Инструкция по применению

Биолабмикс®

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
E-mail: sales@biolabmix.ru

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

Кат. № KDES-001

Оглавление

Область применения 2
Общая информация 2
Описание и принципы 3
Условия хранения 4
Условия транспортировки 4
Состав набора 5
Необходимые материалы, не входящие в набор 5
Необходимые реагенты, не входящие в набор 5
Рекомендации при работе 6
Подготовка реагентов 6
Описание аналитической методики 7
А) Выделение ДНК из образцов 7
Б) Амплификация образцов 8
Б) Обработка полученных данных 9

Область применения

Набор «Система для количественной оценки примесей «хозяйской» ДНК *E. coli* методом сорбции и ПЦР-РВ» предназначен для оценки количества примесей ДНК штамма продуцента на основе клеточных линий *E. coli* (таких как Bl21, Rosetta, TOP10, J5, K-12, MC1061 и аналогичных) в белковых препаратах в соответствии с требованиями фармакопеи.

Набор предназначен только для исследований, разработки процедуры мониторинга в процессе выпуска партии и тестирования QC на основе рекомбинантных 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. Из-за теоретического потенциала переноса онкогенов из клетки-хозяина при изготовлении и очистке этих продуктов ВОЗ установила предел остаточной ДНК-хозяина в фармацевтической субстанции 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, соматоропин, факторы свертывания

крови VII и VIII, не должно превышать 7-10 нг на 1 мг сухого вещества (7-10 ppm). 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 ß-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 в реальном времени (qPCR) в настоящее время являются одними из наиболее специфичных, точных, простых и быстрых методов анализа наличия ДНК в исследуемых образцах. Однако при работе с биологически активными препаратами стоит учитывать, что некоторые компоненты препарата могут искажать 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 *E. coli* методом сорбции и 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 сорбции и 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, реакционная смесь LyoМастер UDG HS-qPCR (2×), лиофилизат стандарта ДНК, лиофилизат специфичных праймеров и зондов к консервативному участку геномной ДНК *E. coli*, вода для ресуспендирования растворов.

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.

Пользователь переводит лиофилизированные реагенты в жидкое состояние путем добавления воды (ресуспендирует), готовит серию разведений стандартов и проводит выделение образцов, согласно прилагаемой инструкции. После подготавливает реакционную смесь без добавления матриц для полимеразной цепной реакции и вносит 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 40 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 Cq, 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 Cq 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 *E. coli* методом сорбции и ПЦР-РВ» включает все необходимые компоненты для проведения полного цикла анализа наличия остаточной ДНК *E. coli*.

Условия хранения

Реагенты для выделения ДНК хранить при температуре от при **+15 – +25 °С** в течение 18 месяцев.
Реагенты для проведения ПЦР и протеиназу К в лиофилизированном состоянии хранить: при **+15 – +25 °С** в течение 4 месяцев; при **+2 – +8 °С** в течение 1 года; при **-20 °С** – 18 месяцев.
Реагенты для проведения ПЦР теста и протеиназу К в ресуспендированном состоянии хранить:
- при +2 - +8 °С в течение 4 месяцев,
- при -20 °С – 1 год.
Растворы могут подвергаться разморозке/заморозке до 30 раз.

Условия транспортировки

Транспортировка и хранение при температуре окружающей среды до 14 суток.

Состав набора

Компонент	Количество, мл (шт)
Протеиназа К	0,12*
Литический буфер LB	40
Промывочный буфер WB1	30
Промывочный буфер WB2 (концентрат)	12
Буфер для элюции EB	15
10×TE буфер	2
ДНК-стандарт 10 нг/10 мкл, лиофилизат	0,1*
Смесь праймеров (10×), лиофилизат	0,35*
LyoМастер HS-qPCR UDG (2×), лиофилизат	4×0,4*
Вода стерильная	2×1,8
Микропробирки типа Эппендорф, 1,5 мл	50
Пробирки для сбора фильтрата и колонки для сорбции образца	50

**** - указан объем воды, необходимый для ресуспендирования лиофилизированных реагентов***

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
12. Оптически прозрачный пластик для проведения ПЦР в реальном времени

Необходимые реагенты, не входящие в набор

Этанол, 96%-100% раствор

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 K или термической обработке. Работа с ними начинается со стадии добавления Литического буфера LB.

Подготовка реагентов

1. Если набор используется первый раз необходимо ресуспендировать (перевести из лиофилизированного состояния в жидкое) лиофилизированные реагенты. Для этого добавить воду в каждую пробирку с соответствующим наименованием в указанных ниже объемах, перемешать пипетированием или с помощью встряхивателя и сбросить капли центрифугированием:

Реагент	Стерильная вода, мл
Протеиназа K, лиофилизат	0,15
Смесь праймеров (10×), лиофилизат	0,35
LyoМастер HS-qPCR UDG (2×), лиофилизат	0,4
ДНК-стандарт 10 нг/10 мкл, лиофилизат	0,1

2. Ресуспендируйте LyoМастер HS-qPCR UDG (2×) добавлением 400 мкл стерильной воды, входящей в состав набора. Тщательно перемешайте, сбросьте капли центрифугированием. Если для проведения анализа требуется более 400 мкл LyoМастер HS-qPCR UDG (2×) рекомендуем ресуспендировать необходимое количество пробирок и перемешать полученные растворы для получения однородной смеси и уменьшения риска флуктуаций данных. При анализе одного образца с использованием всех контрольных и стандартных образцов в трех повторах требуемый объем LyoМастер HS-qPCR UDG (2×) составляет примерно 330 мкл.
3. Заранее приготовьте 1×TE буфер для разведения протеиназы K 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).
4. Разведите протеиназу K в 1×TE буфере 1:10. Например, при выделении ДНК из 50 образцов необходимо добавить 75 мкл протеиназы K к 675 мкл 1×TE буфера (включает 25% дополнительного объема на образец). Раствор протеиназы K должен быть свежеприготовленным для каждого случая выделения.

5. Добавьте к 12 мл WB2 (концентрат) 48 мл этанола (96-100%), чтобы получить 60 мл буфера WB2.
6. Подписать пробирки вместимостью 1,5 мл для разведения образцов, отрицательного контрольного образца (ТЕ-буфер или стерильная вода) и стандартных образцов (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)). Аналогичным образом подписать пробирки для сбора фильтрата, колонки для сорбции и пробирки для сбора элюата.
7. Приготовить серию стандартов ДНК *E. coli*. Для этого в подготовленные и подписанные пробирки добавить по 200 мкл ТЕ буфера. Из пробирки «ДНК-стандарт 10 нг/10 мкл, лиофилизат» (ДНК *E. coli*: с концентрацией 10 нг/10 мкл) отобрать аликвоту объемом 22,2 мкл и перенести в пробирку 1 нг/10 мкл. Перемешать и сбросить капли. Отобрать аликвоту объемом 22,2 мкл из пробирки с первым полученным разведением и перенести во вторую подготовленную пробирку, перемешать и сбросить капли. Аналогичным образом поступить с последующими пробирками.

Важно! Для построения калибровочной кривой используются 5 стандартных растворов от 10 фг/10 мкл до 100 пг/10 мкл.

Описание аналитической методики

А) Выделение ДНК из образцов

1. Перед проведением процедуры раствор протеиназы К из набора реагентов для ПЦР развести в 1× ТЕ-буфере в 10 раз. Раствор протеиназы К должен быть всегда свежеприготовленным.
2. Подписать пробирки вместимостью 1,5 мл для разведения образцов и отрицательного контрольного образца (ТЕ-буфер или стерильная вода). Образцы и контрольный образец развести 1×ТЕ 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 200 мкл.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 100 мкл буфера для лизиса LB и 20 мкл протеиназы К.

Важно! Растворы стандартных образцов не обрабатываются протеиназой К.

4. Перемешать образец на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин при температуре 56 ºС.
6. Во время инкубации образцов добавить к последним пяти разведениям стандартных образцов (от 10 фг/10 мкл до 100 пг/10 мкл) по 100 мкл буфера для лизиса LB.
7. Добавить к растворам стандартов, контроля и образцов по 500 мкл буфера для лизиса LB.

8. Перемешать полученные растворы на вортексе 5-10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием.
9. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре (15-25°C).
10. Перенести содержимое пробирок на колонки. Плотно закрыть крышку колонки.
11. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
12. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
13. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2, предварительно добавив этанол. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
14. Повторно нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 rcf. Удалить фильтрат.
15. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 rcf для полного удаления буфера WB2.
16. Перенести колонку в новую соответствующую микропробирку типа Эппендорф на 1,5 мл. Плотно прижать колонку к пробирке.
17. Нанести на центр фильтра колонки 100 мкл буфера для элюции EB. Инкубировать 3 мин при комнатной температуре (15-25°C). Центрифугировать 1 мин, 12000 rcf.
18. Удалить колонку. Закрыть пробирку.

Важно! Убедитесь, что надписи на крышке колонки сохранились и соответствуют вашему порядку использования.

Б) Амплификация образцов

1. Приготовить смесь для амплификации (ресуспендированные LyoMастер HS-qPCR UDG (2×), лиофилизат и Смесь праймеров (10×), лиофилизат) из расчёта 15 мкл на реакцию плюс 25% избыточный объем:

Реагент	мкл/реакция
Смесь праймеров (10×), лиофилизат	2,5
LyoMастер HS-qPCR UDG (2×)	12,5

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

2. Отобрать аликвоты по 15 мкл смеси для амплификации и перенести в пластик для проведения ПЦР.
3. Добавить в соответствующие лунки к смеси для амплификации по 10 мкл стандартов, тестовых образцов и отрицательный контроль.
4. Поместить раскапанные пробирки в предварительно включенный амплификатор (термоциклер).

5. Запустить программу амплификации со следующими параметрами:

Шаг	Темп-ра, °С	Время инкубации	Кол-во циклов	Измерение флуоресценции
Антиконтаминационная обработка	50	2 мин	1	Нет
Предварительная денатурация	95	5 мин	1	Нет
Денатурация	95	10 сек	40	Нет
Отжиг/Элонгация	60	30 сек		Да, FAM

В) Обработка полученных данных

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

Концентрация 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

2. Результаты исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контрольных образцов в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций.

Таблица оценки результатов контрольных реакций

Контроль	Контролируемый этап	Значение граничного порогового цикла Ct по каналу FAM
Отрицательный контроль выделения	Выделение ДНК	Отсутствует или > стандартного раствора 10 фг/10 мкл
Отрицательный контрольный образец	ПЦР	Отсутствует или > стандартного раствора 10 фг/10 мкл
Стандартный раствор 10 фг/10 мкл	Выделение ДНК и ПЦР	< 35

Если значения, полученные при анализе, отличаются, от приведенных в таблице, то необходимо повторить исследование, начиная с указанного в таблице этапа.

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.*

4. С помощью калибровочной кривой, автоматически рассчитывается концентрация ($C_{пр.}$) 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 ненужно учитывать при оценке среднего значения для образца.
5. Для получения концентрации ($C_{реал.}$) в нг/мл ДНК в исходных растворах белковых субстанций применим следующую формулу:

   $C_{реал.} = k*C_{пр}*100$,
   $k= 200/V_{суб}$,
   где $V_{суб}$ - объём исходной субстанции, взятой в разделе А.2;
   $C_{пр}$ - концентрация ДНК *E. coli* ($C_{пр.}$) в пг/ 10 мкл из раздела В.2

6. Разделив полученную в пункте В.5. цифру на концентрацию белка в исходной субстанции в мг/мл, получим соотношение нг ДНК *E. coli* на мг сухого белка.