

CGE-LIF方法对重组蛋白类新冠疫苗中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析

Size analysis of residual host cell DNA in Recombinant protein vaccine by CGE-LIF

高铁, 王文涛, 陈泓序, 郭立海

Gao Tie, Wang Wentao, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词: PA800 Plus药物分析系统, 毛细管凝胶电泳, 重组蛋白疫苗, 宿主残留DNA分布

1. 引言

新冠疫情爆发以来, 已有多种类型的疫苗成功完成临床申报, 用于预防新冠病毒的感染, 包括灭活疫苗、腺病毒载体疫苗、重组蛋白疫苗、核酸疫苗等。其中重组蛋白疫苗是利用基因工程进行生产, 将编码抗原(如新冠病毒表面蛋白S)的DNA插入大肠杆菌/酵母菌、昆虫-杆状病毒、哺乳动物细胞等体系中进行表达, 然后将表达的抗原进行纯化制备成疫苗。在生产中, 宿主细胞残留DNA(Host Cell Residual DNA, HCD)是一种可能存在于最终的产品中的工艺相关杂质, 而HCD的含量与分布可能存在制瘤性和感染性等问题, 受到了行业及法规机构的关注。现有研究表明, HCD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。目前对于很多基于宿主细胞培养的生物制品, 都需要监控HCD的片段分布及含量, 如美国食品药品监督管理局(FDA)和中国国家药品监督管理局(NMPA)均在基因治疗新产品生产指导类型文件中明确指出HCD的片段要小于200 bp。而重组蛋白疫苗同样存在HCD残留的可能性, 因此需要评估终产品中HCD片段的大小分布情况。

本文以重组S蛋白疫苗为例, 提取产品中的核酸物质, 利用SCIEX PA800 Plus药物分析系统匹配激光诱导荧光检测器(LIF)(图1), 对宿主细胞残留DNA进行片段分布检测。



图1. PA800 Plus药物分析系统

2. 试剂及样品

2.1 试剂耗材

dsDNA 1000试剂盒自SCIEX(Brea, CA, USA), 试剂盒中包含DNA涂层毛细管(100 μm内径)和核酸分析使用的凝胶缓冲液; SYBR Gold 荧光染料、200 bp的marker购自Thermo Fisher(Carlsbad, CA, USA); 10× Tris Borate-EDTA(TBE)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 uL SYBR Gold染料混合均匀, 供CGE-LIF方法分析使用。

2.2 样品及前处理

重组S蛋白疫苗由某疫苗企业提供，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：

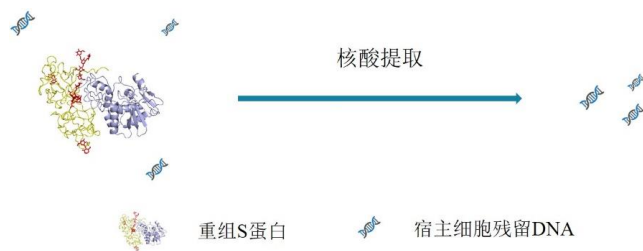


图2. 重组S蛋白疫苗HCD分布分析样品前处理流程

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 μL 供试品，加入蛋白酶 K 溶液，混匀后 55 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 异丙醇和 10 μL 磁珠，使游离 DNA 与磁珠充分结合，分离磁珠；加入各 700 μL 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 μL 预热洗脱液，混匀后 70 $^{\circ}\text{C}$ 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为 11 ng/ μL 。

3. 仪器及方法

PA800 Plus 药物分析系统，匹配激光诱导荧光检测器 (SCIEX)。

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：-7.8 kV，20 min；毛细管温度：20 $^{\circ}\text{C}$ ；样品室温度：10 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长：激发波长 488 nm，发射波长 520 nm。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。

4. 结果与分析

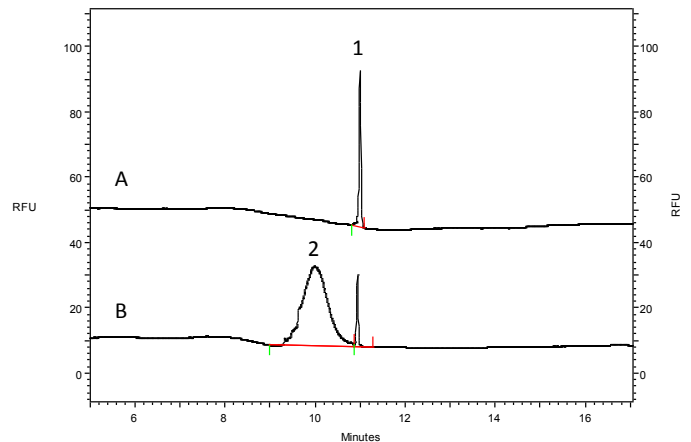


图3. CGE-LIF 法对重组S蛋白疫苗的HCD片段大小分析。

A: DNA marker 200 bp, B: 重组S蛋白样品核酸提取物与DNA marker混合物；峰1为200 bp DNA marker，峰2为HCD片段。

利用CGE-LIF方法，通过与marker的对比，可准确判定重组S蛋白疫苗的HCD的片段大小是否大于200 bp，从而确定样品是否符合合格。如图3为重组S蛋白疫苗中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均在在200 bp以下，并未发现含有长度大于200 bp的HCD片段。CGE-LIF方法可快速准确的判定重组S蛋白疫苗中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1，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)

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-02-15490-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](#)