

## 综述专论

## 生物制品中宿主细胞残留 DNA 检测技术进展\*

马宁<sup>1</sup>, 黄峥梓昂<sup>1</sup>, 王腾苇<sup>1</sup>, 俞晓平<sup>1,2</sup>, 孙凯<sup>1,2\*\*</sup>, 叶子弘<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 中国计量大学生命科学学院 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018;

2. 国家市场监督管理总局重点实验室(微生物计量检测与生物制品质量安全), 杭州 310018)

**摘要:**近年来,生物技术领域的迅猛发展显著提升了生物制品在全球药品市场中的占比。同时,宿主细胞残留 DNA (rcDNA) 因潜在的传染性或致癌性,引发了广泛的关注。为了确保药品的安全性,多数生物制品需要在整个生产过程中严格监控,并证明 rcDNA 的清除。目前,常用的检测方法包括实时定量 PCR (qPCR) 法、微滴式数字 PCR (ddPCR) 法、DNA 探针杂交法和荧光染色法等。这些技术各有优劣,并且在全面检测潜在 rcDNA 方面还存在一定的挑战。本文旨在探讨生物制品中 rcDNA 的潜在来源,并对现有的检测方法进行全面的综述,分析比较了各种方法的优势和不足,并对 rcDNA 检测技术的发展进行了展望,为生物制品中 rcDNA 的检测提供参考。

**关键词:** 生物制品; 宿主细胞; rcDNA; 检测方法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2025) 02-0181-14

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1052

## Advances in residual host cell DNA detection technology in biopharmaceutical products\*

MA Ning<sup>1</sup>, HUANG Zheng-zi-ang<sup>1</sup>, WANG Teng-wei<sup>1</sup>,YU Xiao-ping<sup>1,2</sup>, SUN Kai<sup>1,2\*\*</sup>, YE Zi-hong<sup>1,2\*\*</sup>

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection &amp; Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University,

Hangzhou 310018, China; 2. Key Laboratory of Microbiological Metrology, Measurement &amp; Bio-product Quality Security,

State Administration for Market Regulation, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In recent years, the rapid advancement of biotechnology has significantly increased the proportion of biopharmaceutical products in the global pharmaceutical market. Meanwhile, residual host cell DNA (rcDNA) has become a major concern due to its potential infectious or carcinogenic risks. To ensure the safety of biopharmaceuticals, most biological products require strict monitoring and proof of rcDNA clearance throughout the entire production

\* 国家重点研发计划项目(2021YFF0600800);浙江省属高校基本科研业务费专项资金项目(2022YW04)

\*\* 通信作者 孙凯 Tel: 18888923361; E-mail: sunkai@cjlu.edu.cn

叶子弘 Tel: 13656686088; E-mail: zhye@cjlu.edu.cn

第一作者 Tel: 15841413158; E-mail: mn15841413158@163.com

process. Currently, commonly employed detection methods include real-time quantitative PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR), DNA probe hybridization, and fluorescent staining methods, among others. While these technologies each offer distinct advantages, they also face challenges in comprehensively detecting potential rcDNA. This review explores the potential sources of rcDNA in biopharmaceutical products and provides an in-depth evaluation of existing detection methods. It systematically analyzes and compares the strengths and limitations of various techniques, and discusses future directions for the development of rcDNA detection technologies. This work aims to offer valuable insights and references for improving the detection and control of rcDNA in biopharmaceutical production.

**Keywords:** biopharmaceutical products; host cells; rcDNA; detection methods

生物制品是指应用生物技术生产的用于预防、治疗和诊断人类疾病的制剂,包括疫苗、血液制品、诊断制品、微生态制剂、免疫调节剂、生物技术药物等<sup>[1]</sup>。生物制品具有药理活性高,毒副作用低,特异性强等优势,在抗病毒、肿瘤与免疫、血液病等领域具有不可替代的治疗作用<sup>[2]</sup>。与传统小分子化学药相比,生物制品的生产涉及复杂的工艺流程和严格的质量控制。近年来,随着全球重组蛋白药物市场规模持续扩大,生物制品的安全性问题也越来越引起重视。在生产过程中,生物制品往往需要选用不同细胞系作为生产基质<sup>[3]</sup>,例如鸡胚细胞、中华仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)、非洲绿猴肾细胞(Vero cells)、狗肾传代细胞(madin-darby canine kidney cell, MDCK)、巴斯德毕赤酵母细胞、大肠埃希菌等,这些细胞被称为宿主细胞<sup>[4-8]</sup>。使用宿主细胞生产药品时,需要在生产过程中去除来自宿主细胞的杂质,尽可能排除宿主细胞残留DNA(residual host cell DNA, rcDNA)对产品质量的影响<sup>[9-10]</sup>。

rcDNA被定义为在重组宿主细胞表达过程中产生的DNA及其片段的总和<sup>[11]</sup>。rcDNA具有潜在的风险性<sup>[12]</sup>,主要表现为传染性<sup>[13]</sup>(通过如HIV等病毒)、致癌性<sup>[14-15]</sup>(通过如Ras等癌基因)、免疫原性<sup>[16-17]</sup>(通过细菌的CpG丰富序列)和诱导突变性<sup>[18-20]</sup>(通过转座子、逆转录子和DNA重组)。因此,确保生物制品生产过程中rcDNA的清除至关重要。为了满足这一需求,rcDNA检测方法必须具备准确性、灵敏度和定量能力,以保证DNA的清除达到规定的安全水平。

随着生物制品的不断研发,一系列rcDNA分析方法应运而生<sup>[21-23]</sup>。这些方法极大地提升了rcDNA残留水平的检测精度,同时也深化了大众对rcDNA

潜在风险的理解。本文综述了近年来关于rcDNA检测的相关研究方法,并分析比较了各种方法的优势和不足,详细列举了各国药典的相关规定,为生物制品领域的研究者、开发者以及监管机构提供宝贵的信息和指导。

## 1 rcDNA的潜在危害

生物制品中rcDNA可能来自多种宿主,相关的潜在风险也不尽相同。此外,rcDNA可能以复杂的形式存在,大小和组成各异,风险难以概括。目前相关研究已经明确的rcDNA潜在风险包括传染性、致癌性、免疫原性和突变性等<sup>[24-29]</sup>。

### 1.1 病毒传染性和致癌性

当rcDNA进入人体后,存在在体内发生重组或表达的可能性<sup>[30]</sup>。若rcDNA与肿瘤发生有关联,则可能构成潜在的致癌风险<sup>[31]</sup>;若rcDNA与病毒表达相关,则可能会引起机体患相关疾病,从而对患者健康构成威胁<sup>[10]</sup>。rcDNA的感染性源于细胞DNA中可能存在的传染性病毒基因组。以HIV为例<sup>[32]</sup>,该基因组无论是以染色体外组分的形式存在,还是整合入人体基因组,均具备扩增并产生传染性病毒粒子的能力。Sheng等<sup>[33]</sup>的研究进一步探讨了rcDNA的致癌性,他们使用H-ras和c-myc基因开展肿瘤诱导研究。研究结果显示,需使用含有H-ras和c-myc的质粒12.5 mg,才能在成年或新生小鼠中诱导肿瘤生长,这相当于1~10 g的基因组DNA才具有类似的细胞转化效应。基于该模型,建议将每剂残留DNA的含量限制在10 ng以内(超过10<sup>5</sup>倍),如此可为病毒的传染性和致癌性提供显著的安全系数。

### 1.2 rcDNA的免疫原性

在生物制品用于治疗性给药的背景下,rcDNA所引发的人类免疫反应具有不可预测性。已有研究

报道,在高剂量特定核酸的作用下,可以诱导机体发生免疫反应,如 CpG 寡脱氧核苷酸作为 DNA 疫苗或佐剂,在临床前和临床研究所展现的免疫刺激性<sup>[34-41]</sup>,以及抗 DNA 抗体的诱导现象<sup>[42-47]</sup>,这些研究进一步强调了 rcDNA 免疫原性的潜在威胁。此外,值得注意的是,细菌 DNA 相较于哺乳动物细胞 DNA,具有更高的免疫原性<sup>[48-50]</sup>,这一现象部分源于细菌 DNA 中高比例的 CpG 基序以及较低的甲基化程度<sup>[51]</sup>。这些发现强调了 rcDNA 序列与免疫系统交互作用在生物制品质量安全考量中的重要性。

### 1.3 转座元件插入诱导突变风险

哺乳动物的基因组中充斥着大量重复元件,且这些元件广泛散布于基因组的各个位置<sup>[52]</sup>。基因组测序研究发现,人类和小鼠的基因组中至少有一半的序列属于重复序列<sup>[53]</sup>。这些重复序列主要分为 4 个大类:自主长散在核元件(long interspersed nuclear elements, LINEs)、短散在核元件(short interspersed nuclear elements, SINEs)、具有末端重复序列(long terminal repeat retrotransposons, LTRs)的类逆转录病毒元素以及 DNA 转座子<sup>[54-64]</sup>。其中,前三类通过 RNA 中间体的逆转录过程产生,而 DNA 转座子则通过 DNA 序列的剪切和插入机制进行移动<sup>[65-66]</sup>。这些重复序列被认为是基因组进化过程中转座元件的遗留物,它们在基因组中的作用不仅限于简单的填充,而是通过多种机制影响着基因组的结构和功能<sup>[67-68]</sup>。例如,它们能够引起基因组的异位重排,创造新的基因,修改现有基因,甚至调节基因组的整体 GC 含量<sup>[69-71]</sup>。因此,生物制品中残留的重复序列可能对人体健康构成潜在风险。若生物制品中含有 rcDNA,其中很可能包含大量的重复序列。这些残留的重复序列可能通过一些未知的机制对人体产生影响,进而引发健康问题。

此外,研究还表明,rcDNA 片段的长度与潜在的健康风险之间存在正相关关系<sup>[72]</sup>。这意味着,宿主细胞中残留的 DNA 片段越长,其致病基因或转座子的完整性越高,从而也就增加了这些片段感染生物体的可能性。因此,在关注生物制品中 DNA 残留总量的同时,还必须对残留 DNA 的片段大小给予特别的关注。

## 2 rcDNA 的监管

世界卫生组织和各国药物注册监管机构,对生物制品终产品中宿主细胞 DNA 的残留量做出了严格的

规定<sup>[73-74]</sup>,且某些生物制品还需考虑纯化工艺、给药剂量、检测方法等因素,其残留量被要求控制在更低水平<sup>[75]</sup>。监管机构会对药品生产工艺进行严格审查评估,要求药品生产企业将宿主细胞 DNA 残留量降至可接受限度,对于生物制品 rcDNA 的严格限定,有助于确保生物制品的质量安全,降低潜在风险,保障患者的生命健康。

### 2.1 国外相关法规对生物制品中 rcDNA 限量的要求

为保障生物制品的质量安全,欧美等发达国家对生物制品中残留 DNA 的可接受限度有明确规定。美国 FDA 在其指导原则中规定,生物制品 rcDNA 残余限度不得超过 100 pg/剂量<sup>[76]</sup>,对于大剂量的单抗药物可放宽至 10 ng/剂量。此外,美国 FDA 还建议,rcDNA 片段不大于 200 bp 以减少风险<sup>[77]</sup>。EP 规定,生物制品 DNA 残留量不得超过 10 ng/剂量<sup>[78]</sup>。欧洲药品管理局(EMA)对于某些疫苗产品,如甲型肝炎灭活疫苗和乙型肝炎疫苗,则提出更为严格的规定,要求 rcDNA 残留量分别不得超过 100 pg/剂和 10 pg/剂<sup>[79]</sup>。国际药品监管机构论坛(ICH)在其指导原则中提到,原液中的工艺相关杂质,包括宿主细胞蛋白和 rcDNA 等,应采用合适的可控的生产工艺,将其残留量降至最低限度。同时,ICH 还明确指出,对于生物技术产品和生物制品,应建立经过质量特性分析的内部一级参考品,并使用适宜的检测方法对原液进行精准定量<sup>[80]</sup>。这些规定体现了监管机构对生物制品中 rcDNA 的严格管制态度,旨在确保药品的安全性和有效性。尽管不同机构和不同地区在具体数值限制上存在差异,但它们共同的目标都是尽可能减少 rcDNA 可能带来的风险。

### 2.2 我国对生物制品中 rcDNA 限量的要求

2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)三部对不同生物制品中 rcDNA 的可接受限度做出了详细规定,如表 1 所示。此外,2022 年发布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》中提到,生产中如果使用了肿瘤细胞系、致瘤细胞系,或携带有致瘤基因、病毒来源序列的细胞,需要对 rcDNA 的残留量和残留片段大小进行控制,并建议将 rcDNA 片段大小控制在 200 bp 以下。在生产工艺的优化过程中,应采用适宜的方式,将 rcDNA 总量降至可接受的限度,并就如何降低 rcDNA 片段的大小或者灭活 DNA 活性进行说明。

表 1 2020 年版《中国药典》三部规定的各生物制品外源性 rcDNA 残留量限度

Tab. 1 The limits for residual exogenous rcDNA in various biological products specified in the Part III of 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia

生物制品名称 (biological product name)	外源性 rcDNA 残留量 (limits for residual exogenous rcDNA)
冻干乙型脑炎灭活疫苗 (Vero 细胞) [japanese encephalitis vaccine (Vero cell), inactivated, freeze-dried]	不高于 100 pg/剂 (not exceeding 100 pg/dose)
双价肾综合征出血热灭活疫苗 (Vero 细胞) [haemorrhagic fever with renal syndrome bivalent vaccine (Vero cell), inactivated]	不高于 100 pg/剂 (not exceeding 100 pg/dose)
冻干人用狂犬病疫苗 (Vero 细胞) [rabies vaccine (Vero cell) for human use, freeze-dried]	不高于 3 ng/剂 (not exceeding 3 ng/dose)
sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (Vero 细胞) [poliomyelitis vaccine (Vero cell), inactivated, sabin strains]	不高于 50 pg/剂 (not exceeding 50 pg/dose)
重组乙型肝炎疫苗 (酿酒酵母) [recombinant hepatitis b vaccine ( <i>saccharomyces cerevisiae</i> )]	不高于 10 ng/剂 (not exceeding 10 ng/dose)
重组乙型肝炎疫苗 (汉逊酵母) [recombinant hepatitis b vaccine ( <i>hansulula polymorpha</i> )]	不高于 10 ng/剂 (not exceeding 10 ng/dose)
重组乙型肝炎疫苗 (CHO 细胞) [recombinant hepatitis b vaccine (CHO cell)]	不高于 10 pg/剂 (not exceeding 10 pg/dose)
注射用人促红素 (human erythropoietin for injection)	每 10 000 IU 人促红素应不高于 100 pg (no more than 100 pg per 10 000 IU of human erythropoietin)
人促红素注射液 (human erythropoietin injection)	每 10 000 IU 人促红素应不高于 100 pg (no more than 100 pg per 10 000 IU of human erythropoietin)
注射用人干扰素 $\alpha$ 1b (human interferon $\alpha$ 1b for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 1b 注射液 (human interferon $\alpha$ 1b injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人干扰素 $\alpha$ 2a (human interferon $\alpha$ 2a for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2a 注射液 (human interferon $\alpha$ 2a injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2a 栓 (human interferon $\alpha$ 2a vaginal suppository)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人干扰素 $\alpha$ 2b (human interferon $\alpha$ 2b for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 注射液 (human interferon $\alpha$ 2b injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 滴眼液 (human interferon $\alpha$ 2b eye drops)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 栓 (human interferon $\alpha$ 2b vaginal suppository)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 乳膏 (human interferon $\alpha$ 2b cream)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 凝胶 (human interferon $\alpha$ 2b gel)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 喷雾剂 (human interferon $\alpha$ 2b spray)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 软膏 (human interferon $\alpha$ 2b ointments)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人干扰素 $\alpha$ 2b 阴道泡腾片 (human interferon $\alpha$ 2b vaginal effervescent tablets)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人干扰素 $\gamma$ (human interferon $\gamma$ for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人白介素 -2 (human interleukin-2 for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人白介素 -2 注射液 (human interleukin-2 injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人白介素 -2 (I) [human interleukin-2 (I) for injection]	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人白介素 -11 (human interleukin-11 for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人粒细胞刺激因子注射液 (human granulocyte colony-stimulating factor injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
注射用人粒细胞巨噬细胞刺激因子 (human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor for injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
外用粒细胞巨噬细胞刺激因子凝胶 (human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gel for external use)	每 1 次人用剂量应不高于 10 ng (each human dose should not exceed 10 ng)
牛碱性成纤维细胞生长因子外用溶液 (bovine basic fibroblast growth factor liquid for external use)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
外用牛碱性成纤维细胞生长因子 (bovine basic fibroblast growth factor for external use)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶 (bovine basic fibroblast growth factor gel)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)

表 1 (续)

生物制品名称 (biological product name)	外源性 rcDNA 残留量 (limits for residual exogenous rcDNA)
牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液 (bovine basic fibroblast growth factor eye drops)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
外用表皮生长因子 (human epidermal growth factor for external use)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人表皮生长因子外用溶液 (human epidermal growth factor derivative for external use, liquid) (I)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人表皮生长因子凝胶 (human epidermal growth factor gel)	每 1 支 / 瓶应不高于 10 ng (each vial/bottle should not exceed 10 ng)
人表皮生长因子滴眼液 (human epidermal growth factor eye drops)	每 100 μg 蛋白质应不高于 10 ng (each 100 μg of protein should not exceed 10 ng)
尼妥珠单抗注射液 (nimotuzumab injection)	每 1 支 / 瓶应不高于 100 pg (each vial/bottle should not exceed 100 pg)
康柏西普眼用注射液 (conbercept ophthalmic injection)	每 1 mg 康柏西普应不高于 30 pg (the amount of conbercept should not exceed 30 pg per 1 mg)
人胰岛素 (human insulin)	每 1.5 mg 人胰岛素中 rcDNA 残留量不得过 10 ng (the residual amount of host DNA in 1.5 mg of human insulin should not exceed 10 ng)
甘精胰岛素 (insulin glargine)	每 1.5 mg 甘精胰岛素中 rcDNA 残留量不得过 10 ng (the residual amount of host DNA in 1.5 mg of insulin glargine should not exceed 10 ng)
赖脯胰岛素 (insulin lispro)	每 1.5 mg 赖脯胰岛素中 rcDNA 残留量不得过 10 ng (the residual amount of host DNA in 1.5 mg of insulin lispro should not exceed 10 ng)
注射用人生长激素 (human growth hormone for injection)	每 1 mg 人生长激素中含宿主菌 DNA 残留量不得过 1.5 ng (the residual amount of host bacterial DNA in each 1 mg of human growth hormone should not exceed 1.5 ng)

### 3 rcDNA 检测的分析方法

针对 rcDNA, 国内外药典都规定了相应的检测方法。EP 介绍了 qPCR 法和 DNA 结合蛋白免疫阈值法; USP 推荐了 3 种外源性 DNA 残留量测定的方法, 分别为 DNA 探针杂交法、DNA 结合蛋白免疫阈值法和实时定量 PCR 法; 2020 年版《中国药典》通则 3407 推荐

了 DNA 探针杂交法、荧光染色法和定量 PCR 法; 美国 FDA 主要推荐定量 PCR 法。除药典推荐的方法外, 国内外各研究团队还开发了很多新的方法, 如微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 等, 本文对几种方法的特点进行了比较和整理, 见表 2。这些方法各有利弊, 使用时应根据实际情况具体分析, 筛选合适的方法。

表 2 不同测定方法特点比较

Tab. 2 Comparison of characteristics of different determination methods

方法 (method)	检测时长 (detection time)/h	特异性 (specificity)	一般检测范围 (general detection range)	检测成本 (detection cost)	优点 (advantage)	缺点 (disadvantage)
DNA 探针杂交法 (DNA probe hybridization method)	48	强 (high)	0.01~100 pg · μL <sup>-1</sup>	低 (low)	操作简单, 成本低 (easy to operate and cost-effective)	检测时间长, 结果容易出现假阳性 (long detection time and prone to false positives in the results)
荧光染色法 (fluorescence staining method)	0.5~1	差 (low)	1.25~80 ng · mL <sup>-1</sup>	低 (low)	耗时短, 成本低 (time-efficient and cost-effective)	非特异性检测 (non-specific detection)
DNA 结合蛋白免疫阈值法 (DNA-binding protein immunoassay threshold method)	5	差 (low)	3~200 pg/500 μL	高 (high)	灵敏度高, 重复性好 (high sensitivity and good repeatability)	非特异性检测, 检测成本高 (non-specific detection with high costs)
qPCR	1~1.5	强 (high)	0.01~100 pg · μL <sup>-1</sup>	高 (high)	灵敏度高, 特异性好 (high sensitivity and good specificity)	依赖大型设备 (dependent on large-scale equipment)
ddPCR	4~5	强 (high)	0.001~100 pg · μL <sup>-1</sup>	高 (high)	灵敏度高 (high sensitivity)	成本昂贵, 依赖大型设备 (expensive and dependent on large-scale equipment)

### 3.1 荧光染色法

荧光染色法作为 2020 年版《中国药典》收录的 1 种检测技术,其核心原理在于利用双链 DNA 荧光染料与双链 DNA 的特异性结合,引起荧光信号的显著增强(如图 1 所示),而未与 DNA 结合的染料则几乎不产生荧光<sup>[81]</sup>。该方法因操作流程简便和成本效益高而受到青睐,尤其适合于一些 DNA 含量较高的样本,如生物制药过程中的上游样品。但荧光染色法在灵敏度方面存在局限,对于 rcDNA 残留量的一般检测范围为  $1.25\sim 80\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与其他 rcDNA 检测方法相似,荧光染色法也可能受到样品中其他成分的干扰,尤其是当存在高浓度的重组蛋白时<sup>[82]</sup>。为了获得可靠的测量结果,通常需要先进行 DNA 的提取。灵敏度的限制是该方法应用的最大阻碍,尤其在 WHO 建议的每剂药物中 rcDNA 含量不超过 10 ng 的严格标准下,荧光染色法在高剂量蛋白质产品的检测中可能不太适用<sup>[83]</sup>。然而,在低剂量蛋白质产品,如某些疫苗的检测中<sup>[22]</sup>,荧光染色法能够展现出其高通量筛选和成本效益方面的独特优势。

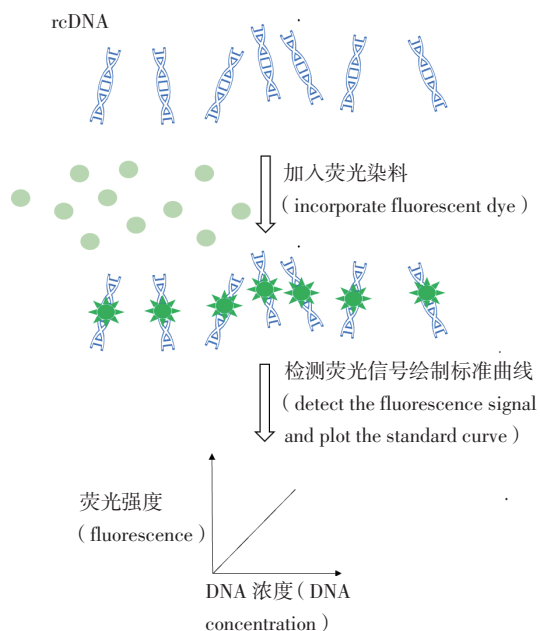


图 1 荧光染色法原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the principle of fluorescence staining method

### 3.2 DNA 探针杂交法

DNA 探针杂交法的基本原理,如图 2 所示,先通过变性处理,将样品中的双链 DNA 变为单链;随后利用固相膜吸附处理后的单链 DNA,再将标记过的特异性单链 DNA 与之进行杂交;最后,通过与

标记物匹配的显色系统来显示杂交结果<sup>[84]</sup>。这种方法通常用于定性检测,如需进行定量检测,则可将杂交结果与已知含量的 DNA 标准品进行对照,从而测定检测样品中外源性 DNA 的残留量<sup>[85]</sup>。该技术的 1 个优点是它类似于 Southern Blot 技术,不需要特殊培训,成本相对较低;另 1 个优点是可以在印迹之前,通过确定大小的 DNA Marker 电泳估计 rcDNA 的大小。然而,与荧光染色法类似,这种方法的主要缺点也是灵敏度较低。研究表明<sup>[78]</sup>,当样品 DNA 含量  $< 10\text{ pg}$  时,样品中的其他化学物质会对检测结果产生较大影响,甚至可能导致出现假阳性结果;而当样品浓度更高,超过背景水平时,通常会低估检测量。此外,较长的检测周期也在一定程度上限制了该方法的进一步应用<sup>[86]</sup>。

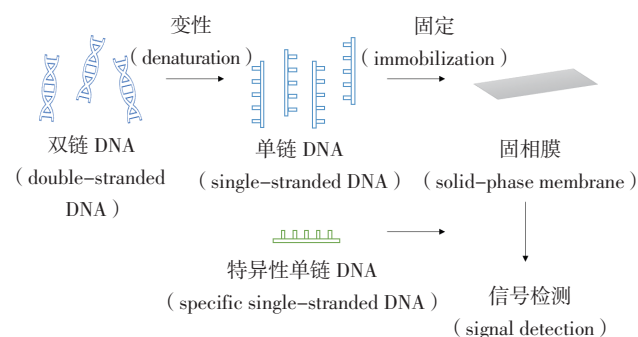


图 2 DNA 探针杂交法原理示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the principle of DNA probe hybridization method

### 3.3 DNA 结合蛋白免疫阈值法

DNA 结合蛋白免疫阈值法是一种基于单链 DNA 结合蛋白的 rcDNA 检测技术。其工作原理为,利用单链 DNA 结合蛋白特异性捕获变性后的单链 rcDNA<sup>[87]</sup>,具体过程如图 3 所示。在此基础上,利用与尿素酶偶联的单克隆抗 DNA 抗体来精准识别并结合这些捕获的 DNA 分子。随后,通过酶催化水解尿素产生 pH 变化,而 pH 变化的速率与样本中 DNA 的含量成正比。这一变化过程在一个封闭的小反应室内进行,通过与 DNA 标准品的信号进行对比,便能准确计算出样本中的 DNA 量<sup>[88]</sup>。此方法以其卓越的灵敏度和标准化的操作流程,在精确定量 DNA 残留方面表现出显著优势<sup>[89]</sup>。但该方法也存在一些局限性。首先,其相对较高的成本以及较低的通量,可能在一定程度上限制了其在大规模筛选或高通量检测中的应用;其次,该技术对可检测的 DNA 片段大小有一

定的限制。由于其检测过程依赖于变性 DNA 与单链 DNA 结合蛋白及单克隆抗 DNA 抗体的结合,对小于 600 bp 的 DNA 片段,可能无法实现有效检测,这在一定程度上影响了对小片段 DNA 残留的全面评估<sup>[80]</sup>。

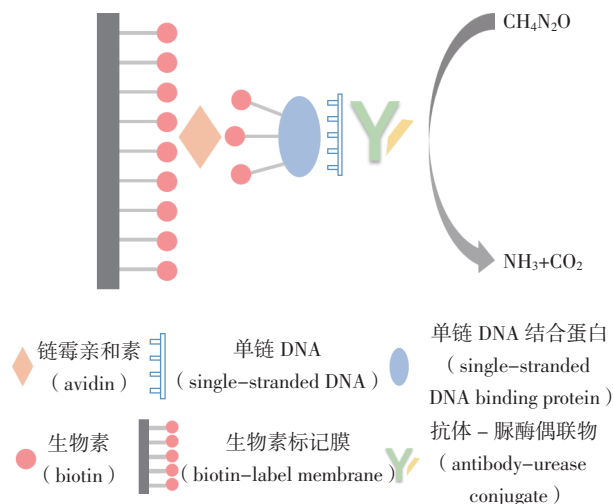
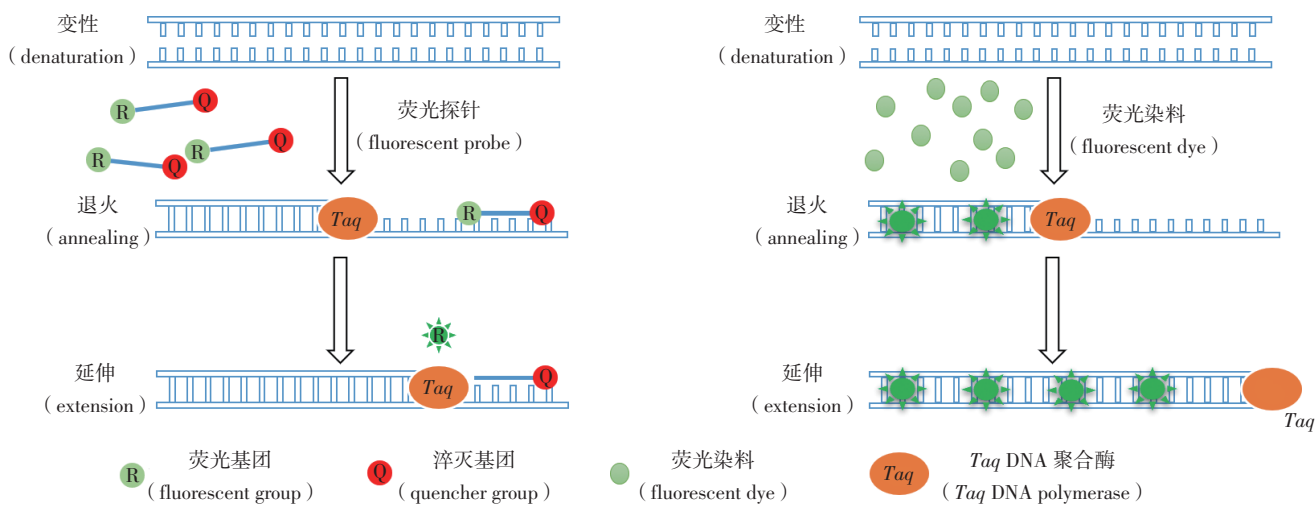


图 3 DNA 结合蛋白免疫阈值法原理示意图  
Fig. 3 Schematic diagram of the principle of DNA-binding protein immunothreshold method



A. TaqMan 探针法 (TaqMan probe method) B. 染料法 (dye method)  
图 4 qPCR 法原理示意图  
Fig. 4 Schematic diagrams of the qPCR principle

qPCR 被广泛应用于 rcDNA 的定量,该过程始于标准曲线的建立。在已知浓度的 DNA 标准品中加入荧光标记的特异性探针或荧光染料,随着 PCR 反应的进行,荧光信号会逐渐积累。通过实时监测和分析这些荧光信号,可以准确地判断特异性扩增

### 3.4 基于核酸扩增的检测方法

在过去几年中,基于 PCR 的技术(如 qPCR、ddPCR)已被用于检测 rcDNA,现在已成为生物技术行业中最广泛使用的方法。在 PCR 反应中,特定序列的 DNA 模板被扩增,可在 1~2 h 内产生数十亿份拷贝,因此,这项技术可以检测到极低水平的 DNA。

**3.4.1 qPCR 法** qPCR 法作为 2020 年版《中国药典》新增的检测方法,同时在 USP 和 EP 中均有收录<sup>[4]</sup>,其重要性不言而喻。qPCR 技术通过实时监测 PCR 扩增过程中的荧光信号,实现了对核酸的精确定量,其工作原理如图 4 所示。该技术常用的几种检测原理均涉及荧光染料的应用,以下 2 种应用较为广泛:(1)SYBR Green 染料法<sup>[86]</sup>。基于双链 DNA 结合染料,SYBR Green 在未结合时背景荧光极低,一旦与 PCR 产生的双链 DNA 结合,荧光输出便会显著增加,从而提供了优异的信噪比。(2)TaqMan 探针法<sup>[90]</sup>。利用带有荧光标记的特异性探针,探针内含有 1 个淬灭分子。在 PCR 反应过程中,DNA 聚合酶的外切核酸酶活性切割探针,释放荧光染料,从而实现荧光的显著增加。TaqMan 技术因其超过 1 000 的信噪比,成为极其灵敏的检测手段。

产物量的动态变化,从而实现了对 rcDNA 的精确定量检测<sup>[91]</sup>。

**3.4.2 ddPCR 法** ddPCR 是 1 种先进的核酸分子绝对定量技术,代表了 PCR 技术的第三代发展。ddPCR 技术通过将含有核酸分子的反应体系分成成

千上万个的纳升级微滴,每个微滴可能包含零个或多个目标核酸分子。经过 PCR 扩增后,通过检测每个微滴的荧光信号,可确定微滴中是否含有目标 DNA,最后根据泊松分布原理,借助数学公式就可以计算出样品中 DNA 的浓度<sup>[92]</sup>,从而实现对目标分子的绝对定量,其工作原理如图 5 所示。与 qPCR 相比,ddPCR 定量过程不需要依靠 DNA 标准品来测定标

准曲线,且不易受到基质干扰,近年来在宿主细胞残留 DNA 检测中得到了广泛的应用<sup>[93]</sup>。例如,Wang 等<sup>[94]</sup>利用 ddPCR 技术建立了 1 种检测 BHK 细胞残留 DNA 的方法,这种方法具有较高的灵敏度和准确性。Anderson 等<sup>[95]</sup>则进一步展示了 ddPCR 技术无须 DNA 提取,即可对大肠埃希菌 rcDNA 进行检测的能力,证明了该技术的高灵敏度和实用性。

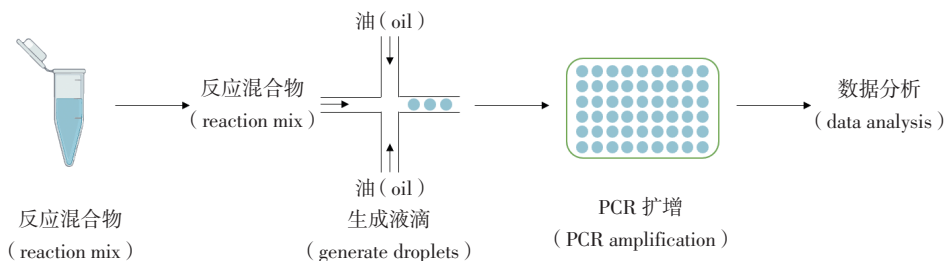


图 5 ddPCR 法原理示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the ddPCR principle

### 3.5 下一代测序技术

下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术是一种高通量的测序方法,可以同时为数百万 DNA 片段进行测序<sup>[96]</sup>,从而获得更为全面的基因组信息。现有的 rcDNA 检测方法大多针对基因组中的特异性片段进行检测,其检测结果的特异性受到引物所靶向序列的限制。NGS 技术可以对待测样本中存在的遗传信息进行全面分析,有效摆脱靶向序列的限制。目前,已有研究将 NGS 技术用于转基因植物的 rcDNA 检测<sup>[97]</sup>,若能将其推广至生物制品的 rcDNA 检测,或许能为生物制品的质量控制提供新的思路和方法。在生物制品的生产过程中,通常会包含去除 rcDNA 的工艺操作,因此生物制品中 DNA 含量往往很低<sup>[98]</sup>。在利用基于扩增的方法进行检测时,要尽可能选取基因组中重复性好,保守程度高的序列作为目的片段,这有助于扩增反应的顺利进行,可以更好地对残留 DNA 含量进行检测。利用 NGS 技术,能够获得更准确、更完整的宿主细胞全基因组序列信息,从中可以选取到重复性更高的保守序列,应用于现有检测方法。

## 4 展望

### 4.1 核酸提取技术的挑战

当前,残留 DNA 检测技术面临着诸多挑战,尤其是在核酸提取和纯化过程中。基质干扰,如聚乙烯亚胺 (PEI)、蛋白质和多糖等,会对 qPCR 等方法的检

测结果产生显著影响<sup>[99]</sup>。虽然对样品进行稀释可以在一定程度上降低这种干扰,但同时也会影响检测结果的灵敏度。因此,选择合适的核酸提取方法对残留 DNA 检测至关重要。

目前主要使用的核酸前处理方法包括酚/氯仿法<sup>[100]</sup>、碘化钠沉淀法<sup>[101]</sup>、柱提取法<sup>[102]</sup>和磁珠法<sup>[103]</sup>。酚/氯仿法利用酚使蛋白质变性,将蛋白质与 DNA 分离,再利用氯仿加速有机相与液相的分层,经过反复抽提,获得高纯度、高含量的 DNA。这种方法提取效率高,但会残留部分有机溶剂,可能影响后续的实验结果。碘化钠沉淀法,收载于 2020 年版《中国药典》四部通则 3407 中,以碘化钠作为蛋白质增溶剂,与表面活性剂一同将样品中的蛋白质等成分转变为可溶状态,加入的异丙醇能够选择性地使核酸(主要是 DNA)和糖原产生沉淀(即共沉淀)。该方法操作简单,但是耗时比较长,且回收率不稳定。柱提取法是利用吸附材料的特性,将 DNA 分子从混合物中分离出来,操作简单,提取时间短,但处理后的样本 DNA 纯度不高,且不同批次的膜柱之间回收效率可能存在一定差异。磁珠法通常选择具有一定磁性的微米级珠子作为 DNA 富集的固相载体,利用磁性珠子及其表面修饰的特定分子与 DNA 之间的亲和性,实现 DNA 的富集与分离。此法操作简单,耗费时间短,并且可以实现自动化高通量操作,但其稳定性受技术和设备的限制。

#### 4.2 非靶向检测的需求

尽管基于 PCR 的检测方法因其广泛应用而备受青睐,但这种方法存在一定的局限性。它依赖于对特定序列的特异性识别,这些序列并不全面代表整个基因组。因此,如果目标序列未被包含,其他序列可能不会被检测到。这一点至关重要,因为生物过程可能会将 DNA 切割成较小的片段,只有当目标 DNA 序列存在时,PCR 技术才能识别出 rcDNA。尽管基于杂交和抗体/亲和性的 DNA 检测技术试图识别所有可能的 DNA 序列,但其灵敏度有限,且与 PCR 相比,DNA 没有经历扩增过程。DNA 结合蛋白免疫阈值法提供的基于抗体/亲和性技术的检测存在对 DNA 片段大小的限制。

为应对残留 DNA 检测中的诸多挑战,非靶向扩增技术应运而生,其中包括多次退火环状循环扩增技术(MALBAC)、非序列依赖性单引物扩增(SISPA)和多重置换恒温扩增法(MDA)<sup>[104-106]</sup>。这些技术的基本原理是在待检测的 DNA 片段两端引入特定的 DNA 序列,将其作为 PCR 扩增的起始点。这种方法能够利用已知的序列扩增出未知的片段,从而实现从样本中所有 rcDNA 片段的全面扩增<sup>[107]</sup>。通过 MALBAC 和 SISPA 等扩增技术,可以实现核酸的高效富集,结合磁珠捕获和末端修复等技术,可以从微量样本中提取足够的 DNA。近年来,已有研究将这些非靶向扩增技术成功应用于残留 DNA 的检测<sup>[30]</sup>。与传统方法相比,非靶向扩增技术能够进行非选择性的扩增,减少扩增偏好性,从而获取准确的、均一性良好且高覆盖度的扩增基因组序列<sup>[108-109]</sup>。其优势在于,仅需特定引物即可实施,无须预先确定特定的 DNA 片段,这在 rcDNA 检测领域尤为突出,给检测工作带来了极大的便利与精准性。

#### 4.3 现场即时检测需求

随着医药产业的蓬勃发展和生物技术的飞速进步,制药企业和监管机构对快速检测技术及现场检测能力的需求日益迫切。然而,rcDNA 检测技术往往依赖于高昂的设备和专业的操作人员,这些条件难以满足日益增长的检测需求。近年来,等温扩增技术作为一种新的分子诊断方法,能够在恒定的温度条件下实现核酸的快速且高效扩增,具有操作简单,不依赖大型设备的特点,在 rcDNA 检测领域展现出巨大的应用潜力和实用价值。

常用的等温扩增技术包括环介导等温扩增技术

(LAMP)和重组酶聚合酶扩增技术(RPA)。LAMP 需针对靶序列的 6~8 个特异性位点设计 4~6 条特异性引物,且均能特异性结合才能实现扩增<sup>[110]</sup>,因而具有较强的特异性,反应过程分为起始和扩增循环 2 个阶段<sup>[111]</sup>,起始阶段即初始反应物的合成,DNA 延伸形成哑铃状结构;扩增循环阶段以哑铃状结构为模板继续延伸和再循环扩增<sup>[112]</sup>。LAMP 反应过程始终维持在 65 °C 左右的恒定温度,且同一时间内对模板的拷贝数比常规 PCR 高出 1~2 个数量级,具有极高的扩增效率,操作简便快捷<sup>[113]</sup>。RPA 是 1 种新型的等温扩增技术,通过重组酶、重组酶加载因子和单链结合蛋白与引物和靶序列的相互作用,完成核酸靶序列的体外扩增<sup>[114]</sup>。该技术主要通过重组酶与引物结合形成蛋白质-DNA 复合物<sup>[115]</sup>,在双链 DNA 中定位同源序列,发生链交换反应形成并启动 DNA 合成,对模板上的目标区域进行指数式扩增<sup>[116]</sup>。未来,如果能利用等温扩增技术对 rcDNA 进行检测,将会使检测更加简便、快捷。

#### 5 总结

rcDNA 在生物制品中可能引发致癌和感染风险,随着生物制品的广泛应用,rcDNA 的残留问题已成为影响产品质量和安全性的的重要因素。各国药品监督管理机构对 rcDNA 的含量设定了严格的控制标准,以确保生物制品的安全性。目前,qPCR 法是检测残留 DNA 的常用方法之一,但其局限在于只能检测特定的目标片段,无法满足全面检测药品中 rcDNA 的需求。而非靶向扩增技术可被引入作为有效的替代方案,由于该技术不依赖于特定基因片段,能够实现非特异性扩增,从而更准确地评估其片段大小及含量。此外,以 LAMP 和 RPA 为代表的等温扩增技术的发展,也为 rcDNA 快速检测提供了新的研究方向。这些技术的不断发展,有助于完善生物制品的质量控制体系,从而保障其临床应用的安全性和有效性,为人类健康事业的发展提供更有力的支持。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 版.三部[S]. 2020: 700  
ChP 2020. Vol III [S]. 2020: 700
- [2] SELEN A, DICKINSON PA, MÜLLERTZ A, *et al.* The biopharmaceutics risk assessment roadmap for optimizing clinical drug product performance [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(11): 3377
- [3] 闫璐瑶,张家友,张青梅,等. 宿主细胞残留 DNA 片段大小分布

- 检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(3): 335
- YAN LY, ZHANG JY, ZHANG QM, *et al.* Development and validation of a method for detection of size distribution of residual host cell DNA fragments[J]. *Chin J Biol*, 2021, 34(3): 335
- [4] 吕萍, 杨志行, 张慧, 等. CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒(PCR-Taqman 探针法)的方法学验证[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(21): 2519
- LÜ P, YANG ZX, ZHANG H, *et al.* Method validation of CHO host cell residual DNA quantitative kit(PCR-Taqman probe)[J]. *Chin J New Drugs*, 2018, 27(21): 2519
- [5] DE SCHUTTER K, LIN YC, TIELS P, *et al.* Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris* [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 561
- [6] 刘晓志, 高健, 赵伟, 等. *Pichia* 酵母宿主细胞 DNA 残留量检测方法的建立[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2012, 36(1): 80
- LIU XZ, GAO J, ZHAO W, *et al.* Development of a method for determination of residual DNA in *Pichia pastoris* host cells[J]. *J Hebei Normal Univ (Nat Sci)*, 2012, 36(1): 80
- [7] 刘金华, 吴月丹, 史艳宇, 等. DNA 聚合酶中宿主细胞核酸残留的分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(9): 1223
- LIU JH, WU YD, SHI YY, *et al.* Analysis of residual host cell nucleic acid in DNA polymerase[J]. *Chin J Biol*, 2012, 25(9): 1223
- [8] 徐宏山, 黄艳秋, 刘欣玉, 等. 新一代高通量 RNA 测序在黄热减毒活疫苗(鸡胚细胞)毒种库质控中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(11): 1335
- XU HS, HUANG YQ, LIU XY, *et al.* Application of new generation high-throughput RNA sequencing in quality control of live attenuated yellow fever vaccine (chicken embryo cell) virus seed bank[J]. *Chin J Biol*, 2023, 36(11): 1335
- [9] YANG H, WEI Z, SCHENERMAN M. A statistical approach to determining criticality of residual host cell DNA[J]. *J Biopharm Stat*, 2015, 25(2): 234
- [10] SHENG-FOWLER L, LEWIS JR. AM, PEDEN K. Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines[J]. *Biologicals*, 2009, 37(3): 190
- [11] LEE DH, BAE JE, LEE JH, *et al.* Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(10): 1463
- [12] 王光裕, 胡倩, 史新昌, 等. 重组腺相关病毒中游离与错误包装宿主细胞 DNA 检测的两种前处理方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(5): 527
- WANG GY, HU Q, SHI XC, *et al.* Comparison of two pretreatment methods for detection of free and mispackaged host cell DNA in recombinant adeno-associated virus[J]. *Chin J Biol*, 2024, 37(5): 527
- [13] 蒋惠源, 张培培, 仇雅静, 等. 荧光定量 PCR 方法检测头孢类产品中的残留 DNA[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(12): 1385
- JIANG HY, ZHANG PP, QIU YJ, *et al.* Detection of residual DNA in cephalosporin products by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. *Chin J Antibiot*, 2023, 48(12): 1385
- [14] FERREIRÓS A, PEDROSA P, DA SILVA-ÁLVAREZ S, *et al.* Context-dependent impact of RAS oncogene expression on cellular reprogramming to pluripotency[J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(5): 1099
- [15] ANDRÉ M, REGHIN S, BOUSSARD E, *et al.* Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines[J]. *Biologicals*, 2016, 44(3): 139
- [16] ZHENG WF, JIANG L, LEI Q, *et al.* Development and validation of quantitative real-time PCR for the detection of residual CHO host cell DNA and optimization of sample pretreatment method in biopharmaceutical products[J]. *Biol Proced Online*, 2019, 21(1): 17
- [17] KNEZEVIC I, STACEY G, PETRICCIANI J, *et al.* Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: revision of WHO recommendations[J]. *Biologicals*, 2009, 38(1): 162
- [18] SOMMERS C, ROSENZWEIG B, OUM L, *et al.* Quantitation of residual host cell DNA in protaminesulfate drug product by qPCR[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 160: 238
- [19] VERNAY O, SARCEY E, DETREZ V, *et al.* Comparative analysis of the performance of residual host cell DNA assays for viral vaccines produced in Vero cells[J]. *J Virol Methods*, 2019, 268: 9
- [20] 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
- WANG L, WANG JZ. Issues on quality control of residual DNA in biological products[J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(8): 678
- [21] 王光裕, 史新昌, 杨靖清, 等. qPCR 在重组腺相关病毒产品大片段宿主细胞残留 DNA 检测中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(7): 775
- WANG GY, SHI XC, YANG JQ, *et al.* Applied research on qPCR for determination of large fragment host cell residual DNA in recombinant adeno-associated virus products[J]. *Chin J Biol*, 2024, 37(7): 775
- [22] 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
- QIU SH, FANG X, ZHAO R, *et al.* Analysis on influencing factors of determination of residual DNA in recombinant hepatitis B vaccine bulk by fluorescence method[J]. *Chin J Drug Eval*, 2014, 31(5): 257
- [23] 周飞燕, 孔雯雯, 符美娟. 原核与真核生物宿主 DNA 残留检测方法的建立与比较[J]. 今日药学, 2017, 27(6): 372
- ZHOU FY, KONG WW, FU MJ. Comparative study on the method of residual DNA in prokaryotic and eukaryotic host[J]. *Pharm Today*, 2017, 27(6): 372
- [24] LI SM, BAI FL, XU WJ, *et al.* Removing residual DNA from Vero-cell culture-derived human rabies vaccine by using nuclease[J]. *Biologicals*, 2014, 42(5): 271
- [25] SHEN X, CHEN X, TABOR DE, *et al.* Size analysis of residual

- host cell DNA in cell culture-produced vaccines by capillary gel electrophoresis [J]. *Biologicals*, 2013, 41 ( 3 ): 201
- [ 26 ] MONTOMOLI E, KHADANG B, PICCIRELLA S, *et al.* Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production [J]. *Expert Rev Vacc*, 2012, 11 ( 5 ): 587
- [ 27 ] LAURO ML, BOWMAN AM, SMITH JP, *et al.* Overcoming biopharmaceutical interferents for quantitation of host cell DNA using an automated, high-throughput methodology [J]. *AAPS J*, 2022, 25 ( 1 ): 10
- [ 28 ] YANG H, ZHANG L, GALINSKI M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products [J]. *Vaccine*, 2010, 28 ( 19 ): 3308
- [ 29 ] SOLTANY-REZAEI-RAD M, SEPEHRIZADEH Z, MOTTAGHI-DASTJERDI N, *et al.* Comparison of SYBR green and TaqMan real-time PCR methods for quantitative detection of residual CHO host-cell DNA in biopharmaceuticals [J]. *Biologicals*, 2015, 43 ( 2 ): 130
- [ 30 ] WANG X, MORGAN DM, WANG G, *et al.* Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and quantitation technologies and future directions [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109 ( 2 ): 307
- [ 31 ] GHOLIZADEH-HASHJIN A, ABEDI N, HEIDARI HR, *et al.* Direct quantitative detection of host cell residual DNA in recombinant filgrastim by qPCR [J]. *Anal Biochem*, 2021, 629: 114296
- [ 32 ] PEDEN K, SHENG L, PAL A, *et al.* Biological activity of residual cell-substrate DNA [J]. *Dev Biol*, 2006, 123: 45
- [ 33 ] SHENG L, CAI F, ZHU Y, *et al.* Oncogenicity of DNA *in vivo*: tumor induction with expression plasmids for activated H-ras and c-myc [J]. *Biologicals*, 2008, 36 ( 3 ): 184
- [ 34 ] NYOMBAYIRE J, ANZALA O, GAZZARD B, *et al.* First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of an intranasally administered replication-competent sendai virus-vectored HIV type 1 gag vaccine: induction of potent T-cell or antibody responses in prime-boost regimens [J]. *J Infect Dis*, 2017, 215 ( 1 ): 95
- [ 35 ] 许洪林, 杨春亭. CpG-ODNs 疫苗佐剂的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23 ( 1 ): 36
- XU HL, YANG CT. Progress in research on CpG-ODNs as vaccine adjuvants [J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23 ( 1 ): 36
- [ 36 ] KAYRAKLIOGLU N, HORULUOGLU B, KLINMAN DM. CpG oligonucleotides as vaccine adjuvants [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2197: 51
- [ 37 ] URSU R, CARPENTIER AF. Immunotherapeutic approach with oligodeoxynucleotides containing CpG motifs ( CpG-ODN ) in malignant glioma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 746: 95
- [ 38 ] GUNAWARDANA T, AHMED KA, GOONEWARDENE K, *et al.* CpG-ODN induces a dose-dependent enrichment of immunological niches in the spleen and lungs of neonatal chicks that correlates with the protective immunity against *Escherichia coli* [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 2704728
- [ 39 ] DHAKAL S, GHIMIRE S, RENU S, *et al.* Evaluation of CpG-ODN-adjuvanted polyanhydride-based intranasal influenza nanovaccine in pigs [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 237: 108401
- [ 40 ] GUNAWARDANA T, AHMED KA, GOONEWARDENE K, *et al.* Synthetic CpG-ODN rapidly enriches immune compartments in neonatal chicks to induce protective immunity against bacterial infections [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 ( 1 ): 1
- [ 41 ] HAM WK, LEE EJ, JEON MS, *et al.* Treatment with phosphodiester CpG-ODN ameliorates atopic dermatitis by enhancing TGF- $\beta$  signaling [J]. *BMB Reports*, 2021, 54 ( 2 ): 142
- [ 42 ] ISENBERG D, SHOENFELD Y. The origin and significance of anti-DNA antibodies [J]. *Immunol Today*, 1987, 8 ( 9 ): 279
- [ 43 ] PISETSKY DS, GARZA REYNA A, BELINA ME, *et al.* The interaction of anti-DNA antibodies with DNA: evidence for unconventional binding mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 ( 9 ): 5227
- [ 44 ] AL ARFAJ AS, CHOWDHARY AR, KHALIL N, *et al.* Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol*, 2007, 124 ( 1 ): 83
- [ 45 ] MUSTAFA I, AHMAD S, DIXIT K, *et al.* Glycated human DNA is a preferred antigen for anti-DNA antibodies in diabetic patients [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 95 ( 1 ): 98
- [ 46 ] FRANCHIN G, SON M, KIM SJ, *et al.* Anti-DNA antibodies cross-react with C1q [J]. *J Autoimmun*, 2013, 44: 34
- [ 47 ] GONZÁLEZ RODRÍGUEZ C, APARICIO HERNÁNDEZ M, ALARCÓN TORRES I. Update and clinical management of anti-DNA auto-antibodies [J]. *Adv Lab Med*, 2021, 2 ( 3 ): 313
- [ 48 ] BUAKLIN A, PALAGA T, HANNAMAN D, *et al.* Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56 ( 10 ): 903
- [ 49 ] LI L, PETROVSKY N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity [J]. *Exp Rev Vaccines*, 2016, 15 ( 3 ): 313
- [ 50 ] MESHKAT Z, TEIMOURPOUR A, RASHIDIAN S, *et al.* Immunogenicity of a DNA vaccine encoding Ag85a-Tb10.4 antigens from mycobacterium tuberculosis [J]. *Iran J Immunol*, 2016, 13 ( 4 ): 289
- [ 51 ] ZHOU J, DENG GM. The role of bacterial DNA containing CpG motifs in diseases [J]. *J Leukocyte Biol*, 2021, 109 ( 5 ): 991
- [ 52 ] LIANG L, CAO C, JI L, *et al.* Complementary Alu sequences mediate enhancer-promoter selectivity [J]. *Nature*, 2023, 619 ( 7971 ): 868
- [ 53 ] LU JY, CHANG L, LI T, *et al.* Homotypic clustering of L1 and B1/Alu repeats compartmentalizes the 3D genome [J]. *Cell Res*, 2021, 31 ( 6 ): 613
- [ 54 ] 葛瑞泉, 王善, 李焯, 等. 大规模基因组重复序列识别与分类研究进展 [J]. *集成技术*, 2017, 6 ( 5 ): 55
- GE RQ, WANG P, LI Y, *et al.* Research progress on large scale repeat identification and classification in genomes [J]. *J Integr Technol*, 2017, 6 ( 5 ): 55

- [ 55 ] MILLER I, TOTROV M, KOROTCHKINA L, *et al.* Structural dissection of sequence recognition and catalytic mechanism of human LINE-1 endonuclease [ J ]. *Nucl Acid Res*, 2021, 49 ( 19 ): 11350
- [ 56 ] D'ORDINE AM, JOGL G, SEDIVY JM. Identification and characterization of small molecule inhibitors of the LINE-1 retrotransposon endonuclease [ J ]. *Nat Commun*, 2024, 15 ( 1 ): 3883
- [ 57 ] 韩德民, 周开亚, 王义权. 短散在元件 ( SINE ) 的研究进展 [ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 2000 ( 5 ): 461  
HAN DM, ZHOU KY, WANG YQ. Recent achievements of research on short interspersed elements [ J ]. *Prog Biochem Biophys*, 2000 ( 5 ): 461
- [ 58 ] 韩亚伟. 短散在核重复序列 ( SINEs ) 的分离及在鲤科鱼类系统进化研究中的应用 [ D ]. 武汉: 中国科学院研究生院 ( 水生生物研究所 ), 2006  
HAN YW. Isolation of Short Interspersed Elements ( SINEs ) and Application in Phylogentic Study of Cyprinidae [ D ]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006
- [ 59 ] ZHANG T, ZHENG R, LI M, *et al.* Active endogenous retroviral elements in human pluripotent stem cells play a role in regulating host gene expression [ J ]. *Nucl Acid Res*, 2022, 50 ( 9 ): 4959
- [ 60 ] GLINSKY GV. Molecular diversity and phenotypic pleiotropy of ancient genomic regulatory loci derived from human endogenous retrovirus type H ( HERVH ) promoter LTR7 and HERVK promoter LTR5\_Hs and their contemporary impacts on pathophysiology of modern humans [ J ]. *Mol Genet Genomics*, 2022, 297 ( 6 ): 1711
- [ 61 ] SOKOL M, JESSEN KM, PEDERSEN FS. Utility of next-generation RNA-sequencing in identifying chimeric transcription involving human endogenous retroviruses [ J ]. *APMIS*, 2016, 124 ( 1-2 ): 127
- [ 62 ] 罗依妮, 王露. 转座子的研究现状 [ J ]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46 ( 7 ): 1323  
LUO YN, WANG L. The function and regulation of transposons [ J ]. *Chin J Cell Biol*, 2024, 46 ( 7 ): 1323
- [ 63 ] MUÑOZ-LÓPEZ M, GARCÍA-PÉREZ JL. DNA transposons: nature and applications in genomics [ J ]. *Curr Genomics*, 2010, 11 ( 2 ): 115
- [ 64 ] 张炳森. 基因组 DNA 重组位点识别研究 [ D ]. 济南: 山东大学, 2023  
ZHANG BS. Identification of Genomic DNA Recombination Sites [ D ]. Jinan: Shandong University, 2023
- [ 65 ] MODZELEWSKI AJ, GAN CHONG J, WANG T, *et al.* Mammalian genome innovation through transposon domestication [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24 ( 9 ): 1332
- [ 66 ] SINZELLE L, IZSVÁK Z, IVICS Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes [ J ]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66 ( 6 ): 1073
- [ 67 ] FUEYO R, JUDD J, FESCHOTTE C, *et al.* Roles of transposable elements in the regulation of mammalian transcription [ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23 ( 7 ): 481
- [ 68 ] LU JY, SHAO W, CHANG L, *et al.* Genomic repeats categorize genes with distinct functions for orchestrated regulation [ J ]. *Cell Rep*, 2020, 30 ( 10 ): 3296
- [ 69 ] NIU Y, TENG X, ZHOU H, *et al.* Characterizing mobile element insertions in 5675 genomes [ J ]. *Nucl Acid Res*, 2022, 50 ( 5 ): 2493
- [ 70 ] GLINSKY GV. Transposable elements and DNA methylation create in embryonic stem cells human-specific regulatory sequences associated with distal enhancers and noncoding RNAs [ J ]. *Genome Biol Evol*, 2015, 7 ( 6 ): 1432
- [ 71 ] 程小玲, 施金荣, 张雪婷, 等. SARS-CoV-2 灭活疫苗 ( Vero 细胞 ) 中宿主细胞 DNA 残留量荧光定量 PCR 检测方法的建立及验证 [ J ]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 ( 7 ): 839  
CHENG XL, SHI JR, ZHANG XT, *et al.* Development and verification of a quantitative real-time PCR method for determination of host cell DNA residues in inactivated SARS-CoV-2 vaccine ( Vero cells ) [ J ]. *Chin J Biol*, 2023, 36 ( 7 ): 839
- [ 72 ] WANG W, GAO T, LUO J, *et al.* Size distribution analysis of residual host cell DNA fragments in lentivirus by CGE-LIF [ J ]. *Electrophoresis*, 2022, 44 ( 3-4 ): 462
- [ 73 ] LYU X, ZHAO Q, HUI J, *et al.* The global landscape of approved antibody therapies [ J ]. *Antib Ther*, 2022, 5 ( 4 ): 233
- [ 74 ] ANDRADE CL, HERRERA MAO, LEMES EMB. A model of risk analysis in analytical methodology for biopharmaceutical quality control [ J ]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2018, 72 ( 3 ): 317
- [ 75 ] YANG H, ZHANG J. A bayesian approach to residual host cell dna safety assessment [ J ]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2016, 70 ( 2 ): 157
- [ 76 ] CHANG JT, CHEN YC, CHOU YC, *et al.* Quantitative detection of residual porcine host cell DNA by real-time PCR [ J ]. *Biologicals*, 2014, 42 ( 2 ): 74
- [ 77 ] YANG H. Establishing acceptable limits of residual DNA [ J ]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, 67 ( 2 ): 155
- [ 78 ] 闫璐瑶, 张家友, 杨晓明. 生物制品中宿主细胞残留 DNA 检测的研究进展 [ J ]. *国际生物制品学杂志*, 2021, 44 ( 3 ): 170  
YAN LY, ZHANG JY, YANG XM. Research progress on detection of host cell residual DNA in biological products [ J ]. *Int J Biol*, 2021, 44 ( 3 ): 170
- [ 79 ] 贾惠言, 姚雪静. 生物制品宿主细胞残留 DNA 检测限定标准及方法浅析 [ J ]. *药学研究*, 2018, 37 ( 2 ): 115  
JIA HY, YAO XJ. Detection of host cells residual DNA in biological drugs [ J ]. *J Pharm Res*, 2018, 37 ( 2 ): 115
- [ 80 ] 艾军文. 抗体药物中宿主细胞残留 DNA 检测方法的建立和验证 [ D ]. 广州: 华南理工大学, 2018  
AI JW. Establishment and Validation of Host Cell Residual DNA Detection Method in Therapeutic Antibody [ D ]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [ 81 ] 柳常青, 王霞, 汲生芝, 等. 甘精胰岛素外源性 DNA 残留量的荧光染色法检测研究 [ J ]. *中国医药生物技术*, 2017, 12 ( 5 ): 453  
LIU CQ, WANG X, JI SZ, *et al.* Research on the detection of exogenous DNA residue in glargine insulin by fluorescence staining method [ J ]. *Chin Med Biotechnol*, 2017, 12 ( 5 ): 453

- [82] 陈凌,王永智,雷高新,等. 荧光染色法检测  $\gamma$ -环糊精 DNA 残留量方法验证研究[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(5): 532  
CHEN L, WANG YZ, LEI GX, *et al.* Validation study on the method for detecting  $\gamma$ -cyclodextrin DNA residue by fluorescence staining[J]. *Chin Med Biotechnol*, 2020, 15(5): 532
- [83] 王秋红,郑绍红. 荧光染色法测定生物制品中 DNA 残留量的研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(6): 66  
WANG QH, ZHENG SH. Studies on the method of residual DNA in biological products by fluorescence method[J]. *Strait Pharm J*, 2016, 28(6): 66
- [84] 霍晶晶,武小琪,郭勇,等. 定量 PCR 法和 DNA 杂交法检测聚乙二醇修饰尿酸酶原液中 DNA 残留量的比较[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1868  
HUO JJ, WU XQ, GUO Y, *et al.* Comparison of quantitative PCR and DNA hybridization for detection of residual DNA in PEGylated uricase stock solution[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(14): 1868
- [85] 梁增伟. 重组人脑利钠肽中大肠埃希菌菌体蛋白质残留量与外源性 DNA 残留量测定法的建立[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2023  
LIANG ZW. Determination of *Escherichia coli* Host Cell Protein and Exogenous DNA Residue in Recombinant Human Brain Natriuretic Peptide[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2023
- [86] 刘莹,张春琪,刘玉林,等. QPCR 法与 DNA 探针杂交法检测重组人生长激素原液中残余 DNA 的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(2): 199  
LIU Y, ZHANG CQ, LIU YL, *et al.* Comparison of QPCR and DNA probe hybridization in determination of residual DNA in recombinant human growth hormone[J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(2): 199
- [87] 杨萍,孙博,刘大维,等. 阈值法检测人用狂犬病疫苗宿主细胞 DNA 残留量[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(7): 806  
YANG P, SUN B, LIU DW, *et al.* Determination of residual host cell DNA in rabies vaccine for human use by threshold method[J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(7): 806
- [88] 赵欣,李敏,罗建辉. 人用狂犬病疫苗(Vero 细胞)DNA 残留控制的相关探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(10): 1164  
ZHAO X, LI M, LUO JH. Discussion on the control of DNA residue in human rabies vaccine(Vero cells)[J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(10): 1164
- [89] 曹守春,李玉华,徐康为,等. 阈值法检测人用狂犬病疫苗 Vero 细胞 DNA 残留量方法的建立及初步验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(3): 423  
CAO SC, LI YH, XU KW, *et al.* Development and preliminary verification of threshold method for residual Vero cell DNA in rabies vaccine for human use[J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(3): 423
- [90] 张培,胡倩,李盼盼,等. 两种测定生物制品宿主细胞 DNA 残留量方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(6): 683  
ZHANG P, HU Q, LI PP, *et al.* Development of two methods for determination of residual host cell DNA in biological products[J]. *Chin J Biol*, 2019, 32(6): 683
- [91] 李炎,陈捷,蒋佳兴,等. 实时荧光定量 PCR 法检测门冬氨酸鸟氨酸原料药中毕赤酵母菌 DNA 残留量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(8): 1158  
LI Y, CHEN J, JIANG JX, *et al.* Detection of residual DNA of pichia pastoris in ornithine aspartate by real-time PCR[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2018, 35(8): 1158
- [92] HUSSAIN M. Isothermal droplet digital PCR method for quantification of CHO residual DNA[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 211: 114564
- [93] HIGASHIYAMA K, YUAN Y, HASHIBA N, *et al.* Quantitation of residual host cell DNA in recombinant adeno-associated virus using droplet digital polymerase chain reaction[J]. *Human Gene Therapy*, 2023, 34(11-12): 578
- [94] WANG Y, COOPER R, BERGELSON S, *et al.* Quantification of residual BHK DNA by a novel droplet digital PCR technology[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 477
- [95] ANDERSON J, MUSADDEQ H. A direct droplet digital PCR method for *E. coli* host residual DNA quantification[J]. *Pharmacol Pharm*, 2018, 9(4): 117
- [96] 潘衍宇,竺文杰,金东新,等. 建设基于下一代测序技术(NGS)的传染病监测预警平台构想[J]. 中国口岸科学技术, 2024, 6(3): 4  
PAN YY, ZHU WJ, JIN DX, *et al.* The establishment of an early warning platform for infectious disease surveillance based on next-generation sequencing technology[J]. *China Port Sci Technol*, 2024, 6(3): 4
- [97] ITOH T, ONUKI R, TSUDA M, *et al.* Foreign DNA detection by high-throughput sequencing to regulate genome-edited agricultural products[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 4914
- [98] LIU XZ, ZHANG B, ZHAO W, *et al.* Method validation of Q-PCR detection of host residual DNA in antibody drug based on protein A magnetic beads[J]. *Biologicals*, 2019, 62: 65
- [99] ZHANG SM, ROBERTS M, JONES M, *et al.* A novel method for removing polyethyleneimine from biopharmaceutical samples: improving assay sensitivity of residual DNA qPCR[J]. *Biotechniques*, 2020, 68(6): 353
- [100] 胡蓓娜,缪敏慧,江海强. 酚氯仿法和快速煮沸法提取阴道毛滴虫 DNA 效果比较[J]. 白求恩医学杂志, 2020, 18(5): 499  
HU BN, MIAO MH, JIANG HQ. Comparative study on the extraction effect of DNA from *Trichomonas vaginalis* by phenol-chloroform method and rapid boiling method[J]. *J Bethune Med Sci*, 2020, 18(5): 499
- [101] ISHIZAWA M, KOBAYASHI Y, MIYAMURA T, *et al.* Simple procedure of DNA isolation from human serum[J]. *Nucl Acid Res*, 1991, 19(20): 5792
- [102] 陈思秀,张馨方,刘玟妍,等. 阿胶中动物源性 DNA 提取方法的改进及驴源性成分鉴定[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(22): 1840  
CHEN SX, ZHANG XF, LIU WY, *et al.* Improvement of extraction method of animal-derived DNA from Colla Corii Asini and identification of donkey-derived components[J]. *Chin Pharm J*,

- 2019, 54(22): 1840
- [ 103 ] 王希彩,白露,孙嘉宏,等.磁珠法提取鸡血液基因组 DNA 效果研究[J].中国家禽,2023,45(6):111  
WANG XC, BAI L, SUN JH, *et al.* Study on the effect of magnetic bead method on the extraction of chicken genomic DNA[J]. *China Poultry*, 2023, 45(6): 111
- [ 104 ] SCHULZ A, SADEGHI B, STOEK F, *et al.* Whole-genome sequencing of six neglected arboviruses circulating in Africa using sequence-independent single primer amplification (SISPA) and MinION nanopore technologies[J]. *Pathogens*, 2022, 11(12): 1502
- [ 105 ] XU QN, ZHANG JY, LI L, *et al.* Evaluating the amplification efficiency of the MALBAC® single-cell DNA Kit for trace DNA[J]. *Forensic Sci Int*, 2019, 7(1): 351
- [ 106 ] LAN Y, ZHOU H, HE S, *et al.* Appropriate whole genome amplification and pathogenic loci detection can improve the accuracy of preimplantation genetic diagnosis for deletional  $\alpha$ -thalassemia[J]. *Front Endocrinol*, 2024, 14: 1176063
- [ 107 ] LI Y, KIM HJ, ZHENG C, *et al.* Primase-based whole genome amplification[J]. *Nucl Acid Res*, 2008, 36(13): e79
- [ 108 ] 杨华,吴卓,李春苑,等.多次退火环状循环扩增联合高通量测序技术在体外受精胚胎无创检测非整倍体中的应用[J].基因组学与应用生物学,2021,40(Z1):2356  
YANG H, WU Z, LI CY, *et al.* Application of multiple annealing and looping-based amplification cycles combined with next-generation sequencing technology in non-invasive detection of aneuploidy *in vitro* fertilized embryos[J]. *Genomics Appl Biol*, 2021, 40(Z1): 2356
- [ 109 ] 陈伟珊.质粒克隆法用于提高单细胞全基因组扩增产物质量的探究[D].广州:南方医科大学,2023  
CHEN WS. The Analysis of Plasmid-cloning Method to Improve the Quality of Single Cell Whole Genome Amplification Products[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2023
- [ 110 ] 罗丽婷,蒋君梅,李向阳,等.环介导等温扩增(LAMP)技术在果树病毒病检测中的应用[J].山地农业生物学报,2022,41(5):43  
LUO LT, JIANG JM, LI XY, *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in virus disease detection of fruit trees[J]. *J Mountain Agric Biol*, 2022, 41(5): 43
- [ 111 ] HAMBALÉK JA, KONG JE, BROWN C, *et al.* Methylation-sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP): nucleic acid methylation detection through LAMP with mobile fluorescence readout[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(9): 3242
- [ 112 ] LEE PL. DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP[J]. *Mol Ecol Resour*, 2017, 17(2): 138
- [ 113 ] CHEN CM, OUYANG S, LIN LY, *et al.* Diagnostic accuracy of LAMP assay for HBV infection[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(7): e23281
- [ 114 ] CHEN K, MA B, LI J, *et al.* A rapid and sensitive europium nanoparticle-based lateral flow immunoassay combined with recombinase polymerase amplification for simultaneous detection of three food-borne pathogens[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(9): 4574
- [ 115 ] LI JL, MA B, FANG JH, *et al.* Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food[J]. *Foods*, 2019, 9(1): 27
- [ 116 ] 王帅,杨艳歌,吴占文,等.重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J].食品科学,2023,44(9):297  
WANG S, YANG YG, WU ZW, *et al.* A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens[J]. *Food Sci*, 2023, 44(9): 297

(本文于2024年8月16日收到)