

沃特世推出快速高通量LC-MS方法分析细胞培养基营养成分和代谢物，为上游生物工艺提供支持

Yun Alelyunas, Josh Gray, Mark Wrona, Patrick Boyce

Waters Corporation

摘要

本文介绍了一种仅需9分钟快速直接液相色谱-质谱(LC-MS)分析方法，可分析细胞培养基(CCM)的营养成分和代谢物，涵盖220多种化合物。该方法基于反相色谱，无需衍生化即可直接检测氨基酸。这种快速方法利用之前建立的用户友好型数据审查工作流程并配合多变量数据分析(MVDA)，可明显缩短从监测到决策制定的周转时间。此方法已应用于采用NISTCHO细胞进行的cNISTmAb生产工艺优化，可对市售细胞培养基和消耗培养基中的细胞培养基营养成分和代谢物进行定性和定量分析。本文还研究并介绍了使用该方法直接监测培养基中葡萄糖的情况。

优势

- 可在9分钟内快速完成细胞培养基的营养成分和代谢物分析，提供的数据库涵盖有220多种化合物
 - 使用基于ACQUITY™ Premier的技术和HSS™ T3键合填料实现出色的色谱分离，提供稳定的重现性并延长色谱柱寿命
 - LC-MS分析使用负离子电喷雾电离(ESI-)采集模式，可提供关键营养成分和代谢物的信息，例如葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和谷氨酸
 - 包含样品前处理、分析和报告的完整工作流程，有助于更深入地了解孵育培养基
-

简介

培养基关键组分的正确组成和浓度对于生物治疗性细胞培养中的理想细胞生长、质量和产量至关重要，因此需要在孵育优化过程中对这些化合物进行及时监测。我们最近的一篇应用纪要介绍了一种基于BioAccord™ LC-MS系统进行细胞培养基(CCM)分析的LC-MS方法和工作流程¹。本应用纪要将展示一种更新的方法，可将采集时间从20 min显著缩短至9 min，同时保持方法稳健性、数据可靠性、质量和化合物覆盖率。图1所示为分析方法示意图，包括使用Andrew+™移液机器人进行样品前处理、使用BioAccord进行LC-MS分析、使用waters_connect informatics™进行数据审查和报告。运行时间短、分析速度快的优势可帮助生物工艺工程师快速监测代谢物变化，为加快决策制定提供支持。

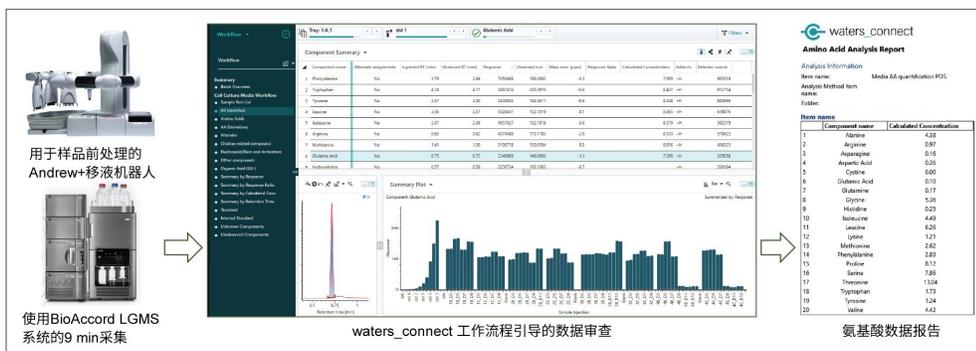


图1.基于Andrew+移液机器人和BioAccord LC-MS平台进行细胞培养基营养成分和代谢物分析的样品前处理、LC-MS分析及所得报告的概览示意图。

实验

样品前处理

表1所示的市售培养基溶液购自Millipore Sigma。消耗培养基样品由Waters™ Immerse Delaware中心生成，该中心使用NISTCHO细胞系进行补料分批生物工艺实验，在CHO补料分批培养基中生成cNISTmAb产物（表1中的条目5）。NISTCHO细胞系（RGTM 10971 NISTCHO测试材料）购自nist.gov（<https://www.nist.gov/programs-projects/nistcho>）

)。使用澄清培养基溶液和标准品进行的样品前处理均由Andrew+移液机器人完成。使用0.1% FA (含有0.1 μM 稳定同位素标记的酪氨酸[酪氨酸 $^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}$]作为内标)，将消耗培养基样品以1:400 (V:V)的比例稀释。使用包含1:400稀释的Earle's平衡盐溶液 (Millipore Sigma E2888) 和0.1 μM 酪氨酸SIL的0.1% FA溶液，以连续稀释法稀释沃特世氨基酸细胞培养基标准品 (表1中的条目1)，从10 μM 稀释至0.01 μM ，制得标准品校准溶液。

方法条件

LC-MS系统	装配ACQUITY Premier BSM的BioAccord LC-MS系统	
样品制备型系统:	Andrew+移液机器人	
LC条件:	ACQUITY Premier HSS T3色谱柱, 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm (部件号186009468, 或配备保护柱部件号186009471)	
	流动相	(A) 0.1% FA的水溶液 (B) 90% ACN/10% IPA/0.1% FA
	进样体积	2 μL
	运行时间	9 min, 梯度洗脱
MS条件:	采集模式	完整扫描或包含碎裂的完整扫描, ESI+或ESI-
	质量数范围	小分子(50-800 m/z)
	扫描速率	5 Hz
	锁定质量数校正模式	标准品
LC-MS软件:	waters_connect 3.1或更高版本, 预装UNIFI	

结果与讨论

快速高通量LC-MS方法描述

本文介绍了一种耗时9 min、快速高通量的细胞培养基营养成分和代谢物分析方法。相比于之前发布的20 min方法，9 min方法运行时间节省了50%，同时能够保持化合物覆盖率不变¹。该方法使用尺寸为2.1 \times 100 mm的ACQUITY Premier HSS T3色谱柱，通过BioAccord LC-MS系统进行检测。与20 min方法类似，9 min方法也是直接检测氨基酸，无需衍生化。为监测消耗培养基，使用0.1%甲酸水性流动相按1:100至1:400 (V:V)的比例稀释澄清培养基样品是唯一需要的样品前处理步骤。稀释比率取决于培养基配方的浓度/强化情况，稀释过程将采用Andrew+移液机器人实现自动化，样品前处理方案可下载。更新后的化合物库收录了220多种化合物，涵盖了广泛的细胞培养基分析数据。可用于通过waters_connect进行数据处理的工作流程 (包括简化数据审查、分析消耗培养基中的未知化合物以及使用EZInfo进行MVDA) 与之前的20 min方法相同¹。该方法的广泛适用性通过分析代表性的市售培养基溶液进行了评估，包括沃特世氨基酸细胞培养基标准品溶液、DMEM、IMDM、CHO补料分批培养基、HEK293病毒载体培养基和微生物生长培养基 (见表1)。对于所有培养基样品，9 min方法生成的检测结果与20 min方法相同。沃特世氨基酸细胞培养基标准试剂盒中26种氨基酸的提取离子流色谱图(XIC)见图2。总而言之

，该方法生成了尖锐且对称的峰，同分异构体化合物对（异亮氨酸/亮氨酸和2-氨基丁酸/4-氨基丁酸）实现了基线分离。

条目	来源	名称
1	Waters 186009300	氨基酸细胞培养标准试剂盒 - 含26种氨基酸
2	Millipore Sigma M4530	培养基199
3	Millipore Sigma D6046	Dulbecco改良Eagle培养基 - 低葡萄糖浓度
4	Millipore Sigma I3390	Iscove改良Dulbecco培养基
5	Millipore Sigma 14366C	EX-CELL Advanced CHO补料分批培养基
6	Millipore Sigma 14385c	EX-CELL Advanced CD HEK293病毒载体培养基
7	Millipore Sigma L2542	LB Broth (Miller), 液体微生物生长培养基
8	Millipore Sigma T5574	Terrific broth, 液体微生物生长培养基

表1.使用9 min分析法分析市售溶液的汇总。

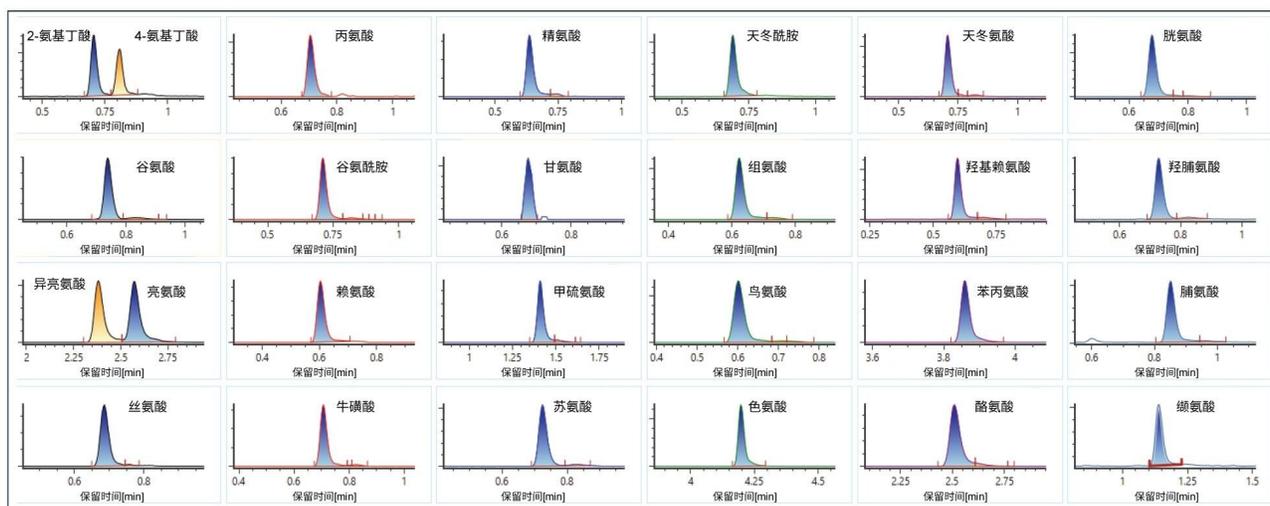


图2.氨基酸细胞培养基标准品试剂盒中26种化合物的提取离子流色谱图(XIC)。两对同分异构体化合物（异亮氨酸/亮氨酸和2-氨基/4-氨基丁酸）实现了基线分离。

方法性能使用包含26种氨基酸的沃特世氨基酸细胞培养试剂盒（P/N: [186009300 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009300-amino-acid-cell-culture-standard-kit.html >](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009300-amino-acid-cell-culture-standard-kit.html)）进行确定。我们还单独制备了葡萄糖校准溶液，各氨基酸的提取离子流色谱图如图2所示。分析使用 $1/x^2$ 拟合的线性回归和20%偏差排除标准确定方法线性。方法精密度和准确度分别在两个浓度（0.5 μM 和2.5 μM ）下进行6次重复进样来确定。表2中汇总的数据表明，所有化合物的重现性和准确度均与20 min方法相

当²。上述结果表明，快速高通量方法可同时提供定量和定性结果。缺少标准品时，在工艺优化实验和后续的MVDA分析方法中，相对响应可为分析培养基营养成分和代谢物的变化提供丰富的信息。

条目	组分名	预期RT (min)	中性质量数 (Da)	范围 (uM)	R ²	QC浓度 = 0.5 μM (n=6)		QC浓度 = 2.5 μM (n=6)	
						准确度(%)	精密度(%)	准确度(%)	精密度(%)
1	4-氨基丁酸	0.62	103.0633	0.025-10	0.99	94	3.6	98	1.7
2	丙氨酸	0.67	89.0477	0.05-10	0.99	108	4.3	103	2.3
3	精氨酸	0.63	174.1117	0.01-5	0.99	92	5.6	107	1.4
4	天冬酰胺	0.68	132.0535	0.025-10	0.99	98	3.3	97	2.0
5	天冬氨酸	0.66	133.0375	0.25-10	0.98	101	5.6	108	5.1
6	胱氨酸	0.64	240.0239	0.01-5	0.99	92	5.3	96	1.7
7	谷氨酸	0.75	147.0532	0.01-10	0.99	97	1.6	103	2.8
8	谷氨酰胺	0.72	146.0691	0.01-10	0.99	98	3.6	105	1.4
9	甘氨酸	0.64	75.0320	0.5-10	0.99	113	5.5	108	4.0
10	组氨酸	0.62	155.0695	0.1-10	0.99	96	5.9	102	1.6
11	羟基赖氨酸	0.57	162.1004	0.25-10	0.99	107	3.1	102	2.6
12	羟脯氨酸	0.62	131.0582	0.025-10	0.99	96	4.4	104	2.5
13	异亮氨酸	2.37	131.0946	0.01-10	0.99	90	3.7	104	2.0
14	亮氨酸	2.56	131.0946	0.025-5	0.99	89	3.8	108	3.9
15	赖氨酸	0.58	146.1055	0.025-10	0.99	95	3.0	106	2.5
16	甲硫氨酸	1.41	149.0511	0.01-5	0.99	91	3.5	107	2.7
17	鸟氨酸	0.58	132.0899	0.025-10	0.99	99	5.1	104	2.8
18	苯丙氨酸	3.79	165.0790	0.01-10	0.99	91	5.4	103	3.3
19	脯氨酸	0.83	115.0633	0.05-10	0.99	97	3.6	111	2.8
20	丝氨酸	0.65	105.0426	0.05-10	0.99	98	4.3	100	2.0
21	牛磺酸	0.66	125.0147	0.05-2.5	0.99	116	9.0	95	3.6
22	苏氨酸	0.69	119.05824	0.025-10	0.99	100	3.6	100	2.3
23	色氨酸	4.18	204.08988	0.01-10	0.99	88	2.8	103	2.3
24	酪氨酸	2.57	181.07389	0.025-10	0.99	92	3.9	103	2.1
25	缬氨酸	1.12	117.07898	0.025-10	0.99	93	2.7	110	11.8
26	葡萄糖	0.76	215.0323 [+C]	0.1-5	0.99	118	2.3	105	2.3

表2.使用9 min方法定量氨基酸和葡萄糖的线性范围、准确度和精密度汇总。分析中使用的氨基酸标准品溶液为氨基酸细胞培养基标准品试剂盒 (P/N: 186009300)。线性范围由1/x²拟合的线性回归得出，20%偏差作为排除标准。氨基酸数据使用ESI+模式采集，葡萄糖数据则使用ESI-模式采集。

在消耗培养基分析中的应用

该方法已应用于CHO细胞培养生成cNISTmAb过程中的消耗培养基分析。在14天的培养期间，对不同葡萄糖补料条件下的消耗培养基溶液进行采样。离心后，用0.1% FA按1:400的比例稀释上清液，然后同时使用9 min快速方法和20 min方法进行分析。图3所示为不同反应烧瓶中MS响应随采样日期变化的趋势图，图中对比了两种分析方法。图3中包括三种代表性氨基酸，天冬氨酸是色谱先洗脱化合物的示例，亮氨酸是中间洗脱化合物的示例，苯丙氨酸是后洗脱化合物的示例。结果显示出优异的相关性，两种方法都获得了相同的趋势，表明20 min方法获得高质量数据的能力在9 min方法中得到保持。

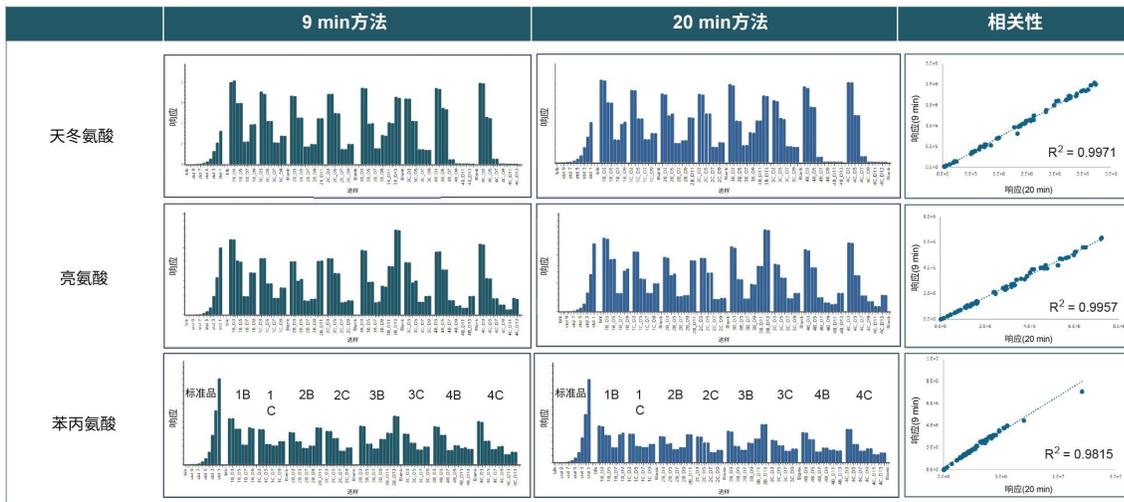


图3.化合物趋势图，展示观测响应值随培养条件和采样时间的变化趋势。左侧绿色图为采用9 min方法得到的数据，中间的蓝色图为采用20 min方法得到的数据。右侧是9 min方法与20 min方法的响应相关图。所有消耗培养基样品重复进样两次。

图4为不同葡萄糖补料条件下的葡萄糖响应与采样时间的叠加图，其中比较了9 min方法(A)与20 min方法(B)。图4还包括从常用的细胞培养基分析仪Nova Flex2 (C)获得的葡萄糖数据。在实验设计中，研究人员测试了四种葡萄糖补料条件。烧瓶1、2和3使用减少葡萄糖的补料条件。向烧瓶4中补加葡萄糖，使其在整个培养过程中维持恒定的6 g/L浓度。结果表明，在减少葡萄糖补料的条件下（烧瓶1-3），葡萄糖在细胞的指数生长期（5-7天）迅速减少并耗尽；作为对比，在相同时间段内，使用维持剂量条件（绿线，烧瓶4）维持葡萄糖浓度不变。细胞活力和蛋白质滴度结果表明，维持剂量组具有高细胞活力和更高的蛋白质滴度（请参阅沃特世关于使用BioAccord分析细胞培养基中的完整蛋白的应用纪要³）。图4显示，9 min方法与20 min LC-MS方法获得了相当的高质量数据，并且LC-MS方法与Nova Flex2分析仪获得的数据之间存在良好的相关性。在负离子条件下除葡萄糖外，还可检出几种氨基酸，包括谷氨酰胺和谷氨酸。因此，需要监测关键营养成分和代谢物（例如葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和谷氨酸）时，只需在负离子条件下进样一次即可获得结果。

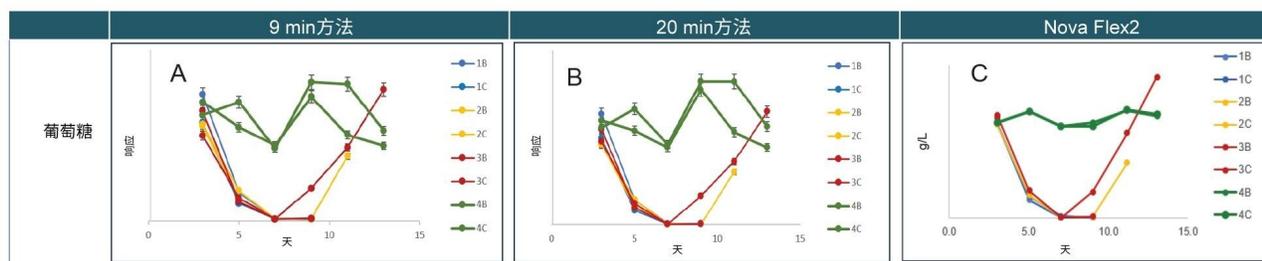


图4.所有补料条件下的葡萄糖响应与培养时间的叠加图。(A) 9 min方法的数据, (B) 20 min方法的数据, (C) Nova Flex2分析仪的数据。四种葡萄糖补料条件用不同的颜色表示, 置于四个单独的培养瓶中, 一式两份。图中的误差条表示重复测量。分析中利用LC-MS对葡萄糖氨加合物(+C1)进行了选择性检测。

结论

本文介绍了一种用于细胞培养基营养成分和代谢物监测的快速高通量分析方法。该方法包括耗时9 min的快速数据采集、涵盖220多种化合物的数据库筛查、简便的数据审查、数据报告以及化合物解析和批次比较(MVDA)功能。分析时间缩短至9 min, 能够帮助生物工艺实验室快速生成数据。该方法使用的消耗培养基样品不到10 μ L, 并且只需使用水性流动相简单稀释采样自生物反应器的澄清消耗培养基样品。使用Andrew+移液机器人可以轻松执行培养基和标准品溶液的自动化样品前处理。经过大量的数据对比, 快速9 min方法比之前发布的20 min方法节省了50%的分析时间, 而获得的高质量数据和方法稳健性仍然相同。综上, 将快速高通量方法与沃特世生物工艺一站式解决方案相结合, 可帮助分析科学家和生物工艺工程师在常规分析中轻松获取高质量数据, 助力上游生物工艺优化⁴。功能齐全的BioAccord LC-MS系统可对培养基样品进行常规监测以及深入分析, 全面了解您的工艺。

参考资料

1. YW Alelyunas, MD Wrona, W Chen, 使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统监测生物工艺开发所用细胞培养基中的营养成分及代谢物, 沃特世应用纪要。720007359ZH, 2021年9月。
2. YW Alelyunas, MD.Wrona, YQ Yu, 使用BioAccord LC-MS系统定量细胞培养基中的未衍生氨基酸, 沃特世应用纪要。720007766ZH, 2022年10月。

3. YW Alelyunas, C Prochaska, C Kukla, C Hanna, MD Wrona, 监测Sartorius Ambr 250高通量生物反应器系统样品中的完整分子量糖谱和消耗培养基代谢物，为上游工艺开发提供支持，沃特世应用纪要。[720008042ZH](#)，2023年9月。
4. YW Alelyunas, E Embrey, L Collins, A Pegaz-Blanc, G Mignard, MD.Wrona, Simplifying Bioreactor In-Process Monitoring with Waters Bioprocess Walk-Up Solutions, Waters Application note.[720008062](#). August 2023.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/135005818>>

UNIFI筛查平台解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134682903>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720008170ZH, 2024年1月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)