

〈For Research Use Only〉 Code No. 290-85301 (100 tests)

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

[Introduction]

This product is a kit that detect and quantify residual genomic DNA (gDNA) in vaccines, biopharmaceuticals, and other biologic products by a method that use a fluorescence-labeled probe (commonly known as the TaqMan® method). It can detect and quantify gDNA derived from *Escherichia coli* (*E. coli*) by quantitative PCR (qPCR).

The unique formulation provided in the kit allows for highly sensitive detection of trace amounts of gDNA contained in samples. In addition, PCR solution is provided as 1×PCR Master Mix, which eliminates the need to prepare PCR solution prior to use, reducing the chance of human error during preparation and improving the work efficiency and accuracy of the test results. The kit also includes template DNA and primers/probe for use as an internal control, which can be used to confirm whether the PCR was successful.

By using this kit in combination with the DNA Extractor® Kit [Code No. 295-50201] sold separately, gDNA can be consistently extracted and detected from proteins in biological products using *E. coli* or solutions containing buffer components.

TaqMan® is a registered trademark of Roche Diagnostics.

[Kit contents]

Reagent name	Volume
1×PCR Master Mix	1 mL × 2 vials
DNA Dilution Buffer (DDB)	10 mL
<i>E. coli</i> Control DNA, 30 ng/μL	40 μL

1×PCR Master Mix contains a primer/probe set for detection of *E. coli*-derived gDNA and a primer/probe set and template DNA for detection of the internal control.

[Storage]

Store at -20°C.

[Allowable number of freezing and thawing]

3 times

[Before use]

- Divide 1×PCR Master Mix into small portions to reduce the frequency of freezing and thawing.
- Conduct experiments in accordance with the laboratory guidelines and with due attention to safety.
- Wear protective gear including gloves and safety glasses during testing.
- Thoroughly swab the tabletop and pipettes with ethanol before testing.

- Work in a place with the lowest possible risk of contamination (e.g., inside a clean bench, safety cabinet)
- Prepare the reagents on ice.
- Do not use TE or other buffers containing EDTA, as they may inhibit PCR.

[Additional reagents and instruments required]

- Real-time PCR device
- Vortex mixer
- Microtube centrifuge
- Nuclease-free sterile water (e.g., Code No. 316-90101, Nippon Gene)
- Micropipette and nuclease-free pipette tip
(Two micropipettes, 2-20 μL and 100-1,000 μL, can be used.)
- Nuclease-free 1.5 mL tube (DNA/RNA low adsorption product is desirable)
- Real-time PCR plate and plate seal, or 8-strip tube for Real-time PCR and tube cap
- Ethanol

[Fluorescent reagent of probe]

Reagent name	Fluorescent reagent
<i>E. coli</i> Primer & Probe	FAM
Internal Control Primer & Probe	HEX substitute

[Usage]

*The protocol has been prepared in accordance with the standards contained in the United States Pharmacopeia (USP). However, please use this kit in accordance with your own protocol if you have one.

[Usage 1 : Detection of gDNA using this kit from extracted DNA]

When the detection kit is used with pre-extracted DNA as template DNA

1-1. Preparation of reagents

- (1) Thaw the reagents in the kit on ice.
- (2) Mix each reagents well with a vortex mixer, then spin down with a microtube centrifuge.

1-2. Preparation of serial dilutions using *E. coli* Control DNA (creation of standard curve)

- (1) Prepare 6 nuclease-free 1.5 mL tubes and label them as PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, and NTC, respectively. NTC (No Template Control) stands for negative control.
- (2) Add 990 μL of DNA Dilution Buffer (DDB) to PC1.
- (3) Add 900 μL of DDB to each of PC2, PC3, PC4, PC5, and NTC.
- (4) Add 10 μL of *E. coli* Control DNA, 30 ng/μL (PC0) to PC1 and mix well with a vortex mixer.
- (5) Add 100 μL of PC1 to PC2 and mix well with a vortex mixer.
- (6) Add 100 μL of PC2 to PC3 and mix well with a vortex mixer.
- (7) Add 100 μL of PC3 to PC4 and mix well with a vortex mixer.
- (8) Add 100 μL of PC4 to PC5 and mix well with a vortex mixer.

Tube name	Diluent	<i>E. coli</i> gDNA concentration
PC1	10 μ L PC0 + 990 μ L DDB	3,000 pg/reaction
PC2	100 μ L PC1 + 900 μ L DDB	300 pg/reaction
PC3	100 μ L PC2 + 900 μ L DDB	30 pg/reaction
PC4	100 μ L PC3 + 900 μ L DDB	3 pg/reaction
PC5	100 μ L PC4 + 900 μ L DDB	0.3 pg/reaction
NTC	900 μ L DDB	0 pg/reaction

1-3. Addition of 1 \times PCR Master Mix to Real-Time PCR plate

Add 20 μ L of 1 \times PCR Master Mix to each plate well.
(Do the same when using 8-strip tube.)

1-4. Addition of serial dilutions, NTC, and sample.

An example of testing four types of samples (n=3) is shown below.

- Add 10 μ L of serial dilutions, NTC prepared in 1-2. and the samples to each well containing 1 \times PCR Master Mix as shown below.
- Cover with a plate seal or cap.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			PC1				Sample 1					
C			PC2				Sample 2					
D			PC3				Sample 3					
E			PC4				Sample 4					
F			PC5				NTC					
G												
H												

1-5. Quantitative PCR (qPCR)

Place the plate in the Real-time PCR device and set up the program shown below.

After setting up the program, start the reaction.

Step	Reaction conditions	} 40 cycles
Hold	95°C, 2 min.	
Denature	95°C, 15 sec.	
Annealing & Extension	60°C, 30 sec.	

1-6. Detection

Check the results in accordance with the device protocol.

1-7. Calculation of DNA content in the sample

Creating a standard curve with the software of the Real-time PCR device is recommended.

When calculating by manual, use the following method :

- Create a logarithmic graph from the Ct value of the standard (PC1-PC5).
- Calculate the approximate equation of the curve from (1).
Retesting is recommended if deviation from the following indicators of the standard curve are observed :

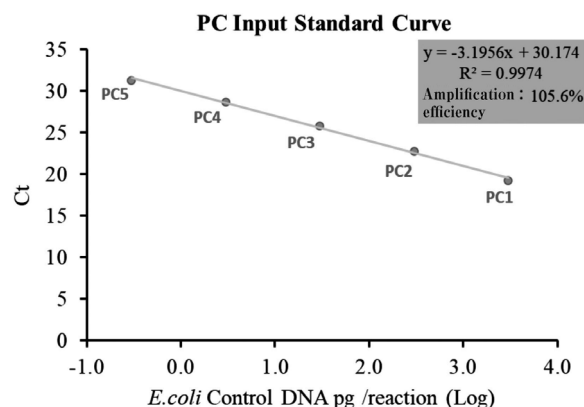
Condition	Proper value
Slope of standard curve	- 3.1 to - 3.8
R ² value	≥ 0.98
Amplification efficiency	90% to 110%
Ct value of NTC	≥ 38 or N.D.

[Example]

When the test results are as follows :

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523
Individual Ct value	19.327	22.617	25.921	28.700	31.311
	19.161	23.208	25.828	28.688	31.250
	19.174	22.515	25.741	28.637	31.350
Mean Ct value	19.220	22.780	25.830	28.675	31.304

NTC should be detected as N.D.



Condition	Proper value	Proper result
Slope of standard curve	- 3.1 to - 3.8	Acceptable
R ² value	≥ 0.98	Acceptable
Amplification efficiency	90% to 110%	Acceptable
Ct value of NTC	≥ 38 or N.D.	Acceptable

1-8. Interpretation of results

The WHO¹⁾ and the FDA²⁾ have established the following criteria for residual DNA during biopharmaceutical manufacturing :

Cell type	Acceptable amount of DNA
Non-tumorigenic cell lines	10 ng
Cell lines with retrovirus proviral sequence	100 pg

Calculate the amount of DNA remaining in the sample to confirm that it does not exceed the acceptable amount.

In addition, it is recommended that the acceptable amount of DNA be calculated under the condition where all results of the standard curve are acceptable.

[Usage 2 : When this kit is used with gDNA extracted with DNA Extractor® Kit]

When gDNA is detected with this kit after DNA is extracted with DNA Extractor® Kit [Code No. 295-50201].

2-1. Preparation of reagents

- (1) Thaw the reagents in the kit on ice.
- (2) Mix it well with a vortex mixer, then spin down with a microtube centrifuge.

2-2. Preparation of serial dilutions using *E. coli* Control DNA (creation of standard curve)

- (1) Prepare 6 nuclease-free 1.5 mL tubes and label them as PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, and NTC, respectively. NTC (No Template Control) stands for negative control.
- (2) Add **990 µL** of DNA Dilution Buffer (DDB) to PC1.
- (3) Add **900 µL** of DDB to each of PC2, PC3, PC4, PC5, and NTC.
- (4) Add **10 µL** of *E. coli* Control DNA, 30 ng/µL (PC0) to PC1 and mix well with a vortex mixer.
- (5) Add **100 µL** of PC1 to PC2 and mix well with a vortex mixer.
- (6) Add **100 µL** of PC2 to PC3 and mix well with a vortex mixer.
- (7) Add **100 µL** of PC3 to PC4 and mix well with a vortex mixer.
- (8) Add **100 µL** of PC4 to PC5 and mix well with a vortex mixer.

Tube name	Diluent	<i>E. coli</i> gDNA concentration
PC1	10 µL PC0 + 990 µL DDB	3,000 pg/reaction
PC2	100 µL PC1 + 900 µL DDB	300 pg/reaction
PC3	100 µL PC2 + 900 µL DDB	30 pg/reaction
PC4	100 µL PC3 + 900 µL DDB	3 pg/reaction
PC5	100 µL PC4 + 900 µL DDB	0.3 pg/reaction
NTC	900 µL DDB	0 pg/reaction

2-3. Extraction with DNA Extractor® Kit

Perform the DNA extraction according to protocol #2 for the DNA Extractor® Kit, using **500 µL** of DNA solution prepared as described in 2-2. and each samples.

2-4. Addition of 1×PCR Master Mix to Real-Time PCR plate

Add **20 µL** of 1×PCR Master Mix to each plate well.
(Do the same when using 8-strip tube.)

2-5. Addition of serial dilutions, NTC, and samples.

An example of testing four types of samples (n=3) is shown below.

- (1) Add **10 µL** of serial dilutions, NTC prepared as described in 2-2. and 2-3. and the samples to each well containing 1×PCR Master Mix as shown below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		PC1 Input			PC1 Extraction			Sample 1				
C		PC2 Input			PC2 Extraction			Sample 2				
D		PC3 Input			PC3 Extraction			Sample 3				
E		PC4 Input			PC4 Extraction			Sample 4				
F		PC5 Input			PC5 Extraction			NTC				
G												
H												

Input : DNA solution prepared as described in 2-2.

Extraction : DNA solution extracted as described in 2-3.

Sample : Test

- (2) Cover with a plate seal or cap.

2-6. Quantitative PCR (qPCR)

Place the plate in the Real-time PCR device and set up the program shown below.

After setting up the program, start the reaction.

Step	Reaction conditions
Hold	95°C, 2 min.
Denature	95°C, 15 sec.
Annealing & Extension	60°C, 30 sec.

} 40 cycles

2-7. Detection

Check the results in accordance with the device protocol.

2-8. Calculation of DNA content in the sample

Creating a standard curve with the software of Real-time PCR device is recommended.

When calculating by manual, use the following method :

- (1) Create a logarithmic graph from the Ct value of the standard (PC1-PC5 input).

- (2) Calculate the approximate equation of the curve from (1).

Retesting is recommended if deviation from the following indicators of the standard curve are observed :

Condition	Proper value
Slope of standard curve	-3.1 to -3.8
R ² value	≥ 0.98
Amplification efficiency	90% to 110%
Ct value of NTC	≥ 38 or N.D.

- (3) The amount of DNA in the sample is calculated by the formula $10^{(Ct-b/m)}$, where Ct is the Ct value of the sample, and m and b are the slope and intercept of the approximate equation of the standard curve, respectively.

Retesting is recommended if deviation from the following recovery rate parameters :

Condition	Proper value
Sample recovery rate	50% to 150%
*Coefficient of variation	< 30%

*The coefficient of variation is the standard deviation divided by the arithmetic mean and indicates relative variability.
[Standard deviation when tested with n=3 × 100/mean]

[Example]

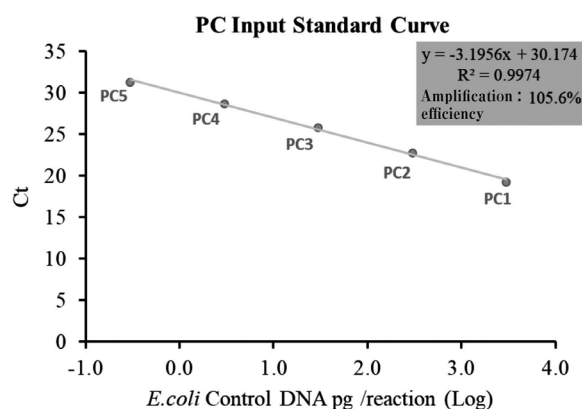
When the test results are as follows :

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523
Individual Ct value	19.327	22.617	25.921	28.700	31.311
	19.161	23.208	25.828	28.688	31.250
	19.174	22.515	25.741	28.637	31.350
Mean Ct value	19.220	22.780	25.830	28.675	31.304

NTC should be detected as N.D.

Positive Control	PC1 Extraction	PC2 Extraction	PC3 Extraction	PC4 Extraction	PC5 Extraction	NTC
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-
Individual Ct value	18.395	21.307	24.513	27.790	30.443	N. D.
	18.371	21.393	24.720	27.424	30.545	N. D.
	18.446	21.377	24.668	27.503	30.741	N. D.
Individual recovery amount (pg)	2,590	320	32	3.0	0.450	-
	2,635	300	28	3.9	0.418	-
	2,496	304	29	3.7	0.363	-
Individual recovery rate (%)	86.3%	106.5%	106.4%	101.0%	150.0%	-
	87.8%	100.1%	91.7%	131.4%	139.5%	-
	83.2%	101.3%	95.1%	124.1%	121.2%	-
Mean recovery rate (%)	85.8%	102.6%	97.7%	118.8%	136.9%	-
Standard deviation	2.4	3.4	7.7	15.9	14.6	-
Coefficient of variation (%)	0.027	0.033	0.079	0.134	0.107	-

N. D. : no detection



Condition	Proper value	Proper result
Slope of approximate equation	-3.1 to -3.8	Acceptable
R ² value	≥ 0.98	Acceptable
Amplification efficiency	90% to 110%	Acceptable
Ct value of NTC	≥ 38 or N.D.	Acceptable
Sample recovery rate	50% to 150%	Acceptable
Coefficient of variation	< 30%	Acceptable

2-9. Interpretation of results

The WHO¹⁾ and the FDA²⁾ have established the following criteria for residual DNA during biopharmaceutical manufacturing.

Cell type	Acceptable amount of DNA
Non-tumorigenic cell lines	10 ng
Cell lines with retrovirus proviral sequence	100 pg

Calculate the amount of DNA remaining in the sample to confirm that it does not exceed the acceptable amount.

In addition, it is recommended that the acceptable amount of DNA be calculated under the condition where all results of the standard curve and sample recovery are acceptable.

[Related Product]

Code No.	Description	Size
295-50201	DNA Extractor [®] Kit	50 tests

[References]

1. Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J., and substrates, W. H. O. S. G. o. c. : WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007, *Biologicals*, **36**, 203-211 (2008).
2. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997). U.S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research, *J. Immunother.*, **20**, 214-243 (1997).

FUJIFILM Wako Laboratory Chemicals site
<https://labchem-wako.fujifilm.com>

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
 fwk-cservice@fujifilm.com

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
 wkuslabchem@fujifilm.com

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
 labchem_wkeu@fujifilm.com

FUJIFILM Wako Chemicals (Hong Kong) Limited

Room 1111, 11/F, International Trade Centre, 11-19 Sha Tsui Road, Tsuen Wan, N.T., Hong Kong
 Telephone : + 852-2799-9019 Facsimile : + 852-2799-9808
 wkhk.info@fujifilm.com

FUJIFILM Wako (Guangzhou) Trading Corporation

Room 3003, 30/F, Dong Shan Plaza 69, Xian Lie Zhong Road Guangzhou, 510095, China
 Telephone : + 86-20-8732-6381 (Guangzhou) Telephone : + 86-21-6288-4751 (Shanghai)
 Telephone : + 86-13611333218 (Beijing)
 wkgz.info@fujifilm.com

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

【概要】

本キットは、ワクチンやバイオ医薬品を始めとする生物由来製品に残留する genomic DNA (gDNA) を蛍光標識プローブ（通称 TaqMan® プローブ）法を用いて検出・定量する製品です。*Escherichia coli* (*E. coli*) 由来の gDNA を Quantitative PCR 法 (qPCR) で検出・定量します。

本キットは独自の構成により、サンプルに含まれる微量 gDNA の高感度な検出を実現しました。PCR 溶液を 1 × PCR Master Mix として提供しているため、使用前に PCR 溶液を調製する必要はなく、調製時のヒューマンエラーを低減し、作業効率および試験精度を向上させています。また、本キットは、インターナルコントロール用の鋳型 DNA とプライマー / プローブも含まれているため、PCR が正しく行われていることを確認できます。別売の DNA Extractor® Kit [Code No. 295-50201] と併用することにより、*E. coli* を用いた生物由来製品に含まれるタンパク質や Buffer 成分を含む溶液からの gDNA 抽出と検出を一貫して実施することができます。

TaqMan® は Roche Diagnostics K.K. の登録商標です。

【キット構成】

試薬名	容量
1 × PCR Master Mix	1mL × 2本
DNA Dilution Buffer (DDB)	10mL
<i>E. coli</i> Control DNA, 30ng/μL	40 μL

1 × PCR Master Mix には、*E. coli* 由来 gDNA 検出用のプライマー / プローブセット、インターナルコントロールの鋳型 DNA および検出用のプライマー / プローブセットが含まれています。

【保存温度】

-20℃

【凍結融解可能回数】

3 回

【ご使用前に】

- 1 × PCR Master Mix は小分けして保管し、凍結融解の回数を減らして下さい。
- 実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して実験を行って下さい。
- 試験は手袋や保護メガネなどの保護具を着用して実施して下さい。
- 試験はテーブルの上やピペットを消毒用エタノールでしっかりと拭いてから行って下さい。
- 操作を行う際は、出来るだけコンタミネーションのリスクが低い場所を選んで作業を行って下さい。（クリーンベンチ内や安全キャビネットなど）
- 試薬調製は、氷上で行って下さい。
- PCR を阻害する恐れがあるため、TE バッファーや EDTA が含まれるバッファーを使用しないで下さい。

【キット以外に必要な試薬・器具】

- Real-Time PCR 装置
- ボルテックスミキサー
- マイクロチューブ遠心機
- Nuclease フリー滅菌水（例：Code No. 316-90101, ニッポンジーン）
- マイクロピペットおよび Nuclease フリーピペットチップ（マイクロピペットは 2-20 μL と 100-1,000 μL の 2 本で操作が可能です）
- Nuclease フリー 1.5mL チューブ（DNA/RNA 低吸着品が望ましい）
- Real-Time PCR プレートとプレートシールもしくは Real-Time PCR 用 8 連チューブとチューブキャップ
- 消毒用エタノール

【プローブの蛍光修飾】

試薬名	蛍光修飾
<i>E. coli</i> Primer & Probe	FAM
Internal Control Primer & Probe	HEX substitute

【使用方法】

*本説明書では、米国薬局方（USP）に基づいた規格に沿ってプロトコルを作成していますが、プロトコルをお客様で持ちの場合にはそちらに合わせてご使用下さい。

【使用方法 1：抽出済み gDNA を本キットで検出】

あらかじめ抽出した gDNA をテンプレート DNA として、検出キットに用いる場合

1-1. 試薬の調製

- キットに含まれる試薬を氷上で融解して下さい。
- 各試薬をボルテックスミキサーでよく混合した後、マイクロチューブ遠心機でスピンドアウンします。

1-2. *E. coli* Control DNA を用いた希釈系列サンプルの作製（標準曲線の作成）

- Nuclease フリー 1.5mL チューブを 6 本用意してそれぞれに PC1、PC2、PC3、PC4、PC5、NTC と記載して下さい。NTC (No Template Control) は、ネガティブコントロールです。
- PC1 に DNA Dilution Buffer (DDB) を 990 μL 加えます。
- PC2、PC3、PC4、PC5、NTC に DDB をそれぞれ 900 μL 加えます。
- PC1 に *E. coli* Control DNA, 30ng/μL (PC0) を 10 μL 加えて、ボルテックスミキサーで良く混ぜます。
- PC2 に PC1 を 100 μL 加えて、ボルテックスミキサーで良く混ぜます。
- PC3 に PC2 を 100 μL 加えて、ボルテックスミキサーで良く混ぜます。
- PC4 に PC3 を 100 μL 加えて、ボルテックスミキサーで良く混ぜます。
- PC5 に PC4 を 100 μL 加えて、ボルテックスミキサーで良く混ぜます。

チューブ名	希釈内容	<i>E. coli</i> gDNA 濃度
PC1	10 μ L PC0 + 990 μ L DDB	3,000pg/reaction
PC2	100 μ L PC1 + 900 μ L DDB	300pg/reaction
PC3	100 μ L PC2 + 900 μ L DDB	30pg/reaction
PC4	100 μ L PC3 + 900 μ L DDB	3pg/reaction
PC5	100 μ L PC4 + 900 μ L DDB	0.3pg/reaction
NTC	900 μ L DDB	0pg/reaction

1-3. Real-Time PCR プレートへ 1×PCR Master Mix の添加

1×PCR Master Mix をプレートの各ウェルに 20 μ L ずつ添加します。
(Real-Time PCR 用 8 連チューブを使う場合も同様の操作を行います。)

1-4. 希釈系列サンプル、NTC、サンプルの添加

サンプルが 4 種類で n=3 で試験した場合を例に示します。

- 下図のように、1×PCR Master Mix を添加した各ウェルに 1-2. で作製した希釈系列サンプル、NTC、およびサンプルを 10 μ L 加えます。
- プレートシールもしくはキャップでフタをします。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			PC1				Sample 1					
C			PC2				Sample 2					
D			PC3				Sample 3					
E			PC4				Sample 4					
F			PC5				NTC					
G												
H												

1-5. Quantitative PCR (qPCR)

Real-Time PCR 装置にプレートをセットし、以下のプログラムを設定します。

プログラムを設定後、反応をスタートさせます。

Step	反応条件	} 40cycles
Hold	95℃, 2min.	
Denature	95℃, 15sec.	
Annealing & Extension	60℃, 30sec.	

1-6. 検出

各装置のプロトコルに従い、結果を確認します。

1-7. サンプル DNA 量の計算

Real-Time PCR 装置のソフトウェアで標準曲線を作成することを推奨します。

手計算の場合は以下の方法で算出して下さい。

- 希釈系列サンプル (PC1-PC5) の Ct 値より対数グラフを作成します。
- (1) より、曲線の近似式を算出します。
標準曲線に関する以下の指標を逸脱した場合は、再試験を推奨します。

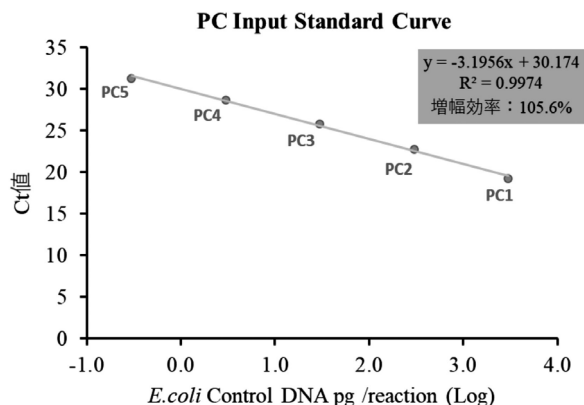
条件	適正值
標準曲線の傾き	-3.1 ~ -3.8
R ² 値	0.98 以上
増幅効率	90 ~ 110%
NTC の Ct 値	38 以上もしくは N.D.

【例】

試験結果が以下ようになった場合

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523
各 Ct 値	19.327	22.617	25.921	28.700	31.311
	19.161	23.208	25.828	28.688	31.250
	19.174	22.515	25.741	28.637	31.350
平均 Ct 値	19.220	22.780	25.830	28.675	31.304

(NTC は N.D. として検出される。)



条件	適正值	適正結果
標準曲線の傾き	-3.1 ~ -3.8	合格
R ² 値	0.98 以上	合格
増幅効率	90 ~ 110%	合格
NTC の Ct 値	38 以上もしくは N.D.	合格

1-8. 結果の解釈

バイオ医薬品製造中における残留 gDNA の基準値として WHO¹⁾ や FDA²⁾ は、以下の値を設定しています。

細胞種	DNA 許容量
造腫瘍性を持たない細胞株	10ng
レトロウイルスのプロウイルス配列を含む細胞株	100pg

サンプル中に含まれる残留 gDNA 量を算出して、上記の許容量未満であることを確認して下さい。

また、標準曲線の適正結果が全て合格になる条件で DNA 許容量を計算することを推奨します。

[使用方法 2 : DNA Extractor[®] Kit [Code No. 295-50201] で gDNA を抽出し、本キットで検出]

試料から DNA Extractor[®] Kit を用いて DNA を抽出した後、本キットにて検出する場合

2-1. 試薬の調製

- (1) キットに含まれる試薬を氷上で融解します。
- (2) ボルテックスミキサーでよく混合した後、マイクロチューブ遠心機でスピンドアウンします。

2-2. *E. Coli* Control DNA を用いた希釈系列サンプル作製

- (1) Nuclease フリー 1.5mL チューブを 6 本用意してそれぞれに PC1、PC2、PC3、PC4、PC5、NTC と記載します。NTC (No Template Control) は、ネガティブコントロールを意味しています。
- (2) PC1 に DNA Dilution Buffer (DDB) を 990 μ L 加えます。
- (3) PC2、PC3、PC4、PC5、NTC に DDB をそれぞれ 900 μ L 加えます。
- (4) PC1 に *E. coli* Control DNA, 30ng/ μ L (PC0) を 10 μ L 加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜます。
- (5) PC2 に PC1 を 100 μ L 加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜます。
- (6) PC3 に PC2 を 100 μ L 加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜます。
- (7) PC4 に PC3 を 100 μ L 加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜます。
- (8) PC5 に PC4 を 100 μ L 加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜます。

チューブ名	希釈内容	CHO gDNA 濃度
PC1	10 μ L PC0 + 990 μ L DDB	3,000pg/reaction
PC2	100 μ L PC1 + 900 μ L DDB	300pg/reaction
PC3	100 μ L PC2 + 900 μ L DDB	30pg/reaction
PC4	100 μ L PC3 + 900 μ L DDB	3pg/reaction
PC5	100 μ L PC4 + 900 μ L DDB	0.3pg/reaction
NTC	900 μ L DDB	0pg/reaction

2-3. DNA Extractor[®] Kit [Code No. 295-50201] による抽出

DNA Extractor[®] Kit のプロトコル #2 に従って、2-2. で作製した DNA 溶液、およびサンプル各 500 μ L を使用して、抽出操作を行います。

2-4. Real-Time PCR プレートへ 1×PCR Master Mix の添加

1×PCR Master Mix をプレートの各ウェルに 20 μ L ずつ添加します。
(Real-Time PCR 用 8 連チューブを使う場合も同様の操作を行います。)

2-5. 希釈系列サンプル、NTC、サンプルの添加

サンプルが 4 種類で n=3 で試験した場合の例です。

- (1) 下図のように、1×PCR Master Mix を添加した各ウェルに 2-2. と 2-3. で作製した希釈系列サンプル、NTC、およびサンプルを 10 μ L 加えます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		PC1 Input			PC1 Extraction			Sample 1				
C		PC2 Input			PC2 Extraction			Sample 2				
D		PC3 Input			PC3 Extraction			Sample 3				
E		PC4 Input			PC4 Extraction			Sample 4				
F		PC5 Input			PC5 Extraction			NTC				
G												
H												

Input : 2-2. で調製した DNA 溶液

Extraction : 2-3. で抽出した DNA 溶液

Sample : 試料

- (2) プレートシールもしくはキャップでフタをします。

2-6. Quantitative PCR (qPCR)

Real-Time PCR 装置にプレートをセットし、以下のプログラムを設定します。

プログラムを設定後、反応をスタートさせます。

Step	反応条件
Hold	95°C, 2min.
Denature	95°C, 15sec.
Annealing & Extension	60°C, 30sec.

} 40cycles

2-7. 検出

各装置のプロトコルに従い、結果を確認します。

2-8. サンプル DNA 量の計算

Real-time PCR 装置のソフトウェアで標準曲線を作成することを推奨します。

手計算の場合は以下の方法で算出して下さい。

- (1) 希釈系列サンプル (PC1-PC5 Input) の Ct 値より対数グラフを作成します。
- (2) (1) より、曲線の近似式を算出します。
標準曲線に関する以下の指標を逸脱した場合は、再試験を推奨します。

条件	適正值
標準曲線の傾き	-3.1 ~ -3.8
R ² 値	0.98 以上
増幅効率	90 ~ 110%
NTC の Ct 値	38 以上もしくは N.D.

- (3) サンプルの Ct 値を Ct、標準曲線近似式の傾きを m、切片を b とした時に、サンプル量は、10^(Ct-b/m) となります。
回収率に関する以下の指標を逸脱した場合は、再試験を推奨します。

条件	適正值
サンプル回収率	50 ~ 150%
*変動係数	30% 未満

※標準偏差を算術平均で割った値であり、相対的なばらつきを示します。

[n=3 で試験した値の標準偏差×100/ 平均値]

【例】

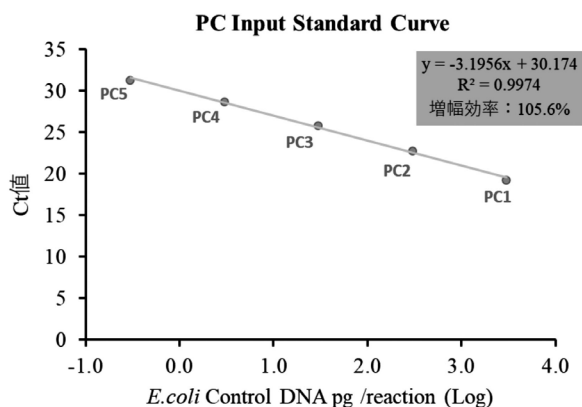
試験結果が以下になった場合

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523
各 Ct 値	19.327	22.617	25.921	28.700	31.311
	19.161	23.208	25.828	28.688	31.250
	19.174	22.515	25.741	28.637	31.350
平均 Ct 値	19.220	22.780	25.830	28.675	31.304

(NTC は N.D. として検出される。)

Positive Control	PC1 Extraction	PC2 Extraction	PC3 Extraction	PC4 Extraction	PC5 Extraction	NTC
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-
各 Ct 値	18.395	21.307	24.513	27.790	30.443	N. D.
	18.371	21.393	24.720	27.424	30.545	N. D.
	18.446	21.377	24.668	27.503	30.741	N. D.
各回収量 (pg)	2,590	320	32	3.0	0.450	-
	2,635	300	28	3.9	0.418	-
各回収率 (%)	86.3%	106.5%	106.4%	101.0%	150.0%	-
	87.8%	100.1%	91.7%	131.4%	139.5%	-
	83.2%	101.3%	95.1%	124.1%	121.2%	-
平均回収率 (%)	85.8%	102.6%	97.7%	118.8%	136.9%	-
標準偏差	2.4	3.4	7.7	15.9	14.6	-
変動係数 (%)	0.027	0.033	0.079	0.134	0.107	-

N. D. : no detection



条件	適正值	適正結果
近似曲線の傾き	-3.1~-3.8	合格
R ² 値	0.98 以上	合格
増幅効率	90~110%	合格
NTC の Ct 値	38 以上もしくは N.D.	合格
サンプル回収率	50~150%	合格
変動係数	30% 未満	合格

2.9. 結果の解釈

バイオ医薬品製造中における残留 gDNA の基準値として WHO¹⁾ や FDA²⁾ は、以下の値を設定しています。

細胞種	DNA 許容量
造腫瘍性を持たない細胞株	10ng
レトロウイルスのプロウイルス配列を含む細胞株	100pg

サンプル中に含まれる残留 gDNA 量を算出して、上記の許容量未満であることを確認して下さい。

また、標準曲線およびサンプル回収に関する適正結果が全て合格になる条件で DNA 許容量を計算することを推奨します。

【関連製品】

Code No.	品名	容量
295-50201	DNA Extractor [®] Kit	50 回用

【References】

1. Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J., and substrates, W. H. O. S. G. o. c. : WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007, *Biologicals*, **36**, 203-211 (2008).
2. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997). U.S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research, *J. Immunother.*, **20**, 214-243 (1997).

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741