

PCR 鉴定骨肽类制剂中动物源性成分

李松播^{1,2}, 王自强², 邵泓², 陈钢^{2*} (1.中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2.上海市食品药品检验所, 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203)

摘要: 目的 基于分子鉴定技术建立适用于骨肽类制剂的种属鉴定方法, 并对部分国内骨肽类制剂生产企业所使用的骨骼原材料的种属来源进行鉴定。方法 以骨肽生产过程中的热压提取中间体作为供试品, 采用优化的 CTAB 法提取核酸, 通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳进行动物源性成分鉴定。结果 采用成功建立的适用于骨骼热压提取中间体的鉴定方法对 9 家企业的样品进行检测, 均只检出猪源性成分, 未检出牛或羊源性成分。结论 9 家企业均使用猪骨作为骨肽类制剂的原材料, 符合相关药品标准规定。

关键词: 骨肽; 生化药物; 种属鉴定; 聚合酶链式反应

中图分类号: R927.11 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)10-1203-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.10.009

引用本文: 李松播, 王自强, 邵泓, 等. PCR 鉴定骨肽类制剂中动物源性成分[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1203-1207.

Identification of Animal-derived Components in Ossotide Preparations by PCR

LI Songbo^{1,2}, WANG Ziqiang², SHAO Hong², CHEN Gang^{2*} (1.China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2.Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method based on molecular biology technology to identify animal-derived components in ossotide preparations, and the species of bone raw materials used by some domestic ossotide preparations enterprises were identified. **METHODS** The intermediate in the process of ossotide preparations was taken as the sample, and nucleic acid was extracted by optimized CTAB method. The animal-derived components were identified by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. **RESULTS** The samples from 9 enterprises were identified by the method successfully established for ossotide extraction intermediate, and only pig source components were detected, no cattle or sheep source components were detected in all samples. **CONCLUSION** All the 9 enterprises use pig bone as raw material for ossotide preparations, which is in line with relevant pharmaceutical standards.

KEYWORDS: ossotide; biochemical pharmaceuticals; species identification; polymerase chain reaction

骨肽类制剂是一类以动物骨骼为主要原料, 经提取制成的富含多肽、氨基酸、钙、磷、无机盐等有效成分的传统生化药, 可单方成药也可与全蝎、甜瓜子配伍制成复方制剂。临床上用于促进骨折愈合及治疗风湿、类风湿性关节炎等骨科疾病^[1]。现行的国家标准中规定骨肽注射液、复方骨肽注射液可使用猪或胎牛的四肢骨进行提取, 而骨瓜提取物注射液只能使用猪的四肢骨作为原料, 鹿瓜多肽注射液只能以鹿科动物梅花鹿的四肢骨作为原料。

自 2017 年新版药品生产质量管理规范《生化药品附录》实行以来, 有关生化制药所用动物原材料的种属来源问题备受关注。从不同动物来源的组织中提取的药品, 其主要成分的含量不尽相

同, 具体药效和不良反应也存在一定差异。而且, 明确制药所用原材料的动物来源或鉴别原材料是否存在其他动物源成分污染也对防止动物源传染性疾病的传播具有重要意义^[2]。分子生物学方法不同于传统的形态学鉴别方法或免疫学方法, 它是以样品的遗传物质 DNA 作为目标检测物, 因此对于经过高温、高压等前处理的样品也可适用, 并且具有良好的特异性和灵敏度。本实验室应用相关方法对肝素钠注射液^[3]、注射用糜蛋白酶^[4]、注射用玻璃酸酶^[5]等常见生化药品进行了种属鉴别研究, 曾在标注为羊源性的玻璃酸酶供试品中同时检测出牛、羊 2 种动物源成分, 也证实了生化制药用动物原材料确实存在被污染的可能性。因

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(16DZ0500203)

作者简介: 李松播, 女, 硕士生 Tel: 13022520815 E-mail: happyjbtm@163.com *通信作者: 陈钢, 男, 主任药师 Tel: (021)50798175 E-mail: chengang@smda.gov.cn

此, 为了解国内骨肽类制剂生产企业所使用的骨骼原材料的种属来源是否符合规定, 收集 9 家企业(不包含鹿瓜多肽注射液生产企业)生产的骨肽类制剂各环节中间体, 最终确定以热压提取中间体作为供试品, 采用聚合酶链式反应法(PCR)对其中含有的动物源性成分进行鉴定。

1 材料

1.1 仪器

Veriti 96 孔热循环仪(美国 Applied Biosystems); 紫外凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司); Bio-Rad 电源及电泳仪(美国 Bio-Rad); Epoch 超微量核酸测定仪(美国 BioTek)

1.2 药品与试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 美国 Sigma 公司, 批号: BCBV4362); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 批号: 20170731)、乙二胺四乙酸二钠二水合物(EDTA·2Na·2H₂O, 批号: 20150320)均购自上海凌峰化学试剂有限公司; CTAB 裂解液: 1% CTAB, 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0), 0.7 mol·L⁻¹ NaCl, 0.01 mol·L⁻¹ EDTA(pH 8.0); CTAB 沉淀液: CTAB 5 g·L⁻¹, NaCl 0.04 mol·L⁻¹, 调节 pH 至 8.0, 高压灭菌后使用; 蛋白酶 K(20 mg·mL⁻¹, 北京天根生物, 批号: R6830); Premix Taq(Ex Taq Version 2.0 plus dye, 批号: AI60204A)、DNA Marker DL500(批号: A801D)均购自 TakaRa 公司; 10 000×Gel Red(碧云天生物技术有限公司, 批号: D0139); 其他试剂均为分析纯。

阳性对照: 猪肉、羊肉、牛肉(上海市食品药品检验所生化药品生物制品室保存); 骨肽热压提取中间体溶液(分别来自黑龙江珍宝岛药业股份有限公司、常州方圆制药有限公司、哈尔滨三联药业股份有限公司、哈尔滨圣泰生物制药有限公司、河北智同生物制药有限公司、湖北威仕生物药业股份有限公司、通化惠康生物制药有限公司、江西康缘桔都药业有限公司以及南京新百药业有限公司), 具体信息见表 1。

1.3 引物的设计和合成

引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 碱基序列见表 2。同一物种的上、下游引物分别用水稀释至 5 μmol·L⁻¹, 等体积混合, 即为猪、牛、羊源性成分鉴别引物混合液。

2 方法

2.1 对照品与样品 DNA 的提取及测定

取供试品约 0.5 mL 至 2 mL 离心管中, 加无

表 1 骨肽样品详细信息

Tab. 1 Detailed information of the ossotide samples

样品编号	企业	样品名称(企业命名)	批号
1	A	骨肽溶液(煎煮液)	18190102
2	A	骨肽溶液(煎煮液)	18190103
3	A	骨肽溶液(煎煮液)	18190104
4	B	高温高压提取液	20180601s
5	B	高温高压提取液	20180602s
6	B	高温高压提取液	20180603s
7	C	骨肽溶液中间体(热压后)	/
8	D	猪四肢骨提取液(注射用)	DGG-A-4-3-P1
9	D	猪四肢骨提取液(注射用)	DGG-A-4-3-P2
10	D	猪四肢骨提取液(注射用)	DGG-A-4-3-P3
11	E	脱脂提取液	180605
12	E	脱脂提取液	180701
13	E	脱脂提取液	180702
14	F	骨肽提取浓缩液	20181101
15	F	骨肽提取浓缩液	20181102
16	F	骨肽提取浓缩液	20181103
17	G	高压液	20181202
18	H	骨肽提取液(煎煮)	1805161
19	J	骨肽提取液去脂后样品	1901002

表 2 猪、牛、羊源性成分鉴别引物碱基序列

Tab. 2 Nucleotide sequence of primers for identification of pig, cattle and sheep origin components

引物名称	引物碱基序列
猪源性成分上游引物	5'-GCC TAA ATC TCC CCT CAA TGG TA-3'
猪源性成分下游引物	5'-ATG AAA GAG GCA AAT AGA TTT TCG-3'
牛源性成分上游引物	5'-GCC ATA TAC TCT CCT TGG TGA CA-3'
牛源性成分下游引物	5'-GTA GGC TTG GGA ATA GTA CGA-3'
羊源性成分上游引物	5'-TAT TAG GCC TCC CCC TTG TT-3'
羊源性成分下游引物	5'-CCC TGC TCA TAA GGG AAT AGC C-3'

水乙醇 1 mL, 充分混合均匀, -20 ℃放置 60 min; 4 ℃下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃去上清液; 加入 CTAB 裂解液 1 mL 和蛋白酶 K 溶液 50 μL, 56 ℃水浴加热 60 min, 期间振荡混匀 3~5 次, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上清液 1 mL 转移至另一 2 mL 离心管中, 加三氯甲烷 700 μL, 涡旋振荡 30 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 取上清液 650 μL 转移至另一 2 mL 离心管中, 加入 CTAB 沉淀液 1.3 mL, 室温放置 60 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 弃去上清液, 沉淀物中加入 1.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶液 350 μL 使溶解, 再加三氯甲烷 350 μL, 涡旋振荡 30 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 取上清液转移至另一 2 mL 离心管中, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 室温放置 20 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 弃去上清液, 沉淀物中加入 70%乙醇

500 μL , 涡旋振荡 30 s, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃去上清液, 沉淀物 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 5~10 min, 加灭菌水 50 μL 使溶解, 即为样品 DNA 提取液。另取猪肉、牛肉和羊肉样品, 剪碎后取适量同法提取, 制成阳性对照 DNA 提取液。取相同体积的水代替样品, 同法制成空白对照 DNA 提取液。采用 Epoch 超微量核酸测定仪对样品及阳性对照 DNA 提取液的浓度及纯度进行测定。

2.2 PCR 反应体系及电泳条件的建立

以 Premix Taq(Ex Taq)反应预混液 12.5 μL , 鉴别引物混合液 1 μL , 模板 DNA 5 μL , 加无菌水补足反应体系至 25 μL 构建 PCR 反应体系。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环。PCR 扩增结束后, 配制 3% 琼脂糖凝胶, 取扩增产物进行电泳, 电泳条件为 80 V, 50 min。实验结束后在紫外凝胶成像仪中观察电泳条带。

2.3 方法学验证

2.3.1 特异性验证 取“2.1”项下提取的猪、牛、羊阳性对照 DNA 提取液, 用无菌水将其稀释至 0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 分别采用猪鉴别引物、牛鉴别引物和羊鉴别引物对 3 种动物 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增结束后取扩增产物进行电泳。PCR 及电泳方法同“2.2”项下。

2.3.2 模板 DNA 浓度对方法的影响 取“2.1”项下提取的猪、牛、羊阳性对照 DNA 提取液, 用无菌水将其稀释至 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 然后进行 10 倍梯度稀释至最低浓度为 1 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。然后分别用猪、牛、羊鉴别引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增结束后取扩增产物进行电泳。PCR 及电泳方法同“2.2”项下。

2.3.3 方法检测限验证 以 0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的猪源、牛源、羊源 DNA 为基础, 配制含有 3 种动物源成分的 DNA 混合液, 其中, 猪源性成分分别占比 (w/w) 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0%。以 0.5 ng 为 PCR 扩增时模板 DNA 总质量, 采用猪鉴别引物对上述 DNA 混合液进行 PCR 扩增, PCR 扩增结束后取扩增产物进行电泳。PCR 及电泳方法同“2.2”项下。同样地, 对牛源性成分和羊源性成分的检测限进行验证。

2.4 骨肽样品动物源性成分鉴别

将骨肽样品的 DNA 提取液稀释至 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 作为模板 DNA, 若骨肽样品的 DNA 提取液浓度 < 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 则直接以 DNA 提取液作

为模板 DNA, 分别用猪、牛、羊鉴别引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增结束后取扩增产物进行电泳。PCR 及电泳方法同“2.2”项下。

2.5 DNA 电泳条带灰度分析

采用 Image J 软件对电泳图中的 DNA 条带进行灰度分析, 然后利用 GraphPad Prism 5 软件绘制柱状图。

3 结果

3.1 骨肽样品 DNA 提取液的测定结果

样品 DNA 提取液的浓度及纯度测定结果见表 3, 表中未列出的样品其测定结果低于仪器检测限。

表 3 骨肽样品 DNA 提取液浓度及纯度测定结果

Tab. 3 Results of DNA purity and concentration determination of ossotide samples

样品编号	A_{260}/A_{280}	浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
1	1.86	71.06
2	1.84	77.72
3	1.87	262.15
8	1.88	248.57
9	1.89	388.68
10	1.87	522.17
17	1.85	26.13
19	2.07	2.98

3.2 方法特异性验证结果

电泳结果表明本方法特异性良好。利用猪鉴别引物进行 PCR 扩增时, 只有猪肉 DNA 在 212 bp 处产生目的条带, 利用牛鉴别引物进行 PCR 扩增时, 只有牛肉 DNA 在 271 bp 处产生目的条带, 利用羊鉴别引物进行 PCR 扩增时, 只有羊肉 DNA 在 293 bp 处产生目的条带。结果见图 1。

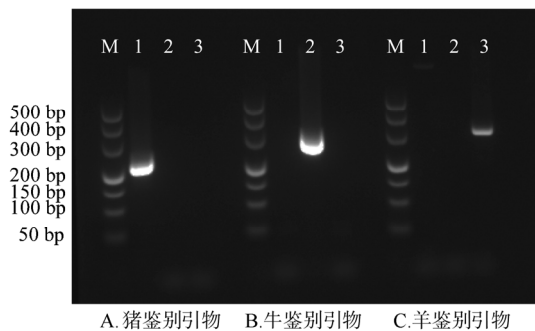


图 1 方法特异性验证电泳图

M—marker(DL500); 1—猪肉 DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 2—牛肉 DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 3—羊肉 DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。

Fig. 1 Electrophoretogram of specificity by PCR

M—marker(DL500); 1—pig DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 2—cattle DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); 3—sheep DNA(0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

3.3 模板 DNA 浓度对方法的影响

电泳结果表明, $\geq 0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的猪源、牛源、羊源 DNA 可被该方法检出, 电泳图及 DNA 电泳条带的灰度分析见图 2。

3.4 方法检测限验证

电泳结果表明, 当体系中存在异种动物源成分干扰时, 体系中 $\geq 1\%(w/w)$ 猪源性 DNA (5 pg)、 $\geq 0.01\%(w/w)$ 牛、羊源性 DNA (0.05 pg) 可被该方法

检出, 电泳图及 DNA 电泳条带的灰度分析见图 3。

3.5 骨肽样品动物源性成分鉴别

按“2.2”项下方法对 19 批样品进行动物源性成分鉴别。电泳结果表明, 所有样品中均只检出猪源性成分, 未检出牛、羊源性成分, 电泳图及 DNA 电泳条带的灰度分析见图 4。由此推断, 9 家企业均使用猪骨作为骨肽类制剂的原材料, 且未发现其他动物源成分污染, 符合相关药品标准规定。

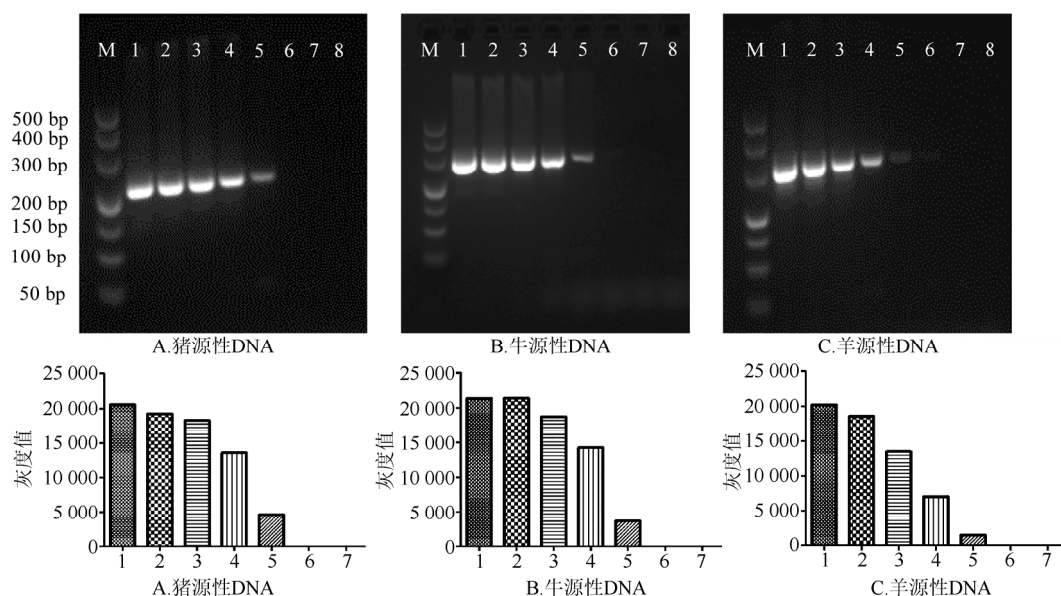


图 2 模板 DNA 浓度对 PCR 方法的影响

M—marker(DL500); 1— $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2— $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3— $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4— $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 5— $0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 6— $0.01 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 7— $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8—阴性对照。

Fig. 2 Effect of template DNA concentration on the PCR method

M—marker(DL500); 1— $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2— $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3— $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4— $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 5— $0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 6— $0.01 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 7— $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8—negative control.

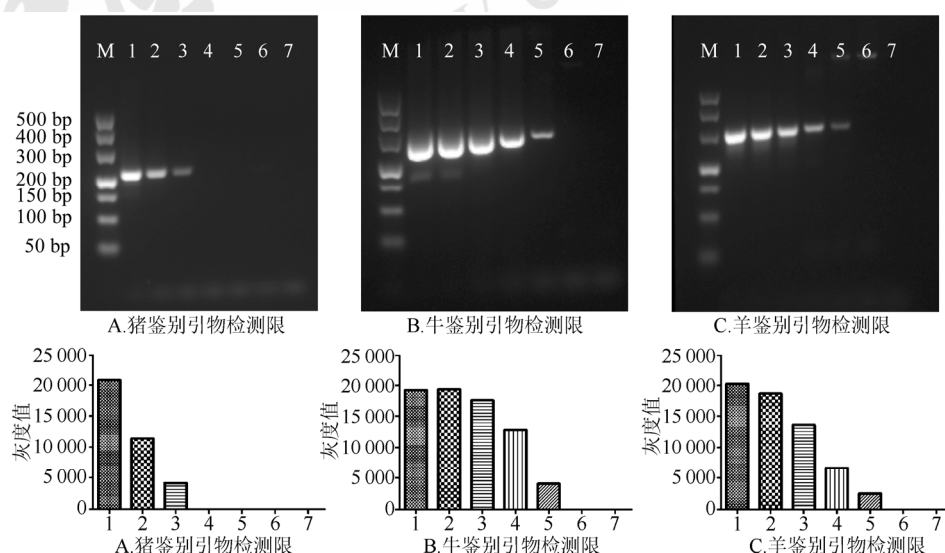


图 3 方法检测限验证电泳图

M—marker(DL500); 1~6—猪/牛/羊占比分别为 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0%; 7—阴性对照。

Fig. 3 Electrophoretogram for detection limits by PCR

M—marker(DL500); 1~6—proportion of pig/cattle/sheep is 50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0%; 7—negative control.

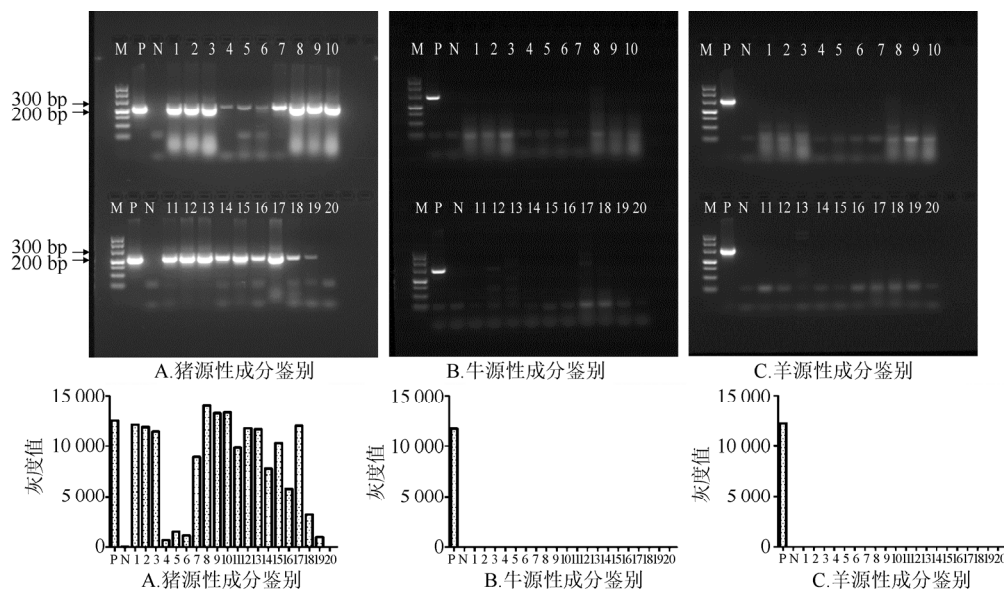


图4 动物源性成分鉴定电泳图

M-marker(DL500); P-阳性对照; N-阴性对照; 1~19-骨肽煎煮中间体样品; 20-空白对照。

Fig. 4 Electrophoretogram for identification of animal-derived components

M-marker(DL500); P-positive control; N-negative control; 1-19-bone peptide decoction intermediate sample; 20-blank control.

4 讨论

4.1 供试品的选择

通过对骨肽类制剂生产企业进行实地调研发现,大部分企业都是通过对骨骼原材料的形态进行鉴别来判别种属,但猪四肢骨与胎牛四肢骨外观差异并不明显,容易产生误判,而且实际生产时每次投料量都在几百公斤,仅依靠形态鉴别无法全面了解原材料是否存在混杂情况。因此,本研究选择以中间体作为研究对象,通过提取 DNA 进行 PCR 扩增来鉴别其中的动物源性成分。

骨肽类制剂生产过程需经过高压提取、调酸调碱除蛋白、过滤除高分子物质等一系列步骤。因此,选择哪一环节的中间体作为供试品是首要问题。尝试对哈尔滨圣泰生物制药有限公司提供的热压提取液、酸沉液、碱沉液、醇沉液、超滤液进行 PCR 鉴别,实验结果表明只能从热压提取液中提取到可用于后续扩增的 DNA,因此选择热压提取中间体作为本研究的研究对象。

4.2 DNA 提取方法的优化

在使用商品化 DNA 提取试剂盒未取得良好的提取效果之后,尝试使用 CTAB 法提取供试品核酸。CTAB 法是提取植物组织 DNA 的一种经典方法,考虑到骨肽样品的特殊性,增加了乙醇预沉淀步骤来提高 DNA 的提取效率,并增加了蛋白酶 K 的使用量以期减少蛋白成分对后续 PCR 扩增的

干扰。最终的实验结果表明,优化后的 CTAB 法适用于本研究中的全部 19 批样品。图 4A 中不同企业的样品电泳条带亮度存在差异,这可能与企业对骨骼原材料的预处理方式以及热压提取的温度和时间有关。

致谢: 感谢黑龙江珍宝岛药业股份有限公司、常州方圆制药有限公司、哈尔滨三联药业股份有限公司、哈尔滨圣泰生物制药有限公司、河北智同生物制药有限公司、湖北威仕生物药业股份有限公司、通化惠康生物制药有限公司、江西康缘桔都药业有限公司以及南京新百药业有限公司对本课题研究的支持。

REFERENCES

- [1] MA J, SONG Y Q. Clinical application of ossotide injection and its pharmacological action thereof [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2016, 36(2): 16-18.
- [2] MA H, SUN L, ZHAO H J, et al. Source control for biochemical drugs from animals [J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(3): 541-542.
- [3] WANG Z Q, HE S T, SHAO H, et al. Identification of porcine, bovine and sheep derived components in heparin sodium by PCR [J]. China Pharm(中国药师), 2015, 18(9): 1506-1511.
- [4] LI S B, WANG Z Q, SHAO H, et al. Identification of animal derived components in two raw materials of biochemical drugs by PCR [J]. China Pharm(中国药师), 2019, 22(5): 932-935.
- [5] ZHOU J H, LI S B, WANG Z Q. Identification of pig, cattle and sheep derived components in hyaluronidase raw material by PCR [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2018, 49(6): 100-106.

收稿日期: 2019-06-12

(本文责编: 沈倩)