



宿主细胞 DNA 残留检测 技术培训手册

2016 年 12 月

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

湖州申科生物技术有限公司

目录

1. 使用范围.....	1
2. 残留 DNA (rDNA) 检测必要性.....	1
2.1 致瘤性.....	1
2.2 传染性.....	1
2.3 DNA 整合.....	2
3. rDNA 检测.....	2
3.1 rDNA 限量规定.....	2
3.2 rDNA 检测方法.....	4
3.3 检测方法发展趋势.....	7
3.4 样品前处理方法.....	8
3.5 SHENTEK rDNA 检测试剂盒介绍.....	9
4. 标准术语.....	9
5. rDNA 样本.....	12
5.1 典型取样点.....	12
5.2 样本运送和保存.....	13
6. rDNA qPCR 检测实验.....	13
6.1 实验要求.....	13
6.2 rDNA 检测试验流程.....	15
6.3 样本准备.....	16
6.4 rDNA qPCR 检测数据分析:	17
7. rDNA 检测方法学验证.....	19
7.1 验证项目.....	19
7.2 分类.....	19
7.3 方法学验证举例.....	21
7.4 特定样品的方法学验证.....	22
8. 注意事项.....	23
9. 常见问题.....	24
10. 参考文献.....	25
技术服务咨询:	27

1. 使用范围

本手册由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和湖州申科生物技术有限公司编写，为宿主细胞 DNA 残留检测方法的建立提供全面指导，供生物制品生产及研发企业等人员参考。

2. 残留 DNA (rDNA) 检测必要性

随着生物医药技术的飞速发展，生物制品的表达系统一直在改变。除了一些常见的细胞系，如 CHO、E.coli、酵母等之外，细胞系如植物、昆虫以及人的细胞越来越广泛应用于治疗性疫苗和治疗性生物制品生产中。生物制品包括重组蛋白，疫苗，以及特殊的单克隆抗体。

源自细胞及微生物培养生产的生物制品含有特定杂质，包括宿主细胞蛋白（HCP）及 DNA 残留（rDNA）。相关研究表明，生物制品中宿主细胞 rDNA 具有潜在致癌和传染风险，rDNA 还可能造成基因插入突变，因此检测 rDNA 的含量关系到生物制品的质量与纯度，是产品质量的一个重要指标，更是一个安全性问题。

2.1 致瘤性

人体内的原癌基因正常情况下参与细胞进程，而一旦被激活（如突变），原癌基因则变成活化的癌基因。而这种被激活的癌基因常存在于特定细胞的基因组中，如连续传代细胞系和成瘤细胞（残留 DNA 可能携带 HIV 病毒或 Ras 癌基因等）。研究表明，分布在哺乳动物细胞基因组的 LINE-1 序列可能发挥逆转录转座子作用插入到染色体中，这种插入可能影响关键基因功能的发挥，如激活癌基因或抑制抑癌基因。

2.2 传染性

残留 DNA 的感染性是由于细胞 DNA 中可能存在传染性病毒基因组，该基因组无论是作为染色体外组分还是整合入人体基因组，都能够扩增并产生传染性病毒粒子，因此 DNA 感染性风险可能比致瘤风险更大。对于肿瘤来源的细胞基质，尤其是活病毒疫苗，rDNA 应作为安全性评价的一个指标。

目前的研究结果显示，残留 DNA 的致癌性相比传染性风险要低，但考虑到致癌性实验是动物实验，传染性实验是在细胞水平做的，或许对两方面的风险都不能掉以轻心。

2.3 DNA 整合

DNA 整合入人体基因组，然后通过激活原癌基因或失活抑癌基因致癌，这种可能性理论上是成立的，而这种风险存在与否取决于整合的 DNA。研究发现，25 μ g 含有强启动子的质粒并未诱导敏感鼠系致癌，而表达原癌基因的相同质粒则可导致肿瘤产生。此外，由于微生物来源的基因组 DNA 富含 CpG 和非甲基化序列，增加了重组蛋白药物在体内的免疫源性风险。在一些临床前和临床研究中报道了高剂量的核酸样品，比如 DNA 疫苗或佐剂中的 CpG 寡聚核苷酸，可以诱导免疫反应，还诱导产生 DNA 抗体。

3. rDNA 检测

生物制品中的宿主细胞残余 DNA 的检测是非常重要的，WHO，EU，ICH，FDA，EMA 和 CFDA 等监管机构对最终剂量中的 rDNA 的量有明确的强制要求。rDNA 潜在的风险以及确定生产过程中 rDNA 的清除情况是监管考虑的重要内容。这就需要 rDNA 的检测方法是准确，灵敏，定量的，特别是要采用高灵敏度的方法检测以确保最终成品中的 rDNA 被清除到尽可能低。

3.1 rDNA 限量规定

虽然在基本结构碱基配对单位上类似，但是 rDNA 会以不同的大小和组成存在。检测重组产品中 rDNA 的意义不仅在于阐明生产中纯化的有效性，也是对宿主表达系统中存在的一些 DNA 潜在的感染性以及致癌性的考虑（分别以 HIV 病毒和 Ras 致癌基因为代表）。

基于 rDNA 的潜在危害，许多机构对生物制品 rDNA 残留有明确限量要求，并不像 HCP 可以根据个案来进行处理。WHO 可接受的非口服生物制品 rDNA 为 10ng/剂量。特殊情况下，由于高度纯化工艺，可使 DNA 残留量为 10pg/剂量。同时对于某些活病毒疫苗，在不损失病毒滴度而达到纯化 DNA 标准很困难时，WHO 建议与药品监管部门和国家质控实验室研讨确定。欧洲药典通则对 rDNA 残留量限制为 10ng/剂量，但针对个别疫苗（如甲型肝炎灭活疫苗 rDNA 不超过 100pg/剂量，乙型肝炎疫苗 rDNA 不超

过 10pg/剂量) 会有所不同。FDA 建议生物制品可允许的 rDNA 限度为 100pg/剂量, 对于大剂量的制品(如单克隆抗体), rDNA 放宽到 10ng/剂量, 这主要取决于 rDNA 的来源和产品给药途径(表 1)。

表 1 宿主细胞 rDNA 残留限制及风险等级

参数	类型	限值	风险因子
细胞株	原代细胞	-	1
	二倍体细胞株	-	1
	连续传代非肿瘤细胞株	≤10ng	2
	连续传代肿瘤细胞株	≤100pg	3
给药方式	口服	≤100ug	1
	皮下注射	≤10ng	2
	肌内注射	≤10ng	3
	静脉注射	≤100pg	4
	输液	≤100pg	5

注: 风险依风险因子数值递增。

《中国生物制品规程》中规定 rDNA 含量每剂量应不高于 10ng。《中国药典》中对于 Vero 细胞培养疫苗一般要求 rDNA 残留量不超 100pg/剂量, CHO 细胞培养疫苗 rDNA 残留量不高于 10pg/剂量(EPO、单克隆抗体等生物制品, rDNA 残留量放宽到 100pg/剂量), 酵母和 E.coli rDNA 残留量不高于 10ng/剂量。

基于 rDNA 潜在的风险, 2010 年 FDA 发布的相关指导, ICHQ9 中强调对于不同的细胞系根据其来源和遗传背景来确定 rDNA 的测试:

- 通过降低生物活性来减少宿主细胞来源的 DNA 的致瘤性和感染性风险。
- 通过降低 rDNA 含量, 减小 rDNA 片段的大小(如 DNase 或其他方法处理)至功能基因大小(目前的证据表明为 200bp)以下。
- 通过化学方法来减小 rDNA 的大小和降低它的生物学活性。
- 如果使用到 DNA 清除, 降解或者失活的方法, 则需要方法学验证。
- 在终产品中需要检测 rDNA 的含量和片段大小分布情况。

现有研究表明, 一个功能基因至少在 200bp 以上, 因此, 为减少 rDNA 风险, FDA 建议 rDNA 片段不大于 200bp。DNA 片段大小风险等级如下表:

表 2 DNA 片段大小风险等级划分

rDNA 片段/bp	风险因子
<200	1
200-1000	2
>1000	3
>2000	4

注：风险依风险因子数值递增。

3.2 rDNA 检测方法

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。rDNA 检测方法有杂交法，阈值法，PicoGreen 为代表的荧光染料法和 qPCR 法等。2010 年版中国药典附录收录了以地高辛标记为代表的 DNA 杂交探针法和 PicoGreen 为代表的荧光染料法。但这两种方法都存在技术缺陷，已经被美国和欧盟药典摒弃。新版美国药典（USP）中将唯一推荐 qPCR 法作为生物制品中宿主残留 DNA 的标准方法。qPCR 法的技术优势在于序列特异性高、灵敏度高、重现性好，还可以实现定量检测，使得结果更精确，对 rDNA 风险的评估更加客观。

表 3 不同检测方法的理想检测限

检测方法	检测限 (LOD)
分光光度法	0.1 μ g/mL
荧光染料法 (PicoGreen)	25-100pg
杂交, 随机标记 DNA	50pg (10^{-12} g)
杂交, 生物素标记探针	2pg
杂交, 重复序列 (SINA, Alu)	5pg
免疫方法	5-10pg
PCR, 单一序列	fg (10^{-15} g)
PCR, 重复序列 (SINE, Alu)	ag (10^{-18} g)

3.2.1 杂交法 (Hybridization-based)

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。

3.2.2 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。

3.2.3 染料法

染料法主要以 PicoGreen 方法为代表，其原理为 PicoGreen 荧光染料与双链 DNA 结合发出荧光信号，使用仪器检测荧光信号以此对 DNA 进行定量分析。PicoGreen 方法的优点是使用方便，成本低廉，可以检测相对 DNA 残留量比较高的样品。但 PicoGreen 灵敏度较低，仅能检测 0.2ng 的纯 DNA 溶液。

3.2.4 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）。在 PCR 反应过程中，1-2h 内以一段 DNA 模板扩增出上百万片段；这项技术使得检测低水平 DNA 成为可能，且能够确定各种样品中目标 DNA 序列的准确数量。

定量 PCR 使用到好几种化学物质，其中两种使用的非常普遍，并且都利用了荧光染料。第一个是基于双链 DNA 的结合染料，如 SYBR Green。游离的染料荧光信号非常弱，相反，当 SYBR Green 结合到双链 DNA 上时会产生很强的荧光信号，大约高于游离染料信号强度的 2000 倍，因此这个分析具有很高的信噪比，但 SYBR Green 能与所有的 DNA 双链相结合，对 DNA 模板没有选择性。第二种化学方法是 TaqMan 技术，在同一个片段中，两个特异性引物之间设计一条特异性探针，该探针包括 5' 端的报告基团和 3' 端的淬灭基团，当探针完整时，报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收，

仪器检测不到信号，随着 PCR 的进行，聚合酶在链延伸过程中遇到与模板结合的探针，其核酸外切酶活性能够将探针切断，报告基团远离淬灭基团，其能量不能被吸收，即产生荧光信号，每经过一个循环，荧光信号也和目的片段一样，有一个同步指数增长的过程（图 1）。由于 TaqMan 探针是特异性针对目的片段的，所以其特异性和准确性要优于 SYBR Green，且不像 SYBR Green 一样存在引物二聚体影响结果的问题。

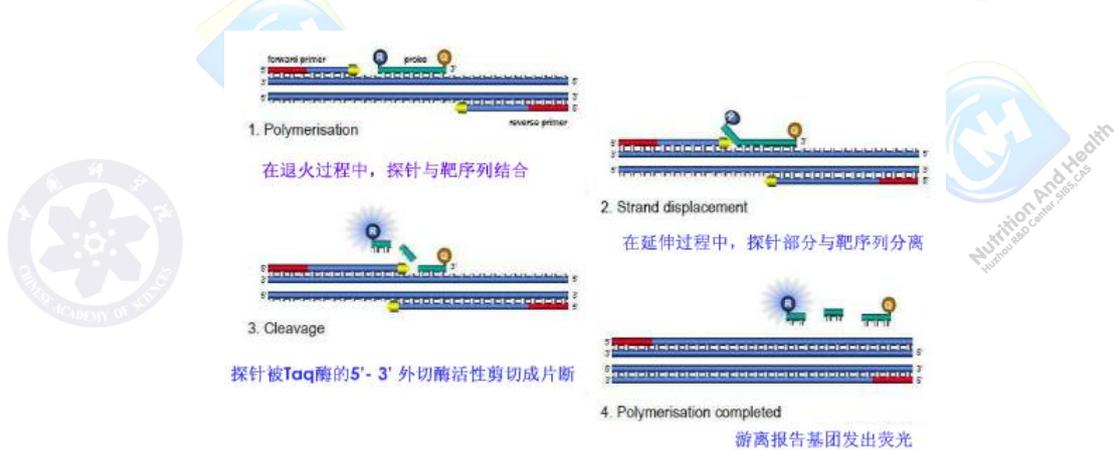


图 1 Taqman 探针法工作原理

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。

3.2.3.1 PCR 原理

聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术。PCR 由高温变性、低温退火（复性）及适温延伸三个基本反应步骤组成一个周期，循环进行，使目的 DNA 得以迅速扩增（图 2）。

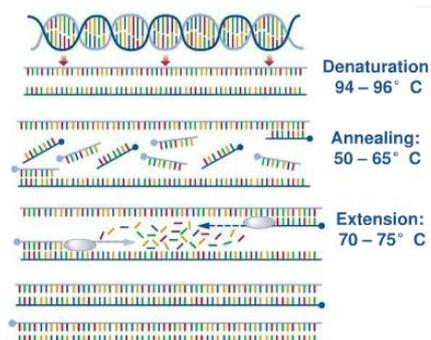


图 2 PCR 扩增原理

3.2.3.2 qPCR 基本概念及理论

qPCR 全名 Real-time Quantitative PCR Detecting System，即实时荧光定量核酸扩增检测系统，是通过实时检测 PCR 每一个循环扩增产物相对应的荧光信号，来实现对起始模板进行定量及定性分析。在实时荧光定量 PCR 反应中，引入了一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，PCR 反应产物不断累积，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线。

一般而言，荧光扩增曲线可以分成三个阶段：荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期（图 3）。在荧光背景信号阶段，扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖，我们无法判断产物量的变化。而在平台期，扩增产物已不再呈指数级的增加，PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系，所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。只有在荧光信号指数扩增阶段，PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系，我们可以选择在这个阶段进行定量分析。

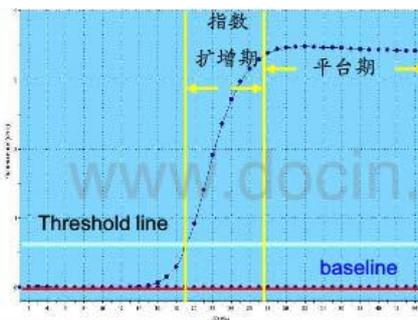


图 3 qPCR 扩增曲线

qPCR 方法包括染料法和探针法，本试剂盒采用 Taqman 探针法。Taqman 探针法含一条特异性探针序列，该探针包括 5' 端的报告基团和 3' 端的淬灭基团，其工作原理如图 3 所示。

3.3 检测方法发展趋势

杂交法可以序列特异性地检测目标 DNA，但 ^{32}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 qPCR 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。最后，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，表 4），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、qPCR 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，Taqman 法要优于荧光染料随机掺入的 SYBR Green 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，美国药典将会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。

在不久的将来，我国药典也将列出 qPCR 法检测 rDNA。2015 年 3 月底，中国食品药品检定研究院网站的国家药品标准物质目录中已经增加了一个编号为 410001 的产品：CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒（PCR-荧光探针法）。

表 4 残余 DNA 不同检测方法比较

	杂交法	阈值法	荧光染料 (PicoGreen)	qPCR 法
最小序列长 (bp)	50	600	100	150
抗干扰性	++	+	—	++
结果重现性	+	++	++	+++
所需时间 (小时)	48	6	1	4
检测范围	ng ($10^{-6} \sim 10^{-9}$)	pg ($10^{-11} \sim 10^{-12}$)	ng-pg ($10^{-7} \sim 10^{-11}$)	fg ($10^{-6} \sim 10^{-15}$)

3.4 样品前处理方法

待检测 rDNA 的生物制品样本除成品，还包括中间品等，其样本中除 rDNA 外，还有很多其他成分，如高浓度的蛋白、多糖等，都会影响后续检测，因此如

何进行样本前处理以稳定高效获取样本中的微量 DNA 是非常关键的步骤。目前主要有酚/氯仿法、碘化钠沉淀法、柱提取法及磁珠法。酚/氯仿法是实验室常用方法，获得的 DNA 纯度高、含量多，但耗时长、步骤繁琐、残留的有机溶剂对 DNA 聚合酶有抑制作用且有损操作者健康；碘化钠沉淀法操作简单，但是时间长，DNA 易丢失，回收率不稳定等；柱提取法简单、快速，但获得的 DNA 纯度不高，且每批次膜柱的回收效率不稳定，批间差大；磁珠法简单、快速、可实现自动化高通量操作、且得到 DNA 纯度高，是比较理想的 rDNA 提取方法。根据最新版 USP 中对 qPCR 法检测 rDNA 的相关要求，rDNA 的提取纯化回收效率的要求为 50~150%。

3.5 SHENTEK rDNA 检测试剂盒介绍

本试剂盒采用基于 Taqman 探针的 qPCR 方法，与现行美国药典建议的检测方法同步，包括样本前处理试剂盒和检测试剂盒。

rDNA 检测需对 mg 级样本中 pg 水平的 DNA 进行准确定量。样本本身，无论是蛋白还是其他化学成分，都可能产生基质效应，从而影响检测过程，因此需进行前期处理，去除样本中其他物质干扰。样本前处理试剂盒采用磁珠吸附方法对各种生物制品样本进行处理，去除样本中的蛋白质、盐类、缓冲液等杂质，从而获得样本中残留的微量宿主 DNA。

样本提取可能会引起残留 DNA 不完全回收或引入环境中外源性 DNA，因此除操作格外注意外，还需增加回收率试验进行评价检测。

试剂盒采用 qPCR 方法进行，通过特异性探针和引物，对提取的宿主细胞 rDNA 含量进行定量检测。

4. 标准术语

4.1 DNA

脱氧核糖核酸的简称，又称去氧核糖核酸，是染色体的主要化学成分，同时也是组成基因的材料。

4.2 基因

是遗传物质的最小功能单位，是指具有一定生物学意义的一段 DNA。

4.3 聚合酶链反应（PCR）

是一种体外扩增特异 DNA 片段的技术。利用 DNA 在体外摄氏高温时变性会变成单链，低温时引物与单链按碱基互补配对的原则结合，再调温度至 DNA 聚合酶最适反应温度，DNA 聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。

4.4 qPCR

全名 Real-time Quantitative PCR Detecting System，即实时荧光定量核酸扩增检测系统，是通过实时检测 PCR 每一个循环扩增产物相对应的荧光信号，来实现对起始模板进行定量及定性分析。

4.5 绝对定量

绝对定量是利用已知浓度的标准品绘制标准曲线来推算未知样品的 DNA 含量。

4.6 基线

PCR 的最初几次循环，在此基线上荧光信号几乎没有变化，一般以 PCR 反应前 15 个循环的荧光信号作为本底信号。

4.7 阳性参比荧光

一种荧光，其本身产生一种内部荧光，通过参比这种荧光，在数据分析期间对报告基团信号进行标准化。标准化对于纠正由于浓度或体积发生改变而引起的荧光波动现象是必须的。

4.8 校正后报告荧光强度（Rn）

与阳性参比荧光信号强度相比较的报告基团荧光信号强度。

4.9 Delta Rn（ ΔRn ）

在给定的一组 PCR 条件下所生成信号的量值。（ $\Delta Rn = Rn - \text{基线}$ ）

4.10 阈值

Delta Rn（校正后报告荧光强度）的一个值——由 SDS 软件自动确定或手动设置——用于在实时实验分析中确定 CT 值。此阈值应设置为高于基线，但应足够地低，使其控制在扩增曲线的指数增长阶段范围之内。阈值线与扩增曲线的交叉点确定 CT 值。

4.11 阈值循环 (CT)

荧光信号强度超过设置的阈值强度时所经历的循环数。

4.12 无模板对照 (NTC)

不包含模板的样本。用于验证扩增量。

4.13 模板

需要确定是否含有或其数量为多少的核苷酸序列。

4.14 报告基团

此荧光加在 TaqMan 探针的 5' 端。它发出的荧光信号作为特异性扩增的指示物。

4.15 标准样本

已知量的样本，用于构建标准曲线。

4.16 未知样本

包含要测定的模板的样本，模板的量未知。

4.17 准确性

指测定值与真实值或认可的参考值的一致性或接近程度。

4.18 精密度

指在规定条件下对均质供试品多次取样进行一系列检测结果的接近程度，一般表示为变异系数 (CV%)，变异系数即是测定值的标准差和测定值均数的比值。

4.19 重复性

是指在同样的操作条件下，在较短时间间隔的精密度。

4.20 中间精密度

是指在试验室内部条件改变，如不同日期、不同分析者、不同仪器、不同批号或来源的实验材料等情况下的精密度。

4.21 重现性

是指不同实验室间的精密度，需通过多个实验室之间的协作研究得到。当分析方法将被法定标准采用时，应进行重现性试验。

4.22 耐用性

指试验参数被有意进行微小改变时，测量结果不受影响的能力，用于说明通常使用条件下该分析方法的可靠性。

4.23 线性

在给定的范围内检测结果与供试品中被分析物的成比例关系。

4.24 范围

是能达到一定的准确性、精密度和线性时被分析物的较高和较低浓度（量）的一个区间。

4.25 专属性

指当制品中含有其它组分，如杂质、降解物、添加物（如缓冲液、赋形剂、稳定剂）等存在时，准确可靠测定供试品的能力。

4.26 检测限度

指供试品中的被分析物能够被检测到的最低量，但不一定要准确定量。

4.27 定量限度

指准确性和精密度都能达到要求时能够定量测定供试品中被分析物的最低量。

5. rDNA 样本

5.1 典型取样点

生物制药生产中 DNA 残留检测的取样点主要是从收集目标物开始，到不同的纯化工艺，乃至最后的成品。一般在 DNA 去除工艺研究和过程验证上，会在从收集细胞到成品的每个处理过程的前端取样进行 DNA 残留检测。

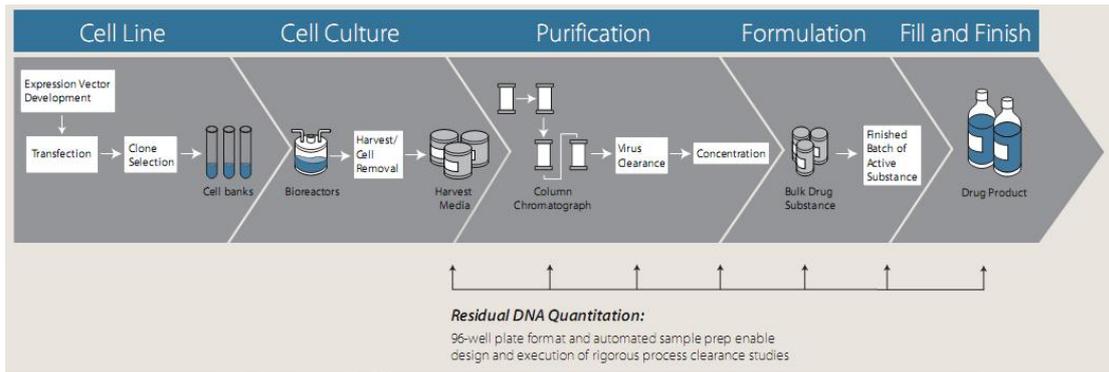


图4 生物制药生产工艺中的杂质分析

5.2 样本运送和保存

样品收集好后如果不直接检测可放入 -20°C 冰箱保存。

需要转送的样本：实验室应建立详细的样本运送标准操作规程（SOP），要求物流人员填写相关运送记录，确保样品运送过程的可控性，样本放在冰袋中运送，以保证微量的DNA不会被降解。

6. rDNA qPCR 检测实验

宿主细胞rDNA检测分析中质量控制内容包括：实验室设计的要求；检测方法及流程；仪器设备的使用、维护与校准；人员培训；确认检测结果的可靠性。实验室应制定室内质量控制操作程序（SOP）和参加室间质评或实验室间比对。

6.1 实验要求

6.1.1 场地要求

宿主细胞 rDNA 检测受环境因素影响大，因此 rDNA 检测实验室一定要远离生产车间，有条件的企业应将实验室设置在与车间不在一幢楼内。

可选择使用 40m^2 左右实验室，配备独立空调及 2 台超净台（一台用于标曲配制、一台用于反应液配制，2 者尽量分开距离），实验室内划分成 4 块区域—标曲配制区、样品前处理区、反应液配置区和模板加样区，并尽量远离出风口，PCR 反应区设置在单独房间内并配备独立空调。

6.1.2 rDNA qPCR 检测所需材料

生物制品中 rDNA 残留极低，其要求精度高，推荐在进行 rDNA 检测实验中所使用到的如移液枪头、EP 管等一次性耗材为低吸附的，qPCR 仪和移液器需定期进行校准。

表 5 检测所需设备

设备名称	要求
定量 PCR 仪	1 台，带分析软件、电脑
恒温金属浴	1 台
漩涡振荡器	1 台
微型离心机	1 台
低温冰箱	1 台
超微量分光光度计	1 台
单道可调移液器	1-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l, 各1支 推荐使用电动移液器
磁力架	1个
4度冰箱	1台
高压灭菌锅	1台
电热鼓风烘箱	1台
超净台	2台

表 6 检测常用耗材

名称	规格	备注
PCR 八连管		
八连管平盖		
96 孔 PCR 板		
封板膜		
EP 管	1.5ml	低吸附
滤芯枪头	10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	低吸附

表 7 检测所需常用试剂

类别	货号	备注
宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒	SK030203D100	
疫苗制剂宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒	SK030206DM50	适用于疫苗等产品检测
CHO 残留 DNA 检测试剂盒	SK030201C100	
E.coli 残留 DNA 检测试剂盒	SK030202E100	
Vero 残留 DNA 检测试剂盒	SK030204V100	
毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒	SK030205P100	
人源细胞残留 DNA 检测试剂盒	SK030207H100	
无水乙醇（分析纯）		
异丙醇（分析纯）		

6.1.3 检测人员要求

- rDNA qPCR 检测人员需要为生物技术专业或相关专业毕业，并可根据企业的样本建立企业内部质控样本库；
- 实验人员应了解 qPCR 技术或经过 PCR 技术培训；
- 对于新进实验人员，应在具有 rDNA qPCR 技术合格的人员指导下进行实验工作，并进行考核培训，包括批内和批间质控评测。

6.2 rDNA 检测试验流程

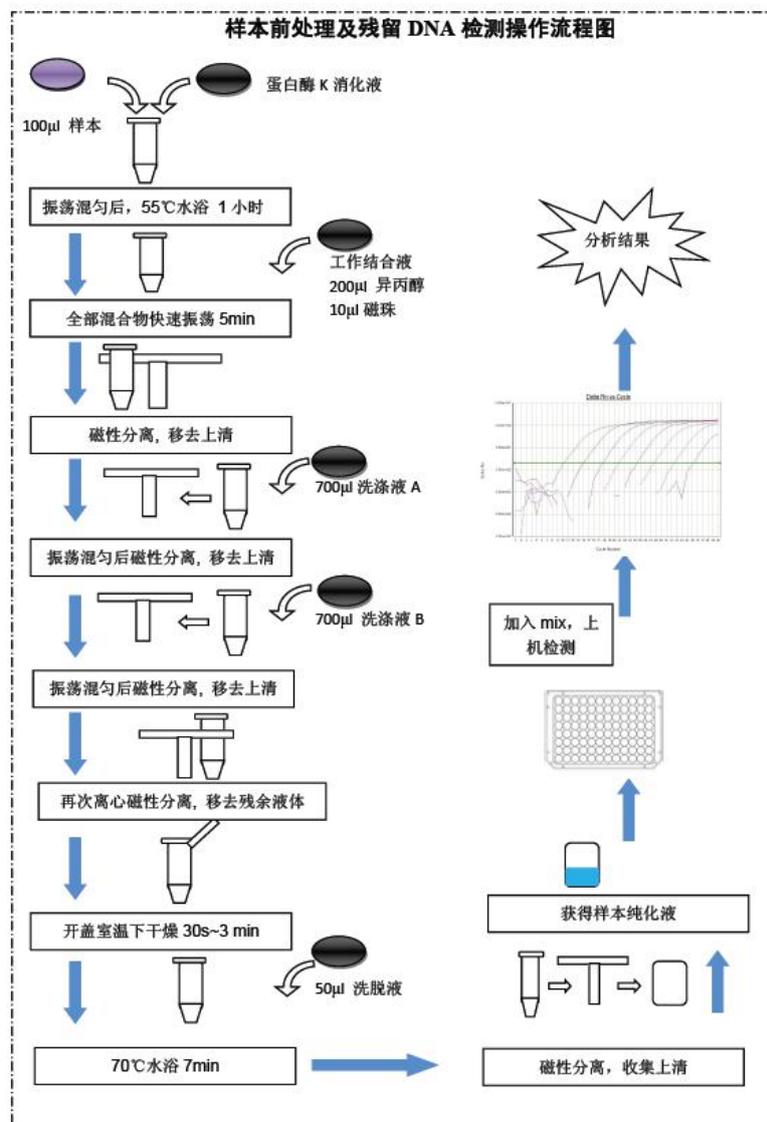


图 5 rDNA 检测流程图

6.3 样本准备

待检测 rDNA 的样本可能是高纯度的蛋白，也可能是含有其他成分的化学品，其要求的 rDNA 定量分析含量极低。根据国家药监局、WHO、FDA 等的规定，生物制品中 DNA 的残余量一般在 100pg/dose。这意味着要在 mg 级的产品中分析 pg 级的残留量。对这样的样本进行 rDNA 的检测分析，需要一个有效的稳定的样本前处理，能够使 rDNA 从这样复杂的一个样本基质中释放出来，并能够富集 DNA 以提高检测灵敏度。

综合考量各方面要求，推荐使用磁珠法。磁珠法简单、快速、可实现自动化高通量操作、且得到 DNA 纯度高，是比较理想的 rDNA 提取方法。更重要是对于 rDNA 的提取纯化回收效率的要求为 50~150%，包括批内和批间实验。磁珠法能够满足微量 rDNA 的提取要求。

进行磁珠法提纯 rDNA，则需要在样本准备前对待处理样本的背景有所了解，如离子浓度、pH 值、蛋白浓度、缓冲体系等。

- 如果待检测样本是生物制品纯化过程中的上游中间样本，可能含有较高的 DNA 含量。为了保证检测的准确性，使样本的检测值在标准曲线线性范围之内，可以用灭菌超纯水对高 DNA 含量样本进行适当比例的稀释后再进行样本纯化处理；也可以在样本纯化处理完成之后，用稀释液对纯化处理后的样本进行稀释，然后再进行 DNA 残留检测。一般可考虑将高 DNA 含量样本稀释 100 倍或 1000 倍。
- 若样本为干粉状态，可以用稀释液将干粉样本进行溶解，再进行下一步操作；或先用适当的试剂将干粉样本溶解，配成高浓度溶液，再用稀释液稀释后，进行下一步操作。一般可考虑将干粉样本稀释成 10mg/ml 或 100mg/ml。
- pH 值要求：一般情况下生物制品纯化过程中间样本的 pH 值均为中性，若样本的 pH<5 或者 pH>9，则会影响样本纯化处理效果。因此可以用 1M 的盐酸或氢氧化钠调整样本的 pH 至中性后（pH6.0~8.0）再进行纯化操作。
- 盐离子浓度要求：若样本中盐离子浓度过低，可使用 5M 的 NaCl 进行调节，保证样本中盐离子浓度在 0.5M 左右，否则会影响样本纯化处理效果。

6.4 rDNA qPCR 检测数据分析:

下图显示了一个有代表性的扩增图谱，其中包括 qPCR 中定义的一些术语。

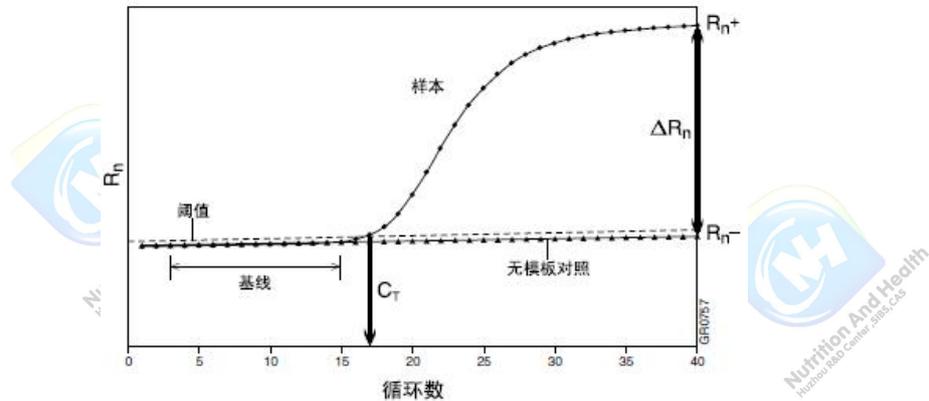


图 6 扩增图谱及术语

6.4.1 rDNA qPCR 参数

绝对定量结果评价指标包括相关系数 R^2 、标准曲线斜率 (Slope)、扩增效率 (E) 和回收率。

利用线性回归方法确定循环数 (C_t) 与试验样品 DNA 量 (\log_{10}) 之间的线性关系。通过回归方程计算参数 (斜率, 截距以及相关系数):

$$\bar{y} = a + b\bar{x}$$

\bar{y} 是样本 y (C_t) 平均值, \bar{x} 是 x 值 ($\log_{10}[\text{fg}]$) 的平均值, a 是 y -截距, b 是斜率。

斜率 (b) 和 y -截距 (a) 计算如下:

$$b = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + \dots + (x_n - \bar{x})(y_n - \bar{y})}{(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

斜率要求在 -3.6 ~ -3.1 之间。

$E = 10^{-1/\text{Slope}} - 1$, qPCR 扩增效率允许范围为 90%-110%, 斜率与扩增效率换算值见表 8:

表 8 斜率与扩增效率换算表

Slope	Efficiency
-3.1	110%
-3.32	100%
-3.5	93%
-3.6	90%

R^2 是评估 qPCR 效率的关键参数, R^2 等于 1, 说明可以用 C_T 值来准确预测样品 DNA 含量。

相关系数 r 如下计算:

$$r = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + \dots + (x_n - \bar{x})(y_n - \bar{y})}{\sqrt{(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2} \sqrt{(y_1 - \bar{y})^2 + \dots + (y_n - \bar{y})^2}}$$

\bar{y} 是样本 y (C_t) 的平均值, \bar{x} 是 x 值 ($\log_{10}[\text{fg}]$) 的平均值。

相关系数的绝对值一般要求 ≥ 0.98 。

6.4.2 回收率和结果计算

回收率 (%) = (加标样品测定值 - 样品测定值) / DNA 标准品理论值 $\times 100\%$ 新版美国药典允许回收率范围为 50%~150%。

标曲赋值 3000pg/10ul, 300pg/10ul, 30pg/10ul, 3pg/10ul, 0.3pg/10ul, 0.03pg/10ul,

rDNA 检测结果计算: DNA 的浓度 (pg/ml) = $10^{(C_t - b)/m} \times 50$

其中 C_t 为达到阈值的循环数, m 和 b 为标准品曲线的斜率和 y 轴截距。

6.4.3 rDNA qPCR 检测结果判定参数

rDNA 结果分析参数包括标准曲线相关系数 R^2 、扩增效率、复孔间 CV 值、样品回收率以及阴性质控品和无模板对照 C_T 值, 要求如下表:

表 9 rDNA qPCR 检测结果判定标准

参数	要求
R^2	≥ 0.99
扩增效率	90%-110%
CV	<15%
样品回收率	50%~150%
阴性质控品 C_T 值	至少在标曲定量限后 2 个循环
无模板对照 C_T 值	>35

7. rDNA 检测方法学验证

方法学验证是对测定方法的评价，证明采用的方法适合于相应检测要求，具有相当的准确性和可靠性，进而可以达到控制产品质量的目的。只有经过验证的分析方法才能用于控制产品质量，因此方法验证是制定质量标准的基础。

7.1 验证项目

质控分析方法的验证就是根据方法的需要测定该方法的专属性、准确性、精密度、线性、范围、检测限度、定量限度、耐用性等几个指标中的一个或几个，用于不同检测目的的试验方法需进行不同参数的测定，下表为各种检测方法通常需测定的参数：

表 10 不同检测方法的方法学验证指标

分析方法 参数	鉴别试验	杂质检查		生物活性（效 价）测定	含量测定
		定量	限度		
准确性	—	+	—	+	+
精密度	—	+	—	+	+
耐用性	+	+	+	+	+
线性	—	+	—	+	+
范围	—	+	—	+	+
专属性	+	+	+	+	+
检测限度	—	—	+	—	—
定量限度	—	+	—	—	—

注：—表示通常不需测定的参数，+表示通常需测定的参数

宿主细胞 rDNA 检测属于对生物制品中的杂质定量检测，其方法学验证指标为准确性、精密度、耐用性、线性、范围、专属性和定量限度等。

7.2 分类

7.2.1 全面验证

对于新药的分析方法及首次建立的分析方法需进行全面分析方法的验证。

7.2.2 部分验证

已经经过验证的分析方法变更时可考虑做部分分析方法的验证，部分验证的内容可以根据分析方法变更的程度从只进行日内精密度和准确度的考察到接近全面的分析方法的考察。部分验证常见于方法转移（人或实验室）、检测方法改变（如仪器改变）、样品基质变化、同一基质不同种属变化、相关线性浓度范围变化等。

因此企业首次采用商业试剂盒检测或样品基质改变需进行部分方法学验证，以确定该试剂盒适用于企业样品。

7.2.3 交叉验证

数据从相同或不同研究中的不同方法中获得，或数据从不同实验室的相同研究方法中获得，需要对这些数据进行比较，并进行交叉验证。

下表为方法学验证内容对比：

表 11 方法学验证实验内容对比

性能检测指标	实验内容	企业方法	商业试剂 +USP	中检院 试剂盒
线性范围	定量检测范围	√	√	-
参考品溯源	自制内部参考品定量	√	√	-
准确度	检测国家标准品	√	√	-
精密度	实验批间差	√	√	√
特异性	Human、mouse、rat、E. coli DNA 干扰	√	-	-
加样回收率	不同浓度 DNA 回收率	√	√	√
	不同基质中的回收率	√	√	√
	不同 PH 值样本回收率	√/-	√/-	-
	不同生产节点的实际样品回收率	√	√	-
对比实验	与同类试剂盒对比纯化回收性能	√/-	-	-
	与同类试剂盒对比检测性能	√/-	-	-
	实际样本检测性能对比实验	√/-	-	-
适用性能	多种 qPCR 仪器适用性	√/-	-	-
	DNA 碎片化的影响	√	-	-
	高蛋白、高盐、低 PH 值等样本	√/-	√/-	-

蛋白降解效率	蛋白酶 K 消化中间品	√	√	-
稳定性	检测试剂可反复冻融	√	√	-
	40℃加速稳定性	√	-	-
	24 个月成品稳定性	√	-	-
时间	建立方法	>12m	3m	0m
	验证可靠性	>3m	1-3m	5d

“√”：必须做 “√/-”：选择做 “-”：不必做 “m”：月 “d”：天

7.3 方法学验证举例

以 CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒方法学验证为例。主要进行了以下验证：

➤ 线性与范围

按说明书方法稀释国标，测定其对 CHO 细胞残留检测试剂的反应曲线，分析曲线线性。

➤ 试剂盒参考品标定

以国家标准品作为标准品，对试剂盒参考品进行标定测定，比较国家标准品与内控参考品曲线的平行性，试验中国家标准品与待测样品的精密度与准确度均应符合相关要求

➤ 准确度

以试剂盒参考品为标准品，对已知浓度国家标准品进行 DNA 测定，分析测定结果的平均值、比较检测值和已知值得出检测准确度。

➤ 精密度

检测试剂盒重复性、中间精密度及重现性。

➤ 特异性

梯度稀释试剂盒参考品绘制标准曲线，同时平行制备一组含有干扰基因的标准曲线进行对比，检测拟合后曲线的重合性。

➤ 定量限

用试剂盒给出的线性范围中最低浓度作为定量限，进行 10 次重复检测，分析检测结果

➤ 回收率

检测不同浓度 DNA 的回收率、不同基质回收率、不同 pH 值样本回收率、不同生产中间样本回收率。

➤ 稳定性

测试检测试剂的反复冻融稳定性、前处理试剂的加速稳定性及检测试剂盒的长期稳定性。

➤ 适用性

测试试剂盒在不同型号仪器上的适用性及不同 DNA 片段大小对检测的影响。

7.4 特定样品的方法学验证

采用 SHENTEK rDNA 检测试剂盒验证特定样品的适用性，可采用如下验证方案：

表 12.样品适用性验证方案

项目		实验方案
精密 度	日间精密 度	检测样品中 r DNA 残留量，据此确定高中低 3 个加标量（最低加标量比样品残留量高一个数量级）。 设置如下 4 组： <ul style="list-style-type: none">➤ 样品组➤ 样品+DNA 1 组（高）➤ 样品+DNA 2 组（中）➤ 样品+DNA 3 组（低） 纯化回收，PCR 检测，不同时间检测 3 次（需 2~3 人完成），计算 CV 值。
	重复性	设置 2 组： <ul style="list-style-type: none">➤ 样品组➤ 样品+ DNA 2 组（中） 纯化回收，PCR 检测，计算 CV 值。（检测时做 6 个重复）
回收 率		根据样品中 DNA 残留量，设置 3 个加标量。设置如下 4 组：

		<ul style="list-style-type: none">➤ 样品组➤ 样品+DNA 1 组（高）➤ 样品+DNA 2 组（中）➤ 样品+DNA 3 组（低） 纯化回收，PCR 检测，计算回收率。
--	--	--

8. 注意事项

8.1 定量 PCR 仪的开关机顺序

按照正确的开关机顺序操作，有助于延长仪器的使用寿命，减少仪器出故障的频率。

开机顺序：先开电脑，待电脑完全启动后再开启定量 PCR 仪主机，等定量 PCR 仪主机面板上的绿灯亮后即可放入 qPCR 管，打开定量 PCR 的收集软件，设置参数进行实验。

关机顺序：确认实验已经结束后，首先关闭定量 PCR 仪主机的电源，接着可在信号收集软件上分析实验结果，然后关掉信号收集软件，最后关闭电脑。

8.2 定量 PCR 仪反应管放置问题

使用单管或 8 连管做实验，并且样本数量不多的时候，建议在样品加热块上对称地安放样品，最好是纵向放置，并且优先放在靠中间的第 6 列或第 7 列，然后逐渐向两边放置。这样做的好处是热盖压下来的时候不至于发生倾斜，各个反应管的受力和受热都比较均匀，提高孔与孔之间的数据精密性。

8.3 防止 PCR 污染

- 1) 实验时穿实验服并戴口罩，勤换手套；
- 2) 使用带滤芯移液枪头和灭菌 ep 管，每次实验尽量更换新的枪头和 ep 管；
- 3) 分区操作：标曲配置区、样品前处理区、反应液配置区、模板加样区和 PCR 反应区，PCR 反应区需设置在单独房间内，尽量远离生产车间或 DNA 提取实验室。每个区分别配备移液枪，勿交叉使用，其中模板加样区需配备 2 把移液枪，一把用于阴性质控和无模板对照孔加样，一把用于检测样本模板加样；
- 4) 实验前整理操作环境，有条件的进行消毒，尽量防止空气流通；

- 5) 空调必须开启时，可在实验开始前先开启空调预冷实验室，待进行实验时，将空调风速调至最低并尽量远离出风口操作；
- 6) 实验过程中先准备阴性对照管、样品管并盖紧管盖，最后准备阳性对照管；
- 7) 勿将扩增产物带至 PCR 反应液配制区；
- 8) 实验结束后清理桌面，可以用 DNA 清除剂清理环境。

8.4 标准品稀释

为节省时间，标准品稀释可在样本消化的等候时间内准备，并存放于 4℃。

8.5 蛋白酶 K 用量建议

表 13 蛋白酶 K 用量建议

蛋白浓度 (mg/ml)	建议加入蛋白酶 K 量/ul
100~150	20 ul
≤100	10 ul

9. 常见问题

9.1 标准曲线线性关系不佳

- 1) 参考品稀释操作有误，使参考品不呈梯度；
- 2) 标准品出现降解或受到污染，应避免标准品反复冻融和被其他试剂污染；

9.2 扩增效率异常

- 1) 注意各试剂成份的储存温度，收到货后及时按要求进行储存；
- 2) 分析参数设置不合适，说明书中参数设置适用于 ABI 7500 qPCR 仪；若检测机型不同，应相应调整 threshold 至合适的位置；
- 3) 参考品稀释不准确；
- 4) 反应体系中有 PCR 反应抑制物，一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

9.3 无模板对照 NTC 或阴性质控 NCS 的检测值不为 Undetermined 或 Ct 值 < 35

请参照 8.3 防止 PCR 污染。NCS Ct 值至少控制在定量限后 2 个循环左右。

9.4 同一试剂在不同仪器上产生不同的曲线

判断曲线是否正常的标准为扩增效率在 90%~110%之间， $R^2 \geq 0.99$ ，灵敏度、特

异性等符合试剂盒标准。同一试剂在不同仪器上有可能产生不同的扩增曲线。

9.5 qPCR 重复性问题

加样时，重复孔操作尽量一致。建议使用电动分液器，提高重复性。

9.6 荧光定量 PCR 模板未扩增标准

当进入对数期的循环数大于 35 个时，荧光定量 PCR 检测无效，可认为没有扩增；当进入对数的循环数在 32-35 个循环时，需要有至少 3 个重复，并与参考品比对才能判断是否有扩增。

9.7 样本纯化回收率异常

- 1) 洗涤液 A 中未加入乙醇；
- 2) 样本 ERC 中添加的 DNA 量不准确；
- 3) 洗脱时磁珠附着于管壁，洗脱液与磁珠未能充分混匀或洗涤后磁珠干燥时间过长，导致磁珠难以洗脱；
- 4) 磁珠吸附力下降，建议预先分装磁珠；
- 5) 样本盐离子浓度低或 pH 不合适，建议调节盐离子浓度和 pH 值；
- 6) 样本中蛋白含量太高，对样本进行适当稀释或增加蛋白酶 K 用量。

9.8 样品调 pH 值后出现絮状沉淀，且蛋白酶 K 消化完成后仍有沉淀，对检测结果是否有影响？

消化完成后仍有沉淀会影响后续的纯化过程，进而影响实验结果，因此建议将待检样品进行适当比例稀释或适当增加蛋白酶 K 后再进行纯化回收，同时还需注意盐离子浓度，如果离子浓度过低，可用 5M NaCl 调节。

10. 参考文献

1. WHO (1987) Acceptability of cell substrates for production of biologicals (World Health Organization, Geneva).
2. Lebron JA, et al. (2006) Adaptation of the WHO guideline for residual DNA in parenteral vaccines produced on continuous cell lines to a limit for oral vaccines. Dev Biol 123:35–44.
3. WHO (1998) WHO Expert Committee on Biological Standardization. (World Health Organization, Geneva).
4. Champion K, Madden H, Dougherty J, Shacter E (2005) Defining your product profile and maintaining control over it, part 2. BioProcess International 3(8):52–57.

5. Wang X, Hunter AK, Mozier NM (2009) Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment. *Biotechnology and Bioengineering* 103(3):446–458.
6. Peden K, Sheng L, Pal A, Lewis A (2004) Biological Activity of Residual Cell-Substrate DNA. *Dev Biol* 123:45–53.
7. Li S, et al. (2008) Oncogenicity of DNA in vivo: Tumor induction with expression plasmids for activated H-ras and c-myc. *Biologicals* 36:184–197.
8. Li S-F, Lewis AMJ, Peden K (2009) Quantitative determination of the infectivity of the proviral DNA of a retrovirus in vitro: Evaluation of methods for DNA inactivation. *Biologicals* 37:259–269.
9. Suntharalingam G, et al. (2006) Cytokine storm in a Phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *The New England Journal of Medicine* 355(10):1018–1028.
10. Cavagnaro JA (1995) Immunotoxicity assessment of biotechnology products: a regulatory point of view. *Toxicology* 105:1–6.
11. WHO (2011) Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Proposed replacement of TRS 878, Annex 1.
12. WHO (1997) Meeting Report WHO Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals
13. FDA (1997) Points to Consider in the Manufacturing and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use.
14. FDA (2010) Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications.
15. EMEA (1997) Position statement on DNA and host cell proteins (HCP) impurities, routine testing versus validation studies.
16. ICH Q6B (1999) Note for Guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Chapter 4.1.3: Purity and impurities
17. ICH Q 9 (2005) Quality Risk Management Step 5.
18. WHO (1998) Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. World Health Organization (WHO) Technical Report. Series 878, Annex 1.
19. WHO (2007) Guidelines To Assure The Quality, Safety And Efficacy Of Live Attenuated Rotavirus Vaccines (Oral), World Health Organization (WHO) Technical Report Series 941, Annex 3.
20. Chu et al. industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Cur. Opin Biotechnology* (2001), 12: 180–187.
21. USP (2008) <1130> Nucleic Acid-Based Techniques—Approaches for Detecting Trace Nucleic Acids (Residual DNA Testing) USP 31-NF 26, Second Supplement.
22. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y (1997) Contribution of CpG Motifs to the Immunogenicity of DNA Vaccines. *The Journal of Immunology* 158:3635–3639.



23. Kojima Y, et al. (2002) Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine* 20:2857–2865.
24. cFDA, 2007: 《生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则》
25. 中国药典（2015年版）：生物样品定量分析方法验证指导原则
26. FDA, 2015: 《Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry》
27. ICH, 2005: 《Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology》

技术服务咨询:

电话: 0572-2115083

Email: Info@nhc.ac.cn