

技术与方法

人 γ 型基因工程干扰素中残余 DNA 的检测

陈宇光

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

摘要 采用地高辛标记探针, 以核酸杂交法检测人 γ 型基因工程干扰素 (IFN- γ) 制品中残余 DNA 含量, 结果表明, 自制的二组 DNA 标准品相应量间显示的色斑相差悬殊, 提示高蛋白含量对痕量残余 DNA 的检测干扰较大, 添加 IFN- γ 的 DNA 标准品比纯 DNA 标准品更合理, 以此测得各样品均符合 WHO 要求 (<100 pg/剂量), 方法敏感性为 4 pg.

关键词 残余 DNA, 重组人 γ 干扰素, 地高辛标记探针

近年基因工程技术的发展已能大量生产多种医药产品满足人类健康需求, 但基因工程产品系由异源细胞所产生, 制品可能污染有宿主细胞成分. 为确保基因工程产品的安全性, WHO 和我国卫生部已制定相应规程^[1], 其中一项重要检定指标是残余细胞 DNA 的检测, 要求每人用剂量制品中残余 DNA 含量不得大于 100 pg. 本文采用目前较灵敏的非同位素固相核酸杂交法, 建立标准品并检测本所试制产品人 γ 型基因工程干扰素中的残余 DNA 含量.

1 材料和方法

1.1 材料

工程菌 *E. coli* DH5 α -pBV220/IFN- γ 由病毒所构建^[2], IFN- γ 半成品由本所生物工程中心提供. 硝酸纤维素滤膜为 Schleicher & Schuell 公司产品. Dig-11-dUTP 和 “DNA Labeling and Detection Kit, Nonradioactive” 试剂盒为 Boehringer 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 DNA 制备: 工程菌总 DNA 制备基本按文献 [3], 略有修改, 染色体 DNA 用玻棒绕出, 剩余溶液中提取质粒 DNA, 纯化后二者合

并. 重组质粒 pBV220/IFN- γ 制备按文献 [4], 紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度. DNA 电泳为 0.8% 琼脂糖, TBE 缓冲液.

1.2.2 标准品与样品的制备及处理: 工程菌总 DNA 经超声剪切和紫外定量后制作标准品. 一组标准品 (Std I) 用 TE 缓冲液系列稀释, 使每 150 μ l 溶液中各含 500、100、20、4、0.8、0 pg 的工程菌总 DNA 及 1 ng 鱼精 DNA; 另一组标准品 (Std II) 按上法制备, 但各浓度管每 150 μ l 溶液中另含 80 μ l (1×10^6 IU) 9202 批 IFN 半成品 (该批已经证明未见测有残余 DNA). 标准品与样品各加 1/2 体积 $20 \times$ SSC (3.0 mol/L 氯化钠, 0.3 mol/L 柠檬酸钠), 100°C 10 min, 冰浴后缓慢抽滤点样于硝酸纤维素滤膜. 点样量: 标准品 225 μ l/dot, 样品 1×10^6 IU/dot.

1.2.3 地高辛标记探针制备: 缺口翻译法 (nick translation) 标记工程菌总 DNA 作探针^[5], 参入标记物为 Dig-11-dUTP, DNase I 浓度 10 μ g/L. 杂交及检测按说明书, 探针浓度为 50 μ g/L.

1.2.4 结果判定: 肉眼比较样品与标准品色斑颜色深浅, 限量法表示结果.

2 结 果

2.1 工程菌总 DNA

人 γ 型基因工程干扰素制品中残余 DNA 源于宿主菌 *E. coli* DH5 α 和质粒 pBV220/IFN- γ , 因此制备的总 DNA 无论用作标记探针 DNA 还是用作标准品的靶 DNA, 均应含有这二组 DNA. 从图 1 可见, 制备的总 DNA 既含大分子量的宿主菌染色体 DNA 也含有重组质粒 DNA 条带, 由此表明制备的工程菌基因组是完整的, 也未见有 RNA 污染. A_{260}/A_{280} 比值在 1.65~1.85 间, 纯度符合要求. 用于制备标准品的总 DNA 经超声剪切, 分子大小约 300~1200 bp, 其中 600~800 bp 是优势区段.

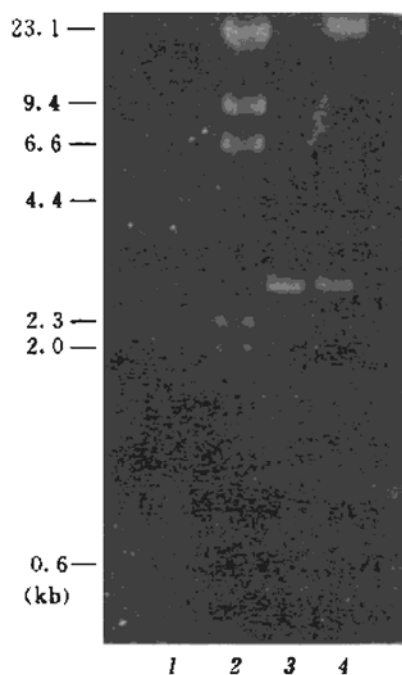


图 1 工程菌 *E. coli* DH5 α /pBV220/IFN 总 DNA

1: 超声切割后的工程菌总 DNA; 2: DNA 标准品; 3: 重组质粒 pBV220/IFN- γ DNA; 4: 工程菌总 DNA.

2.2 制品中残余 DNA

目前因无国家标准品, 故自制二套 DNA 含量标准品. 从图 2 可见, 仅含 DNA 的标准品 Std I 与既含 DNA 又含 1 支剂量干扰素的 StdII 这二组标准品, 经杂交显色后, 相应量的

色斑之间差异悬殊, 提示样品中大量的干扰素蛋白质对核酸杂交检测法影响较大. 鉴于 StdII 似为较严格的阳性对照, 以 StdII 作含量标准较为可取. StdII 标准品的最小检出量是 4 pg, 灵敏度符合本实验需要. 以此比色各样品斑点, 除 9205 批制品接近 20 pg 外, 其余 6 批制品均小于 4 pg, 我所 IFN- γ 的表达以包涵体形式, 菌体成分在纯化过程中较易去除, 制品中残余 DNA 含量较低是可预见的.

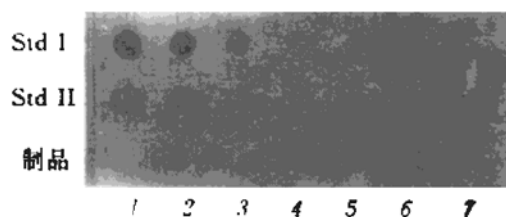


图 2 IFN- γ 制品中残余 DNA

Std I: DNA 标准品. 1~6 相应于 500、100、20、4、0.8、0 pg/dot, 7 为鱼精 DNA 1000 pg/dot. StdII: DNA 标准品. 1~7 相同于 Std I, 但每斑点另含 1 支剂量 IFN- γ (1×10^6 IU). 制品: 1~7 相应于 IFN- γ 制品 9104 批, 9108 批, 9204 批, 9205 批, 9206-1 批, 9206-2 批, 9206-3 批. 1×10^6 IU/dot.

3 讨 论

IFN- γ 制品中蛋白质含量高于残余 DNA 允许量 5~6 个数量级, 大量蛋白质的存在对超微量 DNA 的检出有相当大的干扰 (图 2), 可能是点样时蛋白质在硝酸纤维滤膜上与 DNA 竞争结合位点的结果. 如以纯 DNA 标准品 (Std I) 作标准参比样品, 残余 DNA 测得值可能小于实际值, 这也许是一些实验室所得结果偏低的原因之一^[6,7]. 为排除蛋白对杂交检测的干扰, 标准品 (StdII) 中除含纯 DNA 外另添加 1 支剂量未见有残余 DNA 的干扰素, 使标准品与样品除 DNA 外其余组分背景基本一致, 可能是校正误差的办法之一.

从蛋白质制品 (包括血清、疫苗、基因工程产品) 中检测痕量残余 DNA 是一项较困难

的工作, WHO 至今未提出一项可行的通用方法, 以致各实验室所得结果相差甚远. 本文表明 DNA 标准品的制备对结果的判定影响较大, 在残余 DNA 测定方面作了一定探索, 欲得准确可靠的结果, 还有待进一步的研究工作或技术的进步.

致谢 承蒙李育阳教授, 刘祖洞教授, 向建之教授, 丁锡申教授审阅, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 WHO Technical Report Series. Geneva: WHO, 1987; 771: 158
- 2 张智清, 侯云德, 李玉英等. 病毒学报, 1988; 4: 97
- 3 蔡良琬. 核酸研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987; 6
- 4 郭礼和. Methods in Enzymology, 1986; 100: 76
- 5 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; 109
- 6 向建之. 生物制品快讯, 1992; 19: 14
- 7 WHO Technical Report Series. Geneva: WHO, 1991; 814: 5

Detecting of Residual Cell DNA From Products of Recombinant Human Interferon γ .

Chen Yuguang (Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052, China).

Abstract Residual cell DNA (RC DNA) in the products of recombinant human interferon γ (IFN- γ) was detected by hybridization with digoxigenin-labeled total DNA of *E. coli* DH5 α -pBV220/IFN- γ as probes. The result showed a great disparity between two DNA standards in colour; thus indicating that high protein amount interfere seriously in the detection of trace RC DNA and that the DNA standard supplied with IFN- γ is more reasonable than the homogeneous one. The sensitivity of the method is 4 pg and RC DNA amount existed in each dose of all samples is less than 100 pg, which satisfied WHO requirements.

Key words residual cell DNA, recombinant human IFN- γ , digoxigenin-labeled DNA probe

从水稻细胞核中制备分子量达到 Mb 级的 DNA *

王春新 谢亦武 刘良式

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 用水稻黄化苗作实验材料, 经蔗糖不连续梯度纯化细胞核、琼脂糖包埋、蛋白酶消化释放 DNA, 脉冲交变电泳显示所得 DNA 样品分子量在 200 kb 至 3 Mb 之间, 其中大量集中在 2.2 Mb 处. 所得 DNA 容易被多种内切酶消化和连接, 可用于构建水稻 YAC 文库和大尺度物理图的研究.

关键词 水稻, Mb 级 DNA, 脉冲交变电泳

从植物细胞中分离几 Mb 的高分子量 DNA 存在一些困难: 破碎细胞壁的条件容易引起 DNA 的剪切, 植物细胞核内核酸酶活性高, 提取过程中难以完全抑制它的活性, 因而 DNA 往往断裂和降解^[1]. 许多研究者常利用原生质体来制备高分子量 DNA. 此法有几个缺点: 一

是不能避免其它细胞器 DNA 的污染; 二是使用的纤维素酶、果胶酶不仅价格昂贵, 而且大多数制品不纯, 须先作纯化处理才能使用^[2], 操

* 国家“863”计划 (863-101-01-03) 及美国洛克菲勒基金会 (1994-0001-0137) 资助.

收稿日期: 1994-07-26, 修回日期: 1994-12-19