

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 557.112.823

Е.В. КОВАЛЕВА^{1,2,*}, А.П. БАРАННИК², Ю.С. СКОБЛОВ², Е.Д. ШИБАНОВА², В.И. ШВЕЦ¹

¹Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, 119571, Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, Москва

e-mail: katja_kov@mail.ru
kovaleva@kou.ibch.ru

Разработка и применение метода рвПЦР для анализа остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанции гистона Н1.3

В данной работе предлагается количественный метод ПЦР в реальном времени (рвПЦР) с использованием специфических праймеров к фрагменту гена 16S РНК *E. coli* применить для определения остаточной ДНК штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pH1.3 в активной фармацевтической субстанции (АФС) рекомбинантного человеческого гистона Н1.3. Проведена оптимизация пробоподготовки, создан рабочий стандартный образец на основе ДНК штамма-продуцента, обработанной ультразвуком, подобран ампликон для рвПЦР. Оценена специфичность разработанных праймеров в сравнении с ДНК эукариот. Проведен анализ эффективности метода в сравнении с коммерческим набором. Разработанные праймеры к гену 16S РНК оказались в 30 раз чувствительнее праймеров референсного коммерческого набора.

Ключевые слова: активная фармацевтическая субстанция, гистон, остаточная ДНК, ПЦР в реальном времени.

Гистон Н1.3 относится к семейству высококонсервативных основных белков и проявляет способность внеклеточно и селективно связываться с фосфолипидами мембран лимфоидных клеток; на этом свойстве основано его противоопухолевое действие. Поскольку гистоны являются собственными белками человеческого организма, они в отличие от аналогичных по эффекту моноклональных антител не обладают иммуногенностью, что особенно актуально при разработке более совершенных и безопасных лекарственных форм [1, 2].

Количество ДНК в АФС, предназначенных для производства инъекционных препаратов, не

должно превышать 10 нг на терапевтическую дозу, согласно требованиям международных руководств [3–6]. Для АФС рекомбинантного гистона человека Н1.3 это значение составляет не более 5 пг ДНК на 1 мг сухого вещества (5 ppb).

Особенностью гистонов является формирование прочного комплекса с молекулами ДНК, что затрудняет анализ содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в АФС. Поэтому для определения ДНК в количестве 10^{-12} – 10^{-15} необходима высокая чувствительность методики и особая подготовка проб АФС гистона Н1.3.

Ковалева Екатерина Викторовна, Баранник Алла Петровна, Скоблов Юрий Самойлович, Шибанова Елена Дмитриевна, Швец Виталий Иванович.

Список сокращений: АФС — активная фармацевтическая субстанция; ДНКт — тотальная ДНК штамма-продуцента; ДНКуз — тотальная ДНК штамма-продуцента, обработанная ультразвуком; ДМСО — диметилсульфоксид; ОБП — опытное биотехнологическое производство; ОП — обратный пересчет; п.н. — пар нуклеотидов; ПААГ — полиакриламидный гель; ПКО — предел количественного определения; ПО — предел обнаружения; рвПЦР — ПЦР в реальном времени; РСО — рабочий стандартный образец; среда LB — среда Лурия—Бергана; ТЕМЕД — тетраметилэтилендиамид; УФ — ультрафиолетовый; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; СНО (Chinese Hamster Ovary) — линия клеток яичника китайского хомячка; dNTP — дезоксинуклеозидтрифосфат(ы).

* Автор для переписки.

Целью работы являлась разработка рвПЦР для определения остаточной ДНК *E. coli* BL21(DE3)/prhH1.3 в активной фармацевтической субстанции рекомбинантного гистона человека H1.3 при использовании праймеров к фрагменту гена 16S РНК штамма, а также SYBR GREEN I в качестве интеркалирующего красителя.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследований были использованы 6 протестированных ранее серий АФС генно-инженерного гистона H1.3 (151111, 220912, 250912, 261012, 381212, 391212), полученные на ОБП ИБХ РАН.

С целью разрушения комплекса ДНК с гистоном проводили гидролиз гистона H1.3 трипсином (Sigma, США, термостат Heraeus, Германия). Результаты триптического гидролиза анализировали при помощи вертикального электрофореза в ПААГ по Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия (система Mini-PROTEAN Tetra System, BioRad, США). Были выбраны маркеры молекулярной массы — окрашенный (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), а также неокрашенный более узкого диапазона (Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific, США). На следующем этапе остаточную ДНК из субстанции выделяли при помощи коммерческого набора DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual *E. coli* Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies, США).

Для накопления биомассы были использованы штаммы-продуценты гистона H1.3 *E. coli* BL21/prhH1.3 (ЗАО «Крионикс», РФ), а также высокопродуктивная стабильная клеточная линия *huF5HIK*, секретирующая рекомбинантный человеческий фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), созданная на основе линии *CHO K1 DXB11* (№ 2012106207, разработчики ООО «Фармако Биотех», ООО «Фармбиотех», ИБХ РАН).

Культивирование проводили в жидкой среде LB (компоненты производства HiMediaLab, A. Constantino & C. Spa и «Химмед»). При необходимости добавляли ампициллин (ОАО «Красфарма») до концентрации 100 мкг/мл. Твердые среды готовили на основе бульона LB с добавлением агара (Panreac). Культуры как в жидкой, так и на твердой среде выращивали при 37° в течение 15—16 ч.

Тотальную ДНК из биомассы штаммов выделяли стандартным методом, включающим лизис с последующей экстракцией фенол-хлороформным раствором [7]. Затем полученную ДНК очищали от РНК путем обработки РНКазой А («Евро-

ген», Россия). Готовые растворы ДНК проходили очистку при помощи набора DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual *E. coli* Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies, США) в случае тотальной ДНК гистона H1.3 и набора DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual CHO Host Cell DNA (#D555T, Cygnus Technologies) в случае тотальной ДНК CHO. Качественную и количественную оценку препаратов ДНК проводили, измеряя соотношение 260/280 нм и концентрацию на планшете NanoQuant (TECAN Infinite F200 pro, Австрия).

Рабочий стандартный образец (PCO) для рвПЦР готовили путем обработки тотальной ДНК штамма-продуцента гистона H1.3 ультразвуком в течение 5 мин (Sonicator W-10, Head System Ultrasonic, США). Затем оценивали степень разрушения ДНК при помощи горизонтального агарозного электрофореза (система SE-2, Helicon, Россия) и визуализации в УФ-диапазоне при помощи гель-документирующего устройства (Vilber Lourmat, Франция) в присутствии SYBR GREEN I (ApplyChem Panreac, Германия). Для нанесения образцов на гель использовали 6X MassRuler DNA Loading Dye (Fermentas, США). В качестве маркера использовали FastRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas).

Праймеры к гену 16S РНК *E. coli* были разработаны ранее и использовались для анализа остаточной ДНК штамма-продуцента в АФС инсулина [8]. Последовательности праймеров (5'→3') (ООО «ДНК-Синтез», Россия) были следующие: 16S-FORW: GTG GCG GAC GGG TGA GTA; 16Sa-REV: GGC TGC TGG CAC GGA GTT; 16S-FN: GGG ATA ACT ACT GGA AAC GGT; 16S-REV^{new}: ATG GGC AAG AGG CCC GAA; 16S-REV: GTC GCC TAG GTG AGC CGT.

Температуру отжига праймеров к гену 16S RNA *E. coli* для ампликонов разного размера подбирали на ПЦР-амплификаторе Thermal Cycler T100 (BioRad). Использовали стерильную воду для ПЦР («Евроген»). В реакционную смесь объемом 25 мкл входили следующие компоненты: ПЦР-буфер (70 мМ трис-НСl, рН 8,6/25°, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ dNTP, праймеры (5 пмоль) и 0,2 ед. HS *Taq*-полимеразы (5 ед/мкл, «Евроген», Россия). Условия амплификации были следующие; *программа 1*: 95°, 5 мин, 35 циклов: 95°, 30 с; 50°—70°, 30 с; 72°, 20 с.; затем 72°, 3 мин. Результаты оценивали при помощи горизонтального агарозного электрофореза и визуализации в УФ-диапазоне.

рвПЦР с праймерами к гену 16S РНК *E. coli* проводили на приборе DT96 («ДНК-технологии»,

Россия). В реакционную смесь объемом 25 мкл входили следующие элементы: ПЦР-смесь Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) и праймеры (5 пмоль). Для амплификации использовали следующие программы: *программа 2*: 95°, 5 мин, 45 циклов; 95°, 30 с; 60°, 70 с; *программа 3*: 95°, 5 мин, 45 циклов; 95°, 30 с; 58°, 40 с. Результаты оценивали при помощи программы Real_Time PCR v.7.5, а также горизонтального агарозного электрофореза и визуализации в УФ-диапазоне.

рвПЦР с праймерами из набора DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual E.coli Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies) проводили на приборе DT96 («ДНК-технологии»). В реакционную смесь объемом 25 мкл входили ПЦР-смесь Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) и праймеры (5 пмоль). Условия амплификации выполнялись согласно руководству к набору: 95°, 10 мин, 45 циклов; 95°, 15 с; 55°, 60 с. Результаты оценивали при помощи программы Real_Time PCR v. 7.5, а также горизонтального агарозного электрофореза и визуализации в УФ-диапазоне.

В процессе исследований использовали следующие реактивы российского производства квалификации «ч.д.а.», «х.ч.» и фармакопейной чистоты: пептон, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, агар, ампициллин (готовая лекарственная форма стерильная для инъекций), этанол, трис-(гидроксиметил)аминометан, динатриевая соль

этилендиаминтетрауксусной кислоты, додецилсульфат натрия, лизоцим, трипсин, РНКазуА, хлороформ, фенол водонасыщенный, кислота хлористоводородная концентрированная, акриламид, бис-акриламид, персульфат аммония, тетраметилэтилендиамин (TEMED), β-меркаптоэтанол, гидроксид натрия, кислоту уксусную ледяную, краситель бромфеноловый синий, этидия бромид, агарозу, глицин, глицерин, краситель кумасси бриллиантовый синий G250 и деионизованная вода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация пробоподготовки АФС гистона Н1.3 для определения остаточной ДНК штамма-производителя методом рвПЦР

Применение набора Cygnus для экстракции ДНК из субстанции гистона Н1.3 не дало нужного результата. В ходе выделения было отмечено образование комплекса ДНК—белок, причем ПЦР не происходила из-за отсутствия свободного субстрата ДНК в реакционной смеси (рис. 1, А). В связи с этим было принято решение разрушить комплекс при помощи гидролиза АФС трипсином. Соотношение фермент—белок составляло 1:100. Результаты трипсинолиза оценивали при помощи электрофореза в ПААГ по Лэммли в денатурирующих условиях (см. рис. 1, Б).

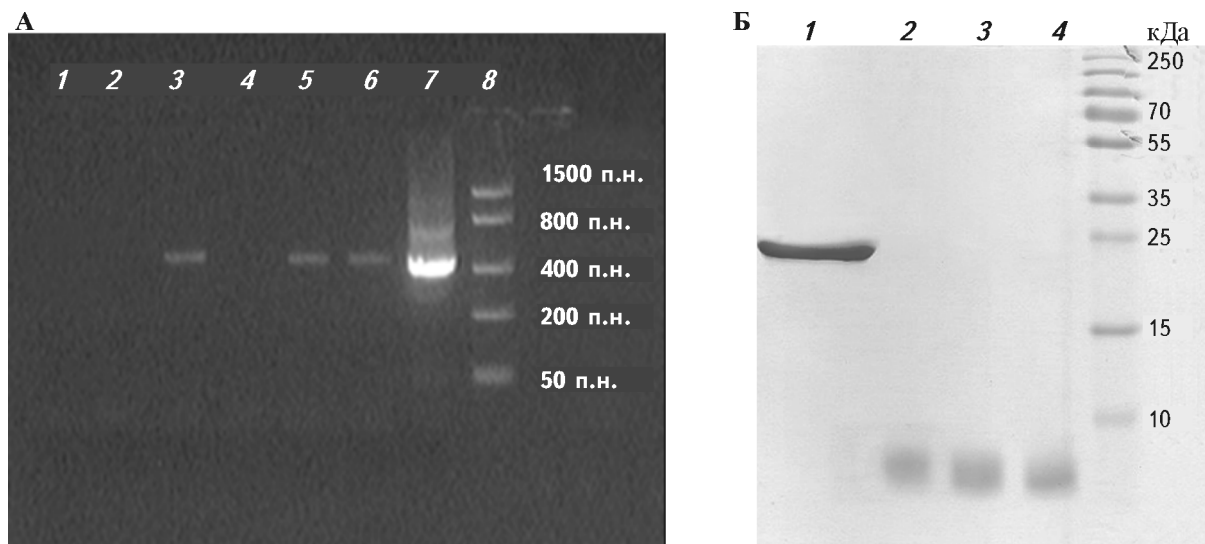


Рис. 1. А — электрофореграмма в 2,5%-ном агарозном геле результатов ПЦР-амплификации фрагмента 425 п.н. в присутствии этидия бромида (программа 1, метод добавок). Состав пробы: 1 — вода; 2 — ДНК, выделенная с помощью набора Cygnus из 10 мкг АФС гистона Н1.3; 3 — ДНК гистона Н1.3, 50 фг; 4 — ДНК, выделенная с помощью набора Cygnus из 10 мкг АФС гистона Н1.3 + ДНК гистона Н1.3, 50 фг; 5 — ДНК, выделенная с помощью набора Cygnus из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3; 6 — ДНК, выделенная с помощью набора Cygnus из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3 + ДНК гистона Н1.3, 50 фг; 7 — ДНКг гистона Н1.3, 2 нг. Б — электрофореграмма в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях: 1 — гистон Н1.3, 4 мкг; 2, 3, 4 — гистон Н1.3 (40 мкг АФС) после обработки трипсином в течение 1, 2 и 4 ч. соответственно

На следующем этапе пробоподготовки из трипсинолизированной субстанции выделили ДНК при помощи набора *Sygnus*. Для подтверждения оптимальности условий пробоподготовки использовали метод добавок в смесь для ПЦР: в пробирки вносили 10 мкг АФС гистона Н1.3; ДНК, экстрагированную при помощи набора *Sygnus* из АФС, а также ДНК, экстрагированную при помощи набора *Sygnus* из трипсинолизированной АФС. К вышеуказанным субстанциям добавляли 50 фг тотальной ДНК (ДНКт) гистона Н1.3 (см. рис. 1, А). Из рис. 1, А видно, что в отсутствие трипсинолиза происходит ингибирование ПЦР добавленным белком Н1.3-гистона (стандарт ДНК не обнаруживается, см. рис. 1, А, дорожка 4). Гидролиз трипсином позволяет разрушить белок и устранить ингибирование (стандарт ДНК виден, см. рис. 1, А, дорожка б). Таким образом, метод добавок показал эффективность использования стадии трипсинолиза как этапа пробоподготовки. Для количественного определения содержания остаточной ДНК в АФС гистона Н1.3 требовался переход к более чувствительному методу — рвПЦР.

Создание рабочего стандартного образца на основе тотальной ДНК штамма-продуцента гистона Н1.3

В процессе получения АФС гистон Н1.3 проходит множество технологических стадий, в связи с чем остаточная ДНК штамма-продуцента, присутствующая в фармацевтической суб-

станции, является весьма гетерогенным материалом. Это фрагменты одно- и двухцепочечной ДНК, образовавшиеся в результате проведения технологического процесса начиная от разрушения клеток штамма-продуцента до финишной очистки получаемого продукта. Применение ПЦР и рвПЦР позволяют выявлять одно- и двухцепочечные фрагменты ДНК, размер которой равен или превосходит выбранный для амплификации фрагмент. Поэтому в качестве положительного контроля необходимо было использовать разрушенную ультразвуком тотальную ДНК штамма-продуцента.

Было проведено выращивание биомассы штамма-продуцента гистона Н1.3 *E. coli* BL21(DE3)/pH1.3. С целью создания РСО для рвПЦР выделенную из биомассы тотальную ДНК очищали от РНК путем инкубации с РНКазой А, после чего обрабатывали ее ультразвуком в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение в 2,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия показало, что фрагменты ДНК_{уз} имеют массу в диапазоне от 50 до 500 п.н. (рис. 2, А).

Полученные растворы ДНК вносили в смесь для рвПЦР в присутствии SYBR GREEN I в качестве интеркалирующего красителя. В реакции использовали сконструированные ранее праймеры к гену 16S RNA *E. coli* для ампликона размером 425 п.н. Проводили оптимизацию температурного режима реакции; для этого рассмотрели динамику накопления ПЦР-продукта при различной температуре отжига праймеров в диапазоне от 50°

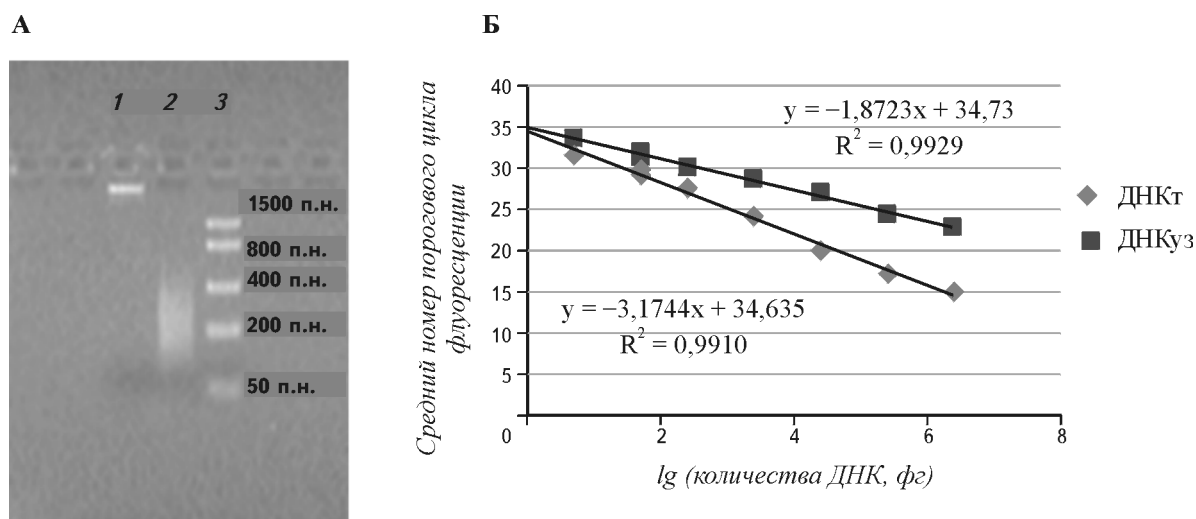


Рис. 2. А — электрофореграмма в 2,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия: 1 — ДНКт гистона Н1.3, 3 мкг; 2 — ДНК_{уз} гистона Н1.3, 3 мкг; Б — калибровочные кривые для амплификации фрагмента 425 п.н. путем рвПЦР (SYBR GREEN I) с указанием уравнений и коэффициентов аппроксимации; количество ДНКт и ДНК_{уз} в реакции для каждой точки кривой: 2,5 нг; 250 пг; 25 пг; 250 фг; 50 фг; 25 фг; 5 фг; 0 фг

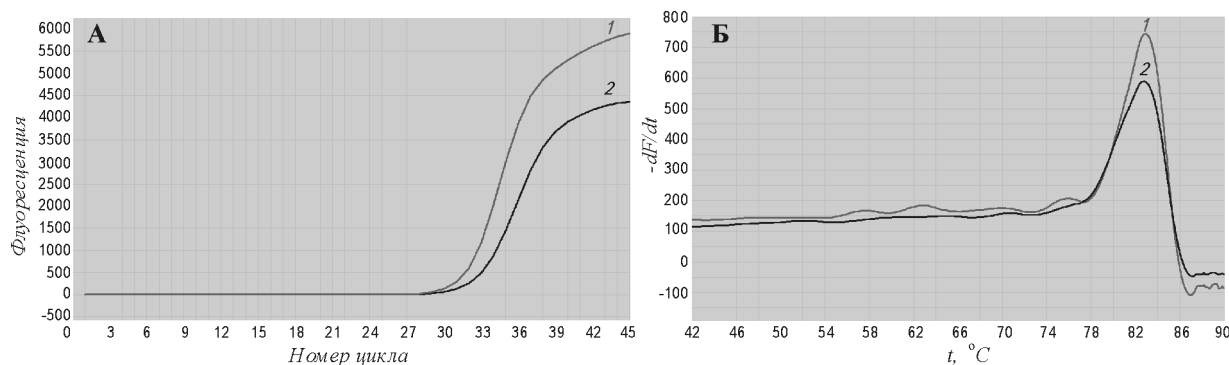


Рис. 3. А — накопление ДНКт (1) и ДНКуз (2) в процессе рвПЦР (SYBR GREEN I) (программа 2). Использовали праймеры к ампликону 425 п.н., 50 фг ДНКт и ДНКуз в пробе. Б — кривые плавления продуктов амплификации (425 п.н., $T_{пл} = 83,0^\circ$)

до 70° . В итоге для ампликона 425 п.н. была выбрана оптимальная температура отжига 60° , время отжига и элонгации составило 70 с (программа 2). Графики накопления ДНК в ходе реакции, а также кривые плавления представлены на рис. 3.

Из рис. 3, Б видно, что профиль плавления продуктов реакции соответствует профилю фрагмента размером 425 п.н.; димеры праймеров отсутствуют.

Для оценки линейности калибровочных кривых проанализировали результаты 6 параллельных определений для каждого из калибровочных растворов. Были рассчитаны средние значения по-

рогового цикла флуоресценции (C); при калибровке ДНКт коэффициент аппроксимации составил 0,9929, ДНКуз — 0,9910 (см. рис. 2, Б) Наряду с этим оценивали значения внутрисерийного ($S_{отн, \% Intra}$) и межсерийного ($S_{отн, \% Inter}$) относительного стандартного отклонения и коэффициент «обратного пересчета» (ОП, %) по уравнениям калибровки (табл. 1). Количество испытаний при определении $S_{отн, \%}$ (n) было равно 6.

Важным параметром является эффективность рвПЦР (E), которую рассчитывают по формуле $E = 10^{(-1/-b)}$, где b — угол наклона калибровочной кривой. При $E=2$ эффективность реакции

Таблица 1

Характеристики калибровочных кривых для результатов рвПЦР (SYBR GREEN I) по программе 2, ампликон 425 п.н.

Содержание ДНК, фг	ДНКт			ДНКуз		
	$S_{отн, \% Intra}$, n=6	$S_{отн, \% Inter}$, n=6	ОП, %	$S_{отн, \% Intra}$, n=6	$S_{отн, \% Inter}$, n=6	ОП %
0	0,62	0,97	102,0	0,71	1,09	105,2
5	0,51	0,84	98,1	0,96	0,94	106,4
25	0,32	0,95	101,5	0,84	0,96	99,7
50	0,96	0,99	99,4	0,74	0,98	99,8
250	0,75	0,89	108,2	0,35	0,87	94,9
2500	0,24	0,92	101,4	0,48	0,91	102,1
25000	0,59	0,78	95,4	0,68	0,96	106,5
250000	0,36	0,89	97,2	0,51	0,90	96,0
2500000	0,51	0,87	103,4	0,37	0,78	100,4

составляла 100% [9]. В случае ДНКт эффективность реакции имела значение 2,07, для ДНКуз этот параметр составил 3,42. Расчетное значение C_t при введении в реакцию 50 фг ДНКт и ДНКуз составило 29,2 и 31,5 циклов, соответственно (см. рис. 2, Б). ПО и ПКО для ДНКт составили 0,96 фг и 3,02 фг, соответственно. Для ДНКуз эти показатели имели значения 1,04 фг и 5,57 фг, соответственно.

Подбор оптимального ампликона для рвПЦР

С целью повышения чувствительности методики необходимо было выбрать оптимальный ампликон для рвПЦР. Ранее нами были разработаны праймеры к гену 16S РНК *E. coli* и проведен анализ содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в АФС инсулина человека [8]. Поскольку последовательности нуклеотидов гена 16S РНК штаммов *E. coli* BL21(DE3)/prhH1.3 и BL21(DE3)/rINS07 идентичны, для выполнения задач данного исследования были использованы вышеуказанные праймеры с размером ампликона 79 п.н., 123, 179 и 425 п.н. Выбор диапазона размера ампликонов связан с гетерогенностью ДНК в АФС.

На начальном этапе проводили оптимизацию температурного режима реакции; для этого рассмотрели динамику аккумуляции ПЦР-продуктов размером 79 п.н., 123 и 179 п.н. при различных

температурах отжига праймеров в диапазоне от 50° до 70°. Оптимальная температура отжига составила 58°, время отжига и элонгации было равно 40 с (программа 3). В реакцию рвПЦР (SYBR GREEN I) вносили ДНКуз, а также праймеры к ампликонам разных размеров. Ампликон 425 п.н. показал наибольшую чувствительность в сравнении с остальными. При этом на кривых плавления для ампликонов размером 425 п.н. и 179 п.н. отсутствовали димеры праймеров (рис.4, Б, Г). В случае ампликонов 123 п.н. и 79 п.н. на кривых плавления были отмечены пики, соответствующие димерам праймеров.

Для оценки линейности калибровочных кривых проанализировали результаты 6 параллельных определений для каждого из калибровочных растворов (рис. 5). В табл. 2 рассчитан средний номер порогового цикла флуоресценции (C_t) для каждого ампликона.

Согласно уравнениям калибровочных кривых, значения эффективности реакций E для ампликонов 179 п.н., 123 и 79 п.н. были около 2, тогда как E для ампликона 425 п.н. имела значение 3,39. Возможно, это связано с большим размером ампликона (425 п.н.) и гетерогенной структурой РСО вследствие его фрагментированности. Но при этом расчетное значение C_t при введении в реакцию предельно допустимой концентрации оста-

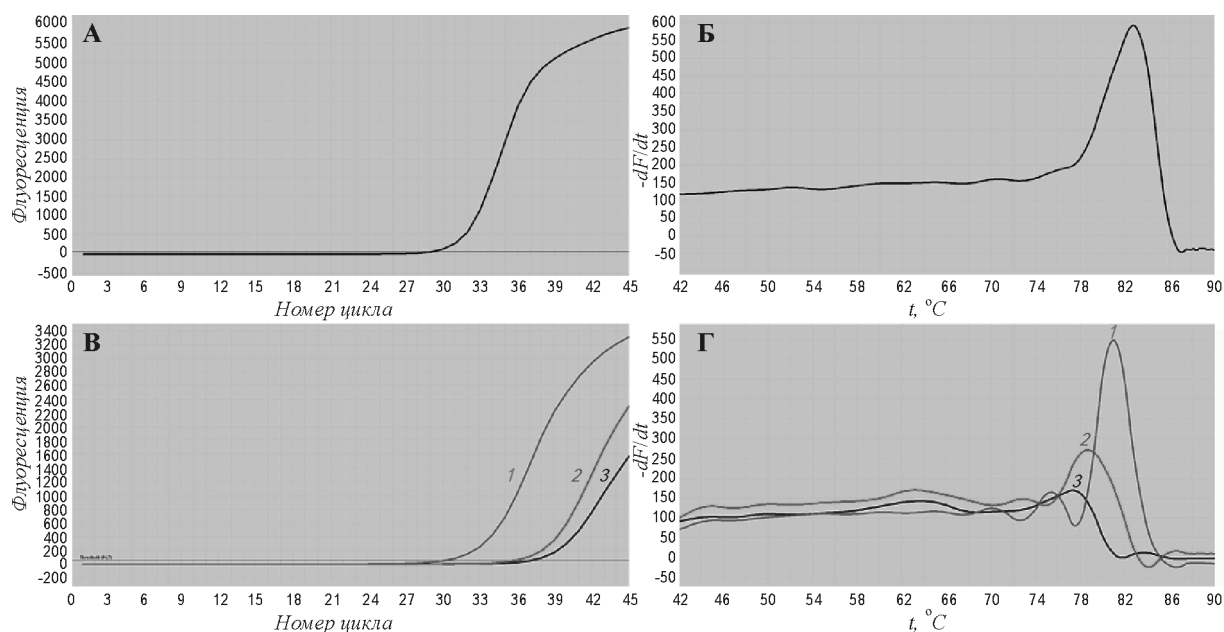


Рис. 4. А — накопление ДНКуз в процессе рвПЦР (SYBR GREEN I) (программа 2). Праймеры к ампликону 425 п.н., 2,5 фг ДНКуз добавляли в реакционную смесь. Б — плавление продукта амплификации ($T_{пл}^{425 \text{ п.н.}} = 83,0^\circ$). В — накопление ДНКуз при использовании следующих ампликонов: 1 — 179 п.н.; 2 — 123 п.н.; 3 — 79 п.н. в процессе рвПЦР (SYBR GREEN I). Использовали праймеры к ампликонам 179 п.н., 123 п.н. и 79 п.н., соответственно. Г — плавление продуктов амплификации: 1 — $T_{пл}^{179 \text{ п.н.}} = 81,1^\circ$; 2 — $T_{пл}^{123 \text{ п.н.}} = 78,8^\circ$; 3 — $T_{пл}^{79 \text{ п.н.}} = 77,4^\circ$

Результаты рвПЦР (SYBR GREEN I) по программе 2 (размер ампликона 425 п.н.) и по программе 3 (размер ампликонов 179 п.н., 123 п.н., 79 п.н.)

Размер ампликона, п.н.	Уравнение	Эффективность реакции, E	Ig (количества ДНК _{уз гистона, 50 фг})	Расчетное число циклов, C _t
425	Y = -1,883x + 34,789 R = 0,9943	10 ^{^(-1/-1,883)} = 3,39	1,698970004	31,5
179	Y = -3,1297x + 40,604 R = 0,9903	10 ^{^(-1/-3,1297)} = 2,09	1,698970004	35,3
123	Y = -3,1721x + 45,494 R = 0,9583	10 ^{^(-1/-3,1721)} = 2,07	1,698970004	40,1
79	Y = -3,7955x + 49,152 R = 0,9679	10 ^{^(-1/-3,7955)} = 1,83	1,698970004	42,7

точной ДНК (50 фг) составляло 31,5 для ампликона 425 п.н. и 35,3 для ампликона 179 п.н. Для других ампликонов значение этого параметра сдвинуто в область большего значения, где чувствительность и достоверность результатов метода ПЦР методики значительно снижаются. Соответственно в дальнейших исследованиях решено было использовать праймеры к ампликону размером 425 п.н., а также при необходимости — праймеры к ампликону 179 п.н.

Определение остаточной ДНК штамма-продуцента гистона Н1.3 в АФС. Метод добавок

Метод рвПЦР с оптимизированными параметрами был использован для анализа количества остаточной ДНК в следующих 6 сериях субстанции гистона Н1.3 (151111, 220912, 250912, 261012, 381212, 391212). В пробирку вносили ДНК, экстрагированную при помощи набора

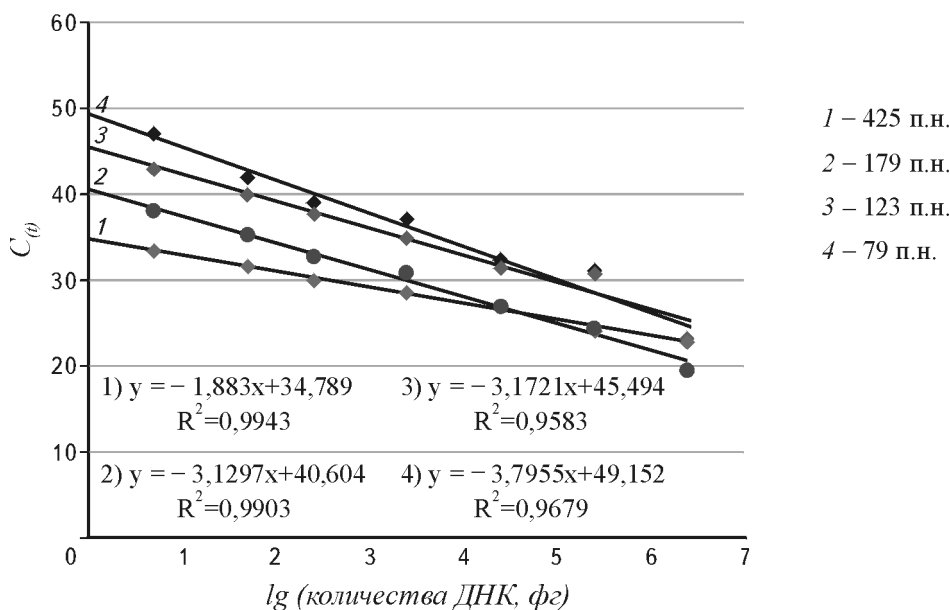


Рис. 5. Калибровочные кривые для результатов амплификации фрагментов 425 п.н.(1), 179 п.н.(2), 123 п.н.(3), 79 п.н.(4) в процессе рвПЦР (SYBR GREEN I) с указанием уравнений и коэффициентов аппроксимации. Количество ДНК_{уз} в реакции для каждой точки кривой: 2,5 нг; 250 пг; 25 пг; 250 фг; 50 фг; 25 фг; 5 фг; 0 фг

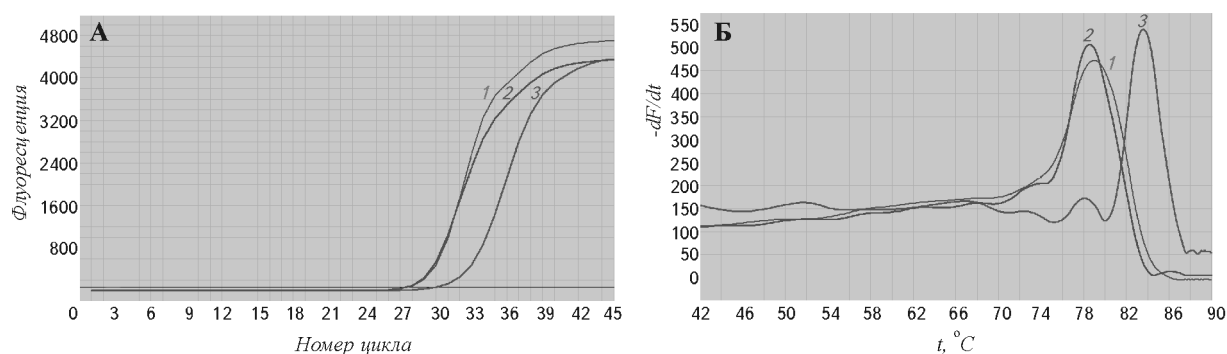


Рис. 6. А — метод добавок; накопление ДНКуз для ампликона 425 п.н.: 1 — ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (количество белка 10 мкг в пробе) + ДНКуз (50 фг в пробе); 2 — ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (10 мкг в пробе); 3 — ДНКуз (50 фг в пробе). Б — плавление продуктов амплификации

Сygnus из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3; к субстанции добавляли 50 фг РСО — ДНКуз гистона Н1.3. В качестве положительного контроля также использовали ДНКуз в количестве 50 фг в пробу. Метод добавок [10] показал, что количество остаточной ДНК штамма-производителя в субстанциях превышает предельно допустимое значение. Для исследованных серий эти значения были в диапазоне от 1600 до 7000 фг. Сводные данные для серии 381212 представлены на рис. 6 и в табл. 3.

Из полученных данных видно, что температура плавления продуктов рвПЦР для ДНКуз — 83,1° — соответствовала таковой для ампликона 425 п.н.; в случае АФС и АФС+ДНКуз этот показатель составлял около 79,0°.

Для оценки размеров продуктов реакции проводили горизонтальный электрофорез в агарозном геле в присутствии SYBR GREEN I (рис. 7). В случае РСО полоса на электрофореграмме соот-

ветствовала ампликону размером 425 п.н. (см. рис. 7, 2). Если же в пробирках присутствовала остаточная ДНК, выделенная из трипсинолизированной субстанции гистона Н1.3, имела место амплификация продукта близкого, но несколько отличного от ампликона 425 п.н. размера (см. рис. 7, 3).

Для предотвращения возможного образования шпилек и других пространственных структур ДНК в реакцию вводили 3% ДМСО. Это повысило эффективность реакции, о чем можно судить по S-образным кривым накопления амплификата (рис.8, А). Вследствие добавления ДМСО температура плавления всех продуктов рвПЦР понизилась примерно на 4°. Для ДНКуз и ампликона 425 п.н. эта величина составила 79,0° (см. рис. 8, Б, 2 и 5); в случае АФС и АФС+ДНКуз этот показатель имел значение около 75,5° (см. рис.8, Б, 1 и 3). Электрофоретическая картина метода добавок была аналогична приведенной на рис. 7.

Таблица 3

Метод добавок: результаты рвПЦР (SYBR GREEN I) по программе 2, размер ампликона 425 п.н.

Наименование образца	Число циклов	Расчетное количество остаточной ДНК, фг, по уравнению калибровки $Y = -1,8647x + 34,718$; $R^2 = 0,9936$
ДНКуз гистона Н1.3, 50 фг	31,5	53,2
ДНК, выделенная из 10 мкг трипсинолизированной субстанции гистона Н1.3	27,6	6565,0
ДНК, выделенная из 10 мкг трипсинолизированной субстанции гистона Н1.3 + ДНКуз гистона Н1.3, 50 фг	27,5	7427,9

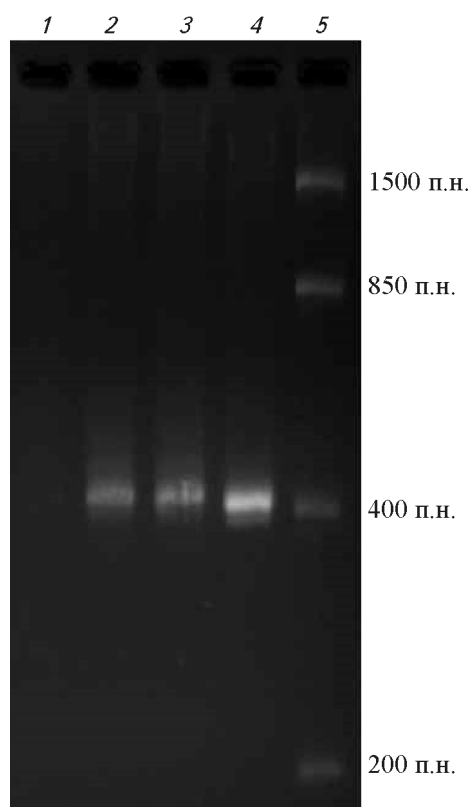


Рис. 7. Электрофореграмма в 5%-ном агарозном геле результатов амплификации фрагмента 425 п.н. в присутствии SYBR GREEN I (программа 2, метод добавок). Состав проб: 1 — вода; 2 — ДНК, выделенная набором *Sygnus* из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3; 3 — ДНК, выделенная набором *Sygnus* из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3 + ДНК гистона Н1.3 (50 фг); 4 — ДНК гистона Н1.3 (50 фг); 5 — маркеры молекулярной массы

Оценка специфичности разработанных праймеров для геномной ДНК *E. coli* в сравнении с геномной ДНК эукариот

Специфичность разработанных праймеров к геномной ДНК штамма — продуцента гистона

была подтверждена при помощи рВПЦР (SYBR GREEN I) при использовании тотальной ДНК ткани представителя эукариот. В реакцию вводили праймеры к ампликону размером 425 п.н., и ДНКт гистона Н1.3 сравнивали с ДНК, выделенной из яйцеклеток китайского хомячка (*CHO*). Эффективность реакции (*E*) для праймеров к гену 16S РНК была равна 2 (100%).

Как видно из калибровочных кривых, при использовании ДНКт *CHO* динамика развития реакции рВПЦР не наблюдается (рис. 9). Таким образом, не происходит отжиг праймеров на эукариотической ДНК и, следовательно, использованные праймеры обладают специфичностью в отношении геномной ДНК *E. coli* штамма-продуцента гистона Н1.3.

Оценка эффективности разработанной методики в сравнении с таковой коммерческого набора по выявлению остаточной ДНК в АФС

При разработке методик контроля качества АФС на биофармацевтических производствах на первом этапе часто используют коммерческие наборы по выявлению остаточной ДНК в субстанции белка. Было проведено сравнение результатов рВПЦР (SYBR GREEN I) при использовании разработанных праймеров к гену 16S РНК *E. coli* и праймеров из набора *Sygnus*. В реакцию вводили ДНКуз штамма-продуцента гистона Н1.3. При этом были полностью соблюдены рекомендации набора *Sygnus* в отношении количества праймеров и температурного режима реакции (рис. 10).

В результате рВПЦР была рассчитана эффективность реакции для обеих пар праймеров, эта величина составила 2,06 в случае праймеров к гену 16S РНК и 1,79 в случае праймеров *Sygnus*. Димеры праймеров при реакции с праймерами к гену

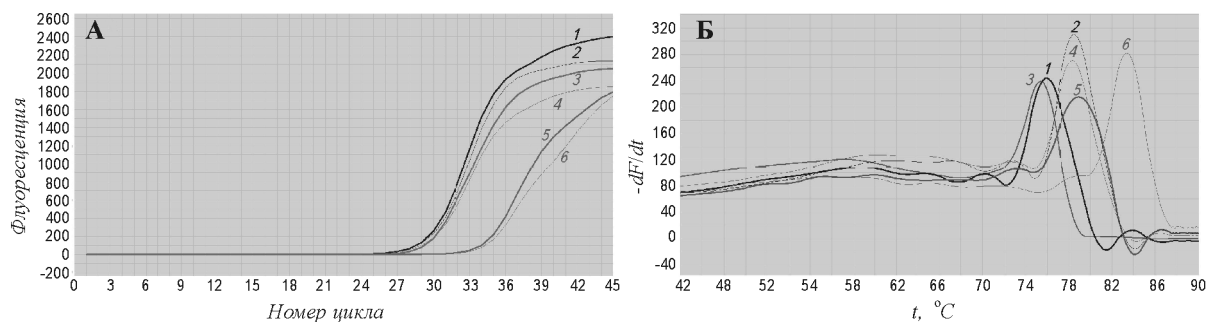


Рис. 8. А — метод добавок; накопление ДНКуз для ампликона 425 п.н.: 1, 2 — ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (количество белка 10 мкг в пробе) + ДНКуз (50 фг в пробе); 3, 4 — ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (10 мкг в пробе); 5, 6 — ДНКуз (50 фг в пробе). В пробы 1, 3, 5 добавлен 3%-ный ДМСО. Б — плавление продуктов амплификации

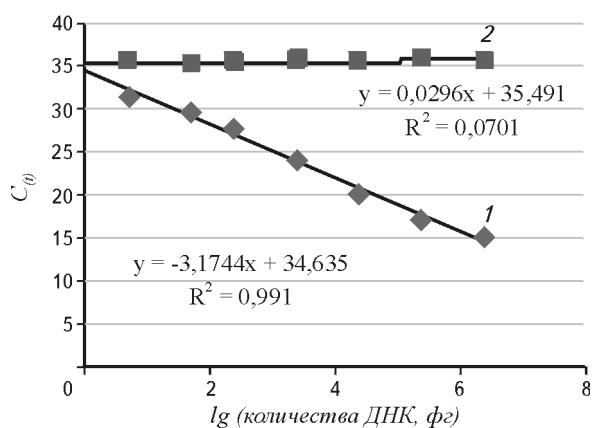


Рис. 9. Калибровочные кривые для результатов амплификации фрагмента 425 п.н. в процессе рвПЦР (SYBR GREEN I): 1 — ДНКт гистона H1.3; 2 — ДНКт *CHO*. Количество ДНКт в реакции для каждой точки кривой: 2,5 нг; 250 пг; 25 пг; 250 фг; 50 фг; 25 фг; 5 фг; 0 фг

16S РНК выявлены не были (см. рис. 10, А) в отличие от праймеров из набора *Sygnus*, на кривых плавления которых виден значительный пик в области 60—65°. Это свидетельствует о неоптималь-

ности условий последней реакции, как и разброс значений температуры плавления продуктов ПЦР (см. рис. 10, Б). Предел чувствительности метода с праймерами *Sygnus* составил 25 пг в пробе; методика с использованием разработанных праймеров более чем в 30 раз чувствительнее методики с применением коммерческого набора. Электрофорез в 2,5 %-ном агарозном геле в присутствии SYBR GREEN I позволил оценить размер ампликонов для продуктов реакции. Был идентифицирован ампликон для ДНКт гистона H1.3 и праймеров из набора *Sygnus*. Его размер составил около 150 п.н. (см. рис. 10, В, Г).

Таким образом, рассматриваемый коммерческий набор не может быть использован для определения минимальных количеств ДНК в субстанции. Его целесообразно применять лишь на начальных этапах разработки методики ПЦР.

Рассматриваемый в данном исследовании метод позволяет определить предельно допустимое количество остаточной ДНК в АФС гистона H1.3 с высокой степенью достоверности. Внутри-

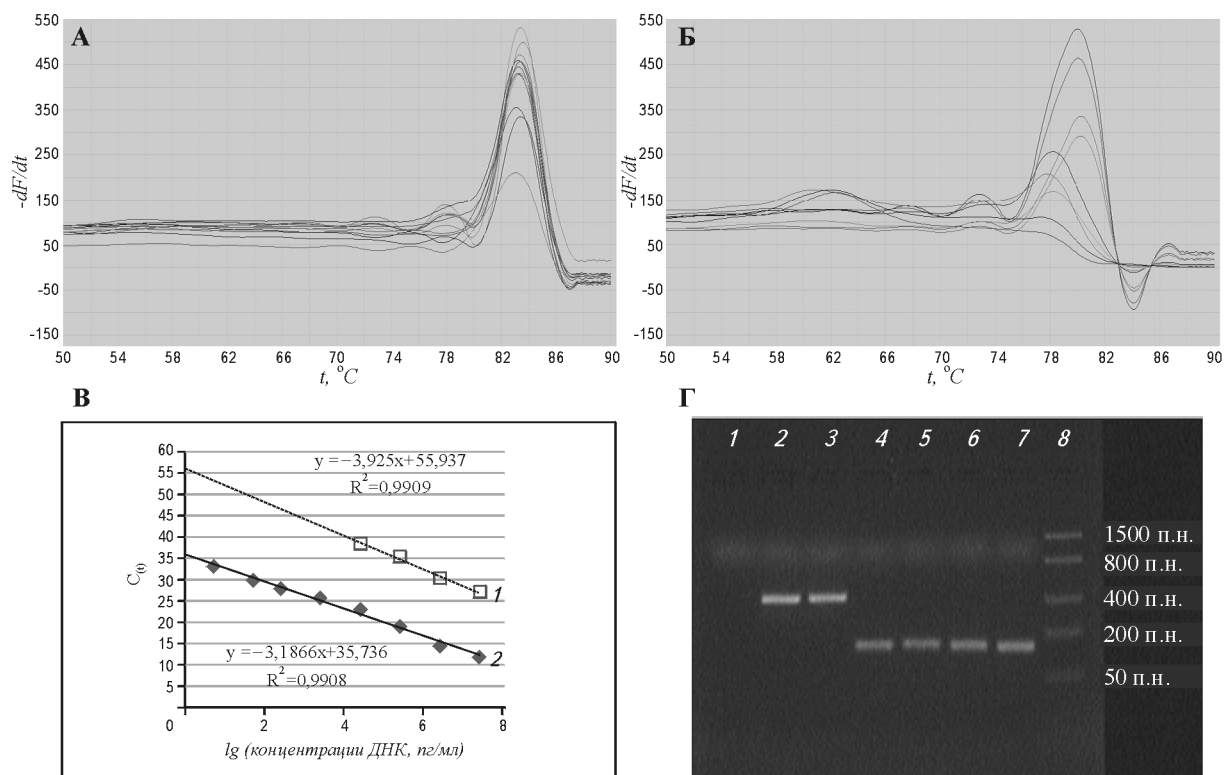


Рис. 10. А, Б — плавление продуктов амплификации праймеров к гену 16S РНК и праймеров *Sygnus*, соответственно, полученных в результате рвПЦР (SYBR GREEN I); В — калибровочные кривые для результатов амплификации разработанных праймеров к гену 16S РНК (2) и праймеров *Sygnus* (1). Количество ДНКт в реакции для каждой точки кривой: 25 нг; 2,5 нг; 250 пг; 25 пг; 250 фг; 50 фг; 25 фг; 5 фг; 0 фг. Г — электрофореграмма продуктов рвПЦР в 2,5%-ном агарозном геле: 1 — вода; 2, 3 — ДНКт гистона H1.3, 2,5 пг в пробе + праймеры к ампликону 425 п.н.; 4, 5, 6, 7 — ДНКт гистона H1.3, 2,5 пг в пробе + праймеры *Sygnus*; 8 — маркеры молекулярной массы

серийное и межсерийное стандартное отклонение для шести повторов не превышает 0,99%. Разработанные праймеры к гену 16S РНК в 30 раз чувствительнее праймеров референсного коммерческого набора Sygnus. Результаты исследований положены в основу нормативной производственной документация для методики контроля остаточной ДНК штамма-производителя в субстанции рекомбинантного гистона H1.3 на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН.

Получено 7.04.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Rytomaa, M. Dissociation of cytochrome c from liposomes by histone H1. Comparison with basic peptides / M. Rytomaa, P.K. Kinnunen // *Biochemistry*. — 1996. — V.35(14). — P. 4529—4539.
2. Partridge, W.M. Transport of histone through the blood-brain barrier / W.M. Partridge, D. Triguero, J. Buciak // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1989. — V.251(3). — P. 821—826.
3. European Pharmacopoeia 8.0, European Department for the Quality of Medicines. — Strasbourg, France, 2014. — 5070 p.
4. ICH harmonised tripartite guideline / Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates, Used for Production of Biotechnological/Biological products Q5D, March, 1998. — London, 1998. — 13 p.
5. WHO Expert Committee on Biological Standardization / Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBP), October, 2009. — Geneva: WHO Press, 2009. — 33 p.
6. FDA Briefing Document/Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, Cell Lines Derived from Human Tumors for Vaccine Manufacture, USA, September, 2012. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccineandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM319573.pdf>
7. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. — N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. — P. 545.
8. Скоблов М.Ю. Количественное определение содержания ДНК в генно-инженерных активных фармацевтических субстанциях методом ПЦР в реальном времени / М.Ю. Скоблов, Е.Д. Шибанова, Е.В. Ковалева, Д.И. Баирамшвили, Ю.С. Скоблов, А.И. Мирошников // *Биоорганическая химия*. — 2010. — Т.36. — №1. — С.119—123.
9. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.А. ПЦР в реальном времени. — М.: БИНОМ, 2009. — 215 с.
10. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации. — М.: Спорт и Культура, 2007. — 192 с.

E.V. KOVALEVA^{1,2,*}, A.P. BARANNIK², Yu.S. SKOBLOV², E.D. SHIBANOVA², and V.I. SHVETS¹

¹The Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, 119571, Moscow Russia

²The Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Russ. Acad. Sci., 117997, Moscow Russia

e-mail: katja_kov@mail.ru
kovaleva@kou.ibch.ru

Design and Application of rtPCR Method for Analysis of Strain-Producer Residual DNA in Histon H1.3 Substance

The application of the real-time PCR quantitative method (rtPCR) with specific primers to the 16S RNA *E.coli* gene fragment for the detection of residual DNA of *E. coli* BL21(DE3)/prhH1.3 strain-producer in the APS of the recombinant human histon H1.3 has been suggested. The sample preparation was optimized, a working standard based on the sonicated total DNA of the strain-producer was designed, and an amplicon for the rtPCR was selected. The specificity of the designed primers was evaluated in comparison with eukaryotic DNA. The efficiency of the method in comparison with that using a commercial kit was analyzed. The designed primers to the 16S RNA gene proved to be by 30 times more sensitive than primers of a reference commercial kit.

Key words: active pharmaceutical substance, histon, real-time PCR, residual DNA.

* Author for correspondence.