-12300 pM
5hmC	5.6 pM	5.6-4100 pM
5fC	16.9 pM	16.9-12300 pM
5caC	16.9 pM	16.9-111100 pM

2. 线性范围:

胞嘧啶及其修饰物在线性范围内线性关系良好, 相关系数r大于0.996 (见图4), 标曲各点准确度在85%-115%之间。

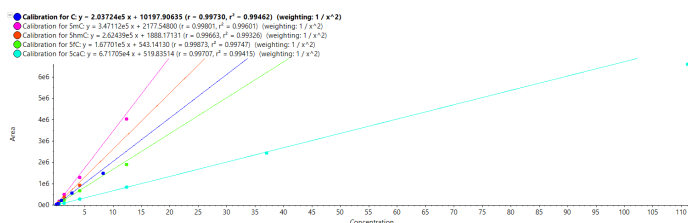


图4. 胞嘧啶及其修饰物的标准曲线图

3. 样品检测:

实际DNA样品中胞嘧啶及其修饰物的检测结果见图5，所有成分都能检测到。

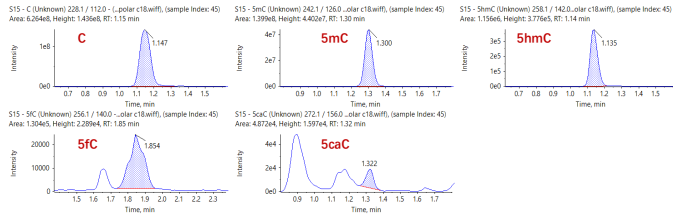


图5. 实际DNA样品中胞嘧啶及其修饰物的检测结果图

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 系统建立了DNA中胞嘧啶及其修饰物的LC-MS/MS方法。结果表明，本方法灵敏度高，能够满足检测需求。

参考文献

- [1] Lister, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322[J]. PubMed, 2009. DOI:10.1038/nature08514.
- [2] C.-X. Song, C. Yi, C. He, Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome, *Nat. Biotechnol.* 2012, 30, 1107-1116.

SCIEX临床诊断产品仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-29097-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)