

荧光定量 PCR 法测定地特胰岛素原料中酿酒酵母宿主 DNA 残留量

张 晶, 周朝东, 黄哲甦*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要:目的 建立检测地特胰岛素原料中宿主 DNA 残留量的荧光定量核酸扩增 (Real-time PCR) 方法并进行验证, 用于该产品的质量控制。**方法** 选择酿酒酵母 5sRNA 作为靶基因设计引物, 提取地特胰岛素原料中的残留宿主 DNA, 采用 Real-time PCR SYBRGreen 染料法对标准 DNA 和样品进行测定, 绘制标准曲线并分析样品中的 DNA 残留量。对建立的方法进行方法学验证, 并测定 3 批地特胰岛素原料中的残留宿主 DNA。**结果** 酿酒酵母基因组 DNA 质量浓度在 0.18~180 000 ng/mL 线性良好 ($r^2=0.998 5$); 回收率均在 80.0%~106.3%, 检测 3 批地特胰岛素原料的宿主 DNA 残留量均低于进口药品注册标准限度。**结论** 该方法可用于酿酒酵母生产的地特胰岛素原料中残留宿主 DNA 的定量测定。

关键词: 地特胰岛素; 酿酒酵母; 残留宿主 DNA; 荧光定量 PCR

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)07-1312-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.07.005

Detection of residual host cell DNA in insulin detemir substances by Real-time PCR

ZHANG Jing, ZHOU Chao-dong, HUANG Zhe-su

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a Real-time PCR method for quantitative detection of *Saccharomyces cerevisiae* nucleotide residues in insulin detemir substances, to control the quality of insulin detemir substances. **Methods** The 5S ribosomal RNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* was used as target gene to design primer, and the residual host cell DNA was extracted and determined by SYBRGreen based q-PCR. The residual host cell DNA was analyzed according to the standard curve. The developed method was verified and used for determination of 3 batches of insulin detemir substances. **Results** The calibration curve was linear over the range of 0.18 — 180 000 ng/mL, the correlation coefficient r^2 was 0.998 5, and the recovery rates of spiked samples with different DNA quantity were between 80.0% — 106.3%. The residual host cell DNA determined by this method was not more than the limit, which was adopted by imported drug registration standards. **Conclusion** The method can be used for the quantitative determination of *Saccharomyces cerevisiae* nucleotide residues in insulin detemir substances.

Key words: insulin detemir; *Saccharomyces cerevisiae*; residual DNA; Real-time PCR

地特胰岛素是可溶性的长效胰岛素, 有 A、B 两条链, 是人胰岛素类似物, 通过重组 DNA 技术利用酵母生产出蛋白母链, 再利用化学合成方法在 B 链第 29 位赖氨酸以共价键连接了 1 个 14 碳的脂肪酸 (肉豆蔻酸) 侧链^[1], 去掉了 B30 位氨基酸。地特胰岛素分子以六聚体形式存在, 增加了与白蛋白结合的能力, 使其进入体内后可以缓慢释放, 降糖作用平缓且持续时间长^[2-4]。目前国内外药典未收载地特胰岛素原料, 基因重组蛋白药物产品产生免

疫原性的风险高, 宿主菌残留的 DNA 具有潜在的危害性, 因此残留 DNA 的控制是产品安全性的重要质控指标^[5]。目前进口药品注册标准中检测地特胰岛素原料残留宿主 DNA 采用荧光染色法, 使用 PicoGreen dsDNA 定量检测试剂盒, 其原理是 PicoGreen 与 DNA 双链结合后发出荧光, 再经酶标仪测定吸光度值, 绘制荧光强度与 DNA 浓度标准曲线, 进而测定样品中的 DNA 浓度。试剂盒中的 PicoGreen 试剂含有 DMSO, 且此方法不如荧光定

收稿日期: 2020-03-30

作者简介: 张 晶, 女, 河北人, 助理研究员, 硕士, 从事生化药品检验与研究。E-mail: zhangjing0119@126.com

*通信作者 黄哲甦, 女, 天津人, 主任药师, 从事生化药品检验与研究。E-mail: zcd82@163.com

量核酸扩增 (Real-time PCR) 法灵敏度高。本文利用 Real-time PCR 技术^[6-7], 以 SYBRGreen 荧光染料为基础对地特胰岛素原料的残留宿主 DNA 进行测定, 并对该方法进行了方法学验证, 可用于酿酒酵母生产的地特胰岛素原料生产过程的质量控制。

1 材料与仪器

1.1 材料

地特胰岛素原料药, 诺和诺德公司 (丹麦) 生产, 批号分别为 HL1DHP271、HL1DHP272、HL1DHP273, 各检验项目均符合其进口药品注册标准的规定, 由本科室留存。

标准基因组 DNA: 将地特胰岛素宿主菌酿酒酵母扩大培养, 参考文献方法提取基因组^[8-9], 经微量紫外可见分光光度计测定浓度和纯度, 其浓度为 180 ng/μL, 纯度 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.92。取 PCR 用水将标准基因组 DNA 按 10 倍梯度进行稀释, 浓度为 0.018~18 000 ng/mL, 共 7 个浓度点。

1.2 仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪 StepOne 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, Varioskan Flash 型多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司; 宿主残留 DNA 提取试剂盒 wako DNA Extractor kit 购自日本 wako 公司, Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit 购自 Thermo Fisher 公司, 2×Power SYBRGreen Master Mix 购自美国 ABI 公司, PCR 用水购自 Ambion 公司。

2 方法与结果

2.1 原料中残留宿主 DNA 的提取

精密称取地特胰岛素原料 15 mg, 用 1×TE 溶液溶解并稀释至 10 mL, 即终浓度为 1 剂量/mL (1 剂量 = 1.5 mg), 取地特胰岛素原料溶液按 wako DNA extractor kit 说明书提取残留 DNA。

2.2 进口药品注册标准中残留宿主 DNA 检验方法

使用 Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA 试剂盒, 参考文献方法^[10], 用 1×TE 溶液将标准宿主 DNA 溶液 (试剂盒内包含) 稀释为 20、10、2、1、0.5、0.2、0.1、0.01、0 ng/mL 的线性溶液, 0 ng/mL 即 1×TE 溶液, 测定过程按照说明书操作, 对地特胰岛素原料进行残留宿主 DNA 的测定, 结果显示 3 批特胰岛素原料均未检出残留宿主 DNA。

2.3 方法的建立和标准曲线绘制

利用酿酒酵母 5sRNA 的序列设计特异引物, 引物序列: 上游引物为 5'-TTGCGCCATATCTACC

AGAAA-3', 下游引物为 5'-CCTGAGTTTCGCGTA TGGTCA-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 μmol/L, 各加入 1 μL, 2×PowerSybrGreenMaster Mix 10 μL, 模板 1 μL, 超纯水 7 μL, 总体积为 20 μL。反应条件为: 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, 40 个循环; 72 °C 再次延伸 5 min。

以各质量浓度的 DNA 为模板行 PCR 扩增, 平行试验 3 孔。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, 并进行线性拟合, 线性回归方程为 $Y = -3.5164X + 25.238$, $r^2 = 0.9985$, 斜率为 -3.5, 在 -3.1~-3.8, 模板 DNA 在 0.018~18 000 ng/mL 线性关系良好。

2.4 定量限试验

将 DNA 标准品稀释制备质量浓度分别为 0.18、0.018、0.009 ng/mL 的待测样品, 重复测定 6 次, 结果平均值分别为 0.182、0.018、0.006 ng/mL, RSD 值分别为 13.7%、14.2%、48.3%。当检测质量浓度为 0.009 ng/mL 时, RSD 大于 15%; 检测浓度为 0.18、0.018 ng/mL 时, RSD 均小于 15%。因此本方法的定量限浓度为 0.018 ng/mL。

2.5 引物特异性试验

对 7 个浓度梯度标准品、样品进行扩增, 通过荧光定量 PCR 仪设置熔解曲线步骤, 进行分析, 结果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。熔解曲线见图 1。

2.6 准确度、精密度试验

精密称取批号 HL1DHP271 地特胰岛素原料 15 mg,

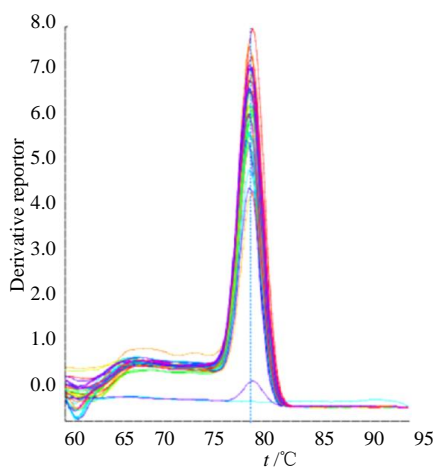


图 1 熔解曲线分析

Fig. 1 Analysis of melt curve

分别加入 50、5、0.5 ng DNA 标准品, 每个水平 3 份, 利用 DNA extractor kit 提取总 DNA 后, 进行测定, 并按照回收率 = (实际测定值 - 本底残留值) / 加标值计算回收率, 结果显示地特胰岛素原料回收率范围在 80.0%~106.3%, 平均值为 94.8%, RSD 值为 8.6%。均符合 Real-time PCR 检测要求范围 (50%~150%), RSD 值在 15% 以内。

2.7 样品测定结果

用建立的 Real-time PCR 方法对地特胰岛素原料进行残留宿主 DNA 的检测。结果显示, 3 批地特胰岛素原料的宿主残留 DNA 均远低于 10 ng/剂的限度, 见表 1。

表 1 地特胰岛素原料中宿主 DNA 残留量测定结果 (n = 3)
Table 1 Determination of residual host cell DNA in insulin detemir (n = 3)

批号	残余 DNA 量/(ng 剂量 ⁻¹)	RSD/%
HL1DHP271	0.08	18.3
HL1DHP272	0.09	17.6
HL1DHP273	0.15	9.6

3 讨论

由于生物技术药物在生产工艺中通常会使用基因工程菌 (细胞), 而宿主菌的 DNA 残留是重组产品中特有的具有潜在致癌性、感染性以及参与人体代谢的物质^[11], 因此这些产品中外源性 DNA 残留量的检测尤为重要。目前已有多种技术方法应用于重组蛋白药物产品中残留宿主 DNA 的质量控制, 如荧光染色法、DNA 探针杂交法、Real-time PCR 法^[12]。荧光染色法和杂交法灵敏度较低且操作繁琐, Real-time PCR 法灵敏度高、准确、快速, 近年来有多项关于 Real-time PCR 技术在外源性 DNA 残留测定上的应用研究^[13-15], 美国药典已把 Real-time PCR 法作为宿主 DNA 残留的标准检验方法^[16], 制定了大肠杆菌、中国仓鼠卵巢细胞系 (CHO) 制备的重组治疗产品中的残留宿主 DNA 的法定检验方法, Real-time PCR 的应用是未来残留宿主 DNA 控制的发展趋势。重组蛋白产品的生产工艺常使用酿酒酵母作宿主菌, 对酿酒酵母残留 DNA 的检测也应当引起关注。

地特胰岛素原料进口注册标准规定用荧光染色法检测宿主 DNA 残留量, 使用酶标仪测定染料与 DNA 的复合物所发出的荧光信号, 标准曲线中 DNA 在低浓度时测得的荧光信号变化量小, 此方法

的灵敏度偏低。实验结果显示, 所检测的 3 批地特胰岛素原料的 DNA 残留量远小于 1 ng/剂量的限度要求, 当使用 PicoGreen dsDNA 试剂盒检测时, 样品均未检出残留宿主 DNA, 而本文建立的 Real-time PCR 法具有较高的灵敏度, 最低定量限为 0.018 ng/mL, 测定误差小, 可用于测定样品中的宿主 DNA 残留量, 是一种重现性好、准确度高的新方法。

5sRNA 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, 片段大小可以用来进行 Real-time PCR SybrGreen 法检测^[17]。本文利用酿酒酵母的 5sRNA 为序列设计引物, 溶解曲线显示引物特异性良好。宿主残留 DNA 属于微量杂质, 易受实验条件干扰, 对地特原料溶液直接进行扩增发现 PCR 反应被抑制。本文采用了 wako DNA extractor kit 提取样品中的 DNA, 相较于磁珠法提取宿主菌 DNA 操作更简易, 且提取回收率符合要求。Real-time PCR SybrGreen 法比探针法成本低, 使用也更为方便。本文建立的 Real-time PCR SybrGreen 方法灵敏度高、特异性好, 可以准确地测定酿酒酵母生产的地特胰岛素原料中宿主 DNA 残留量, 为其他酿酒酵母作为宿主而生产的重组生物制品的 DNA 残留量的检测提供了参考。

参考文献

- [1] Soran H, Younis N. Insulin detemir: a new basal insulin analogue [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2006, 8(1): 26-30.
- [2] 杨萍, 魏祎, 陈艳霞. 地特胰岛素治疗儿童和青少年 1 型糖尿病的疗效观察 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(15): 1180-1182.
- [3] 范峥, 郭桂明, 李文喆, 等. 甘精胰岛素对比地特胰岛素治疗 2 型糖尿病的 Meta 分析 [J]. *中国药房*, 2016, 27(18): 2524-2527.
- [4] 陆菊明. 回到基础——地特胰岛素的安全性评价 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(8): 638-640.
- [5] 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): 678-687.
- [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): 1063-1067.
- [7] 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.
- [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): 31-37.
- [9] 刘晓志, 高健, 韩柱, 等. 大量 *Pichia pastoris* 酵

- 母基因组 DNA 的提取 [J]. 生物技术通报, 2011(4): 167-170.
- [10] 王 兰, 高 凯, 范文红, 等. 中国仓鼠卵巢细胞DNA 国家标准品的研制 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(1): 68-72.
- [11] 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): 678-683.
- [12] 中国药典 [S]. 2015: 789, 250.
- [13] 苏 喆, 周朝东, 黄哲甦. 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 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(4): 193-195.
- [14] 孙允芳, 谢育媛, 郭江红. Real-time PCR 法检测注射用门冬酰胺酶制剂中大肠杆菌核苷酸残留 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 272-276.
- [15] 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): 401-405.
- [16] USP 39-NF 37 [S]. 2019: 509.
- [17] 刘 宁, 刘延琳. 核糖体 RNA 基因在酵母分类鉴定中的应用 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4701-4708.