

使用装配ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统监测微生物培养基中的营养成分及代谢物

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

和哺乳动物细胞培养体系一样，在微生物发酵体系中，微生物的生长维系以及高质量蛋白质的生产离不开培养基的支持¹。本技术简报介绍了一种液相色谱-质谱(LC-MS)方法和工作流程的应用，我们在基于微生物的生物工艺中，将这种使用BioAccord LC-MS系统为细胞培养基分析开发的方法应用于监测生长培养基中的营养成分和代谢物。方法包的内容为：全面的反相LC-MS方法、含有200多种化合物的数据库；用于数据审查的简单、分步工作流程（包括趋势图）；一套未知物筛选工具；多变量数据分析工具；报告模板。BioAccord LC-MS系统提供的产物质量分析功能包括完整蛋白分析、肽图分析和监测（包括多属性方法）、游离寡糖分析和寡核苷酸质量数确认，而培养基监测是该功能的补充。

优势

- 采用基于BioAccord LC-MS系统、高性能表面(HPS)技术和waters_connect信息学平台的专用工作流程直接测量微生物生长培养基属性，可加速培养基开发与监测

- 单一LC-MS平台同时支持培养基属性监测和产物属性监测（包括完整蛋白分析、肽MAM、游离寡糖和寡核苷酸质量数确认），可通过采集工艺输入和产物质量输出信息助力决策制定

简介

生物工艺开发研究已经开发出使用微生物（例如大肠杆菌）作为蛋白质表达和纯化、载体构建以及基因合成宿主的方法²。在微生物的生长维系以及蛋白质的生产过程中，需要使用微生物生长培养基。这种培养基通常由酵母提取物制成，营养丰富，含有氨基酸、水溶性维生素、碳水化合物、肽、甘油和其他化合物。我们需要一种能检测这些物质的全面分析方法。

在本技术简报中，我们将一种使用BioAccord LC-MS系统为分析细胞培养基开发的LC-MS方法和工作流程³应用于微生物生长培养基的分析。图示1为BioAccord LC-MS方法和工作流程的流程图。它包括反相液相色谱分离、HRMS数据采集、包含200多种化合物的谱库、引导式数据审查工作流程，以及用于批量分析的多变量数据处理步骤。在本技术简报中，我们购买并分析了两种常用的微生物培养基，鉴别并对比了它们的主要成分。



图示1.基于BioAccord/waters_connect的培养基分析工作流程示意图（摘自沃特世应用纪要³）。

结果与讨论

从MilliporeSigma（美国密苏里州圣路易斯）购买了LB培养基(Miller)和Terrific培养基两种液体微生物生长培养基。这两种培养基都用H₂O以1:100 (V:V)比例稀释。按沃特世应用纪要²所述，使用基于ACQUITY Premier技术的BioAccord LC-MS系统采集数据。采用小分子质量数范围(50-800 *m/z*)和动态实时校正标准液校正。进样体积为2 μL。

使用ACQUITY Premier HSS T3色谱柱（1.8 mm，2.1 x 150 mm，部件号：[186009469 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009469-acquity-premier-hss-t3-column-18--m-21-x-150mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009469-acquity-premier-hss-t3-column-18--m-21-x-150mm-1-pk.html)）在反相条件下分析样品。导入包含200多种化合物的谱库用于化合物分析和检测。图1显示了在正离子或负离子模式下分析Terrific液体培养基样品检测到的化合物的叠加色谱图。结果显示，Terrific液体培养基样品中检测到90多种化合物，包括库中的所有化合物类别，例如氨基酸及其衍生物、维生素、核酸碱基、核苷、核苷酸、有机酸、肽片段和许多其他化合物。丰度最高的化合物是一组氨基酸，如图1A中的叠加色谱图所示。

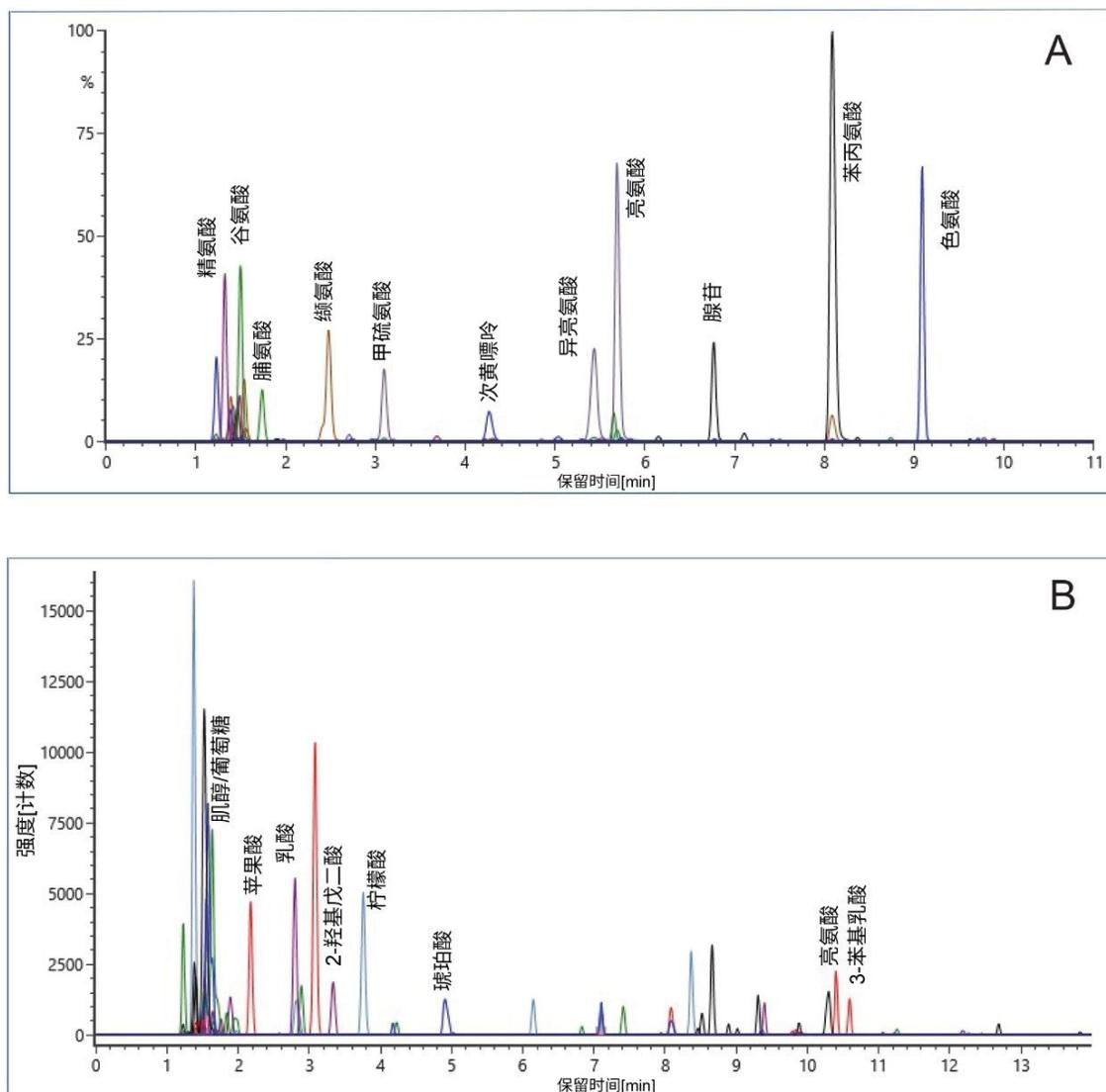


图1. Terrific液体培养基的叠加色谱图。(A) ESI+采集模式。(B) ESI-采集模式。在ESI-电离模式下未标记的化合物通常在ESI+采集模式下也可以检测到。

LB液体培养基中也检测到类似的化合物，检出化合物中丰度最高的也是氨基酸。图2显示了Terrific和LB液体培养基中检出的化合物中，响应排在前三的化合物的汇总图。结果表明，与LB培养基相比，Terrific培养基中的化合物浓度普遍更高。

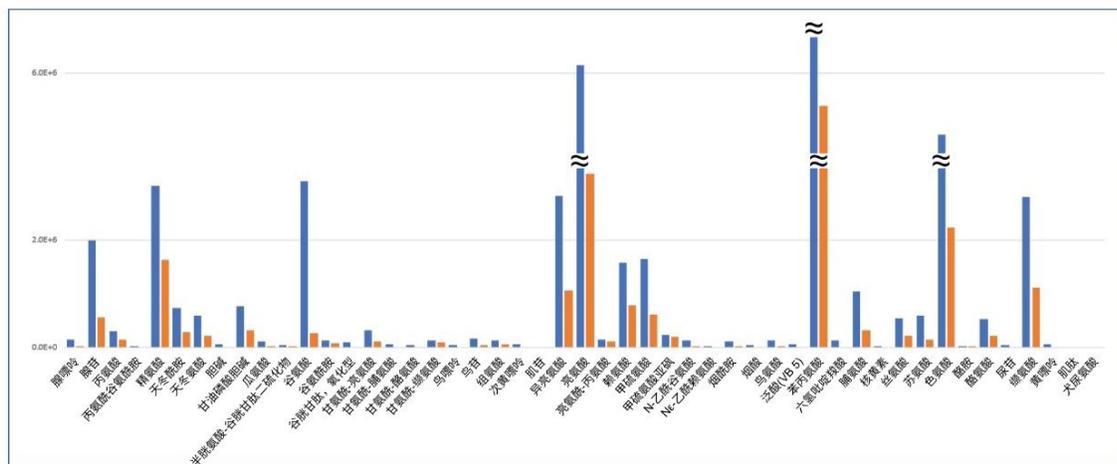


图2. Terrific培养基与LB培养基的响应对比。蓝色条柱表示Terrific培养基。橙色条柱表示LB培养基。

通过六次重复进样Terrific培养基溶液收集LC-MS检测的重现性数据。表1汇总了响应、保留时间和质量数误差排在前50的化合物。这些结果显示有良好的重现性，响应RSD < 5 %、保留时间RSD < 0.2 %，质量数误差 < 5 ppm。结果还表明重现性十分稳定，与响应范围的高低、保留时间的长短以及观察到的质量数值大小无关。综上，数据表明我们之前为分析细胞培养基开发的方法可以很容易地应用于监测微生物发酵体系所使用的生长培养基中的化合物。

组分名	响应		rt (min)		质量误差(ppm)		化合物种类
	平均值	%RSD	平均值	%RSD	平均值	标准偏差	
丙氨酸	3.0E+05	3.1	1.43	0.03	-3.1	1.9	氨基酸
精氨酸	3.0E+06	1.9	1.32	0.01	-2.3	1.4	氨基酸
天冬酰胺	7.3E+05	4.0	1.39	0.02	-2.9	1.7	氨基酸
天冬氨酸	6.0E+05	3.8	1.42	0.01	-1.2	1.2	氨基酸
谷氨酸	3.1E+06	2.6	1.50	0.01	-3.4	1.5	氨基酸
谷氨酰胺	1.4E+05	2.7	1.65	0.04	-2.4	1.9	氨基酸
甘氨酸	2.0E+04	4.2	1.36	0.03	-0.2	3.3	氨基酸
组氨酸	1.4E+05	1.0	1.30	0.02	-2.9	1.7	氨基酸
异亮氨酸	2.8E+06	2.6	5.43	0.09	-3.2	1.5	氨基酸
亮氨酸	6.1E+06	4.8	5.69	0.03	-2.9	1.7	氨基酸
赖氨酸	1.6E+06	1.8	1.23	0.02	-2.6	1.7	氨基酸
甲硫氨酸	1.7E+06	2.7	3.09	0.14	-2.7	1.0	氨基酸
苯丙氨酸	1.0E+07	1.9	8.09	0.01	-1.8	1.2	氨基酸
脯氨酸	1.1E+06	2.5	1.73	0.09	-3.4	1.9	氨基酸
丝氨酸	5.4E+05	3.2	1.38	0.03	-3.9	2.2	氨基酸
苏氨酸	5.9E+05	3.2	1.47	0.02	-3.7	1.6	氨基酸
色氨酸	4.9E+06	1.3	9.09	0.00	-1.3	0.7	氨基酸
酪氨酸	5.3E+05	4.4	5.65	0.03	-2.3	1.0	氨基酸
缬氨酸	2.8E+06	2.9	2.47	0.13	-3.5	1.7	氨基酸
瓜氨酸	1.1E+05	2.6	1.54	0.03	-1.1	1.4	氨基酸衍生物
甘氨酸-亮氨酸	3.2E+05	1.6	8.67	0.00	-1.8	1.5	氨基酸衍生物
甘氨酸-缬氨酸	1.3E+05	3.8	5.51	0.08	-2.0	1.3	氨基酸衍生物
亮氨酸-丙氨酸	1.6E+05	2.7	6.75	0.02	-2.7	0.6	氨基酸衍生物
甲硫氨酸亚砷	2.4E+05	3.2	1.55	0.04	-2.2	1.2	氨基酸衍生物
N-乙酰谷氨酸	1.3E+05	1.8	5.02	0.14	-1.4	1.3	氨基酸衍生物
鸟氨酸	1.3E+05	2.1	1.22	0.02	-2.9	1.5	氨基酸衍生物
5-甲基胞苷	1.7E+04	1.8	4.87	0.20	-2.2	1.1	核碱基, 核苷, 核苷酸
腺嘌呤	1.5E+05	3.2	2.90	0.22	-3.1	2.0	核碱基, 核苷, 核苷酸
腺苷	2.0E+06	1.7	6.77	0.02	-2.3	0.6	核碱基, 核苷, 核苷酸
AMP	2.3E+04	3.5	3.60	0.31	-1.9	1.7	核碱基, 核苷, 核苷酸
胞苷	1.7E+04	4.1	2.85	0.44	0.3	1.7	核碱基, 核苷, 核苷酸
鸟嘌呤	5.0E+04	4.0	2.95	0.21	-4.3	1.0	核碱基, 核苷, 核苷酸
鸟苷	1.7E+05	2.8	7.10	0.01	-2.3	1.7	核碱基, 核苷, 核苷酸
次黄嘌呤	5.9E+04	2.8	4.21	0.17	-2.5	1.4	核碱基, 核苷, 核苷酸
肌苷	2.2E+04	2.4	7.13	0.01	-1.7	2.0	核碱基, 核苷, 核苷酸
尿苷	4.9E+04	3.1	5.84	0.04	-0.4	1.4	核碱基, 核苷, 核苷酸
黄嘌呤	5.8E+04	3.8	5.29	0.13	-2.0	2.1	核碱基, 核苷, 核苷酸
2-吡咯烷酮	1.4E+04	4.0	5.87	0.04	-2.8	1.8	其他
4-氨基丁酸	1.1E+04	4.4	2.94	0.19	-2.4	1.3	其他
甘油磷酸胆碱	7.7E+05	2.2	1.49	0.02	-2.7	1.1	其他
磷酸胆碱	1.1E+04	4.2	1.42	0.04	-3.2	1.7	其他
半胱氨酸-谷胱甘肽二硫化物	5.6E+04	4.3	1.89	0.18	-0.9	0.9	其他
谷胱甘肽, 氧化型	9.3E+04	1.8	6.15	0.02	0.4	1.3	其他
六氢吡啶羧酸	1.4E+05	3.8	2.70	0.15	-2.8	1.5	其他
4-氨基苯甲酸	1.7E+04	3.3	8.75	0.01	-2.5	1.3	维生素
胆碱	6.3E+04	4.5	1.40	0.01	-2.9	2.5	维生素
烟酰胺	1.2E+05	3.7	3.67	0.21	-4.0	1.3	维生素
烟酸	4.3E+04	3.5	3.19	0.20	-4.0	1.0	维生素
泛酸(VB5)	6.0E+04	2.9	8.74	0.00	-0.8	1.9	维生素
核黄素	3.8E+04	3.2	9.62	0.01	-0.6	1.8	维生素

表1.基于6次重复进样, 在Terrific微生物培养基中观察到的含量前50的化合物重现性数据汇总。数据

按化合物种类分类，再按照组分名排序。

结论

基于BioAccord LC-MS系统和waters_connect信息学平台的工作流程被用于分析微生物生长培养基中的化合物。使用工作流程中包含的化合物谱库，在市售的微生物生长培养基中检测到了90多种化合物。该系统在响应范围、保留时间和质量数范围上表现出良好的重现性。BioAccord LC-MS系统可轻松部署、操作简单，并且可长期保持性能稳定。这对没有LC-MS经验或经验有限的生物工艺工程师而言尤其有利，让他们得以快速轻松地运行和处理大量样品。这套使用BioAccord LC-MS系统构建的工作流程可以轻松部署到基于微生物的生物工艺开发中，为培养基监测分析提供支持。

参考资料

1. Ladage K, Choosing the Right Expression Platform for Biologics, *Pharma's Almanac*. Oct 28, 2019.
2. Baeshen MN, Al-Hejin AM, *et al.* Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*. 2015 Jul; 25(7):953–62.
3. 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.

特色产品

搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统，适用于常规生物治疗药物分析 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537>>

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

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

720007485ZH, 2022年1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