

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

LCMSMS-241

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“细胞培养分析方法包”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。

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

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

进样体积：1 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱

时间程序：见“细胞培养分析方法包”

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℃

加热模块温度：400℃

接口温度：300℃

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

1.3 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

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。

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“细胞培养分析方法包”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。

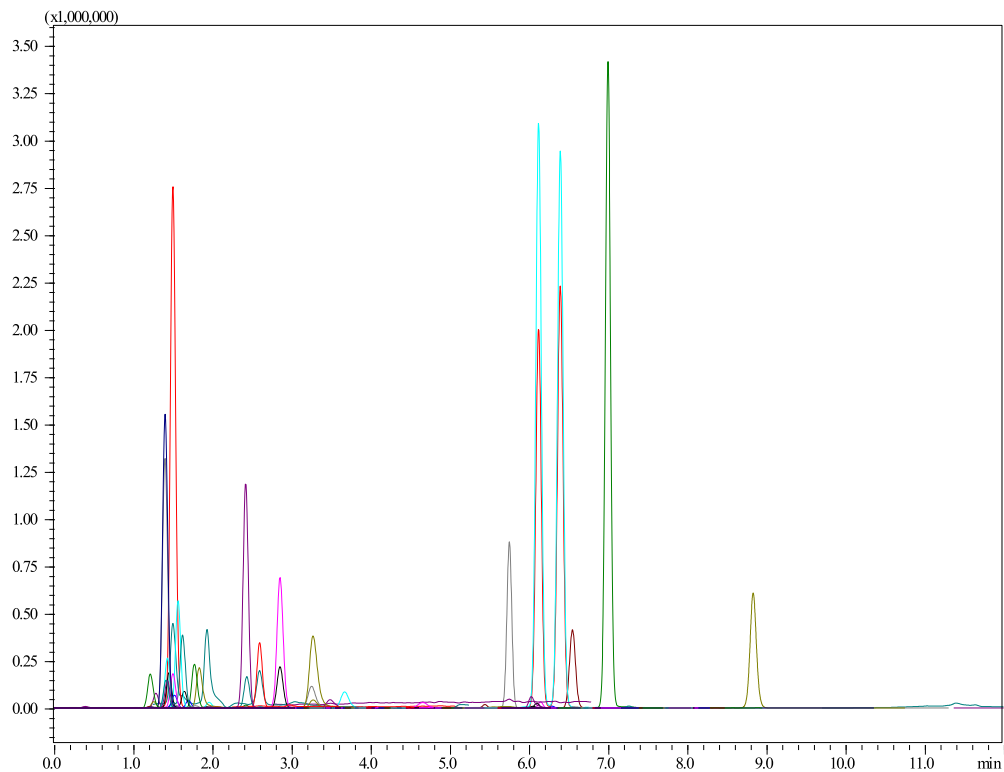


图1 4#培养基上清液分析色谱图

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

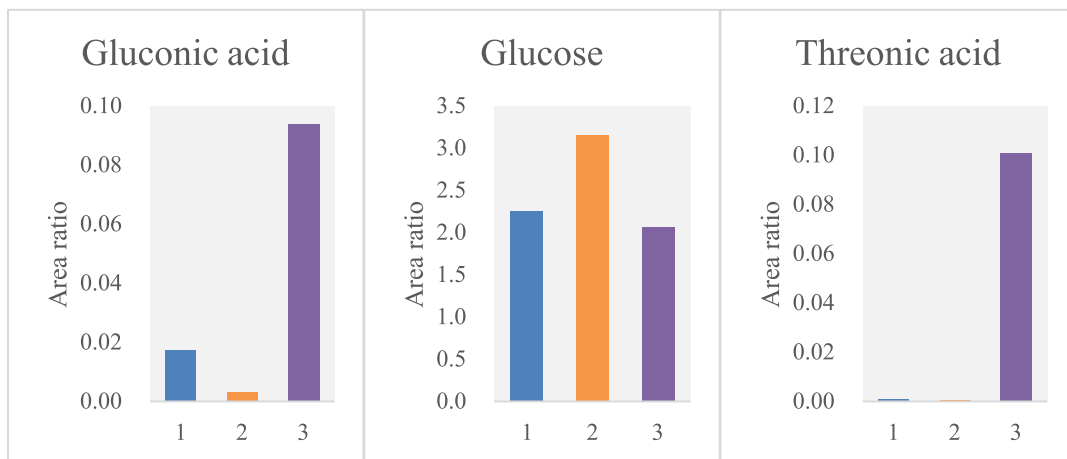


图2 3种哺乳动物细胞培养基中部分糖类化合物的相对含量差异

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

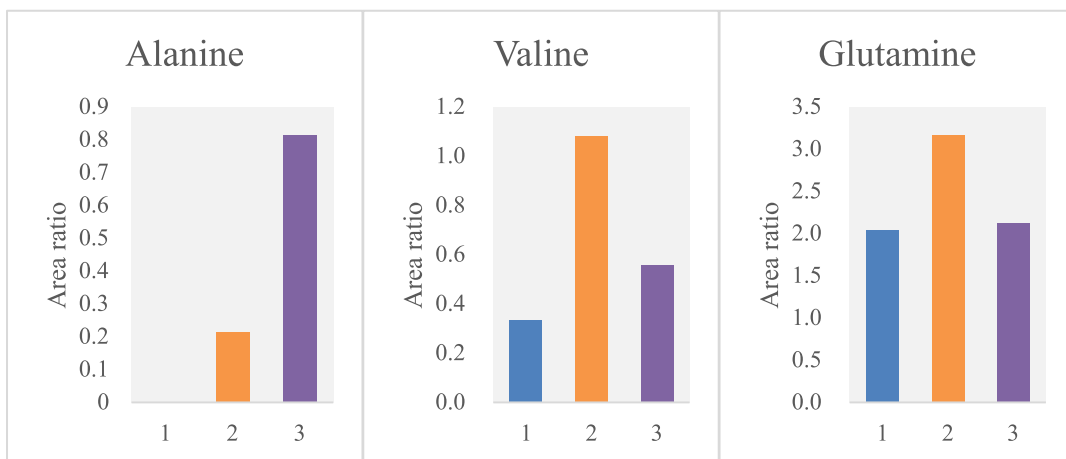


图3 3种哺乳动物细胞培养基中部分氨基酸类化合物的相对含量差异

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

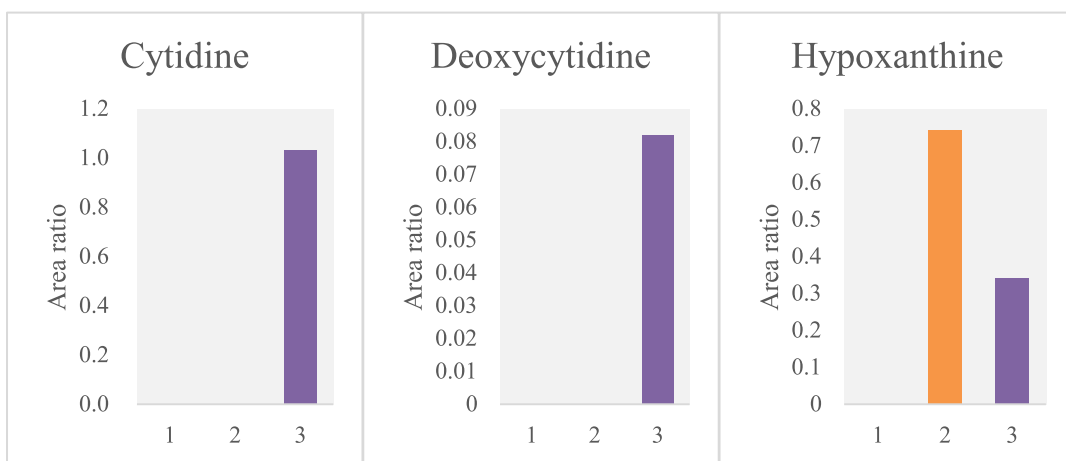


图4 3种哺乳动物细胞培养基中部分核苷酸类化合物的相对含量差异

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# 培养基, 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

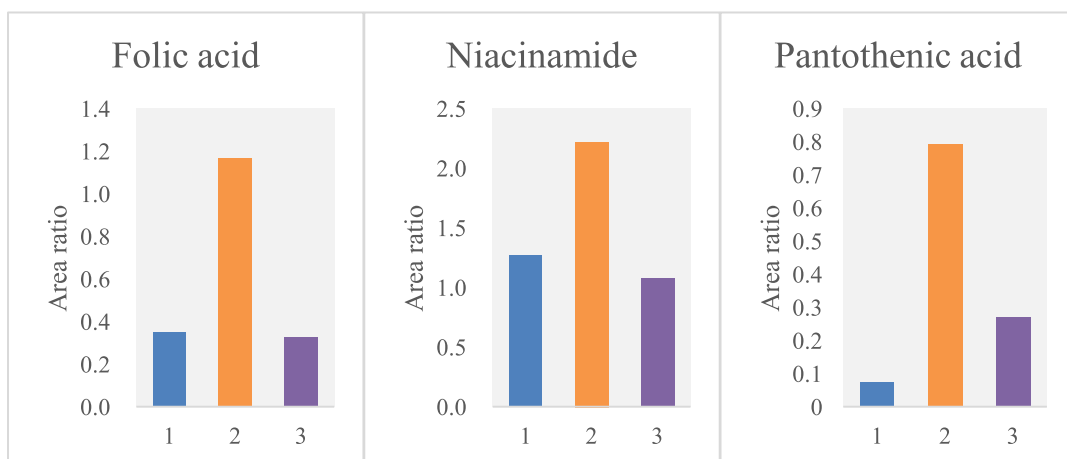


图5 3种哺乳动物细胞培养基中部分维生素类化合物的相对含量差异

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。

■ 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“细胞培养分析方法包”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。