

FUJIFILM**Wako**

Code No. 294-85201 (100 tests)

QCdetect™ Residual DNA Detection Kit for CHO cells

[Introduction]

This product is a kit that detect and quantify DNA remaining in biological products such as vaccines and biopharmacy. In particular, genomic DNA (gDNA) derived from Chinese Hamster Ovary cells (CHO cells) is detected and quantified by the Quantitative PCR method (qPCR).

The unique configuration enables highly sensitive detection of trace amounts of DNA in samples. In addition, the PCR solution is prepared as a 1×PCR Master Mix to suppress human error during preparation and improve work efficiency and test accuracy. Therefore, the customer does not need to prepare the Master Mix for PCR. Furthermore, the qPCR of this kit uses a fluorescein-labeled probe (commonly known as the TaqMan® probe) and contains a primer/probe and template DNA for internal control, so it can be confirmed that PCR reaction is being performed correctly.

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 CHO cells 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
CHO Control DNA, 30 ng/μL	40 μL

1×PCR Master Mix also contains a primer/probe set for detection of CHO-derived gDNA and a template DNA and a primer/probe set 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 buffer or buffer containing EDTA.

[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 for disinfection

[Detection wavelength of the probe]

Reagent name	Fluorescence wavelength
CHO Primer & Probe	FAM
Internal Control Primer & Probe	HEX or VIC

[Usage]

*The protocol in this manual 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 from extracted DNA using this kit]
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 CHO gDNA-positive control (creation of standard curve)

- (1) Prepare 7 nuclease-free 1.5 mL tubes and label them as PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, 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, PC6, and NTC.
- (4) Add 10 μL of CHO Control DNA, 30 ng/μL (PC0) to PC1 and mix well.
- (5) Add 100 μL of PC1 to PC2 and mix well.
- (6) Add 100 μL of PC2 to PC3 and mix well.
- (7) Add 100 μL of PC3 to PC4 and mix well.
- (8) Add 100 μL of PC4 to PC5 and mix well.
- (9) Add 100 μL of PC5 to PC6 and mix well.

Tube name	Diluent	CHO 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
PC6	100 μ L PC5 + 900 μ L DDB	0.03 pg/reaction
NTC	900 μ L DDB	0 pg/reaction

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

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

1.4. Addition of positive control, negative control, and sample

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

- (1) Add 10 μ L of the positive and negative control prepared in 1-2. and the sample to each well containing 1×PCR Master Mix as shown below.
- (2) 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		PC6										
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
Hold	95°C, 10 min.
Denature	95°C, 15 sec.
Annealing & Extension	60°C, 1 min.

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 hand, use the following method:

- (1) Create a logarithmic graph from the Ct value of the standard (PC1-PC6).
- (2) Calculate the approximate equation of the curve from (1).
Repeat testing is recommended if there is a deviation in any of the following standard curve parameters :

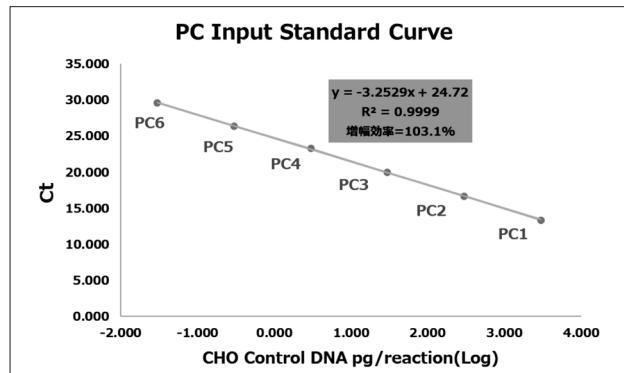
Condition	Proper value
Slope of approximate equation	-3.1 to -3.8
R^2 value	≥ 0.98
Amplification efficiency	90% to 110%
Ct value of NTC	≥ 39 or N.D.

[Example]

When the test results are as follows :

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input	PC6 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
Individual Ct value	13.335	16.582	19.928	23.278	26.325	29.592
	13.355	16.604	19.960	23.194	26.401	29.519
Mean Ct value	13.349	16.675	20.011	23.391	26.427	29.725

NTC should be detected as ND.



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	≥ 39 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 CHO Control DNA, 30 ng/μL (PC0) in the kit on ice.
- (2) Mix it well with a vortex mixer, then spin down with a microtube centrifuge.

2-2. Preparation of CHO gDNA-positive control (creation of standard curve)

- (1) Prepare 7 nuclease-free 1.5 mL tubes and label them as PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, 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, PC6, and NTC.
- (4) Add 10 μL of CHO Control DNA, 30 ng/μL (PC0) to PC1 and mix well.
- (5) Add 100 μL of PC1 to PC2 and mix well.
- (6) Add 100 μL of PC2 to PC3 and mix well.
- (7) Add 100 μL of PC3 to PC4 and mix well.
- (8) Add 100 μL of PC4 to PC5 and mix well.
- (9) Add 100 μL of PC5 to PC6 and mix well.

Tube name	Diluent	CHO 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
PC6	100 μL PC5 + 900 μL DDB	0.03 pg/reaction
NTC	900 μL DDB	0 pg/reaction

2-3. Extraction with DNA Extractor® Kit

Extract DNA from 500 μL of each of the DNA solutions prepared as described in 2-2. in accordance with protocol #2 of the DNA Extractor® Kit.

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 positive control, negative control, and sample

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

- (1) Add 10 μL of the positive and negative control prepared as described in 2-2. and 2-3. and the sample 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		PC6 Input		PC6 Extraction								
H												

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

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

Sample : Test

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

2-6. Quantitative PCR (qPCR) reaction

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, 10 min.
Denature	95°C, 15 sec.
Annealing & Extension	60°C, 1 min.

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 hand, use the following method :

- (1) Create a logarithmic graph from the Ct value of the standard (PC1-PC6).
- (2) Calculate the approximate equation of the curve from (1).
Repeat testing is recommended if there is a deviation in any of the following standard curve parameters :

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	≥ 39 or N.D.

- (3) The amount of DNA in the sample is calculated by the formula $10^{\frac{(Ct-b)}{m}}$, 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.

Repeat testing is recommended if there is a deviation in any of 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 $\times 100$ /mean when tested with n=3

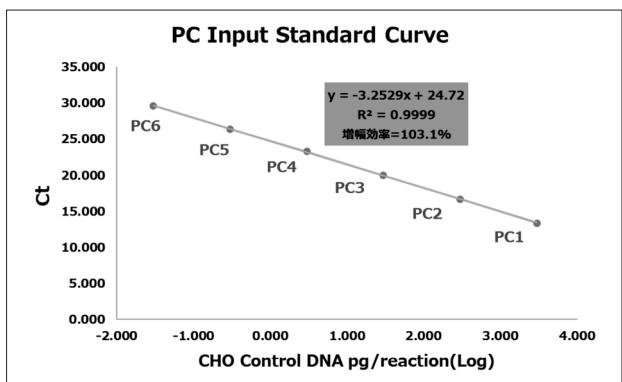
[Example]

When the test results are as follows :

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input	PC6 Input
pg/reaction	3.000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
Individual Ct value	13.335	16.582	19.928	23.278	26.325	29.592
	13.355	16.604	19.960	23.194	26.401	29.519
	13.349	16.675	20.011	23.391	26.427	29.725
Mean Ct value	13.346	16.650	19.966	23.288	26.384	29.612

NTC should be detected as ND.

Positive Control	PC1 Extraction	PC2 Extraction	PC3 Extraction	PC4 Extraction	PC5 Extraction	PC6 Extraction
pg/reaction	3.000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
Individual Ct value	13.384	16.697	20.030	23.240	26.389	29.622
	13.394	16.574	19.932	23.179	26.304	29.238
	13.327	16.676	20.026	23.206	26.412	29.236
Amount recovered individually (pg)	3.055.058	292.658	27.654	2.851	0.307	0.031
	3.033.101	319.379	29.636	2.976	0.326	0.041
	3.180.577	296.994	27.744	2.920	0.302	0.041
Individual recovery rate (%)	101.835	97.553	92.180	95.032	102.288	103.739
	101.103	106.460	98.787	99.188	108.659	136.098
	106.019	98.998	92.479	97.336	100.659	136.364
Mean recovery rate (%)	102.986	101.003	94.482	97.186	103.869	125.400
Standard deviation	2.166	3.903	3.046	1.700	3.452	15.317
Coefficient of variation (%)	2.043	3.943	3.294	1.747	3.429	11.233



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	≥ 39 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, L, 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, *Biologics*, **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, Doshonachi 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 **FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**
 1600 Bellwood Road Fuggerstrasse 12
 Richmond, VA 23237 D-41468 Neuss
 U.S.A. Germany
 Telephone : +1-804-271-7677 Telephone : +49-2131-311-0
 Facsimile : +1-804-271-7791 Facsimile : +49-2131-311-00
 wkuuslabchem@fujifilm.com 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

QCdetectTM Residual DNA Detection Kit for CHO cells

【はじめに】

本製品は、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DNAを検出・定量する製品です。特にChinese hamster ovary cells (CHO cells) 由来のgenomic DNA (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DNAの高感度な検出を実現しました。また、調液時のヒューマンエラーを抑制し、作業効率と試験精度を向上させるために、PCR溶液は1×PCR Master Mixとして調液されています。そのため、お客様がMaster Mixを調液する必要はありません。さらに、本キットのqPCRは蛍光標識プローブ（通称TaqMan[®]プローブ）法を採用し、インターナルコントロール用のプライマー/プローブと鑄型DNAが含まれているため、PCR反応が正しく行われていることを確認できます。別売のDNAエキストラクターキット [Code No. 295-50201]と併用することにより、CHO cells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.の商標登録です。

【キット構成】

試薬名	容量
1×PCR Master Mix	1mL×2本
DNA Dilution Buffer (DDB)	10mL
CHO Control DNA, 30ng/μL	40 μL

1×PCR Master Mixには、CHO由来gDNA検出用のプライマー/プローブセットとインターナルコントロールの鑄型DNAと検出用のプライマー/プローブセットも含まれています。

【保存温度】

-20°C。

【凍結融解許容回数】

3回

【ご使用の前に】

- 1×PCR Master Mixは小分けをして保管し、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ベットを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、でき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等）
- 試薬調製は氷上で行って下さい。

・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:コードNo. 316-90101, ニッポンジーン）
- マイクロピペット及び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

【プローブの検出波長】

試薬名	蛍光の波長
CHO Primer & Probe	FAM
Internal Control Primer & Probe	HEX or VIC

【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おりますが、プロトコルをお客様でお持ちの場合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】

あらかじめ抽出されたDNA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ます。
- 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ラウンします。

1-2. CHO gDNAポジティブコントロールの作製(標準曲線の作成)

- Nucleaseフリー1.5mLチューブを7本用意してそれぞれにPC1、PC2、PC3、PC4、PC5、PC6、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。
- PC1にDNA Dilution Buffer (DDB)を990 μL加えます。
- PC2、PC3、PC4、PC5、PC6、NTCにDDBをそれぞれ900 μL加えます。
- PC1にCHO Control DNA, 30 ng/μL (PC0)を10 μL加えて、良く混ぜます。
- PC2にPC1を100 μL加えて、良く混ぜます。
- PC3にPC2を100 μL加えて、良く混ぜます。
- PC4にPC3を100 μL加えて、良く混ぜます。
- PC5にPC4を100 μL加えて、良く混ぜます。
- PC6にPC5を100 μL加えて、良く混ぜます。

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
PC6	100 μ L PC5 + 900 μ L DDB	0.03pg/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う。)

1-4. ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、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. で作製したポジティブコントロール、ネガティブコントロール、及びサンプルを各 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		PC6										
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
Hold	95°C, 10min.
Denature	95°C, 15sec.
Annealing & Extension	60°C, 1min.

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。

手計算で計算する場合は以下の方法で算出して下さい。

- スタンダード (PC1-PC6) 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。

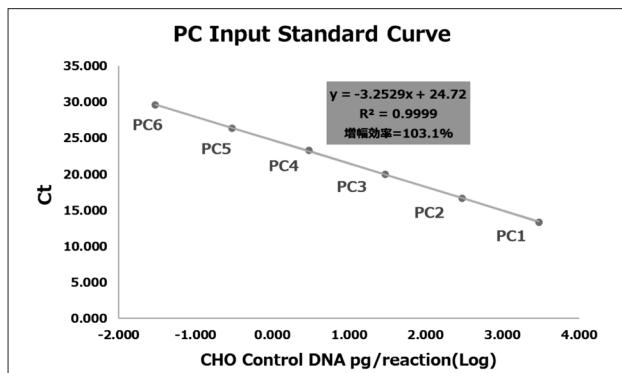
条件	適正值
近似曲線の傾き	-3.1～-3.8
R ² 値	0.98 以上
増幅効率	90～110%
NTC の Ct 値	39 以上もしくは N.D.

[例]

試験結果が以下のように成了った場合

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input	PC6 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
各 Ct 値	13.335	16.582	19.928	23.278	26.325	29.592
	13.355	16.604	19.960	23.194	26.401	29.519
	13.349	16.675	20.011	23.391	26.427	29.725
平均 Ct 値	13.346	16.650	19.966	23.288	26.384	29.612

NTC は ND と検出される



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	39 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 DNA 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存 DNA 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 エキストラクターキットを用いて 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 CHO Control DNA, 30ng/μL (PC0) 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ラウンドします。

2-2. CHO gDNA ポジティブコントロールの作製(標準曲線の作成)

- (1) Nuclease フリー 1.5mL チューブを 7 本用意してそれぞれに PC1、PC2、PC3、PC4、PC5、PC6、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 μL 加えます。
- (3) PC2、PC3、PC4、PC5、PC6、NTC に DDB をそれぞれ 900 μL 加えます。
- (4) PC1 に CHO Control DNA, 30ng/μL (PC0) を 10 μL 加えて、良く混ぜます。
- (5) PC2 に PC1 を 100 μL 加えて、良く混ぜます。
- (6) PC3 に PC2 を 100 μL 加えて、良く混ぜます。
- (7) PC4 に PC3 を 100 μL 加えて、良く混ぜます。
- (8) PC5 に PC4 を 100 μL 加えて、良く混ぜます。
- (9) PC6 に PC5 を 100 μL 加えて、良く混ぜます。

チューブ名	希釈内容	CHO gDNA 濃度
PC1	10 μL PC0 + 990 μL DDB	3.000pg/reaction
PC2	100 μL PC1 + 900 μL DDB	300pg/reaction
PC3	100 μL PC2 + 900 μL DDB	30pg/reaction
PC4	100 μL PC3 + 900 μL DDB	3pg/reaction
PC5	100 μL PC4 + 900 μL DDB	0.3pg/reaction
PC6	100 μL PC5 + 900 μL DDB	0.03pg/reaction
NTC	900 μL DDB	0pg/reaction

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

DNA エキストラクターキットのプロトコル #2 に従って、2-2. で作製した DNA 溶液をそれぞれ 500 μL 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 μL 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う。)

2-5. ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、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. で作製したポジティブコントロール、ネガティブコントロール、及びサンプルを 10 μL 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		PC6 Input		PC6 Extraction								
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) 反応

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, 10min.
Denature	95°C, 15sec.
Annealing & Extension	60°C, 1min.

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。

手計算で計算する場合は以下の方法で算出して下さい。

- (1) スタンダード (PC1-PC6) 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	適正値
標準曲線の傾き	-3.1 ~ -3.8
R ² 値	0.98 以上
增幅効率	90 ~ 110%
NTC の Ct 値	39 以上もしくは N.D.

- (3) サンプルの Ct 値を Ct_t、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_t-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	適正値
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

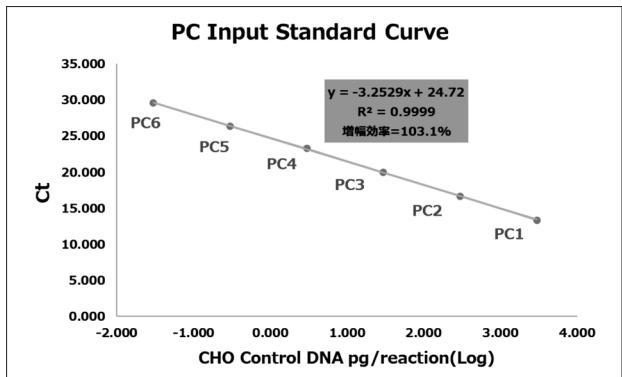
【例】

試験結果が以下のようになった場合

Positive Control	PC1 Input	PC2 Input	PC3 Input	PC4 Input	PC5 Input	PC6 Input
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
各 Ct 値	13.335	16.582	19.928	23.278	26.325	29.592
	13.355	16.604	19.96	23.194	26.401	29.519
	13.349	16.675	20.011	23.391	26.427	29.725
平均 Ct 値	13.346	16.650	19.966	23.288	26.384	29.612

NTC は ND と検出される

Positive Control	PC1 Extraction	PC2 Extraction	PC3 Extraction	PC4 Extraction	PC5 Extraction	PC6 Extraction
pg/reaction	3,000	300	30	3	0.3	0.03
pg/reaction (Log)	3.477	2.477	1.477	0.477	-0.523	-1.523
各 Ct 値	13.384	16.697	20.030	23.240	26.389	29.622
	13.394	16.574	19.932	23.179	26.304	29.238
	13.327	16.676	20.026	23.206	26.412	29.236
各回収量 (pg)	3,055.058	292.658	27.654	2.851	0.307	0.031
	3,033.101	319.379	29.636	2.976	0.326	0.041
	3,180.577	296.994	27.744	2.920	0.302	0.041
各回収率 (%)	101.835	97.553	92.180	95.032	102.288	103.739
	101.103	106.460	98.787	99.188	108.659	136.098
	106.019	98.998	92.479	97.336	100.659	136.364
平均回収率 (%)	102.986	101.003	94.482	97.186	103.869	125.400
標準偏差	2.166	3.903	3.046	1.700	3.452	15.317
変動係数 (%)	2.043	3.943	3.294	1.747	3.429	11.233



条件	適正値	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
增幅効率	90～110%	合格
NTC の Ct 値	39 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 DNA 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存 DNA 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、標準曲線及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, L, 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

富士フィルム 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