

Application News

No. C106A

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

使用三重四极杆 LC/MS/MS 同时分析哺乳动物的细胞培养上清液

Simultaneous Analysis of Mammalian Cell Culture Supernatant Using Triple Quadrupole LC/MS/MS

生产生物燃料或生物制药的工业发酵需要常规监测介质条件，如 pH、溶解气体、碳源（葡萄糖）和氮源（谷氨酰胺）等，从而优化及控制发酵过程。然而除上述因素外，培养基中还包含其他一些重要生物成分如维生素、核酸和其他主要代谢物，如果一起监控，可以得到更多有关生物过程技术的详细信息。为满足全面

分析培养基成分的需求，我们优化了分析条件，开发出“细胞培养分析方法包”，该方法包可以监控下面列出的 95 种化合物的相对丰度。使用这个方法包，我们研究在杂交癌细胞一周期 5 天内生长过程中培养基成分的丰度变化。

■ 化合物列表

List of Compounds

No.	化合物名称	分类	No.	化合物名称	分类	No.	化合物名称	分类
1	2-Isopropylmalic acid	标准物质	33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	65	Cytidine	核酸相关
2	Gluconic acid	糖	34	N-Acetylcysteine	氨基酸	66	Cytidine monophosphate	核酸相关
3	Glucosamine	糖	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核酸相关
4	Hexose (Glucose)	糖	36	Oxidized glutathione	氨基酸	68	Guanine	核酸相关
5	Sucrose	糖	37	Phenylalanine	氨基酸	69	Guanosine	核酸相关
6	Threonic acid	糖	38	Pipecolic acid	氨基酸	70	Guanosine monophosphate	核酸相关
7	2-Aminoadipic acid	氨基酸	39	Proline	氨基酸	71	Hypoxanthine	核酸相关
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	40	Serine	氨基酸	72	Inosine	核酸相关
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	73	Thymidine	核酸相关
10	5-Glutamylcysteine	氨基酸	42	Tryptophan	氨基酸	74	Thymine	核酸相关
11	5-Oxoproline	氨基酸	43	Tyrosine	氨基酸	75	Uracil	核酸相关
12	Alanine	氨基酸	44	Valine	氨基酸	76	Uric acid	核酸相关
13	Alanyl-glutamine	氨基酸	45	4-Aminobenzoic acid	维生素	77	Uridine	核酸相关
14	Arginine	氨基酸	46	Ascorbic acid	维生素	78	Xanthine	核酸相关
15	Asparagine	氨基酸	47	Ascorbic acid 2-phosphate	维生素	79	Xanthosine	核酸相关
16	Aspartic acid	氨基酸	48	Biotin	维生素	80	Penicillin G	抗生素
17	Citrulline	氨基酸	49	Choline	维生素	81	2-Aminoethanol	其他
18	Cystathionine	氨基酸	50	Cyanocobalamin	维生素	82	2-Ketoisovaleric acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	51	Ergocalciferol	维生素	83	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
20	Cystine	氨基酸	52	Folic acid	维生素	84	4-Hydroxyphenyllactic acid	其他
21	Glutamic acid	氨基酸	53	Folinic acid	维生素	85	Citric acid	其他
22	Glutamine	氨基酸	54	Lipoic acid	维生素	86	Ethylenediamine	其他
23	Glutathione	氨基酸	55	Niacinamide	维生素	87	Fumaric acid	其他
24	Glycine	氨基酸	56	Nicotinic acid	维生素	88	Glyceric acid	其他
25	Glycyl-glutamine	氨基酸	57	Pantothenic acid	维生素	89	Histamine	其他
26	Histidine	氨基酸	58	Pyridoxal	维生素	90	Isocitric acid	其他
27	Isoleucine	氨基酸	59	Pyridoxine	维生素	91	Lactic acid	其他
28	Kynurenine	氨基酸	60	Riboflavin	维生素	92	Malic acid	其他
29	Leucine	氨基酸	61	Tocopherol acetate	维生素	93	O-Phosphoethanolamine	其他
30	Lysine	氨基酸	62	Adenine	核酸相关	94	Putrescine	其他
31	Methionine	氨基酸	63	Adenosine	核酸相关	95	Pyruvic acid	其他
32	Methionine sulfoxide	氨基酸	64	Adenosine monophosphate	核酸相关	96	Succinic acid	其他

HPLC 条件, HPLC Conditions

色谱柱 : 反相色谱柱
流动相 A : 0.1%甲酸 / 水
流动相 B : 0.1%甲酸 / 乙腈
模式 : 梯度洗脱
流速 : 0.35 mL / min.

MS 条件, MS Conditions (LCMS-8050)

离子化模式 : ESI (正离子 / 负离子)
雾化气流速 : 3.0 L / min.
干燥气流速 : 10.0 L / min.
加热气流速 : 10.0 L / min.
DL 温度 : 250 °C
加热模块温度 : 400 °C
接口温度 : 300 °C

使用 DMEM 培养杂交瘤 5 天（表 1 为培养条件）。播种后每隔 24 小时采集一次培养上清液。LCMS 样品制备，添加内标物到样品中，然后加入乙腈混合，取培养基上清液，进而除去蛋白。

使用超纯水对有机溶剂沉淀后的离心上清液进行稀释，将稀释溶液作为样品，取 1uL 进 LCMS，进行 96 种化合物的同时定量分析。图 1 为细胞的生长曲线和生存率；图 2 为 5 天内代表性化合物的定量值（化合物与内标物的峰面积比值）。

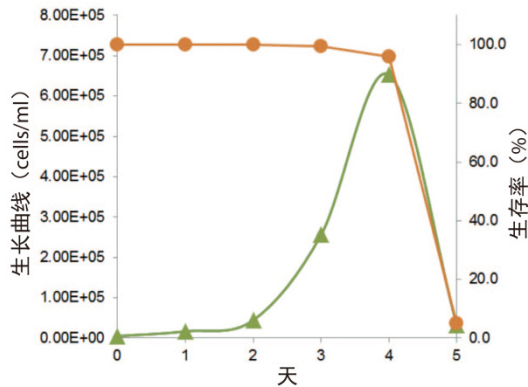


图 1 生长曲线和生存率
Cell Count and Viability

表 1 培养条件
Culture Conditions

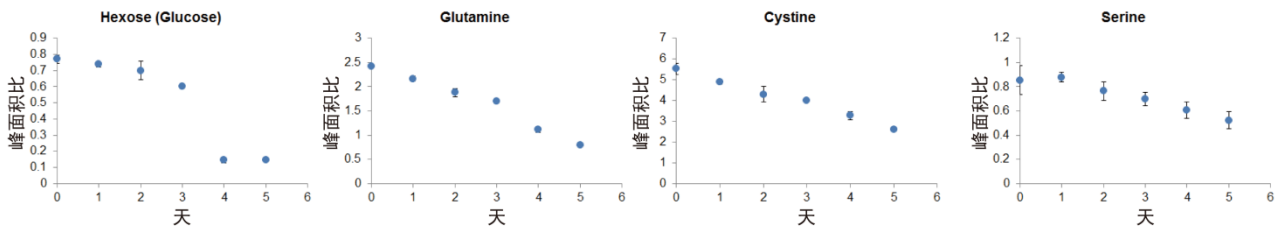
细胞	: SJK-287-38 (ATCC® CRL-1644™)
培养基	: DMEM (Low Glucose) + 10 % FBS + Gln, NaHCO ₃
条件	: 37 °C, 5 % CO ₂ , 120 rpm
比例	: 24 mL (N = 4)

培养上清液以及数据由极东制药工业株式会社提供。

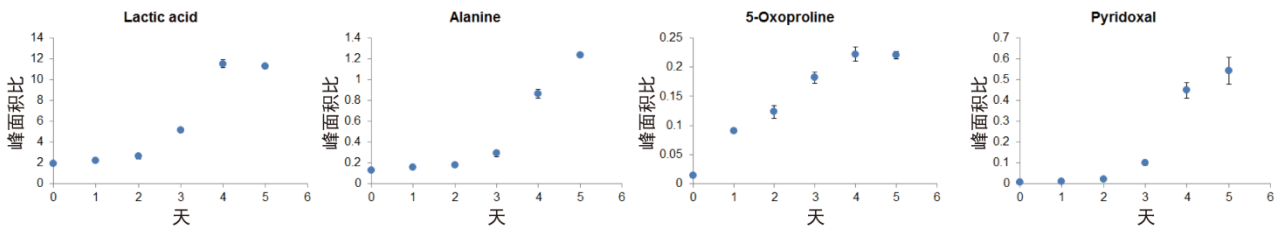
结果如下所示。对于主要的碳源和氮源即葡萄糖、谷氨酰胺以及几种氨基酸，由图 A 可知，随着细胞生长，信号强度逐渐减弱；由图 B 可知，因为消耗葡萄糖，所以分泌的代谢物乳

酸随着培养时间的延长，信号逐渐增强。观察其他几种化合物也表现为类似模式的增强。由图 C 可知，必需氨基酸和几种维生素的强度并不随着培养时间的延长而发生变化。

(A) 随着培养时间的延长，信号减弱的化合物示例



(B) 随着培养时间的延长，信号增强的化合物示例



(C) 随着培养时间的延长，未发现信号强度有变化的化合物示例

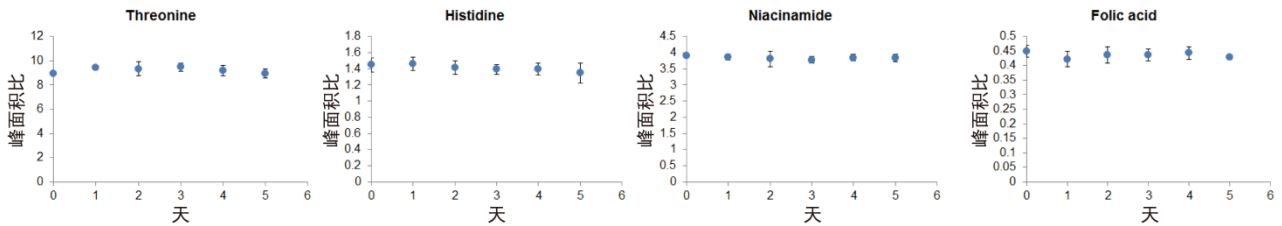


图 2 随着培养时间的延长，培养上清液成分的强度变化
Changes in Culture Supernatant Components during Cultivation with Time



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第二版发行日：2016 年 7 月