

细胞培养上清液分析技术在抗体生产细胞培养工艺筛选中的应用

LCMSMS-359

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用同时测定细胞培养上清液中 95 种组分，快速分析了用于抗体生产的 4 种培养工艺中 95 种化合物的相对含量变化趋势，从而判断细胞培养工艺的可行性并发现影响抗体产量和质量的关键因素。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分离，分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类化合物的高灵敏度快速检测。

关键词：超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 细胞培养工艺

抗体是机体体液免疫关键效应分子，同时还能辅助细胞免疫和补体系统，近年来随着杂交瘤技术、噬菌体文库技术、细胞大规模培养技术等迅猛发展，抗体已经可以在体外大规模生产，因其特异性强、治疗效果显著等特点，抗体已被广泛用于人类疾病的诊断、预防和治疗。在抗体生产过程中，为了提高抗体的质量和产量，需要对培养基、培养工艺进行优化，并考虑生产的线性放大等等。要实现培养基和培养工艺的优化，需要实时监控抗体生产过程中细胞培养上清液中关键因素的变化，从而得出最优化培养基和培养工艺。

为满足快速全面分析细胞培养上清液组分，将基础

碳源、氮源、核苷酸、维生素和其他主要代谢物一起检测分析，得到更多有关生物过程中的详细信息，我们开发出“细胞培养分析方法包”。该技术平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需 17 分钟，即可同时监测分析 95 种细胞培养上清液营养成分和代谢物的相对丰度变化。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用，利用“细胞培养分析方法包”建立了不同细胞培养工艺中营养物质和细胞代谢物的液相色谱 - 串联质谱的同时分析方法，供相关人员参考。

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×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：见“细胞培养分析方法包”

流动相：见“细胞培养分析方法包”

流速：0.35 mL/min

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI，正负离子同时扫描

离子源接口电压：+4.0 kV; -3.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气

进样体积：1 μ L

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱

时间程序：见“细胞培养分析方法包”

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：2.0-5.0 ms

MRM 参数：见“细胞培养分析方法包”

化合物：见表 1

1.4 样品制备

样品前处理方法：取 500 μL 细胞培养液，在室温下离心 1 分钟（3000 rpm），吸取 100 μL 离心后上清液到新的离心管中，然后加入 20 μL 2-异丙基苹果酸内标溶液（0.5 mmol/L），再加入 200 μL 乙腈，涡旋使充分混匀，室温下离心 15 分钟（15000 rpm），精密吸取上清液 100 μL ，加入 900 μL 水，涡旋混匀，上机前再用纯水稀释 100 倍。

表1 细胞培养方法包中96种化合物列表

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	33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	65	Cytidine	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	34	N-Acetylcysteine	氨基酸	66	Cytidine monophosphate	核苷酸
3	Glucosamine Carbohydrate	糖类	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose (Glucose) Carbohydrate	糖类	36	Oxidized glutathione	氨基酸	68	Guanine	核苷酸
5	Sucrose Carbohydrate	糖类	37	Phenylalanine	氨基酸	69	Guanosine	核苷酸
6	Threonic acid Carbohydrate	糖类	38	Pipecolic acid	氨基酸	70	Guanosine monophosphate	核苷酸
7	2-Amino adipic acid	氨基酸	39	Proline	氨基酸	71	Hypoxanthine	核苷酸
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	40	Serine	氨基酸	72	Inosine	核苷酸
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	73	Thymidine	核苷酸
10	5-Glutamylcysteine	氨基酸	42	Tryptophan	氨基酸	74	Thymine	核苷酸
11	5-Oxoproline	氨基酸	43	Tyrosine	氨基酸	75	Uracil	核苷酸
12	Alanine	氨基酸	44	Valine	氨基酸	76	Uric acid	核苷酸
13	Alanyl-glutamine	氨基酸	45	4-Aminobenzoic acid	维生素	77	Uridine	核苷酸
14	Arginine	氨基酸	46	Ascorbic acid	维生素	78	Xanthine	核苷酸
15	Asparagine	氨基酸	47	Ascorbic acid 2-phosphate	维生素	79	Xanthosine	核苷酸
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	核苷酸	94	Putrescine	其他
31	Methionine	氨基酸	63	Adenosine	核苷酸	95	Pyruvic acid	其他
32	Methionine sulfoxide	氨基酸	64	Adenosine monophosphate	核苷酸	96	Succinic acid	其他

结果与讨论

2.1 抗体生产细胞培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”中的方法对不同培养工艺的细胞培养上清液中组分进行分析，目标组分不同程度被检出，色谱图如图 1 所示。

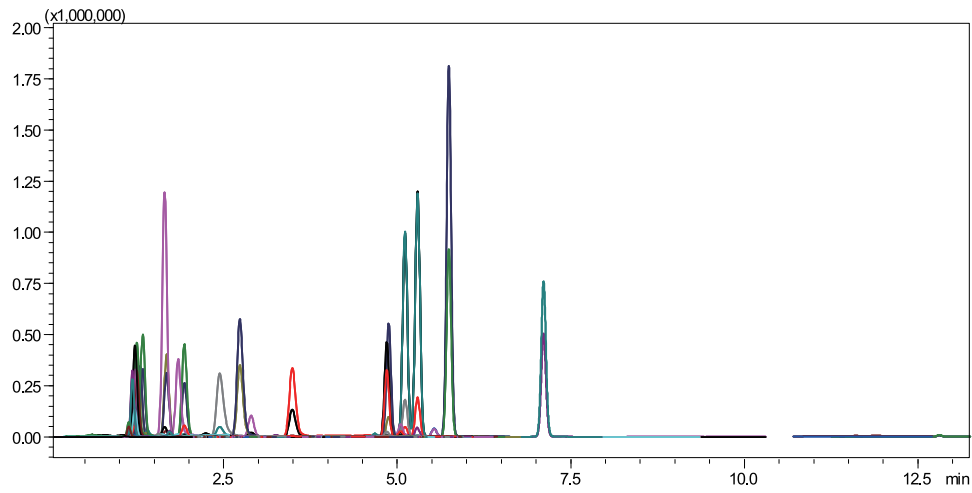
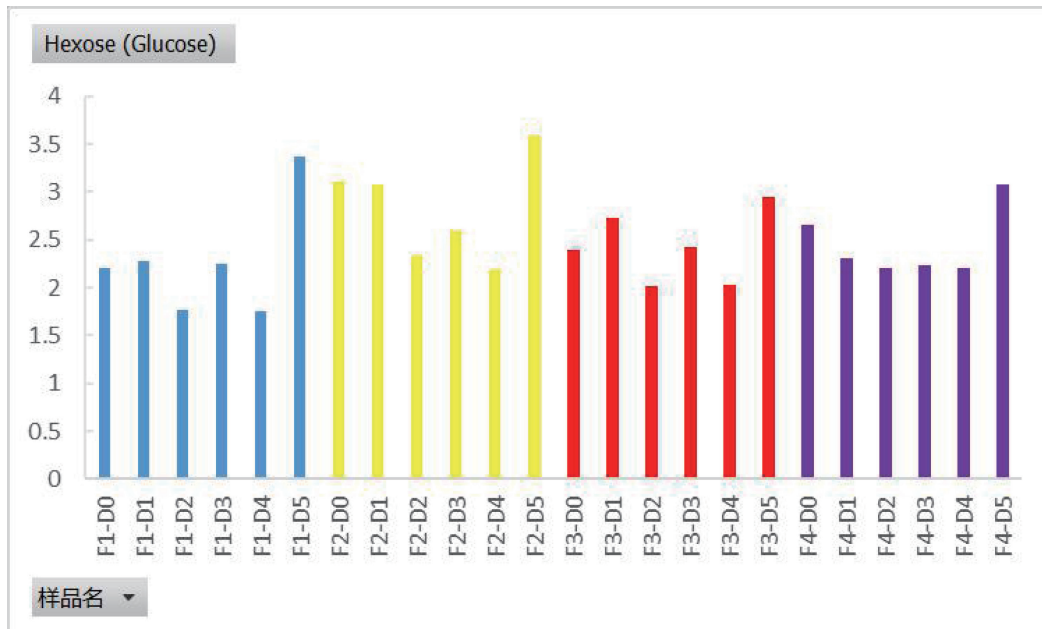


图1 F1-D3细胞培养上清液组分分析色谱图

2.2 用于抗体生产的4种细胞培养工艺中部分糖、氨基酸、核苷和维生素类化合物的含量变化趋势

以下各柱形图均以培养时间为横坐标，目标化合物与内标化合物的峰面积比为纵坐标进行绘图。

2.2.1 糖类化合物



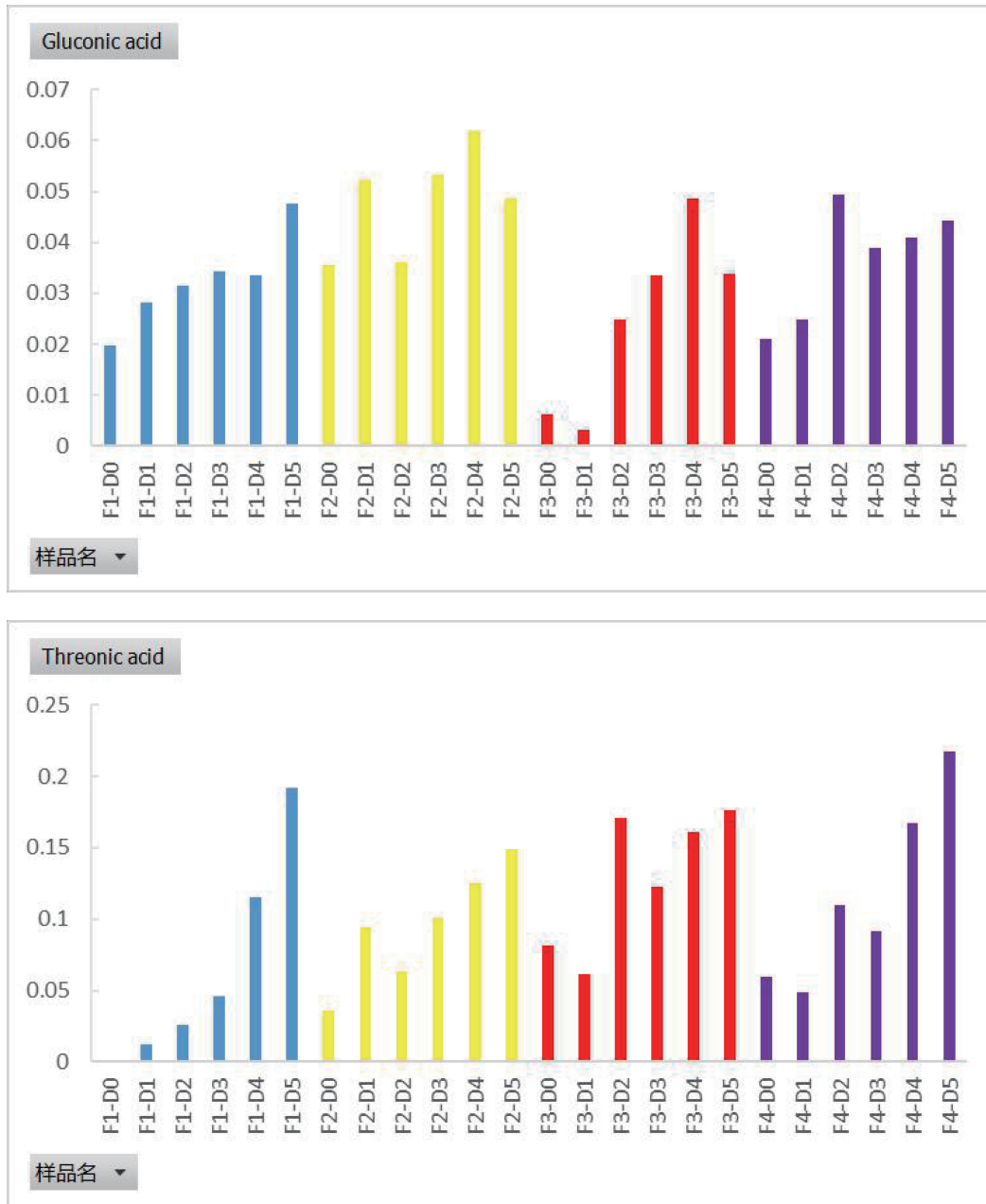


图2 用于抗体生产的4种细胞培养工艺中部分糖类化合物的相对含量变化趋势

用于抗体生产的4个不同细胞培养工艺中，葡萄糖（Glucose）的相对浓度基本维持在相当水平，变化幅度很小。葡萄糖酸（Gluconic acid）和苏糖酸（Threonic acid）的相对含量比较低，且在F1培养工艺中苏糖酸（Threonic acid）的相对含量随着培养时间的增加而增加，趋势明显。

2.2.2 氨基酸类化合物

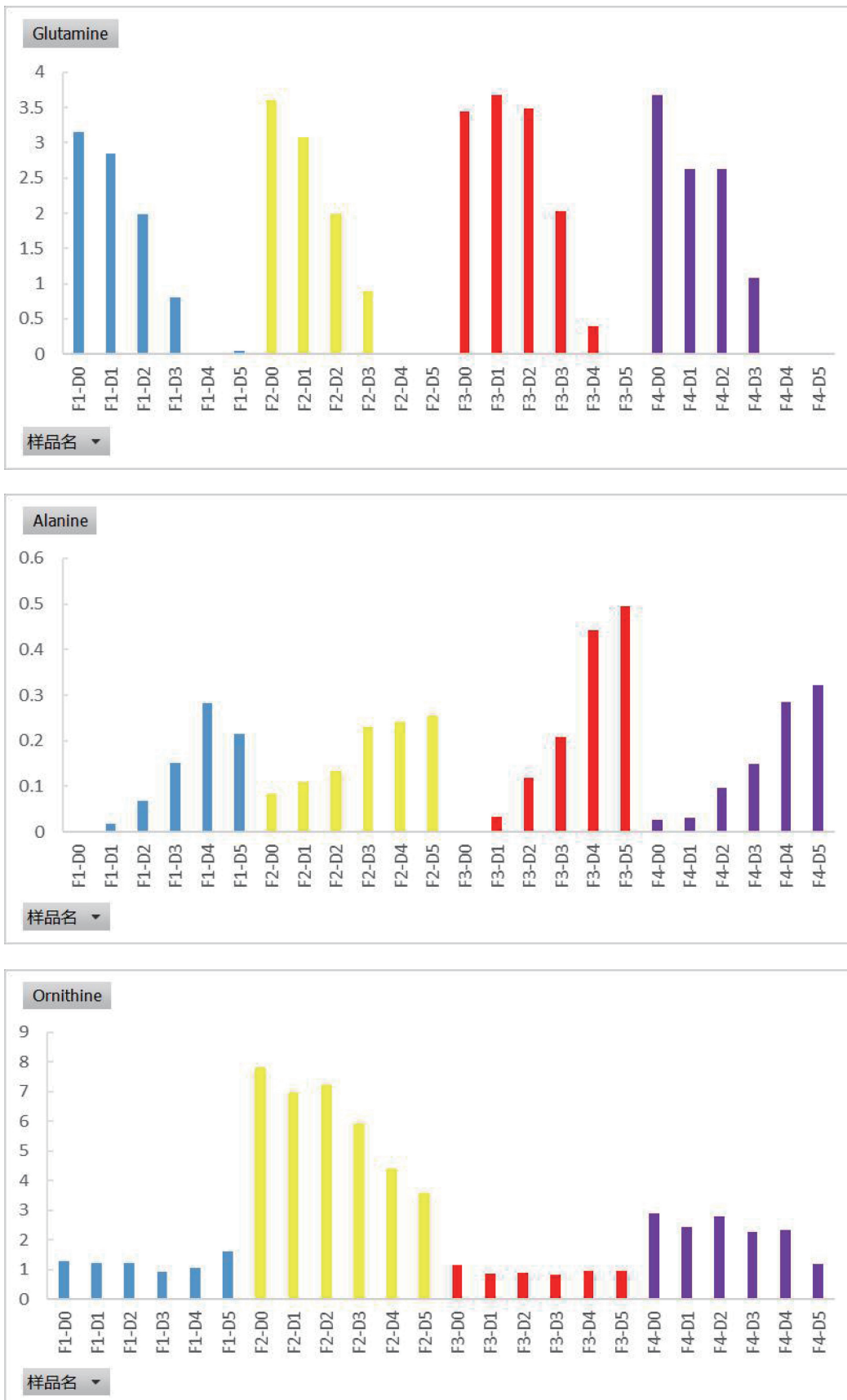
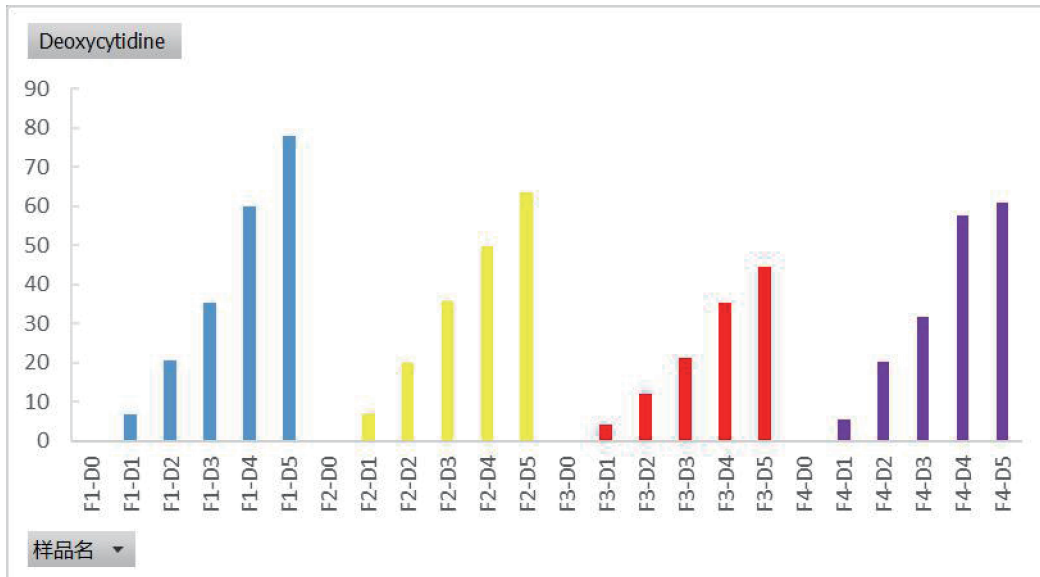
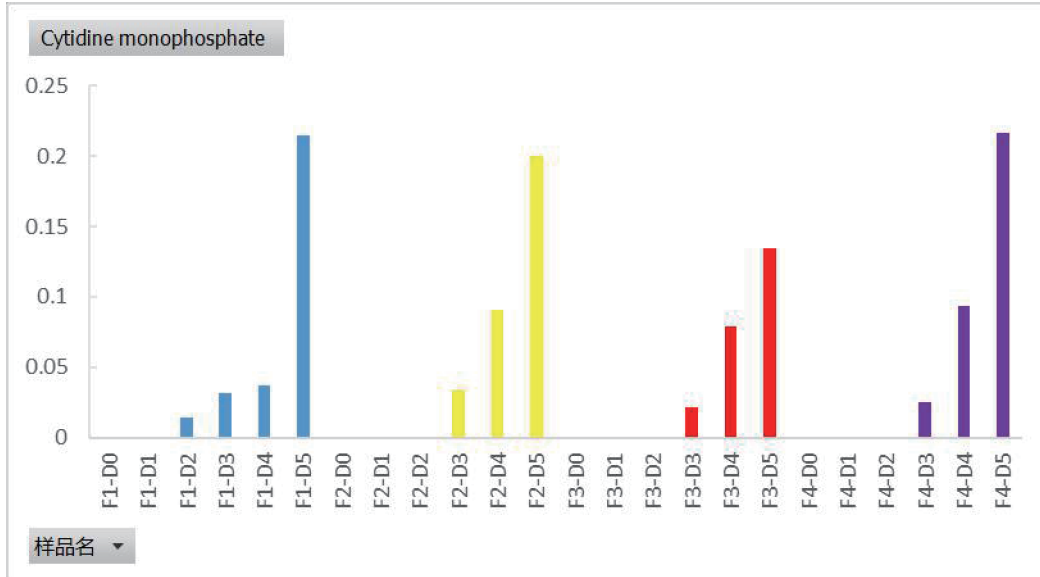


图3 用于抗体生产的4种细胞培养工艺中部分氨基酸类化合物的相对含量变化趋势

在 4 个不同的细胞培养工艺中，谷氨酰胺（Glutamine）消耗量比较大，在最后 2 天的培养过程中几乎耗尽，可根据目标产物的要求适当调整该氨基酸的添加量；丙氨酸（Alanine）随着培养时间的增加相对浓度逐渐变大，初步推断是细胞摄入过多葡萄糖，生成代谢废物丙氨酸；鸟氨酸（Ornithine）在培养过程中基本保持一个稳定浓度，变化微小，可结合最终抗体产物的质量和产量来适当调整该化合物的平衡浓度。

2.2.3 核苷类化合物



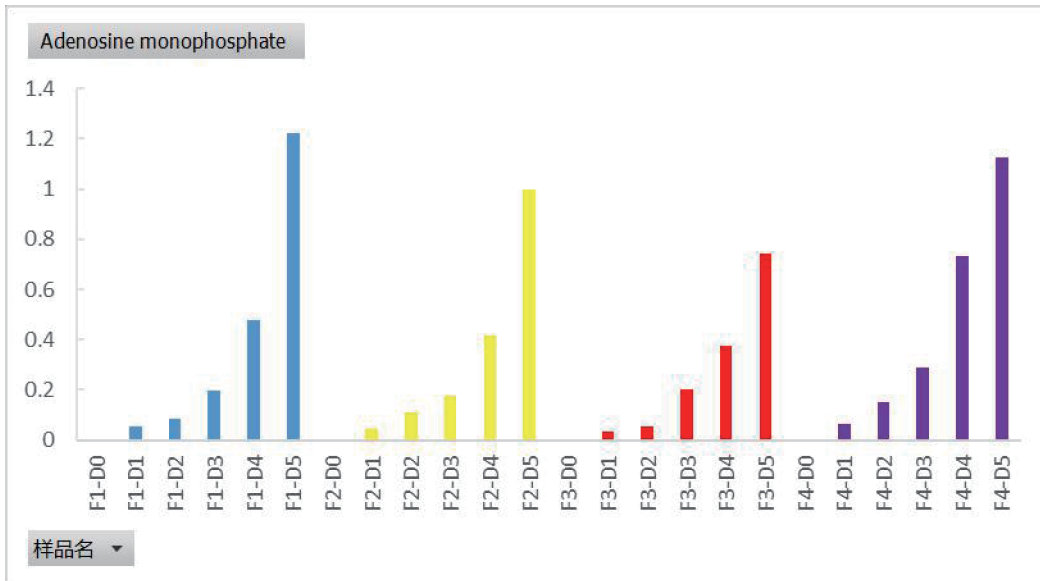


图4 用于抗体生产的4种细胞培养工艺中部分核苷类化合物的相对含量变化趋势

在4个不同的培养工艺中，核苷类化合物均随着培养时间的增加而增加，培养基中均不含这4个核苷类化合物。

2.2.4 维生素类化合物

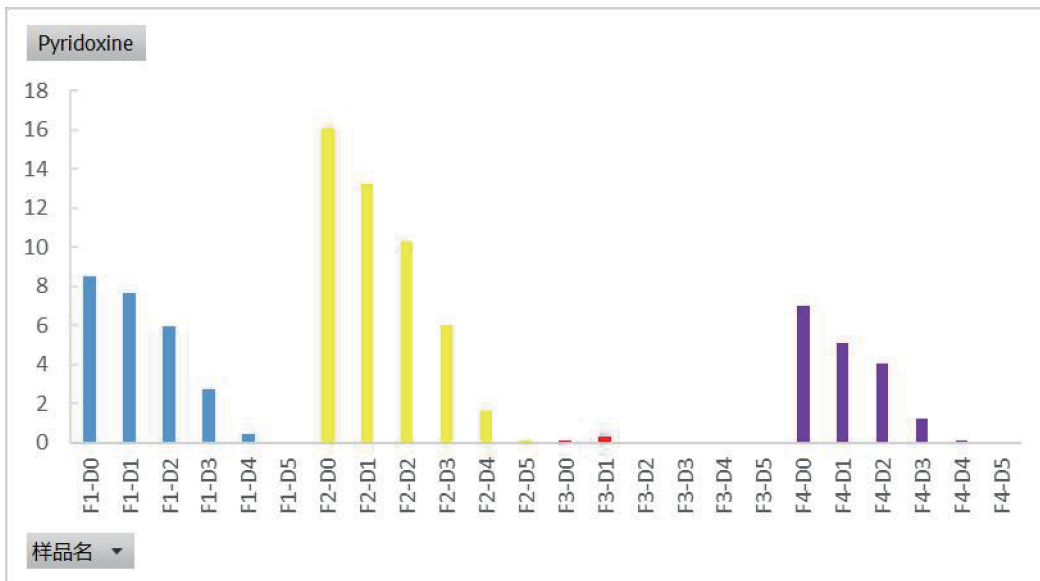




图5 用于抗体生产的4种细胞培养工艺中部分维生素类化合物的相对含量变化趋势

在4个不同培养工艺中生物素（Biotin）和叶酸（Folic acid）的相对浓度在5天的培养过程中维持在一定水平，而维生素B6（Pyridoxine）随着培养时间的增加，相对浓度逐渐减小，可对其浓度进行适当调整，从而保证目标抗体最终的质量和产量符合要求。

结论

采用岛津公司LCMS-8060三重四极杆液质联用仪，结合“细胞培养分析方法包”快速分析了用于抗体生产的4种培养工艺中95种化合物的相对含量，并对4个细胞培养工艺中部分糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类化合物随着培养时间的变化趋势进行了详细说明，结合抗体生产的质量和产量要求，选择高效快速的培养工艺，并发现影响抗体产量和质量的关键因素，该方法可为细胞培养工艺的选择和优化提供直接可靠的依据。