



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

Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* методом ПЦР-РВ

Кат. номер: KDE001

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. *Аmplификация образцов*
3. *Обработка полученных данных*

Область применения

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* методом ПЦР-РВ» предназначен для оценки количества примесей ДНК штамма продуцента на основе клеточных линий *E. coli* (таких как *Bl21*, *Rosetta*, *TOP10*, *J5* и аналогичных) 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 рекомбинатных штаммов *E. Coli* и не может быть использован для диагностики у людей и животных.

Общая информация

Штаммы клеточных линий *E. coli* относятся к одним из наиболее распространенных суперпродуцентов. Экспрессия терапевтических белков в клетках *E. coli* является экономически эффективным методом для производства коммерческих количеств лекарственного вещества. Однако процесс изготовления и очистки этих продуктов оставляет потенциал для заражения ДНК клетками-хозяевами. Из-за теоретического потенциала переноса онкогенов из клетки-хозяина ВОЗ установила предел остаточной ДНК-хозяина в 10 нг / доза. Регулирующие органы установили допустимые пределы между 100 мкг / доза и 10 нг / доза, в зависимости от используемой линии клеток, а также от режима и частоты дозирования. Согласно требованиям европейской и американской фармакопей, количество ДНК в субстанциях, предназначенных для производства инъекционных препаратов, таких, как инсулин, соматропин, факторы свертывания крови VII и VIII, не должно превышать 7-10 нг на 1 мг сухого вещества (7-10 ppt). До настоящего времени остаточную ДНК клетки-хозяина в активных фармацевтических субстанциях определяли следующими методами: 1 – гибридизация с использованием радиоактивных или флуоресцентных зондов, как это рекомендовано фармакопеями Европы и США; 2 – прямое неспецифическое связывание ДНК с флуоресцентными красителями (PicoGreen, SYBR Green I); 3 –

ПЦР с использованием специфических праймеров к гену устойчивости к ампициллину (ген β -лактамазы, или *bla*-ген). Все эти методы имеют свои ограничения и недостатки, а первый и третий дают лишь полуколичественную оценку содержания ДНК. Для контроля степени чистоты и качества таких субстанций необходимо развитие современных чувствительных методов определения специфических примесей.

Количественные анализы на основе ПЦР (qPCR) использовались многими биофармацевтическими производствами на протяжении многих лет. Однако во многих случаях белки и буферные компоненты могут влиять на амплификацию ДНК, приводя к искажению результатов с информацией об истинной концентрации ДНК. В наборе «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* методом ПЦР-РВ» применяется оригинальная процедура экстракции ДНК для выделения остаточной ДНК из сложных матриц и проведения измерений в среде, свободной от загрязняющих белков, солей и моющих средств. Удаление загрязняющего белок продукта и других эксципиентов обеспечивает точные измерения остаточной ДНК клетки-хозяина и позволяет принимать своевременные и научно обоснованные изменения регламента.

«Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* 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 *E. coli* методом ПЦР-РВ» включает в себя все необходимое для проведения анализа наличия и количественного определения остаточной ДНК *E. coli* в исследуемых образцах. В состав набора входят реагенты для выделения ДНК и удаления ингибиторов ПЦР, 2 \times реакционная смесь БиоМастер UDG HS-qPCR (2 \times), стандартный раствор ДНК и набор специфичных праймеров и зондов к консервативному району 16S рНК *E. coli*.

Пользователь подготавливает серию разведений стандартов и проводит пробоподготовку образцов согласно прилагаемой инструкции. По завершению экстракции остаточной ДНК, образец, стандарты и контрольные образцы переносят на ПЦР-планшет, содержащую реакционную смесь, входящую в состав набора, к которой добавлены праймеры. После раскапывания планшета и наклеивания оптически прозрачной плёнки для ПЦР-планшетов, прилагаемой к набору, проводят амплификацию в течение 35-40 циклов.

Результат реакции выражается в виде кривых амплификации, отражающих зависимость накопления сигнала флуоресценции (количества ПЦР-продукта) от цикла и соответствующих им значений C_q (пороговый цикл – 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). Значения C_q для стандартов используются софтом

амплификатора для построения калибровочной кривой, отражающей соотношение C_q к $pg / 10$ мкл ДНК *E.coli*. С использованием калибровочной кривой, автоматически рассчитывается концентрация ($C_{пр.}$) в $pg/10$ мкл ДНК *E.coli* для контроля и анализируемых образцов. Используя этот метод, остаточная ДНК может быть измерена до $5 fg/10$ мкл.

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* методом ПЦР-РВ» прост в использовании. Процедура выполнения не требует длительной подготовки реагентов и проб. Входящий в набор ПЦР-мастермикс уже имеет в своем составе все необходимые компоненты для проведения ПЦР в режиме реального времени, что экономит время и снижает вероятность контаминирования за счет малого количества шагов пипетирования.

Условия хранения

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

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

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
$10\times$ TE буфер	20
ДНК-стандарт $10 ng/10$ мкл	0,1
Смесь праймеров ($10\times$)	0,35
БиоМастер UDG HS-qPCR ($2\times$)	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 объёмом 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. Подписать пробирки вместимостью 1,5 мл для разведения образцов и контроля. Образцы и контроль развести *Буфером для разведения* либо до концентрации ДНК в пределах аналитического диапазона (1 пг/мл – 10 нг/мл), либо по белку до конечной концентрации ≤ 20 мг/мл до конечного объёма 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 *E. Coli*. Для этого приготовить 6 микропробирок вместимостью 1,5 мл: подписать каждую, указав концентрацию от 1 нг/10 мкл до 10 фг/10 мкл с шагом один порядок (10 раз) и добавить в каждую пробирку по 250 мкл ТЕ буфера. Из пробирки ДНК-стандарт (ДНК *E. Coli* 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.

Примечание: в ПЦР для построения калибровочной кривой используются только 5 стандартных растворов с концентрациями от 10 фг/10 мкл до 100 пг/мкл.

- 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 контроля) 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, °C	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 *E.coli*. 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
10 фг/10 мкл	0,01

- 3.2. Если для отрицательного контрольного образца получено S_q с меньшим значением, чем S_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 ($S_{пр}$) в пг/10 мкл ДНК *E.coli* 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 не нужно учитывать при оценке среднего значения для образца.
- 3.5. Для получения концентрации ($S_{реал.}$) в нг/мл ДНК в исходных растворах белковых субстанций применим следующую формулу:

$$S_{реал.} = k \cdot C_{пр} \cdot 100,$$

$$k = 250 / V_{суб.},$$

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

$C_{пр}$ - концентрация ДНК *E.coli* ($C_{пр}$) 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 *E.coli* на мг сухого белка.