

## 宿主細胞由来の 残留DNA検査キット

01

大腸菌由来ゲノムDNAをqPCR（プローブ法）で定量するキット

**QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for *E. coli***

02

CHO細胞由来のゲノムDNAをqPCR（プローブ法）で定量するキット

**QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for CHO cells**

03

宿主細胞由来の微量DNAを抽出できるキット

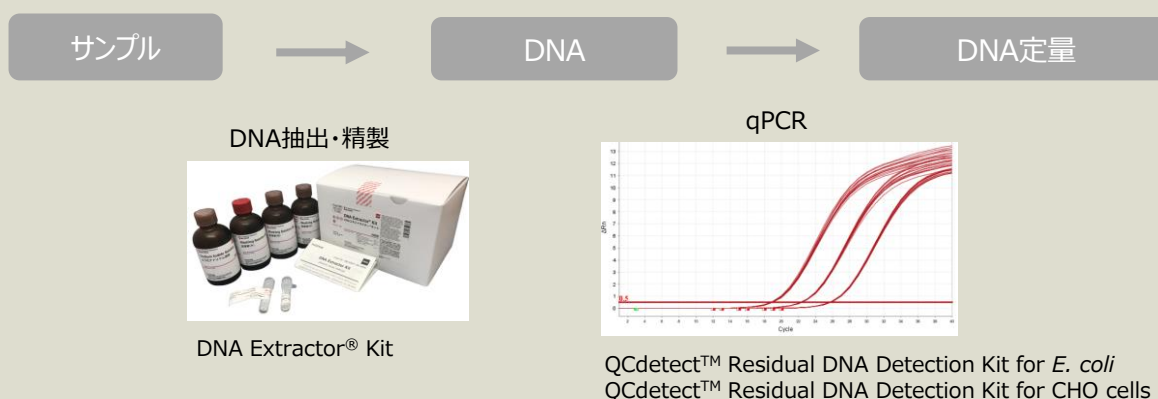
**DNA Extractor® Kit**

## 宿主細胞由来の残留DNA試験

バイオ医薬品の製造工程において、抗体やタンパク質の発現にCHO細胞や大腸菌が宿主細胞（ホストセル）として用いられます。これら宿主細胞のDNAは、製造工程由来不純物として管理しなければなりません。

世界保健機関（WHO）、米国食品医薬品局（FDA）、欧州薬局方（EP）は、最終的な宿主由来残留DNA量を10ng/doseもしくは100pg/dose未満とする指針を示しています。

これまで富士フイルム和光純薬では、残留DNA試験用試薬として、DNA抽出・精製キット「DNA Extractor® Kit」を販売していましたが、この度新たに大腸菌とCHO細胞の残留DNAを検出・定量するキットを発売しました。



### 01 QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for *E. coli*

Wako

本製品は、大腸菌由来ゲノムDNAをqPCR（プローブ法）で定量するキットです。

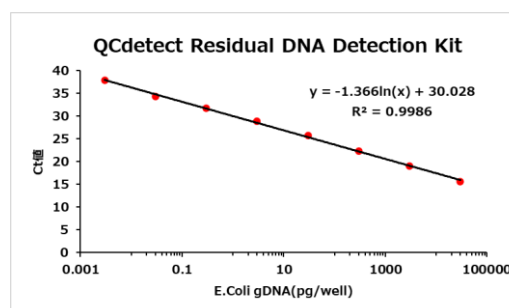
バイオ医薬品の品質管理及び製造プロセス開発における宿主細胞由来残存DNA検査にご使用下さい。

- 検出下限：≥ 0.003 pg/test
- 定量下限：≥ 0.03 pg/test
- 直線性の高い検量線
- アッセイ間差が少なく再現性が高い
- Pre-mix bufferで操作が簡単
- サンプル中の夾雑物の影響を受けにくい
- Internal Control含有

和光コード	品名	容量	希望納入価格(円)
290-85301	QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for <i>E. coli</i>	F <sup>o</sup> 100回用	130,000

#### 検量線

0.0003pgから30,000pgの大腸菌由来gDNAを本キットでqPCRを行い、検量線を作成した（n=3）。0.003pgから30,000pgの広範囲の濃度幅において、直線性の高い検量線が得られた。

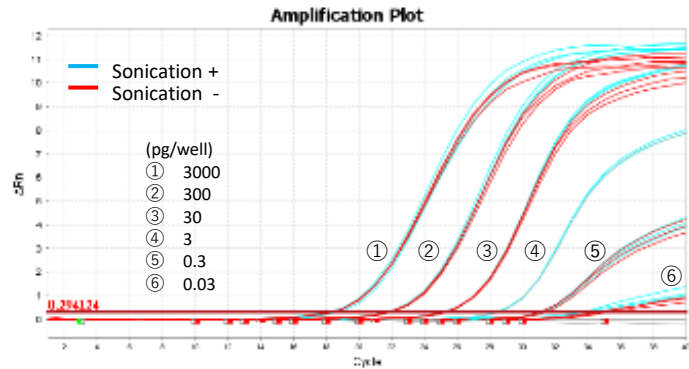


Wako	QCdetect Residual DNA Detection Kit								
pg/well	30000	3000	300	30	3	0.3	0.03	0.003	0.0003
Ct	15.655	19.011	22.335	25.709	28.932	31.941	33.825	37.731	N.D
	15.393	18.976	22.414	25.675	28.875	31.684	34.866	38.012	
	15.713	19.091	22.400	25.696	28.945	31.657	34.507	N.D	
Average Ct	15.587	19.026	22.383	25.693	28.917	31.760	34.399	37.872	
S.E	0.1707	0.0593	0.0418	0.017	0.0371	0.1566	0.5292	0.1989	

## DNA断片の検出

断片化した大腸菌gDNAを検出できるかを調べるため、大腸菌gDNAをSonicationで断片化し、本キットで検出した。

断片化したgDNAもIntact gDNAと同様の感度で検出できた。また、低濃度のgDNAであっても検出感度の低下は見られなかった。



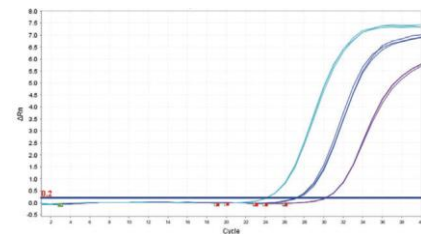
## 高濃度タンパク質を含むサンプルでの使用例 – DNA Extractor® Kitとの併用–

75mg/mL ヒト血漿由来γ-グロブリンを含むサンプルに0.1、1、10ng/mL 大腸菌gDNAを添加し、DNA Extractor® KitでDNAを抽出した。次に、得られたDNAを本キットで定量し、添加回収率を求めた。

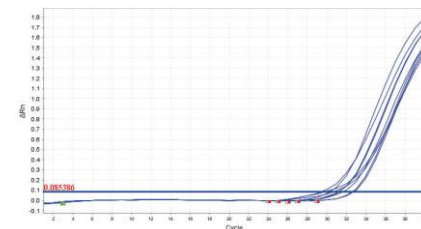
DNA添加量	0.1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL
検出系(PCR反応)へのDNA添加量	1 pg	10 pg	100 pg
回収率 (平均)	96.9%	85.7%	86.9%
SD	0.013	0.67	1.4
CV%	1.3%	7.8%	1.6%

高濃度のタンパク質を含むサンプルにおいても、高い回収率で大腸菌gDNAを回収できた。

### Detection of *E. coli*-derived genomic DNA.



### Detecting Internal Control



## キット構成

キット部材	容量
1×PCR Master Mix	2×1mL
DNA Dilution Buffer (DDB)	1×10mL
<i>E. coli</i> Control DNA	1×40μL

## 検出波長

- *E. coli* gDNA 520nm (例: FAM)
- Internal Control 555nm (例: HEX)

※Internal Controlは非天然の合成DNAです。

本製品は、CHO細胞由来のゲノムDNAをqPCR（プローブ法）で定量するキットです。

抗体医薬品およびその製造プロセスの残存DNA検査にご使用ください。

- 検出下限： $\geq 0.0003\text{pg/test}$
- 定量下限： $\geq 0.003\text{pg/test}$
- 直線性の高い検量線
- アッセイ間差が少なく再現性が高い
- Pre-mix bufferで操作が簡単
- サンプル中の夾雑物の影響を受けにくい
- Internal Control含有

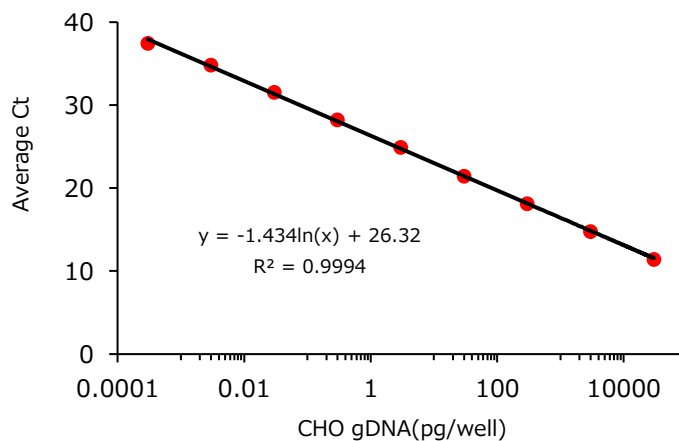


和光コード	製品名	容量	希望納入価格 (円)
294-85201	QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for CHO cells	<b>F</b> 100回用	130,000

## 検量線

0.0003pgから30,000pgのCHO gDNAを本キットでqPCRを行い、検量線を作成した（n=3）。

0.0003pgから30,000pgという広範囲の濃度幅においても、非常に直線性の高い検量線を得られた。

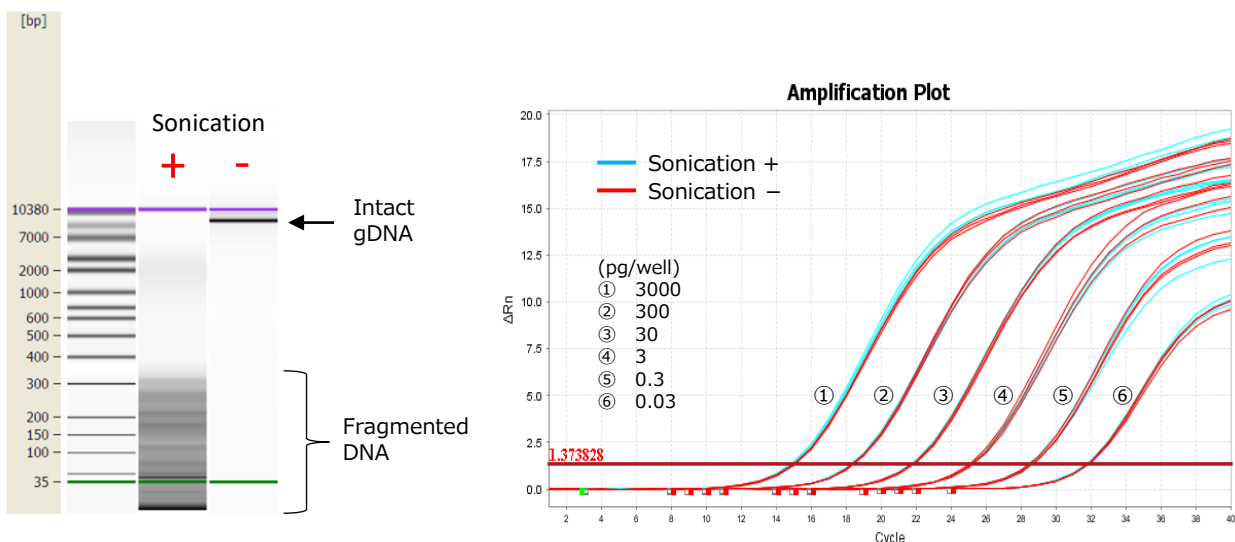


pg/well	0.0003	0.003	0.03	0.3	3	30	300	3000	30000
Ct	37.639	34.822	31.546	28.117	24.809	21.337	18.079	14.726	11.506
	37.107	34.981	31.506	28.324	24.906	21.416	18.084	14.744	11.467
	37.642	34.689	31.595	28.267	24.987	21.533	18.225	14.807	11.269
<b>Average Ct</b>	<b>37.462</b>	<b>34.830</b>	<b>31.549</b>	<b>28.236</b>	<b>24.901</b>	<b>21.428</b>	<b>18.129</b>	<b>14.759</b>	<b>11.414</b>
S.E	0.30806	0.14652	0.04455	0.10713	0.08904	0.09853	0.0831	0.0424	0.12685

## DNA断片の検出

断片化したCHO gDNAを検出できるかを調べるため、CHO gDNAをSonicationで断片化し、本キットで検出した。

断片化したgDNAもIntact gDNAと同様の感度で検出できた。また、低濃度のgDNAであっても検出感度の低下は見られなかった。



## 高濃度タンパク質を含むサンプルでの使用例 -DNA Extractor® Kitとの併用-

γ-globulinを高濃度を含むサンプルへCHO gDNAを添加し、DNA Extractor® KitでDNAを抽出した。次に、得られたDNAを本キットで定量し、添加回収率を求めた。

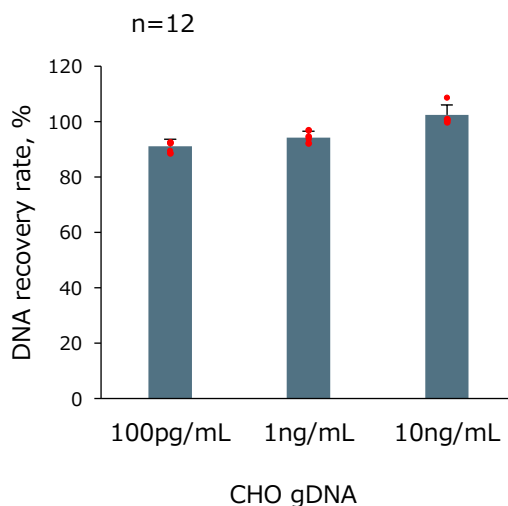
### ▶ Sampleの組成

- ・ 20mg/mL γ-globulin
- ・ 3% Mannitol
- ・ 2% Sucrose
- ・ 10mM L-Arginine
- ・ 0.01% Tween20

### ▶ 添加したCHO gDNAの濃度

- 10ng/mL
- 1ng/mL
- 100pg/mL

高濃度のタンパク質を含むサンプルにおいても、高い回収率でCHO gDNAを回収できた。



## キット構成

品名	容量
1×PCR Master Mix	2 x 1mL
DNA Dilution Buffer(DDB)	1 x 10mL
CHO Control DNA	1 x 40μL

## 検出波長

- ・ CHO gDNA 520nm (例: FAM)
- ・ Internal Control 554nm (例: HEXなど)

※Internal Controlは非天然の合成DNAです。

## 03 DNA Extractor<sup>®</sup> Kit

Wako

残留する宿主細胞由来のDNAをよう化ナトリウム法で抽出するキットです。抽出したDNAはqPCRで定量できます。

CHO細胞、大腸菌、酵母などホストセル由来DNA量の検査、管理にご使用ください。



- 微量DNA (100-1,000fg) を高い収率で回収
- チューブ交換不要 (チューブ1本で全工程完了)
- スタートから抽出完了まで60-90分間
- 高濃度タンパク質含有サンプル用プロトコルあり
- よう化ナトリウム法\*採用

\* よう化ナトリウム法は、USP(The United States Pharmacopeia)42-NF37の<509>Residual DNA Testingで紹介されている残留DNA抽出法です。

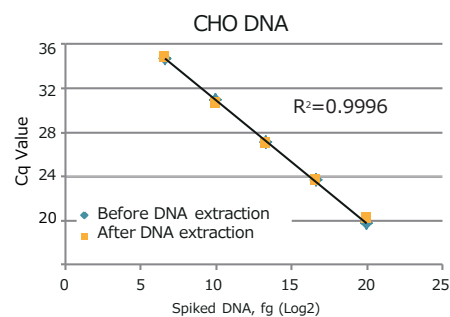
和光コード	品名	容量	希望納入価格(円)
295-50201	DNA Extractor <sup>®</sup> Kit  	50回用	21,000

### 添加回収試験例

CHO, *E. coli*, *Pichia pastoris* の3種類のgDNAを用いて、添加回収試験を行った。

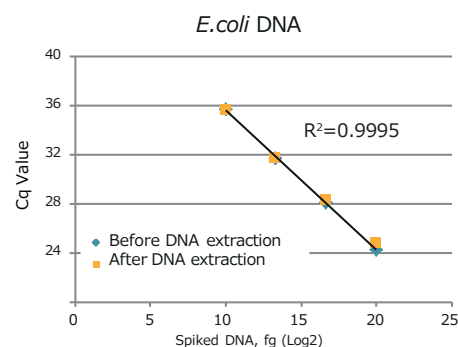
#### ▶ CHO gDNA

gDNA		CHO	
Spike (fg)	Detection (fg)		Recovery (%)
100	100		100
1,000	979		98
10,000	10,831		108
100,000	90,031		90
1,000,000	1,045,186		105



#### ▶ *E. coli* gDNA

gDNA		<i>E. coli</i>	
Spike (fg)	Detection (fg)		Recovery (%)
1,000	939		94
10,000	11,004		110
100,000	100,009		100
1,000,000	969,911		97

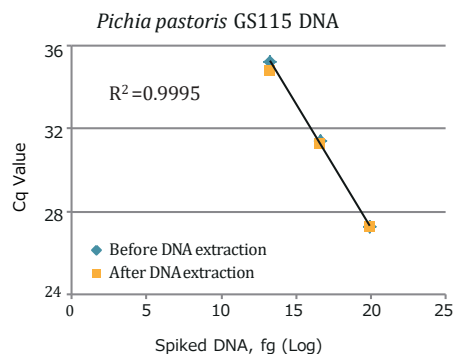




▶ *Pichia pastoris* GS115 gDNA

gDNA <i>Pichia pastoris</i> GS115		
Spike (fg)	Detection (fg)	Recovery (%)
10,000	10,316	103
100,000	94,045	94
1,000,000	1,031,630	103

いずれの条件においても、高いDNA回収率を示した。また、スパイクしたDNA量とCq値は高いと直線性を示した。



### 培養上清を用いたCHO gDNAの添加回収試験

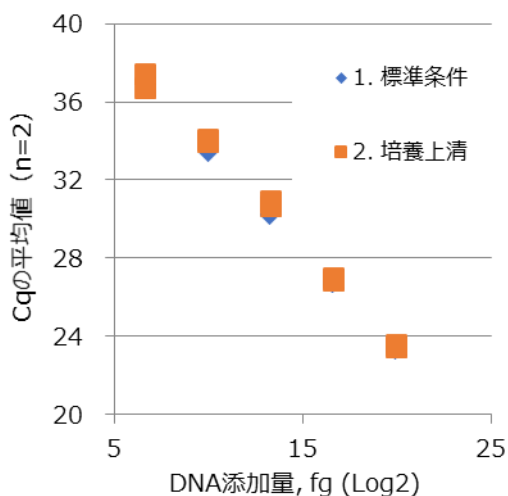
培養上清を用いてCHO由来DNAの添加回収率を求めた。

**方法：**

10fgから1ngまでのCHO由来DNAをPANC-1細胞培養上清に添加し、本キットでDNAを抽出した。抽出したDNAに対してqPCRを行い、Cq値を測定した。また、CHO由来DNAを添加した精製水をDNA抽出処理せずqPCRを行い、Cq値を測定した。これを標準条件とした。標準条件で検量線を作成し、各条件でのDNA回収率を算出した。

**サンプル：**

1. 標準条件：CHO由来DNAを添加した精製水（DNA抽出操作なし）：
2. 培養上清条件：CHO由来DNAを添加したPANC-1細胞培養上清から本キットで抽出したDNA



DNA添加量とCqの平均値  
 1.標準条件 :R²=0.9998  
 2.培養上清 :R²=0.9982

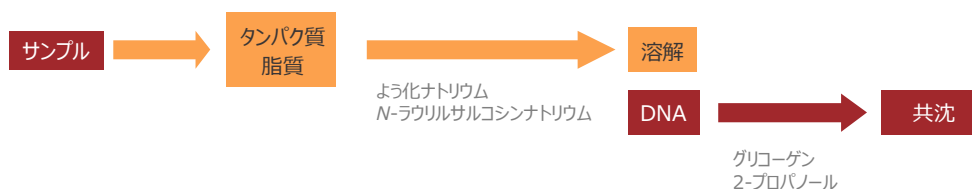
添加量(fg)	培養上清	
	回収量(fg)	回収率(%)
0	ND	
10		
100	93	<b>93</b>
1,000	741	<b>74</b>
10,000	6,333	<b>63</b>
100,000	86,703	<b>87</b>
1,000,000	874,502	<b>87</b>

標準条件のCq平均値で検量線を作成し、培養上清条件のCq平均値からDNA回収率を算出した。

100fgから1ngのDNA添加量において、培養上清中のDNAを高い収率で回収できた。

## 原理

1. サンプルにカオトロピックイオンであるよう化ナトリウムと*N*-ラウリルサルコシナトリウムを添加し、タンパク質および脂質を可溶化します。
2. グリコーゲンを添加したサンプルに2-プロパノールを添加し、DNAをグリコーゲンと共沈させます。
3. DNAペレットを回収します。



## キット構成

品名	容量
Sodium Iodide Solution	26mL×1
Sodium <i>N</i> -Lauryl Sarcosinate Solution	1.2mL×1
Washing Solution (A)	42mL×1
Washing Solution (B)	40mL×2
Glycogen Solution	0.1mL×1


R<sub>60</sub>…2~10℃保存 F…-20℃保存 -80…-80℃保存 表示が無い場合は室温保存です。  
 特定 毒-I…特定毒物 毒-II…毒物 劇-I 劇-II 劇-III…劇物 毒…毒薬 劇…劇薬 危…危険物 向…向精神薬 特麻原…特定麻薬向精神薬原料 カルタヘナ…カルタヘナ法  
審-1…化審法 第一種特定化学物質 審-2…化審法 第二種特定化学物質 化兵1…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化兵2…化学兵器禁止法 第二種指定物質  
 覚せい剤取締法…「覚せい剤原料研究者又は取扱者」の免許を取得して、ご購入に際しては、譲受証及び譲渡証による受け渡しが必要となります。関  
 国民保護法…生物・毒薬兵器の製造、使用防止のため、「毒薬等」を試験研究用に使用することを確認する証を頂戴しております。関  
 上記以外の法律及び最新情報は、弊社試薬サイト (<https://labchem-wako.fujifilm.com>) をご参照下さい。

- 本文に収載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

## 富士フイルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)  
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所 ● 中国営業所
- 東海営業所 ● 横浜営業所
- 筑波営業所 ● 東北営業所
- 北海道営業所

 フリーダイヤル 0120-052-099  
 試薬URL : <https://labchem-wako.fujifilm.com>

**■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation**  
 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA  
 TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791

**■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**  
 Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany  
 TEL: +49-2131-311-0 FAX: +49-2131-311-100

**■ 富士膠片和光 (香港) 有限公司**  
 Room 1111, 11/F, International Trade Centre,  
 11-19 Sha Tsui Road, Tsuen Wan, N.T., Hong Kong  
 TEL: +852-2799-9019 FAX: +852-2799-9808

**■ 富士膠片和光 (広州) 貿易有限公司**  
 广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼3002-3003室  
 TEL: +86-20-8732-6381 (广州)  
 TEL: +86-21-6288-4751 (上海)  
 TEL: +86-10-6413-6388 (北京)