

使用Bioaccord™ LC-MS系统监测细胞和基因疗法中的细胞培养基

Yun Alelyunas, Mark Wrona, Ying Qing Yu

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

HEK293细胞系通常用于病毒载体的生产，需要使用根据其健康和生长情况而量身定制的细胞培养基来进行培养。本研究展示了BioAccord液质联用(LC-MS)系统在HEK293病毒载体培养基分析中的应用。结果表明，该培养基含有典型的细胞培养基化合物类别，例如氨基酸和维生素。此外，还含有少量的核酸和核苷。总体而言，为蛋白质生产开发的细胞培养基方法和工作流程可轻松地应用于基于病毒载体的基因疗法。

优势

- 易于使用的LC-MS平台，能够快速全面地监测在基于病毒载体的基因疗法中使用的细胞培养基
- 一个支持培养基监测过程分析以及产品质量分析的HRMS平台，可用于蛋白质和病毒载体生产³

简介

在基于病毒载体的基因疗法中，经过修饰的病毒充当药物递送载体的角色，将特定的DNA序列引入细胞。HEK293细胞系来自永生化的人胚胎肾细胞，通常用于生产病毒载体，如腺病毒(AV)、腺相关病毒(AAV)和逆转录病毒载体¹。在本技术简报中，我们将基于BioAccord高分辨率质谱(HRMS)平台开发的细胞培养基分析方法应用到HEK293病毒载体培养基的分析中。方法包概述见图示1；更详细的信息请参见之前发布的沃特世应用纪要²。



图示1. BioAccord/waters_connect™培养基分析工作流程示意图（摘自沃特世应用纪要²）。

结果与讨论

HEK293病毒载体培养基购自MilliporeSigma (P/N: 14385C)。由于产品中未公开培养基成分，因此将培养基按1:100、1:200、1:500、1:1000和1:2000的比例稀释，以利于阳性化合物鉴定，并帮助确定用于常规稀释的理想稀释比。使用的稀释剂是含有0.1%甲酸和内标0.1 μM 3-氯酪氨酸的水溶液。还制备了1:100稀释的基础培养基溶液：DMEM和IMDM。如前所述，使用BioAccord对溶液进行LC-MS分析²。在样品分析的开始和结束时进样含有17种氨基酸的校准溶液，浓度范围为0.01~10 μM。采集50-800 *m/z*质量范围内的数据。

主要化合物的提取离子流色谱图(XIC)叠加图如图1所示，每个化合物类别的代表性趋势柱形图如图2所示。结果表明，在HEK293培养基中检测到的化合物可分为三大类：氨基酸、维生素以及几种核酸和核苷。丰度最高的化合物类别是氨基酸，其次是维生素。核酸和核苷的丰度最低。快速代谢的氨基酸，即谷氨酰胺，以稳定的二肽形式丙

氨酰谷氨酰胺检出。与基础培养基DMEM和IMDM相比，HEK293病毒载体培养基的氨基酸和维生素浓度通常更高。而基础培养基一般不含核酸和核苷。在1:200和1:500的稀释比下，前35种化合物具有出色的LC-MS重现性，如表1所示。根据在多次稀释时观察到的响应值，建议在病毒载体生产过程中使用1:500的稀释比进行培养基成分常规监测。

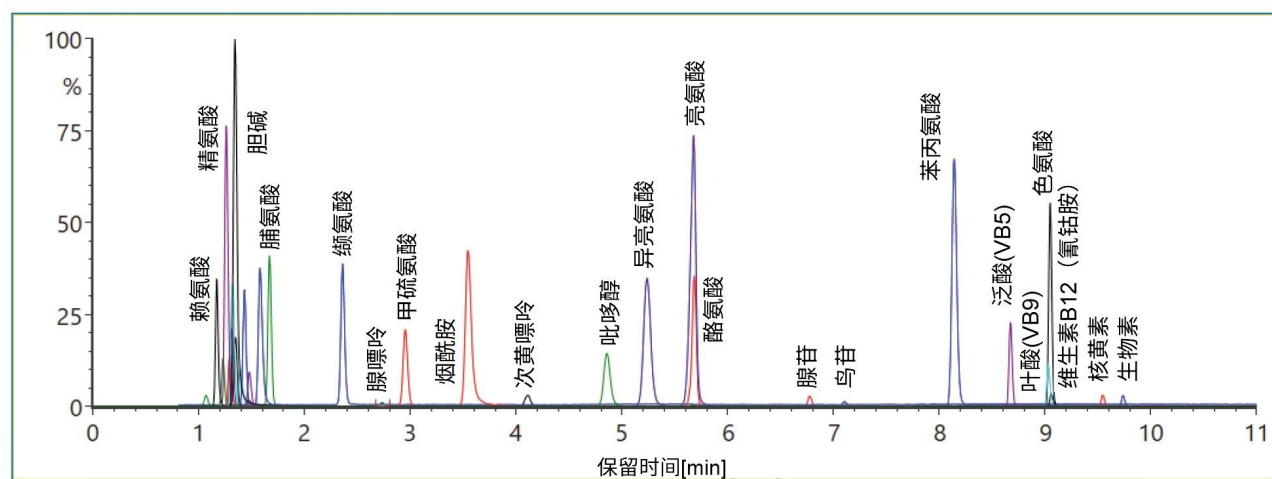


图1.在正离子电喷雾(ESI+)条件下观察到的HEK293培养基中前34种化合物的XIC叠加图。为便于展示，从1:2000稀释样品中提取氨基酸，从1:100稀释样品中提取维生素和其他化合物。在负离子模式(ES-)下观察到维生素—肌醇（数据未显示）。

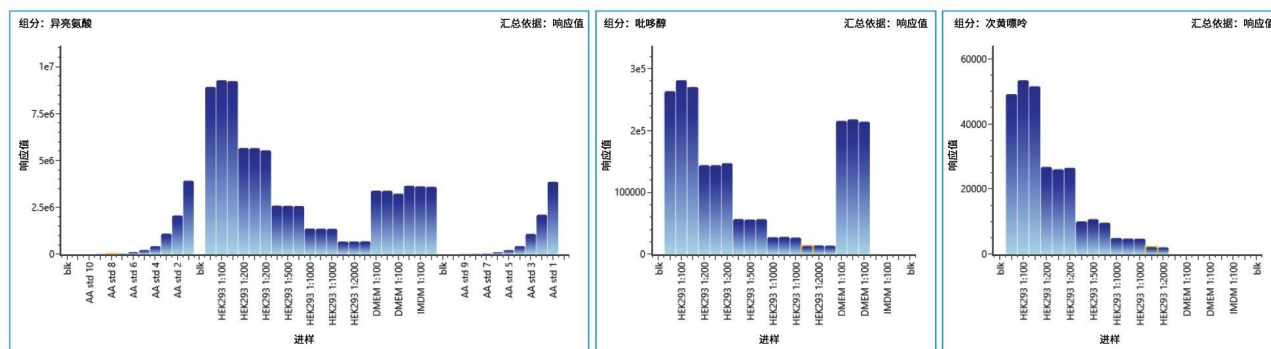


图2.化合物响应值的代表性趋势柱形图（每种样品进样三次）。(A)进样开始和结束时的氨基酸标准品校准曲线示例，此处为异亮氨酸。标准品和所有培养基样品中均含有异亮氨酸。(B)维生素示例，此处为吡哆醇，图中可以看出该化合物存在于HEK293培养基和DMEM培养基中，而不像预期的那样存在于IMDM培养基中。(C)核碱基示例，此处为次黄嘌呤，图中可以看出该化合物存在于HEK293培养基中，而不存在于DMEM和IMDM培养基中。

化合物	实测RT (min)	1:500稀释比的平均响应值	1:500稀释比的%RSD	1:200稀释比的%RSD
丙氨酸	1.36	1.3E+04	2.2	1.7
丙氨酰谷氨酰胺	1.48	4.1E+05	1.1	0.2
精氨酸	1.26	2.2E+06	0.8	1.0
天冬酰胺	1.32	8.3E+05	0.7	1.0
天冬氨酸	1.35	4.8E+05	1.2	0.9
胱氨酸	1.29	3.8E+05	0.7	1.1
谷氨酸	1.43	9.9E+05	0.5	0.5
甘氨酸	1.29	2.4E+03	6.1	4.4
组氨酸	1.23	2.8E+05	0.2	0.4
异亮氨酸	5.23	2.6E+06	0.5	1.2
亮氨酸	5.67	4.0E+06	0.6	2.7
赖氨酸	1.17	7.7E+05	1.5	0.6
甲硫氨酸	2.95	1.1E+06	0.6	0.9
苯丙氨酸	8.14	3.5E+06	0.9	0.5
脯氨酸	1.67	1.2E+06	1.3	2.5
丝氨酸	1.31	5.3E+05	0.2	0.8
苏氨酸	1.39	2.8E+05	1.1	1.2
色氨酸	9.05	2.0E+06	1.1	0.2
酪氨酸	5.68	1.2E+06	1.2	4.5
缬氨酸	2.36	1.3E+06	1.4	2.4
生物素	9.74	5.5E+03	4.3	0.8
胆碱	1.34	3.1E+05	0.8	0.5
叶酸(VB9)	9.03	2.2E+04	1.9	0.7
葡萄糖/肌醇	1.51	5.1E+04	1.3	0.9
烟酰胺	3.55	1.6E+05	1.8	0.5
泛酸(VB5)	8.67	4.0E+04	1.9	1.0
吡哆醇	4.86	5.7E+04	0.5	1.3
核黄素	9.55	5.3E+03	0.7	1.3
硫胺素	1.58	9.8E+04	1.9	2.0
维生素B12 (氰钴胺)	9.06	6.9E+03	3.9	1.0
腺嘌呤	2.73	2.5E+03	12.4	2.9
腺苷	6.78	6.9E+03	5.8	3.6
胞苷	2.92	3.0E+03	5.4	4.1
鸟苷	7.11	3.2E+03	6.1	3.3
次黄嘌呤	4.11	1.0E+04	5.4	1.4

表1.基于三次重复进样的前35种化合物的响应值和重现性总结。该表根据化合物类别和化合物名称排序。

结论

本文介绍了一种使用BioAccord LC-MS系统开发的细胞培养基方法，我们使用该方法来分析HEK293病毒载体培养基。分析显示，HEK293培养基含有超过35种化合物，包括氨基酸、维生素、核酸和核苷等化合物类别，易于检测和监测。数据表明，除了蛋白质生产中的细胞培养和微生物培养基监测外，细胞培养基分析方法还适用于基因疗法中的一般培养基监测。

参考资料

1. Tan E. *et al.* “HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors;”, *Front Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9 796991.
2. Alelyunas YW, Wrona MD, Chen W, 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.
3. Zhang X, Koza SM, Yu YQ, Chen W. 使用UPLC和UPLC-MS优化腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白分析, 沃特世应用纪要 [720006869ZH](#), 2020年5月.

特色产品

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

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

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007705ZH, 2022年9月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号