

Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. coli* и CHO в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR

Н. Д. Ёлшин

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 12.09.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Рынок препаратов рекомбинантных белков растет и развивается во всем мире, в том числе и в России. Как продуцент, так и субстанция, должны быть тщательно охарактеризованы и проверены по всем критериям безопасности. Среди обязательных требований, предъявляемых к таким препаратам — содержание остаточной ДНК клеток-продуцентов должно быть не более 10 нг на дозу. Коммерческих наборов для определения остаточной ДНК в мире относительно немного, они основаны на четырех разных методах. В статье представлен краткий обзор этих методов, обозначены их преимущества и недостатки. Общим недостатком всех коммерческих наборов является стоимость. Основными задачами работы было подобрать оптимальный метод выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных этапов очистки белка, отработать определение количества остаточной ДНК *Escherichia coli* и клеток яичника китайского хомяка (CHO) методом количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) без использования коммерческих наборов. Статья также содержит ряд практических рекомендаций по особенностям выделения ДНК и хранению стандарта. Целью исследования был поиск достоверного и недорогого метода определения содержания остаточной ДНК клеток-продуцентов в образцах рекомбинантных белков. В статье приводится обзор методов выделения ДНК для анализа, обоснована необходимость выделения ДНК перед анализом, преимущество отдано методу выделения на спин-колонках. Оптимальный метод выделения ДНК для определения ее количества в субстанции такой, при котором выход ДНК стабилен, в том числе и при различных химических составах исследуемых образцов, а в растворе выделенной ДНК отсутствует белок и другие примеси. Предложенный метод выделения ДНК на спин-колонках является наименее трудозатратным, оптимизирован для выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных стадий очистки белков. Самостоятельное приготовление растворов для выделения ДНК является простой процедурой и может снизить затраты на анализ. Представлен отчет об успешной адаптации методик определения остаточной ДНК *E. coli* и CHO методом qPCR с использованием флуоресцентных зондов. Продемонстрирована чувствительность метода не менее 1 пг/мл как при анализе количества остаточной ДНК *E. coli*, так и CHO.

Ключевые слова: определение остаточной ДНК клеток-продуцентов; остаточная ДНК клеток хозяина; qPCR ДНК CHO; qPCR ДНК *E. coli*; выделение ДНК из субстанций рекомбинантных белков.

Библиографическое описание: Ёлшин Н.Д. Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *Escherichia coli* и CHO в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (4): 245–252.

1. Введение

1.1. Производство рекомбинантных белков

Производство рекомбинантных белков для терапевтических целей это целая индустрия, которая уже сейчас огромна и в дальнейшем будет только расти.

На данный момент два наиболее популярных продуцента это кишечная палочка (*Escherichia coli*) и клетки яичника китайского хомяка (Chinese hamster ovary, CHO). Эти продуценты хорошо изучены, методики производства различных рекомбинантных белков при помощи этих клеток многократно описаны, контролирующие организации много лет регистрируют и одобряют производство терапевтических белков как в *E. coli*, так и в CHO, поэтому выбор их для работы очевиден [1].

Использование клеточных линий для производства ведет к множеству проблем, связанных с контролем чистоты и безопасности получаемой субстанции, одна из которых — обеспечить минимальное количество остаточной ДНК клеток-продуцентов [2, 3].

ДНК клеток-продуцентов в ходе получения субстанции обычно разрушается на мелкие фрагменты, поэтому сложно предсказать конкретные эффекты от ее наличия в

субстанции. Хотя нет данных о полученных негативных эффектах, связанных с остаточной ДНК в субстанции, есть причины предполагать связанный с ней онкогенный (могут присутствовать такие онкогены, как Ras) и инфекционный (ВИЧ, в случае использования некоторых лентивирусных векторов) потенциал, и потому рассматривать как фактор риска [4, 5]. Остатки геномной ДНК бактерий несут иммуногенный потенциал, в связи с вероятностью остатка неметилированных CpG-регионов. Идея определения остаточной ДНК также позиционируется как демонстрация эффективности очистки белка [6]. Так, в реальности, образцами для анализа количества остаточной ДНК клеток-продуцентов оказываются не только образцы субстанций, но и образцы различных стадий хроматографии белков, получаемые во время отработки методики очистки. Такие образцы могут содержать не только белок в высоких концентрациях, но и различные соли и детергенты.

Контролирующие организации требуют определять количество остаточной ДНК в субстанциях рекомбинантных белков: предельно допустимая концентрация остаточной ДНК по требованиям FDA (Food and Drug Administration): 100 пг на дозу [7], по требованиям ВОЗ — 10 нг на дозу [8]. В отечественной фармакопее рекоменда-

ции по определению остаточной ДНК даны в ОФС 1.7.1.0007.15 тома 2 издания XIII «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», рекомендуемая концентрация совпадает с требованиями ВОЗ, что указано в ОФС.1.7.2.0011.15 «Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов» [9].

1.2. Методы измерения остаточной ДНК

Регулирующими организациями, в том числе и отечественной фармакопеей, рекомендованы три метода для определения остаточной ДНК: гибридизация, метод Threshold®, количественная ПЦР (qPCR, quantitative PCR, real-time PCR) [10]. Полноценных сравнений этих методов в литературе достаточно [6, 11], далее будет представлена только краткая справка о методах.

1.2.1. Гибридизация ДНК. Принцип метода — отжигание специфических меченых проб на иммобилизованной и денатурированной ДНК. В ходе гибридизации двухцепочечную молекулу ДНК нагревают для денатурации и разделения цепей, смешивают с другой денатурированной ДНК, например с флуоресцентно мечеными зондами. При последующем снижении температуры смеси одноцепочечные ДНК в случае комплементарности соединяются, образуя гибридную молекулу. Гибридизация ДНК длительный и трудоемкий процесс.

1.2.2. Threshold total DNA assay system — коммерческий набор фирмы «Molecular Devices Corporation», этот метод более 20 лет используют для определения примеси остаточной ДНК, приобрести набор можно и на момент написания статьи. Реакция многокомпонентна: ДНК связывается одновременно с биотинилированным белком и с антителом, конъюгированным с уреазой. С помощью биотина, связанного со стрептовидином, комплексы концентрируются на биотинилированной мембране, затем добавляется мочевины, и измерение количества ДНК производится по изменению pH при гидролизе мочевины до аммиака и углекислого газа [12]. Метод дорог, низкопроизводителен и трудоемок.

1.2.3. Quant-iT™ PicoGreen®. Коммерческий краситель производства «Molecular Probes, Invitrogen» широко используется для определения ДНК. При определении остаточной ДНК этим методом необходимо учитывать, что, во-первых, ДНК нужно хорошо очистить от белка и других примесей, так как интенсивность свечения красителя сильно зависит не только от наличия белка, но и от примесей (солей, спирта, детергентов и т.д.). Во-вторых, заявленная производителем чувствительность метода — 250 пг/мл (50 пг ДНК в 200 мкл раствора), а динамический диапазон — всего три порядка. В некоторых ситуациях такой чувствительности может быть недостаточно, а динамический диапазон узок в сравнении с qPCR. Данный метод не рекомендован контролирующими организациями для определения остаточной ДНК. Но при этом измерение этим методом максимально быстро, дешево и неспецифично.

1.2.4. qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — данный метод позволяет многократно увеличить количество копий представленной в образце ДНК при наличии необходимых компонентов реакции (нуклеотиды, ДНК-полимеразы, праймеры, буфер) и условий (термоциклирование). За счет увеличения количества копий достигается высокая чувствительность метода. Обратной стороной чувствительности являются нередко встречающиеся проблемы с контамина-

цией [13]. При использовании qPCR для определения ДНК в образцах белковых растворов, ее также придется выделять, так как многие белки и другие возможные компоненты анализируемой субстанции (образца) ингибируют ПЦР.

Коммерческий набор, основанный на использовании реагента PicoGreen, предлагает компания «Cygnus» и «Krishgen». Коммерческие наборы, основанные на qPCR, предлагают также «Cygnus», «ThermoFisher».

Для достоверного определения количества ДНК клеточ-продуктов важно провести качественное выделение ДНК из образца.

1.3. Методы выделения ДНК для последующего анализа

Выделять ДНК из белковой субстанции необходимо, так как некоторые белки даже в низких концентрациях могут ингибировать ПЦР [14], при этом белки существенно различаются по степени ингибирования реакции [15]. Кроме того, в образце могут присутствовать различные компоненты, такие как органические растворители, детергенты, соли, которые также могут повлиять на ход ПЦР.

Последние несколько лет все чаще используют метод «прямой qPCR», т.е. без выделения ДНК из образца, но с «перевариванием» белка прямо в образце [16]. Опубликована работа, где к субстанции белкового препарата добавляли протеиназу К, которая в присутствии SDS (sodium dodecyl sulfate, додецил сульфат натрия) переваривает белок, а также Tween 20 для отмены ингибирующего полимераза эффекта SDS [17]. В статье Hussain M. [18] описано использование только протеазы КАРА, которая, по мнению автора, не обладает ингибирующим эффектом. Такие методы могут рассматриваться перспективными ввиду отсутствия этапа выделения ДНК, невысокой стоимости и быстроты выполнения анализа, но имеют некоторые ограничения, например, по количеству белка в образце.

1.3.1. Переосаждение ДНК. В статье В. Ну с соавт. [19] предложен этот метод для последующей оценки уровня остаточной ДНК. Авторы использовали коммерческий набор для выделения ДНК, основанный на переосаждении на йодиде натрия. Чтобы хорошо очистить осадок ДНК от белка, его необходимо многократно промыть. Авторы предлагали не делать отмывки, положенные по методике коммерческого набора, поскольку «возникали вариации в количестве выделенной ДНК». Данных о чистоте ДНК, выделенной таким образом, в статье не приводится. Также метод переосаждения ДНК для последующего определения ее количества используется в коммерческих наборах компании «Cygnus».

Метод переосаждения ДНК дешев, но с необходимыми отмывками не быстр. Эффективность и успешность переосаждения зависит от компонентов раствора ДНК, встречается много технических проблем в работе с методом, в том числе и при работе с соосаждителем: есть опасность пересушить осадок после отмывки, тогда ДНК плохо растворится, можно недосушить, тогда возникает риск контаминации раствора этанолом, осадок может флотировать, в таком случае сложно отобрать отмывочный раствор, не повредив осадок, иногда осадок оказывается нерастворим.

Для последующего проведения количественного анализа ДНК необходим метод, устойчивый к различным составам образца, при котором количество потерянной при выделении ДНК стабильно не различается в стандартных и исследуемых образцах.

1.3.2. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок. Данный метод является самым распространенным методом выделения ДНК. ДНК в присутствии высокой концентрации хаотропных ионов сорбируется на носитель (стекло, диоксид кремния) [20], белки и другие компоненты остаются в растворе и фильтруются в собирательную пробирку. Затем ДНК отмывают спиртовым раствором от примесей и хаотропных ионов.

Этот метод самый быстрый и простой. Также этот метод может быть самым дешевым при самостоятельном приготовлении растворов в лаборатории и использовании дешевых спин-колонок. Кроме того, при использовании спин-колонок риск контаминации в процессе выделения минимален. При выделении возможны потери ДНК, однако, не связанные с химическим составом исследуемого на примесь остаточной ДНК образца.

1.3.3. Выделение ДНК на магнитных частицах. Этот более дорогостоящий метод (основанный на том же принципе, что и предыдущий), например, использовали для определения остаточной ДНК Wei Zhang с соавт. [21].

Целью работы являлась разработка оптимального метода выделения ДНК из белковых субстанций и образцов различных стадий очистки белка и последующего достоверного определения остаточной ДНК клеток-продуцентов СНО и *E. coli* методом qPCR без использования коммерческих наборов.

2. Материалы и методы

2.1. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок

После серии экспериментов был разработан следующий протокол выделения ДНК из белковых растворов (субстанция (образцы) различных стадий очистки белка):

1. Добавить к 100 мкл исследуемого или калибровочного образца 400 мкл сорбционного раствора, перемешать, перенести в спин-колонку.
2. Центрифугировать пробирки при 6000g в течение 1 мин, вылить содержимое собирательной пробирки.
3. Внести на колонку 500 мкл сорбционного раствора. Центрифугировать пробирки при 12000g в течение 1 мин. Вылить содержимое собирательной пробирки.
4. Внести на колонку 500 мкл промывочного раствора. Центрифугировать пробирки при 12000g 3 мин. Вставить колонку в новую пробирку объемом 1,5 мл.
5. Внести в центр колонки 100 мкл элюирующего раствора. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре. Центрифугировать пробирки при 6000g в течение 1 мин.

Для выделения ДНК использовались спин-колонки «DSB», кат. № 9012-90-2 (Китай), они могут быть заменены любыми аналогичными спин-колонками.

Состав растворов для выделения остаточной ДНК из белковых субстанций с использованием спин-колонок:

- лизирующий раствор: 100 mM Tris-HCl (pH 6,4), 6 M GuSCN, 20 mM EDTA, 1 % Triton X-100. Используют только для приготовления ДНК-стандарта (п. 2.3);
- сорбционный раствор: 100 mM Tris-HCl (pH 6,4), 6 M GuSCN;
- промывочный раствор: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 25 % изопропанол, 25 % этанол;
- элюирующий раствор: TE буфер или вода;

В коммерческих наборах используется элюирующий раствор следующего состава: 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0 (NaOH);

2.2. qPCR

2.2.1. Реагенты и оборудование. Для qPCR на основе интеркалирующего красителя SYBR использовали реагенты фирмы «Евроген». Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR, кат. № PK147L. Для qPCR с использованием флуоресцентных зондов использовали следующую смесь для ПЦР в расчете на одну реакцию 25 мкл: HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», PK015L), 0,4 мкл; буфер для ПЦР, поставляемый вместе с полимеразой 10×, 2,5 мкл; смесь олигонуклеотидов 2,5 mM каждого, 2 мкл («Sigma», DNTPI00A); вода 8,6 мкл. В реакцию общим объемом 25 мкл вносили 10 мкл раствора ДНК, конечная концентрация праймеров и зондов была 200 нМ. В работе использовали систему определения ПЦР в режиме реального времени Bio-Rad iCycler IQ5 и соответствующее стандартное программное обеспечение. Cq (quantitative cycle; Ct; Threshold cycle) определяли автоматически.

Определение количества белка в анализируемых образцах производили методом с использованием бичининовой кислоты (BCA, Bicinchoninic acid) — использовали коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay (кат. № 23225).

2.2.2. Праймеры и зонды

2.2.2.1. Измерение ДНК СНО методом qPCR. Праймеры и зонды, использованные в работе, приведены в таблице 1 и были заказаны в компании «ДНК-синтез». Для детекции остаточной ДНК СНО использовали уже неоднократно проверенный (по данным литературы) набор олигонуклеотидов, разработанный D. Venable с соавт. [22]. Использовали двухступенчатый протокол ПЦР: после предварительной денатурации 5 мин при 95 °C проводили 40 циклов амплификации: 10 с при 95 °C и 60 с при 53 °C.

2.2.2.2. Измерение ДНК *E. coli* методом qPCR. В оригинальной статье была предложена трехступенчатая программа амплификации, работу проводили по двухступенчатой программе: после предварительной денатурации при 95 °C 2 мин, проводили 40 циклов амплификации: 10 с при 95 °C и 40 с при 56 °C. В процессе отработки методики анализ проводили, как в варианте с SYBR (как предлагалось в оригинальной статье), так и с флуоресцентным зондом. Оригинальный дизайн праймеров: L. D. Нууск с соавт. [11]. Зонд предлагается впервые.

2.3. Стандарт

Стандарт изготавливали накануне работы с исследуемыми образцами, ДНК выделяли из клеток линии продуцента белка, субстанцию или образцы стадий очистки которого планировали анализировать. Отбирали около 10 млн клеток штамма-продуцента, количество клеток определяли с помощью камеры Горяева. В микропробирку помещали 50 мкл клеточной взвеси, прибавляли 450 мкл лизирующего раствора (состав растворов указан в разделе 2.1), тщательно перемешивали на вортексе. Полученный клеточный лизат переносили в спин-колонку, помещенную в собирательную пробирку, и центрифугировали при 6000 g в течение 1 мин. Затем в колонку вносили 500 мкл сорбционного буферного раствора и центрифугировали при 12000 g в течение 1 мин. Содержимое собирательной пробирки отбрасывали. В центр колонки вносили 500 мкл промывочного раствора и центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Содержимое собирательной пробирки отбрасывали. Для элюции в центр колонок вносили 100 мкл воды, инкубировали в те-

чение 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 12000g в течение 1 мин.

Концентрацию ДНК штамма-продуцента в полученном элюате определяли спектрофотометрически с учетом удельного показателя поглощения при 260 нм, равного $A_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}} = 20 \text{ о. е.}$

3. Результаты и обсуждение

ПЦР ингибируется белком даже в низких концентрациях, например, таким малым количеством иммуноглобулинов, как 1 мкг/мл (финальная концентрация в ПЦР-смеси), при концентрации 1 мг/мл в пробирке в процессе ПЦР образуется непрозрачный сгусток (в процессе термоциклирования происходит коагуляция белка), при наличии которого невозможна и правильная детекция сигнала. Также ПЦР в разной степени ингибируют органические растворители, детергенты и различные соли.

Требованиями к методу выделения ДНК для определения количества ее в субстанции являются: получение чистой ДНК без примеси белка, стабильный выход ДНК после выделения, устойчивость метода к различным составам образцов для анализа.

Очевидно, что выделяя ДНК методом, неподходящим для выделения из образцов с высоким содержанием белка и возможным наличием различных солей и детергентов, можно получить недостоверные результаты о количестве остаточной ДНК клеток-продуцентов. При этом в большинстве статей, посвященных определению остаточной ДНК клеток-продуцентов, этот момент игнорируется, обычно лишь указывается наименование коммерческого набора для выделения ДНК (обычно из крови).

Например, работая с методом переосаждения ДНК из образцов с высокими концентрациями белков или солей (образцы различных стадий очистки белка), мы столкнулись с целым рядом проблем в процессе выделения ДНК для анализа. Эффективность и успешность переосаждения зависела от компонентов раствора, иногда осадок после переосаждения оказывался нерастворимым, иногда он не формировался. При экспериментах с количеством отмывок не было оптимального варианта: либо из выделенных стандартных образцов не удавалось построить кривую с удовлетворительным коэффициентом линейной зависимости (R^2), либо раствор ДНК содержал примесь белка.

Для получения достоверных результатов содержания ДНК в исследуемых образцах методом qPCR, выделять ДНК нужно обязательно как из исследуемых образцов, так и из калибровочных, чтобы при подсчете концентраций детектируемой ДНК, учесть потери при выделении и избежать возможных искажений результатов, связанных с разными составами растворов стандартных образцов ДНК и исследуемых образцов. При этом процент выхода ДНК при выделении должен быть достоверно одинаковый для всех образцов, и, очевидно, чем выше будет выход, тем выше будет чувствительность. О стабильности выхода ДНК можно говорить при коэффициенте линейной зависимости (R^2) ≥ 0.99 кривой, построенной по данным qPCR, как минимум, 6 стандартных образцов, при нормальной эффективности ПЦР (90–110 %). Чтобы проверить и доказать устойчивость метода к необычному составу экспериментального образца, из которого будет производиться выделение ДНК (высокие концентрации солей, детергентов и т.д.), необходимо дополнительно поставить экспери-

мент с добавлением известного количества ДНК в такой образец.

3.1. Выделение ДНК на сорбенте с использованием спин-колонок

Протокол был составлен на основе метода Boom с соавт. [23]. Была проведена серия экспериментов со сравнением выхода ДНК и ее качества и в классический метод внесено несколько изменений. Из сорбционного буфера был удален предлагаемый авторами Triton X-100, так как его наличие снижало выход и делало его нестабильным. Вероятно, в условиях выделения ДНК из белковой субстанции, а не из клеточной массы, нет нужды в его наличии. По данным литературы Triton X-100 действительно мешает сорбции ДНК [24]. Две отмывки спиртом и одна ацетоном, предложенные в статье, заменены на одну отмывку спиртовым раствором, без последствий для чистоты выделенных образцов.

По нашим данным выход ДНК напрямую связан с колонками: нами сравнивались четыре разных типа колонок. Некоторые спин-колонки, например, прилагаемые к наборам фирмы «Qiagen», позволяют стабильно выделять 100 % ДНК образца, даже если в образце, внесенном на колонку, присутствует лишь 0,1 пг ДНК. Но эти колонки можно приобрести только вместе с дорогостоящим набором. В большинстве экспериментов использовались спин-колонки «DSB» (могут быть заменены любыми аналогичными), которые обеспечивают стабильный выход ДНК на уровне 80 %. На рисунке 1 приводится обычный результат для выделения на таких колонках.

Выбор самих колонок также играет большую роль в затратах на анализ. Затраты на реагенты при выделении по вышеописанной методике составят не более 0,2\$, стоимость ПЦР-смеси на одну реакцию составляет 0,1\$, а цена на спин-колонки — 0,2–0,6\$ за штуку. Хотя и описаны способы регенерации колонок с помощью инкубации в 1 М HCl [25] и с помощью нескольких отмывок Triton X-100 в течение 1 ч [25], эти методы подойдут не каждой лаборатории.

Для определения устойчивости метода был проведен опыт с добавлением известного количества ДНК к растворам белков в высокой концентрации и к хроматографическим буферным растворам, в которых теоретически может быть необходимо оценить количество остаточной ДНК в

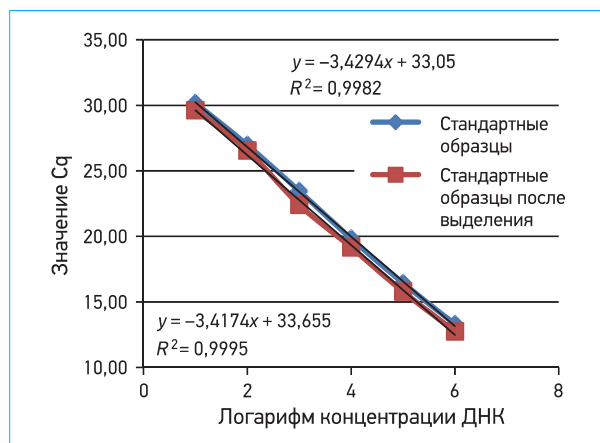


Рис. 1. Стандартные кривые qPCR ДНК CHO в 10-кратных разведениях (с 1 мкг/мл до 10 пг/мл). Представлены кривая qPCR образцов калибровки и кривая qPCR образцов калибровки, прошедших выделение на спин-колонках.

процессе отработки метода очистки. Во всех случаях выделялось одинаковое количество ДНК, — количество, которое было инокулировано в раствор перед экспериментом. Состав буферных растворов, используемых в эксперименте, приведен в таблице 2. Компоненты указанных буферов и высокая концентрация белков не повлияли на качество выделения ДНК. Перед выделением к 90 мкл буферных растворов добавлялось 10 мкл раствора ДНК, т.е. указанные в таблице 2 концентрации солей в растворах снижались, но незначительно.

В растворах элюированной ДНК контролировалось отсутствие белка с помощью набора (2.2.2.1) — метод с использованием бицинхониновой кислоты: раствор элюированной ДНК после выделения не содержал белка по результатам данного анализа, не наблюдалось ингибирования ПЦР.

Выделение ДНК предложенным методом дает стабильный выход, что дает возможность строить калибровочные кривые с $R^2 \geq 0,99$.

3.2. Стандарт. Срок хранения ДНК в оптимальных условиях без значительного снижения Cq при проведении qPCR на матрице этой ДНК обычно около 100 сут [26]. На матрице деградирующей ДНК амплификация идет хуже, чем на матрице свежевыделенной, а результаты по поглощению при 260 нм могут совпадать, так как при спектрофотометрии поглощают свет пурины и пиримидины, которые могут быть как в составе молекулы ДНК, так и в виде отдельных нуклеотидов (или разной длины фрагментов ДНК в процессе деградации) [27]. Поэтому, при невозможности приготовления свежей стандартной ДНК непосредственно перед анализом, рекомендуется калибровочную ДНК измерять комбинацией, как минимум, из двух методов: количество оценить спектрофотометрически и (или) методом с использованием интеркалирующих красителей и проконтролировать качество ДНК методом электрофореза.

Для длительного хранения ДНК-стандарта может быть использовано лиофильное высушивание, по некоторым данным это позволяет отсрочить деградацию ДНК [28]. При лиофилизации рекомендуется добавлять в буфер тригалоу для дополнительного увеличения срока хранения ДНК [29].

3.3. СНО qPCR. Праймеры отжигаются на Alu-эквивалентных повторах [30], которых в ДНК СНО около 4000. Тест-система СНО49 оказывается самой чувствительной к ДНК СНО, хотя количество повторов амплифицирующейся последовательности не всегда коррелирует с чувствительностью тест-системы [31]. По данным В. Ну с соавт. [19] в зонде есть критическая замена, но по другим источникам и нашим данным это не подтверждается.

Чувствительность тест-системы 10 фг на реакцию. Эффективность реакции 95 %. Стандартная кривая приведена на рисунке 2, а.

3.4. *E. coli* qPCR. Для детекции остаточной ДНК *E. coli* использовались праймеры, отжигающиеся на гене 16S рибосомы, у некоторых бактерий до 7 копий этого гена [32]. Оригинальный дизайн праймеров: L. D. Нууц с соавт. [11]. Такие же праймеры использовались (без ссылки на указанных выше авторов) в статье Т. N. Farivar с соавт. [33]. Дополнительно к этим праймерам для qPCR с интеркалирующим красителем SYBR green нами был предложен зонд. Чувствительность при работе с зондом соответствует результатам с SYBR green — не менее 1 пг/мл. Последовательность разработанного зонда также внесена в таблицу 1.

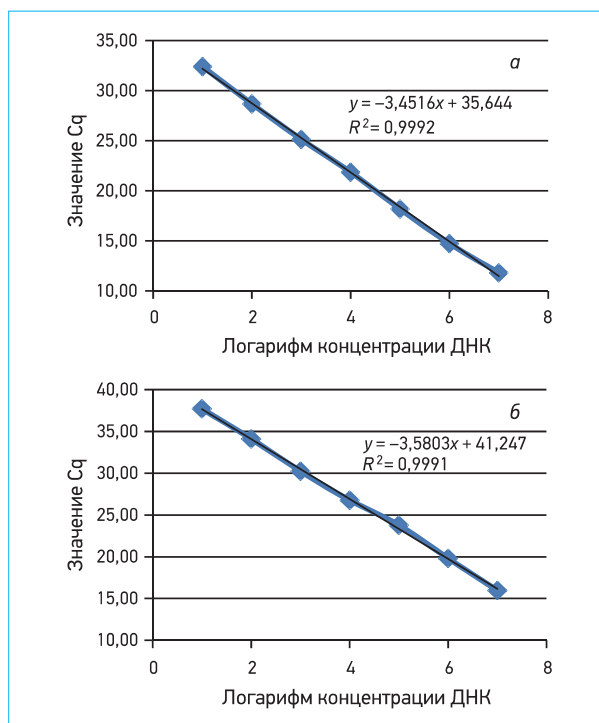


Рис. 2. Стандартная кривая qPCR ДНК в 10-кратных разведениях (с 1 мкг/мл до 1 пг/мл): а — ДНК СНО; б — ДНК *E. coli*.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для детекции остаточной ДНК СНО и *E. coli* методом qPCR

CHO HCDNA Primers (5' → 3')	
qCHO49 F	TGGAGAGATGGCTCGAGGTT
qCHO49 R	TGGTTGCTGGGAATTGAAGTC
qCHO49 probe	FAM-AGAGCACCAACTGCTCTTCCAGAGGTCC-BHQ
<i>E. coli</i> HCDNA Primers (5' → 3')	
qColiDNA F	AGAAGCTTGCTCTTTGCTGA
qColiDNA R	CTTTGGTCTTGCGACGTTAT
qColiDNA probe	FAM-ATGCTCTGGGAACTGCCTGATGGA-BHQ

Чувствительность тест-системы 10 фг на реакцию. Эффективность реакции 95 %. Стандартная кривая приведена на рисунке 2, б.

Многие авторы, определяющие остаточную ДНК *E. coli*, сталкивались с проблемой контаминации используемых ПЦР-смесей: в них использовалась рекомбинантная полимераз, полученная из *E. coli* и плохо очищенная от ДНК. Справиться с этой проблемой поможет немалое количество советов в литературе [34, 35].

Чувствительность описанных методов достаточна для определения количества остаточной ДНК в субстанции для предоставления такой информации контролирующим органам; выделение ДНК предложенным методом дает стабильный выход, что дает возможность построить калибровочную кривую с $R^2 \geq 0,99$, метод выделения подходит для работы с образцами белковых субстанций и образцов промежуточных стадий очистки белка, за счет самостоятельного приготовленных растворов для выделения ДНК достигается невысокая стоимость анализа.

Таблица 2. Хроматографические буферы и белковые растворы, проверенные на совместимость с методикой выделения ДНК, описанной в данной статье

Буферы для хроматографии	Состав буфера
Ионообменная хроматография	NaHCO ₃ 0,3 М, NaCl 0,5 М, pH 8,6
Гидрофобная хроматография	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ, pH 6,0
	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ pH 6,0 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,3 М
	Фосфатный буфер (Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄) 50 мМ, pH 6,0 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0 М
Аффинная хроматография	Glycine HCl 0,1 М, pH 2,5
Металл-хелатная	PBS + Imidazole 0,3 М, pH 7,8
	Tris-HCl 50 мМ, pH 7,0
	Цитратный буфер 50 мМ, pH 6,1

Растворы белков

Infliximab (IgG) 49 мг/мл
Omalizumab (IgG) 25 мг/мл
Etanercept 15 мг/мл

4. Заключение и выводы

Таким образом, измерение остаточной ДНК при помощи qPCR является точным, простым и дешевым методом, доступным каждой лаборатории. Выбранные наборы праймеров и зондов обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Выделение ДНК из исследуемого образца перед таким анализом необходимо, предложенный метод выделения оптимизирован специально для обозначенной задачи, быстр, дешев и устойчив, может заменить коммерческие наборы. Отечественной фармакопеей метод ПЦР рекомендован для определения остаточной ДНК в субстанции, метод может быть при необходимости валидирован и включен в фармакопейную статью предприятия.

Литература

- Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13: 117–23.
- Миронов АН, Меркулов ВА, Сакаева ИВ, Васильев АН, Бунятян НД, Кузес ВГ. и др. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. В кн.: *Руководство по экспертизе лекарственных средств*. Т. 3. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС; 2014. С. 4–24.
- Note for Guidance on Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology, 3AB1A. *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology*. 1995. P. 214.
- WHO. WHO Expert Committee on Biological standardization: Highlights of the 46th meeting, October 1996. *WHO Wkly Epidemiol. Rec*. 72, 1997, pp. 141–5.
- Lahijani M, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *Hum Gene Ther*. 1988; (9): 1173–80.
- Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions. *Biotechnology & Bioengineering*. Published online 28 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). doi 10.1002/bit.23343.
- Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, U. S. A. FDA; 1997.
- Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. *Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use*, EU. CPMP; 2001.
- Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. ОФС 1.7.1.0007.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2. С. 536–7. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organ. *Teth. Rep. Ser.* 1998; 878: 1–101.
- Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10): 1463–70.
- Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez JB, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem*. 1990; 187: 220–7.
- Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 188–94.
- Abu Al-Soud W, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 345–50.
- Abu Al-Soud W, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2): 485–93.
- Peper G, Fankhauser A, Merlin T, Roscic A, Hofmann M, Obrdlík P. Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 100: 123–30.
- Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple «universal» DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Appl*. 1995; (4): 368–70.
- Hussain M. A direct qPCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 115: 603–6.
- Hu B, Sellers J, Kupeca J, Ngob W, Fentona S, Yanga TY, Grebaniera A. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 88: 92–5.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1979; 76: 615–9.
- Zhang W, Wu M, Menesale E, Lu T, Magliola A, Bergelson S. Development and qualification of a high sensitivity, high throughput Q-PCR assay for quantitation of residual host cell DNA in purification process intermediate and drug substance samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 100: 145–9.
- Venable D, Miro-Quesada G, Calley J, Monson E, He L. High-throughput and quantitative detection of residual NS0 and CHO host cell genomic DNA. *BioProcess Int*. 2007; (5): 56–61.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; (3): 495–503.
- Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 2007; 42: 186–92.
- Röder B, Frühwirth K, Vogl C, Wagner M, Rossmann P. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 4260–2.
- Glaser JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18: 62–6.
- Podivinsky E, Love JL, van der Colff L, Samuel L. Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009; 394(1): 132–4.

29. Smith S, Morin P. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci.* 2006; 51(2): 426–32.
30. Haynes SR, Toomey TP, Leinwand L, Jelinek WR. The Chinese hamster Alu-equivalent sequence: a conserved highly repetitious, interspersed deoxyribonucleic acid sequence in mammals has a structure suggestive of a transposable element. *Molecular Cellular Biology* 1981; 1(7): 573–83.
31. Verardo ML, Carvalho JG, Delgado DN, Kuhns ST. Accuracy and sensitivity of residual DNA detection by qPCR is not predicted by target copy number. *Biotechnology Progress* 2012; 28(2): 428–34.
32. Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1981; 62: 293–300.
33. Farivar TN, Mamnoon B, Arzenani MK, Ilghari D. Novel real time polymerase chain reaction approach for rapid detection of the residual *Escherichia coli* genomic DNA in biopharmaceutical products establishment of real time polymerase chain reaction to detect residual gDNA. *Biotech Health Sci.* 2014; 3(1): 263–75.
34. Silkie SS, Tolcher MP, Nelson KL. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J Microbiol Meth.* 2008; 72: 275–82.
35. Kibbee R, Linklater N, Црмeci B. Eliminating false positives in a qPCR assay for the detection of the uidA gene in *Escherichia coli*. *J Water Health* 2013; 11(3): 382–6.

Об авторах

Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства России. Российская Федерация, 197110, Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7. Ёлшин Никита Дмитриевич. Младший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии.

Адрес для переписки: Ёлшин Никита Дмитриевич; nikita.yolshin@gmail.com

Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR

N. D. Yolshin

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, St Petersburg, Russia

Production of recombinant proteins is a steadily growing industry in Russia and all over the world. Both producer and substance should be properly characterized and tested against all safety criteria. One of the mandatory requirements to the mentioned drugs is the assessment of the content of residual DNA-producing cells, which should be less than 10 ng per dose. There are not many commercial kits for detection of residual DNA and they are based on four different methods. The article provides a brief overview of these methods and highlights their advantages and disadvantages. Common disadvantage of all the commercial kits is their price. The main goal of the research was to choose an optimal method of DNA extraction from protein substances and samples of various protein purification steps, as well as to work over measuring the amount of residual *E. coli* DNA and CHO by qPCR method not using commercial kits. The article also provides with a number of practical recommendations on specific aspects of DNA extraction and reference standard storage. The aim of the study was to find a reliable and inexpensive method for determining residual DNA-producing cells in recombinant protein samples. The article provides with an overview of DNA extraction methods, stipulates the necessity of DNA extraction prior to the analysis. The advantage was given to the method of spin-column extraction. Optimal DNA extraction method for its assay in a substance is the method, which provides with a stable DNA yield, including different chemical structure of the samples, and upon the condition that no protein and other impurities are detected in the isolated DNA solution. The proposed method for DNA spin-column extraction is the least labor-intensive, is optimized for DNA isolation from protein substances and samples of various protein purification steps. Self preparation of solutions for DNA extraction is a simple procedure and can reduce analysis costs. The report on successful adaptation of the methods of residual *E. coli* and CHO DNA detection by qPCR using fluorescent probes was provided. The sensitivity of the method was demonstrated at least 1 pg/ml for the analysis of the amount of residual DNA both for *E. coli* and CHO.

Key words: detection of residual DNA-producing cells; residual host-cell DNA; the DNA qPCR CHO host cell; qPCR *E. coli* host-cell DNA; DNA isolation from protein solutions.

For citation: Yolshin ND. Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 245–252.

References

1. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 117–23.
2. Mironov AN, Merkulov VA, Sakaeva VI, Vasiliev AN, Bunyatyan ND, Kukes VG, et al. Evaluation of the quality of biological drugs derived using recombinant DNA techniques. In: *Guidelines for the examination of medicines. V. 3. Moscow: POLIGRAF-PLUS; 2014. P. 4–24 (in Russian).*
3. Note for Guidance on Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology, 3AB1A. *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology.* 1995. P. 214.
4. WHO. WHO Expert Committee on Biological standardization: Highlights of the 46th meeting, October 1996. *WHO Wkly Epidemiol. Rec.* 72, 1997, pp. 141–5.
5. Lahijani M, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *Hum Gene Ther.* 1988; (9): 1173–80.
6. Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions. *Biotechnology & Bioengineering.* Published online 28 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). doi 10.1002/bit.23343.

7. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologicals Evaluation and Research, U. S. A. FDA; 1997.
8. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use, EU. CPMP; 2001.
9. Medicines produced using recombinant DNA techniques. General monograph 1.7.1.0007.15. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 2. P. 536–7. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
10. WHO Expert Committee on Biological Standardization, World Health Organ. Teth. Rep. Ser. 1998; 878: 1–101.
11. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(10): 1463–70.
12. Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez JB, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem*. 1990; 187: 220–7.
13. Vanechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 188–94.
14. Abu Al-Soud W, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 345–50.
15. Abu Al-Soud W, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2): 485–93.
16. Peper G, Fankhauser A, Merlin T, Roscic A, Hofmann M, Obrdlík P. Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 100: 123–30.
17. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple «universal» DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods Appl*. 1995; (4): 368–70.
18. Hussain M. A direct qPCR method for residual DNA quantification in monoclonal antibody drugs produced in CHO cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 115: 603–6.
19. Hu B, Sellers J, Kupeca J, Ngob W, Fentona S, Yanga TY, Grebaniera A. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 88: 92–5.
20. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1979; 76: 615–9.
21. Zhang W, Wu M, Menesale E, Lu T, Magliola A, Bergelson S. Development and qualification of a high sensitivity, high throughput Q-PCR assay for quantitation of residual host cell DNA in purification process intermediate and drug substance samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 100: 145–9.
22. Venable D, Miro-Quesada G, Calley J, Monson E, He L. High-throughput and quantitative detection of residual NS0 and CHO host cell genomic DNA. *BioProcess Int*. 2007; (5): 56–61.
23. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; (3): 495–503.
25. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 2007; 42: 186–92.
26. Röder B, Fröhlich K, Vogl C, Wagner M, Rossmann P. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 4260–2.
27. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18: 62–6.
28. Podivinsky E, Love JL, van der Colff L, Samuel L. Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009; 394(1): 132–4.
29. Smith S, Morin P. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J Forensic Sci*. 2006; 51(2): 426–32.
30. Haynes SR, Toomey TP, Leinwand L, Jelinek WR. The Chinese hamster Alu-equivalent sequence: a conserved highly repetitive, interspersed deoxyribonucleic acid sequence in mammals has a structure suggestive of a transposable element. *Molecular Cellular Biology* 1981; 1(7): 573–83.
31. Verardo ML, Carvalho JG, Delgado DN, Kuhns ST. Accuracy and sensitivity of residual DNA detection by qPCR is not predicted by target copy number. *Biotechnology Progress* 2012; 28(2): 428–34.
32. Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1981; 62: 293–300.
33. Farivar TN, Mamnoon B, Arzenani MK, Ilghari D. Novel real time polymerase chain reaction approach for rapid detection of the residual *Escherichia coli* genomic DNA in biopharmaceutical products establishment of real time polymerase chain reaction to detect residual gDNA. *Biotech Health Sci*. 2014; 3(1): 263–75.
34. Silk SS, Tolcher MP, Nelson KL. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J Microbiol Meth*. 2008; 72: 275–82.
35. Kibbee R, Linklater N, Urmeci B. Eliminating false positives in a qPCR assay for the detection of the *uidA* gene in *Escherichia coli*. *J Water Health* 2013; 11(3): 382–6.

Authors

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, Pudojskaya street, 7, St Petersburg 197110, Russian Federation.
 Yolshin ND. Junior research scientist of the Immunopharmacology laboratory.