

实时荧光定量 PCR 法检测左旋多巴中大肠埃希菌宿主细胞 DNA 残留量

许冰瑜¹, 刘妍², 郭心瑶¹, 严方^{1*}, 孙桂斌³

(¹ 中国药科大学药物分析系, 南京 210009; ² 哈尔滨工业大学医院药局, 哈尔滨 150000;

³ 南京希罗斯医药有限公司, 南京 210038)

摘要 采用实时荧光定量 PCR 技术, 建立特异性强、灵敏度高的左旋多巴中大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 宿主细胞 DNA 残留量的检测方法, 并进行验证和初步应用。以大肠埃希菌中的相对保守的 *E. coli* MB6 菌株 16S 核糖体 RNA 基因序列作为目的基因设计多对引物, 通过 PCR 进行特异性扩增获得目的片段。将目的片段重组至 pLENTI-BSD-CON 载体构建重组质粒命名为 pLENTI-BSD-CON-*E. coli*-16S, 以其为标准品, 结合磁珠法提取纯化 DNA, 建立定量 PCR 检测方法 (SYBR-Green 法)。对建立的方法进行线性与范围、准确度、精密度、专属性、定量限及耐用性的方法学验证, 应用于左旋多巴原料药的检测, 并与试剂盒检测方法 (Taqman 探针法) 进行比较。建立的定量 PCR 检测方法 (SYBR-Green 法) 正向引物序列: 5'-TTCGATGCAACGCGAAGAAC-3'; 反向引物序列: 5'-GTGTAGCCCTGGTCGTAAGG-3'。以重组质粒作为标准品, DNA 质量浓度在 10 fg/μL~3 ng/μL 范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.98$), 定量限为 10 fg/μL, 加标溶液回收率在 59.7%~80.7% 范围内, RSD 均小于 30%。应用该法对 3 批左旋多巴原料药进行检测, DNA 残留量均在限度以下。结果表明, 建立的检测方法可用于定量检测左旋多巴等由大肠埃希菌作为宿主细胞生产的生物制品的 DNA 残留量, 并且其灵敏度优于试剂盒检测方法。

关键词 大肠埃希菌; 左旋多巴; 构建质粒; 实时荧光定量 PCR; 外源性 DNA 残留; 帕金森病

中图分类号 R917 文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2025)02-0176-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024043002

引用本文 许冰瑜, 刘妍, 郭心瑶, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测左旋多巴中大肠埃希菌宿主细胞 DNA 残留量 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 176–182.

Cite this article as: XU Bingyu, LIU Yan, GUO Xinyao, et al. Detection of residual DNA in host cells of *Escherichia coli* in levodopa by Real-time PCR[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 176–182.

Detection of residual DNA in host cells of *Escherichia coli* in levodopa by Real-time PCR

XU Bingyu¹, LIU Yan², GUO Xinyao¹, YAN Fang^{1*}, SUN Guibin³

¹Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Department of Pharmacy, Harbin Institute of Technology Hospital, Harbin 150000; ³Nanjing Xiluosi Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China

Abstract Using Real-time PCR technology, a highly specific and sensitive method for detecting DNA residues of *Escherichia coli* host cells in levodopa was established, validated, and preliminarily applied. *Escherichia coli* strain MB6 16S ribosomal RNA gene was selected as the target gene to design multiple pairs of primers and the target fragment by specific amplification of PCR was obtained. The target fragment was cloned into the pLENTI-BSD-CON vector and the recombinant plasmid was constructed and named pLENTI-BSD-CON-*E. coli*-16S. A quantitative PCR detection method (SYBR Green method) with magnetic bead extraction and purification methods was established with the reference standard of the recombinant plasmid. Furthermore, the established method was validated, including linear and range, accuracy, precision, specificity, and quantification limit, and applied to the detection of levodopa raw materials. Meanwhile, the detection method was compared with the

Taqman probe method by the commercial kit. The primer sequences of the quantitative PCR detection method (SYBR Green method) were TTGATGCAACGCGAAGAAC (forward) and GTGTAGCCCTGGTCGTAAGG (reverse). The standard curve of DNA was in the range of 10 fg/μL to 3 ng/μL with good linearity ($R^2 \geq 0.98$). The quantitative limit was 10 fg/μL. In addition, the detection recovery rate was in the range of 59.7% to 80.7%, with RSD at less than 15%. Nine batches of levodopa were detected by this method, and the amount of *E.coli* DNA residue was below the limit. The developed qPCR method can be used for quantitative detection of residual DNA in biological products produced by *E.coli* as host cells, such as levodopa. The results indicate that the sensitivity of the detection method for recombinant plasmid construction standards is superior than the reagent kit detection method.

Key words *E.coli*; levodopa; plasmid construction; Real-time PCR; residual exogenous DNA; Parkinson's disease

宿主细胞残留 DNA 是指可能出现于半合成药物或生物制品中来自宿主细胞的 DNA 片段或更长的分子, 其可能存在于最终的产品中^[1]。目前, 许多半合成药物和生物制品都以细胞为生产基质, 宿主细胞残留 DNA 给病毒疫苗等连续细胞系衍生的生物制品及药品造成了潜在的安全风险^[2]。因此, 建立合适的宿主细胞 DNA 残留量检测方法对监测半合成药物和生物制品的安全性和质量可控性至关重要。

大肠埃希菌(*Escherichia coli*), 属于革兰氏阴性短杆菌, 广泛应用于微生物发酵、激素和免疫调节剂等重组蛋白类药物的生物合成以及抗生素的生产^[3-5]。目前, 对于检测药物中的 *E.coli* 宿主细胞 DNA 残留量, 《中华人民共和国药典》主要有荧光染色法、DNA 探针杂交法以及实时荧光定量 PCR 法 3 种方法^[6]。其中荧光染色法灵敏度较低且无法满足微量 DNA 残留的检测; DNA 探针杂交法虽然无需昂贵仪器, 成本相对较低, 但是此方法灵敏度较低且步骤繁琐; 实时荧光定量 PCR 法具有高特异性和高灵敏度等特点, 近年来均被各国药典应用于 DNA 残留量的检测。

左旋多巴是多巴胺的前体药物, 被认为是帕金森病治疗中最有效的药物之一。左旋多巴合成工艺包括全化学合成、天然植物中提取、生物酶转化以及代谢工程。在该研究中, 以 *E.coli* 为宿主菌, 避免了使用 L-酪氨酸作为诱导剂, 减少了后期产物分离纯化的难度, 大大缩减了工业生产的成本^[7]。左旋多巴的剂量为不超过 800 mg/d, 根据 WHO 和欧盟(EU)的指南, 规定生物制品中 DNA 的可接受残留量为 10 ng/剂以下; 美国食品药品管理局(FDA)规定生物制品中 DNA 的可接受残留量为 100 pg/剂

以下。*E.coli* 表达系统作为生产左旋多巴的重要宿主菌已经得到一定的应用, 但经 *E.coli* 表达的左旋多巴药物内的宿主细胞残留 DNA 具有潜在的致癌风险, 可能传递肿瘤或病毒相关的基因, 并导致癌变或其他病理变化^[7], 因此, 检测左旋多巴中的 DNA 残留量十分必要。

通过重组质粒构建标准品的检测方法不仅灵敏度高, 并且获得的标准品具有保存时间长, 纯度较高的优点。基于此, 本实验通过克隆合适的目的基因, 构建了重组质粒标准品; 并根据目的基因进一步筛选引物, 建立了实时荧光定量 PCR 检测左旋多巴原料药中 *E.coli* 宿主细胞 DNA 残留量的方法, 并对该方法进行了方法学验证, 同时与商品化的检测试剂盒进行了比较。

1 材 料

1.1 样品与试剂

左旋多巴(批号: 220020-YP001~220020-YP003)由钛和(杭州)医药技术服务有限公司提供。实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(SYBR-Green 法)、2×Taq Plus 混合物 II(加染料)试剂、DNA 纯化-胶回收试剂盒、FastPure EndoFree 质粒抽提试剂盒、ClonExpress II 一步法克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞(上海唯地生物技术有限公司); 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒(磁珠法), *E.coli* 残留 DNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法, 湖州申科生物技术有限公司); 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); 电子天平(德国 Sartorius 公司); 冷冻离心机、涡旋仪

(德国 Eppendorf 公司); 离心机(瑞士 Biotool 公司); 六孔磁力架(苏州凯发新材料科技有限公司)。

2 方法

2.1 *E.coli* DNA 定量 PCR (SYBR-Green 法) 引物设计及筛选

以大肠埃希菌 DNA 中相对保守的 *E. coli* MB6 菌株 16S 核糖体 RNA 基因序列作为目标序列, 根据引物及探针设计的基本原则, 利用 NCBI 网站设计 6 对引物(F1: CTGGAAC TGAGACACGGTCC/R1: CCAGGTAAGGTTCTCGCGT; F2: TCTGAGAGG ATGACCAGCCA/R2: GTTTACGGCGTGGACTAC CA; F3: CGTCGTAGTCCGGATTGGAG/R3: TCAC CGTGGCATTCTGATCC; F4: ACGCGAAGAACCT TACCTGG/R4: GTATGCGCCATTGTAGCACG; F5: TTCGATGCAACGCGAAGAAC/R5: GTGTAGCCC TGGTCGTAAGG; F6: CGGTAATA CGGAGGGTG CAA/R6: AAGGGCACAACCTCCAAGTC), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以来源于 *E.coli* 残留 DNA 检测试剂盒(湖州申科生物技术有限公司)中的 *E.coli* DNA 定量参考品作为模板, 用 SYBR-Green 染料法进行实时荧光定量 PCR。经过比较多组引物组合的扩增效率和特异性, 从中选取扩增结果较好的引物组合, 确定其中 F5/R5 组引物作为本检测方法的引物组合。

2.2 重组质粒标准品的制备

根据目标序列和 pLENTI-BSD-CON 载体的 DNA 序列选定 *Xho* I 和 *Sal* I 为酶切位点, 结合诺唯赞 ClonExpress II 一步法克隆试剂盒说明书引物设计总原则, 利用 Snapgene 软件进行 PCR 目的片段扩增的上下游引物设计: PCR Forward Primer: 5'-CCCGCGCCGCACAGATCTCGAGTTCGATGCAA CGCGAAGAAC-3'/PCR Reverse Primer: 5'-CCGG GCCCGCGGTACCGTCGACGTGTAGCCCTGGTC GTAAGG-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 *E.coli* DNA 定量参考品作为模板进行 PCR 扩增, 实验运行程序为: 98 °C, 10 s 预变性; 55 °C, 15 s; 72 °C, 5 s; 共 30 个循环。将 pLENTI-BSD-CON 载体进行双酶切反应, 反应体系为: pLENTI-BSD-CON 载体 10 μg、*Xho* I 10 μL、*Sal* I 10 μL、10 × FastDigest 绿色缓冲液 15 μL、灭菌水将反应

体积补至 150 μL, 37 °C 酶切 30 min。将 PCR 扩增产物和双酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 利用 DNA 纯化-胶回收试剂盒获取目的片段, 测定浓度, 按照 ClonExpress II 一步法克隆试剂盒的说明书进行同源重组, 将目的片段导入载体后转化至 DH5α 感受态细胞, 氨苄抗性培养基筛选阳性菌落。将含重组质粒的感受态菌株接种至含氨苄的 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 摆床振荡过夜培养, 菌液经上海生工生物工程技术服务有限公司测序后, 用 FastPure EndoFree 质粒抽提试剂盒提取重组质粒, 利用超微量分光光度计测定核酸浓度。

2.3 供试品残留 DNA 的前处理

按照宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒的说明书, 根据受试药物的检测要求进行适当调整, 具体实验步骤如下: 取供试品溶液 1 mL, 10 000 r/min 离心 15 min, 每 500 μL 样品中加入 5 mol/L NaCl 10 μL。加入蛋白酶 K 消化液(蛋白酶 K 10 μL + 蛋白酶 K 缓冲液 100 μL)10 μL 混匀后, 55 °C 水浴 1 h。从水浴中取出样本, 快速离心 30 s, 加入工作结合液后混匀。快速离心后在样本中分别加入异丙醇 200 μL 和磁珠 10 μL。将混合物置于漩涡振荡器上振荡 5 min, 快速离心后置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后移去上清液, 加入洗涤液 A 700 μL, 振荡 10 s 使其混匀; 快速离心后, 将离心管重置于磁性分离架上。待磁珠完全分离后移去上清液, 完成第 1 次磁珠洗涤后加入洗涤液 B 700 μL, 振荡 40 s 使磁珠和洗涤液 B 混匀; 快速离心后重置于磁性分离架上。待磁珠完全分离后移去上清液, 完成第 2 次磁珠洗涤。快速离心后置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 将残余液体吸净。取下离心管, 室温晾干。加入 70 °C 预热的洗脱液 50 μL, 振荡使磁珠和洗脱液混匀, 70 °C 水浴 7 min, 水浴过程中再次振荡混匀 3 次。孵育完成后高速离心 1 min, 静置于磁性分离架上, 待分离后转移溶液到新的离心管中。快速离心 10 s, 静置于磁性分离架上, 待分离后再次转移溶液至新的离心管, 所得即为样本纯化液, 用于后续定量 PCR 反应。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测

2.4.1 SYBR-Green 法 按照实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(SYBR-Green 法)的说明书, 根据定量 PCR 法检测要求适当调整, 反应体系为 2×ChamQ SYBR 彩色 qPCR 混合物 5 μL、DNA 模板 1 μL、正

向引物 F5 0.2 μ L、反向引物 R5 0.2 μ L、DEPC 水 3.6 μ L, 反应条件为阶段 1: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 阶段 2: 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 重复 40 个循环; 阶段 3: 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 60 s, 95 $^{\circ}$ C, 15 s。每个浓度做 3 个复孔, 应用 LightCycler[®] 96 SW 1.1 软件进行数据分析, 根据反应循环数 C_t 利用一系列浓度梯度所做的标曲计算浓度。

2.4.2 Taqman 探针法 按照 *E.coli* 残留 DNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法, 湖州申科生物技术有限公司)说明书, 以不同浓度的 DNA 标准品和供试品为模板进行 Real-time PCR 扩增。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 1 min, 40 个循环。每个浓度做 3 个复孔, 应用 LightCycler[®] 96 SW 1.1 进行数据分析, 以不同浓度的 DNA 标准品做标准曲线, 根据供试品反应循环数 C_t 利用标曲计算其初始浓度。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性和范围 以重组质粒为 DNA 标准品, 用 TE 缓冲液将其稀释成 3 000, 300, 30, 3, 0.3, 0.03, 0.01 pg/ μ L 的系列质量浓度梯度, 标记为 ST1~ST7。以上述系列稀释的重组质粒作为模板, 每个浓度重复测定 3 次, 按“2.4”项下方法配制反应体系进行反应。以 DNA 标准品溶液质量浓度的对数值对其相应的 C_t 做直线回归, 求得直线回归方程和相关系数。线性范围与相关系数 R^2 可接受标准: 标准曲线线性回归方程相关系数 R^2 不小于 0.98, 斜率应在 -3.1~ -3.8 范围内。

2.5.2 专属性 以重组质粒为 DNA 标准品, 用 TE 缓冲液配制 10 pg/ μ L 的 DNA 标准品溶液, 取 10 μ L 加入 10 mL 量瓶中并加无酶水定容至刻度, 摆匀, 为阳性溶液。取无酶水 100 μ L 作为阴性溶液。按“2.3”项下方法进行 DNA 残留的提取和纯化, 按“2.4”项下方法配制反应体系进行反应。读取阴性对照溶液和阳性对照溶液的 C_t , 考察采用该前处理方法和 PCR 测定方法是否能正常检测。分别使用 HepG2 细胞, Huh7 细胞和放线菌的基因组 DNA 进行实时定量 PCR 扩增反应, 考察该检测方法的特异性。

2.5.3 定量限和检测限 以重组质粒为 DNA 标准品, 用 TE 缓冲液配制 3, 10 fg/ μ L 的 DNA 标准品溶液, 将其作为模板, 按“2.4”项下方法配制反应体系进行反应, 计算残留 DNA 的定量限和检出限, 并计算检测结果的 RSD。

2.5.4 准确度 取供试品约 100 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 DNA 标准品溶液 ST1~ST3 10 μ L, 加无酶水适量, 振摇 10 min, 再加无酶水定容至刻度, 摆匀即得, 分别得到低浓度加标溶液、中浓度加标溶液、高浓度加标溶液。按“2.3”项下方法进行 DNA 残留的提取和纯化。按“2.4”项下配制 PCR 反应体系, 运行反应, 计算加标溶液中 DNA 的回收率及回收率 RSD。低、中、高加标溶液回收率应在 50%~150% 范围内, 3 份加标溶液回收率的 RSD 不得大于 30%。

2.5.5 精密度

重复性: 按“2.5.4”项下方法配制供试品溶液、中浓度加标溶液。按“2.3”项下方法进行残留 DNA 的提取和纯化。按“2.4”项下方法配制 PCR 反应体系, 运行反应。计算 6 份中浓度加标溶液中 DNA 的回收率以及回收率 RSD, 6 份中浓度加标溶液回收率应在 50%~150% 范围内, 6 份中浓度加标溶液回收率 RSD 不得大于 30%。

中间精密度: 更换实验人员且于不同日期按重复性项下方法重复实验。按“重复性”项下方法进行实验, 计算 6 份中浓度加标溶液中 DNA 的回收率以及回收率 RSD, 计算两次实验 12 份中浓度加标溶液中 DNA 的回收率 RSD。6 份中浓度加标溶液回收率应在 50%~150% 范围内。6 份中浓度加标溶液回收率 RSD 不得大于 10%, 两次实验 12 份中浓度加标溶液回收率 RSD 不得大于 30%。

2.5.6 耐用性 按“2.5.4”项下方法配制供试品溶液、中浓度加标溶液。按“2.3”和“2.4”项下方法更换另一不同实验室进行 DNA 的提取纯化以及实时荧光定量 PCR 检测。计算不同实验室间条件下的 DNA 回收率和 RSD, 评价此检测方法的耐用性。3 份中浓度加标溶液回收率应在 50%~150% 范围内。3 份中浓度加标溶液回收率 RSD 不得大于 30%, 取“2.5.5”项下重复性的 3 次回收率结果共同计算, 两次实验 6 份中浓度加标溶液回收率 RSD 不得大于 30%。

2.6 初步应用

用建立的 Real-time PCR 方法对企业生产的 3 批左旋多巴原料药进行大肠埃希菌宿主细胞 DNA 残留量的检测。

3 结果

3.1 筛选定量 PCR (SYBR-Green 法) 最佳引物组合 利用 *E.coli* DNA 标准品作为模板对设计的 6

对引物,根据起始 C_t 、拟合曲线 R^2 以及是否存在引物二聚体等多个因素进行综合评价,从中选取出扩增结果最好的一组引物组合(F5:TTCGATGC

AACCGAAGAAC/R5:GTGTAGCCCTGGTCGTA AGG),其线性回归方程为 $C_t = -3.3105 \times c + 22.89$, R^2 为 0.9995。6 对引物的扩增曲线见图 1。

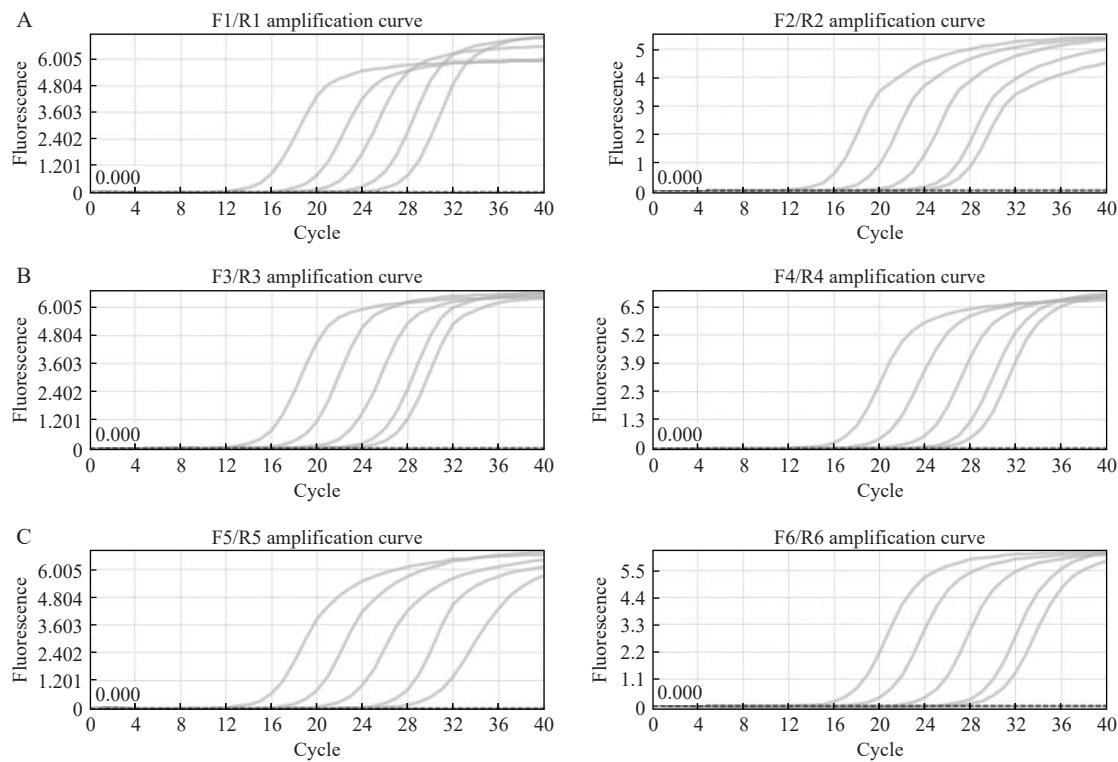


Figure 1 Screening results of primer by SYBR-Green method

A-F: F1/R1-F6/R6 Amplification curve

3.2 重组质粒的构建

通过双酶切方法得到的线性化载体的长度应为 7746 bp,通过 SnapGene 软件设计出的插入目的片段的长度应为 269 bp。此结果均在琼脂糖凝胶电泳显影图中得到了验证且经生工公司菌液测序成功,所提质粒经超微量分光光度计测定 $A_{260}/A_{280} = 1.85$ (在 1.7~1.9 之间,纯度符合要求),证明线性化载体与插入目的片段均制备成功,表明 pLENTI-BSD-CON-E.coli-16S 质粒构建成功。双酶切产物及目的扩增片段的琼脂糖凝胶电泳见图 2。

3.3 方法学验证

3.3.1 线性和范围 重组质粒质量浓度在 10 fg/ μ L~3 ng/ μ L 范围内线性关系良好,线性回归方程 $C_t = -3.5872 \times \lg c + 19.109$,相关系数 R^2 为 0.9968。

3.3.2 专属性 以重组质粒为标准品检测,采用的样品前处理和 Real-time PCR 测定方法无干扰,阴性对照的 C_t 大于最低检测限的 C_t 均值,并能正常检测阳性对照溶液,阳性对照溶液的 C_t 平均值

17.22,浓度 RSD 为 4.5%,符合可接受标准。引物特异性验证:分别使用 HepG2 细胞、Huh7 细胞和

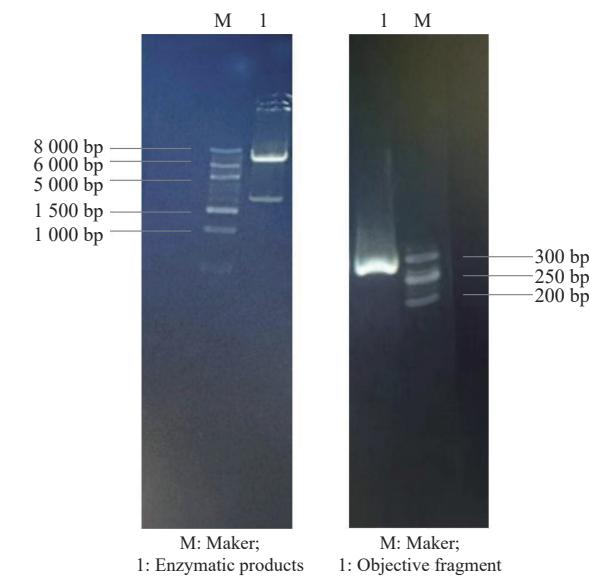


Figure 2 Agarose gel electrophoresis

放线菌的基因组这几种干扰 DNA 进行扩增实验。结果表明, 该检测方法仅对 *E.coli* 进行特异性扩增, 而不受其他 DNA 干扰, 结果见图 3。

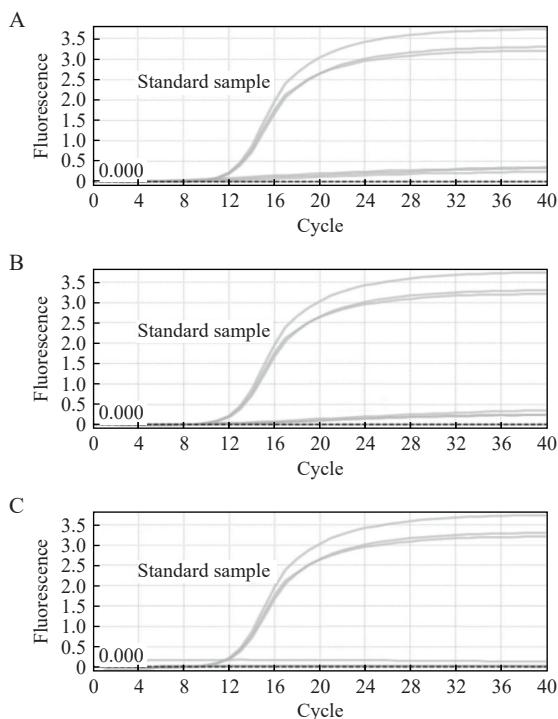


Figure 3 Genome amplification curves of HepG2 cell (A), Huh7 cell (B), and actinobacteria(C)

3.3.3 定量限和检测限 以重组质粒为标准品检测, 定量限浓度为 $10 \text{ fg}/\mu\text{L}$, RSD 为 8.8%; 检测限浓度为 $3 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 均符合可接受标准。

3.3.4 准确度 以重组质粒为标准品检测, 低($30 \text{ pg}/\mu\text{L}$)、中($300 \text{ pg}/\mu\text{L}$)、高($3000 \text{ pg}/\mu\text{L}$)加标溶液回收率在 59.7%~80.7% 范围内, 加标溶液回收率 RSD 在 4.8%~15.2%, 符合可接受标准。

3.3.5 精密度

重复性: 6 份中浓度加标溶液加标回收率在 70.1%~78.7% 范围内, 6 份中浓度加标溶液回收率 RSD 为 4.9%, 符合可接受标准。

中间精密度: 6 份中浓度溶液加标回收率在 64.9%~71.4% 范围内, 6 份中浓度加标溶液回收率 RSD 为 3.6%, 两次实验共 12 份加标溶液回收率总 RSD 为 5.9%, 符合可接受标准。

3.3.6 耐用性 3 份中浓度溶液回收率在 68.0%~71.0% 范围内, 3 份中浓度加标溶液回收率 RSD 为 7.4%, 两次实验共 6 份加标溶液回收率总 RSD 为 6.1%, 符合可接受标准。

3.4 结果比较

本实验中, 用商品化试剂盒检测方法, DNA 质量浓度在 $60 \text{ fg}/\mu\text{L}$ ~ $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.98$), 定量限 $60 \text{ fg}/\mu\text{L}$; 而以重组构建的质粒为标准品绘制的标准曲线, DNA 质量浓度在 $10 \text{ fg}/\mu\text{L}$ ~ $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.98$), 定量限为 $10 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 准确度和精密度两者均符合可接受标准, 可见重组质粒构建标准品的检测方法灵敏度优于试剂盒中的检测方法。

3.5 初步应用

用重组质粒构建标准品检测 3 批左旋多巴原料药中大肠埃希菌 DNA 残留量, 检测结果显示, 本方法检测左旋多巴中的大肠埃希菌残留 DNA 均远低于每剂 10 ng 。

4 讨 论

通过微生物发酵生产的各种化学药物、蛋白酶中仍有可能残留宿主细胞的 DNA 片段, 这些残余 DNA 的片段大小组成不定, 潜在的风险不定, 可能带来传染性、致瘤性、免疫原性和致突变性等风险。所以各国药品监管部门对 DNA 杂质的限量要求非常严格, 是药物生产过程中极其重要的安全质量控制环节, 故需要检测其中来自宿主细胞的 DNA 残留量。

近年来, 通过一系列的摸索与改进, Real-time PCR 技术普遍应用于外源性 DNA 残留量的测定, 并取得了较好的结果。USP38 中也将 Real-time PCR 法作为生物制品中宿主残留 DNA 检测的唯一推荐标准方法。Real-time PCR 法的技术优势在于序列特异性高、灵敏度高、重现性好、操作便捷, 人为干扰因素少, 可以为生物制药工业在工艺研究和成品质量控制方面提供可靠的检测手段, 具有较为广阔的应用前景^[8~9]。

本实验的创新点在于自主设计引物并利用酶切酶连、同源重组等方法构建了大肠埃希菌标准品重组质粒, 然后使用荧光染料法进行 qPCR 扩增。荧光染料法在 PCR 扩增中加入 SYBR-Green 荧光染料, 该染料可结合所有的 dsDNA, 并不与单链 DNA 结合, 随着特异性 PCR 产物的指数扩增, 每个循环的延伸阶段, 染料掺入双链 DNA 中, 其荧光信号强度与 PCR 产物的数量呈正相关, 此方法较为经济, 成本更低。商品化试剂盒采用荧光探针法, 探

针两端分别标记一个荧光基团和一个淬灭基团, 探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收, PCR 扩增时, 探针被外切酶降解, 荧光基团和淬灭基团被分离, 发射出荧光信号^[10], 此方法虽特异性强但成本较高, 试剂昂贵。将自建的检测方法与商品化试剂盒的检测方法进行比较, 用试剂盒检测方法, DNA 质量浓度在 60 fg/μL~3 ng/μL 范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.98$), 定量限为 60 fg/μL; 而以重组构建的质粒为标准品绘制的标准曲线, DNA 质量浓度在 10 fg/μL~3 ng/μL 范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.98$), 定量限为 10 fg/μL, 可见重组质粒构建标准品的检测方法灵敏度优于试剂盒中的检测方法。同时, 本实验建立的大肠埃希菌 DNA 残留量检测方法, 其专属性、线性与范围、定量限与检测限、准确度、精密度以及耐用性均在药典规定的可接受范围内。此方法获得了浓度较为准确的 DNA 标准品重组质粒, 提高了引物与模板结合的特异性和反应的扩增效率。自建的检测方法更加灵敏, 定量结果也更加精准。

我国药典针对药用原料、辅料、制药用水、中间产品、终产品、包装材料和环境等药品全生命周期质量控制中细菌的生物学鉴定, 采用细菌 DNA 特征序列鉴定法, 此方法中用琼脂糖凝胶电泳检测核酸扩增产物, 然后将核酸扩增产物纯化后进行测序, 将测序结果与数据库进行比对^[11], 此方法仅适用于对待检菌进行定性。而本研究构建了标准品重组质粒, 通过实时荧光定量 PCR 进行扩增, 此方法适用于定量检测药物中宿主细胞 DNA 残留量, 以此来对相关生物制品进行质量控制。重组质粒构建标准品的检测方法不仅灵敏度高, 并且通过构建质粒获得的标准品具有保存时间长, 不易降解, 纯度高, 容易制备等优点。受企业委托, 实验中仅对左旋多巴中大肠埃希菌宿主细胞 DNA 残留量进行了检测, 此方法也有一定的局限性。为了满足生物技术产品中 DNA 残留量定量测定的需求, 更快地推动新版药典外源性 DNA 残留量测定第三法(qPCR 法)的应用, 需要建立统一的 DNA 残留量定量检测所用的 DNA 国家标准品^[12]。与以全基因组为模板相比, 重组质粒仅插入目标序列中的一段,

背景上与全基因组一定程度上会有所不同。因此, 此方法需要在更多品种的宿主 DNA 残留量检测上进行验证。

References

- [1] Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, **67**(2): 155-163.
- [2] Wang X, Morgan DM, Wang G, et al. Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and quantitation technologies and future directions[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**(2): 307-317.
- [3] Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, et al. Production of pharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, **25**(7): 953-962.
- [4] McElwain L, Phair K, Kealey C, et al. Current trends in pharmaceuticals production in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Lett*, 2022, **44**(8): 917-931.
- [5] Iacovelli R, Sokolova N, Haslinger K. Striving for sustainable biosynthesis: discovery, diversification, and production of antimicrobial drugs in *Escherichia coli*[J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, **50**(5): 1315-1328.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: part 3 (中华人民共和国药典: 三部) [S]. *China Medical Science and Technology Press*, 2020: 3407.
- [7] Lung ML, Cheung AK, Ko JM, et al. The interplay of host genetic factors and Epstein-Barr virus in the development of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin J Cancer*, 2014, **33**(11): 556-568.
- [8] Min K, Park K, Park DH, et al. Overview on the biotechnological production of L-DOPA[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**(2): 575-584.
- [9] Shahrajabian MH, Sun WL. The significance and importance of dPCR, qPCR, and sybr green PCR kit in the detection of numerous diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2024, **30**(3): 169-179.
- [10] Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, et al. Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis[J]. *Genes*, 2022, **13**(12): 2387.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: part 4 (中华人民共和国药典: 四部) [S]. *China Medical Science and Technology Press*, 2020: 1021.
- [12] Wu G, Fu JH, Cui YF, et al. Validation of quantitative PCR-Taqman probe method for detection of residual NS0 host cell DNA[J]. *J Chinese Pharm J(中国药学杂志)*, 2020, **55**(5): 389-395.