

CGE-LIF方法分析不同工艺阶段狂犬疫苗中宿主残留DNA的片段大小分布

Size distribution analysis of residual host cell DNA in rabies vaccines at different process by CGE-LIF

高铁¹, 李加², 王文涛¹, 陈泓序¹, 郭立海¹
Gao Tie¹, Li Jia², Wang Wentao¹, Chen Hongxu¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX, 中国; ² 中国食品药品检定研究院虫媒室, 北京

¹ SCIEX, China; ² NIFDC, China

Key words: CGE-LIF, HCD片段大小分布, 狂犬疫苗

1. 引言

宿主细胞残留DNA (HCD) 存在制瘤性和感染性, 目前其残留问题受到了生物制品企业和监管机构的广泛关注。现有研究表明, HCD可能引发致病的功能基因至少在200 bp以上, 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。由此可见, 一种简便快捷的用于基因细胞治疗产品中的HCD分布分析的方法是必要。目前基于激光诱导荧光检测器的毛细管凝胶电泳方法 (CGE-LIF) 已经应用多种基因细胞治疗产品的检测, 如慢病毒、腺病毒等^{1,2}。

HCD的片段大小分布检测对于基因工程类的疫苗也很重要。狂犬疫苗原液的生产工艺中通常为狂犬病病毒固定毒株接种Vero细胞, 经过病毒培养, 收获病毒液, 再经灭活、浓缩、纯化等工艺, 制成疫苗原液。在整个过程中, HCD是一种可能存在于最终的产品中的工艺相关杂质, 需要进行考察。

本文以狂犬疫苗不同工艺阶段的样品为例, 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), 对其宿主细胞残留DNA进行片段大小分布检测。



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)。dsDNA 1000试剂盒 (SCIEX公司 PN 477410) 内含DNA 涂层毛细管 (100 μ m内径, PN 477477)、dsDNA 1000固体凝胶 (PN 477628); SYBR Gold荧光染料购自Thermo Fisher (Carlsbad, CA, USA); 10 $\times$ Tris Borate-EDTA (TBE) 缓冲液购自Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA); 100 bp、200 bp、500 bp、1000 bp的DNA标准品由中检院提供。

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 $\times$ TBE 缓冲液对上述溶液进行12倍稀释, 得到分离凝胶缓冲液; 取10 mL凝胶缓冲液与1 μ L SYBR Gold染料混合均匀, 供CGE-LIF分析使用。

2.2 样品及前处理

狂犬疫苗不同工艺阶段的样品由中检院提供，按照工艺先后顺序，分别为收获液、超滤浓缩液、灭活前液、灭活液、原液，如图2所示。不同阶段样品均利用湖州申科HCD磁珠法提取试剂盒进行提取，由于狂犬疫苗的基因组是RNA，因此提取后的样品经过RNA酶处理去除掉基因组，处理后各个样品及DNA标准品混合物的浓度如表1。

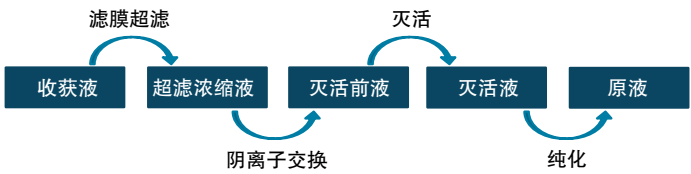


图2. 不同阶段的狂犬疫苗样品

表1. 样品及DNA标准品混合物的浓度

序号	名称	核酸浓度 (nanodrop测定)
1	收获液	4.70 ng/μL
2	超滤浓缩液	6.05 ng/μL
3	灭活前液	7.35 ng/μL
4	灭活液	6.95 ng/μL
5	原液	5.20 ng/μL
6	DNA标准品混合物	单独标准品为0.20 ng/μL

2.3 CGE-LIF方法设置

毛细管：DNA涂层毛细管，100 μm内径，30/40.2 cm（有效/总长度）；进样条件：0.2 psi，10 s；分离电压：-9 kV，20 min；毛细管温度：20 ℃；样品室温度：10 ℃。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；-9 kV加电平衡10 min。针与针间冲洗：使用凝胶缓冲液在20psi压力下冲洗2 min。

3. 结果与分析

本文对狂犬疫苗不同生产阶段样品中的核酸提取物进行了CGE-LIF分析，结果如图3所示。结果显示，收获液、超滤浓缩液中含有分布较宽的HCD，且超滤浓缩液经过了滤膜超滤，其HCD的含量明

显高于收获液；灭活前液、灭活液和原液经过了阴离子交换、柱层析的工艺，其HCD的分布范围明显缩小，但是结果中还是能检测到少量HCD。对于原液中的HCD，需要考察其分布范围。对比100、200、500、1000 bp的DNA标准品，可以发现原液中的HCD分布均小于200 bp。而另外四个阶段的样品中灭活前液和灭活液中检测到的HCD均已小于200 bp，而收获液和超滤浓缩液均含有大于200 bp的核酸信号，说明纯化工艺中阴离子交换步骤去除掉大部分的HCD，尤其是可有效去除大于200 bp的HCD。

通过CGE-LIF的方法，可以快速准确的判定狂犬疫苗样品中HCD的分布情况，进而可以帮助用户更好的对工艺的优化和产品的质控。

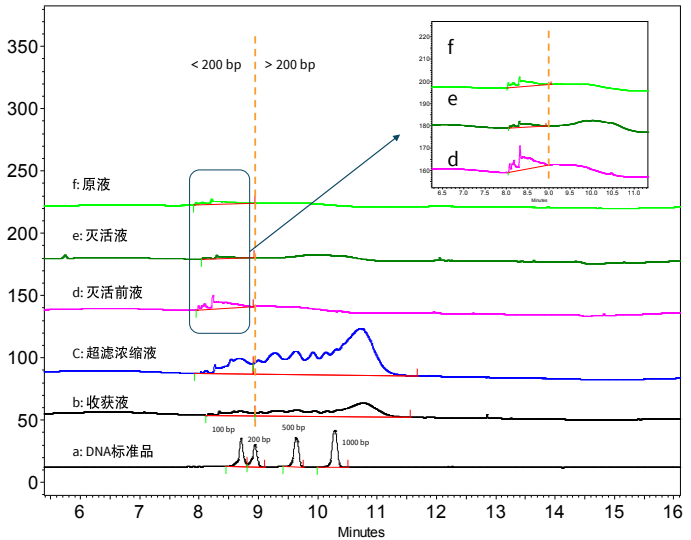


图3. CGE-LIF 法对DNA标准品混合物及不同阶段狂犬疫苗样品中的HCD片段分析。a. DNA标准品混合物（100、200、500、1000）、b. 收获液、c. 超滤浓缩液、d. 灭活前液、e. 灭活液、f. 原液。

4. 结论

毛细管凝胶电泳（CGE-LIF）方法分离HCD片段大小分布的应用具有如下特点：

- **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³，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: CGE-LIF方法对重组腺病毒疫苗中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析（RUO-MKT-02-14119-ZH-A）
2. SCIEX Tech Note: 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（RUO-MKT-02-13912-ZH-A）
3. 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）

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15816-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：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)