



Общество с ограниченной ответственностью  
**«Биолабмикс»**  
ИНН 5408278957 КПП 540801001  
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,  
ул. Инженерная, дом № 28  
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40  
E-mail: sales@biolabmix.ru

## Паспорт набора

### **Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК СНО методом ПЦР-РВ**

Кат. номер: KDE002

## Оглавление

Область применения

Общая информация

Описание и принципы

Условия хранения

Состав набора

Необходимые материалы, не входящие в набор

Рекомендации при работе

Подготовка реагентов

Описание аналитической методики

1. Выделение ДНК из образцов
2. Амплификация образцов
3. Обработка полученных данных

## Область применения

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК СНО методом ПЦР-РВ» предназначен для оценки количества примесей ДНК штамма продуцента на основе клеточной линии СНО (Chinese hamster ovary, *англ.* клетки яичника китайского хомячка) в белковых препаратах в соответствии с требованиями фармакопеи.

Набор предназначен только для исследований, разработки процесса, мониторинга в процессе выпуска партии и тестирования QC на основе клеточной линии СНО и не может быть использован для диагностики у людей и животных.

## Общая информация

В настоящее время активное развитие получили биотехнологии, основанные на продуцировании белковых препаратов как для исследовательских, так и для медицинских целей. СНО (Chinese hamster ovary, *англ.* клетки яичника китайского хомячка) являются клеточной линией эпителиальных клеток, полученных из яичников китайского хомячка *Cricetulus barabensis griseus*, широко используемой в научных и медицинских исследованиях, в том числе при коммерческом производстве терапевтических рекомбинантных белковых препаратов, так как было показано, что гликозилирование и пост-трансляционные модификации таких препаратов, наиболее близки к соответствующим модификациям, происходящим при синтезе белка у человека. Было показано, что при наработке биологически активных веществ в эукариотических клетках существует вероятность заражения инфекционными заболеваниями или переноса онкогенов из клетки-хозяина. Всемирной Организацией Здравоохранения был установлен предел концентрации остаточной ДНК-хозяина – 10 нг на дозу, однако, для некоторых линии клеток, режима и частоты дозирования полученных с использованием продуцентов биологических препаратов, предел составляет 100 мкг на дозу. Определение остаточной ДНК возможно реакцией гибридизации с радиоактивными или флуоресцентными зондами, прямым неспецифическим связыванием ДНК с

флуоресцентными красителями (PicoGreen, SYBR Green I); а также при использовании ПЦР со специфических праймерами к гену устойчивости к ампициллину (ген  $\beta$ -лактамазы, или *b/a*-ген). Все перечисленные выше методы либо не обладают достаточной специфичностью, либо не являются количественными.

Количественные анализы на основе ПЦР в реальном времени (qPCR) в настоящее время является одним из наиболее специфичных, точных, простых и быстрых методов анализа наличия ДНК в исследуемых образцах. Однако, при работе биологически активными препаратами, стоит учитывать, что некоторые компоненты препарата могут исказить результаты ПЦР, что приведет к ложной оценке количества ДНК в образце. В данном наборе применяется оригинальная процедура высокоэффективной экстракции ДНК из сложных растворов, что дает возможность получить образец для постановки ПЦР без загрязняющих белков, солей и моющих средств. Таким образом, при использовании набора возможно провести точную оценку количества остаточной ДНК клетки-хозяина, и, как следствие, оценить качество выпускаемого биологически активного продукта, согласно установленным ВОЗ нормам.

«Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *CHO* методом ПЦР-РВ» охарактеризована по специфичности, пределу обнаружения и прецизионности в соответствии с требованиями фармакопеи.

### **Описание и принципы**

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *CHO* методом ПЦР-РВ» включает в себя все необходимое для проведения анализа наличия и количественного определения остаточной ДНК *CHO* в исследуемых образцах. В состав набора входят реагенты для выделения ДНК и удаления ингибиторов ПЦР, 2× реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR (2×), стандартный раствор ДНК и набор специфичных праймеров и зондов к консервативному участку геномной ДНК *CHO*. Преимущество метода с использованием зонда в ПЦР реакции, состоит в высокой степени специфичности, в отличие от интеркалирующих красителей, а также более высокая точность результатов исследования.

Для проведения анализа готовят серию разведений стандартов и проводят выделение образцов, согласно прилагаемой инструкции. После, подготавливают реакционную смесь без добавления матриц для полимеразной цепной реакции и вносят ее в предоставленный в наборе ПЦР-планшет проведения ПЦР в реальном времени. Затем, образцы, стандарты, положительные и отрицательные контроли переносят в подготовленную реакционную смесь, распределенную в планшете. После, планшет запечатывают оптически прозрачной плёнкой, прилагаемой к набору, и проводят амплификацию в течение 45 циклов.

Визуализация хода реакции происходит с помощью кривых амплификации. Кривые амплификации отражают зависимость накопления флуоресцентного сигнала,

который пропорционален количеству ПЦР-продукта, от цикла, и соответствующих им значений  $C_q$ , которые отражают цикл начала увеличения флуоресценции, на котором сигнал уже достоверно отличим от приборного шума, но при этом еще наблюдается экспоненциальный рост сигнала. Эта величина прямо пропорциональна логарифму исходной концентрации ДНК-мишени, внесенной в реакционную смесь. Полученные в ходе реакции значения  $C_q$  и введенные при постановке реакции концентрации для стандартов используются программным обеспечением амплификатора для построения калибровочной кривой. С использованием калибровочной кривой, ПО прибора автоматически рассчитывает концентрацию в 10 мкл образца для контрольных и анализируемых образцов. Предел обнаружения остаточной ДНК набором составляет 5 фг в 10 мкл выделенного образца, что составляет менее одной клетки на выделение.

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *СНО* методом ПЦР-РВ» включает все необходимые компоненты для проведения полного цикла анализа наличия остаточной ДНК *СНО*. Выделение ДНК облегчается окраской видимого осадка, что позволяет упростить процесс экстракции, в то время как наличие в наборе готовой ПЦР-смеси позволяет сократить количество пипетирований и, таким образом, уменьшить вероятность контаминации.

### Условия хранения

Если планируется полностью использовать набор в течении 4-х месяцев, то он может храниться в упакованном состоянии при +2 - +8 °С.

Если использование набора предполагает более 4-х месяцев с момента получения, необходимо пробирки с растворами Протеиназа К, ДНК-стандарт 10 нг/10 мкл, Смесь праймеров (10×) и 2× реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) поместить на -20 °С.

### Состав набора:

Компонент	Количество, мл (шт)
Протеиназа К	0,15
Буфер для разведения	30
Буфер для экстракции	30
Раствор для осаждения	55
Раствор для промывки	85
10×TE буфер	20
ДНК-стандарт 10 нг/10 мкл	0,1
Смесь праймеров (10×)	0,35
БиоМастер UDG HS-qPCR (2×)	1,6
96-луночный планшет	1
Пробирки 1,5 мл	10
Оптически прозрачная плёнка для запечатывания ПЦР-планшетов	1

### Необходимые материалы, не входящие в набор

1. Амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени
2. Вортекс персональный
3. Дозаторы автоматические переменного объема
4. Микроцентрифуга

5. Микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл
6. Наконечники с фильтром на автоматические дозаторы вместимостью 2, 10, 100, 200, 1000 мкл
7. Настольный твердотельный термостат
8. Штатив для микропробирок
9. Стерильная вода (Кат№ SP010-05)
10. Пробирка типа Falcon 15 мл
11. Гидрофильные салфетки или фильтровальная бумага

### **Рекомендации при работе**

1. Рекомендуется использовать образцы с концентрацией белка до 20 мг/мл. Если образцы содержат белок свыше 20 мг/мл, убедитесь, что такие образцы после пробоподготовки не будут ингибировать ПЦР.
2. Высокая чувствительность метода предъявляет повышенные требования к чистоте рабочей поверхности. Перед началом работы обработайте рабочую поверхность и инструменты для защиты от попадания ДНК из окружения.
3. Организуйте свою работу таким образом, чтобы минимизировать количество манипуляций над планшетом или открытыми пробирками.
4. Стандартные растворы ДНК не должны подвергаться обработке протеиназой К или термической обработке. Работа с ними начинается со стадии добавления Буфера для экстракции.

### **Подготовка реагентов**

1. Перед началом эксперимента рекомендуется нагреть компоненты набора до комнатной температуры.
2. Заранее приготовьте 1×TE буфер для разведения протеиназы К (см.п.3) и конечных растворов для ПЦР (стандарты, контроли и образцы) из расчета 0,3 мл на один образец. Для этого используйте пробирку типа Falcon объемом 15 мл, стерильную воду и 10× TE буфер (входит в состав набора).
3. Разведите протеиназу К в 1×TE буфере 1:10. Например, при выделении ДНК из 50 образцов необходимо добавить 75 мкл протеиназы К к 675 мкл 1×TE буфера (включает 25% дополнительного объема на образец). Раствор протеиназы К должен быть свежеприготовленным для каждого случая выделения.

### **Описание аналитической методики**

1. Выделение ДНК из образцов
  - 1.1 *Приготовление рабочего раствора протеиназы К.* Непосредственно перед проведением процедуры раствор протеиназы К из набора реагентов для ПЦР развести в 1× TE-буфере в 10 раз. Раствор протеиназы К должен быть всегда свежеприготовленным.
  - 1.2 *Подготовка образцов.* Подготовка образцов. Подписать пробирки вместимостью 1,5 мл для разведения образцов и отрицательного контрольного образца (TE-буфер или стерильная вода). Образцы и контрольный образец развести Буфером для разведения либо до концентрации ДНК в пределах

аналитического диапазона (1 пг/мл – 10 нг/мл), либо по белку до конечной концентрации  $\leq 20$  мг/мл до конечного объема 238,5 мкл. Все образцы должны быть разведены как минимум 1:2 (т.е. 1 часть образца и 2 части Буфера для разведения).

- 1.3. Добавить в каждую пробирку по 12,5 мкл разведённой протеиназы К. Аккуратно перемешать на вортексе и сбросить капли, используя микро-центрифугу. Инкубировать в течение 30 мин при температуре 60 °С в сухом термостате. (растворы стандартных образцов не обрабатываются протеиназой К).
- 1.4. Центрифугировать пробирки в течение 1 мин при 10000 об/мин для устранения конденсата с крышек пробирок.
- 1.5. Во время инкубации образцов приготовить серию стандартов ДНК *CHO*. Для этого приготовить 6 микропробирок вместимостью 1,5 мл: подписать каждую, указав концентрацию от 10 нг/10 мкл до 10 фг/10 мкл с шагом один порядок (10 раз) и добавить в каждую пробирку по 250 мкл ТЕ буфера (для построения калибровочной кривой используются 5 стандартных растворов от 100 пг/10 мкл до 10 фг/10 мкл). Из пробирки ДНК-стандарт (ДНК *CHO* с концентрацией 10 нг/10 мкл) отобрать аликвоту объемом 27,8 мкл и перенести в пробирку 1 нг/10 мкл. Перемешать и сбросить капли. Отобрать аликвоту объемом 27,8 мкл из пробирки с первым полученным разведением и перенести во вторую подготовленную пробирку, перемешать и сбросить капли. Аналогичным образом поступить с последующими пробирками.
- 1.6. К приготовленным 250 мкл растворов стандартов, контролю и образцам добавить по 250 мкл *Буфера для экстракции*. Перемешать на вортексе каждую пробирку 5 сек.
- 1.7. Добавить к каждой пробирке по 0,5 мл *Раствора для осаждения*. Перемешать на вортексе 5 сек. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.
- 1.8. Центрифугировать пробирки 15 мин. при 10000 об/мин.
- 1.9. Убрать супернатант и оставить пробирки перевернутыми на 2-3 мин. на гидрофильной салфетке. Прижимать пробирки к гидрофильной безворсовой салфетке до полного устранения всех видимых жидкостей.
- 1.10. Добавить к каждой пробирке по 0,5 мл *Раствора для промывки*. Перемешать 5 сек. на вортексе (осадок может не сдвинуться с места). Инкубировать при комнатной температуре 20 мин (для достижения лучшего результата несколько раз перемешать в процессе инкубации).
- 1.11. Центрифугировать пробирки 5 мин при 10000 об/мин.
- 1.12. Убрать супернатант и оставить пробирки перевернутыми на 2-3 мин на гидрофильные салфетки. Прижимать пробирки к гидрофильной безворсовой салфетке до полного устранения всех видимых жидкостей (избегать сильного высушивания самого осадка).
- 1.13. Повторить шаги 1.10 – 1.12.
- 1.14. Растворить осадки в 250 мкл 1×ТЕ буфера, предварительно прогретого до 50 °С. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин, периодически помешивая.

## 2. Амплификация образцов.

2.1. Приготовить смесь для амплификации (2× реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) и Смесь праймеров (10×)) из расчёта 15 мкл на реакцию плюс 25% избыточный объем. Например, на 96-луночный планшет приготовить как на 120 реакций.

Реагент	мкл/реакция	Суммарный объем на 120 реакций (мкл)
Смесь праймеров	2,5	300
2 x реакционная смесь для ПЦР	12,5	1500

При расчёте объёма смеси для амплификации учитывают, что анализ каждого образца (стандарта и контрольного образца) проводится минимум в трёх лунках (в триплетах). Таким образом, если анализировать три субстанции белка с одним контрольным образцом, то необходимо приготовить смеси для амплификации на 33,75 реакции (с учетом 5-ти стандартных растворов).

- 2.2. Взять аликвоты по 15 мкл смеси для амплификации и перенести в лунки 96-луночного планшета для ПЦР.
- 2.3. Добавить в соответствующие лунки к смеси для амплификации по 10 мкл стандартов, тестовых образцов и отрицательный контроль.
- 2.4. Закрыть планшет оптически прозрачной пленкой.
- 2.5. Аккуратно перемешать планшет круговыми движениями в плоскости стола.
- 2.6. Поместить планшет в предварительно включенный амплификатор (термоциклер).
- 2.7. Запустить программу амплификации со следующими параметрами:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 сек	45
Отжиг/Элонгация	60	30 сек*	

\*- считывание флуоресценции по каналу Fam

## 3. Обработка полученных данных.

3.1. Результат реакции визуализируется в виде кривых амплификации, отражающих зависимость накопления сигнала флуоресценции (количества ПЦР-продукта) от цикла и соответствующих им значений  $C_q$ . Значения  $C_q$  для стандартов используются софтом амплификатора для построения калибровочной кривой, отражающей соотношение  $C_q$  к пг/10 мкл ДНК *СНО*. Чтобы прибор выдал результаты в заданной размерности необходимо при дизайне плашки задать стандартным растворам концентрации, как в таблице ниже:

С стандартного образца	Значение для прибора
10 фг/10 мкл	0,01
100 фг/10 мкл	0,1
1 пг/10 мкл	1
10 пг/10 мкл	10
100 пг/10 мкл	100

3.2. Если для отрицательного контрольного образца получено  $C_q$  с меньшим значением, чем  $C_q$  стандартного раствора 10 фг/10 мкл необходимо повторить постановку ПЦР части анализа. Если при повторном проведении ПЦР ситуация повторится, необходимо полностью повторить анализ.

3.3. Корректность проведенного анализа оценивается по значениям калибровочной кривой:

Параметр	Значение нормы	Действие при отклонении от нормы
Количество точек калибровочной кривой	5	Вероятная ошибка на стадии выделения. Повторить анализ сначала
Эффективность ПЦР (E)*	80 - 100% 1,6-2	Слишком высокая или слишком низкая эффективность указывает на вероятную ошибку при разведении стандартных образцов. Заново приготовить стандартные образцы и провести анализ повторно

\* разные амплификаторы оценивают эффективность реакции в разных единицах: это проценты 0-100% или коэффициент умножения числа копий ДНК-матрицы 0-2, где 2 это 100% эффективность.

3.4. С помощью калибровочной кривой, автоматически рассчитывается концентрация ( $C_{пр.}$ ) в пг/10 мкл ДНК *СНО* для анализируемых образцов в растворах, полученных в пункте 1.2, и выдается софтом амплификатора в виде значения для каждой ячейки и усреднённого значения для трёх повторов. Если из трёх повторов в образце два имеют близкое значение, а третий значительно отличается, его значение ненужно учитывать при оценке среднего значения для образца.

3.5. Для получения концентрации ( $C_{реал.}$ ) в нг/мл ДНК в исходных растворах белковых субстанций применим следующую формулу:

$$C_{реал.} = k * C_{пр.} * 100,$$

$$k = 250 / V_{суб.},$$

где  $V_{суб.}$  – объём исходной субстанции, взятой в разделе 1.2;

$C_{пр.}$  – концентрация ДНК *СНО* ( $C_{пр.}$ ) в пг/ 10 мкл из раздела 3.2

3.6. Разделив полученную в пункте 3.5. цифру на концентрацию белка в исходной субстанции в мг/мл, получим соотношение нг ДНК *СНО* на мг сухого белка.