

Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗宿主细胞 DNA 残留量检测方法研究

任玉莹 刘建凯 尹珊珊 徐颖之 邓海清 殷建齐 邢盛宇 张艳红 高宇皎
郝倩 刘杨

【摘要】 目的 建立 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 Vero 细胞 DNA 残留量的检测方法。方法 提取 Vero 细胞基因组 DNA, 制备地高辛标记探针。比较样品不同处理方式的检测差异。对建立的残留 DNA 检测方法进行特异性、灵敏度和稳定性验证。结果 Vero 细胞基因组 DNA 的质量浓度为 295 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 260 nm 与 280 nm 波长处的吸光度比值为 1.88。探针灵敏度达到 0.01 $\text{pg}/\mu\text{l}$ 。采用苯酚抽提方式处理 DNA 参考品, 检测灵敏度为 1 ng; 而用碘化钠处理 DNA 参考品, 灵敏度达到 10 pg。特异性检测表明, 探针与非同源 DNA 无杂交。灵敏度和稳定性检测结果显示, 探针于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 9 个月, 灵敏度仍为 10 pg。结论 建立了 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 Vero 细胞 DNA 残留量的检测方法。采用碘化钠提取 DNA, 回收率高, 操作简单, 适用于 Vero 细胞的残留 DNA 检测。

【关键词】 脊髓灰质炎病毒疫苗, 灭活; DNA 污染; Vero 细胞; 方法

Studies on a detection method of residual host cell DNA in Sabin strain inactivated poliovirus vaccine Ren Yuying, Liu Jiankai, Yin Shanshan, Xu Yingzhi, Deng Haiqing, Yin Jianqi, Xing Shengyu, Zhang Yanhong, Gao Yujiao, Hao Qian, Liu Yang. Center of Research and Development, Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102600, China

Corresponding author: Liu Jiankai, Email: liujiankai@sina.com

【Abstract】 Objective To establish a method of detecting residual Vero cell DNA in Sabin strain inactivated poliovirus vaccines. **Methods** The genomic DNA of Vero cell was extracted. Digoxigenin labeled probe was prepared. The detection results of samples treated with two different methods were compared. The specificity, sensitivity and stability of the established method were verified. **Results** The concentration of Vero cell DNA was 295 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm was 1.88. Probe sensitivity was 0.01 $\text{pg}/\mu\text{l}$. The sensitivity of the method was 1 ng when DNA reference was treated with phenol, and reached 10 pg when the reference was treated with sodium iodide. No hybridization between the probe and non-homologous DNAs was observed. The sensitivity remained 10 pg 9 months after the probe was conserved at $-70\text{ }^\circ\text{C}$. **Conclusions** The detection method of residual Vero cell DNA in Sabin strain inactivated poliovirus vaccines is developed. Sodium iodide has advantages of both high recovery and easy operation for DNA extraction. It is suitable for residual Vero cell DNA detection.

【Key words】 Poliovirus vaccine, inactivated; DNA contamination; Vero cells; Methods

目前有 4 个国家研发的 Sabin 株脊髓灰质炎(脊灰)灭活疫苗已完成或进入临床试验, 且均显示良好的安全性和免疫原性^[1]。我国脊灰灭活疫苗采

用 Vero 细胞系制备。Vero 细胞是传代细胞。理论上, 传代细胞系的 DNA 有可能使其他细胞生长失控或产生致瘤性, 因此需对其残留量进行控制^[2]。研究表明, 170 代以上 Vero 细胞的致瘤性试验阳性, 而 134~150 代细胞未发现致瘤性^[2]。我国药典(2015 年版)规定, 无论采用何种方式抽提, Vero 细胞 DNA 参考品至少应能达到 10 pg 的检测限^[3]。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4211.2017.03.004

作者单位: 102600 北京民海生物科技有限公司研发中心

通信作者: 刘建凯, Email: liujiankai@sina.com

本实验中,我们尝试建立 Sabin 株脊灰疫苗宿主 DNA 的检测方法,并改进样品的处理方式,以提高检测灵敏度。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Vero 细胞 DNA 定量国家参考品(20 ng)购自中国食品药品检定研究院,地高辛标记和检测试剂盒购自瑞士 Roche 公司,带正电荷尼龙膜购自美国 GE Healthcare 公司,细胞基因组 DNA 提取试剂盒和 Hae III 内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司,蛋白酶 K 和鱼精蛋白 DNA 购自美国 Amresco 公司,DNA Extractor Kit 购自日本和光纯药工业株式会社。

1.2 主要仪器

紫外分光光度计购自岛津国际贸易(上海)有限公司,全温摇瓶柜购自太仓实验设备厂,电热恒温水浴锅购自北京长风仪器仪表公司,电热鼓风干燥箱购自重庆万达仪器有限公司,离心机购自美国 Thermo 公司,循环水式多用真空泵购自上海知信实验仪器技术有限公司,电子天平购自瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.3 点杂交法检测

1.3.1 Vero 细胞基因组 DNA 的制备 取培养 3 d 左右生长良好的 Vero 细胞,胰蛋白酶消化、PBS 充分洗涤,重悬,计数细胞。将含 10^7 细胞的混悬液加入离心管,离心收集细胞沉淀。按试剂盒操作说明书提取 Vero 细胞基因组 DNA,将其溶于 TE 缓冲液,经 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法测定 DNA 的纯度和质量浓度,分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 探针的制备 取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 基因组 DNA,用 Hae III 酶切。将酶切后的 DNA 用去离子水补至 $16\text{ }\mu\text{l}$,置 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min,然后迅速冰浴冷却, $10\text{ }000\times g$ 离心 5 s;加入试剂盒提供的随机引物 $4\text{ }\mu\text{l}$,混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入乙二胺四乙酸二钠终止反应,用冷无水乙醇 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 自然沉淀数小时,弃上清。将沉淀复溶,分装后置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.3 探针标记效率的测定 将试剂盒自带的地高辛对照 DNA 与地高辛标记探针分别稀释至 $1\text{ ng}/\mu\text{l}$,再依次稀释至 10.00、3.00、1.00、0.30、0.10、0.03、0.01、0.00 $\text{pg}/\mu\text{l}$ 。取 $1\text{ }\mu\text{l}$ 稀释后样品依次点于尼龙膜, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤 30 min 固定。用适量马来酸冲洗,加入阻断液封闭 30 min。再加 10 ml 抗地高辛碱性磷酸酶结合物,室温结合 30 min。洗

涤,加入 2% NBT/BCIP 储存液显色。比较两者显色深浅,确定标记探针的浓度。

1.3.4 样品的处理

1.3.4.1 苯酚抽提法 将复溶的 Vero 细胞 DNA 参考品、阴性对照(鱼精蛋白 DNA 稀释液)、样品(澄清液、超滤浓缩液、分子筛工艺样品、离子交换工艺样品、成品)各 $500\text{ }\mu\text{l}$,按 1:10 比例加入蛋白酶缓冲液,再加入 $4\text{ }\mu\text{l}$ 2% 蛋白酶 K, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预处理 6 h。然后加入 Tris 饱和酚溶液 $600\text{ }\mu\text{l}$,剧烈振摇混合 15~30 s, $15\text{ }000\times g$ 离心 10 min。小心移取上层液体至干净离心管中,加入 3 mol/L 醋酸钠溶液 $60\text{ }\mu\text{l}$,充分混合,再加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷异丙醇 $600\text{ }\mu\text{l}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日, $10\text{ }000\times g$ 低温离心 15 min,弃上清液,加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇 $500\text{ }\mu\text{l}$ 洗涤沉淀; $10\text{ }000\times g$ 低温离心 15 min,弃上清液,室温通风干燥后加 $200\text{ }\mu\text{l}$ TE 缓冲液溶解。DNA 参考品依次稀释成 10 000、1 000、100、50、10 和 1 $\text{pg}/200\text{ }\mu\text{l}$ 备用。

1.3.4.2 碘化钠抽提法 取 Vero 细胞 DNA 参考品、阴性对照(TE 缓冲液)和待检样品各 $500\text{ }\mu\text{l}$,加入 2 ml 离心管中。按试剂盒方法,每管加入 N-月桂酰肌氨酸钠试剂 $20\text{ }\mu\text{l}$,混匀。再加入碘化钠(含糖)试剂 $500\text{ }\mu\text{l}$,涡旋混匀, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。加入异丙醇 $900\text{ }\mu\text{l}$,振荡混匀,室温作用 15 min。将离心管 $10\text{ }000\times g$ 离心 15 min,可见白色沉淀,弃上清,尽量使管内无液体。向管内加入洗涤液 A,剧烈振荡使沉淀脱离管底, $10\text{ }000\times g$ 离心 15 min,弃上清。向管内加入洗涤液 B(含糖),洗涤,离心后弃上清。离心管自然干燥后,用适量 TE 缓冲液复溶备用。DNA 参考品依次稀释成 10 000、1 000、100、50、10 和 1 $\text{pg}/200\text{ }\mu\text{l}$ 备用。

1.3.4.3 苯酚抽提法的样品适宜含量摸索 将 Vero 细胞基因组 DNA 稀释至 $2\text{ ng}/\mu\text{l}$,取 $500\text{ }\mu\text{l}$,苯酚预处理后作为样品 1。Vero 细胞 DNA 参考品(复溶 $500\text{ }\mu\text{l}$)经碘化钠预处理后作为样品 2。复溶后的两样品分别稀释成 10 000、1 000、100、50、10 和 1 $\text{pg}/200\text{ }\mu\text{l}$ 备用。

1.3.5 固定及显色 将已处理的 DNA 参考品、阴性对照和待检样品置沸水浴 10 min,而后立即冰浴冷却, $10\text{ }000\times g$ 离心 5 s。用抽滤加样器点于尼龙膜, $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤固定 30 min, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。加入抗地高辛碱性磷酸酶结合物结合,2% NBT/BCIP 储存液避光显色。实验成立条件:阳性对照显色,阴

色深浅与 DNA 含量相对应,呈一定颜色梯度;阴性、空白对照不显色或颜色浅于 1 pg 阳性对照。实验结果判定:将样品与阳性对照进行比较,根据显色的深浅判定样品中外源性 DNA 的含量。

1.4 方法验证

1.4.1 特异性 将地高辛标记的探针分别与鱼精蛋白 DNA、汉逊酵母 DNA、大肠埃希菌 DH5 α 菌株 DNA 杂交,检测地高辛标记探针的特异性。

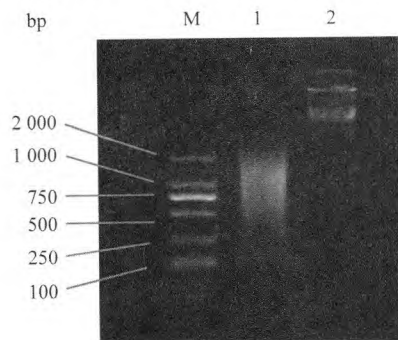
1.4.2 灵敏度 将 Vero 细胞 DNA 国家参考品按 1.3.4.2 方法进行预处理后,稀释至 10 000、1 000、100、50、10、1 pg/200 μ l,显色后观察检测灵敏度。

1.4.3 稳定性 将地高辛标记的探针制备后分装,-70 $^{\circ}$ C 保存,随用随取。对 Sabin 株疫苗检测的同时,纵向比对不同时期检测的灵敏度变化。

2 结果

2.1 Vero 细胞基因组 DNA

取 1 μ l 基因组 DNA 及酶切后 DNA 进行电泳检测,结果见图 1。基因组 DNA 纯度较高,无 RNA 污染;DNA 质量浓度(μ g/ml)按下式计算:260 nm 处的吸光度(A) \times 稀释倍数 \times 50(当 $A_{260\text{ nm}} = 1$ 时,双链 DNA 的质量浓度约为 50 μ g/ml)。将样品稀释 10 倍后检测, $A_{260\text{ nm}}$ 为 0.59,DNA 质量浓度为 295 μ g/ml。 $A_{260\text{ nm}}$ 与 $A_{280\text{ nm}}$ 的比值为 1.88,在 DNA 纯度要求范围(1.8~2.0)内。酶切后的 DNA 片段集中于 200~2 000 bp,符合探针制备范围(100~10 000 bp)。



注: M; Marker; 1: 酶切后 DNA; 2: 基因组 DNA

图 1 Vero 细胞基因组 DNA 及酶切后 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

2.2 探针标记效率

将地高辛对照 DNA(作为标准)和自制地高辛探针分别稀释后干烤固定,显色后如图 2 所示。自制探针的灵敏度达到 0.01 pg/ μ l,符合实验对探针

的灵敏度要求,可进行下一步杂交检测。

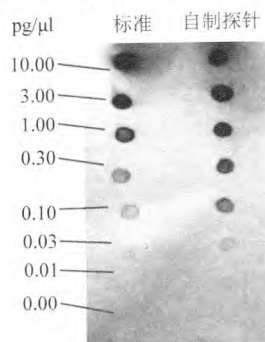
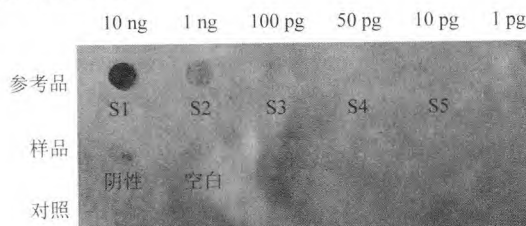


图 2 自制探针标记效率的检测结果

2.3 样品不同处理方式的检测结果比较

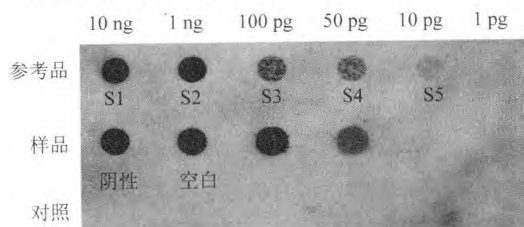
2.3.1 苯酚抽提 DNA 参考品经苯酚处理后,DNA 损失较多,各检测点显色浅,检测灵敏度为 1 ng(见图 3)。



注: S1:澄清液; S2:超滤浓缩液; S3:分子筛工艺样品; S4:离子交换工艺样品; S5:成品

图 3 苯酚抽提法处理样品的检测结果

2.3.2 碘化钠抽提 采用碘化钠处理样品,检测灵敏度可达 10 pg(见图 4),符合我国药典对分子杂交法检测 DNA 残留量的灵敏度要求。中间样品(S1—S4)检测无试剂干扰,成品 S5 < 50 pg,符合 Sabin 株疫苗的制备要求。



注: S1:澄清液; S2:超滤浓缩液; S3:分子筛工艺样品; S4:离子交换工艺样品; S5:成品

图 4 碘化钠抽提法处理样品的检测结果

2.3.3 苯酚抽提法的样品适宜含量 将苯酚预处理样品的初始含量提高至 1 μ g,对比碘化钠处理的 DNA 参考品,检测灵敏度均达到 10 pg,肉眼观察无差别(见图 5)。由此可知,当样品 DNA 含量较高(不低于 1 μ g)时,抽提损失忽略不计,可选择苯酚

抽提法处理 DNA 样品。

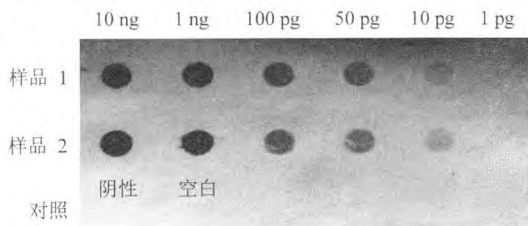
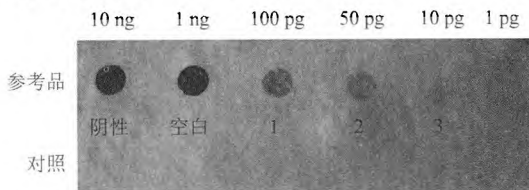


图 5 苯酚抽提法的样品适宜含量

2.4 方法验证

2.4.1 特异性 将地高辛标记的探针分别与鱼精蛋白 DNA、汉逊酵母 DNA、大肠埃希菌 DH5 α DNA 杂交,结果均为阴性,见图 6。表明地高辛标记探针与非同源 DNA 无杂交,具有良好的特异性。



注:1:鱼精蛋白 DNA; 2:汉逊酵母 DNA; 3:大肠埃希菌 DH5 α DNA

图 6 残留 DNA 检测方法的特异性验证

2.4.2 灵敏度和稳定性 地高辛标记探针于效率检测后置 -70 $^{\circ}$ C 保存。不同时期的检测结果见图 7。探针放置 9 个月后灵敏度无变化,仍为 10 pg。DNA 参考品显色由深至浅,显色梯度良好,颜色深度与 DNA 含量成正比,无背景色。

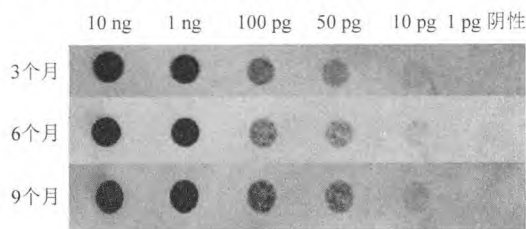


图 7 残留 DNA 检测方法的灵敏度和稳定性验证

3 讨论

宿主残留 DNA 的检测方法有分子杂交半定量法(即点杂交法)、荧光染料法、阈值法和实时定量 PCR 法。每种检测方法各有其优缺点。阈值法在准确性上优于杂交法,但由于其操作条件难以优化(样品依赖),且处理量小、仪器昂贵、使用成本高,因此未被广泛接受^[4]。实时定量 PCR 法在特异性、灵敏性和准确性方面具有独特优势,目前各国对此法

都进行了大量研究,但实验室间引物探针的设计有所不同,没有统一的标准物质和验证接受标准^[4-5]。荧光染料法可根据供试品的荧光强度计算 DNA 残留量, DNA 在 1.25~80.00 ng/ml^[4] 范围内可进行纳克级含量检测,缺点是该法易受蛋白浓度、离子强度等因素干扰^[6];并且,由于其原理为荧光染料与所有的 DNA 双链结合,因而对核酸类制品的检测存在一定局限性^[7]。

点杂交法中地高辛标记法最为常用,操作相对简单,灵敏度可达 10 pg,干扰因素少,可进行成品、半成品及中间品检测。样品处理对此法的灵敏度影响很大。实验发现,传统的苯酚抽提法虽能去除蛋白干扰,但样品回收率较低,初始 DNA 含量低时很可能检测不到。本实验对 Vero 细胞 DNA 参考品采用不同方式进行前处理。因标准品含量低,仅为 20 ng/支,经苯酚抽提后,检测灵敏度仅为 1 ng;而参考品经碘化钠处理,灵敏度可达 10 pg,符合我国药典要求。另外,苯酚的残留也会影响探针的结合,使其灵敏度降低,因此用该法处理样品有一定的弊端。

本次实验还摸索出苯酚抽提法合适的样品初始含量。当 DNA 达到 1 μ g 时进行抽提,操作损失可忽略不计。因此,对于选择苯酚抽提法处理样品的检测,需注意样品 DNA 的含量不低于 1 μ g,以避免误差过大。碘化钠法与传统的苯酚抽提法相比,不仅克服了蛋白酶 K 长时间消化的问题,还可避免有机溶剂苯酚、氯仿的反复抽提,并消除了环境污染的隐患^[8]。用碘化钾代替碘化钠亦有同样的效果^[9]。为提高检测灵敏度,我们参考李加等^[10]和黄相红等^[11]的实验,在探针片段大小(200~2 000 bp)、探针标记时间(>16 h)、探针纯化(无水乙醇沉淀)等方面进行了优化,并取得良好效果,探针灵敏度达到 0.01 pg/ μ l,远高于实验要求的 0.1 pg/ μ l。

综上所述,本研究建立了 Sabin 株脊髓灰质炎活疫苗宿主 DNA 残留量的检测方法,提出了更合理的样品处理方式,并优化了探针制备方法,提高了 DNA 残留量检测的准确性。

参考文献

- [1] 任芳芳,董少忠. Sabin 株脊髓灰质炎活疫苗研究进展 [J]. 浙江预防医学, 2015, 27(11): 1119-1122.
- [2] WHO Expert Committee on Biological Standardization [J]. World Health Organ Tech Rep Ser, 1998(878): i-vi, 1-101.

(下转第 138 页)

- [20] Vanwolleghem T, Libbrecht L, Hansen BE, et al. Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(3): 468-476. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.03.024.
- [21] Ding Q, von Schaeuwen M, Hrebikova G, et al. Mice expressing minimally humanized *CD81* and *occludin* genes support hepatitis C virus uptake *in vivo* [J]. *J Virol*, 2017, 91(4): e01799-16. DOI: 10.1128/JVI.01799-16.
- [22] Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus [J]. *Antiviral Res*, 2014, 105: 100-111. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.02.013.
- [23] Vieyres G, Dubuisson J, Patel AH. Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92 Pt 3: 494-506. DOI: 10.1099/vir.0.028092-0.
- [24] Frey SE, Houghton M, Coates S, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults [J]. *Vaccine*, 2010, 28(38): 6367-6373. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.084.
- [25] Law JL, Chen C, Wong J, et al. A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59776. DOI: 10.1371/journal.pone.0059776.
- [26] Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F. GI-5005, a yeast vector vaccine expressing an NS3-core fusion protein for chronic HCV infection [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(4): 456-462.
- [27] Pockros PJ, Jacobson IM, Boyer TD. GI-5005 therapeutic vaccine plus pegIFN/ribavirin improves sustained virologic response versus pegIFN/ribavirin in prior non-responders with genotype 1 chronic HCV infection [J]. *Hepatology*, 2010, 52 Suppl 1: 107A.
- [28] Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41 [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(5): 1385-1395. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.058.
- [29] Wedemeyer H, Schuller E, Schlaphoff V, et al. Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C [J]. *Vaccine*, 2009, 27(37): 5142-5151. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.027.
- [30] Klade CS, Schuller E, Boehm T, et al. Sustained viral load reduction in treatment-naive HCV genotype 1 infected patients after therapeutic peptide vaccination [J]. *Vaccine*, 2012, 30(19): 2943-2950. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.02.070.
- [31] Liang TJ. Current progress in development of hepatitis C virus vaccines [J]. *Nat Med*, 2013, 19(7): 869-878. DOI: 10.1038/nm.3183.
- [32] Ghasemi F, Rostami S, Meshkat Z. Progress in the development of vaccines for hepatitis C virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(42): 11984-12002. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.11984.
- [33] Pierce BG, Keck ZY, Fong SK. Viral evasion and challenges of hepatitis C virus vaccine development [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 20: 55-63. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.09.004.
- [34] Di Bisceglie AM, Janczewska-Kazek E, Habersetzer F, et al. Efficacy of immunotherapy with TG4040, peg-interferon, and ribavirin in a phase 2 study of patients with chronic HCV infection [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(1): 119-131. e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.03.007.
- [35] Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2012, 22(4): 391-415. DOI: 10.1517/13543776.2012.673589.

(收稿日期:2017-03-09)

(上接第 124 页)

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 250-252.
- [4] 王兰, 王军志. 关于生物制品残余 DNA 质量控制问题 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(8): 678-683, 687.
- [5] Gijsbers L, Koel B, Weggeman M, et al. Quantification of residual host cell DNA in adenoviral vectors produced on PER. C6 cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(3): 393-398. DOI: 10.1089/hum.2005.16.393.
- [6] 邱少辉, 方鑫, 赵冉, 等. 荧光染色法测定重组酵母乙型肝炎疫苗原液中残留 DNA 的影响因素分析 [J]. *中国药物评价*, 2014, 31(5): 257-261.
- [7] 牛冬云, 连炜, 何静, 等. 康柏西普制品中 CHO 细胞 DNA 残留量的检测 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(7): 1023-1026. DOI: 10.13200/j.cjb.2013.07.132.niudy.036.
- [8] Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3(9): 2303-2308.
- [9] 赵书平, 张俊洁, 尤建, 等. 一种碘化钾提取外周血基因组 DNA 的方法 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 6(16): 395-396. DOI: 10.3760/j.issn:1003-9406.1999.06.015.
- [10] 李加, 唐建蓉, 刘景华, 等. 斑点杂交法测定 Vero 细胞 DNA 残留量的探针选择 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(11): 1892-1895. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2008.11.033.
- [11] 黄相红, 胡立德, 梁文璐, 等. 地高辛标记探针检测重组人 p43 蛋白宿主 DNA 残留量的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(2): 356-359. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2011.02.050.

(收稿日期:2016-12-09)