

安全监测

蛋白酶消化结合荧光定量 PCR 法和杂交法检测重组人胰岛素中 *E. coli* 细胞 DNA 残留量的比较*

王杰¹, 吕萍², 张慧², 李晶², 丁晓丽², 魏云林^{1**}, 梁成罡^{2**}

(1. 昆明理工大学, 昆明 650500; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 利用蛋白酶 K 消化结合荧光定量聚合酶链式反应 (q-PCR) 技术, 检测重组人胰岛素原料中 *E. coli* 细胞 DNA 残留量, 并进行初步的方法学验证, 与狭缝杂交-放射自显影方法进行比较。方法: 通过蛋白酶 K 消化样品, 利用核酸纯化提取试剂盒提取 DNA, 然后采用 Taqman 探针法对样品和标准 DNA 进行定量 PCR 测定, 再根据标准曲线对样品中 DNA 残留量进行分析。对方法进行线性、范围、准确度和精密度的验证, 对重组人胰岛素中 DNA 残留量进行测定。结果: 该方法检测 *E. coli* 细胞 DNA 残留的最低定量限度为 $0.03 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, DNA 含量在 $0.03 \sim 2.25 \times 10^3 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 相关系数在 0.98 以上; 该方法检测不同加标样品回收率较接近, 3 次测定的相对标准偏差均小于 20%; 该方法检测各批次重组人胰岛素的 DNA 残留量均小于 $10 \text{ ng} \cdot \text{剂}^{-1}$, 而狭缝杂交——放射自显影法 50 pg (标准 DNA) 均未出现条带。结论: 蛋白酶消化结合试剂盒洗脱解决了残留 DNA 检测中样品前处理的难题, 定量 PCR 检测可能代替杂交法, 快速、准确、灵敏地对重组人胰岛素原料中 *E. coli* 细胞残余 DNA 进行定量测定, 为将来荧光定量 PCR 检测药物中宿主 DNA 残留方法标准化奠定了基础。

关键词: 蛋白酶消化; 定量聚合酶链式反应 (q-PCR); 狭缝杂交; 重组人胰岛素; *E. coli* 细胞; DNA 残留量比较

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)05-0846-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.05.15

Comparison of PCR method protease digestion coupled with fluorescence quantification and hybrid method in the detection of *E. coli* cell DNA residues in recombinant human insulin*

WANG Jie¹, LÜ Ping², ZHANG Hui², LI Jing², DING Xiao-li²,
WEI Yun-lin^{1**}, LIANG Cheng-gang^{2**}

(1. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To test the *E. coli* cell DNA residues in recombinant human insulin by using the technology of proteinase K digestion coupled with quantitative polymerase chain reaction (q-PCR), and to

* 国家科技重大专项——重大新药创制课题: “抗体类生物大分子药物质量属性分析标准物质及评价方法研究平台”(课题编号: 2014ZX09304311)

** 通信作者 魏云林 Tel: 13888644139; E-mail: homework18@126.com

梁成罡 Tel: 13910268763; E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn

第一作者 王杰 Tel: 13529115108; E-mail: wangjie19881997@163.com

吕萍 Tel: 13671185501; E-mail: 1220089213@qq.com

make a preliminary validation of the method and compare the method with the slit hybrid- autoradiography method. **Methods:** The residual host cell DNA in test samples was digested by proteinase K and extracted by nucleic acid purification kits based extraction method, and determined by Taqman probe based q-PCR, with standard DNA as control. The residual DNA content was analyzed according to the standard curve. The developed method was validated for linear scope, accuracy and precision, and was used for determination of DNA residues in recombinant human insulin. **Results:** The minimum detection limit of residual *E.coli* cell DNA by the developed method was $0.03 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, while the linear range was $0.03-2.25 \times 10^3 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, with a correlation coefficient (r) above 0.98. The recovery rates of spiked samples of various concentrations were approximate, and the relatively standard deviations in 3 tests were also less than 20%. All the residual DNA contents in all batches of hormonal drugs determined by the developed method were less than 10 ng per dose. However, the stripe of 50 pg (the standard DNA) in results determined by hybrid- autoradiography method was not detected. **Conclusion:** The method of protease digestion coupled with kit elution based extraction solved the technical difficulties in sample pretreatment during residual DNA detection assay successfully. The q-PCR method may replace the hybridization method, and the method is rapid, accurate and sensitive for quantitative determination of residual *E.coli* cell DNA in recombinant human insulin. And this study will lay the foundation for the future standardization of q-PCR method for detecting DNA residues in drugs.

Keywords: protease digestion; quantitative polymerase chain reaction (q-PCR); slit hybrid; hormone; *E.coli* cell; comparison of residual DNA

重组 DNA 蛋白药物的质量控制^[1]强调包括生产、工艺控制、原液和制剂在内的全过程控制。细胞基质残留是重组激素药物工艺相关杂质的重要组成部分^[2],包括宿主细胞残留蛋白、潜在的病毒及微生物、残留细胞 DNA 等。宿主细胞残留 DNA 关系到工艺稳定和产品安全性,残余宿主 DNA 分析是我国重组药物原料检定中强制要求的项目。由于原料中 DNA 残留量一般较低,所以在前处理过程中要降低药物蛋白对 DNA 提取效果的影响,提高提取效率,因而,其定量分析方法需有较好的样品前处理能力,较高的检测灵敏度和准确度。目前,不少重组激素药物宿主细胞残余 DNA 检测采用杂交法,如地高辛标记 DNA 杂交检测法、狭缝杂交——放射自显影等半定量方法^[3],其中,最灵敏的属放射自显影法,此方法一般可以检测到 100 pg 左右,而定量聚合酶链式反应 (q-PCR) 方法灵敏度可以达到 fg 级^[4]。

重组人胰岛素通常是由酵母或 *E. coli* 细胞表达的重组激素类药物,中国药典三部 2015 年版规定 *E. coli* 细胞表达制品宿主 DNA 含量应不超过 $10 \text{ ng} \cdot \text{剂}^{-1}$ ^[5]。由于制剂无宿主 DNA 残留检测项目,所以,本文以某企业生产的 *E. coli* 表达的重组人胰岛素原料为研究对象,分别采用本实验室建立的蛋白酶 K

处理结合荧光定量 PCR 法和企业内控狭缝杂交-放射自显影法对残余 DNA 检测进行了对比研究。结果表明,荧光 q-PCR 法检测限更低,准确度更高,重复性更好,且操作简便、快速。

1 仪器和材料

1.1 主要仪器

电子天平,梅特勒·托利多公司;干式加热器、7500 实时定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; pH 计,梅特勒·托利多公司;离心机, HealForce 公司; MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp 高透光,中度粘性耐高温覆膜,均为 applied biosystems 公司; TS435-L 洗片机,岛津公司, Hoefer (48 孔)狭缝点样器,安玛西亚公司。

1.2 样品

3 批重组人胰岛素原料药为本科室留样,为 *E. coli* 表达产品。

1.3 *E. coli* 细胞染色体

DNA 标准品、探针、引物来自中国食品药品检定研究院 (试剂盒正在协作标定,待上架到国家标准试剂盒)。

1.4 主要试剂

染色体 DNA 浓度: $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 探针浓度:

100 pmol · μL⁻¹; 引物 (F、R) 浓度: 100 pmol · μL⁻¹; MasterPure™ 纯化提取试剂盒: 为核酸纯化提取试剂盒, 含 2 × T&C 裂解液、MPC 蛋白沉淀剂, Illumia 公司; 无核酸酶水 (DNA 稀释液), Ambion 公司; 2 × MIX (PCR Light Cycler 480 Probe Master)、蛋白酶 K, 罗氏公司; Glycogen, 罗氏公司, 用来配制 70% 乙醇溶液; Dig 标记 DNA 检测试剂盒 (10 × 封闭液、酶标抗体)、CDP-star (25 mmol · L⁻¹)、高纯 PCR 模板制备试剂盒, 罗氏公司; 显影剂和定影剂, Foma Bohemia 公司; 预杂交液, TOYOBO 公司。

2 方法

2.1 主要溶液配制

TE (pH 8.0) 缓冲液 (300 mmol · L⁻¹ Tris, 25 mmol · L⁻¹ EDTA); 70% 乙醇溶液 (含 Glycogen 40 ng · mL⁻¹); 0.2 mol · L⁻¹ EDTA 溶液 (pH 8.0); 10% SDS; 20 × SSC; 十二烷基肌酸钠溶液 (10%); 马来酸缓冲液 (pH 7.5); 洗膜液: 含 0.3% Tween 20 的马来酸缓冲液; 杂交液: 预杂交液稀释变性 DNA 探针, 质量浓度为 0.2 μg · mL⁻¹; 底物缓冲液 (pH 9.5, 含 1 mol · L⁻¹ 氯化钠及 0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl); 抗体溶液 (封闭液 1:5 000 稀释抗体)。

2.2 q-PCR 方法测定 DNA 残留

2.2.1 供试品 DNA 的提取^[6]

用 1 × TE 缓冲液 150 μL 溶解样品, 在 25 °C 下摇动孵化样品, 直至溶解 (约 15 min), 制备 133.3 mg · mL⁻¹ 溶液; 加 2 × T&C 细胞溶解液 150 μL 和蛋白酶 K 1 μL, 在 65 °C 下涡流孵化 15 min, 每隔 5 min 振荡 30 s; 冰浴冷却 5 min; 加 MPC 蛋白沉淀试剂 175 μL, 彻底涡旋混匀; 4 °C 下 10 000 g 离心 10 min; 将上清液转移至新的定量试管中, 弃去沉淀; 加冰冻异丙醇 500 μL 并缓慢用移液器吹吸混匀; 4 °C 下 10 000 g 离心 10 min; 丢弃上清液, 用 70% 乙醇冰冻液 (含 Glycogen 40 ng · mL⁻¹) 250 μL 冲洗 DNA 沉淀并缓慢混合均匀; 4 °C 下 10 000 g 离心 10 min; 弃去上清液, 沉淀在空气中晾干; 在 60 °C 下用无菌无核酸酶水 20 μL 溶解分离的 DNA 1 h; 溶解后用于后续 q-PCR 的测定^[7]。

2.2.2 q-PCR 的检测

采用水解探针, Taqman 探针法对样品和 *E.coli* 染色体 DNA 含量测定用标准品进行定量 PCR 测定。将染色体 DNA 标准品用 TE (pH 8.0) 缓冲液稀释至 2 250、450、90、18、3.6、0.72、0.14、0.03 pg · μL⁻¹,

即得系列标准品稀释液。采用 PCR Light Cycler 480 Probe Master 中的 2 × MIX 和水, 组成 PCR 体系^[8]: 上游引物 0.16 μL, 下游引物 0.16 μL, 探针 0.16 μL, 水 (sterilized) 4.52 μL, 2 × MIX 10 μL, DNA 模板 5 μL。反应条件: 预变性 95 °C 10 min 激活 Taq 酶; 变性 95 °C 10 s, 退火 60 °C 1 min, 延伸 72 °C 1 s, 循环 45 个; 冷却 40 °C 30 s。应用 7500 software v 2.0.6 进行数据分析, 绘制标曲, 将仪器读出的 Ct 值带入线性方程, 计算出各批次品种的 DNA 残留量^[9]。

2.2.3 q-PCR 方法学考察

2.2.3.1 线性和范围 按照“2.2.2”项中染色体 DNA 梯度稀释方法稀释, 进行 2 次测定, 确定线性和范围。

2.2.3.2 准确性及精密度验证 随机取 1 批溶解好的样品溶液 (制备方法见“2.2.1”项下方法) 3 次, 各 100 μL, 分别加入 450 pg · μL⁻¹ (高)、90 pg · μL⁻¹ (中)、18 pg · μL⁻¹ (低) 的稀释后标准品溶液各 10 μL, 制备 3 个浓度加标样品, 以 DNA 稀释液作为阴性对照, 按照“2.2.1”项方法提取样品、加标样品、阴性对照的 DNA, 按照“2.2.2”项方法进行定量 PCR 扩增, 平行做三复孔。应用 7500 software v 2.0.6 分析数据。按 (加标样品测定值 - 样品测定值) / DNA 标准品理论值 × 100% 计算 DNA 回收率, 验证方法的准确性。高、中、低浓度均测定 3 次, 计算相对标准偏差 (RSD), 验证方法的精密度^[10]。

2.3 狭缝杂交 - 放射自显影法测定 DNA 残留^[11]

2.3.1 ST 稀释配制

用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 对大肠杆菌 DNA 标准品 100 ng · μL⁻¹ 逐步稀释至 200、20、2、1、0.5、0.25、0.125、0.063、0.031、0 pg · μL⁻¹, 为 ST1~ST10, 每个梯度取 50 μL, 和样品及加标样品一同处理。

2.3.2 样品及加标样品配制

样品: 分别用 40 mmol · L⁻¹ 盐酸溶液溶解得到 40 mg · mL⁻¹ 浓度样品溶液, 并分别加入 Tris 溶液 60 μL 稀释, 混匀制得样品母液, 3 批样品浓度: 01P 为 33.17 mg · mL⁻¹, 02P 为 34.20 mg · mL⁻¹, 03P 为 34 mg · mL⁻¹。吸取 30 μL 上述样品母液即为 1 mg 低蛋白胰岛素样品 S1; 吸取 150 μL 上述样品母液即为 5 mg 高蛋白胰岛素样品 S2。加标样品: 吸取 30 μL 上述样品母液即为 1 mg 胰岛素, 在 30 μL 样品母液中加入 50 pg DNA (10 pg · μL⁻¹) 作为低蛋白加标样品 S1P; 吸取 150 μL 上述样品母液即为 5 mg 胰岛素, 在 150 μL 样品母液中加入 50 pg DNA (10 pg · μL⁻¹)

作为高蛋白加标样品 S2P。

2.3.3 样品前处理 对样品中残留 DNA 提取需进行

样品前处理过程,而本过程需要添加 2 mol·L⁻¹ 乙酸钠 (pH4.1) 等 4 种试剂进行处理,具体处理过程见表 1。

表 1 样品处理体系配制

Tab. 1 The preparation of samples handling system

试剂 (reagent)	S1: 30 μL 胰岛素溶液 (insulin solution) [1 mg 胰岛素 (insulin)]	S1P: 30 μL 胰岛素溶液 (insulin solution)+5 μL DNA 溶液 (DNA solution)	S2: 150 μL 胰岛素溶液 (insulin solution) [5 mg 胰岛素 (insulin)]	S2P: 150 μL 胰岛素溶液 (insulin solution)+5 μL DNA 溶液 (DNA solution)	ST: 50 μL DNA 溶液 (DNA solution)
pH 4.1 2 mol·L ⁻¹ 乙酸钠 (sodium acetate)/μL	20	20	20	20	20
ddH ₂ O/μL	170	165	50	45	150
结合缓冲液 (binding buffer)/μL	200	200	200	200	200
异丙醇 (isopropanol)/μL	100	100	100	100	100
总体积 (total volume)/μL	520	520	520	520	520

注 (note): 3 批样品均按上述体系处理。空白对照: 40 mmol·L⁻¹ 盐酸 +1 mol·L⁻¹ Tris 溶液 (“2.3.2” 项中样品稀释溶液), 做同样处理 (The three batches of sample were all treated with the same system as above. Blank control: The sample diluent in “2.3.2” was treated with the same treatment as above (40 mmol·L⁻¹ hydrochloric acid+1 mol·L⁻¹ Tris solution))

将上述样品、加标样品、ST、空白配制混匀后, 均加入到高纯过滤管中, 8 000 g 离心 1 min, 弃去上清液, 加抑制剂清除液 500 μL, 8 000 g 离心 1 min, 弃上清液, 加冲洗缓冲液 500 μL, 8 000 g 离心 1 min, 弃上清液, 加冲洗缓冲液 500 μL, 8 000 g 离心 1 min, 弃上清液, 13 000 g 离心 10 min 后, 转移到新的 eppendorf 管中, 并加洗脱缓冲液 200 μL, 8 000 g 离心 1 min, 洗脱液即为上样样品 DNA 液 (DNA 制备所用试剂均来自高纯 PCR 模板制备试剂盒)。

2.3.4 点样及固定

将处理后的 ST、样品以及每批样品对应的加标样品, 放在 100 °C 变性 10 min, 迅速冷却后点样。点样后膜在 80 °C 真空固定 2 h; 上样量: 空白对照品 C1 和 C5 均为 200 μL, 各种样品均为 200 μL。

2.3.5 预杂交

将膜放入 5 mL 预杂交液中, 封入杂交袋 38 °C 预杂交 4 h。

2.3.6 杂交

将变性的探针加入后 38 °C 杂交 16 h。

2.3.7 洗涤

加洗膜液 (含 0.3% 的 Tween 20 的马来酸缓冲液) 漂洗 5 min, 弃去。加封闭液, 37 °C 水浴 40 min, 弃去。

2.3.8 酶标二抗

加封闭液稀释的抗体溶液 (1:5 000), 37 °C 水浴 40 min, 弃去。加入洗膜液, 室温浸洗 2 次, 15 min·次⁻¹。

2.3.9 暗室显影

加上显影液, 室温避光孵育 30 min, 放入洗片机,

观察结果。

3 结果

3.1 定量 PCR 扩增结果

标准曲线斜率为 -3.39, 截距为 36.26, 相关系数为 0.982, 扩增效率为 97.16%。样品浓度与 Ct 值之间的线性关系表达: Ct=-3.39 × log concentration+36.26。定量 PCR 扩增曲线光滑平稳, 且指数增长期、线性增长期及平台期明显, 符合定量检测要求^[12], 如图 1。

3.2 q-PCR 方法的验证结果

3.2.1 线性和范围

线性在 0.03~2.25 × 10³ pg·μL⁻¹ 范围内线性良好。

3.2.2 准确性和精密度

本次实验采用蛋白酶 K 结合 q-PCR 检测 E. coli 表达药品中宿主残留 DNA 的方法, 对重组人胰岛素中残留 DNA 进行了 3 次测定, 每次实验均对 3 个不同浓度的加标样品进行测定, 均做三复孔, 完成了该方法的初步验证。利用 3 次不同加标浓度的回收率平均值结果分析, 均值差异系数 (与实际值之间的差异) 均 <20%, 可见该方法的准确性良好; 通过对 3 次不同加标浓度的回收率相对标准偏差结果分析, RSD 均 <20%, 可见该方法精密度较高。具体数据分析见表 2。

3.3 q-PCR 法样品测定结果

采用蛋白酶 K-荧光 q-PCR 法, 检测重组人胰岛素中 E.coli 宿主 DNA 残留量, 检测其可行性。测定结果见表 3。

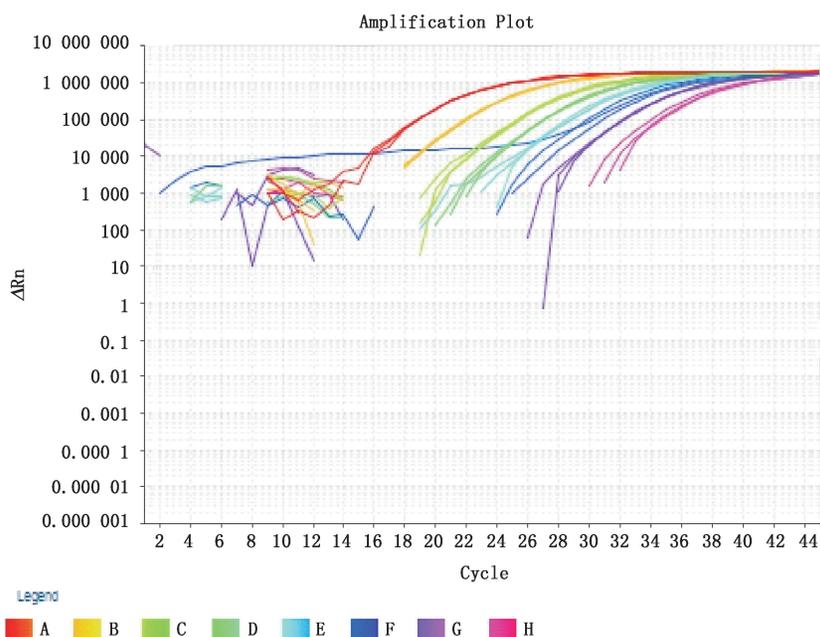


图1 q-PCR 扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of q-PCR

表2 不同加标量的 DNA 回收率

Tab.2 Recovery of DNA in spiked samples of various concentrations

DNA 加标量 (adding standard matter amount)/pg	回收率 (recovery) /%			均值 (mean value) /%	标准偏差 (standard deviation) /%	相对标准偏差 (relative standard deviation) /%
	第1次 (the first time)	第2次 (the second time)	第3次 (the third time)			
4 500	85.3	86.5	76.5	82.8	5.5	6.6
900	89.3	88.1	79.5	85.6	5.3	6.2
180	96.9	103.1	80.8	93.6	11.5	12.3

表3 重组人胰岛素原料样品的 DNA 残留量检测结果

Tab.3 The detected residual DNA results in recombinant human insulin samples

样品批号 (the sample batch number)	样品浓度 (sample concentration) / (mg · mL ⁻¹)	第1次 q-PCR 检测均值 (the first q-PCR detected average value) / (pg · μL ⁻¹)	第2次 q-PCR 检测均值 (the second q-PCR detected average value) / (pg · μL ⁻¹)	提取后体积 (the volume after extraction) / μL	提取蛋白量 (the extraction protein quantity) / mg	DNA 残留量 (the residual DNA quantity) / (pg · mg ⁻¹)
01P	133	0.10	0.11	20	20	0.11
02P	133	0.13	0.10	20	20	0.12
03P	133	0.10	0.12	20	20	0.11

3.4 狭缝杂交 - 放射自显影结果

利用狭缝杂交法对以上3批重组人胰岛素原料中残留DNA进行提取检测,采用X光片对检测结果进行结果观察,具体结果见图2。由图2可见,狭缝杂交-放射自显影法检测限最低为100 pg,而100 pg以下ST、样品、加标样品均无条带。

4 讨论

目前重组人胰岛素原料质量控制中宿主DNA残留检测多采用杂交法^[13],杂交法试验周期长,操作

复杂,影响因素多,试剂批次间不稳定,分析灵敏度低,不能准确定量,实际应用中重现性不好,失败率较高^[14]。本研究中采用狭缝杂交-放射自显影方法测定,经多次试验,DNA浓度检测灵敏度仅能达到100 pg,而50 pg及以下均未显影,见图2。而通过Taqman探针技术优化的*E. coli*细胞残留染色体DNA检测方法,检测限到0.1 pg。该方法与杂交法相比,实验步骤更加简单、灵敏度更高、重现性好,具有显著优势。

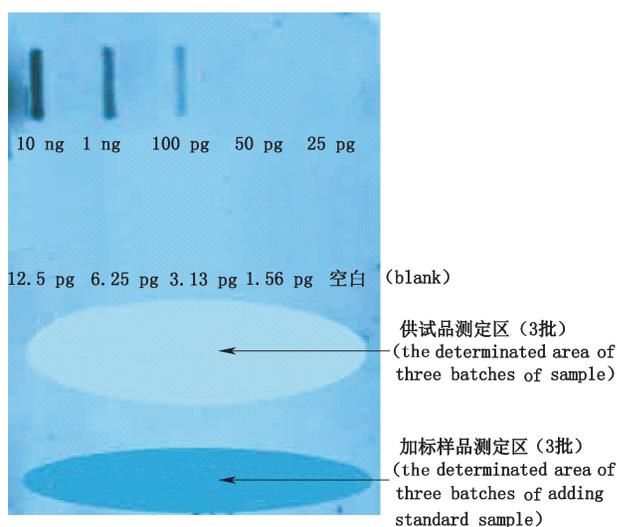


图2 自显影结果

Fig. 2 The results of autoradiography

鉴于重组激素类药物原料^[15]中DNA残留较低,工艺中间体成分复杂等问题,要准确定量测定,需要开发出操作简便,抗干扰能力强,回收率高的样品前处理方法。本研究利用蛋白酶K消化预处理、MasterPure™纯化试剂盒纯化等步骤,很好地解决了样品前处理问题,使得回收率提高至近90%。研究表明,蛋白酶K消化结合荧光q-PCR法适用于重组人胰岛素原料*E. coli*细胞残留DNA检测。并且此方法不仅可用于激素类药物的放行检验,还可对激素类药物工艺过程中DNA去除的关键步骤进行评价,从而起到全程控制的作用。期望该文数据能够为将来开发灵敏度更高,周期更短,适用性更广的方法提供可靠的技术支持。

参考文献

[1] 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
WANG L, WANG JZ. Issues on quality control of residual DNA in biological products[J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(8): 678

[2] 张昀,陈兴. 生物制剂残余DNA的潜在危害性及其检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(10): 1348
ZHANG J, CHEN X. Progress in study on potential hazard and test method of residual DNA in biologics[J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(10): 1348

[3] 张峰,郭玮,王佑春,等. 对斑点杂交方法检测治疗性单克隆抗体制品中残留宿主细胞DNA含量的影响因素研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 111
ZHANG F, GUO W, WANG YC, et al. Research on factors affecting dot-blot detection of residual host cell DNA in therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(1): 111

[4] 吴浩飞. 生物制品残留DNA分析技术的研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2013, 36(1): 30

WU HF. Research development of residual DNA analysis in biological products[J]. *Int J Biol*, 2013, 36(1): 30

[5] 中国药典. 2015年版. 三部[S]. 2015: 通则 107
ChP 2015. Vol III[S]. 2015: General Rule 107

[6] 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 of fluorescence and DNA hybridization methods for the determination of residual DNA in recombinant products[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(7): 1063

[7] HUSSAIN M. A direct q-PCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 115: 603

[8] 王兰,李萌,高凯,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
WANG L, LI M, GAO K, et al. Determination of residual host cell DNA in monoclonal antibody products by magnetic bead based extraction combined with quantitative PCR[J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(4): 555

[9] 张晓志,张斌,王志明,等. 生物技术药物中宿主DNA残留Q-PCR检测法的方法验证[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(1): 69
ZHANG XZ, ZHANG B, WANG ZM, et al. The method validation of quantitative PCR in detecting residual host genomic DNA in biotech drugs[J]. *Chin Med Biotechnol*, 2016, 11(1): 69

[10] 曹晨华,刘晓志,高健,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, GAO J, et al. Detecting residual host genomic DNA in biotech drugs by real-time quantitative PCR[J]. *Curr Biotechnol*, 2014, 4(2): 142

[11] 李京敬,郜尽,韩伟. 2种定量PCR法与探针杂交法在检测重组白介素1受体拮抗剂中宿主DNA残留量的比较[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 140
LI JJ, GAO J, HAN W. Comparative study of two quantitative PCR methods and the probe hybridization method on residual host genomic DNA assay of recombinant human interleukin 1 receptor antagonist[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(1): 140

[12] ANDREW K, REGHIN G, HERNANDEZ B, et al. Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines[J]. *Biologicals*, 2016, 44(3): 139

[13] 彭燕,杨晓明. 生物技术药物中残留DNA检测方法的比较[J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 39(2): 73
PENG Y, YANG XM. Comparison of testing methods for residual DNA in biotech drugs[J]. *Int J Biol*, 2016, 39(2): 73

[14] 李瑞,王建昌,李静,等. 实时荧光单引物等温扩增技术检测大肠杆菌O157的方法研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 317
LI R, WANG JC, LI J, et al. A method for the detection of *Escherichia coli* O157 based on real-time fluorescence single primer isothermal amplification[J]. *Mod Food Sci Technol*, 2016, 32(2): 317

[15] LEE DH, JUNG EB, JUNG HL, et al. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(10): 1463

(本文于2016年11月9日收到)