

## 3407 外源性DNA残留量测定法

在进行外源性DNA残留量测定时,可根据供试品具体情况选择下列任何一种方法进行测定。

## 第一法 DNA探针杂交法

供试品中的外源性DNA经变性为单链后吸附于固相膜上,在一定条件下可与相匹配的单链DNA复性而重新结合成为双链DNA,称为杂交。将特异性单链DNA探针标记后,与吸附在固相膜上的供试品单链DNA杂交,并使用与标记物相应的显示系统显示杂交结果,与已知含量的阳性DNA对照比后,可测定供试品中外源性DNA残留量。

试剂 (1)DNA标记和检测试剂盒。

(2)DNA杂交膜 尼龙膜或硝酸纤维素膜。

(3)2%蛋白酶K溶液 称取蛋白酶K0.20g,溶于灭菌水(电阻率大于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )10ml中,分装后贮藏于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

(4)3%牛血清白蛋白溶液 称取牛血清白蛋白0.30g,溶于灭菌水(电阻率大于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )10ml中。

(5)1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液(pH8.0) 用适宜浓度盐酸溶液调pH值至8.0。

(6)5.0mol/L氯化钠溶液。

(7)0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0) 用10mol/L氢氧化钠溶液调pH值至8.0。

(8)20%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液 用盐酸调pH值至7.2。

(9)蛋白酶缓冲液(pH8.0) 量取1mol/L Tris溶液1.0ml(pH8.0)、5mol/L氯化钠溶液2.0ml、0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)2.0ml、20%SDS溶液2.5ml,加灭菌水(电阻率大于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )至10ml。如供试品遇氯化钠溶液发生沉淀反应,可免加氯化钠。

(10)TE缓冲液(pH8.0) 量取1mol/L Tris溶液(pH8.0)10ml、0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)2ml,加灭菌水(电阻率大于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )至1000ml。

(11)1%鱼精DNA溶液 精密称取鱼精DNA 0.10g,置10ml量瓶中,用TE缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,用7号针头反复抽打,以剪切DNA成为小分子,分装后贮藏于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

(12)DNA稀释液 取1%鱼精DNA溶液50 $\mu\text{l}$ ,加TE缓冲液至10ml。

用于探针标记和阳性对照的DNA制备 用于探针标记和阳性对照的DNA,由生产供试品用的传代细胞、工程菌或杂交瘤细胞提取纯化获得,其提纯和鉴定可参考下述推荐方案进行,具体方法可参考《分子克隆实验指南》([美] J.萨姆布鲁克等著,黄培堂等译,科学出版社,2002)或《精编分子生物学实验指南》([美] F.奥斯伯等著,颜子颖、王海林译,科学出版社,1998)。

将待提取的细胞基质悬液的细胞浓度调整为每1ml约含 $10^7$ 个细胞,如果为细菌,则将其浓度调整为每1ml约含 $10^8$ 个细菌。量取悬液1ml,离心,在沉淀中加裂解液400 $\mu\text{l}$ 混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用12~24小时后,加入饱和苯酚溶液450 $\mu\text{l}$ ,剧烈振摇混匀,以每分钟10000转离心10分钟,转移上层液体,以饱和苯酚溶液450 $\mu\text{l}$ 重复抽提1次;转移上层液体,加入三氯甲烷450 $\mu\text{l}$ ,剧烈振摇混匀,以每分钟10000转离心10分钟;转移上层液体,加入pH5.2的3mol/L醋酸钠溶液40 $\mu\text{l}$ ,充分混合,再加入 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下的无水乙醇1ml,充分混合, $-20^{\circ}\text{C}$ 以下作用2小时,以每分钟15000转离心15分钟;用适量 $-20^{\circ}\text{C}$  70%乙醇溶液洗涤沉淀1次,以每分钟15000转离心15分钟,弃上清液,保留沉淀,吹至干燥后,加适量灭菌TE缓冲液溶解,RNase酶切,苯酚-三氯甲烷抽提,分子筛纯化DNA,即得。

用1%琼脂糖凝胶电泳法和分光光度法鉴定阳性对照品的DNA纯度:应无RNA和寡核苷酸存在; $A_{260}/A_{280}$ 比值应在1.8-2.0之间(测定时将供试品稀释至 $A_{260}$ 为0.2~1.0)。

用于阳性对照和标记探针的DNA在使用前应进行酶切或超声处理,使其片段大小适合于DNA杂交和探针标记。

阳性对照品的DNA浓度按下式计算:

$$\text{DNA浓度}(\mu\text{g/ml})=50\times A_{260}$$

阳性对照品可分装于适宜的小管中, $-20^{\circ}\text{C}$ 以下保存,长期使用。

探针的标记 按试剂盒使用说明书进行。

测定法 (1)蛋白酶K预处理按下表对供试品、阳性对照和阴性对照进行加样,混合后于37 $^{\circ}\text{C}$ 保温4小时以上,以保证酶切反应完全。

|                | 加样量         | 2%蛋白酶K<br>溶液 | 蛋白酶<br>缓冲液 | 3%牛血清<br>白蛋白溶液 | 加水至<br>终体积  |
|----------------|-------------|--------------|------------|----------------|-------------|
| 供试品            | 100 $\mu$ l | 1 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l |                | 200 $\mu$ l |
| D <sub>1</sub> | 100 $\mu$ l | 1 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l | 适量             | 200 $\mu$ l |
| D <sub>2</sub> | 100 $\mu$ l | 1 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l | 适量             | 200 $\mu$ l |
| D <sub>3</sub> | 100 $\mu$ l | 1 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l | 适量             | 200 $\mu$ l |
| 阴性对照           | 100 $\mu$ l | 1 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l | 适量             | 200 $\mu$ l |

注意事项 供试品的稀释。

根据成品最大使用剂量，用DNA稀释液将供试品(原液)稀释至每100 $\mu$ l含1人份剂量；如成品最大使用剂量较大，而供试品的蛋白质含量较低，可用DNA稀释液将供试品稀释至每100 $\mu$ l含1/10人份剂量或每100 $\mu$ l含1/100人份剂量。

D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>为稀释的阳性DNA对照。用DNA稀释液稀释至每1ml中含DNA 1000ng，然后依次10倍稀释成10ng/100 $\mu$ l(D<sub>1</sub>)、1ng/100 $\mu$ l(D<sub>2</sub>)、100pg/100 $\mu$ l(D<sub>3</sub>)3个稀释度；如成品使用剂量较大，而且DNA限量要求(100pg/剂量)较严格时，则需要提高DNA检测灵敏度，相应的阳性DNA对照应稀释成100pg/100 $\mu$ l(D<sub>1</sub>)、10pg/100 $\mu$ l(D<sub>2</sub>)、1pg/100 $\mu$ l(D<sub>3</sub>)3个稀释度。阴性对照为DNA稀释液，空白对照为未进行蛋白酶K预处理的TE缓冲液。

当供试品1/100人份剂量大于100 $\mu$ l时，终体积也随之增大，一般终体积为供试品体积的1倍左右，供试品体积和终体积相差过小，可能会影响蛋白酶K的活性。

2%蛋白酶K溶液和蛋白酶缓冲液的比例为1：20，蛋白酶缓冲液和终体积的比例为1：10。

加入3%牛血清白蛋白溶液适量，是为了使阳性对照和阴性对照中含有一定的蛋白质，与供试品(通常为蛋白质)的酶切条件保持一致；如供试品为其他物质，则应改用其他相应物质。

若预处理后的供试品溶液中的蛋白质干扰本试验，可用上述饱和苯酚溶液抽提法或其他适宜方法提取供试品DNA(阳性对照、阴性对照也应再次提取DNA，与供试品溶液平行)。

无论采用何种方式抽提，Vero细胞DNA参考品至少应能达到10pg的检测限。

供试品为疫苗制品时，供试品和阳性对照均采用TE缓冲液进行稀释。阴性对照为TE缓冲液。

(2)点膜 用TE缓冲液浸润杂交膜后，将预处理的供试品、阳性对照、阴性对照与空白对照置100 $^{\circ}$ C水浴加热10分钟，迅速冰浴冷却，以每分钟8000转离心5秒。用抽滤加样器点样于杂交膜(因有蛋白质沉淀，故要视沉淀多少确定加样量，以避免加入蛋白质沉淀。所有供试品与阳性对照、阴性对照、空白对照加样体积应一致，或按同样比例加样)。晾干后可采用紫外交联法或置80 $^{\circ}$ C真空干烤1小时以上。

(3)杂交及显色 按试剂盒使用说明书进行。

结果判定 阳性对照应显色，其颜色深度与DNA含量相对应，呈一定的颜色梯度；阴性对照、空白对照应不显色，或显色深度小于阳性DNA对照D<sub>3</sub>，试验成立。将供试品与阳性对照进行比较，根据显色的深浅判定供试品中外源性DNA的含量。

## 第二法 荧光染色法

应用双链DNA荧光染料与双链DNA特异结合形成复合物，在波长480nm激发下产生超强荧光信号，可用荧光酶标仪在波长520nm处进行检测，在一定的DNA浓度范围内以及在该荧光染料过量的情况下，荧光强度与DNA浓度成正比，根据供试品的荧光强度，计算供试品中的DNA残留量。

试剂 (1) 1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液(pH7.5) 用盐酸调pH值至7.5。

(2) 0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液(pH7.5) 用10mol/L氢氧化钠溶液调pH值至7.5。

(3) TE缓冲液(pH7.5) 量取1mol/L Tris溶液(pH7.5)1.0ml、0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液(pH7.5)0.2ml，加灭菌注射用水至100ml。

(4) 双链DNA荧光染料 按试剂使用说明书配制。

(5) DNA标准品 取DNA标准品适量溶于TE缓冲液中，制成50 $\mu$ g/ml DNA标准品，于-20 $^{\circ}$ C保存。

DNA标准品浓度根据下式计算：

$$\text{DNA浓度}(\mu\text{g/ml})=50 \times A_{260}$$

DNA标准品溶液的制备 用TE缓冲液将DNA标准品配成0ng/ml、1.25ng/ml、2.5ng/ml、5.0ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、40ng/ml、80ng/ml的标准品溶液。

测定法 精密量取DNA标准品溶液和供试品溶液各400 $\mu$ l于1.5ml离心管中，分别加入新配制的双链DNA荧光染料400 $\mu$ l，混匀后，避光室温放置5分钟。取250 $\mu$ l上述反应液于96孔黑色酶标板中，并做3个复孔。用荧光酶标仪在激发波长480nm、发射波长520nm处测定荧光强度。以TE缓冲液测得的荧光强度为本底，测定和记录各测定孔的荧光值。以标准品溶液的浓度对其相应的荧光强度作直线回归，求得直线回归方程(相关系数应不低于0.99)，将供试品溶液的荧光强度代入直线回归方程，求出供试品中DNA残留量。

注意事项 (1) DNA残留量在1.25~80ng/ml范围内，本法线性较好，因此供试品DNA残留量在该范围内可定量测定；当DNA残留量低于1.25ng/ml时应为限量测定，表示为小于1.25ng/ml。

(2)供试品首次应用本法测定时需要方法进行方法学验证,验证内容至少包括精密度试验和回收率试验。若供试品干扰回收率和精密度,应采用适宜方法稀释或纯化DNA(可参见本项目第一法)以排除干扰,直至精密度试验和回收率试验均符合要求。需要纯化DNA后再进行测定的供试品,每次测定均应从纯化步骤起增加回收率试验,并用回收率对测定结果进行校正。

### 第三法 定量PCR法

PCR反应过程中可通过荧光标记的特异性探针或荧光染料掺入而检测PCR产物量,通过连续监测反应体系中荧光数值的变化,可即时反映特异性扩增产物量的变化。在反应过程中所释放的荧光强度达到预设的阈值时,体系的PCR循环数(Ct值)与该体系所含的起始DNA模板量的对数值呈线性关系。采用已知浓度的DNA标准品,依据以上关系,构建标准曲线,对特定模板进行定量分析,测定供试品中的外源DNA残留量。

试剂 (1) PCR反应预混液(2×)含MgCl<sub>2</sub>、扩增酶、dNTPs等,按试剂使用说明书要求配制,或符合条件的其他配方预混液。

(2)TE缓冲液(pH8.0)同本通则第一法。

(3)荧光标记探针 用TE缓冲液稀释至100μmol/L, -20℃保存。

(4)正向和反向序列检测引物 用TE缓冲液稀释至100μmol/L, -20℃保存。

(5)碘化钠溶液(6mol/L碘化钠, 15mmol/L EDTA, 0.5%月桂酰肌氨酸钠, 25mmol/L Tris-HCl pH8.0以及35μg/ml糖原): 配制100ml碘化钠储备液,先取干净的烧杯置于磁力搅拌器上,依次加入以下成分,同时用搅拌子不断搅拌均匀: 50ml无核酸酶水, 3.0ml 0.5mol/L EDTA溶液, 2.5ml 1mol/L Tris-HCl pH8.0, 缓慢加入89.93g碘化钠,加入适量无核酸酶水至100ml(可根据需要等比增加或减少)。用0.2μm孔径的尼龙膜过滤溶液。避光4℃储藏。使用前加入月桂酰肌氨酸钠及糖原。

(6)2%蛋白酶K溶液 同本项目第一法。

(7)蛋白酶K 缓冲液(10×),同本项目第一法但不加氯化钠,或按蛋白酶K试剂说明书要求配制。

(8)推荐的检测探针及引物

#### CHO细胞

探针: 5'-FAM-ACTCGCTCTGGAGACCAGGCTGGC-TAMRA3'

正向引物: 5'-TGTTAGCTTTGGAGCCW'CCT-3'

反向引物: 5'-CAGCACTCGGGAGGCAGA-3'

#### 大肠埃希菌

探针: 5'-FAM-CGGTGCTGCGACGGCGGAGT-TAMRA3'

正向引物: 5'-GAAAGTAACACCAGCGTGCG-3'

反向引物: 5'-CCAATGCATTAACGCTGGCA-3'

#### 毕赤酵母

探针: 5'-FAM-TAACTACGGTTGATCGGACGGGAAA-TAMRA3'

正向引物: 5'-ACACTACTCGGTCAGGCTCT-3'

反向引物: 5'-TTTCGGTTGCGCCATATCT-3'

#### NS0细胞

探针: 5'-FAM-AGGGCCCCAATGGAGGAGCT-TAMRA3'

正向引物: 5'-CCCCTTCAGCTCCTTGGGTA-3'

反向引物: 5'-GCCTGGCAAIAACAGAAGTGG-3'

#### Vero细胞

探针: 5'-FAM-CCTTCAAGAAGCCTTTCGCI AAG-TAMRA3'

正向引物: 5'-CCCCTTCAGCTCCTTGGGTA-3'

反向引物: 5'-GGAAGATATTCCTTTTCACCATAGC-3'

(9)DNA共沉淀染色剂。(可选)

(10)清洗液A 按试剂(5)方法配制,含碘化钠37.5g, 1mol/L Tris缓冲液(pH8.4)2.0ml, 0.5M EDTA溶液(pH8.4)2.0ml, 异丙醇50ml, N-月桂酰肌氨酸钠0.5%(W/V), 加去离子水至总体积100ml。

(11)清洗液B 含有35Mg/ml糖原的乙醇(70%)水溶液。使用前,将糖原加入20ml乙醇(70%)水溶液中至浓度为35μg/ml, 混匀。

### 测定法

(1)供试品处理

可根据需要对供试品进行稀释,也可按碘化钠沉淀法或磁珠法等方法浓缩纯化DNA。碘化钠沉淀法按如下操作进行。若采用商业化试剂盒,需经验证并参照使用说明书进行操作。

(2)DNA标准品溶液的配制

用TE缓冲液将DNA标准品稀释成1000pg/μl、100pg/μl、10pg/μl、1pg/μl、0.1pg/μl、0.01pg/μl、0.001pg/μl的系列浓度梯度,或其他适宜的浓度范围。DNA标准品含量在0.01-100pg/μl范围内本法线性较好。

### (3)DNA浓缩/纯化

取2.0ml的离心管三支，加入250 $\mu$ l供试品溶液及12.5 $\mu$ l无核酸酶水作为供试品组；加入250 $\mu$ l供试品溶液及12.5 $\mu$ lDNA标准品溶液作为加标组；另加入262.5 $\mu$ l无核酸酶水作为阴性对照组。

向管中分别加入50 $\mu$ l蛋白酶K溶液和50 $\mu$ l 10 $\times$ 蛋白酶K缓冲液混匀，短暂离心确保所有溶液都在管底。在管中加入137.5 $\mu$ l TE以调整体积为500 $\mu$ l。将上述离心管放入56 $^{\circ}$ C酶解30分钟或适宜时间；加入500 $\mu$ l碘化钠溶液(含糖原及月桂酰肌氨酸钠)，混匀后短暂离心，置于40 $^{\circ}$ C水浴中孵育15分钟；每个离心管加DNA共沉淀染色剂混匀，再加入900 $\mu$ l异丙醇，再次混匀后，室温静置15分钟；13000g，离心30分钟后弃去上清后将离心管倒置在吸水纸上，使管壁的液体流尽，各管中分别加入800 $\mu$ l清洗液A，轻弹离心管底使沉淀从管壁上脱离，13000g，离心20分钟弃去上清，每管加入1500 $\mu$ l清洗液B，轻弹离心管底使沉淀从管壁上脱离，13000g，离心30分钟；弃上清，晾干。每管加入50 $\mu$ l TE缓冲液，轻弹离心管底，40 $^{\circ}$ C水浴静置5~10分钟以充分溶解DNA。

### (4)检测(定量PCR法)

配制PCR反应体系 引物和探针用TE缓冲液稀释至10 $\mu$ mol/L，吸取DNA标准品溶液和抽提后的DNA样品溶液，配制PCR反应体系。

每个25 $\mu$ l PCR反应体系所需的成分如下(不同的反应体系可适当调整)：

|                        |              |
|------------------------|--------------|
| PCR 反应预混液(2 $\times$ ) | 12.5 $\mu$ l |
| 正向引物(10 $\mu$ mol/L)   | 2.5 $\mu$ l  |
| 反向引物(10 $\mu$ mol/L)   | 2.5 $\mu$ l  |
| 探针*(10 $\mu$ mol/L)    | 2.5 $\mu$ l  |
| DNA 模板(标准品或供试品溶液)      | 5 $\mu$ l    |
| 合计                     | 25 $\mu$ l   |

注：\*对于大肠埃希菌和毕赤酵母，探针浓度使用5 $\mu$ mol/L。

配制不含DNA模板的PCR反应混合液。于96孔反应板中分别加入20 $\mu$ lPCR混合液，再移取无核酸酶水、DNA样品、稀释的DNA标准品各5 $\mu$ l至96孔反应板中，每个样品做3个复孔。另取无核酸酶水25ml，做3复孔为阴性对照。反应板覆盖光学盖膜后，离心去除气泡。将反应板放置在荧光定量PCR仪中运行反应，设定如下参数。

阶段1：95 $^{\circ}$ C，10分钟；阶段2：95 $^{\circ}$ C，15秒，60 $^{\circ}$ C，1分钟，重复40个循环；样品体积：25 $\mu$ l。

结果计算 取第3到15次循环的荧光强度均值加10倍标准差，或采用阴性对照荧光值的最高点作为荧光阈值。以至少5个连续标准品溶液浓度点生成标准曲线， $R^2$ 值应 $\geq$ 0.98，斜率应在-3.1至-3.8范围内；标准品溶液浓度最低点的Ct值，不得高于39。阴性对照组若有Ct值时，不得低于标准品溶液浓度最低点的Ct值；每组加标样品的回收率应在50%~150%之间，RSD $\leq$ 30%。适当情况下，可剔除第一个或者第六个点，以连续5个标准品溶液浓度点生成标准曲线，系统适用性仍应满足以上条件。以标准品溶液浓度的对数值对其相应的Ct值作直线回归，求得直线回归方程，供试品溶液的Ct值代入直线回归方程，求出供试品中DNA残留量。

注意事项 (1)当DNA残留量低于标准曲线最低浓度点时，应为限量测定。

(2)供试品首次应用本法测定时需要进行方法学验证，具体要求参照本通则第二法。

(3)引物及探针设计：建议针对具有种属特异性的高度重复序列进行设计。设计的引物及探针应经过验证，其灵敏度、特异性、重复性、精确性能够达到要求。

(4)PCR反应体系及反应条件可按照具体使用的仪器及试剂进行相应的调整，实验应在符合检测要求的洁净条件下进行，排除核酸和核酸酶的污染。