

荧光定量 PCR 法测定重组人 / 门冬胰岛素原料中宿主 DNA 的残留量

周朝东, 苏喆, 黄哲魁*

(天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要 目的: 利用 wako DNA 提取试剂盒结合荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 技术, 建立重组人 / 门冬胰岛素原料中宿主 DNA 残留量测定的方法并进行验证, 用于对该产品进行质量控制。**方法:** 通过 wako DNA 提取试剂盒提取重组人 / 门冬胰岛素原料中的宿主残留 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 残留量进行分析。对建立的方法进行引物特异性以及结果准确性和精密性验证, 同时对本室留样的 3 批重组人胰岛素原料和 3 批重组门冬胰岛素原料中的残留 DNA 进行测定。**结果:** 该方法检测酿酒酵母基因组 DNA 的最低准确定量质量浓度可达 $0.1378 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, DNA 质量浓度在 $0.1378 \sim 137800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 其质量浓度的对数值与 Ct 值呈良好线性关系, 标准曲线的相关系数 (r) 为 0.994; 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 批重组人胰岛素原料和 3 批重组门冬胰岛素原料中的 DNA 残留量均小于 $10 \text{ ng} \cdot \text{剂}^{-1}$, 符合进口药品注册标准中关于重组人 / 门冬胰岛素原料中宿主 DNA 残留量的要求。**结论:** wako DNA 提取试剂盒能解决重组人 / 门冬胰岛素原料中样品前处理的技术难点, 与定量 PCR 法结合能够简便、快速、准确地对重组人 / 门冬胰岛素原料中残留的 DNA 进行定量测定。

关键词: 基因工程产品; 重组人门冬胰岛素; 杂质控制; DNA 提取试剂盒; 荧光定量 PCR; 酿酒酵母; 宿主菌 DNA 残留

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 03-0477-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.16

Determination of residual host cell DNA in recombinant human/aspart insulin substances by quantitative PCR

ZHOU Chao-dong, SU Zhe, HUANG Zhe-su*

(Tianjin Institute For Drug Control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish validated test method for determination of residual host cell DNA in recombinant human/aspart insulin substances by using DNA extractor kit combined with quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Methods:** The residual host cell DNA was extracted by wako DNA extractor kit. SYBRGreen method combined with qualitative PCR was employed to determine the samples and standard DNA. The residual host cell DNA was analyzed refer to the standard curve. The developed method was confirmed by primer specificity, results accuracy and precision, and applied for determination of 3 batches of recombinant human insulin substances and 3 batches of recombinant

* 通信作者 Tel: (022) 23374073; E-mail: zrh1221@163.com

第一作者 Tel: (022) 23374073; E-mail: zhouchaodong0517@163.com

aspart insulin substances. **Results:** The minimum quantitative limit of residual host cell DNA by the developed method was $0.1378 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, while the linear range was $0.1378\text{--}137800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, with a correlation coefficient (r) of 0.994. The designed primers were specific to the DNA templates. The recovery rates of spiked samples containing various level of DNA were in the range of 50%–200%. The residual host cell DNA determined by this method were no more than 10 ng per dose, which were conformed to the acceptance criteria for the control of residual host cell DNA adopted by imported drug registration standards. **Conclusion:** The application of wako DNA extractor kit successfully make a breakthrough for the sample pretreatment during residual DNA assay. The quantitative PCR method is simple, rapid and accurate for quantification of residual host cell DNA in recombinant human/aspart substances.

Keywords: genetic engineering products; recombinant human aspart insulin; impurity control; DNA extractor kit; quantitative PCR; *Saccharomyces cerevisiae*; host bacterium DNA residue

糖尿病是由于多种原因引起的胰岛素分泌不足和靶细胞对胰岛素敏感性降低而使人体代谢出现障碍的一种疾病,胰岛素是治疗糖尿病的主要药物。重组人/门冬胰岛素原料是利用基因工程手段把人胰岛素基因或人胰岛素类似物基因克隆到表达载体中利用基因工程菌进行发酵生产获得的产品。人胰岛素由 51 个氨基酸组成,有 A 和 B 两条链,A 链含 21 个氨基酸残基,B 链含 30 个氨基酸残基,2 条链之间有 2 个二硫键相连,A 链本身还有 1 个二硫键^[1]。门冬胰岛素是将人胰岛素 B 链上的第 28 位脯氨酸改为天冬氨酸,由于其结构的改变,它比人胰岛素起效更早,达峰更快,半衰期更短,疗效上优于人胰岛素^[2]。目前中国药典 2015 年版二部只收录了重组人胰岛素原料而未收录重组门冬胰岛素原料,重组人胰岛素原料各论里有外源性 DNA 残留量检查项^{[3]789}。因宿主菌残留的 DNA 具有潜在的危害性,所以需要重组人/门冬胰岛素原料中的残留 DNA 进行质量控制^[4]。中国药典 2015 年版四部收录的宿主残留 DNA 检测方法有 2 种:第一法是 DNA 探针杂交法,第二法是荧光染色法^{[3]250}。地高辛标记探针法不但操作烦琐,耗时较长而且无法进行定量分析,而荧光染色法也存在着特异性差灵敏度低的缺点^[5-7]。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/门冬胰岛素原料中的宿主残留 DNA 量,该方法具有灵敏度高,准确性好,简便快速等优点,可用于酿酒酵母发酵生产的重组人/门冬胰岛素原料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 批重组人胰岛素原料和 3 批重组

门冬胰岛素原料均由本室留存。

标准基因组 DNA: 由重组人/门冬胰岛素宿主菌酿酒酵母菌经扩大培养后参考文献方法^[8]进行提取,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 宿主残留 DNA 提取试剂盒 wako DNA Extractor kit 购自 Wako 公司。2×PowerSYBR Green Master Mix 购自 ABI 公司,微量紫外可见分光光度计 NanoDrop 购自 Thermo 公司,Stepone 荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组人/门冬胰岛素原料中宿主残留 DNA 的提取 精密称取重组人/门冬胰岛素原料约 4.5 mg,加入 $1 \times \text{TE}$ 溶液约 3 mL 进行溶解制成 $1 \text{ 剂量} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1 \text{ 剂量} = 1.5 \text{ mg}$) 的溶液,取不同批号的重组人/门冬胰岛素原料溶液按 wako DNA extractor kit 说明书提取样品中的残留 DNA。

1.2.2 荧光定量 PCR 方法的建立及标准曲线的绘制 利用酿酒酵母菌 5sRNA 的序列设计特异引物,上游引物序列为 5'-TGCGGCCATATCTACCAGAAA-3';下游引物序列为 5'-GGCTCTTACCAGCTTAACCTACAGTTGA-3',引物序列委托 Invitrogen 公司合成。反应体系中各成分的加入量:上下游引物各 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,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: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s,共 40 个循环; 72°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,质量浓度从 $0.1378\text{--}137800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 共 7 个浓度点,以各质量浓度的 DNA 为模板进行 PCR 扩

增。以模板 DNA 质量浓度的对数值为横坐标 (X), 以 C_t 值为纵坐标 (Y) 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”项下方法进行 PCR 反应体系的扩增, 扩增完毕之后做熔解曲线, 如果没有杂峰则说明引物特异性较好同时退火温度比较合适。

1.3.2 准确性及精密性验证 在批号为 EMOH20401 的重组人胰岛素和批号为 DQ1AHP300 的重组门冬胰岛素中分别加入 13.78、1.378、0.689 ng 的 DNA 标准品, 采用 DNA extractor kit 提取总 DNA 后, 进行荧光定量 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 = $[(\text{实际测定值} - \text{本底残留值}) / \text{加标值}] \times 100\%$

1.4 方法应用

用建立的荧光定量 PCR 方法对重组人 / 门冬胰岛素原料进行 DNA 残留量的检测, 样品实际 DNA 残留量 = 样品测得值 / 平均回收率。

2 结果

2.1 DNA 标准品的浓度及纯度

经提取后测定, 其质量浓度为 $137\ 800\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 纯度 A_{260}/A_{280} 为 1.77。

2.2 荧光定量 PCR 线性回归方程

线性回归方程:

$$Y = -3.662\ 4X + 45.902 \quad r = 0.994$$

表明 C_t 值与模板 DNA 浓度的对数值呈良好线性关系, 线性范围 $0.137\ 8 \sim 137\ 800\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限为 $0.137\ 8\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 方法学验证

2.3.1 引物特异性的验证 在荧光定量 PCR 扩增不同浓度的标准 DNA 做标准曲线时给荧光定量 PCR 仪设置熔解曲线步骤, 实验结果证明除了主峰之外无杂峰, 证明引物特异性良好, 退火温度适当。熔解曲线见图 1。

2.3.2 准确性及精密性验证 重组人 / 门冬胰岛素原料的加标回收率均在荧光定量 PCR 可接受的范围 (50%~200%) 内, 不同浓度加标回收率的 RSD 均在 20% 以内, 具体数据见表 1。

2.4 方法应用

检测结果显示, 重组人 / 门冬胰岛素原料的 DNA

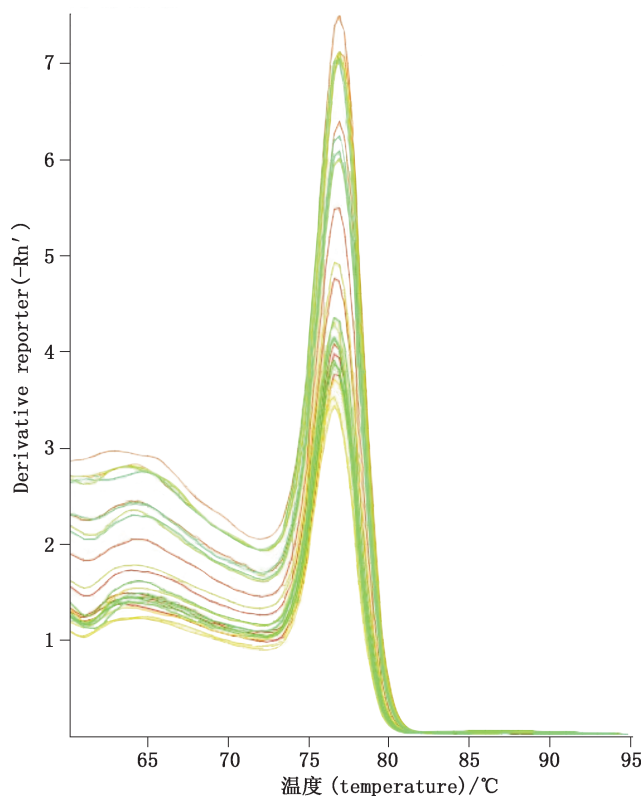


图 1 熔解曲线分析

Fig. 1 Analysis of Melt Curve

残留量远低于 $10\ \text{ng} \cdot \text{剂}^{-1}$, 符合进口药品注册标准的相关要求, 结果见表 2。

3 讨论

细胞基质作为主要原材料其质量的好坏直接影响生物制品的产量和质量。一般认为细胞基质存在的潜在危险因素主要有促生长蛋白及宿主残留蛋白、宿主残留 DNA 和潜在病毒。其中宿主残留 DNA 一直是人们关注的焦点。因为其可能有潜在的致癌性、感染性以及参与人体的代谢^[9]。

在酿酒酵母细胞中, 5sRNA 基因以 100~200 个串联重复序列排列在第 12 号染色体上。这些 5sRNA 基因序列非常保守, 在长期进化过程中保持序列恒定^[10]。基因的多拷贝数使其容易被检出, 同时序列的保守性使设计的引物更有特异性, 容易进行其种属鉴别。本研究利用酿酒酵母菌的 5sRNA 为序列设计特异性引物然后通过基于 SYBRGreen 染料的荧光定量 PCR 最终根据荧光信号的强度来确定重组人 / 门冬胰岛素原料中宿主 DNA 残留量。

目前中国药典 2015 年版四部收载的外源性 DNA 残留测定方法有 2 种, 分别是 DNA 探针杂交法

表 1 重组人/门冬胰岛素原料不同加标量样品的回收率(%)

Tab. 1 The recovery of recombinant human/aspart insulin substances of different added amount of samples

分析物(analyte)	加标量 (added)/ng	实测值 (detected)/ng	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
重组人胰岛素(recombinant human insulin)	13.78	19.813 6	143.7	133.8	6.9
		18.258 6	132.5		
		17.254 2	125.2		
	1.378	1.959 6	140.9	132.2	5.8
		1.772 0	128.6		
		1.749 9	127.0		
	0.689	0.915 7	130.4	128.1	9.4
		0.792 5	115.0		
		0.956 9	138.9		
重组门冬胰岛素(recombinant aspart insulin)	13.78	19.566 0	141.9	141.2	4.7
		20.318 2	147.4		
		18.489 7	134.2		
	1.378	1.602 4	115.0	122.8	6.9
		1.817 2	131.9		
		1.674 5	121.5		
	0.689	1.031 9	147.2	133.4	9.3
		0.893 0	129.6		
		0.849 2	123.3		

表 2 重组人/门冬胰岛素原料中 DNA 残留量的测定结果

Tab. 2 Determination of residual host cell DNA content in recombinant human/aspart insulin substances

样品名 (sample name)	批号 (lot No.)	残余 DNA 量 (residual DNA quantity)/ (ng · dose ⁻¹)	RSD/% (n=3)
重组人胰岛素(recombinant human insulin)	EM0H20401	0.13	12.4
	EM0H21301	0.23	6.8
	DM0H25001	0.22	7.2
重组门冬胰岛素(recombinant aspart insulin)	DQ1AHP300	0.13	4.9
	DQ1AHP302	0.14	13.6
	DQ1AHP301	0.12	9.0

和荧光染色法,两者都存在灵敏度低,操作烦琐,耗时较长等缺点^[11-12]。荧光定量 PCR 则具有灵敏度高、准确、快速等优点,是实现生物制品中残留 DNA 测定的最佳方法^[13]。目前国内定量 PCR 方法尚无统一的验证接受标准,有参考文献^[14]报道,因 PCR

产物的量呈 2ⁿ 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依照理论值 ± 2ⁿ 倍进行评价,通常最大可接受回收率标准应设定在理论值 ± 2¹ 倍,即 ± 1 个循环(50%~200%)^[15]。而 USP 39 的 general chapters 中<1130>则明确规定一般条件下加样回收率应在 80%~120% 范围内,如果由于基质效应或样品前处理方法导致回收率不在上述范围内,则用回收率结果进行样品残留 DNA 数值的校正。通过实验发现,重组人/门冬胰岛素的回收率结果绝大部分不在 80%~120% 范围内,因此计算样品中 DNA 残留量时用回收率进行了校正。

宿主残留 DNA 属于微量杂质,测定时存在干扰因素多的困难。在实验过程中作者采用了未经任何前处理直接扩增,加蛋白酶 K 消化并灭活,磁珠提取试剂盒和 wako DNA 提取试剂盒共 4 种前处理方法。实验结果证明,未经任何前处理直接扩增则样品溶液抑制 PCR 的反应,因为其扩增曲线不是典型的扩增曲线,而蛋白酶 K 消化并灭活后发现加标样

品均无扩增,证明蛋白酶 K 的加入即使高温灭活后依然严重抑制 PCR 反应。磁珠提取试剂盒虽然能够有效地从样品中提取微量的宿主残留 DNA,而且其加标回收率也在 50%~200% 范围内,但它对操作者要求较高,尤其在清洗磁珠的时候需要极其小心,因为一不小心就容易吸走磁珠造成损失,导致结果不准确,而且磁珠提取方法不如 wako DNA 提取试剂盒方法更适用于大批量样品的检验。因此作者倾向于选择 wako 公司生产的 DNA 提取试剂盒。经实验,3 批重组人胰岛素原料和 3 批重组门冬胰岛素原料中的残留 DNA 量均远远低于 $10 \text{ ng} \cdot \text{剂量}^{-1}$ 的标准,符合该品种进口药品注册标准的要求。综上所述,本文建立的检测方法可作为酿酒酵母产重组人/门冬胰岛素原料中宿主残留 DNA 测定的常规检测方法。

参考文献

- [1] 姜宁,吕晔,陈执中. 重组人胰岛素类似物的研究应用进展[J]. 食品与药品, 2012, 14(11): 445
JIANG N, LÜ Y, CHEN ZZ. Progress on study and application of recombinant human insulin analogues[J]. Food Drug, 2012, 14(11): 445
- [2] 赵红峰,刘幼硕,黄武等. 门冬胰岛素与人普通胰岛素在老年 2 型糖尿病胰岛素泵治疗中的疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2009, 16(29): 2010
ZHAO HF, LIU YS, HUANG W, *et al.* Comparison between the effects of insulin aspart and Novolin R via continuous subcutaneous insulin infusion pump on hyperglycemia in elderly patients with type 2 diabetes[J]. Chin J Gerontol, 2009, 16(29): 2010
- [3] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 789, 250
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015: 789, 250
- [4] WANG L, WANG JZ. Issue on quality control of residual DNA in biological products[J]. Chin J New Drugs, 2011, 20(8): 678
- [5] 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
WANG L, GAO K, BI H, *et al.* Comparison between fluorescence and DNA hybridization methods for determineng residual DNA in recombinant products[J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29(7): 1063
- [6] 刘晓志,高健,赵伟,等. *Pichia* 酵母宿主细胞 DNA 残留量检测方法建立[J]. 河北师范大学学报, 2012, 36(1): 80
LIU XZ, GAO J, ZHAO W, *et al.* Development of a method for determination of residual DNA in *Pichia pastoris* host cells[J]. J Hebei Norm Univ, 2012, 36(1): 80
- [7] 黄相红,胡立德,梁文璐,等. 地高辛标记探针检测重组人 p43 蛋白宿主 DNA 残留量的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 356
HUANG XH, HU LD, LIANG WL, *et al.* Testing for residual DNA in recombinant human p43 protein using digoxin labled probe[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(2): 356
- [8] 卢鑫,张会彦,亢春雨,等. 马克思克鲁维酵母 DNA 提取方法的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 31
LU X, ZHANG HY, KANG CY, *et al.* Comparison of methods of DNA extraction from *Kluyveromyces marxianus*[J]. Food Sci Technol, 2009, 34(4): 31
- [9] 王兰,王军志. 关于生物制品残留 DNA 质量控制问题[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(8): 678
WANG L, WANG JZ. Issue on quality control of residual DNA in biological products[J]. Chin J New Drugs, 2011, 20(8): 678
- [10] PIPER PW, LOCKHEART A, PATEL N. A minor class of 5 s rRNA genes in saccharomyces cerevisiae X2180-1B, one member of which lies adjacent to Ty transposable element[J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(10): 4083
- [11] 刘晶晶,郭莹莹,李艳琪,等. 荧光定量 PCR 检测重组新蛭素中毕赤酵母基因组 DNA 的残留量[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(3): 401
LIU JJ, GUO YY, LI YQ, *et al.* Determination of residual *Pichia* yeast genomic DNA in recombinant neorudin by real-time quatitative PCR[J]. Lett Biotechnol, 2014, 25(3): 401
- [12] 曹晨华,刘晓志,段月娇,等. 实时定量 PCR 法检测生物技术药物中宿主基因组 DNA 残留[J]. 生物技术进展, 2014, 4(2): 142
CAO CH, LIU XZ, DUAN YJ, *et al.* Detecting residual host genomic DNA in biotech drugs by real-time quantitative PCR[J]. Curr Biotechnol, 2014, 4(2): 142
- [13] MEHTA S, KEER JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods[J]. Bioprocess Tech, 2007, October, 44
- [14] GIJSBERS 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
- [15] 牛冬云,连炜,何静,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
NIU DY, LIAN W, HE J, *et al.* Determination of residual CHO cell DNA in conbercept[J]. Chin J Biol, 2013, 26(7): 1023

(本文于 2016 年 3 月 29 日收到)