

# 细胞培养上清液方法包在体外生殖方面的应用

## LCMSMS-276

**摘要：** 本文使用细胞培养上清液分析方法包对不同品牌的细胞培养液中的 17 种氨基酸组份进行了定量测定。利用方法包中的条件对体外生殖细胞培养液中的 101 种成份进行了分析，并对其中的氨基酸组份进行了定量，结果显示在 0.25~12.5  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  均大于 0.9973。保留时间和峰面积的重复性测试结果的 RSD% 分别优于 0.219% 和 5.54%。该方法可以对细胞培养液中的氨基酸组份进行准确定量，从而对商品化的体外生殖细胞培养液的质量监控提供了可靠的参考依据。

**关键词：** 三重四极杆质谱 细胞培养上清液方法包 体外受精

体外受精是指哺乳动物的精子和卵子在体外人工控制的环境中完成受精过程的技术。在生物学中，把体外受精胚胎移植到母体后获得的动物称试管动物。试管婴儿是伴随体外授精技术的发展而来的，是指分别将卵子与精子取出后，置于试管内使其受精，再将胚胎前体受精卵移植回母体子宫内发育成胎儿。试管婴儿是用人工方法让卵子和精子在体外受精并进行早期胚胎发育，然后移植到母体子宫内发育而诞生的婴儿。细胞培养液对

体外生殖细胞的成长和发育有着至关重要的影响，而培养液中的大部分氨基酸对卵母细胞的体外受精具有能抑制作用，个别氨基酸则对体外受精具有能促进作用。所以对培养液中的氨基酸进行含量控制有着较为重要的意义。本文利用岛津公司的细胞培养上清液方法包连同三重四级杆质谱对不同厂商的细胞培养液中的氨基酸组份进行了准确定量，为相关的从业人员提供了一种比较可靠的技术手段。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：见细胞培养上清液方法包

流动相：见细胞培养上清液方法包

流速：0.35 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：1  $\mu\text{L}$

洗脱方式：见细胞培养上清液方法包

#### 质谱条件

离子化模式：ESI(+/-)

加热气：空气 10.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

接口温度：300 $^{\circ}\text{C}$

DL 温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

监控的化合物信息：见表 1

表1 细胞培养上清液方法包

编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别
1	2-Isopropylmalic acid	内标	35	Ornithine	氨基酸	69	Deoxycytidine	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	36	Oxidized glutathione	氨基酸	70	Guanine	核苷酸
3	Glucosamine	糖类	37	Phenylalanine	氨基酸	71	Guanosine	核苷酸
4	Hexose (Glucose)	糖类	38	Pipecolic acid	氨基酸	72	Guanosine monophosphate	核苷酸
5	Sucrose Carbohydrate	糖类	39	Proline	氨基酸	73	Hypoxanthine	核苷酸
6	Threonic acid	糖类	40	Serine	氨基酸	74	Inosine	核苷酸
7	2-Aminoadipic acid	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	75	Thymidine	核苷酸
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	42	Tryptophan	氨基酸	76	Thymine	核苷酸
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	43	Tyrosine	氨基酸	77	Uracil	核苷酸
10	5-Glutamylcysteine	氨基酸	44	Valine	氨基酸	78	Uric acid	核苷酸
11	5-Oxoproline	氨基酸	45	homocysteine	氨基酸	79	Uridine	核苷酸
12	Alanine	氨基酸	46	L-Homoserine	氨基酸	80	Xanthine	核苷酸
13	Alanyl-glutamine	氨基酸	47	4-Aminobenzoic acid	维生素	81	Xanthosine	核苷酸
14	Arginine	氨基酸	48	Ascorbic acid	维生素	82	Penicillin G	抗生素
15	Asparagine	氨基酸	49	Ascorbic acid 2-phosphate	维生素	83	2-Aminoethanol	其他
16	Aspartic acid	氨基酸	50	Biotin	维生素	84	2-Ketoisovaleric acid	其他
17	Citrulline	氨基酸	51	Choline	维生素	85	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
18	Cystathionine	氨基酸	52	Cyanocobalamin	维生素	86	4-Hydroxyphenyllactic acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	53	Ergocalciferol	维生素	87	Citric acid	其他
20	Cystine	氨基酸	54	Folic acid	维生素	88	Ethylenediamine	其他
21	Glutamic acid	氨基酸	55	Folinic acid	维生素	89	Fumaric acid	其他
22	Glutamine	氨基酸	56	Lipoic acid	维生素	90	Glyceric acid	其他
23	Glutathione	氨基酸	57	Niacinamide	维生素	91	Histamine	其他
24	Glycine	氨基酸	58	Nicotinic acid	维生素	92	Isocitric acid	其他
25	Glycyl-glutamine	氨基酸	59	Pantothenic acid	维生素	93	Lactic acid	其他
26	Histidine	氨基酸	60	Pyridoxal	维生素	94	Malic acid	其他
27	Isoleucine	氨基酸	61	Pyridoxine	维生素	95	O-Phosphoethanolamine	其他
28	Kynurenine	氨基酸	62	Riboflavin	维生素	96	Putrescine	其他
29	Leucine	氨基酸	63	Tocopherol acetate	维生素	97	Pyruvic acid	其他
30	Lysine	氨基酸	64	Adenine	核苷酸	98	Succinic acid	其他
31	Methionine	氨基酸	65	Adenosine	核苷酸	99	3-OxoPrGSH	其他
32	Methionine sulfoxide	氨基酸	66	Adenosine monophosphate	核苷酸	100	3-OxoPrMCA	其他
33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	67	Cytidine	核苷酸	101	ACR-Cys	其他
34	N-Acetylcysteine	氨基酸	68	Cytidine monophosphate	核苷酸	102	ACR-Hcy	其他

### 1.3 样品前处理方法

取 500  $\mu\text{L}$  发酵液初步离心 (室温, 3000 rpm, 1 min), 取 300  $\mu\text{L}$  上清至进样小瓶中, 从中取 100  $\mu\text{L}$  至另一离心管中加入 20  $\mu\text{L}$  内标溶液, 加入 200  $\mu\text{L}$  乙腈, 充分振匀室温 15000 rpm, 15 min 再次离心。取 100  $\mu\text{L}$  上清加入 900  $\mu\text{L}$  超纯水充分振匀后直接上样分析。

## 结果讨论

### 2.1 部分组份 MRM 色谱图

本研究对方法包中的 Glycine、Alanine、Proline、Serine、Valine、Threonine、Leucine、Isoleucine、Aspartic acid、Lysine、Glutamic acid、Methionine、Histidine、Phenylalanine、Arginine、Tyrosine、Cystine 共 17 种氨基酸进行了含量分析。部分化合物的色谱图如下:

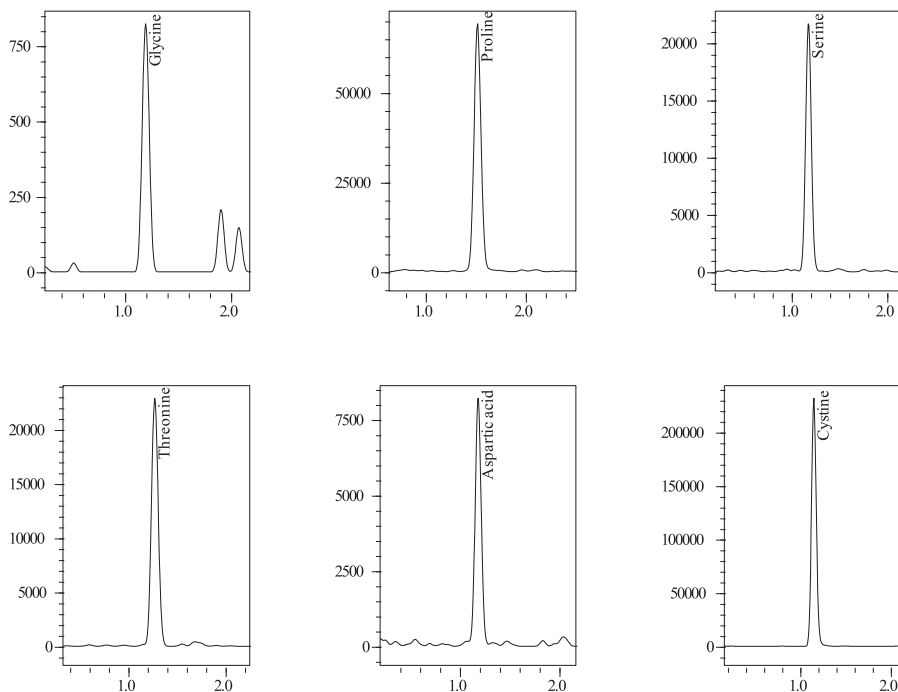


图1 部分氨基酸标准品色谱图 (0.25  $\mu\text{mol/L}$ )

### 2.2 线性关系

超纯水配制 17 种氨基酸的混标溶液标准曲线, 配制系列浓度为 0.25、0.5、2.5、5、12.5  $\mu\text{mol/L}$  的标准溶液曲线, 外标法制作校准曲线。结果显示在 0.25~12.5  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

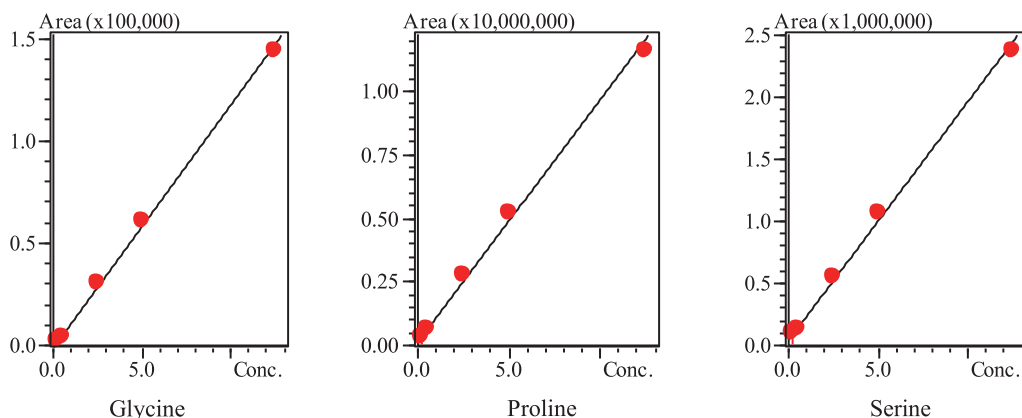


图2 部分氨基酸标准工作曲线

表2 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 0.25 μmol/L	准确度(%)	相关系数 r
1	Glycine	$Y = (11885.9)X + (-1265.51)$	0.25~12.5	90.8~106.2%	0.9992
2	Proline	$Y = (954088)X + (139718)$	0.25~12.5	86.0~108.4%	0.9983
4	Serine	$Y = (192966)X + (40799.6)$	0.25~12.5	88.9~106.4%	0.9986

### 2.3 重复性考察

对浓度为 2.5 μmol/L 的标准溶液重复六次进样分析，重复性结果如下表 4 所示。

表3 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD%	
	R.T	Area
Glycine	0.149	5.25
Alanine	0.098	5.06
Proline	0.064	5.49
Serine	0.116	2.52
Valine	0.119	3.76
Threonine	0.073	4.04
Leucine	0.195	4.86
Isoleucine	0.205	2.94
Aspartic acid	0.142	5.54
Lysine	0.094	3.36
Glutamic acid	0.056	3.43
Methionine	0.084	4.31
Histidine	0.094	4.76
Phenylalanine	0.177	2.49
Arginine	0.068	2.79
Tyrosine	0.219	4.26
Cystine	0.095	1.99

### 2.4 实际样品分析结果

取市售某品牌的细胞培养液，按照 1.3 部分进行样品前处理。按照 1.2 部分的分析条件进行分析，色谱图和定量结果统计如下：

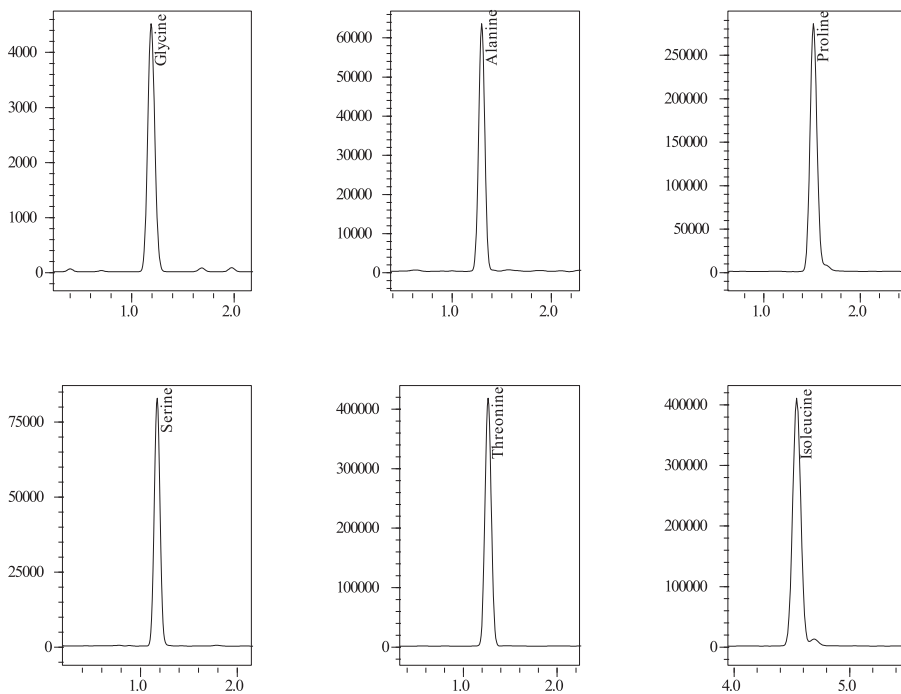


图3 实际样品中部分氨基酸组份色谱图

表4 市售细胞培养液中氨基酸定量结果

Name	Conc.( $\mu\text{mol/L}$ )
Glycine	1.626
Alanine	5.222
Proline	1.427
Serine	1.533
Valine	5.710
Threonine	5.666
Leucine	8.256
Isoleucine	7.090
Aspartic acid	2.817
Lysine	7.499
Glutamic acid	1.101
Methionine	1.512
Histidine	4.756
Phenylalanine	3.543
Arginine	10.435
Tyrosine	3.933
Cystine	0.753

## ■ 结论

本文利用细胞培养上清液方法包及超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 对市售体外生殖用细胞培养液中的 17 种氨基酸组份进行了准确定量。结果显示在 0.25~12.5  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  均大于 0.9973。保留时间和峰面积的重复性测试结果的 RSD% 分别优于 0.219% 和 5.54%。对市售培养液进行了定量分析，结果显示，该品牌产品标示的含量范围属实。该方法快速，高灵敏度，为相关从业人员提供了一种非常好的技术手段。