

基于液质联用技术分析肿瘤细胞中的核苷酸

李竑¹, 鲁家骏¹, 严雅琴¹, 陈铭¹

(1.中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 核苷酸的过度合成和使用是泛肿瘤细胞的一个普遍代谢特征。细胞内核苷酸的超生理丰度与肿瘤细胞的许多行为密切相关, 包括不受控制的增殖、免疫逃避、转移和化疗抗性。利用高灵敏度的液相色谱-质谱联用仪, 我们可以及时并迅速地对胞内核苷酸代谢异常的信号进行检测分析。但是, 传统的反相色谱体系并不能有效地分离这些强极性的核苷酸代谢物, 因此, 离子交换色谱、离子对色谱、亲和色谱、石墨化碳色谱以及毛细管电泳等被用来进行核苷酸的检测分析。本项研究工作报道了一种基于石墨化碳作为固定相的色谱耦联电喷雾质谱, 并同时对其携带多个磷酸基团的代谢物进行定量分析的有效方法。

关键词: 核苷酸; 肿瘤细胞; 石墨化碳色谱法; 质谱法

中图分类号: (请在 <http://www.ztflh.com> 查询) **文献标识码:**

Direct quantification of intracellular pan-cancer metabolic dependent nucleotides by HPLC-coupled Tandem mass spectrometry

Li Hong¹, Lu Jiajun¹, Yan Yaqin¹, Chen Ming¹

(1. Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China)

Abstract: Hyperactive alteration of nucleotide metabolites (NMs) is a universal feature of cancer cells across different cancer types. Determinants associated with aggressive behaviors of cancer cells, such as uncontrolled proliferation, chemotherapy resistance, immune evasion and metastasis, rely heavily on augmented nucleotide metabolism. The early and rapid detection of nucleotide metabolites when present in too high quantities, or containing certain modifications that are not common in wide types, are many triggered by LC-MS techniques. Due to their high polarity, chromatographic separation of NMs is challenging using traditional C₁₈ columns in reverse phase chromatography. Therefore, alternative approaches are used for the chromatographic retention of NMs, which can be accomplished by IEX, IP, hydrophilic interaction (HILIC), porous graphitic carbon (PGC) chromatography, or capillary electrophoresis (CE). This work presents a simultaneous determination of nucleosides and their mono-, di- and triphosphates using a PGC

stationary phase coupled with electrospray mass spectrometry. The applicability of the method was evaluated in pan-cancer cells, from which pyrimidine-containing nucleosides and nucleotides were successfully separated. Principle component analysis (PCA) showed that UTP was responsible for most of the variance. A comprehensive understanding of the complexity of PGC chromatography was also demonstrated in this study.

Keywords: Nucleotides, cancer cells, porous graphitic carbon (PGC) chromatography, Mass spectrometry

1 研究背景

核酸是细胞内携带遗传信息的物质，基本结构是核苷酸，它们的性质和数量的改变与基因功能密切相关。随着生命科学研究的不深入，核苷酸的检测分析手段越来越多，包括质谱法、液相色谱法与紫外/质谱联用法、离子对色谱与离子交换色谱法、毛细管电泳与紫外/质谱联用法，以及近几年发展起来的亲水作用色谱和多孔石墨化碳色谱与质谱联用技术等。由于嘧啶核苷酸的极性非常强，含有一个或者多个磷酸基团，并且相对分子质量非常接近，因此如何有效地对这些的嘧啶核苷酸进行分离和分析仍然是个很大的挑战。

石墨化碳 (PGC) 色谱柱中的固定相具有不同于硅胶基质固定相的独特性质，它们由网状交织的石墨带组成。石墨带是一种导电晶体材料，在带负电荷的磷酸基团和 PGC 柱石墨表面的 π -电子之间形成电荷诱导偶极。这种电荷诱导的相互作用促进了极性或非极性分析物如核苷酸的保留。对于非极性化合物，它们也可以通过与流动相以及石墨化碳晶状结构表面所产生的色散力而被保留在色谱柱上，化合物的极性越弱，保留越强。因此，这些与 PGC 色谱柱结合的极性或非极性化合物的过度保留都有可能造成色谱柱的污染，从而导致高度结晶的多孔石墨化碳表面的结合力受损，表现出保留时间的不可重复性[1-3]。这种不可预测的色谱行为严重限制了 PGC 柱的适用性，尽管它对极性化合物的保留率和选择性明显高于硅胶基质作为固定相的反相色谱柱。

但是，PGC 色谱法基于它独特的疏水和电子云保留机理，而能够以超凡能力保留强极性化合物并分离结构性质接近的化合物。用于 PGC 色谱法的许多溶剂和添加剂能够很好地与质谱兼容，避免了高盐浓度或离子对试剂的使用，而这些高盐浓度或离子对试剂却分别是离子对色谱 (IEX) 和离子对试剂 (IP) 色谱所必需的。此外，PGC 的色谱分离行为更类似于传统的反相色谱法 (峰形对称性好、保留时间稳定)，因此相对于 HILIC 方法中经常出