

岛津生物药整体解决方案（三）

——细胞培养上清液和培养基分析篇



目 录

前 言	2
“细胞培养上清液方法包” 介绍	3
第一部分 细胞培养基组分分析	5
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定不同哺乳动物细胞培养基组分差异	6
利用 LC-MS/MS 分析三种用于抗体药物生产的培养基组分差异	11
“细胞培养上清液方法包” 在体外生殖方面的应用	15
第二部分 细胞培养过程监控	19
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物	20
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物	25
利用 LC-MS/MS 同时测定哺乳动物细胞培养上清液中 95 种化合物	31
利用 LC-MS/MS 考察不同培养基对 CHO 细胞株培养的影响	36
利用 LCMS-8060 监控酿酒酵母培养过程中上清液组分变化	40
利用 LCMS-8060 监控微生物发酵过程中上清液组分变化	44
利用 LC-MS/MS 同时测定哺乳动物细胞培养上清液中多种组分	47

前言

现代生物技术一般认为包括基因工程技术、细胞工程技术、酶工程技术和发酵工程技术，而这些技术的发展几乎都与细胞培养有密切关系，特别是在医药领域的发展。比如基因工程药物或疫苗在研究生产过程中很多是通过细胞培养来实现的；细胞工程中更是离不开细胞培养，杂交瘤单克隆抗体，完全是通过细胞培养来实现的。正在倍受重视的基因治疗、细胞治疗也要经过细胞培养过程才能实现，发酵工程和酶工程有的也与细胞培养密切相关。总之，细胞培养在整个生物技术产业的发展中起到了关键的核心作用。

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是保证产品质量、产量以及批次之间一致性的重要因素，尤其是抗体药物偶联物、双靶点/特异抗体类药物、抗体片段融合蛋白等相对分子量大、结构复杂的抗体类药物，对其重要性不言而喻。而对于生物类似药的研发与质量控制来说，尽可能通过优化工艺缩小差异，更有利于生物类似药与原研参比品的质量对比研究，提高生物类似药的质量研究结果与参比品之间的相似性，从而使各项质量属性达到预先设置的可接受范围。

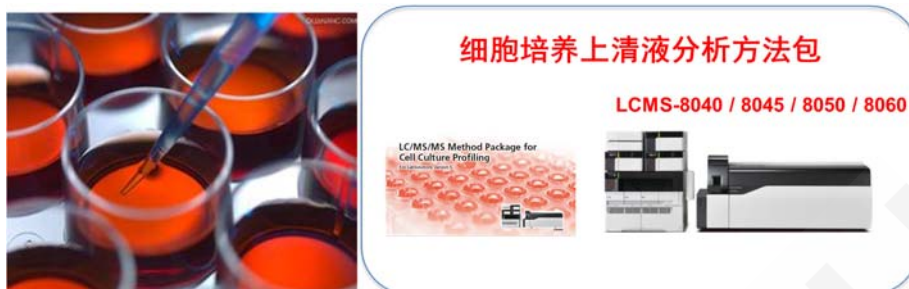
目前生物制品公司的生物过程工艺开发与优化偏重于监测常规的温度、搅拌、溶解气体、OD值等理化条件和少数培养基成分与代谢物等的变化，缺乏对于细胞培养上清液组分直接、全面且快速的客观动态数据分析，因此无法精准优化细胞培养工艺条件，甚至影响抗体类药物等的产品品质；而培养基生产商为了开发高效低成本培养基配方，并且要保证批次间一致性，则需要投入大量的人力物力，配备不同检测功能的仪器来实现培养基成分的全方位检测。为满足快速全面分析细胞培养上清液组分和培养基组分，将基础碳源、氮源、核酸、维生素和其他主要代谢物同时检测分析的需求，我们开发出“细胞培养上清液方法包”。该平台采用超快速三重四极杆液质联用仪，仅需 17 分钟，即可同时监测 95 种细胞培养上清液营养成分和代谢物等的相对丰度变化。无需用户自行开发方法，即装即用。所有目标化合物信息与实验方法全内置，且根据需要可增加，可拓展。

为增进用户对“细胞培养上清液方法包”的深入了解和方便使用，岛津企业管理(中国)有限公司分析中心整理编写了本册《岛津生物药整体解决方案(三)—细胞培养上清液和培养基分析篇》。本册文集介绍了“细胞培养上清液方法包”在不同培养基组分分析以及细胞培养过程监控中的应用，共收录应用文章 10 篇，为相关领域的客户使用该系统提供参考。

知识水平所限，文中难免存有不妥之处，恳请读者匡误斧正。

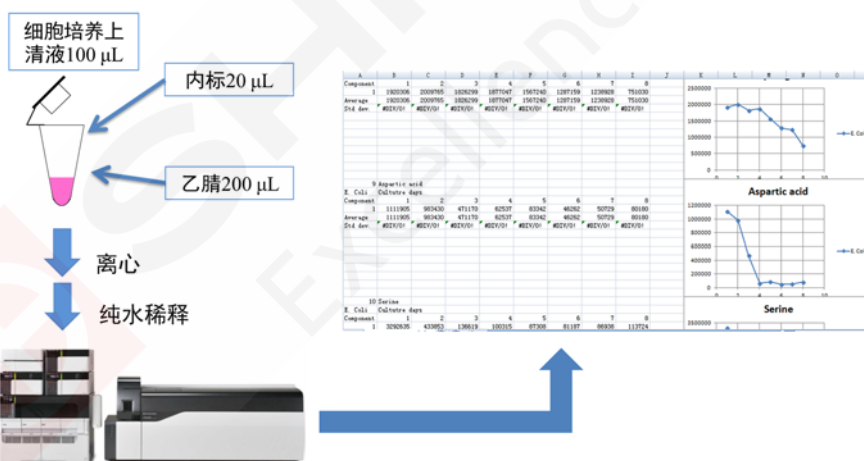
岛津企业管理(中国)有限公司
分析中心

“细胞培养上清液方法包” 介绍



“细胞培养上清液方法包”采用超快速三重四极杆液质联用仪（LCMS-8040/8045/8050/8060），仅需 17 分钟（包含分析时间和平衡时间），使用最优化的 MRM 参数，可同时监测分析 95 种化合物（不仅可分析培养基的基础成分也可分析细胞的代谢产物，包括氨基酸类、核苷酸类、维生素类、糖类以及其他类化合物等）的相对丰度变化。该方法包既可分析高浓度组分（例如葡萄糖和谷氨酰胺），也可分析低浓度组分（例如维生素等）。该方法包无需标准品，只需一个内标即可检测细胞培养过程中各组分随时间的变化曲线和培养批次间的一致性。如用户需要对培养基或者细胞培养上清液中组分进行绝对定量，则需要另行准备对应的标准品，从而通过内标法对组分进行绝对定量，可参考本文集中“细胞培养上清液方法包在体外生殖方面的应用”。

“细胞培养上清液方法包”前处理操作简单方便，流程如下图所示：



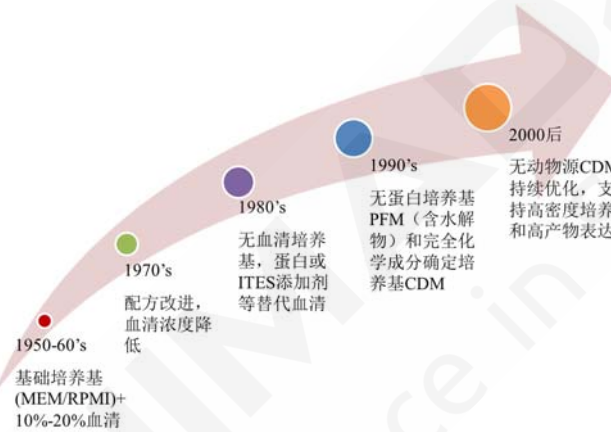
“细胞培养上清液方法包”中 95 个化合物（糖类、氨基酸类、维生素类、核苷酸类以及其他的抗生素、有机酸、生长因子等）列表详见表 1。该方法包所检测化合物可增加扩展，也可根据用户需求选择性除去不关注化合物。本文集中“利用 LCMS-8060 监控酿酒酵母培养过程中上清液组分变化”即加入了用户比较感兴趣 6 种化合物：Homocysteine, L-Homoserine, 3-OxoPrGSH, 3-OxoPrMCA, ACR-Cys 和 ACR-Hcy。

表 1. “细胞培养上清液方法包”中 96 种化合物列表 (包含一个内标)

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	其他
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

第一部分 细胞培养基组分分析

作为细胞生长的环境和营养来源，培养基的性能很大程度上决定了细胞密度和表达产物的产量和质量，因此培养基是工艺开发最重要的环节之一。1955 年 Eagle 博士发布细胞基础培养基配方，并指出培养基是“一个包含无机盐、氨基酸、糖、维生素及其它必须营养物的等渗透压且具有 pH 缓冲能力的混合物”，并在 1959 年提出了进一步改进的配方，并将该配方命名为“Minimal Essential Medium (MEM)”。MEM 配方需要在 10%以上牛血清浓度下才能支持细胞生长，即使在 60 多年后的今天 MEM 培养基仍然被用于研究领域和一些疫苗生产工艺里。血清含有上千种不同成分，为细胞体外培养提供广泛而丰富的营养和各种细胞因子，但动物血清的使用存在引进外源病毒的风险，因此减少血清浓度甚至完全去除血清对细胞培养有着重大的意义。



90 年代靶向重组蛋白药物的研发成为推动无血清培养基开发的新动力。1987 年美国 FDA 批准了首个通过动物细胞培养表达的重组蛋白药物：即组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (Tissue Plasminogen Activator, t-PA) 上市，自此动物细胞特别是 CHO 细胞被越来越广泛地应用于治疗性蛋白抗体的生产。多个后来成为“重磅炸弹”级别的蛋白抗体药获批上市对于培养基配方的开发起了巨大的推动作用：比如 1997 年 Rituxan 上市；1998 年 Herceptin、Remicade 和 Enbrel 上市；2002 年 Humira 上市、2004 年 Avastin 上市。这些靶向治疗药物的热销推动了工业界开发高密度培养工艺和高品质培养基的热情，21 世纪以来的十几年时间里几乎每个跨国制药公司都投入大量人力物力开发个性化化学成分确定培养基。目前几乎所有生物制药公司以及培养基公司都是通过不同的方法和仪器实现培养基组分检测，例如利用 HPLC 柱后衍生法检测氨基酸、利用比色法检测糖和维生素等，不仅耗时耗力，结果准确度也不高。因此为了推进生物技术药物的发展，实现细胞培养基的化学成分快速分析，岛津公司推出“细胞培养上清液方法包”，可快速检测培养基的化学组成，并比较不同批次间培养基的一致性。

该部分介绍了利用“细胞培养上清液方法包”在不同批次和不同种类培养基检测中的应用，为后续细胞培养中培养基的选择提供可靠的依据。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定不同哺乳动物细胞培养基组分差异

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-8050 联用同时测定 3 种哺乳动物细胞培养基中 95 种化合物的方法。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, 适合哺乳动物细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等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 哺乳动物细胞培养基

哺乳动物细胞培养时一般需加入一定量血清, 以提供必要的营养成分和细胞调节因子。但是实际生产时很难保证不同批次间血清的一致性, 而且血清对哺乳动物细胞存在潜在的毒性作用和外源污染等。为了避免不同批次间血清的质量变动, 提高细胞培养和实验结果的重复性, 避免血清对细胞的毒性作用和血清源性污染等, 很多细胞培养基开发商开始研究开发无血清细胞培养基, 即在细胞培养基中加入某些组分来替代血清。因此我们首先需要分析检测添加了血清的培养基和未添加血清的培养基之间的差异性, 尽可能多地分析培养基中各组分的相对含量以及不同组分间的配比。

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“细胞培养上清液方法包”。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份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-8050联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了哺乳动物细胞培养基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。

1. 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-8050 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

流动相: 见“细胞培养上清液方法包”

色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”

流速: 0.35 mL/min

进样体积: 1 μ L

洗脱方式: 梯度洗脱

柱温: 40°C

时间程序: 见“细胞培养上清液方法包”

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8050	脱溶剂管温度:	250°C
离子源:	ESI, 正负离子同时扫描	加热模块温度:	400°C
离子源接口电压:	+4.0 kV; -3.0 kV	接口温度:	300°C
雾化气:	氮气 3.0 L/min	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
干燥气:	氮气 15 L/min	驻留时间:	2.0-5.0 ms
加热气:	空气 10 L/min	MRM 参数:	见“细胞培养上清液方法包”
碰撞气:	氩气	化合物:	见第 4 页表 1

1.3 培养基相关信息

1#培养基: 无血清

2#培养基: 1#培养基+血清 A

3#培养基: 1#培养基+血清 B

1.4 数据处理

软件: LabSolutions

Traverse MS

1.5 样品制备

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

2. 结果及讨论

2.1 哺乳动物细胞培养基上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对哺乳动物细胞培养基中组分进行分析, 目标组分不同程度被检出, 色谱图如图 1 所示。

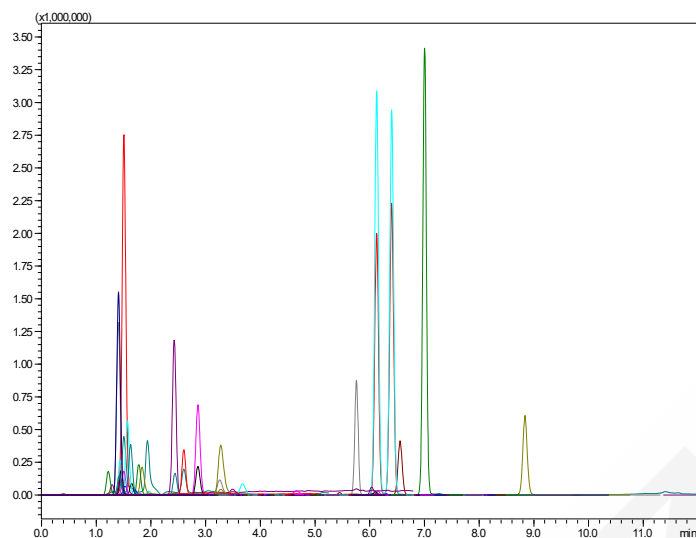


图1 4#培养基上清液分析色谱图

2.2 三种哺乳动物细胞培养基中部分糖、氨基酸和维生素类化合物的含量差异

2.2.1 糖类化合物

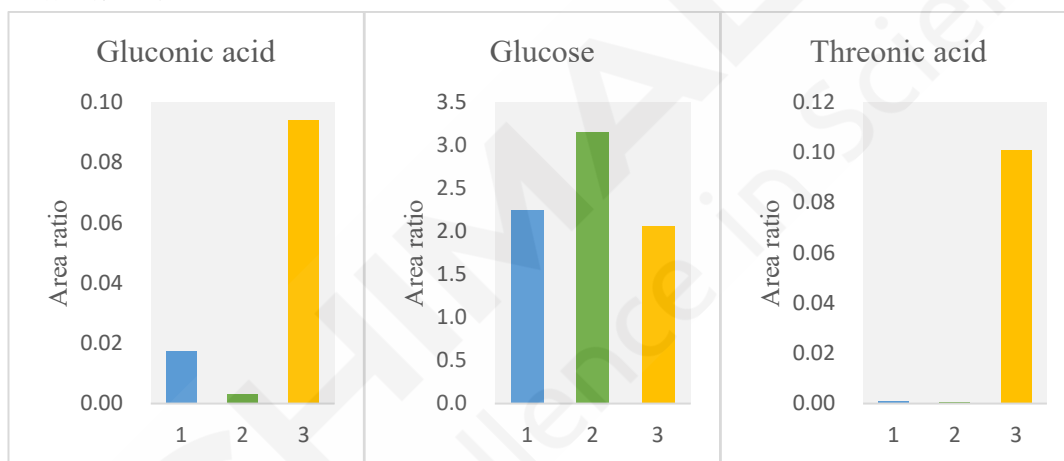


图2 3种哺乳动物细胞培养基中部分糖类化合物的相对含量差异

由图2可知添加了血清B的3#培养基中葡萄糖酸（Gluconic acid）和苏糖酸（Threonic acid）的相对含量明显高于未添加血清的1#培养基。所以为了配制营养丰富的无血清培养基，可以考虑在1#培养基中提高葡萄糖酸和苏糖酸的含量；另外图2表明不同批次的血清中葡萄糖酸和苏糖酸含量差异比较大，所以为了保证培养基批次间一致性，最好调整培养基各组分含量，配制营养丰富的无血清培养基，避免使用天然血清。

2.2.2 氨基酸类化合物

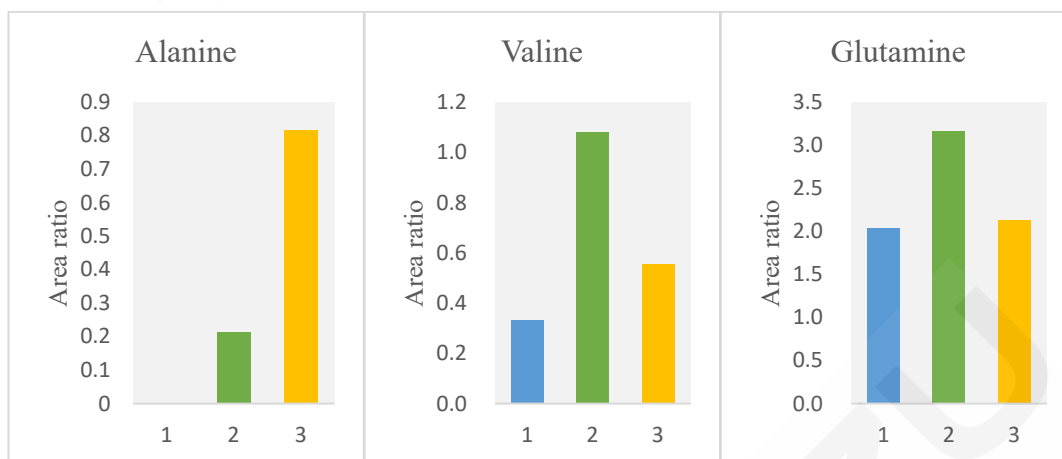


图3 3种哺乳动物细胞培养基中部分氨基酸类化合物的相对含量差异

由图3可知加入血清后，培养基中丙氨酸 (alanine) 和缬氨酸 (valine) 的含量明显提高，因此为了保证哺乳动物细胞培养中对丙氨酸的需求量，可以考虑在配制无血清培养基时适当提高这些氨基酸的含量并调整各氨基酸之间的配比；另外从图3中可看出加入了不同批次血清的2#和3#培养基中丙氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺 (glutamine) 相对含量差异较大，再次说明不同批次间血清组分含量差异性较大。

2.2.3 核苷酸类化合物

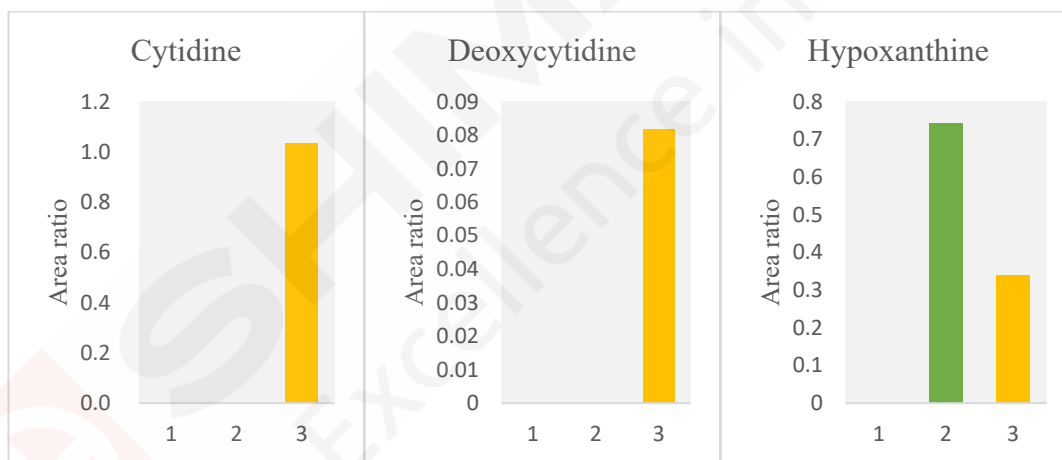


图4 3种哺乳动物细胞培养基中部分核苷酸类化合物的相对含量差异

由图4可知不含血清的1#培养基中胞苷 (cytidine)、脱氧胞苷 (deoxycytidine) 和次黄嘌呤 (hypoxanthine) 的相对含量明显低于加了血清的2#和3#培养架，因此在做哺乳动物细胞培养时可根据具体的培养要求，可适当调整核苷酸类化合物的含量。

2.2.4 维生素类化合物

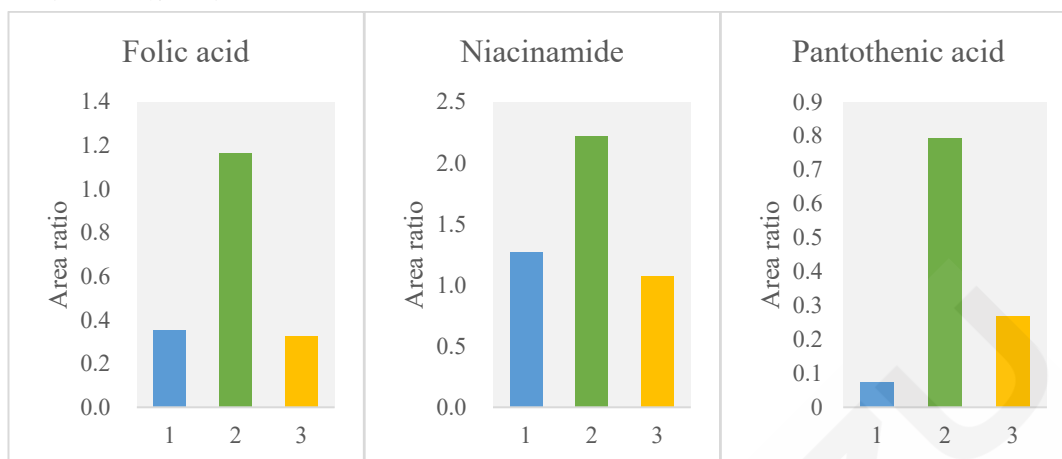


图 5 3 种哺乳动物细胞培养基中部分维生素类化合物的相对含量差异

由图 5 可知，加入了不同批次血清的 2#和 3#培养基中叶酸（folic acid）、烟酰胺（niacinamide）和维生素 B5（pantothenic acid）相对含量有所差异；维生素 B5（pantothenic acid）在未添加血清的 1#培养基中含量明显低于加了血清的培养基，因此在配制营养丰富的无血清培养基时可考虑适当提高维生素 B5 的含量。

3. 结论

采用岛津公司 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪分析 3 种哺乳动物细胞培养基中 95 种组分相对含量之间的差异。利用岛津“细胞培养上清液方法包”快速分析了 3 种培养基中 95 种化合物的相对含量，并对培养基中糖类、氨基酸类、核苷酸类和维生素类化合物在 3 种培养基中的分布情况以图表的形式进行了详细说明。通过比较含血清培养基和无血清培养基中各营养成分的差异，可以适当调整无血清培养基中各组分的含量，从而配制符合要求的营养丰富的无血清培养基。

利用 LC-MS/MS 分析三种用于抗体药物生产的培养基组分差异

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-8045 联用同时测定 3 种用于抗体药物生产的培养基中 95 种化合物的方法。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分析, 速度快、重复性好、灵敏度高, 适用于抗体药物生产的培养基中氨基酸类、维生素类和其他类影响因子的高灵敏度快速检测。利用该方法可快速对比不同类别和不同批次培养基之间的组分差异, 从而根据抗体生产的要求选择合适的培养基, 提高抗体生产效率。

关键词: 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 抗体药物生产 培养基

动物细胞大规模培养和抗体质量分析已然成为抗体药物产业化的主要限制因素。培养基优化作为动物细胞大规模培养的关键环节, 对抗体质量的影响显得尤为重要。众所周知, 培养基开发与生产用细胞株特征关系密切, 因此, 在培养基开发过程中需要围绕生产用细胞株的特点进行“个性化培养基”的设计与优化, 了解每种细胞在培养过程中对各种营养成分的消耗, 以及自身分泌物对细胞生产繁殖的影响。

为满足快速全面分析细胞培养基组分, 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“细胞培养上清液方法包”。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份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-8045 联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了用于抗体药物生产的培养基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。

1. 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-8045 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-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.86 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	进样体积: 1 μ L
色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”	柱温: 40°C
流动相: 见“细胞培养上清液方法包”	洗脱方式: 梯度洗脱
流速: 0.35 mL/min	时间程序: 见“细胞培养上清液方法包”

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8045	脱溶剂管温度:	250°C
离子源:	ESI, 正负离子同时扫描	加热模块温度:	400°C
离子源接口电压:	+4.0 kV; -3.0 kV	接口温度:	300°C
雾化气:	氮气 3.0 L/min	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
干燥气:	氮气 15 L/min	驻留时间:	4.0-97.0 ms
加热气:	空气 10 L/min	MRM 参数:	见“细胞培养上清液方法包”
碰撞气:	氩气	化合物:	见第 4 页表 1

1.3 培养基

三种用于抗体药物生产的培养基分别为：1#培养基、2#培养基和 3#培养基。

1.4 数据处理

软件：LabSolutions

Traverse MS

1.5 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 10 倍。

2. 结果及讨论

2.1 用于抗体药物生产的培养基组分分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对用于抗体药物生产的培养基中组分进行分析，目标组分不同程度被检出，色谱图如图 1 所示。

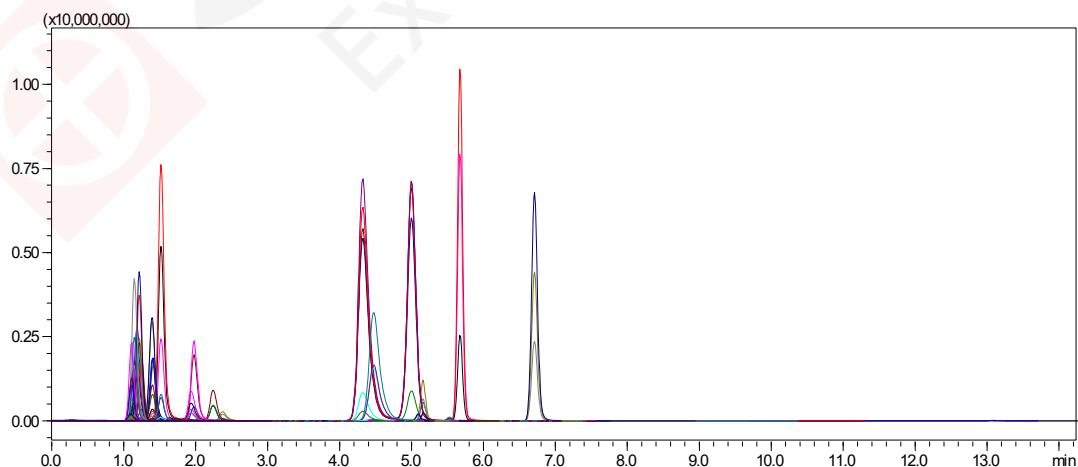


图 1 1#培养基上清液分析色谱图

2.2 三种用于抗体药物生产的培养基中部分氨基酸、维生素和其他类化合物的含量差异

2.2.1 氨基酸类化合物

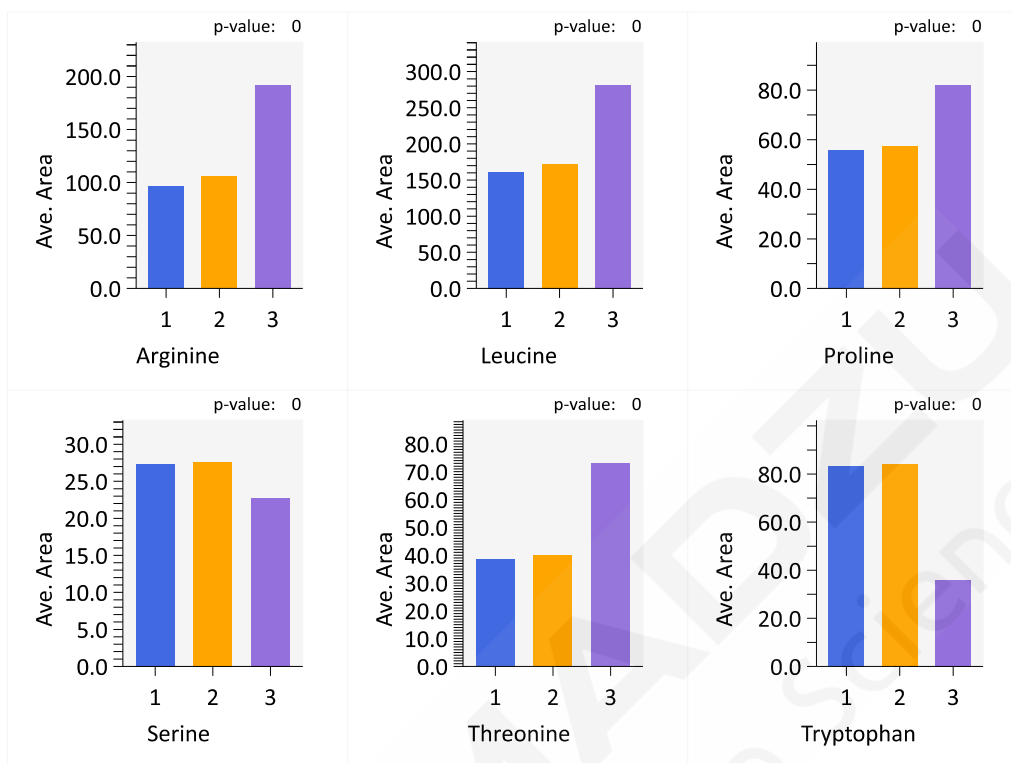


图2 3种用于抗体药物生产的培养基中部分氨基酸类化合物的相对含量差异

2.2.2 维生素类化合物

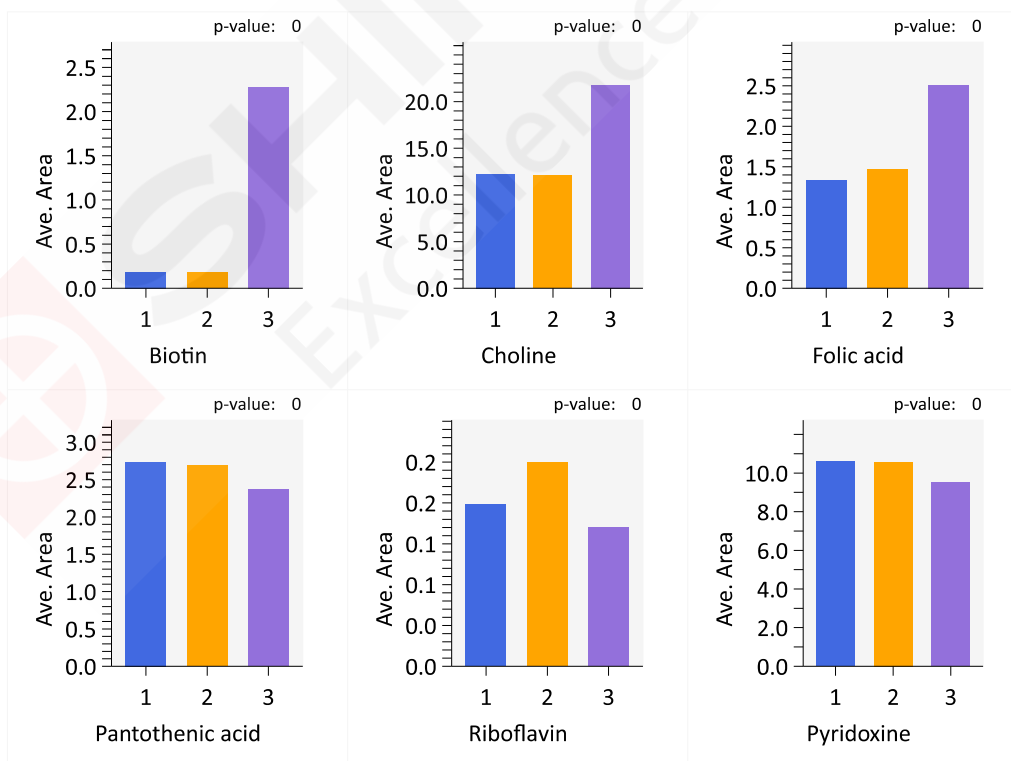


图3 3种用于抗体药物生产的培养基中部分维生素类化合物的相对含量差异

2.2.3 其他类化合物

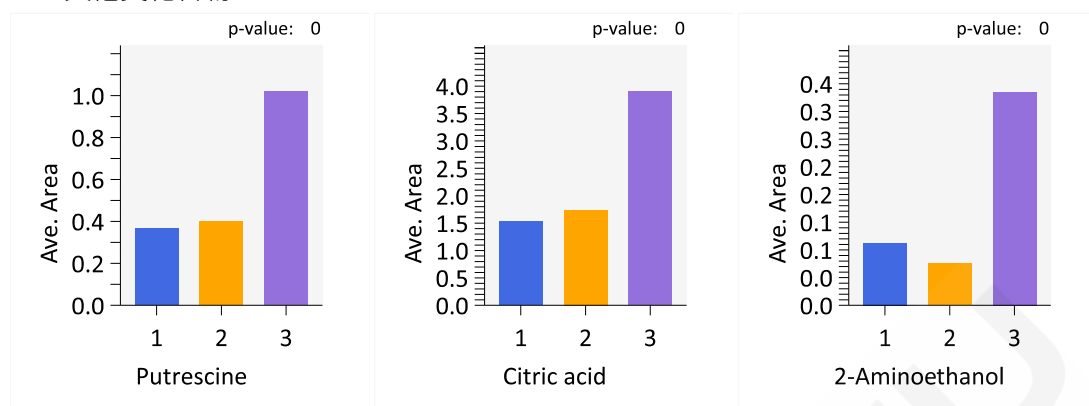


图 4 3 种用于抗体药物生产的培养基中其他类化合物的相对含量差异

图 2-4 中纵坐标为峰面积比，横坐标代表 3 个培养基样品。结果显示 1#和 2#培养基中每个对应的氨基酸、维生素和其他类化合物的峰面积比相差不大，表明这两个培养基组成以及比例相近，而 3#培养基样品与 1#和 2#相差比较大。

3. 结论

采用岛津公司 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪分析 3 种用于抗体药物生产的动物细胞培养基中 95 种组分相对含量之间的差异。利用岛津“细胞培养上清液方法包”快速分析了 3 种培养基中 95 种化合物的相对含量，并对培养基中糖类、氨基酸类和其他类化合物在 3 种培养基中的分布情况以图表的形式进行了详细说明。

“细胞培养上清液方法包”在体外生殖方面的应用

摘要：本文使用细胞培养基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 细胞培养基上清液分析方法包 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基上清液分析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。

1. 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-20A₅ 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

液相色谱条件

色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”
流速: 0.35 mL/min
进样量: 1 μL

流动相: 见“细胞培养上清液方法包”
柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$
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(+/-)

接口温度: 300°C

加热气: 空气 10.0 L/min

DL 温度: 250°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400°C

干燥气: 氮气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

化合物信息: 见第 4 页表 1

1.3 样品前处理方法

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

2. 结果与讨论

2.1 部分组分 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:

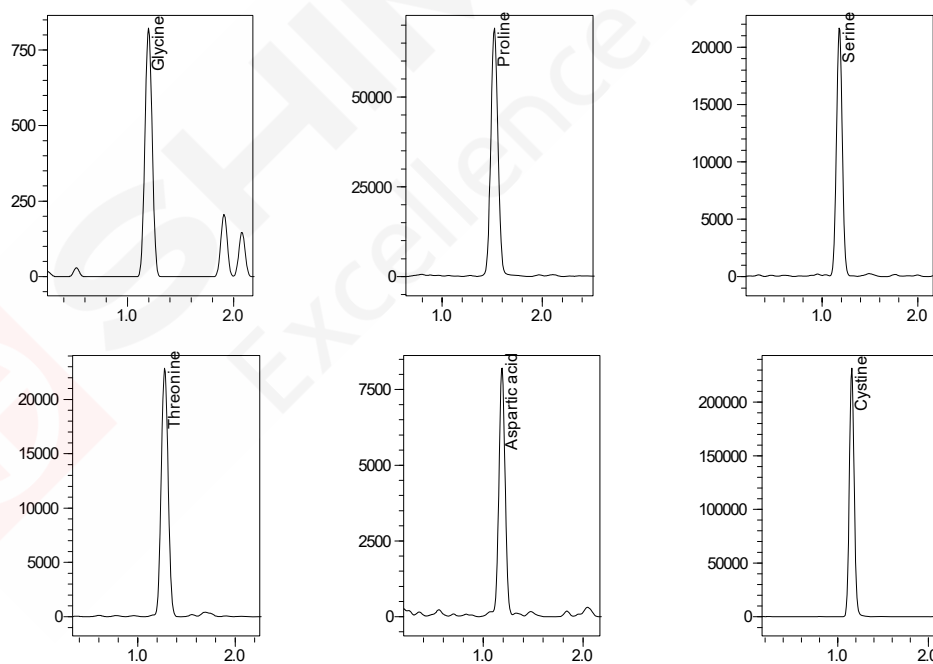


图 1 部分氨基酸标准品色谱图 (0.25 $\mu\text{mol/L}$)

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。

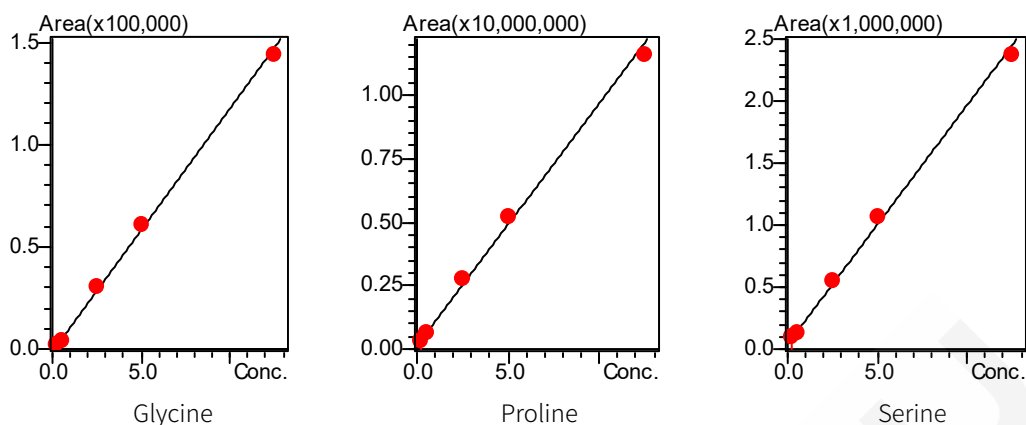


图 2 部分氨基酸标准工作曲线

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：

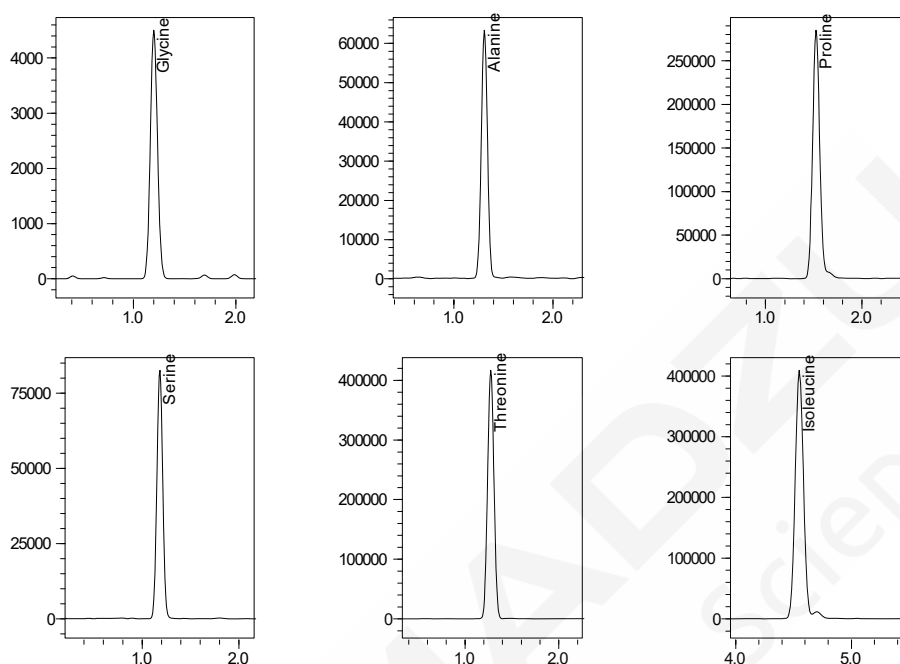


图 3 实际样品中部分氨基酸组份色谱图

表 4 市售细胞培养液中氨基酸定量结果

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

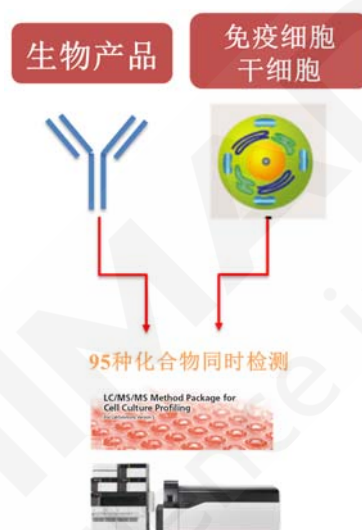
3. 结论

本文利用“细胞培养基上清液分析方法包”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 $0.25\sim 12.5\ \mu\text{mol/L}$ 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。

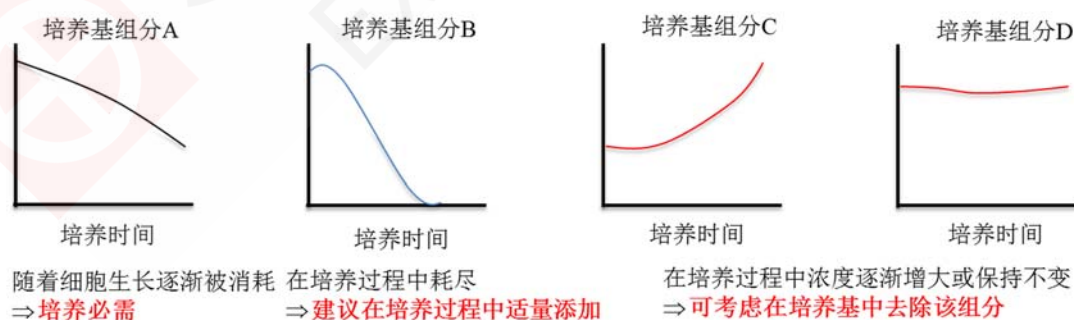
第二部分 细胞培养过程监控

过程监控是指应用各种监测技术对培养过程中状态变量的变化进行追踪,当这些变量与预测值或与预期变化方式相偏离时,通过过程检测的手段可以及早发现并进行相应的调控,以使培养过程向预期或者更好的方向发展。而目前细胞培养的生物过程工艺开发与优化偏重于监测常规的温度、搅拌、溶解气体、OD 值等理化条件和少数培养成份与代谢物等的变化,缺乏对于细胞培养上清液组份直接、全面且快速的客观动态数据分析,因此无法精准的优化调整细胞培养工艺条件与培养基配比,甚至影响抗体类药物等的产品品质。

为满足快速全面分析细胞培养上清液组份,将基础碳源、氮源、核酸、维生素和其他主要代谢物同时检测分析的需求,得到更多有关生物过程中相关化合物含量变化的详细信息,我们开发出“细胞培养上清液方法包”。



该部分内容介绍了用于抗体药物生产的 CHO 细胞株、哺乳动物细胞、细菌、链霉菌和真菌培养过程中利用“细胞培养上清液方法包”对培养过程中上清液组分进行监控,从而对培养工艺的改进提供可参考的依据。



超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物

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-8050 联用同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物。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、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等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 细菌培养上清液

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是生物技术药物生产工艺的核心内容之一。适宜的培养基组成与优选的细胞培养条件对于提高重组蛋白类药物的产率, 保证产品批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要, 尤其是ADC、Bi-specific、Fc Fusion Protein 等相对分子量大、结构复杂的抗体类药物, 对其重要性不言而喻。对于培养基生产商和自行配制培养基的细胞培养公司而言, 了解培养基中各组分在培养过程中的变化以及对目标产物质量和产量的影响至关重要, 因此我们需要尽可能多的了解培养基配方中各组分的含量在整个细胞培养过程中的变化趋势。

目前生物过程工艺开发与优化偏重于检测常规的温度、搅拌、气体溶解量和OD值等理化条件以及少数培养成分与代谢物的变化, 缺乏对于细胞上清液组分直接、全面和快速的客观动态数据分析, 因此无法精准优化调整细胞培养工艺条件和培养基中各组分分配比。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“细胞培养上清液方法包”。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, 即可同时监测分析下列95种细胞培养上清液营养成份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-8050联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了藤黄杆菌培养上清液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。

1. 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-8050 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

色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”	柱温: 40°C
流动相: 见“细胞培养上清液方法包”	洗脱方式: 梯度洗脱
流速: 0.35 mL/min	时间程序: 见“细胞培养上清液方法包”
进样体积: 1 μ L	

质谱条件

离子源: ESI, 正负离子同时扫描	加热模块温度: 400°C
离子源接口电压: +4.0 kV; -3.0 kV	接口温度: 300°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
干燥气: 氮气 15 L/min	驻留时间: 2.0-5.0 ms
加热气: 空气 10 L/min	MRM 参数: 见“细胞培养上清液方法包”
碰撞气: 氩气	化合物: 见第 4 页表 1
脱溶剂管温度: 250°C	

1.3 菌株相关信息

菌株: 藤黄杆菌 (细菌)

培养时间: 12 小时

1.4 样品制备

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

2. 结果及讨论

2.1 藤黄杆菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对藤黄杆菌培养上清液中的组分进行分析, 目标组分不同程度的被检出, 色谱图如图1所示。

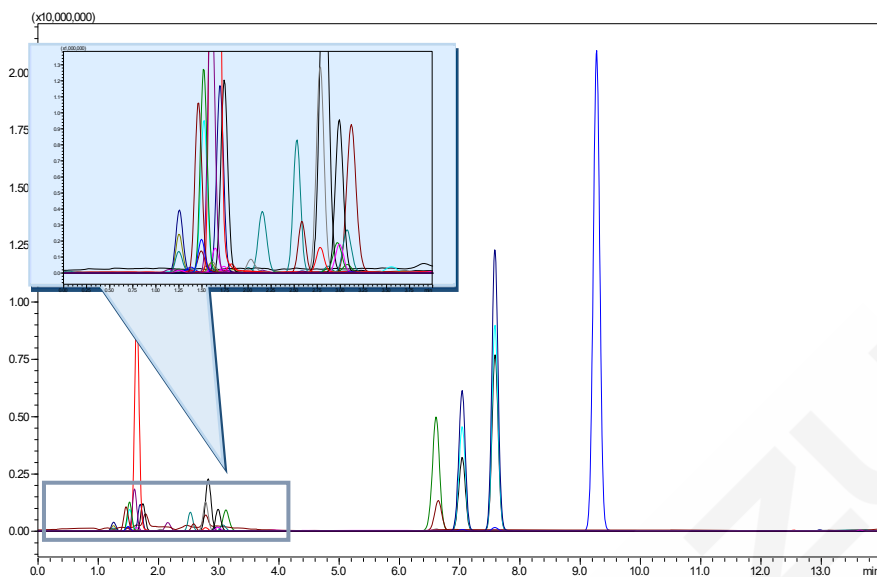


图1 藤黄杆菌上清液 (4 h) 分析色谱图

2.2 在细胞培养过程中部分营养物质和代谢物质峰面积与内标峰面积比值变化趋势

2.2.1 随着培养时间增长峰面积比逐渐增加的化合物

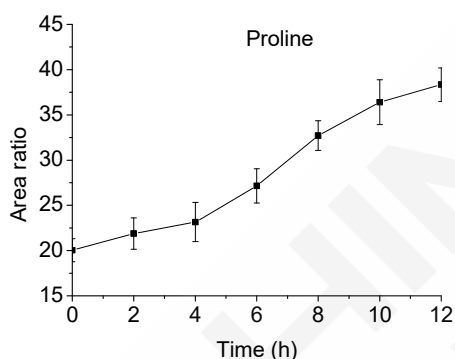


图2 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

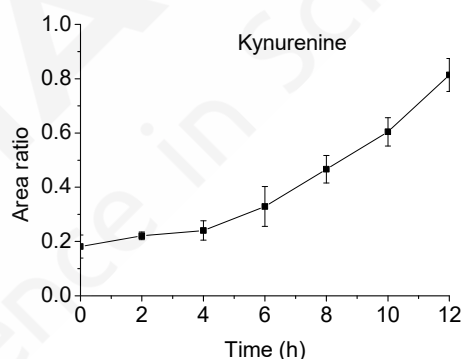


图3 犬尿氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

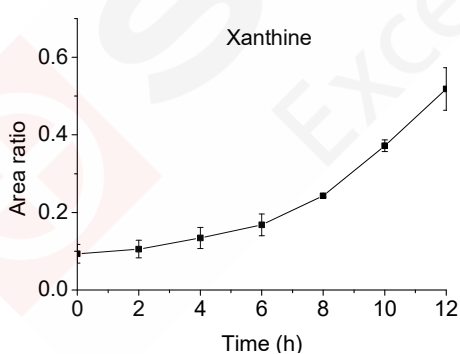


图4 黄嘌呤在培养过程中峰面积比变化趋势

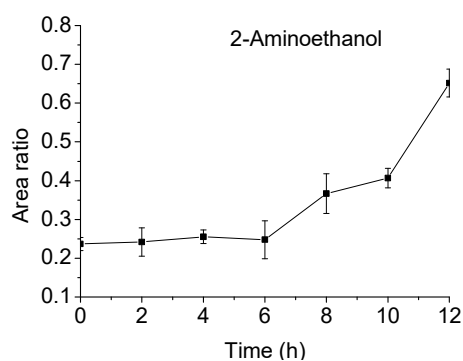


图5 2-氨基乙醇在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.2 随着培养时间增长峰面积比逐渐减小的化合物

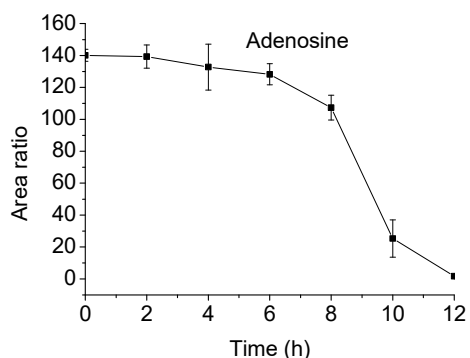


图 6 腺苷在培养过程中峰面积比变化趋势

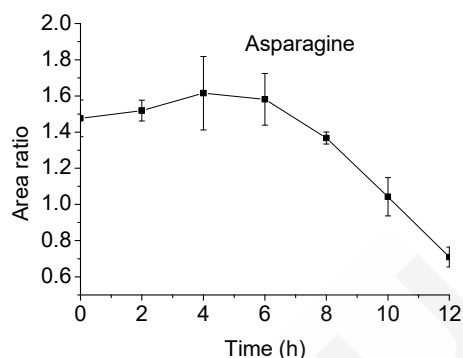


图 7 天冬酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势

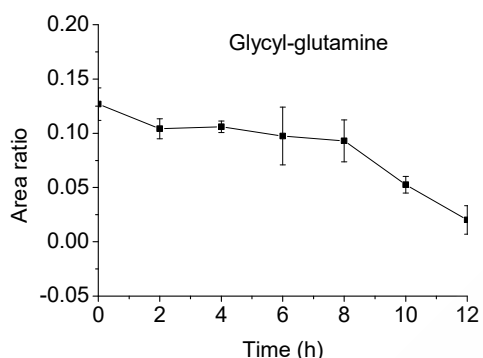


图 8 氨基乙酰基谷氨酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势

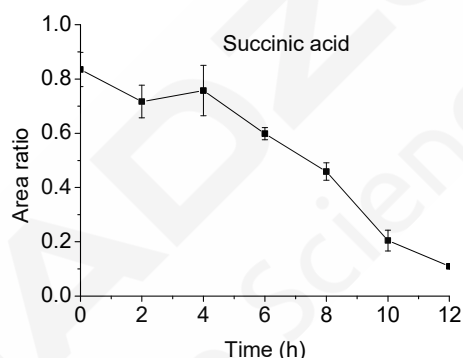


图 9 琥珀酸在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.3 随着培养时间增长峰面积比几乎不变的化合物

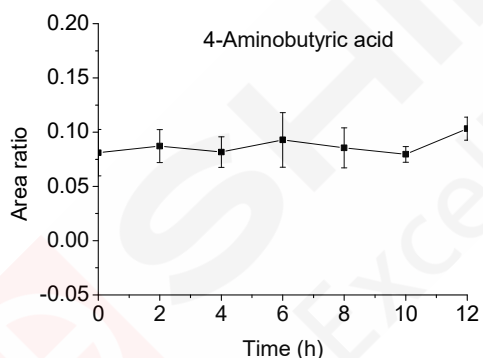


图 10 4-氨基丁酸在培养过程中峰面积比变化趋势

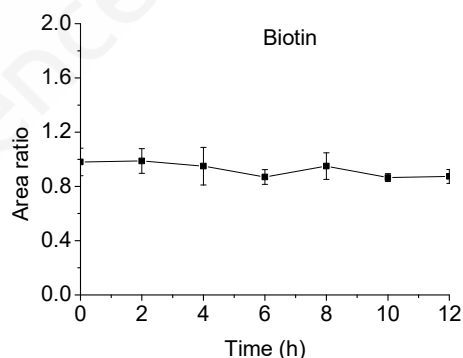


图 11 生物素在培养过程中峰面积比变化趋势

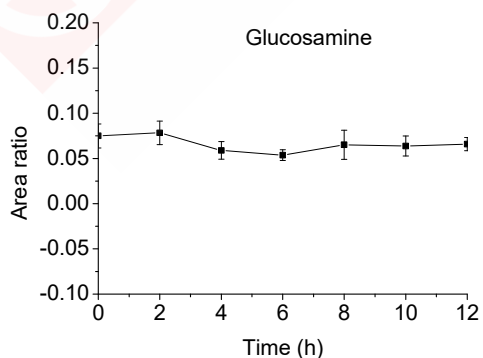


图 12 葡萄糖胺在培养过程中峰面积比变化趋势

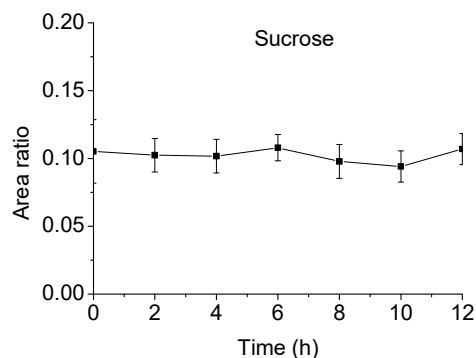


图 13 蔗糖在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.4 随着培养时间增长峰面积比先增加后减少的化合物

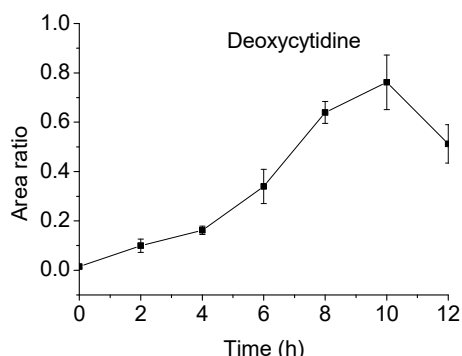


图 14 脱氧胞苷在培养过程中峰面积比变化趋势

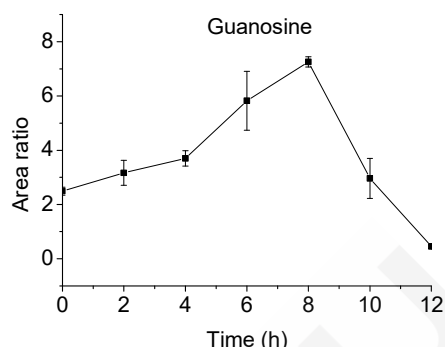


图 15 鸟苷在培养过程中峰面积比变化趋势

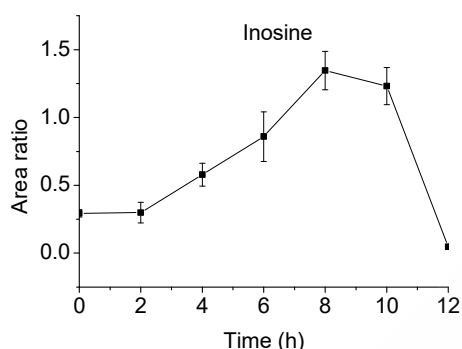


图 16 肌苷在培养过程中峰面积比变化趋势

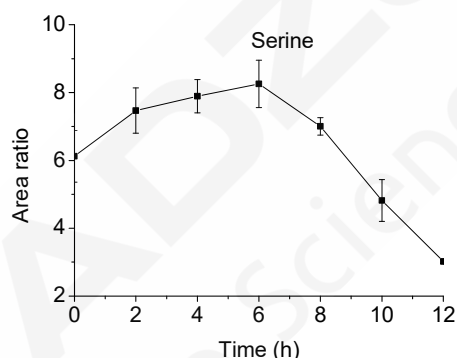


图 17 丝氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图2-5可知，脯氨酸和犬尿氨酸（氨基酸）、黄嘌呤（核苷酸）、2-氨基乙醇的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间逐渐增大，说明在此培养条件下，这些化合物的量是足够的，可以考虑适当减少这些化合物在培养基中的配比；由图6-9可知，腺苷（核苷酸）、天冬酰胺和氨基乙酰基谷氨酰胺（氨基酸）、琥珀酸的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间逐渐减少，说明细菌培养过程中一直在消耗这些物质，可以考虑适当增加这些化合物在培养基中的配比；由图10-13可知，4-氨基丁酸（氨基酸）、生物素（维生素）、葡萄糖（糖）、蔗糖（糖）的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间无明显变化，表明这些化合物在此培养条件下一直处于一个平衡状态或者不参与该细菌的培养，如果是后者，可以考虑在培养基配方中去除这些化合物，从而降低成本；由图14-17可知，脱氧胞苷、鸟苷和肌苷（核苷酸）、丝氨酸（氨基酸）的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间先增大后减少，说明这些化合物是先积累后消耗，根据减少的量可考虑适当增加或减少这些化合物在培养基中的配比。实验数据表明“细胞培养上清液方法包”适合分析细菌类细胞培养过程中各种营养物质和代谢物质的变化趋势，从而根据实验结果调整培养基配方和培养工艺。

3. 结论

采用岛津公司 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪分析藤黄杆菌上清液中95种营养物质和代谢物质相对含量在12小时培养过程中随着时间的变化曲线。参考“细胞培养上清液方法包”，无需优化仪器参数，方法操作简单，结果直观。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物

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 联用同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物。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、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等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 链霉菌培养上清液

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是细胞培养生产工艺的核心内容之一。适宜的培养基组成与优选的细胞培养工艺对于提高酶和其他蛋白类药物的产率, 保证产品批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。

对于通过细胞培养生产酶和其他蛋白类药物的公司而言, 目前生物过程工艺开发与优化仅限于检测常规的 OD 值和酶活等参数, 缺乏对于细胞上清液组分直接、全面和快速的客观动态数据分析, 因此无法准确了解培养基中各组分和细胞代谢物对酶或者其他蛋白质产量和质量的影响。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“细胞培养上清液方法包”。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, 即可同时监测分析下列 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“细胞培养上清液方法包”建立了链霉菌培养上清液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。

1. 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-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱: 见“细胞培养上清液方法包”	进样体积: 1 μL
流 动 相: 见“细胞培养上清液方法包”	柱 温: 40°C
流 速: 0.35 mL/min	洗脱方式: 梯度洗脱

时间程序:见“细胞培养上清液方法包”

质谱条件

离子源:	ESI, 正负离子同时扫描	脱溶剂管温度:	250°C
离子源接口电压:	+4.0 kV; -3.0 kV	加热模块温度:	400°C
雾化气:	氮气 3.0 L/min	接口温度:	300°C
干燥气:	氮气 15 L/min	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
加热气:	空气 10 L/min	驻留时间:	2.0-5.0 ms
碰撞气:	氩气	MRM 参数:	见“细胞培养上清液方法包”

1.3 菌株相关信息

菌株: 链霉菌

培养时间: 115 小时

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 1000 倍, 即得。

2. 结果及讨论

2.1 链霉菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对链霉菌培养上清液中的组分进行分析, 目标组分不同程度的被检出, 色谱图如图 1 所示。

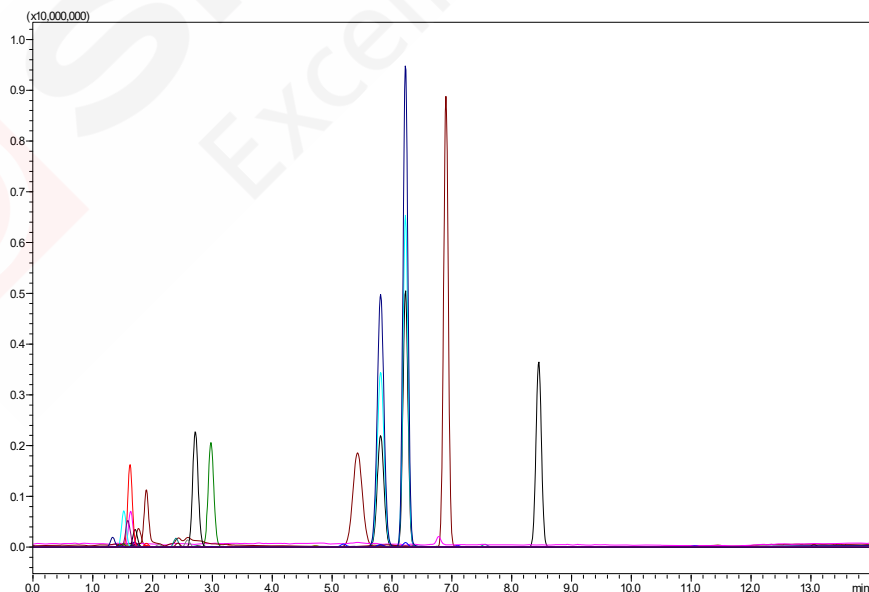


图 1 链霉菌上清液 (48 h) 分析色谱图

2.2 培养过程中酶活参数变化趋势

在培养过程中酶活检测取样点分别为 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

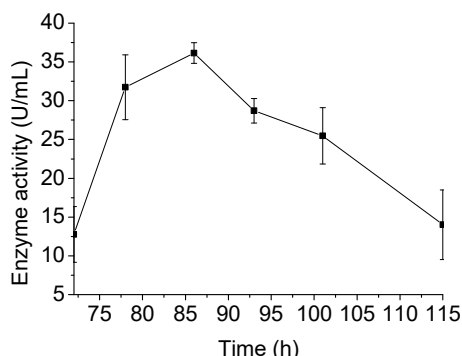


图 2 链霉菌上清液酶活曲线图 (72-115 h)

2.3 在细胞培养过程中部分营养物质和代谢物质峰面积与内标峰面积比值变化趋势

在培养过程中 95 种化合物检测取样点为 48 h, 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

2.3.1 培养过程中氨基酸类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

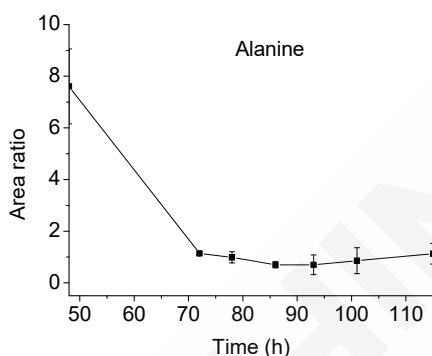


图 3 丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

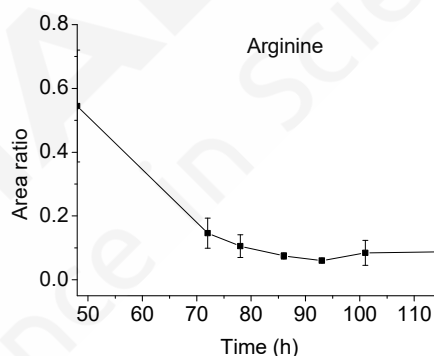


图 4 精氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

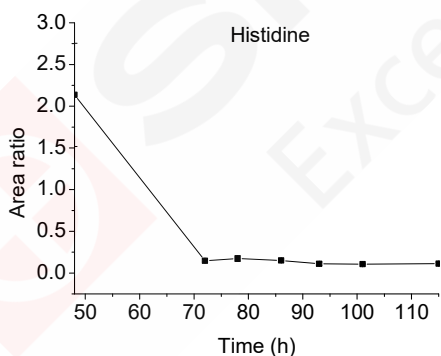


图 5 组氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

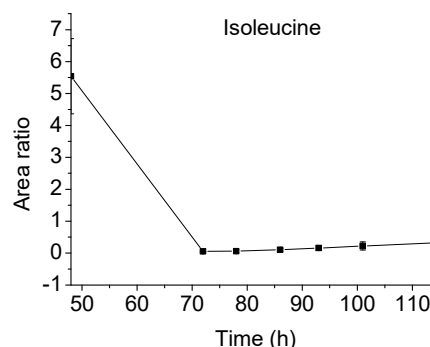


图 6 异亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

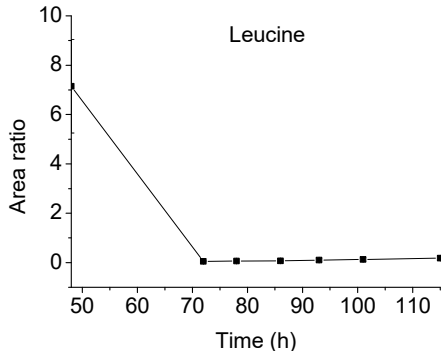


图 7 亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

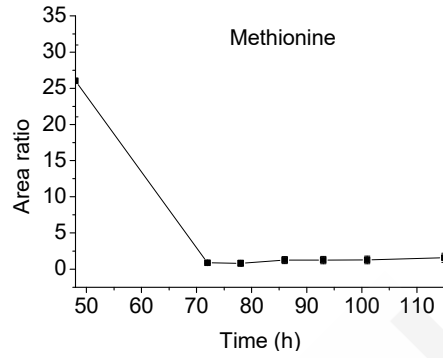


图 8 蛋氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

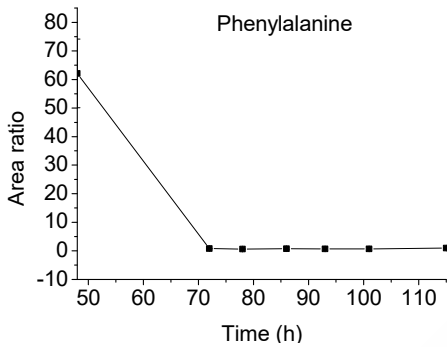


图 9 苯丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

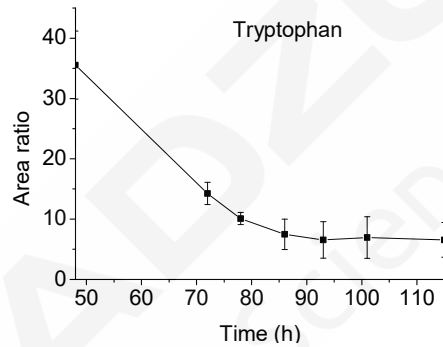


图 10 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

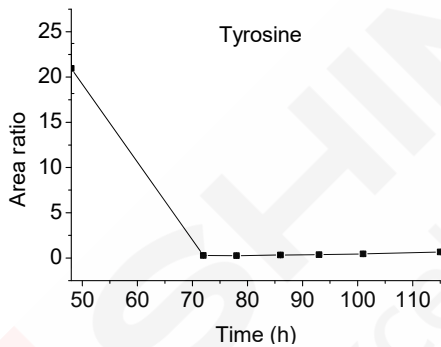


图 11 酪氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

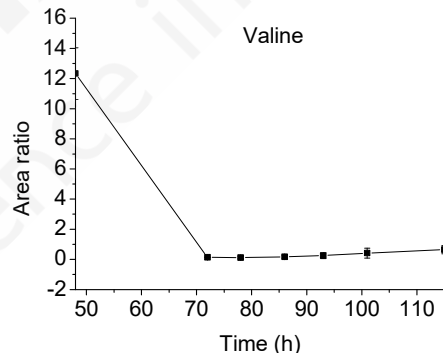


图 12 缬氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 3-12 可知，这些氨基酸在链霉菌 48-72 h 培养过程中浓度急剧下降，72 h 后维持在一个较低水平，接近于 0，由此可推断 48-72 h 这些氨基酸被大量消耗，用于蛋白质（酶）的合成。而由图 1 酶活趋势图可知，在细胞培养到 86 h 时，酶活才达到最大值，所以在优化培养工艺时可以考虑在 72 h 时往培养液中补加这些氨基酸，促进蛋白质的合成，从而进一步提高酶活。

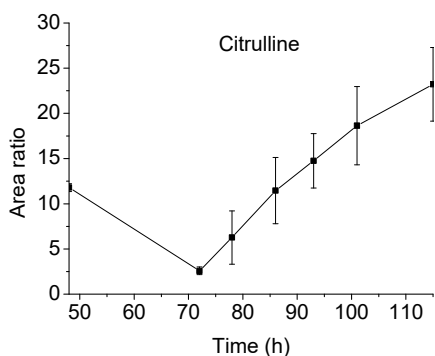


图 13 瓜氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

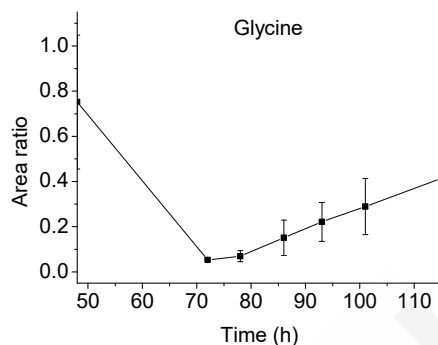


图 14 甘氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

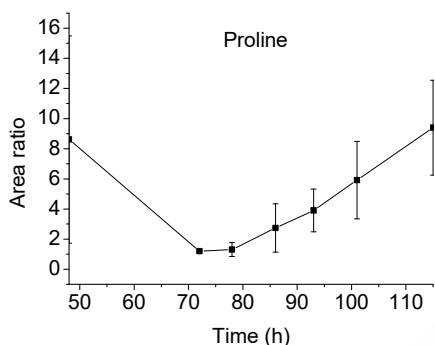


图 15 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

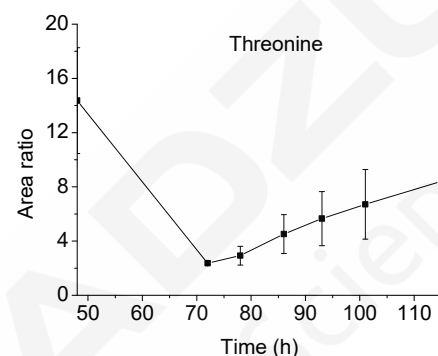


图 16 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 13-16 可知，在 72 h 之前这些氨基酸的量急剧减少，72 h 后开始增加，可能的原因是 72 h 前这些氨基酸被大量消耗，72 h 后培养液中蛋白质分解开始生成新的氨基酸，而此时链霉菌又无法快速消耗掉这些氨基酸，从而导致这些氨基酸开始积累，浓度逐渐增大。

2.3.2 培养过程中链霉菌有机酸代谢物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

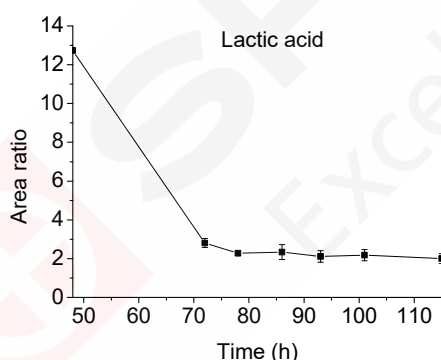


图 17 乳酸在培养过程中峰面积比变化趋势

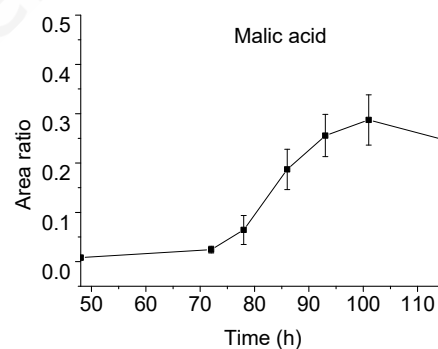


图 18 苹果酸在培养过程中峰面积比变化趋势

细胞培养初期在有充足碳源（甘油，参考 1.3 培养基组成）的情况下，细胞快速生长，并分泌乳酸，碳源量急剧下降，到达 48 h 后，培养液中甘油和其他碳源无法维持细胞正常生长，于是细胞开始消耗乳酸（以乳酸为碳源），导致乳酸的含量急剧下降（图 17）。

由图 18 可知，该株链霉菌在 72 h 后开始不断产生苹果酸，在 101 h 后细胞开始消耗自身产生的这些苹果酸（图 18）。

2.3.3 培养过程中维生素类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

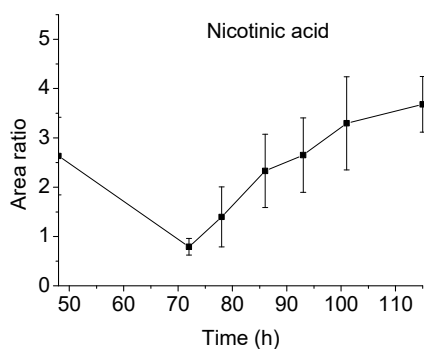


图 19 VB3 在培养过程中峰面积比变化趋势

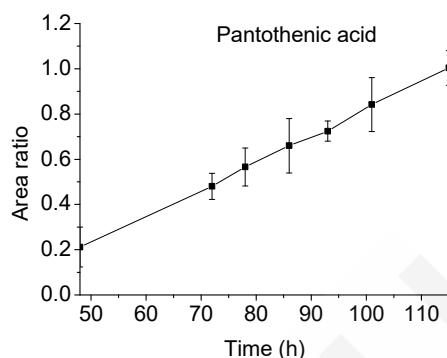


图 20 VB5 在培养过程中峰面积比变化趋势

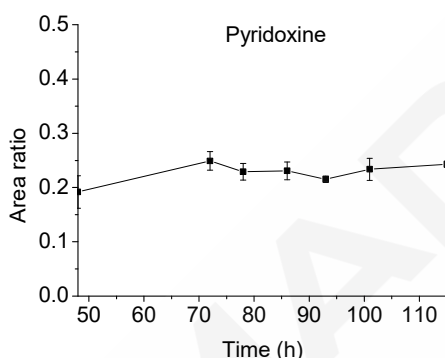


图 21 VB6 在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 19 可知在链霉菌 48-72 h 培养过程中，细胞不断消耗维生素 B3 (VB3)，但 72 h 后 VB3 开始积累；该株链霉菌在培养过程中会不断代谢产生维生素 B5 (VB5) (图 20)；在培养的 48-115 h，培养液中维生素 B6 (VB6) 的浓度变化不大 (图 21)。

3. 结论

采用岛津公司 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪分析链霉菌上清液中 95 种营养物质和代谢物质相对含量在 115 小时培养过程中随着时间的变化曲线。参考“细胞培养上清液方法包”，无需优化仪器参数，方法操作简单，结果直观。

利用 LC-MS/MS 同时测定哺乳动物细胞培养上清液中 95 种化合物

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-8050 联用同时测定哺乳动物细胞培养上清液中 95 种化合物的方法。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、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等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 哺乳动物细胞培养上清液

适宜的培养基组成与优选的细胞培养工艺对于提高蛋白类药物的产率, 保证细胞培养批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。

目前生物过程工艺开发与优化偏重于检测常规的温度、搅拌、气体溶解量和 OD 值等理化条件以及少数培养成分与代谢物的变化, 缺乏对于细胞上清液组分直接、全面和快速的客观动态数据分析, 因此无法精准优化调整细胞培养工艺条件和培养基中各组分配比。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“细胞培养上清液方法包”。该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, 即可同时监测分析下列 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-8050 联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了哺乳动物细胞培养上清液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。

1. 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-8050 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	进样体积: 1 μL
色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”	柱温: 40°C
流动相: 见“细胞培养上清液方法包”	洗脱方式: 梯度洗脱
流速: 0.35 mL/min	时间程序: 见“细胞培养上清液方法包”

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050	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
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“细胞培养上清液方法包”
化合物: 见第 4 页表 1

1.3 哺乳动物细胞培养相关信息

细胞: 哺乳动物细胞
培养时间: 13 天
培养基: 含血清培养基
培养工艺: 每天加料

1.4 数据处理

软件: LabSolutions
Traverse MS

1.5 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。

2. 结果及讨论

2.1 哺乳动物细胞培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对哺乳动物细胞培养上清液中的组分进行分析, 目标组分不同程度被检出, 色谱图如图 1 所示。

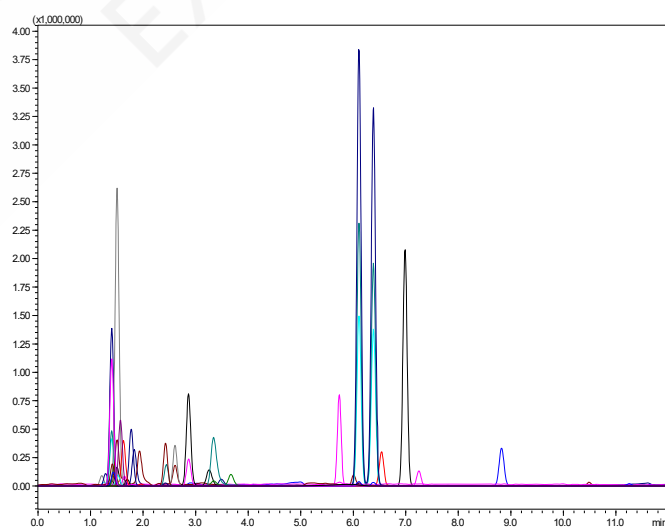


图 1 哺乳动物细胞培养上清液 (1d) 分析色谱图

2.2 在细胞培养过程中部分营养物质和代谢物质峰面积与内标峰面积比值变化趋势

在持续加料的培养过程中 95 种化合物检测取样点分别为 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d、9d、10d、11d 和 13d。

2.2.1 培养过程中部分糖类化合物相对含量变化情况 (1-13 d)

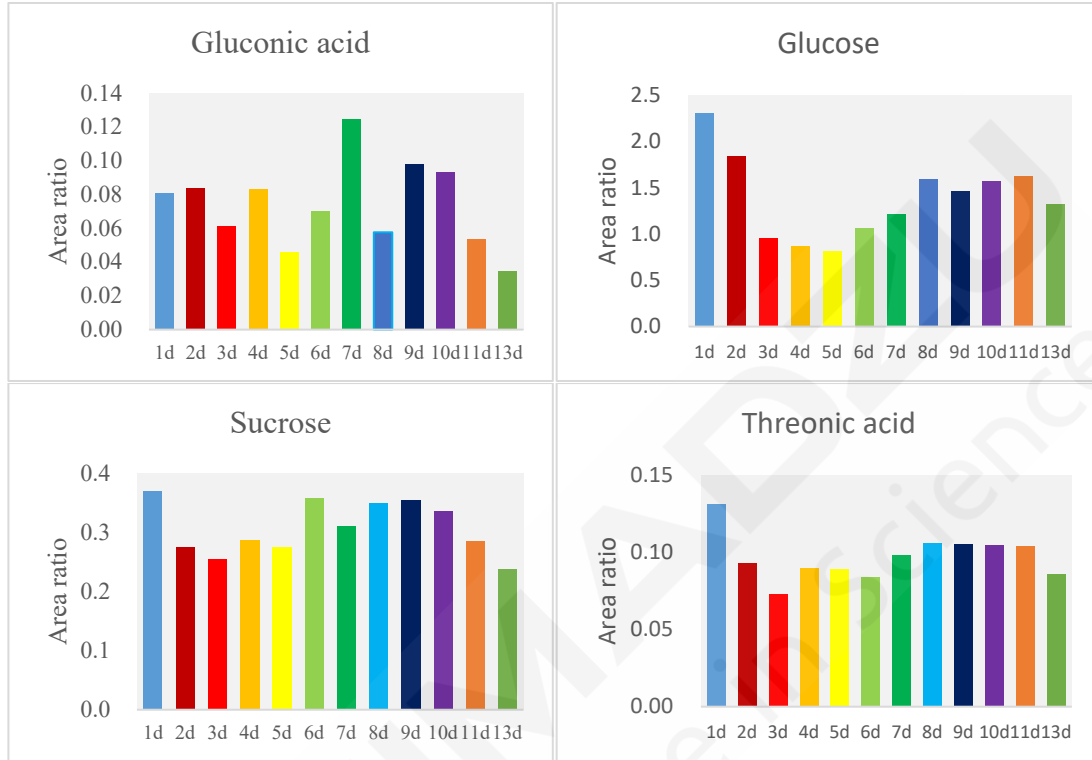
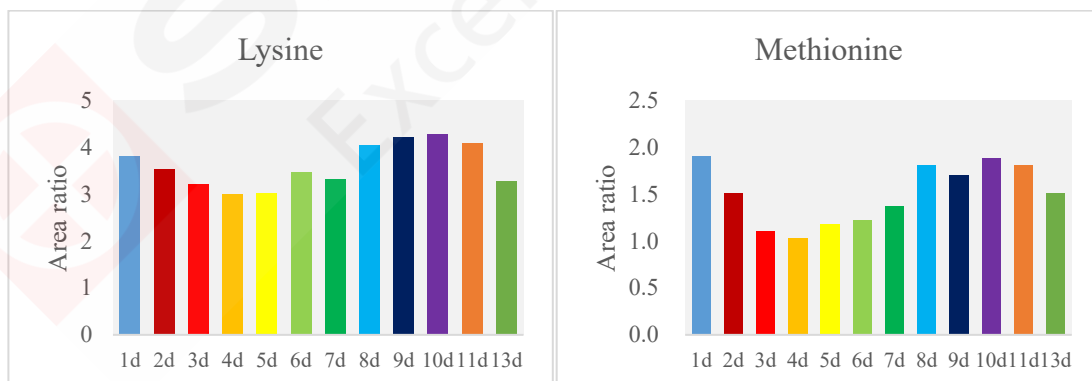


图2 哺乳动物细胞在 1-13d 培养过程中部分糖类化合物相对含量变化情况

由图 2 可知 3-6d 葡萄糖 (glucose) 的消耗最多, 由此可判断哺乳动物细胞在这段时间内生长比较旺盛, 可考虑在这段时间适当增加加料量以补充细胞生长所需碳源。

2.2.2 培养过程中部分氨基酸类化合物相对含量变化情况 (1-13 d)



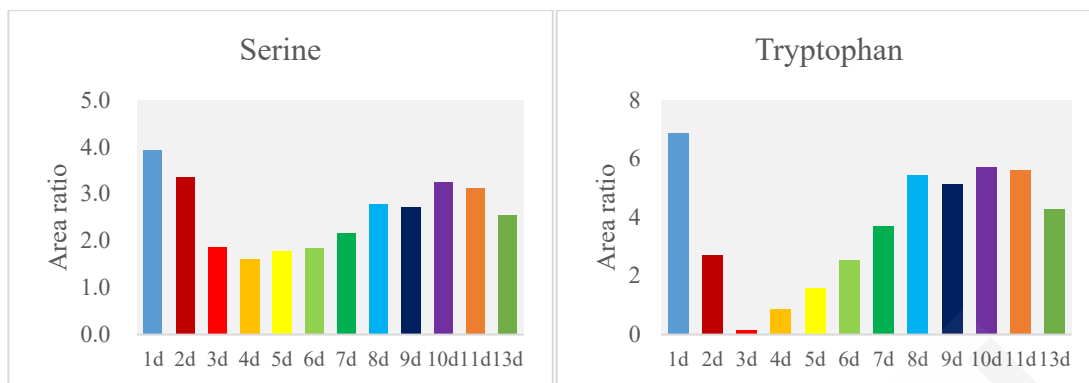


图3 哺乳动物细胞在 1-13d 培养过程中部分氨基酸类化合物相对含量变化情况

由图3可看出赖氨酸 (lysine)、蛋氨酸 (methionine)、丝氨酸 (serine) 和色氨酸 (tryptophan) 在 3-6d 的相对含量最小, 尤其是色氨酸在第 3d 时相对含量几乎为零, 由此可知这些氨基酸在 3-6d 时消耗量最大, 在过程加料时可考虑适当增加加料液中这些氨基酸的相对含量。

2.2.3 培养过程中部分维生素类化合物相对含量变化情况 (1-13 d)

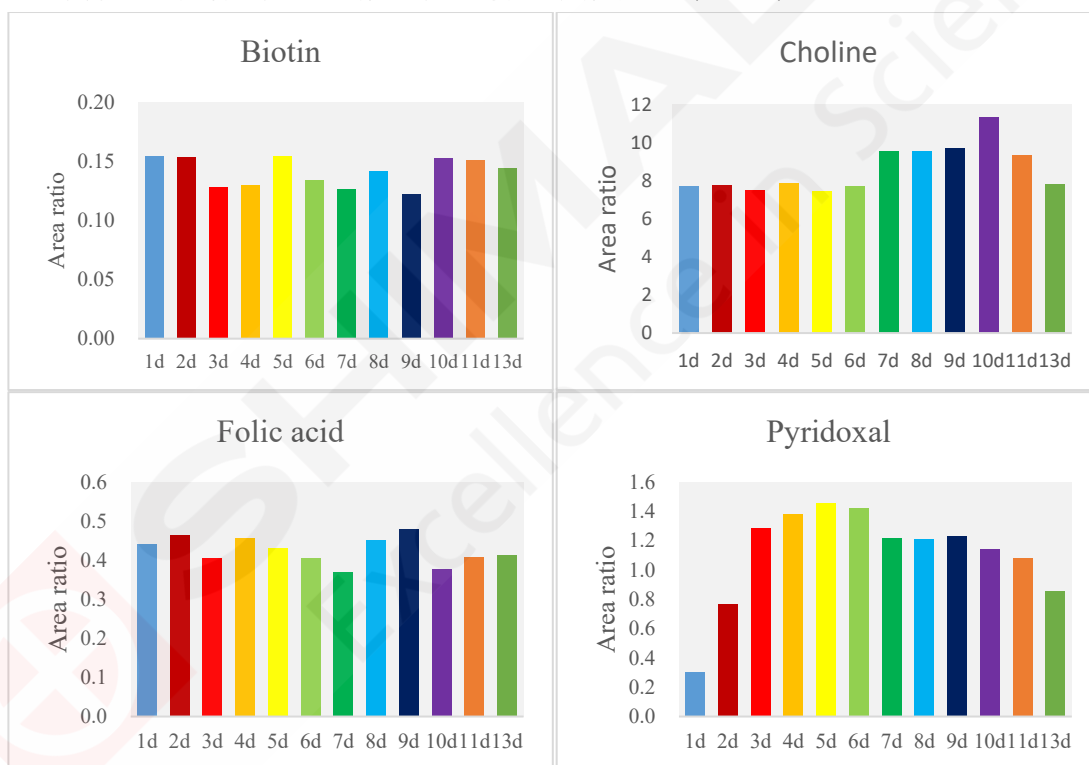


图4 哺乳动物细胞在 1-13d 培养过程中部分维生素类化合物相对含量变化情况

由图4可知在 1d-13d 的培养过程中生物素 (biotin)、胆碱 (choline)、叶酸 (folic acid) 的相对含量基本维持在一个浓度水平; 在 1-2d 培养过程中吡哆醛 (pyridoxal) 的相对含量较低, 培养后期基本维持在一个浓度水平, 因此在培养过程加料时可考虑在 1-2d 培养期间内适当增加吡哆醛的投料量。

2.2.4 培养过程中部分有机酸类化合物相对含量变化情况 (1-13 d)

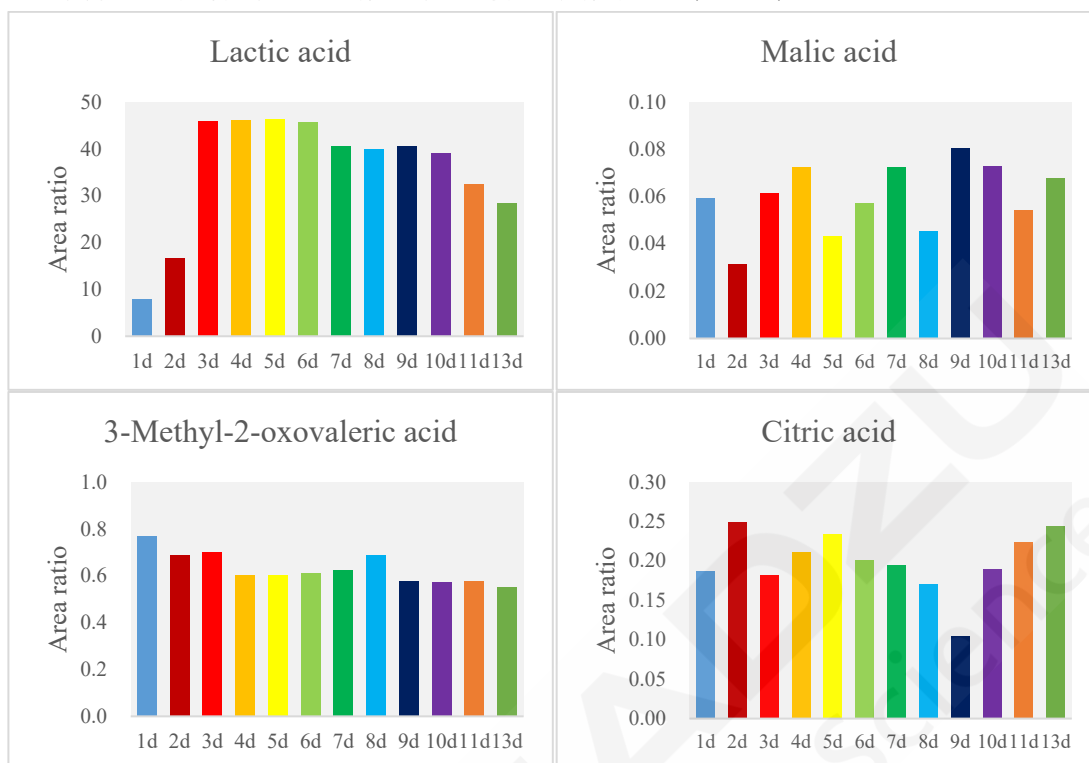


图5 哺乳动物细胞在 1-13d 培养过程中部分有机酸化合物相对含量变化情况

由图 5 可知在 1-3d 培养过程中乳酸 (lactic acid) 的相对含量逐渐增大, 由此可知在 1-3d 培养过程中哺乳动物细胞快速生长导致乳酸含量快速增加, 在后期培养过程中基本维持在一个浓度水平; 在 1-13d 的培养过程中苹果酸 (malic acid)、3-甲基-2-羟基戊酸 (3-methyl-2-oxovaleric acid) 和柠檬酸 (citric acid) 的相对含量都很低, 在持续加料的培养过程中没有明显变化趋势。

3. 结论

采用岛津公司 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪快速分析哺乳动物细胞上清液中 95 种营养物质和代谢物质在 13 天培养过程中 (每天加料) 的相对浓度变化情况, 从而对哺乳动物细胞培养工艺提供可靠的参考依据。参考“细胞培养上清液方法包”, 该方法无需优化仪器参数, 方法操作简单, 结果直观。

利用 LC-MS/MS 考察不同培养基对 CHO 细胞株培养的影响

摘要: 本文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, 建立了一种同时测定细胞培养上清液中 95 种化合物的方法。该方法在 17 min 内可完成 95 种化合物的分析, 适用于细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类等化合物的快速检测, 且重复性好、灵敏度高。利用该方法, 我们考察了细胞株在 4 种不同培养基中的营养物和代谢物变化情况, 并绘制出目标物的时间变化趋势图, 对相关研究人员判断细胞状态、改进培养基组成具有一定参考意义。

关键词: 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 细胞培养上清液 代谢物分析

细胞培养基是人工模拟细胞在体内生长的营养环境, 为促进细胞生长增殖提供物质基础, 是培养细胞生长和繁殖的生存环境。合成细胞培养基是用化学成分明确的试剂配制的培养基, 是目前常用的一类培养基, 其组分稳定, 主要包括糖类、必需氨基酸、维生素、无机盐类等。

培养基组分的变化, 对细胞生长会产生一定影响, 如细胞生长形态、分裂速度等。同时, 适宜的培养基组成与优选的细胞培养工艺对于提高蛋白类药物的产率, 保证细胞培养批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。因此, 寻求一类合适的培养基组成, 对细胞培养具有重大意义。

细胞生长状态的分析, 除形态学观察外, 还可对细胞培养上清液中细胞代谢物进行分析, 通过考察细胞上清液中营养物和代谢物的变化, 判断细胞在生长增殖过程中状态的优劣。鉴于此, 我们开发了“细胞培养上清液方法包”, 该技术可在 17 分钟内同时分析 95 种细胞培养上清液营养成份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, 结合“细胞培养上清液方法包”建立了细胞培养上清液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, 为相关研究人员评估细胞生长状态、改进培养基组分提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 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-20A5R (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. 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱: 见“细胞培养上清液方法包”	流 速: 0.35 mL/min
流 动 相: 见“细胞培养上清液方法包”	进 样 体 积: 1 μ L

柱温：40°C

质谱条件

离子源：ESI(+/-)

脱溶剂管温度：250°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热模块温度：400°C

加热气：氮气 10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气：氮气 10.0 L/min

离子源接口电压：+4.5 kV; -3.5 kV

碰撞气：氩气

监控的化合物信息：见第 4 页表 1

接口温度：300°C

MRM 参数：见“细胞培养上清液方法包”

1.3 细胞培养和取样方法

(1) 细胞株：CHO DG44 细胞株

(2) 细胞培养方法：取对数期细胞，传代并接种于培养瓶中。实验中使用 4 种不同培养基，分别为无蛋白培养基 I：proCHO5、无动物源成分培养基 II：Balan CD Growth A、无蛋白培养基 III：opti CHO 和无蛋白无动物源成分培养基 IV：Forti CHO。每种培养基分别制备 8 管，每管各取 5mL 培养基培养一瓶细胞，连续培养 5 天。

(3) 取样方法：每个时间点 (5min, 3h, 10h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d) 分别从每组相应的细胞中取 500 μ L 细胞培养基上清液 (取样 3 次)，以 I 为例：5 min 时从 I-1 中取 500 μ L；3 h 时从 I-2 取 500 μ L，依此类推，直至 Day 5；I-0 为培养基原液。

1.4 样品制备

取 500 μ L 细胞培养液，在室温下离心 1 min (3000 rpm)，吸取 100 μ L 离心后上清液到新的离心管中。然后加入 20 μ L 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L)，再加入 200 μ L 乙腈，涡旋使充分混匀，室温下离心 15 min (15000 rpm)。精密吸取上清液 100 μ L，加入 900 μ L 水，涡旋混匀，上机前再用纯水稀释 50 倍。

2. 结果讨论

2.1 细胞培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对 CHO DG44 细胞培养上清液中的组分进行分析，目标组分不同程度被检出，色谱图如图 1 所示。

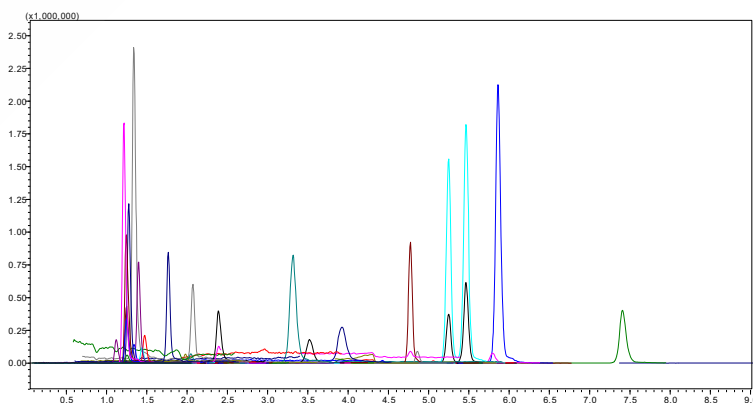


图1 细胞培养上清液 (IV-0) 分析色谱图

2.2 目标物含量变化趋势图

取各组细胞培养上清液在不同时间点的样品进行测定，以 2-异丙基苹果酸为内标，得到各目标组份的面积比。以面积比为纵坐标，时间点为横坐标绘制折线，得到不同时间点时目标营养物和代谢物组份含量的变化趋势图，如图 2 所示。

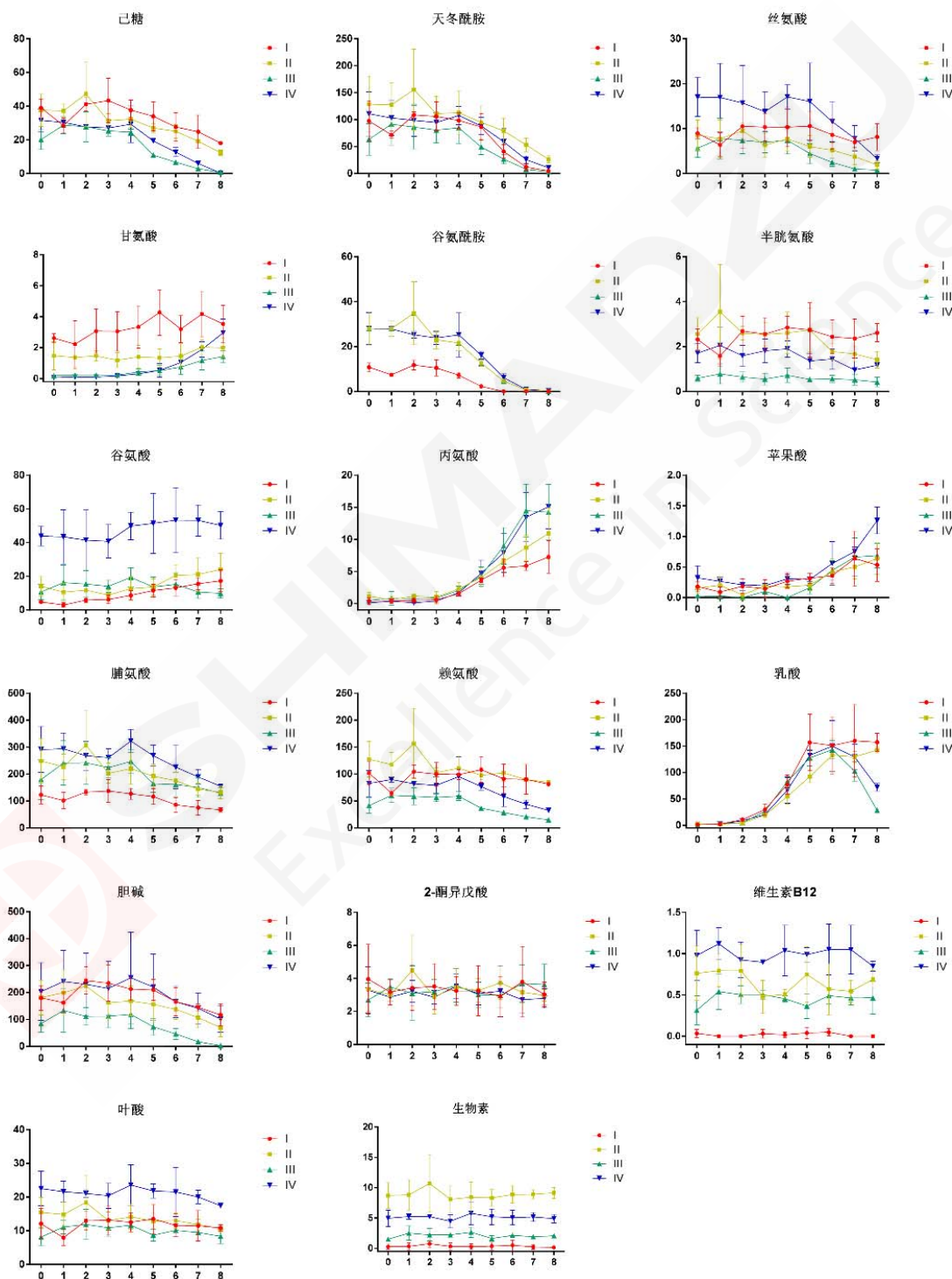


图 2 细胞培养上清液目标组份含量变化趋势图

在 4 种培养条件下, 己糖、天冬酰胺、谷氨酰胺和胆碱随时间的变化, 均呈现下降趋势, 而丙氨酸、苹果酸呈现上升趋势。对于乳酸而言, 在 I 和 II 型培养基中, 乳酸浓度为先升高后平稳的趋势, 而 III 和 IV 型培养基中, 乳酸浓度变化为先升后降。不同细胞上清液中, I 型培养基中的甘氨酸含量明显高于其它培养基, 而谷氨酰胺、维生素 B12 明显低于其它培养基; III 型培养基中的半胱氨酸含量明显高于其它培养基; IV 型培养基中的谷氨酸、叶酸含量明显高于其它培养基。生物素在各培养基中的含量为: II>IV>III>I。

3. 结论

本文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, 并结合细胞培养基上清液分析方法包, 完成了在 4 种不同培养基条件下, 细胞上清液中营养物和代谢物变化情况, 并绘制出目标物的时间变化趋势图。该结果有助于相关研究人员判断不同条件下细胞的生长状态, 为培养基配方优化提供指导意义。

利用 LCMS-8060 监控酿酒酵母培养过程中上清液组分变化

摘要：本文使用细胞培养基上清液分析方法包对不同时间点的酿酒酵母菌发酵液进行了成分测定。利用方法包中的条件对发酵液中的 101 种成份进行了半定量分析，使用方法包中的内标物 2-异丙基苹果酸对酵母菌过程中所涉及的相关代谢产物的组分的结果进行了半定量分析。该分析结果为酵母菌代谢产物含量的变化提供了量化的参考依据。

关键词：三重四极杆质谱 细胞培养基上清液分析方法包 酿酒酵母菌

酒精发酵过程是一个复杂的生物代谢过程，在这个过程中有酵母菌种类和能量的变化，代谢产物的含量的变化，能量代谢导致温度的变化等。这些变化可以直接影响酵母菌的生长代谢，从而对酒精发酵产生影响，以此影响葡萄酒的风味。酒精发酵过程中有许多连续反应和中间代谢产物，化学反应主要分为糖分子的裂解、丙酮酸的分解和甘油发酵三个过程。在酒精发酵过程中除了产生 CO₂、乙醇和热量外，酵母还可以利用 5%~8% 的糖产生一系列其他的化合物，即酒精发酵副产物，这些代谢副产物对葡萄酒的风味和口感有重要影响。本文利用岛津细胞培养基上清液分析方法包对酿酒酵母菌的代谢产物进行了半定量分析，为该方面的研究提供了量化的数据支持。

1. 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-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：见“细胞培养上清液方法包”

进样量：1 μL

流速：0.35 mL/min

洗脱方式：见“细胞培养上清液方法包”

柱温：40°C

质谱条件

离子化模式：ESI(+/-)

接口温度：300°C

加热气：空气 10.0 L/min

DL 温度：250°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热模块温度：400°C

干燥气：氮气 10.0 L/min

1.3 内标液的配制

称取内标物 2-异丙基苹果酸适量，用纯水配制成浓度为 0.5 mmol/L 的工作溶液备用。

1.4 样品前处理方法

取 500 μL 发酵液初步离心（室温，3000 rpm, 1 min），取 300 μL 上清至进样小瓶中，从中取 100 μL 至另一离心管中加入 20 μL 内标溶液，加入 200 μL 乙腈，充分振匀，室温 15000 rpm、15 min 再次离心。取 100 μL 上清加入 900 μL 超纯水充分振匀后再用超纯水稀释 10 倍，上样分析。

2. 结果与讨论

2.1 酵母菌上清液分析色谱图

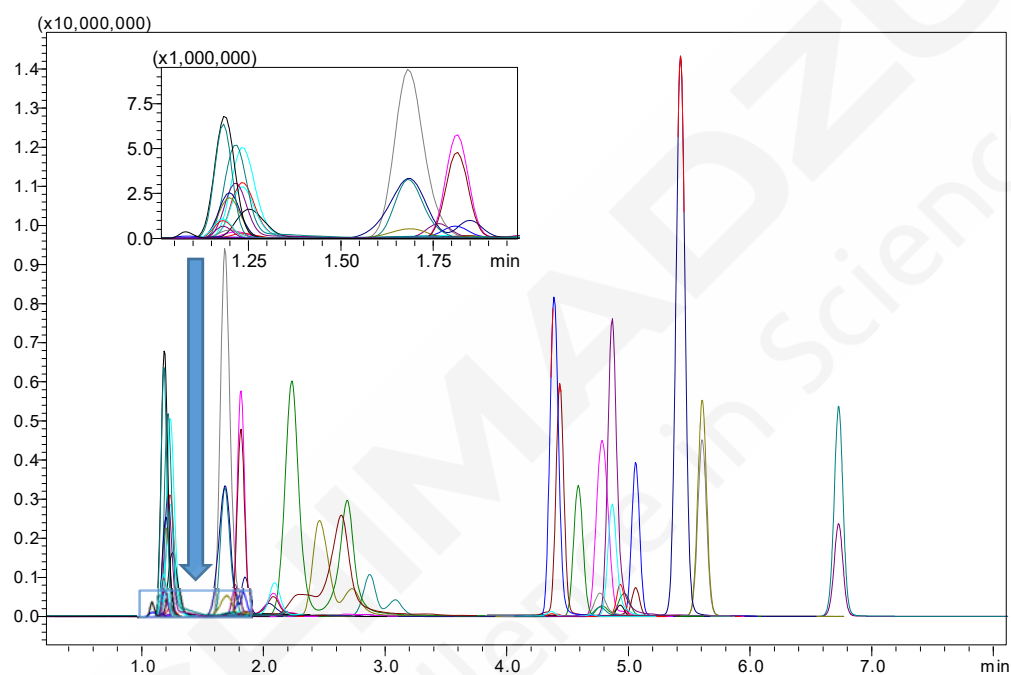
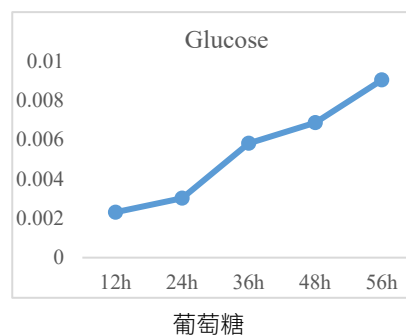
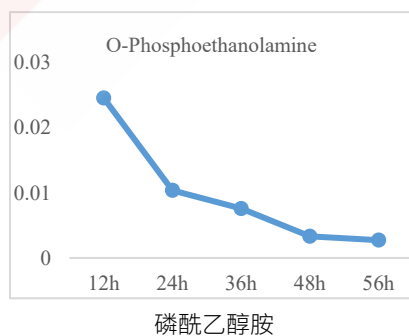
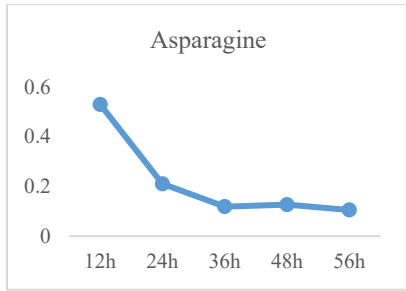


图 1 酵母菌上清液（12 h）分析色谱图

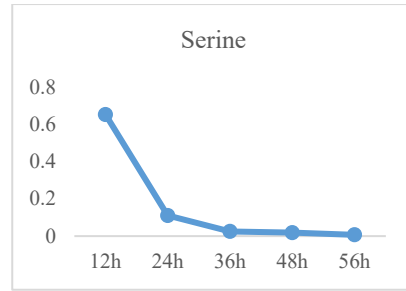
2.2 酵母菌发酵液中部分组份含量变化趋势图

取酵母菌发酵液不同时间点的样品进行测定，以 2-异丙基苹果酸为内标得到不同组份的面积比，以面积比做纵轴，时间点为横轴做曲线，得到不同时间点时酿酒酵母菌代谢物组份含量的变化趋势图如下所示：

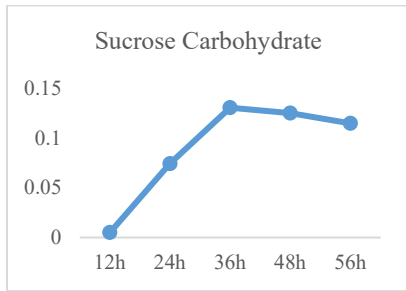




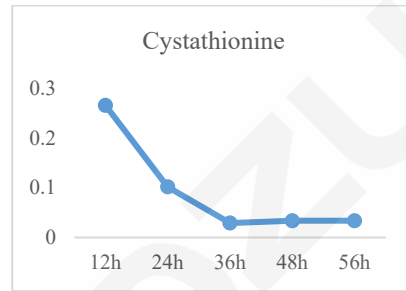
天冬酰胺



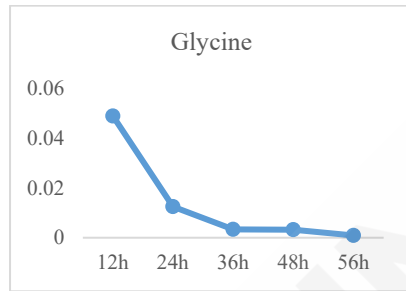
丝氨酸



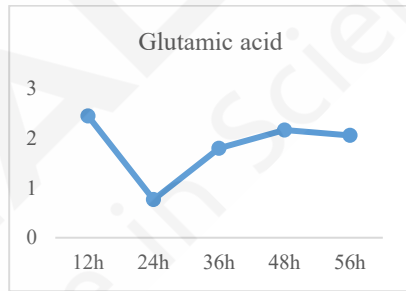
蔗糖碳水化合物



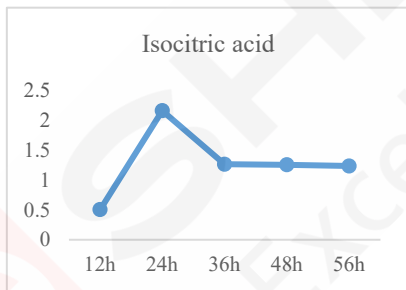
胱硫醚



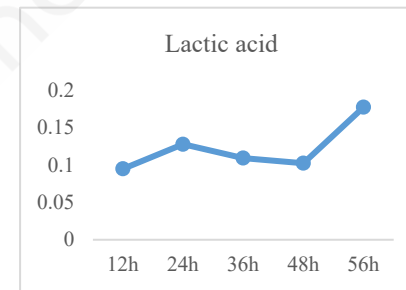
甘氨酸



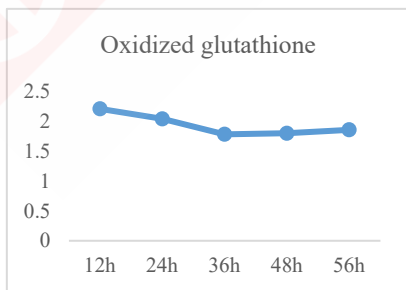
谷氨酸



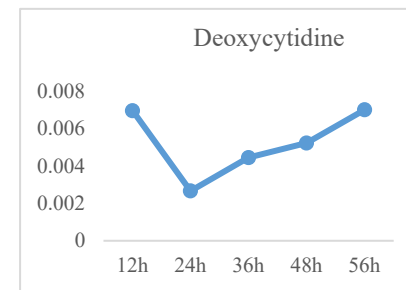
异柠檬酸



乳酸



氧化型谷胱甘肽



去氧胞嘧啶核苷

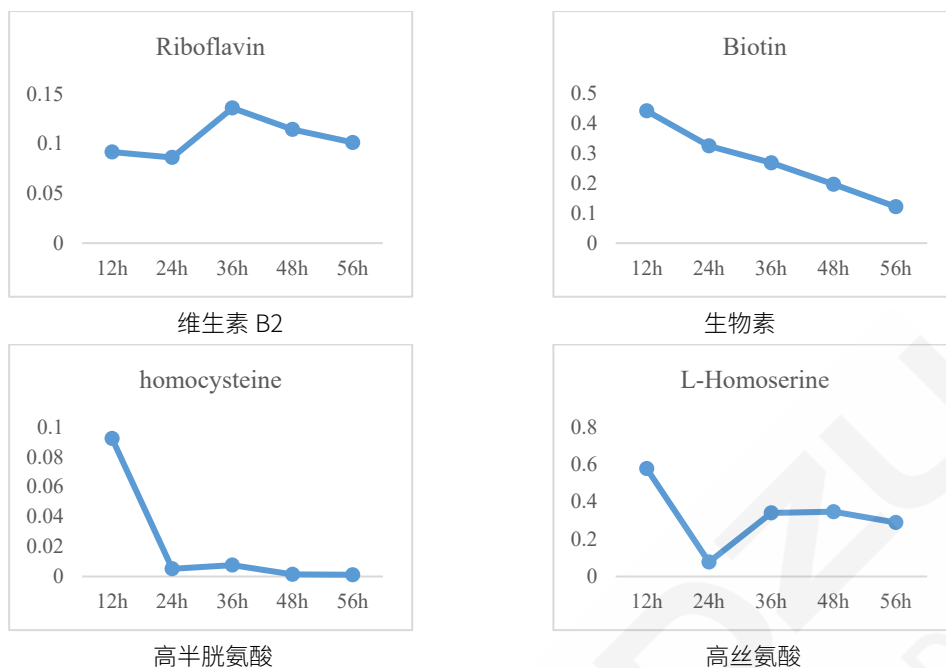


图 5 发酵液组份含量变化趋势图

3. 结论

本文利用细胞培养基上清液分析方法包及超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 这种新型的技术为对于酒精发酵综合影响因素以及其生产工艺的研究可以进一步深入，为提高酒酿造品质提供依据。

利用 LCMS-8060 监控微生物发酵过程中上清液组分变化

摘要：本文使用细胞培养基上清液分析方法包对不同时间点的发酵液进行了成分测定。利用方法包中的条件对发酵液中的 95 种成份进行了半定量分析，使用方法包中的内标物 2-异丙基苹果酸对发酵过程中所涉及的碳源、氮源、微量元素、维生素及代谢物等组分的结果进行了半定量分析。该分析结果为发酵过程中各组分含量的变化提供了量化的参考依据。

关键词：三重四极杆质谱 细胞培养基上清液分析方法包 发酵液

近年来，生物技术工业发展迅速，发酵技术也有了很大的发展，并且已经进入能够人为控制和改造微生物，使这些微生物为人类生产产品的现代发酵工程阶段。现代发酵工程作为现代生物技术的一个重要组成部分，具有广阔的应用前景。例如，用基因工程的方法有目的地改造原有的菌种并且提高其产量；利用微生物发酵生产药品，如人的胰岛素、干扰素和生长激素等。但是由于微生物发酵过程，机理十分复杂，影响因素错综复杂，为了对发酵过程进行优化控制，保持微生物生长按照一定的生长轨迹生长，需要确保微生物生长的环境条件为最优。传统的方式是通过控制微生物生长环境参数如温度、pH 值、溶氧度等来实现的。但是由于缺乏量化的依据，传统的方式难以准确的对发酵过程中各成份的变化进行监控，所以在从实验室到中试，从中试到大规模生产过程中会出现许多问题，因此开发一种能准确的对发酵过程中各组分进行量化监控的方法是十分必要的。岛津公司推出的“细胞培养上清液方法包”即为发酵过程中各组分的量化监控提供了有效的手段。

1. 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，DGL-20A₅ 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

液相色谱条件

色谱柱：见“细胞培养上清液方法包”

流速：0.35 mL/min

进样量：1 μL

流动相：见“细胞培养上清液方法包”

柱温：40°C

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°C

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测(MRM)

1.3 内标液的配制

称取内标物 2-异丙基苹果酸适量，用纯水配制成浓度为 0.5 mmol/L 的工作溶液备用。

1.4 样品前处理方法

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

2. 结果与讨论

2.1 部分组份 MRM 色谱图

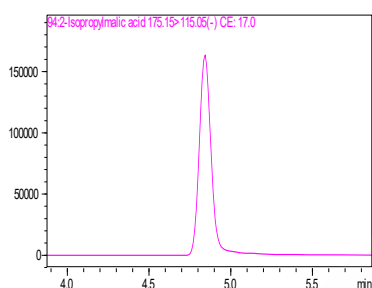


图 1 空白加内标色谱图

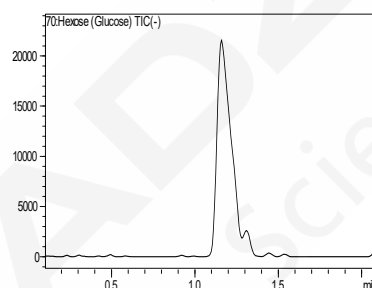


图 2 葡萄糖色谱图

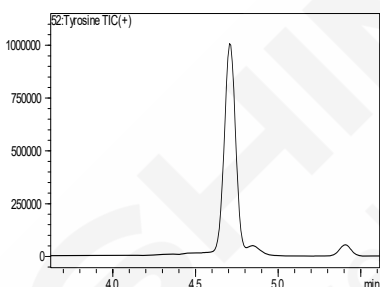


图 3 酪氨酸色谱图

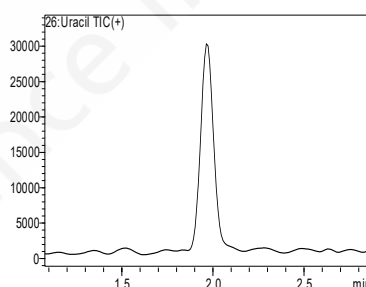
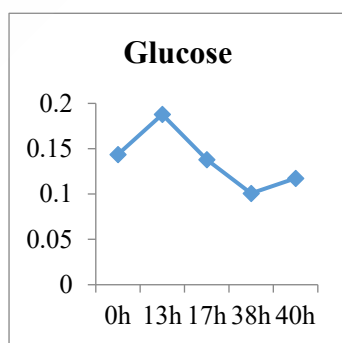


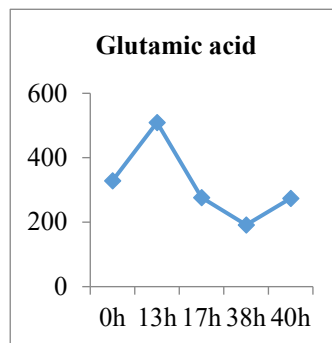
图 4 尿嘧啶色谱图

2.2 发酵液中部分组份含量变化趋势图

取相同培养液不同发酵时间点的样品进行测定，以 2-异丙基苹果酸为内标得到不同组份的面积比，以面积比做纵轴，时间点为横轴做曲线，得到不同时间点时组份含量的变化趋势图如下所示：



葡萄糖



谷氨酸

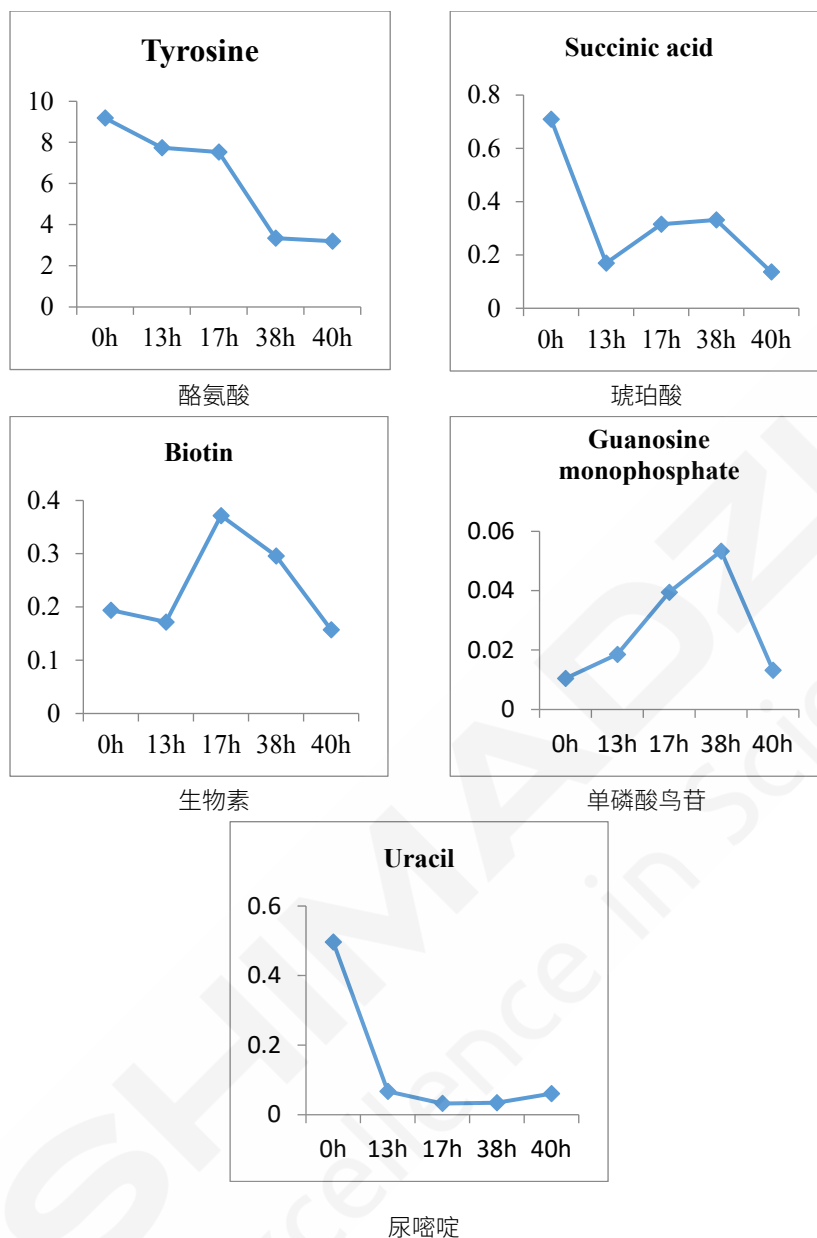


图5 上清液组份含量变化趋势图

3. 结论

本文利用细胞培养基上清液分析方法包及超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 这种新型的方式为传统的发酵过程的监控提供了一种新的思路，即量化的方式精准地对发酵的过程进行监控。由此可以为发酵工程从实验室到中试，从中试到大规模生产过程提供有效的量化参考，可大大提高发酵生产的效率，降低生产成本。

利用 LC-MS/MS 同时测定哺乳动物细胞培养上清液中多种组分

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用同时测定小鼠杂交瘤细胞培养上清液中 95 种化合物。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、核苷酸类、维生素类和其他影响因子等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 小鼠杂交瘤细胞

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, 我们优化另外分析条件, 开发出“细胞培养上清液方法包”, 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, 我们研究在杂交瘤细胞一周期 5 天内生长过程中培养基成分的丰度变化。

1. 实验部分

1.1 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: 见“细胞培养上清液方法包”

流速: 0.35 mL/min

进样量: 1 μ L

流动相: 见“细胞培养上清液方法包”

柱温: 40°C

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°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测(MRM)

1.2 取样和样品前处理

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。

表 1 培养条件

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。

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 1 μ L 进 LCMS，进行 95 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）。

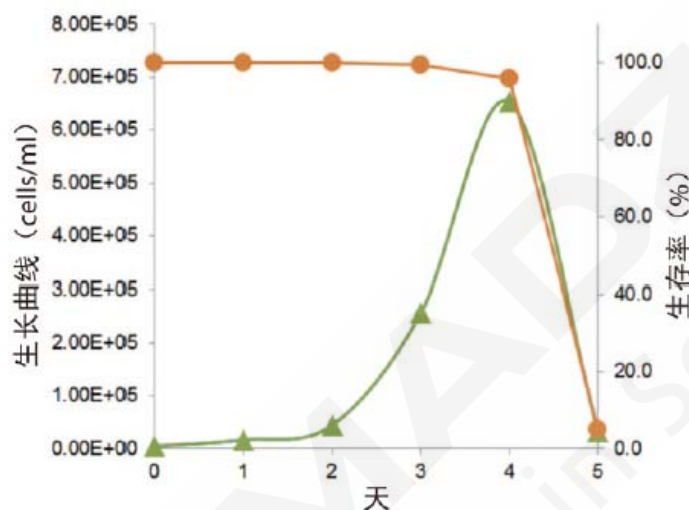


图 1 生长曲线和生存率

2. 结果与讨论

结果如下所示，对于主要的碳源和氮源及葡萄糖、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信号并不随着培养时间的延长而发生变化。

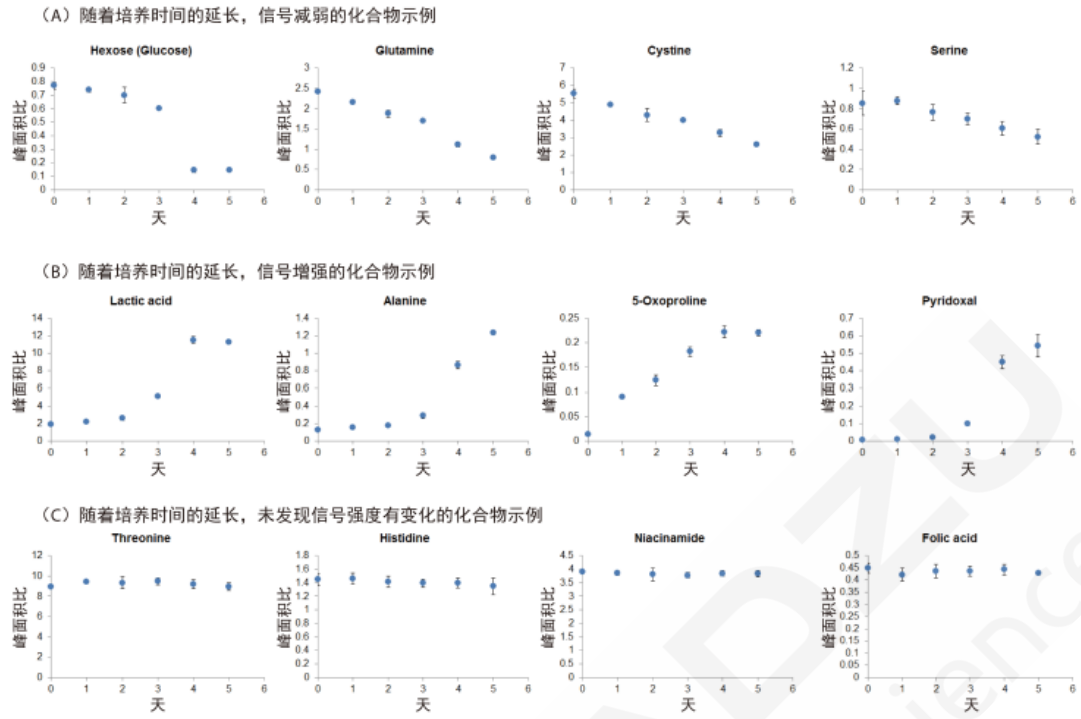


图2 随着培养时间的延长, 培养上清液成分的强度变化



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 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>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
B座12层
邮政编码: 610063
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702座
邮政编码: 400010
电话: (023)6380-6068/6058 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOW LOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知