

# 荧光定量 PCR 法测定重组人干扰素 $\alpha 2b$ 原液中宿主 DNA 的残留

苏喆<sup>1</sup>, 周朝东<sup>1</sup>, 黄哲魁<sup>1Δ</sup>, 尉然<sup>2</sup>

(1. 天津市药品检验所 生化室, 天津 300070; 2. 天津华立达生物工程有限公司, 天津 300457)

**[摘要]** **目的** 建立重组人干扰素  $\alpha 2b$  原液中宿主 DNA 残留量测定的方法并进行验证, 用于对该产品的质量的控制。**方法** 通过 wako DNA 提取试剂盒提取干扰素原液中的宿主残留 DNA, 再利用 SYBRGreen 染料法对样品和标准 DNA 进行定量 PCR 测定, 根据标准曲线对样品中的 DNA 残留量分析。对建立的方法进行引物特异性以及结果准确性和精密性的验证, 同时对企业提供的 3 批干扰素原液中的残留 DNA 测定。**结果** 该方法检测假单胞菌基因组 DNA 的最低准确定量浓度可达  $12 \text{ fg}/\mu\text{L}$ , DNA 含量在  $12 \text{ fg}/\mu\text{L} \sim 120 \text{ ng}/\mu\text{L}$  范围内线性良好, 标准曲线的相关系数  $r = 0.998$ ; wako DNA 提取试剂盒提取不同量的加标样品回收率均在 50% ~ 200% 范围内; 该方法检测 3 批干扰素原液的 DNA 残留量均低于标准限度, 符合《中国药典》三部 2010 年版和 2015 年版中关于假单胞菌产重组人干扰素  $\alpha 2b$  原液中宿主 DNA 残留量的要求。**结论** wako DNA 提取试剂盒能解决干扰素原液中样品前处理的技术难点, 与定量 PCR 法结合能够简便、快速、准确地对干扰素原液中残留的 DNA 定量测定。

**[关键词]** wako DNA 提取试剂盒; 荧光定量 PCR; 假单胞菌; 干扰素; DNA 残留; 质量控制

**[中图分类号]** R917 **[文献标识码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.1005-1678.2016.04.61

## Determination of residual host cell DNA in recombinant human interferon $\alpha 2b$ substances by quantitative PCR

SU Zhe<sup>1</sup>, ZHOU Chao-dong<sup>1</sup>, HUANG Zhe-su<sup>1Δ</sup>, WEI Ran<sup>2</sup>

(1. Biochemical Lab, Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Hualida Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop and verify a method for determination of residual host cell DNA in recombinant human interferon  $\alpha 2b$  substances, which is used for the quality control of the product. **Methods** The residual host cell DNA was extracted by wako DNA extractor kit and determined by SYBRGreen based q-PCR using standard DNA as control. The residual host cell DNA was analyzed according to the standard curve. The developed method was verified by primer specificity, results accuracy and precision and used for determination of 3 batches of interferon substances. **Results** The minimum quantitative limit of residual host cell DNA by the developed method was  $12 \text{ fg}/\mu\text{L}$ , while the linear range was  $12 \text{ fg}/\mu\text{L} \sim 120 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , with a correlation coefficient ( $r$ ) of 0.998. The designed primers were specific to the DNA templates. The recovery rates of spiked samples with different DNA quantity were between 50% -200%. The residual host cell DNA determined by this method were not more than the limit, which were complied with the requirements for residual host cell DNA in Chinese Pharmacopeia (volume III, 2010 edition and 2015 edition). **Conclusion** The wako DNA extractor kit could successfully solved the technical difficulties of sample pretreatment during residual DNA assay. The q-PCR method was simple, rapid and accurate for quantitation of residual host cell DNA in interferon substances.

**[Keywords]** wako DNA extractor kit; quantitative PCR (q-PCR); pseudomonas; interferon; residual DNA; quality control

重组人干扰素  $\alpha 2b$  具有广谱抗病毒、抑制细胞增殖、提高机体免疫功能等作用<sup>[1-3]</sup>。《中国药典》三部 2010 年版和 2015 年版收载的干扰素制剂均由大肠杆菌、酿酒酵母和假单胞菌发酵产生<sup>[4-5]</sup>。天津华立达生物工程有限公司生产的重组人干扰素  $\alpha 2b$  即由假单胞菌携带能够产生人白细胞干扰素  $\alpha 2b$  基因的质

粒发酵产生, 临床主要用于治疗急慢性病毒性肝炎、带状疱疹、尖锐湿疣等。因宿主菌残留的 DNA 具有潜在的危害性, 所以需要对发酵产物中的宿主残留 DNA 进行质量控制<sup>[6]</sup>。《中国药典》三部 2010 年版和 2015 年版对干扰素原液中宿主残留 DNA 量都作了规定, 两版药典在该处的区别是 2010 年版要求原液中宿主 DNA 残留量不得超过  $10 \text{ ng}/\text{剂}$  量而 2015 年版则要求原液中宿主 DNA 残留量每支 (瓶) 不得超过  $10 \text{ ng}$ 。两版药典附录收载的宿主残留 DNA 检测方法也相同, 都是 2 种方法: 第一法是 DNA 探针杂交法, 第二法是荧光染色法<sup>[7-8]</sup>。地高辛标记的探针

作者简介: 苏喆, 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 生化药品检验与研究, E-mail: marilyn66@163.com; 黄哲魁, 通信作者, 女, 本科, 主任药师, 研究方向: 生化药品检验与研究, E-mail: zcd82@163.com。

法具有操作繁琐、耗时较长等缺点;而荧光染色法也存在灵敏度低的缺点<sup>[9-10]</sup>。现使用以 SYBRGreen 荧光染料为基础的荧光定量 PCR 法来检测重组人干扰素  $\alpha 2b$  原液中的宿主 DNA 残留量,该方法具有灵敏度高、准确性好、简便快速等优点,可用于假单胞菌发酵产生的重组人干扰素  $\alpha 2b$  生产过程中的质量控制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 供试品:3 批干扰素原液由天津华立达生物工程有限公司提供。

标准基因组 DNA:干扰素宿主菌假单胞菌由天津华立达生物工程有限公司提供,采用天根细菌基因组提取试剂盒提取,经微量紫外可见分光光度计测定浓度和纯度。

1.1.2 主要试剂及仪器:细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根公司,宿主残留 DNA 提取试剂盒 wako DNA Extractor kit 购自日本 wako 公司。2 × PowerSYBRGreen Master Mix 购自美国 ABI 公司,微量紫外可见分光光度计 NanoDrop 购自美国 Thermo 公司,荧光定量 PCR 仪 stepone 购自美国 ABI 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 干扰素原液中宿主残留 DNA 提取:取不同批号的干扰素原液按 wako DNA extractor kit 说明书提取样品中的残留 DNA。

1.2.2 q-PCR 方法建立及标准曲线绘制:利用假单胞菌 16sRNA 的序列设计特异引物,引物序列如下:上游 5'-CACG-CCGTAAACGATGTCAA-3';下游 5'-AGCTGCGCCACTAAAATCTCA-3',引物序列由 Invitrogen 公司合成。反应体系中各成分的加入量为:上下游引物各 10  $\mu\text{M}$  各加入 1  $\mu\text{L}$ , 2 × PowerSYBRGreen Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ ,超纯水 7  $\mu\text{L}$ ,总体积 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  再次延伸 5 min。取灭菌超纯水按 10 倍梯度稀释标准基因组 DNA,浓度从 120  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ~ 0.12  $\text{fg}/\mu\text{L}$ ,以各浓度的 DNA 为模板行 PCR 扩增。以模板 DNA 浓度的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标绘制标准曲线,进行线性拟合,求出回归方程。每个浓度做 3 个复孔,每个样品亦做 3 个复孔。

#### 1.3 方法学验证

1.3.1 引物特异性的验证:按 1.2.2 的方法配制标准曲线的 PCR 反应体系扩增,扩增完毕后做溶解曲线,若无杂峰则说明设计的引物特异性较好同时也说明选择退火的温度合适。

1.3.2 准确性及精密性验证:在干扰素原液批号为 BD150102 中分别加入 1200、120、12  $\text{pg}$  的基因组 DNA 标准品,采用 DNA extractor kit 提取总 DNA 后,进行 q-PCR 检测,并按下述公式计算加标回收率(%),分析该方法的准确性。加标回收率(% ) = (实际测定值-本底残留值)/加标理论值 × 100%

1.4 方法应用 用建立的 q-PCR 方法对 3 批干扰素原液的宿主 DNA 残留量测定。

### 2 结果

2.1 DNA 标准品的浓度及纯度 经提取后测定,其浓度为 120  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,纯度  $A_{260}/A_{280}$  为 1.87。

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: $y = -3.6012x + 40.035$  ( $r = 0.998$ ),Ct 值与模板 DNA 浓度的对数呈良好线性关系,相关系数为 0.998。

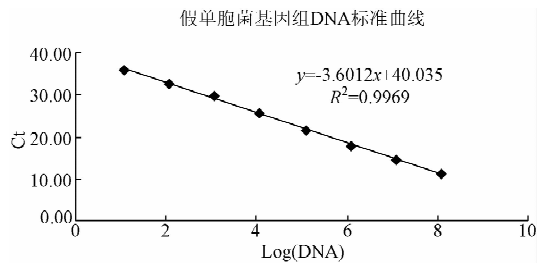


图 1 假单胞菌基因组 DNA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of pseudomonas genome DNA

### 2.3 方法学验证

2.3.1 引物特异性的验证:在 q-PCR 扩增不同浓度的标准 DNA 做标准曲线时给荧光定量 PCR 仪设置溶解曲线步骤,实验证明除主峰之外无杂峰,证明引物特异性良好,退火温度适当,符合实验要求。溶解曲线见图 2。

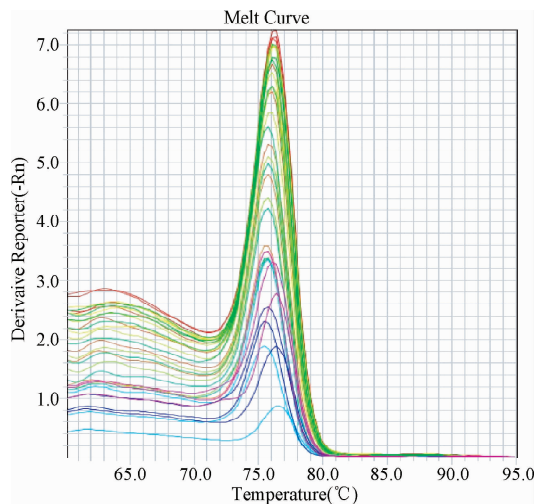


图 2 溶解曲线分析

Fig. 2 Analysis of melt curve

2.3.2 准确性及精密性验证:干扰素原液的加标回收率在 q-PCR 可接受范围内(50% ~ 200%),不同浓度加标回收率的变异系数均在 20% 以内。见表 1。

表 1 干扰素原液不同加标量样品的回收率

Tab. 1 The recovery of interferon stock solution of adding different amount of samples

理论值 (pg)	测定次数	实测值 (pg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	变异系数 CV (%)
1200	1	1894.1	157.7%	146.1%	7.1%
	2	1656.1	138.0%		
	3	1710.0	142.5%		
120	1	135.1	111.3%	107.1%	3.5%
	2	125.1	104.2%		
	3	126.7	105.6%		
12	1	12.4	90.7%	97.6%	6.5%
	2	11.9	99.1%		
	3	12.4	103.0%		

2.4 方法应用 检测结果显示,干扰素原液中宿主 DNA

残留量均远低于 10ng/剂量,符合《中国药典》三部(2010 年版)的相关要求。见表 2。

表 2 干扰素原液中宿主 DNA 残留量的测定结果

Tab.2 Determination of residual host cell DNA content in interferon stock solution

批号	残留 DNA 量 (pg/剂量)	CV (%)
BD150102	0.3	6.5
BD150201	0.2	5.2
BD150202	0.3	8.2

### 3 讨论

生物制品的质量控制不仅是对终产品的质量控制,更是对整个生产过程的质量控制。生物制品在生产过程中宿主残留的微量 DNA 本身可引起人体免疫反应<sup>[11-13]</sup>,因此,如何选择灵敏度高、准确性好、简单快速的方法对生产过程中的宿主残留 DNA 进行质量控制便成为提高产品质量的重要一环。

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信息。因此常被用来设计特异性引物以进行微生物种属的鉴别<sup>[14]</sup>。本研究参考相关文献<sup>[15-18]</sup>利用假单胞菌的 16sRNA 为序列设计特异性引物后通过基于 SYBRGreen 染料的荧光定量 PCR,最终根据荧光信号的强度来确定干扰素原液中宿主残留的 DNA 量。

《中国药典》三部 2010 年版和 2015 年版收录的宿主残留 DNA 测定方法有 2 种,分别是 DNA 探针杂交法和荧光染色法,二者都存在灵敏度低,操作繁琐,耗时较长等缺点<sup>[16-17]</sup>。荧光定量 PCR 法则具有灵敏度高、准确、快速等优点,是实现生物制品中宿主残留 DNA 测定的最佳方法。目前定量 PCR 方法尚无统一的验证接受标准,因 PCR 产物的量呈 2<sup>n</sup> 增长,每增加 1 个循环,产物量即在原有的基础上增加 1 倍,因此回收率的计算应按理论值 ±2<sup>x</sup> 倍评价,通常最大可接受回收率标准应设定在理论值 ±2<sup>1</sup> 倍,即 ±1 个循环(50% ~ 200%)<sup>[14]</sup>。

宿主残留 DNA 属于微量杂质,测定时干扰因素多。为确保干扰素原液中残留 DNA 能够被有效提取,本文经过对比,采用了美国药典推荐的 wako DNA extractor kit,其提取回收率符合要求。在实验过程中还采用了磁珠提取试剂盒对干扰素原液进行提取,其回收率亦符合要求,只是对操作人员的技能要求较高,且实验花费较大,因此笔者倾向于选择 wako 公司生产的 DNA 纯化试剂盒。经实验,3 批干扰素原液中的宿主 DNA 残留量均远低于 10ng/剂量的标准,符合《中国药典》的要求。综上所述,本文建立的检测方法可作为假单胞菌产重组人干扰素 α2b 原液中宿主 DNA 残留量测定的常规检测方法。CP

### 参考文献

- [1] 马宗斌. 阿德福韦酯联合干扰素 α-2 b 治疗拉米夫定耐药的慢性乙型肝炎的疗效[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(3):215-216.
- [2] 谢雯,吴璐. 干扰素 α-2 b 在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的应用[J]. 中国临床医生,2012,40(4):3-5.
- [3] 李卫国. 重组人干扰素对慢性乙型肝炎患者细胞因子水平的的影响及抗病毒效果[J]. 山东医药,2011,51(43):88.
- [4] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 中国医药科技出版社,2010:266-287.

- [5] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 中国医药科技出版社,2015:305-326.
- [6] Wang L, Wang JZ. Issue on quality control of residual DNA in biological products[J]. Chin J N Drugs,2011,20(8):678-683,687.
- [7] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 中国医药科技出版社,2010:附录 60-61.
- [8] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 中国医药科技出版社,2015:通则 107-109.
- [9] Wang L, Gao K, Bi H, et al. Comparison of fluorescence and DNA hybridization methods to determine residual DNA in recombinant products[J]. Chin J Pharm Anal,2009,29(7):1063-1066.
- [10] 曹守春,李玉华,徐康为,等. 阈值法检测人用狂犬病疫苗 Vero 细胞 DNA 残留量方法的建立及初步验证[J]. 中国生物制品学杂志,2014,27(3):423-426.
- [11] WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks[S]. Geneva: World Health Organization,2010.
- [12] 王兰,李萌,郭玮,等. 磁珠分离结合定量 PCR 法检测单克隆抗体产品中 CHO 细胞 DNA 残留量[J]. 中国生物制品学杂志,2014,27(4):555-558.
- [13] Nissom PM. Specific detection of residual CHO host cell DNA by real-time PCR[J]. Biologicals,2007,35(3):211-215.
- [14] 牛冬云,连炜,等. 康柏西普制品中 CHO 细胞 DNA 残留量的检测[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(7):1023-1026.
- [15] Jezuit MA, Letwin BW. Detection of residual host cell DNA by PCR[P]. United states Paten 5393657.
- [16] Mehta S, Keer JT. Performance Characteristics of Host-Cell DNA Quantification Methods[J]. Bioprocess Technical, 2007:44-58.
- [17] 王昊宇,张公亮,侯红漫. 应用 SYBR Green I 溶解曲线检测食源性单增李斯特菌[J]. 食品工业科技,2013,34(10):77-79,88.
- [18] 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.

(编校:王伊伊)