

### 系列 3. 各种宿主细胞 DNA 残余检测技术的优劣

2015 年版的美国药典将新增章节对残余 DNA 检测进行规范化，那究竟和现有方法有什么不同？为什么最后只确定了一种方法？我们来看看现行美国药典对于残余 DNA 检测的总体要求 [General Chapter 〈1130〉 NUCLEIC ACID-BASED TECHNIQUES-APPROACHES FOR DETECTING TRACE NUCLEIC ACIDS (RESIDUAL DNA TESTING)]。"因为残留 DNA 涉及到潜在来源（传染性病毒 DNA）、管理规程等关键问题，药品监管部门建议必须建立产品的 DNA 残留检测方法。不论是否成品的常规检测包含 DNA 残留含量检测，还是工艺开发中已经证实了 DNA 清除率，残留 DNA 技术指标和定量分析监测规程都必须确立。分析方法包括杂交法、基于 DNA 结合蛋白的免疫色谱法（阈值法）、定量 PCR（Q-PCR）或其他 DNA 扩增方法。理想的定量检测方法的灵敏度应该能够检测到约 10pg/剂量的残留 DNA。杂交法、阈值法和定量 PCR 方法因为灵敏度可以达到检测要求，所以属于经典方法。"下面我们引用美国药典（USP）〈1130〉的内容分别介绍一下这三种方法。

**杂交法（Hybridization-based）：**在这种方法中，根据宿主 DNA 序列设计 DNA 探针用于测定产品中配对 DNA 的数量。双链 DNA 被变性成单链后固定在尼龙膜或硝化纤维膜上，DNA 探针被放射或荧光随机掺入标记以后，与膜上固定的样品宿主 DNA 杂交结合，并在胶片或成像仪对应位置中显现斑点。对于荧光标记的探针，斑点的光密度结果可以在仪器中定量分析。斑点光密度对应结合在目标 DNA 上的探针数，进而推测出残留 DNA 的数量。通过目测方法可以半定量地检测样品中残留 DNA，仪器读片可以对应斑点光密度绘制标准曲线，对应检测结果更加准确。

**DNA 结合蛋白免疫阈值法（DNA-BINDING PROTEIN-BASED）：**这种方法使用 DNA 结合蛋白和 DNA 抗体，分四步检测。第一步，通过加热把 DNA 变性成单链 DNA，变性后 DNA 与偶联了亲和素的 DNA 结合蛋白以及偶联了尿素酶的 DNA 单克隆抗体混合反应，液相中的单链 DNA、DNA 结合蛋白、DNA 抗体共同形成序列非特异的复合物。第二步，样品混合液通过生物素标记的膜，亲和素-生物素结合把 DNA 复合物固定在膜上，洗去非特异吸附。第三步，膜放入

检测仪器中与尿素溶液反应，反应产物氨改变溶液 pH 值并被仪器记录变化。这种 pH 值的变化直接与样品中的 DNA 数目相关。第四步，仪器软件自动分析原始数据确定样品中残留 DNA 数量。

定量 PCR 法（QUANTITATION PCR-BASED）：qPCR 方法以其快速、高通量的特点已经被应用于生物制药的一些领域（拷贝数检测与病毒检测）。这项技术能够确定各种样品中目标 DNA 序列的准确数量。DNA 探针的设计非常关键，这种 DNA 探针包含一端染料分子和另一端淬灭分子。当特殊设计的 DNA 引物引导 DNA 聚合酶沿着模板序列复制合成另一条对应序列时，DNA 聚合酶切断结合在目标 DNA 上的探针染料端，释放到反应液里的染料信号被仪器测量。经过数十个循环的 DNA 扩增，荧光信号与起始 DNA 模板成对应关系，对应标准曲线可以准确计算出样品中残留 DNA 的数量。

美国药典附录进一步对三种方法进行了应用评价。杂交法可以序列特异性地检测目标 DNA，但  $^{32}\text{P}$  标记的探针因为存在半衰期短、放射等问题，实际应用并不广泛。荧光标记的探针如果采用仪器读取信号，杂交法理论上可以达到定量检测要求的灵敏度，但是检测时间需要 48 小时。阈值法因为是采用 DNA 抗体的非特异序列免疫检测技术，不能特异性识别宿主残留 DNA 序列，且容易受到环境和操作人员的 DNA 污染，导致读值偏高。qPCR 法具有序列特异性，灵敏度、准确度、精密度都好，还可以高通量筛选，但开发一个合格的 q-PCR 试剂检测宿主残留 DNA 并不是件容易的事情。有人会提出疑问，终产品中应该限定任何物种的 DNA 残余以确保安全性，所以阈值法是不是最合理的分析方法？这里还需要强调一下宿主残余 DNA 检测的目的：

1. 确认纯化工艺合理，能有效去除宿主 DNA 残余；

2. 确认产品中杂质含量符合标准要求。非特异性的 DNA 检测结果不能区分究竟是生产中污染、检测污染、或是工艺缺陷引起的 DNA 残余，就无法为解决方案提供有效信息。在严格的生产体系中，残留 DNA 检测是解决工艺合理性问题，任何外源污染问题都归 SOP 或 GMP 管理体系解决。

3. 经典的残留 DNA 检测方法灵敏度不同，qPCR 法、DNA 结合法、杂交法的检测限分别达到 <1、3、6pg/样品的水平（目前 qPCR 法灵敏度可达 10fg/反应），但是技术上限制，要求待测 DNA 片段分别不能小于 50、150、600bp 才能用于

杂交法、q-PCR 法、阈值法检测，而 WHO 和 FDA 可接受的 DNA 限度内的片段长度<200bp。

由此可见，这三种方法中，qPCR 法的适用性和技术指标最好。从 qPCR 技术原理来看，探针法要优于荧光染料随机掺入的染料法。正如前面介绍的 USP 修订内容，经过几年来对三种检测方法的系统研究和应用反馈，美国药典会将在新版药典中唯一推荐 qPCR 法作为生物制品残留 DNA 检测的标准方法。

中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心 王滔  
2015 年 10 月 10 日