

★论著★

荧光法和 DNA 杂交法检测重组技术产品中残余 DNA 的比较^{*}王兰, 高凯, 毕华, 李永红, 饶春明^{**}

(中国药品生物制品检定所生化室, 北京 100050)

摘要 目的: 对于检测重组技术产品中残余 DNA 的荧光法及 DNA 杂交法进行比较性评价。方法: 应用地高辛标记的 DNA 杂交法以及 PicoGreen 荧光法对 3 批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 中外源 DNA 残留量进行测定。结果: 荧光法检测结果显示 3 批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 制品中 DNA 残留量分别为每人份剂量 $(0.695 \pm 0.021) \text{ ng}$ $(0.664 \pm 0.021) \text{ ng}$ $(0.916 \pm 0.017) \text{ ng}$ 而用地高辛标记的 DNA 杂交实验由于阳性基因组 DNA 灵敏度偏低以至于结果无法判断。应用琼脂糖凝胶电泳和 PicoGreen 荧光法测得由生产单位提供的阳性 DNA 浓度明显偏低, 与标示量不符, 这说明阳性 DNA 含量偏低是本次 DNA 杂交实验失败的主要原因。通过对该阳性 DNA 重新定量后再进行 DNA 杂交检测, 结果显示 3 批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 制品的 DNA 残留量均小于每人份剂量 1 ng , 该结果与 PicoGreen 荧光法相一致。结论: 荧光法具有简便、快速, 自动化程度高, 不受工程菌种类限制, 能够精确定量等特点, 优于传统的 DNA 杂交法, 更适于重组制品残余外源 DNA 含量的常规检定。

关键词: 荧光法; DNA 杂交法; 残余 DNA; 重组生物制品; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1063-04

Comparison of fluorescence and DNA hybridization methods for the determination of residual DNA in recombinant products^{*}

WANG Lan, GAO Kai, BI Hua, LI Yong-hong, RAO Chun-ming^{**}

(Department of Biochemistry, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050 China)

Abstract **Objective** Evaluation the fluorescence method and DNA hybridization method to determine DNA content for the quality control of residual DNA in recombinant products **Method** To apply Digoxin-labeled DNA hybridization and PicoGreen fluorescence methods to determine residual DNA in three batches of recombinant human interferon $\alpha 2b$ **Results** The fluorescence results revealed residual DNA of three batches of recombinant human interferon $\alpha 2b$ was $(0.695 \pm 0.021) \text{ ng per dose}$ $(0.664 \pm 0.021) \text{ ng per dose}$ and $(0.916 \pm 0.017) \text{ ng per dose}$ respectively. But because of the positive genome DNA, the sensitivity of Digoxin-labeled DNA hybridization was too low to determine the result. DNA electrophoresis and PicoGreen fluorescence method indicated that the concentration of positive genome DNA provided by the manufacturer was obviously low, which was the main reason for the failure of DNA hybridization. When the positive DNA was quantitated, DNA hybridization revealed that the residual DNA of these three batches of recombinant human interferon $\alpha 2b$ was less than 1 ng per dose . These results were in accord with the PicoGreen fluorescence results. **Conclusion** The fluorescence method is convenient, fast, automatic, non-specific and quantitative. It is better than the traditional Digoxin-labeled DNA hybridization and more suitable for routine test for the content of residual extraneous DNA of recombinant biologics.

Key words fluorescence method; DNA hybridization; residual DNA; recombinant biologics; quality control

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2007AA021200)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095380 E-mail: raom@nicbp.org.cn

随着基因工程技术的迅猛发展,越来越多的新药研制采用基因重组技术。由于在生产过程中使用了工程菌(细胞),而宿主菌(细胞)的残留DNA是重组药物中特有的潜在致癌性杂质,存在安全性问题,因此宿主菌基因组DNA残留量的检测极为重要。WHO和欧盟建议每人份传代细胞的纯化产品中可接受的残余DNA含量为 $10\text{ ng}^{[1]}$;FDA要求其含量应不高于每人份剂量 $100\text{ pg}^{[2]}$;2005年版中国药典三部规定其含量应不高于每人份剂量 $10\text{ ng}^{[3]}$ 。由于外源DNA宿主种类繁多,片段大小不一,属微量杂质,测定时干扰因素较多,如何对其进行灵敏、快速、准确的检测是一项困难的工作。现行的检测方法主要是地高辛标记的DNA杂交法,但这种方法需要生产单位提供宿主菌(细胞)DNA标准进行杂交实验,宿主菌DNA的种属和质量直接影响到检测结果的可靠性。此外,DNA杂交法实验操作周期长,步骤烦琐,干扰因素多,重复性差,不能进行定量分析^[4]。为了解决这些问题,应用高灵敏度的双链DNA荧光染料PicoGreen对DNA含量进行测定。该染料能够与双链DNA结合形成复合物,在波长 480 nm 激发下产生超强荧光信号,可用荧光酶标仪在波长 520 nm 处进行检测,在一定的DNA浓度范围内以及该荧光染料过量的情况下,荧光信号与DNA浓度成正比^[5,6]。荧光法可以不区分宿主菌来源,能够检测出重组制品中全部DNA污染。本文利用该荧光法对生产单位提供的阳性DNA及重组生物制品中的残余外源DNA进行分析,从而进一步评价传统的地高辛标记的DNA杂交法存在的问题。

1 材料与方法

1.1 试剂 PicoGreen dsDNA Quantitation Kit试剂盒为美国Molecular Probes公司产品;96孔黑色酶标板为COSTAR公司产品;地高辛标记和检测试剂盒以及正电荷尼龙膜均购自美国罗氏公司。

1.2 供试品 3批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 为重组技术产品室留样检品;大肠杆菌K12的基因组DNA标准为生产单位提供。

1.3 仪器 GEM N IXS 荧光酶标仪,SOFTmaxPRO 软件为美国Molecular Devices公司产品。

1.4 探针制备、纯化及DNA杂交法的灵敏度检测 取试剂盒提供的用于探针标记的control DNA $1\text{ }\mu\text{g}$ 加无菌双蒸水至终体积 $16\text{ }\mu\text{L}$,沸水浴 10 min 后,冰浴中迅速冷却。取DIG-High Prime $4\text{ }\mu\text{L}$ 加入变性DNA中,混匀后稍离心, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 h ,加

入乙二胺四乙酸二钠溶液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0) $2\text{ }\mu\text{L}$, $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$,无水乙醇 $75\text{ }\mu\text{L}$,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h 以上。 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 小心弃去上清,用70%乙醇浸洗沉淀,抽干。加入TE缓冲液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 复溶上述沉淀即为纯化的探针。将试剂盒提供的Unlabeled control DNA依次稀释成 $10, 1, 0.1, 0.01\text{ ng}\cdot\text{ }\mu\text{L}^{-1}$,然后分别取各浓度溶液点样 $1\text{ }\mu\text{L}$ 于尼龙膜上。经杂交和封闭后,通过Anti-DIG-AP和NBP/BCIP进行显色反应,从而确定试剂盒检测的灵敏度。

1.5 DNA杂交法检测重组人干扰素 $\alpha 2b$ 中外源性DNA残留量 将3批样品、阳性对照(大肠杆菌K12的基因组DNA)经蛋白酶K预处理后,置沸水浴 10 min 立即冰浴冷却, $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 s 经点膜、杂交后通过Anti-DIG-AP和NBP/BCIP进行显色反应。与阳性对照比较,根据显色深浅判定样品中外源性DNA的含量。

1.6 荧光法DNA标准曲线的建立 根据PicoGreen dsDNA Quantitation Kit说明书进行操作。Lambda DNA标准用TE缓冲液从 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 开始按2倍连续稀释10个稀释度,每个稀释度设置3个平行样品。按照试剂盒提供的方法,将稀释后样品与PicoGreen反应液(用TE缓冲液1:200稀释)等体积混合,室温避光反应 5 min 。用荧光酶标仪测定,以 480 nm 为激发光波长,以 520 nm 为增强的发射荧光检测波长进行测定,所得数据用SOFTmax-PRO软件进行分析,作图并求得回归方程。

1.7 基因组DNA(TE缓冲液溶解)中DNA含量及回收率测定 基因组DNA与PicoGreen反应液等体积混合,平行做3孔;同时做回收率试验,即生产单位提供的基因组DNA先等体积加入 $40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lambda DNA标准,再与PicoGreen反应液等体积混合,平行做3孔。按“1.6”项下方法进行测定,将样品荧光读数平均值($n=3$)代入标准曲线回归方程求得结果。回收率用以下公式计算:回收率=(加入Lambda DNA样品测定值 $\times 2$ -DNA样品测定值)/加入Lambda DNA理论值。

1.8 3批重组制品中DNA检测回收率及DNA含量的测定 按“1.7”项下方法利用荧光法测定并计算3批供试品中DNA回收率及其DNA含量。同时将基因组DNA按照“1.6”项下方法测定的结果进行调整后,按“1.5”项下杂交法再次检测制品中DNA残留量。

2 结果

2.1 探针标记及灵敏度检测 用地高辛标记和检测试剂盒提供的 Unlabeled control DNA 进行灵敏度检测结果如图 1 所示, 标记探针 10 pg 稀释点可见显色, 因此标记探针的检测灵敏度能够满足进一步检测要求。

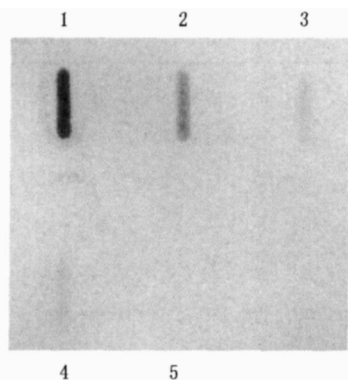


图 1 探针标记灵敏度检测图

Fig 1 Detection of probe labeling sensitivity

1~ 4 阳性对照 (positive control): 10 ng 1 ng 100 pg 10 pg
5 阴性对照 (negative control)

2.2 杂交法检测重组人干扰素 $\alpha 2b$ 中外源性 DNA 残留量 按照企业申报规程每人份剂量的原液中 DNA 残留量应小于 1 ng 结果如图 2 所示, 生产单位提供的 DNA 标准检测灵敏度仅为 10 ng 不能够满足该样品检测的要求, 并且多次反复实验均是如此, 导致无法判断样品结果。分析原因可能是该阳性 DNA 质量有问题, 所以进一步应用荧光法和电泳法对 DNA 标准的质量进行评价。

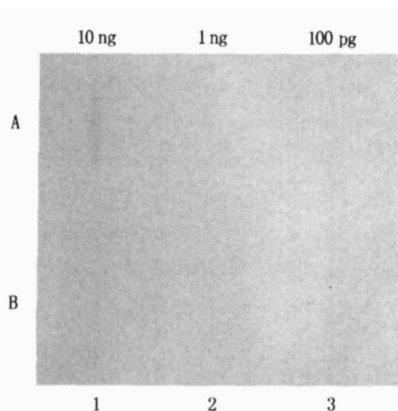


图 2 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 中外源性 DNA 残留检测图

Fig 2 Detection of residual DNA in recombinant human interferon $\alpha 2b$

A. 标准 DNA (standard DNA): 10 ng 1 ng 100 pg

B 样品 (sample): 1~ 3 three batches of recombinant human interferon $\alpha 2b$

2.3 荧光法 DNA 含量测定标准曲线 标准曲线

DNA 含量在 $0.391 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内各稀释度荧光读数的 RSD 均小于 20%, 用 SOFTmaxPRO 软件进行自动分析, 以荧光读数平均值 ($n = 3$) 对 DNA 含量作出标准曲线回归方程:

$$y = 1.825x + 0.376 \quad r = 1.000$$

2.4 荧光法检测基因组 DNA 含量及回收率结果 按“1.5”项下方法对生产单位提供的阳性 DNA 含量进行测定。该阳性 DNA 标识浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而利用荧光法测得 DNA 含量平均值 ($n = 3$) 为 $(6.709 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.1%, 回收率平均值为 102%, 由此可见该阳性 DNA 标准浓度过低。通过 DNA 电泳可见, 按照该阳性 DNA 标识浓度取 200 ng 基因组 DNA 上样, 与 200 ng Lambda DNA 相比, 进一步证明基因组 DNA 浓度明显偏低 (图 3)。

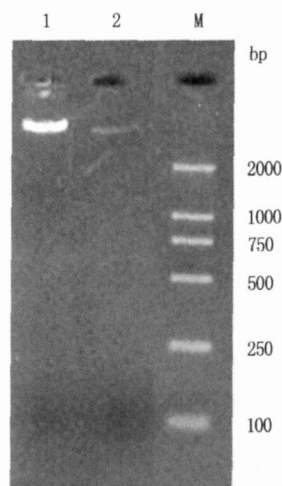


图 3 工程菌基因组 DNA 电泳图

Fig 3 The electropherogram of engineering bacteria genome DNA

M: DNA 相对分子质量标准 DL 2000 (DNA Marker DL 2000)

1. 200 ng 的 Lambda DNA (200 ng Lambda DNA)

2. 200 ng 的基因组 DNA (200 ng genome DNA)

2.5 3 批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 制品中 DNA 残留量及回收率测定结果 按“1.7”项下方法利用荧光法测定了 3 批重组人干扰素 $\alpha 2b$ 中的 DNA 残留量, 回收率及校正后的 DNA 含量结果见表 1, DNA 回收率在 72.8% ~ 92.5% 之间。根据其人用最大使用剂量进行计算, 这 3 批制品宿主 DNA 残留量均小于每人份剂量 1 ng 符合企业申报规程的要求。

按照荧光法定量的结果将阳性 DNA 浓度进行调整, 同时利用超声波处理 DNA 标准, 使其片断大小适合于 DNA 杂交和探针标记。通过 DNA 杂交法可见检测灵敏度提高, 3 批制品宿主 DNA 残留量均小于每人份剂量 1 ng (图 4)。

表 1 3批重组制品中 DNA回收率及 DNA 含量测定结果

Tab 1 DNA content and recovery detem in ed in different recom binant products

样品编号 (No.)	成品剂量 (dosage) /U·dose ⁻¹	原液效价 (bulk titer) /IU·mL ⁻¹	DNA 含量 (DNA content) /ng·mL ⁻¹	回收率 (recovery) /%	校正后 DNA 含量 (revised DNA content) /ng·mL ⁻¹	DNA残留量 /剂量 (residualDNA per dose) /ng
1	5×10 ⁶	1.13×10 ⁸	11.432±0.347	72.8	15.703±0.477	0.695±0.021
2	5×10 ⁶	2.02×10 ⁸	24.498±0.796	91.3	26.832±0.872	0.664±0.021
3	5×10 ⁶	2.09×10 ⁸	35.432±0.647	92.5	38.3±0.699	0.916±0.017

注: 按最大剂量计算 DNA 残留量 = DNA 含量×成品最大剂量 /原液效价

Note: residualDNA content·dose⁻¹= revised DNA content×dosage of finished product / bulk titer

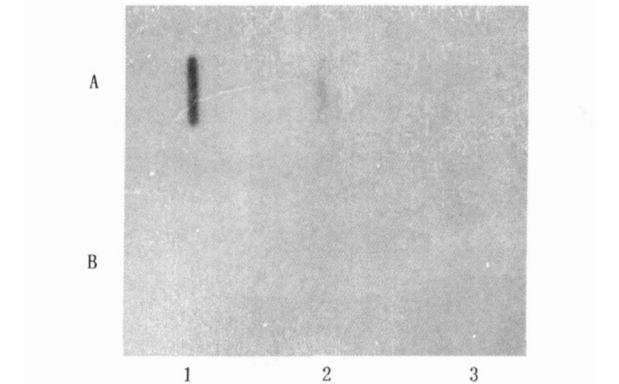


图 4 重组人干扰素 α2b 中外源性 DNA 残留检测图

Fig 4 Detection of residualDNA in recom binant hum an interferon α2b

A. 标准 DNA(standard DNA): 10 ng 1 ng 100 pg

B 样品 (sample): 1~ 3 批重组人干扰素 α2b(three batches of re- combinant hum an interferon α2b)

3 讨论

通过对大量重组技术产品外源 DNA 残留量的检定发现, 原有 2005 年版中国药典三部地高辛标记探针杂交法存在一定的缺点和局限性。首先, 地高辛法需要生产单位提供阳性 DNA, 正如本文中所指出的, 目前很多新企业提供的阳性 DNA 质量存在问题, 这不仅影响到结果的判定, 也大大降低了检定的工作效率。其次, 地高辛法只能检测工程菌来源的 DNA 污染, 而无法检测其他来源的 DNA 污染。此外, 地高辛法操作周期长、干扰因素多, 存在非特异性显色, 有时也会出现假阳性。随着重组技术产品数量的增多和检测灵敏度要求的提高, 势必需要建立更加简便、快速、自动化程度高、可定量分析的检测方法。本文中所用到的荧光法测定 DNA 含量在 0.391~ 100 ng·mL⁻¹ 范围内线性良好^[6]。该法不会受到阳性 DNA 来源的限制, 因此可统一制备 DNA 含量测定国家标准品, 定量地检测出微量残余外源 DNA。而且该方法还可以同时检测多批不同重组制品, 从而高效地完成生物技术产品质量控制的 需要。应该指出的是, 荧光酶标仪价格昂贵, 这一

点也限制了该法的推广。生产单位应根据自身条件选择 DNA 杂交法或荧光法进行残余 DNA 检测, 如采用 DNA 杂交法检测 DNA 残留量, 应按照 2005 年版中国药典三部中的相关规定对基因组 DNA 标准进行严格控制, 从而确保检定工作的顺利进行。此外, 应用荧光法对不同生产单位不同制品进行了外源 DNA 残留的检测, 发现不同厂家其宿主 DNA 残留量各不相同, 高的超过每人份剂量 10 ng 低的几乎测不出来, 说明个别厂家纯化工艺有待进一步提高。

参考文献

1 EU. Position statement on the use of tumorigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of medicinal products for human use. CPMP/BWP/1143/00 2001

2 FDA. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research 1997

3 ChP(中国药典). 2005. Vol III(三部): 203

4 WANG Jun-zhi(王军志). Research & Development and Quality Control of Biotechnical Drugs(2nd Ed) (生物技术药物研究开发和质量控制) (第二版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2007. 98

5 Singer VL, Jones LJ, Yue ST, et al. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. Anal Biochem, 1997, 249(2): 228

6 RAO Chun-ming(饶春明), ZHAO Yang(赵阳), LI Yong-hong(李永红), et al. Determination of residual DNA in recombinant cytokines by fluorescence method(应用荧光法测定重组细胞因子中残余 DNA 含量). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005 25 (12): 1417

(本文于 2008 年 7 月 31 日收到)