

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/286181759>

Determination of residual CHO cell DNA in conbercept

Article in *Chinese Journal of Biologicals* · July 2013

CITATIONS

0

READS

236

5 authors, including:



Wei Lian

The Chinese University of Hong Kong

4 PUBLICATIONS 10 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Conbercept, KH902 (Internal Code) [View project](#)

· 技术方法 ·

康柏西普制品中 CHO 细胞 DNA 残留量的检测

牛冬云, 连炜, 何静, 邬智刚, 柯潇
成都康弘生物科技有限公司, 四川 成都 610036

摘要: **目的** 建立特异的 CHO 细胞 DNA 残留量荧光定量 PCR(Q-PCR)检测方法。**方法** 采用 DNeasy Tissue Kit 提取 CHO 细胞基因组 DNA, 制备 DNA 标准品; 确定 Q-PCR 反应体系及反应条件, 绘制标准曲线, 建立 CHO 细胞 DNA 残留量 Q-PCR 检测方法, 并验证其专属性、准确性及精密性; 用建立的方法对 1003b02、1008b05、1012b09、1104b04、1108b13、1112b24 批康柏西普原液的 CHO 细胞 DNA 残留量进行检测。**结果** 建立的标准曲线 C_t 值与模板 DNA 浓度的对数值之间呈良好的线性关系, 相关系数为 0.99 以上; 检测 HUVEC、HEK293 细胞的 DNA 残留量均无特异性扩增曲线; 检测高、中、低浓度的 DNA 标准品 (10^5 、 10^3 、 10^1 pg/ml) 的平均回收率均在 Q-PCR 方法可接受的回收率范围 (50% ~ 200%) 内, 批间变异系数分别为 9.3%、21.8%、26.8%; 检测 10^0 pg/ml 浓度的 DNA 标准品的平均回收率为 111.6%, 变异系数为 20.4%; 康柏西普原液的 DNA 残留量远低于 100 pg/剂量。**结论** 已成功建立特异的 CHO 细胞 DNA 残留量 Q-PCR 检测方法, 该方法专属性好, 准确性及精密性高, 可作为 CHO 宿主细胞 DNA 残留量的常规检测方法。

关键词: CHO 细胞; DNA 残留量; 荧光定量 PCR

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2013)07-1023-04

Determination of residual CHO cell DNA in Conbercept

NIU Dong-yun, LIAN Wei, HE Jing, WU Zhi-gang, KE Xiao
Chengdu Kanghong Biotechnology Co. Ltd, Chengdu 610036, Sichuan Province, China
Corresponding author: NIU Dong-yun, niudongyun@cnkh.com

Abstract: **Objective** To develop a specific fluorescent quantitative PCR (Q-PCR) method for determination of residual Chinese hamster ovary (CHO) cell DNA. **Methods** Genomic DNA of CHO cells was extracted by using DNeasy Tissue Kit and prepared into standard DNA. The reaction system and condition for Q-PCR were determined, and a standard curve was plotted, based on which a Q-PCR method for residual CHO cell DNA was developed and verified for specificity, accuracy and precision. The residual CHO cell DNA contents in six batches (Lot No. 1003b02, 1008b05, 1012b09, 1104b04, 1108b13 and 1112b24 of bulks of Conbercept were determined by the developed method. **Results** The C_t value of established standard curve showed good linear relationship to the concentration of template DNA, with a correlation coefficient of more than 0.99. No specific amplification curves for residual HUVEC and HEK293 cell DNA were found. All the mean recovery rates of standard DNA at high (10^5 pg/ml), moderate (10^3 pg/ml) and low (10^1 pg/ml) concentrations were within the acceptable range of Q-PCR (50% ~ 200%), with inter-CV values of 9.3%, 21.8% and 26.8% respectively. The mean recovery rate of standard DNA at a concentration of 10^0 pg/ml was 111.6%, with a CV value of 20.4%. The residual CHO cell DNA content in bulk of Conbercept was far less than 100 pg/dose. **Conclusion** A specific Q-PCR method for determination residual CHO cell DNA content was successfully developed, which showed high specificity, accuracy and precision, and might be used as a routine method for residual CHO cell DNA content.

Key words: CHO cells; Residual DNA content; Fluorescent quantitative PCR

CHO 细胞是生物制品生产中应用较为广泛的哺乳动物细胞之一^[1]。理论上, 存在于生物制品中的微量 DNA 杂质, 可能传递肿瘤或病毒相关的基因, 并导致癌变或其他病理变化^[2-3]。因此, 宿主细胞 DNA 残留量的控制是生物制品质量控制中非常重要的环节。1997 年, WHO 第 46 届生物制品标准化专家

通讯作者: 牛冬云, E-mail: niudongyun@cnkh.com

委员会 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS) 通过对传代细胞残余 DNA 风险的再评估, 将 DNA 视为细胞污染物。FDA 规定, 重组蛋白制品中残余 CHO 细胞 DNA 接收标准应小于 100 pg/剂量, 对于大剂量的制品 (如单克隆抗体), DNA 残留量放宽到 10 ng/剂量。但应视制品的用途、用法和使用对象而决定可接受的限度^[4], 特别是对于以

CHO 细胞、Vero 细胞等具有致瘤性的连续传代细胞系生产的预防疫苗等制品,残余外源 DNA 的质量要求应更加严格,如乙型肝炎疫苗 DNA 残留量应不超过 10 pg/剂量。

目前,国外对于宿主细胞 DNA 残留量的检测,一般采用定量 PCR (quantitative PCR, Q-PCR) 技术、SYBR green 染料法或探针标记法^[5-9]。国内检测一般采用《中国药典》(三部)2010 版附录 IX B“外源性 DNA 残留量测定法”收录的 2 种方法——“DNA 探针杂交法”和“荧光染色法”,前者操作繁杂,种属特异性较差;后者测定对象为所有双链 DNA^[10-11]。因此,为了对此类制品的宿主细胞 DNA 残留量进行更好的质量控制,需要建立特异性的检测方法。

本文建立了残余 CHO 细胞 DNA 检测方法,并对该方法进行了验证。

1 材料与方法

1.1 细胞 CHO 细胞、人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)、人胚肾 293 细胞(human embryo kidney 293 cells, HEK293)均由成都康弘生物科技有限公司提供。

1.2 供试品 康柏西普眼用注射液原液由成都康弘生物科技有限公司提供,批号为:1003b02、1008b05、1012b09、1104b04、1108b13、1112b24、080303。

1.3 主要试剂及仪器 DNeasy Tissue Kit、QIAquick PCR Purification Kit 均购自德国 QIAGEN 公司;DNA Extractor Kit 购自日本 WAKO 公司;SYBR Premix Ex Taq PCR 反应混合液购自日本 TaKaRa 公司;荧光定量 PCR 仪及分析软件 OPTICON 为美国 MJ research 公司产品。

1.4 DNA 标准品的制备 采用 DNeasy Tissue Kit 提取 CHO 细胞基因组 DNA,经 EcoR I 酶切线性化,采用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化回收酶切片段,经紫外分光光度计检测 A_{260} 和 A_{280} 值,并计算纯化产物的浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 值)。15 μl /支分装后,置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存,作为 Q-PCR DNA 标准品。

1.5 康柏西普原液中残留 DNA 的提取 取不同批号的康柏西普原液,加入适量的蛋白酶 K 消化,取 100 μl 消化后的样品,按 DNA Extractor Kit 说明书提取残留的 CHO 细胞 DNA。

1.6 Q-PCR 方法的建立及标准曲线的绘制 利用 CHO 细胞 16sRNA 的序列设计特异性引物,引物序列如下:上游:5'-CCAGGCATTGGTGGCAC-3';下游:5'-AGACAGGGTTTCTCTGT-3'。序列由日本 TaKaRa

公司合成^[8,12]。反应体系中各成分的终浓度为:上、下游引物各 200 nmol/L,1 \times SYBR Premix Ex Taq,各加入模板 DNA 10 μl ,反应总体积为 25 μl 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,51 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 45 个循环。

取用灭菌超纯水稀释至 10⁵ pg/ml 的 DNA 标准品 10 μl ,进行 10 倍系列稀释(10⁴ ~ 10⁰ pg/ml),以各浓度的 DNA 为模板进行 Q-PCR 扩增。利用 OPTICON 软件分析实验数据,以 C_t 值为横坐标,以模板 DNA 浓度的对数值为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性拟合,得出回归方程。每个浓度作 3 个复孔,每个样品作 5 个复孔。

1.7 方法的验证

1.7.1 专属性验证 采用 DNeasy Tissue Kit 提取 HUVEC 细胞及 HEK293 细胞 DNA,进行 Q-PCR 检测,分析方法的专属性。

1.7.2 准确性及精密性验证 在 080303 批康柏西普原液中分别加入 10⁴、10³、10²、10¹ 和 10⁰ pg/ml 的 DNA 标准品,采用 DNA Extractor Kit 提取总 DNA 后,进行 Q-PCR 检测,并按下式计算加标回收率(%),分析该方法的准确性。

加标回收率(%) = (实际检测值 - 药品检测值) / 加标理论值 \times 100%

分别配制高、中、低浓度的 DNA 样品(10⁵、10³、10¹、10⁰ pg/ml),进行 Q-PCR 检测,计算回收率和变异系数 CV(%),分析该方法的准确性和精密性。

回收率(%) = 实测值 / 理论值 \times 100%

1.8 方法的初步应用 用建立的 Q-PCR 方法对 1003-b02、1008b05、1012b09、1104b04、1108b13、1112b24 批康柏西普原液的 CHO 细胞 DNA 残留量进行检测。

2 结果

2.1 DNA 标准品的浓度和纯度 标定后的 DNA 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,纯度为 1.84。

2.2 Q-PCR 标准曲线及线性回归方程 标准曲线见图 1,线性回归方程为: $y = a x + b$, C_t 值与模板 DNA 浓度的对数值之间呈良好的线性关系,相关系数为 0.99 以上。

2.3 方法的验证

2.3.1 专属性 以 HUVEC、HEK293 细胞 DNA 为模板的 Q-PCR 荧光信号与空白对照基本一致,无特异性扩增曲线,见图 2。表明该方法的专属性较好,可用于制品中 CHO 细胞 DNA 残留量的检测。

2.3.2 准确性及精密性 加标回收率依次分别为 104.3%、81.8%、82.0%、86.0%、148.0%，均在 Q-PCR 法可接受的回收率范围(50% ~ 200%)内。见表 1。

10⁵、10³、10¹ pg/ml 浓度的 DNA 标准品进行 2 次检测,每次重复测定 3 次,平均回收率均在 Q-PCR 法可接受的回收率范围(50% ~ 200%)内;批间 CV 分别为 9.3%、21.8%、26.8%。见表 2。

对 10⁰ pg/ml 浓度的 DNA 标准品重复检测 6 次,平均回收率为 111.6%,批内 CV 为 20.4%,准确性和精密性均符合要求,表明以此浓度作为该方法的定量下限是适合的。

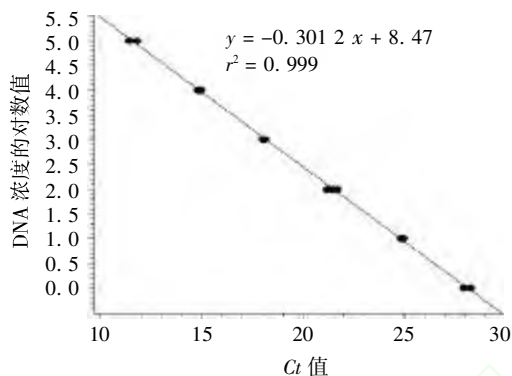


图 1 Q-PCR 标准曲线

Fig 1. Standard curve of Q-PCR

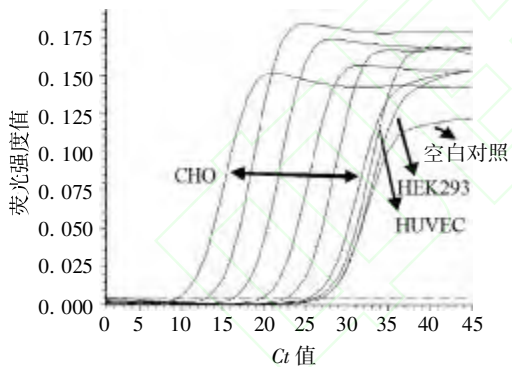


图 2 Q-PCR 检测 CHO 细胞 DNA 残留量的专属性

Fig 2. Specificity of Q-PCR for determination of residual CHO cell DNA

表 1 不同浓度 DNA 标准品的回收率(%)

Tab 1. Recovery rates(%) of standard DNA at various concentrations

DNA 浓度(pg/ml)		回收率	R ²
理论值	提取后实测值		
10 ⁴	10 433 ± 102. 1	104. 3	0. 997
10 ³	817. 6 ± 23. 1	81. 8	
10 ²	82. 8 ± 9. 6	82. 8	
10 ¹	8. 6 ± 0. 4	86. 0	
10 ⁰	1. 48 ± 0. 5	148. 0	

表 2 不同浓度 DNA 标准品的精密性

Tab 2. Precision of Q-PCR method for standard DNA at various concentrations

测定次数	理论值 (pg/ml)	次数	实测值 (pg/ml)	回收率 (%)	批内 CV(%)	批间 CV(%)
1	10 ⁵	1	111 500. 000	118. 9	12. 7	9. 3
		2	136 333. 000			
		3	109 000. 000			
2	10 ³	1	114 000. 000	121. 0	7. 4	
		2	118 000. 000			
		3	131 000. 000			
1	10 ¹	1	1 263. 470	118. 2	29. 1	21. 8
		2	1 478. 170			
		3	803. 980			
2	10 ⁰	1	938. 800	117. 8	18. 4	
		2	1 237. 000			
		3	1 357. 000			
1	10 ¹	1	13. 130	108. 9	35. 7	26. 8
		2	13. 150			
		3	6. 400			
2	10 ⁰	1	10. 200	131. 6	20. 0	
		2	14. 060			
		3	15. 230			
1	10 ⁰		1. 241	111. 6	20. 4	/
2			1. 284			
3			0. 829			
4			1. 378			
5			1. 097			
6			0. 866			

2.4 方法的初步的应用 检测结果显示,康柏西普原液的 DNA 残留量远低于 100 pg/剂,符合 FDA 及《中国药典》(三部)2010 版的相关要求。见表 3。

表 3 康柏西普原液中 DNA 残留量的检测结果

Tab 3. Determination of residual CHO cell DNA content in bulk of Conbercept

批号	残余 DNA 浓度(pg/ml)	
	$\bar{x} \pm s$	CV(%)
1003b02	1. 2 ± 0. 173	14. 3
1008b05	2. 6 ± 0. 154	5. 9
1012b09	1. 3 ± 0. 255	19. 0
1104b04	1. 4 ± 0. 074	5. 1
1108b13	1. 3 ± 0. 123	9. 6
1112b24	0. 9 ± 0. 036	4. 2

3 讨论

为了更好地控制产品的质量,需要针对不同产品的特性,建立特异的质量控制方法,并对其进行全面的验证。

16sRNA 是微生物的核糖体 RNA,在进化过程中保持相对恒定的序列结构。因此,常用于特异引物序列的设计,从而进行微生物的种属鉴定。本研究利用 CHO 细胞 16sRNA 的特异性引物,通过 SYBR Green I 染料 Q-PCR 法,根据荧光信号的强度确定 PCR 体系中存在的双链 DNA 数量^[8,13]。

Q-PCR 方法尚无统一的验证接受标准,本文参考文献^[9],PCR 产物的量呈 2^n 增长,每增加 1 个循环,产物量即在原有基础上增加 1 倍,因此计算回收率时不能按照线性增长的模式,以理论值 $\pm X\%$ 进行评价,而应按照理论值 $\pm 2^n$ 倍进行评价,通常最大可接受回收率设定在理论值 $\pm 2^1$ 倍,即 ± 1 个循环(50% ~ 200%)。

宿主细胞 DNA 属于微量杂质,测定时受干扰因素较多,很难实现灵敏、准确、快速的检测。常用的地高辛标记的探针杂交法步骤比较繁琐,且不能实现定量分析;DNA 荧光染色法能够灵敏、快速地进行准确定量,但荧光染料 Picogreen 能与所有的双链 DNA 结合,对于核酸类基因治疗制品,如溶瘤腺病毒、核酸疫苗类制品等使用存在一定的局限性。本文所建立的 CHO 细胞 DNA 残留量检测方法,经过验证后,残余 DNA 的回收率及方法的线性、准确性、精密度均符合要求,检测下限达到 1 pg/ml,可有效用于以 CHO 细胞为表达系统的生物制品中宿主细胞 DNA 残留量的特异性检测,为保证产品的质量可控奠定了基础。而且由于本文所使用的 DNA 标准品较易制备,适合由国家建立统一标准品,可减少不同厂家自己制备造成的差异。

确保制品中残余 DNA 在抽提过程中能被有效地提取,是采用 Q-PCR 对其进行准确定量的前提。本文所采用的 DNA 提取试剂盒,是美国药典 USP32 推荐的一种商业化微量 DNA 提取试剂盒。其利用载体分子糖原、离液剂碘化钠和表面活性剂 N-月桂酰肌氨酸钠来破坏 DNA 和样品的结合,提取效率较好^[13-14]。采用本实验建立的方法检测 6 批康柏西普原液的 DNA 残留量,结果均远低于 100 pg/剂量,符合相关法规的要求。综上所述,本文建立的检测方法,可作为 CHO 细胞 DNA 残留量的常规检测方法。

参考文献

- [1] Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, *et al.* Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting [OL]. CHO Consortium: SBE Special Edition, 2006: 40-47.
- [2] Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (19): 3308-3311.
- [3] Sheng-Fowler L, Lewis AM Jr, Peden K. Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines [J]. *Biologicals*, 2009, 37 (3): 190-195.
- [4] FDA. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use(1997). U.S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research [J]. *J Immunother*, 1997, 20 (3): 214-243
- [5] Verardo ML, Carvalho JG, Delgado DN, *et al.* Accuracy and sensitivity of residual DNA detection by QPCR is not predicted by target copy number [J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28 (2): 428-434.
- [6] Lovatt A. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products [J]. *J Biotechnol*, 2002, 82 (3): 279-300.
- [7] Mehta S, Keer JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods [J]. *BioProcess Int*, 2007: 44-58.
- [8] Nissom PM. Specific detection of residual CHO host cell DNA by real-time PCR [J]. *Biologicals*, 2007, 35 (3): 211-215.
- [9] Gijssbers L, Koel B, Weggeman M, *et al.* Quantification of residual host cell DNA in adenoviral vectors produced on PER. C6 cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(3): 393-398.
- [10] Jezuit MA, Letwin BW. Detection of residual host cell DNA by PCR[P]. United States Patent 5393657.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 60-61.
- [12] 王兰, 高凯, 毕华, 等. 荧光法和 DNA 杂交法检测重组技术产品中残余 DNA 的比较 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(7): 1063-1066.
- [13] 王兰, 王军志. 关于生物制品残余 DNA 质量控制问题 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20 (8): 678-683, 687.
- [14] USP32-NF27(United States Pharmacopoeia), <1130> .Nucleic acid-based techniques -Approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing)[S]. 2009

(收稿日期:2012-10-28)