

CGE-LIF方法对慢病毒中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析

Size analysis of residual host cell DNA in Lentivirus by CGE-LIF

高铁¹, 李响², 王文涛¹, 陈泓序¹

Gao Tie¹, Li Xiang², Wang Wentao¹, Chen Hongxu¹

¹ SCIEX, 中国; ² 中国食品药品检定研究院重组药物室, 北京

¹ SCIEX, China; ² NIFDC, China

1. 引言

哺乳动物细胞系如今已经成为表达制备生物制品最广泛的宿主。在已经上市和正在进行临床试验的生物制品中, 70%来源于哺乳动物细胞系, 如幼仓鼠肾细胞系、中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)、小鼠骨髓瘤 NS0 细胞系以及人胚肾细胞系(HEK-293)。宿主细胞残留DNA(HCD)一种可能存在于最终的产品中的工艺相关杂质, 其残留问题受到了生物制药用户的广泛关注, 存在制瘤性和感染性。现有研究表明, 可能引发致病的功能基因至少在200 bp以上, 因此残留DNA片段越大, 风险等级越高。美国食品药品监督管理局(FDA)关于人类基因治疗新产品生产指导文件中明确指出HCD的片段要小于200 bp; 国家药品监督管理局(NMPA)生物制品药学部同样在《基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则》的征求意见稿中指出, HCD的片段要小于200 bp。因此基因治疗终产品中需要合适的方法检测HCD的片段大小分布情况。

本文以慢病毒样品为例, 使用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 结合激光诱导荧光检测器(LIF)和dsDNA 1000试剂盒(货号477410)(图1), 对宿主细胞残留DNA进行片段分布检测。



图1. PA 800 Plus药物分析系统与dsDNA 1000试剂盒

2. 试剂及方法

2.1 仪器和试剂

PA 800 Plus制药分析系统, 匹配LIF检测器激光诱导荧光检测器(SCIEX公司, 激发波长488 nm, 发射波长520 nm)。DNA 涂层毛细管(100 μm内径)、dsDNA 1000固体凝胶、SYBR Gold 荧光染料购自Thermo Fisher(Carlsbad, CA, USA); 10 × Tris Borate-EDTA(TBE)缓冲液、200 bp、500 bp、1000 bp的marker缓冲液购自Sigma Aldrich(St Louis, MO, USA)。

凝胶缓冲液配置: 将20 mL去离子水加入固体凝胶中, 搅拌直到固体凝胶完全溶解, 使用1 × TBE 缓冲液对上述溶液进行10倍稀释, 得到分离凝胶缓冲液; 取10 mL凝胶缓冲液与1 μL SYBR Gold染料混合均匀, 供CGE-LIF分析使用。

2.2 样品及前处理

慢病毒样品由国内某基因治疗公司提供, 利用湖州申科HCD磁珠法提取试剂盒进行的纯化。样品处理流程如图2所示:

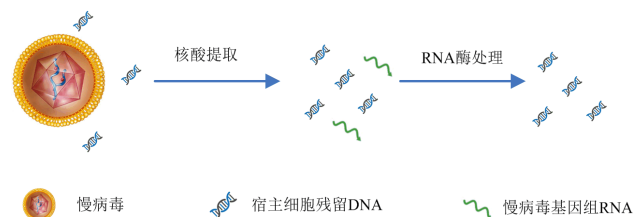


图2. 慢病毒HCD分布分析样品前处理流程

样品残留 DNA 提取

采用样品残留 DNA 提取试剂盒，具体操作按试剂盒说明书进行。取 100 μ L 供试品，加入蛋白酶 K 溶液，混匀后 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h，使膜蛋白降解、与 DNA 结合的蛋白质降解、DNA 充分游离；加入 200 μ L 异丙醇和 10 μ L 磁珠，使游离 DNA 与磁珠充分结合，分离磁珠；加入各 700 μ L 洗涤液 A 和 B，使磁珠和洗涤液混匀，完成 2 次磁珠洗涤；将离心管开盖干燥 10 min，除去残留乙醇；加入 100 μ L 预热洗脱液，混匀后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，分离磁珠；上清即为 DNA 纯化液，经紫外可见分光光度计测定浓度。

2.3 CGE-LIF方法设置

毛细管：DNA 涂层毛细管，100 μ m 内径，30/40.2 cm（有效/总长度）；进样条件：0.2 psi，10 s；分离电压：-7.8 kV，20 min；毛细管温度：20 $^{\circ}$ C；样品室温度：10 $^{\circ}$ C。毛细管的预处理：使用去离子水在 20 psi 压力下冲洗 5 min，凝胶缓冲液在 20 psi 压力下冲洗 5 min；-7.8 kV 加电平衡 10 min。针与针间冲洗：使用凝胶缓冲液在 20 psi 压力下冲洗 2 min。

3. 结果与分析

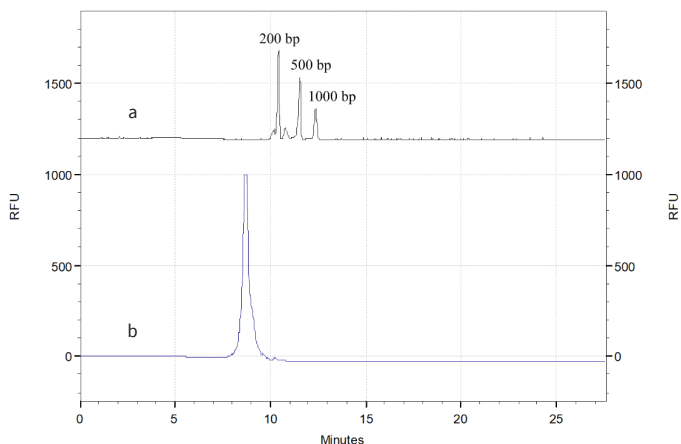


图3. CGE-LIF 法对慢病毒的HCD片段大小分析。a, marker (200,500,1000 bp)；b, 慢病毒DNA提取物；

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13912-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China

利用CGE-LIF方法，通过与marker的对比，可准确判定慢病毒样品HCD的片段大小是否 < 200 bp，从而确定样品是否符合合格。如图3为慢病毒样品中HCD分布分析的谱图，通过与marker比对，可以看到样品中残留的核酸片段都在200 bp以下；由于慢病毒基因组RNA已被酶切破坏，因此在 > 1000 bp 的范围内未检测到任何DNA及RNA片段。通过CGE-LIF的方法，可以快速准确的判定慢病毒样品中HCD的分布情况，进而可以帮助用户更好的对工艺的优化和种产品的质控。

4. 结论

该毛细管凝胶电泳（CGE-LIF）方法具有如下特点：

- **高效分离**：可按照片段大小对不同DNA进行分离，结合DNA marker，可评估DNA的片段大小分布。
- **灵敏度**：可检测10 pg/mL的片段浓度，若在前处理的过程中对DNA进行浓缩处理，可获得更高的检测灵敏度，满足各种残留DNA检测的要求。
- **操作方便**：具有商品化的样品前处理试剂盒和分离试剂盒。
- **符合法规**：仪器具有操作（OQ）认证，操作软件能够进行权限设置和审计追踪。

参考文献

1. SCIEX Tech Note: CE-LIF方法分析宿主细胞残留DNA的片段分布（RUO-MKT-02-9259-ZH-A）