



УДК 577.112.088

## ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК В ПРЕПАРАТАХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ПЦР

© 2005 г. А. Н. Александров<sup>\*#</sup>, Ю. С. Скоблов<sup>\*</sup>, М. Ю. Скоблов<sup>\*\*</sup>, Е. Д. Шибанова<sup>\*</sup>,  
Д. И. Байрамашвили<sup>\*</sup>, А. И. Мирошников<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>\*\*</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 22.12.2003 г. Принята к печати 03.02.2004 г.

Описан метод полукOLIЧЕСТВЕННОГО определения ДНК в образцах рекомбинантного инсулина человека. Методика основана на обнаружении ДНК штамма продуцента по наличию в образце фрагмента гена устойчивости к ампициллину методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ продуктов ПЦР испытуемых образцов и образцов, содержащих известное количество суммарной ДНК *E. coli*, позволил провести количественную оценку содержания ДНК штамма-продуцента в испытуемых образцах. Чувствительность определения составила 7 пг ДНК *E. coli* в 10 мкг рекомбинантного инсулина человека. Высокая чувствительность методики позволяет рекомендовать ее для количественной оценки содержания ДНК в рекомбинантных препаратах, не ингибирующих полимеразную цепную реакцию.

*Ключевые слова:* определение ДНК, рекомбинантный инсулин человека, ПЦР.

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время получило широкое развитие биотехнологическое производство рекомбинантных белковых препаратов фармакологического назначения, основанное на промышленном использовании бактериальных штаммов-суперпродуцентов. Применение таких препаратов в медицине предъявляет высокие требования к качеству получаемых белковых продуктов. Среди этих требований – низкое содержание ДНК штамма-продуцента. Для такого препарата, как рекомбинантный инсулин человека, используемого в медицинской практике для ежедневного введения в организм пациента, допускается содержание ДНК продуцента не более 7 нг/мг белка [1]. Задача определения и количественной оценки содержания ДНК в биотехнологической продукции решается с помощью гибридизационных методов [1] и прямого флуоресцентного определения нуклеиновых кислот в образцах [2]. Среди преимуществ этих методов анализа необходимо отметить их высокую чувствительность, например, использование специфического к ДНК красителя PicoGreen (Molecular Probes, США) позволяет определять 25 пг ДНК/мл в присутствии значительного количества белка [2]. К существенным недостаткам упомянутых методов следует отнести вы-

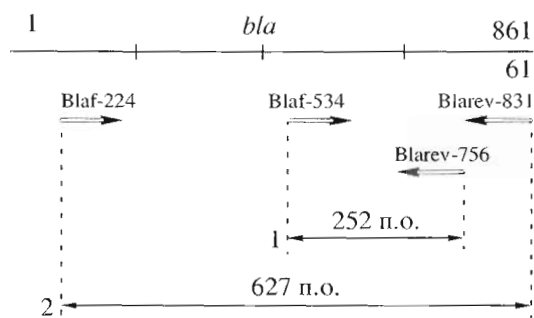
сокую стоимость оборудования и реагентов для проведения анализа и использование нестабильных радиоактивно меченных соединений (зондов ДНК для проведения гибридизации).

В настоящей работе предложен метод полукOLIЧЕСТВЕННОГО определения ДНК в образцах рекомбинантного инсулина человека, полученного в штамме-продуценте *E. coli* JM109 [1]. Сущность методики заключается в определении ДНК штамма-продуцента по наличию в образце фрагмента гена устойчивости к ампициллину (*bla*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Электрофоретический анализ продуктов такой амплификации испытуемых образцов и образцов, содержащих известное количество суммарной ДНК *E. coli*, позволяет провести количественную оценку содержания ДНК штамма-продуцента в испытуемых образцах инсулина. Чувствительность определения составила 7 пг ДНК *E. coli* в 10 мкг рекомбинантного белка.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение остаточной ДНК продуцента проводили в образцах рекомбинантного инсулина человека. В качестве маркерного гена для проведения ПЦР-анализов был выбран ген устойчивости к ампициллину (ген β-лактамазы, или ген *bla*), поскольку этот ген входит в большинство генетических конструкций суперпродуцентов в качестве

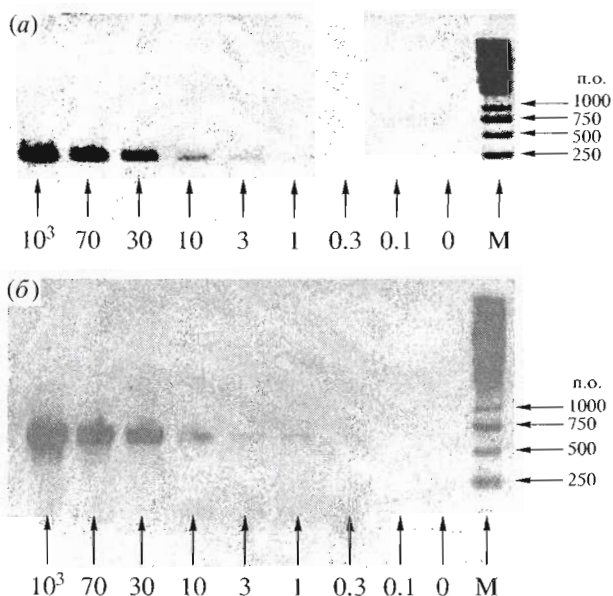
<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 335-71-93, эл. почта: alex@ibch.ru).



**Рис. 1.** Карта праймеров гена *bla* (пустые стрелки) и длина возможных амплификатов (обоюдоострые стрелки).

селективного маркера. Высокая чувствительность ПЦР предполагает выбор такой маркерной последовательности, специфическая амплификация которой позволяет получить с минимального количества ДНК-матрицы продукт реакции в концентрации 5–10 нг/мкл. Эта концентрация определяется наименьшим количеством визуально детектируемого в агарозном геле амплификата. На рис. 1 показана карта выбранных праймеров для амплификации фрагментов гена *bla* и диаграмма, демонстрирующая относительную длину возможных амплификатов.

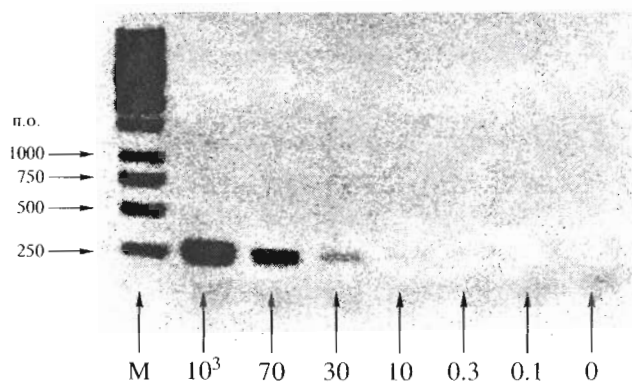
Последовательности праймеров были выбраны с учетом известной первичной структуры хромосомы *E. coli* таким образом, чтобы свести к минимуму их отжиг на геномную ДНК *E. coli*. В качестве матрицы в ПЦР вводили разные количества вектора, содержащего ген устойчивости к ампициллину. Продукты полимеразной реакции анализировали электрофоретически. На рис. 2а и 2б представлены результаты такого анализа для амплификатов длиной 252 и 627 п. о. соответственно. Из приведенных данных видно, что метод ПЦР позволяет выявить в образце объемом 20 мкл 0.3–1 пг плазмидной конструкции несущей ген *bla* (или его фрагмент). Эти данные хорошо согласуются с описанными для ПЦР количественными закономерностями, например с уравнением Матца–Лукьянова [3].



**Рис. 2.** Электрофореграмма амплификатов фрагментов гена *bla* длиной 252 (а) и 627 п.о. (б), полученных в ПЦР с разного количества плазмидной ДНК (pUC18). Количество введенной в реакцию матрицы (пг) отмечены под стрелками. М – маркеры молекулярной массы.

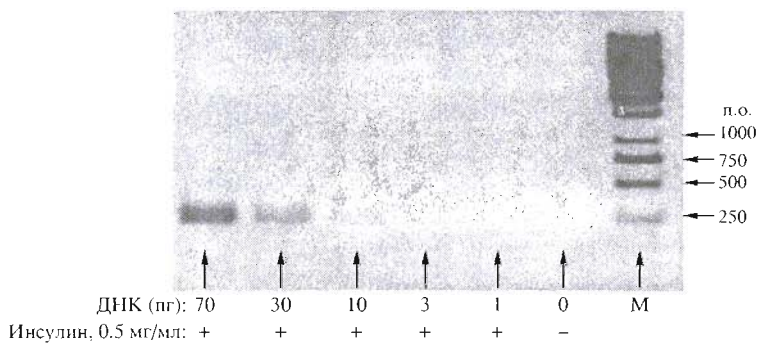
#### Определение чувствительности метода; ингибирование ПЦР высокими концентрациями инсулина

Для измерения чувствительности предлагаемого метода анализа в ПЦР вводили разные количества суммарной ДНК рекомбинантов *E. coli*, содержащих ген *bla*. Известно, что примесная ДНК в анализируемых образцах в той или иной степени деградирует в процессе выделения и очистки белкового препарата. Для того чтобы деградация примесной ДНК не снижала чувствительности ПЦР-анализа, была выбрана пара праймеров, соответствующих продукту ПЦР длиной 252 п. о. Данные электрофореза (рис. 3) показывают, что амплификация фрагмента гена *bla* (252 п. о.) из гетерогенного набора ДНК, каковым является образец суммарной ДНК продуцента, протекает менее эффективно, и специфический фрагмент синтезируется лишь при введении в ПЦР (в объеме 20 мкл)  $\geq 10$ –30 пг суммарной ДНК продуцента в качестве матрицы.



**Рис. 3.** Электрофореграмма амплификатов фрагмента гена *bla* (252 п. о.), полученных в ПЦР с использованием суммарной ДНК продуцента инсулина в качестве матрицы. Количество введенной в реакцию матрицы отмечены под стрелками. М – маркеры молекулярной массы.

Поскольку мониторинг примесной ДНК в ходе очистки рекомбинантного белка и в конечном продукте производства предполагает определение ДНК на значительном белковом фоне, то для выявления возможного ингибирующего эффекта больших количеств белка на ПЦР амплификацию вели в присутствии рекомбинантного инсу-



**Рис. 4.** Ингибирование ПЦР инсулином. Электрофореграмма амплификатов фрагмента гена *bla* (252 п. о.), полученных в ПЦР в присутствии рекомбинантного инсулина человека (0.5 мг/мл). В качестве матрицы использовали указанные под стрелками количества суммарной ДНК штамма-производителя инсулина. М – маркеры молекулярной массы.

лина человека. В качестве матрицы использовали разные количества суммарной ДНК производителя инсулина. Электрофоретический анализ продуктов амплификации в присутствии инсулина (рис. 4) показал, что этот белок не оказывает заметного ингибирующего действия на полимеразную реакцию вплоть до концентрации 0.5 мг/мл реакционной смеси и не снижает чувствительности анализа.

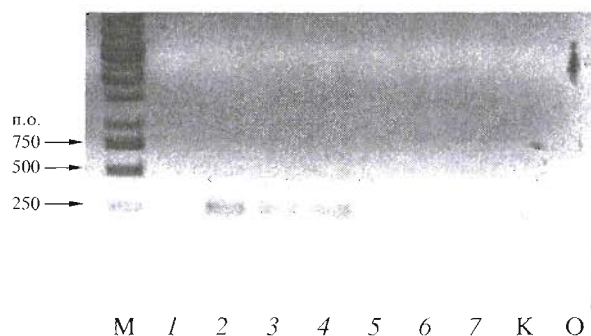
*Определение ДНК штамма-производителя в образцах рекомбинантного инсулина человека*

В ПЦР вводили 70 пг суммарной ДНК производителя, проводили реакцию и использовали полученные реакционные смеси как образцы сравнения для оценки количества остаточной ДНК в пробах инсулина. В качестве отрицательного контроля использовали буфер для растворения инсулина. Пробы инсулина растворяли до конечной концентрации 10 мг/мл и вводили в ПЦР в количестве 10 мкг белка/реакцию. Сравнение интенсивностей полос, отвечающих специфической амплификации в образцах сравнения и испытуемых образцах, позволило количественно оценить суммарную ДНК производителя в образцах. Наличие полинуклеотида длиной 252 п. о. в амплификате, отвечающем исследуемому препарату, свидетельствует о наличии в препарате ДНК штамма-производителя. Если количество этого полинуклеотида, по результатам электрофоретического анализа, оказывалось сравнимо с количеством его в образце сравнения, то можно говорить о содержании ДНК в белковом препарате на уровне  $7 \times 10^{-6}$  по отношению к белку (или 7 пг суммарной ДНК производителя/мкг белка).

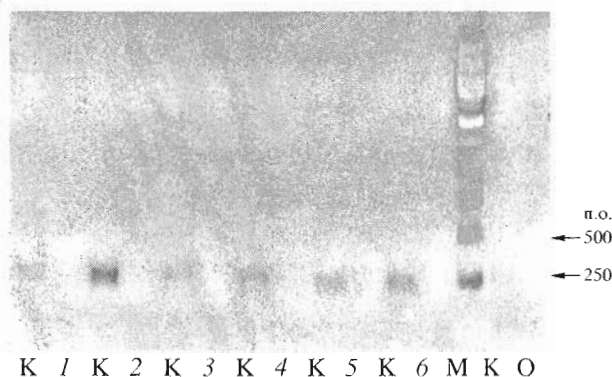
На рис. 5 представлены результаты определения ДНК в пробах инсулина на отдельных стадиях очистки. Видно, что гидрофобная хроматография не освобождает инсулин от примесной ДНК (дорожка 1 и 2). Отдельные фракции белка из профиля элюции на анионообменном носителе еще содержат ДНК в количестве  $> 7$  пг/мкг белка (до-

рожки 3–6). На заключительных стадиях очистки (рис. 5, дорожка 7), а также в очищенных образцах инсулина (рис. 6) примеси ДНК *E. coli* детектируются на уровне значительно  $< 7$  пг/мкг белка. Варьируя количество циклов ПЦР и количество суммарной ДНК производителя в образце, соответствующем положительному контролю, легко получить данные, отвечающие другому уровню содержания ДНК в препарате по отношению к белку.

Таким образом, в настоящей работе разработан простой и эффективный ПЦР-метод полуколичественного определения ДНК в препаратах рекомбинантных белков, позволяющий определять 7 пг ДНК *E. coli* в 1 мкг инсулина. Описанный выше метод применим для определения ДНК в образцах других белков, не ингибирующих ПЦР.



**Рис. 5.** Проверка образцов инсулина, полученных на разных стадиях очистки. Электрофореграмма амплификатов фрагмента гена *bla* (252 п. о.), полученных в ПЦР в присутствии 10 мкг инсулина, из: 1, 2 – отдельных фракций профиля элюции на гидрофобном носителе; 3, 6 – на анионообменном носителе; 7 – отдельных фракций гель-фильтрационного профиля элюции. М – маркеры молекулярной массы (п. о.). К – продукты амплификации с 70 пг суммарной ДНК производителя инсулина (образец сравнения). О – отрицательный контроль амплификации (ПЦР без ДНК-матрицы).



**Рис. 6.** Определение ДНК в пробах очищенного препарата инсулина (дорожки 1–6). М – маркеры молекулярной массы (п.о.). К – продукты амплификации с 70 пг суммарной ДНК продуцента инсулина (образец сравнения). О – отрицательный контроль амплификации (ПЦР без ДНК-матрицы).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение суммарной ДНК *E. coli* и приготовление проб описано в работе [4].** В качестве калибровочного использовали раствор суммарной ДНК штамма-продуцента в концентрации 100 нг/мл. Препараты инсулина [1] растворяли в концентрации 10 мг белка/мл 1 мМ Трис-НСl, рН 8,0.

**ПЦР [4]** проводили в DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer-Cetus). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 20 мМ Трис-НСl, рН 8,4, 50 мМ КСl, по 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 1,5 мМ хлорид магния, 10–15 пмоль каждого прай-

мера, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы и 1 мкл раствора испытуемого образца, суммарной ДНК *E. coli* известной концентрации или плазмидной ДНК.

Реакционную смесь прогревали при 94°C в течение 3 мин и проводили 25–29 циклов инкубации по программе: 94°C – 30 с; 58°C – 30 с; 72°C – 1 мин. Реакцию завершали, выдерживая реакционную смесь при 72°C в течение 3 мин. Продукты ПЦР анализировали визуально в 1,2% агарозном геле, окрашенном в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл). Для оценки относительной интенсивности полос на электрофореграммах и статистической обработки результатов (для трех независимых реакций) использовали программу Sigma-Gel (Jandel Scientific).

В работе были использованы следующие праймеры (5' → 3'): Blaf-224 (СТТТАТССГССТСССАТССАГТС), Blaf-534 (GATGCTTTTCTGTGACTGGTG), Blarev-765 (ACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT), Blarev-831 (СААСАТТТССГТГТССССТТА).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фармакопейная статья предприятия Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. ФСП42-0452361302. Инсулин человека. Инсулин человеческий, 2002.
2. Haugland R.P., Kang H.C. Chemically Reactive Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes // US Patent № 4.774.339.
3. Matz M.V. // Methods Mol. Biol. / Ed. Hicks B.W. Totowa: Humana press, 2003. V. 221. P. 103–116.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor; N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

## A PCR-Based Semiquantitative Assay of DNA Impurities in Recombinant Protein Preparations

A. N. Aleksandrov<sup>\*,#</sup>, Yu. S. Skoblov<sup>\*</sup>, M. Yu. Skoblov<sup>\*\*</sup>, E. D. Shibanova<sup>\*</sup>, D. I. Bairamashvili<sup>\*</sup>, and A. I. Miroshnikov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 335-7193; e-mail: alex@ibch.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A semiquantitative assay of DNA impurities in preparations of human recombinant insulin is described. The assay is based on the detection of a fragment of the ampicillin-resistant gene within the producer strain DNA by PCR. The analysis of PCR products of the studied preparations and PCR products containing known amounts of *E. coli* total DNA enabled a quantitative determination of the producer strain DNA content in the preparations under study. The sensitivity of the method is 7 pg of *E. coli* DNA per 10 µg of human recombinant insulin. The high sensitivity of the method allows us to recommend it for the quantitative determination of DNA content in recombinant preparations that do not inhibit PCR. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* DNA determination, human recombinant insulin, PCR