

基于液质联用技术 MRM 模式准确定量分析 DNA 中低浓度核苷 5gmC

►魏金超

(分析测试中心质谱组 Tel: 010-62554495 Email: weijincao@iccas.ac.cn)

摘要

本研究成功建立了基于多反应监测 (MRM) 模式的液质联用 (LC-MS/MS) 定量分析方法。该方法优化了色谱与质谱条件, 实现了对 DNA 样本中 6 种极性相近的核苷, 特别是痕量新型修饰核苷—5-甘油基-甲基胞嘧啶 (5gmC) 的高效分离与准确定量。该方法的检测下限 (LOD) 可达 0.3 nM, 为“稀有 DNA 修饰”相关的甲基化与去甲基化研究提供了关键的数据支撑, 有望推动该领域的深入探索。

一、仪器及原理介绍

1.1 液质联用 (LC-MS) 技术

液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 是一种强大的分析工具, 它将液相色谱 (LC) 对复杂样品卓越的分离能力, 与质谱 (MS) 高灵敏度、高选择性的检测能力完美结合。在 LC-MS 系统中, 样品首先经由 LC 分离, 随后进入 MS 检测。在质谱部分, 分析物被离子化, 经质量分析器筛选和检测, 最终得到能够反映其分子量与结构信息的质谱图。凭借其独特优势, LC-MS 技术已在药物分析、食品安全和环境监测等领域获得广泛应用。

1.2 电喷雾离子源 (ESI)

电喷雾离子源 (ESI) 是 LC-MS 中最常用的离子化技术之一。其核心原理是利用强电场将样品溶液雾化成为带电液滴, 通过溶剂的不断蒸发, 最终形成气相离子。该过程主要包括三个阶段 (如图 1 所示): 带电液滴形成, 样品溶液以低流速通过带有高电压 (2~5kV) 的毛细管。在强电场作用下, 液体在毛细管尖端形成一个被称为“泰勒锥”的锥形结构^[1]。液滴收缩与库仑爆炸: 当泰勒锥尖端的液滴达到“瑞利极限” (即表面电荷的库仑斥力与溶液表面张力相当的临界点) 时^[2], 会喷射出带电液滴。随着溶剂蒸发, 液滴收缩, 电荷密度增大, 当再次超越瑞利极限时, 液滴会发生“库仑爆炸”, 裂变成更小的子液滴^[3]。气相离子产生: 上述过程循环往复, 最终使分析物分子完全脱溶剂化, 形成气相离子,

进入后续的质量分析器进行检测。

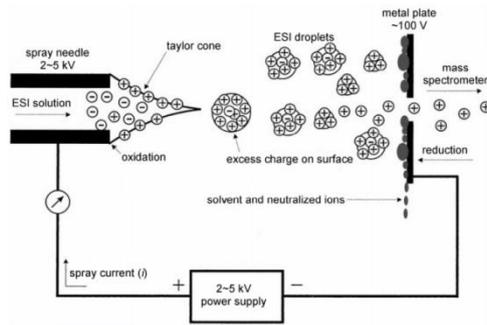


图 1、电喷雾离子化过程示意图

1.3 QTRAP 介绍

QTRAP 是一种基于三重四极杆 (Triple Quadrupole, QqQ) 并整合了线性离子阱 (Linear Ion Trap, LIT) 技术的高端串联质谱仪，能同时提供超高灵敏度的定量和定性分析数据。其结构如图 2 所示，Q1 和 Q3 为质量分析器，Q2 为碰撞室。其独特之处在于，第三个四极杆 (Q3) 既可用作传统的质量过滤器，也能作为线性离子阱 (LIT) 捕获和积累离子，从而显著提高检测的信噪比和定性能力。因此，QTRAP 质谱仪不仅保留了三重四极杆的所有扫描模式，如子离子扫描、母离子扫描、中性丢失扫描和多反应监测 (MRM)，还具备了离子阱的增强扫描功能，实现了定量“”与“定性”能力的高度统一。

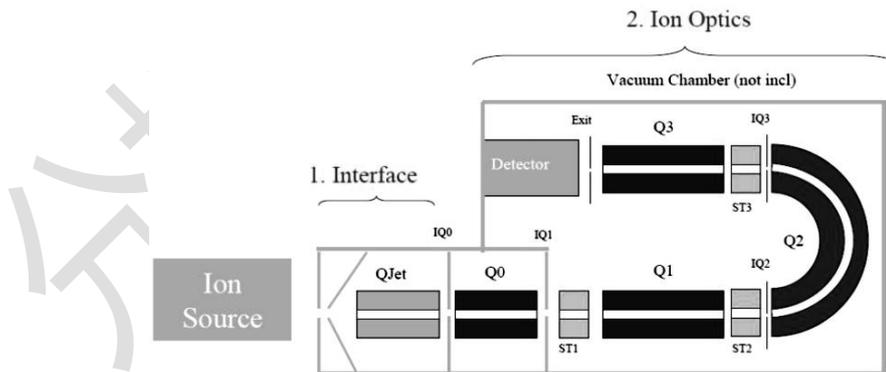


图 2、QTRAP 4500 的基本构造示意图

1.4 MRM 原理介绍

多反应监测 (MRM) 是一种高选择性、高灵敏度的靶向定量技术，其原理如图 3 所示。核心流程如下：选择母离子：第一个四极杆 (Q1) 设定为只允许目标分析物的特异性母离子通过。碰撞诱导解离：母离子进入碰撞室 (Q2)，在

与中性气体（如 N₂）碰撞后，发生碎裂，产生一系列碎片离子。选择子离子：第三个四极杆（Q3）设定为只允许目标分析物的特征碎片离子通过并到达检测器。由于 Q1 和 Q3 的双重质量筛选，MRM 模式能够极大地排除基质干扰，实现对复杂混合物中痕量组分的精准、快速鉴别与定量。

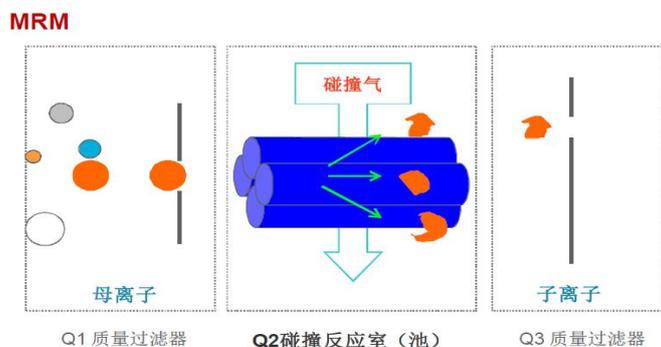


图 3、MRM 原理示意图

二、LC-MS/MS 定量检测 DNA 中 5gmC 的准确定量分析

2.1 研究背景

2019 年《Nature》发表的一项研究报道称^[4]，莱茵衣藻中的 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine, 5mC）可被 TET 同源蛋白 CMD1 氧化，生成一种全新的 DNA 修饰产物—5-甘油基-甲基胞嘧啶（5-glyceryl-methylcytosine, 5gmC）。这一发现揭示了 5gmC 可能在一定程度上拮抗 5mC 介导的基因沉默，是 DNA 去甲基化领域的一项重大突破。然而，由于 5gmC 在细胞内含量极低，对其消除机制、识别蛋白等生物学功能的研究受到了极大限制。为了解决这个难题，科研人员用全合成的手段合成了 5gmC^[5]（如图 4），并用其来孵育细胞，通过提取 DNA 并将其消化成核苷，最终得到 5gmC 浓度在 1 nM 左右的样本，本研究旨在建立一种高灵敏度的检测方法，以支持后续的功能探索。

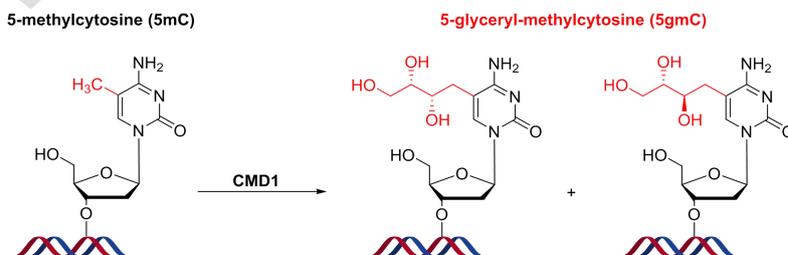


图 4、5gmC 的全合成路线图^[5]

2.2 实验方法与条件优化

本研究采用 API 4500 QTRAP 质谱仪，通过优化一系列质谱和色谱参数，对 6 种极性相近的核苷（dA、dG、dC、dT、5mC、5gmC）进行分析。

色谱条件：色谱柱：ACQUITY UPLC BEH amide column (1.7 μm ; 2.1 mm \times 100 mm)，柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量：5 μL ，流速：0.5 mL/min，流动相为 72 %水（5mM 醋酸铵溶液含 0.1% 甲酸）和 28%乙腈（含 0.1% 甲酸）恒梯度。

质谱条件：ESI 离子源，雾化气与脱溶剂气均为 N_2 ，气帘气（CUR）25，碰撞气（CAD）为中等能量，雾化气（GS1）45，脱溶剂气（GS2）50，正离子 MRM 模式下电喷雾电压 5500 V，温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

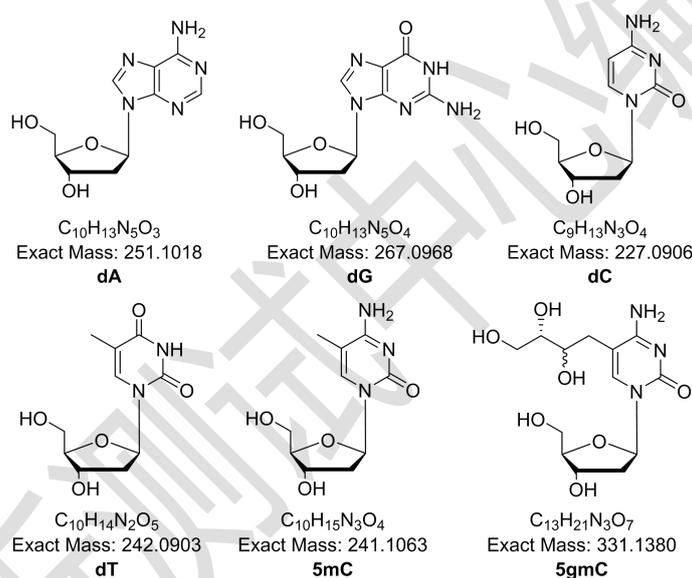


图 5、6 种核苷标准品的化学结构图

针对每种核苷，我们优化了其去簇电压（DP）和碰撞能量（CE），以获得最佳信号响应（见表 1）。

表 1、检测 6 种核苷的 MRM 质谱参数

母离子 Q1(Da)	碎片离子 Q3(Da)	ID	DP (volts)	CE (volts)
252.0	136.1	dA	40	20
268.0	152.1	dG	20	15
228.0	112.0	dC	30	15
243.1	127.1	dT	40	15
242.1	126.0	5mC	40	15

332.2	216.1	5gmC	40	20
-------	-------	------	----	----

注：DP 为去簇电压；CE 为碰撞能量

通过上述优化，成功实现了 6 种极性相近且浓度极低的核苷（dA、dG、dC、dT、5mC、5gmC）的有效分离（图 6），其中目标物 5gmC 的最低检测下限（LOD）达到了 0.3 nM，充分满足了生物样本中痕量检测的需求。

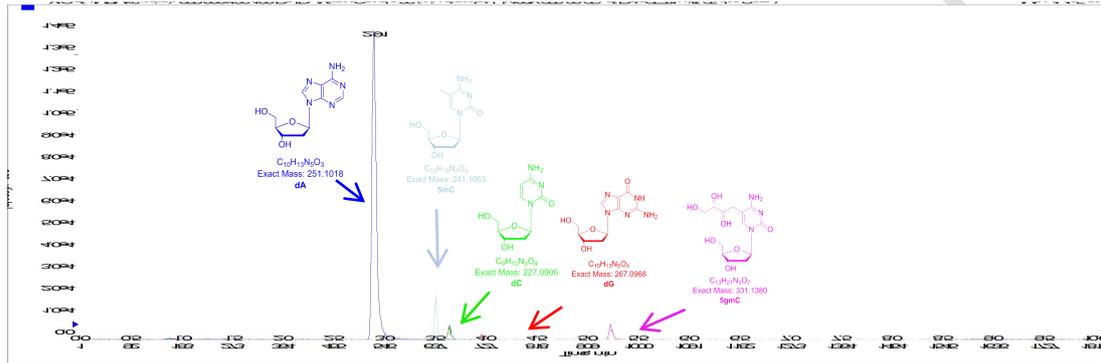
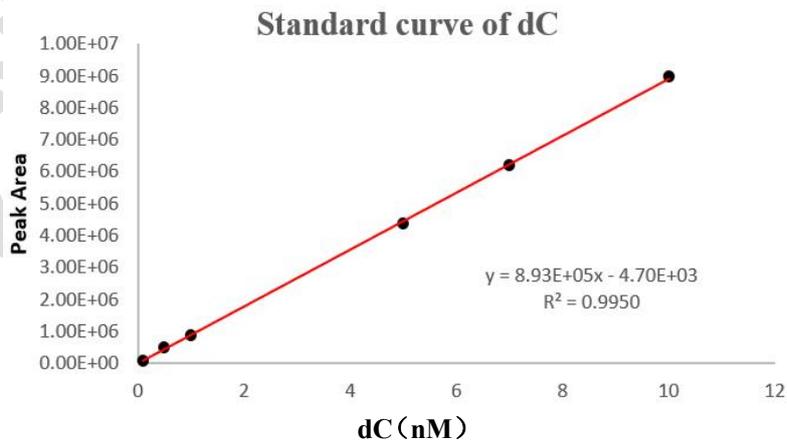


图 6、MRM 模式 dA、dG、dC、5mC 和 5gmC 的萃取离子流图^[5]

2.3 建立标准曲线

为实现准确定量，本研究配制了一系列浓度的 dC 和 5gmC 标准品，并建立了标准曲线。如图所示，dC 和 5gmC 在考察的浓度范围内均表现出良好的线性关系，其相关系数（ R^2 ）分别达到 0.9950 和 0.9997，证明了该方法的可靠性、准确性和宽广的线性范围。



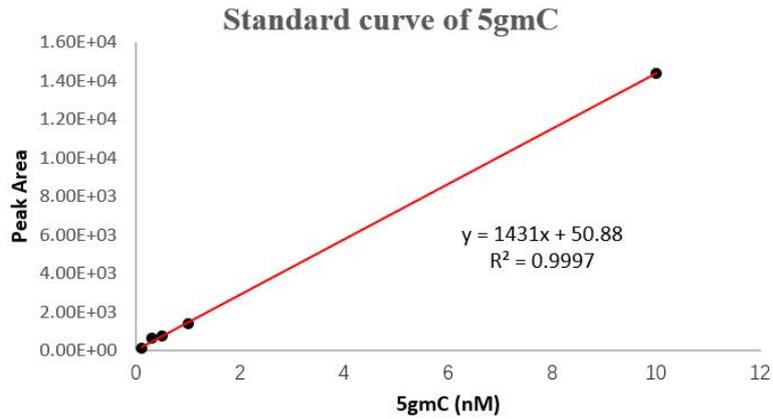


图 7、dC 和 5gmC 的标准曲线图^[5]

2.4 结论

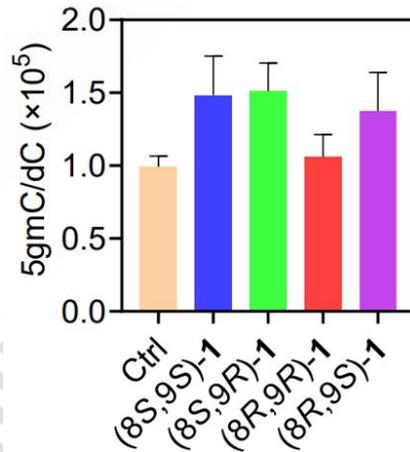


图 8、DNA 中 5gmC 的动态变化^[5]

本研究基于液质联用 LC-MS/MS 的 MRM 模式，成功建立了一套高效、灵敏的定量分析方法，能够对 DNA 样本中痕量 5gmC 进行准确定量。该方法的建立，不仅可以清晰地监测 5gmC 的动态变化（图 8），也为深入探索 DNA 甲基化与去甲基化调控机制，特别是与“稀有 DNA 修饰”相关的生物学问题，提供了关键的技术支持，有望推动该领域的深入探索。

参考文献：

1. N. B. Cech, C. G. Enke*. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*. **2001**, 20, 362.

2. D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis*. Electrified droplet fission and the rayleigh limit. *Langmuir*. **1989**, *5*, 376.
3. R. B. Cole. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2000**, *35*,763.
4. Xue J H, Chen G D, Hao F*, et al. A vitamin-C-derived DNA modification catalysed by an algal TET homologue . *Nature*, **2019**, *569*,581.
5. Zhao L W, Xu J X, Liu G, He Y M, J Nafie, Wu C S, Wei J C, Liu L, Tang H R , Huang K Y , Xu G L, Cheng L*. Total synthesis of all stereoisomers of C5-glyceryl-methyl-2'-deoxycytidine 5gmC and their occurrence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Rep. Phys. Sci.*, **2024**, *5*, 102041.

致谢:

感谢分析测试中心丁丽萍老师对稿件的多次审读和编辑加工!