

QC Sample Preparation Kit

PCRによる CHO 細胞・大腸菌由来マイコプラズマ/残留 DNA 検出試験用細胞培養サンプルの調製

Cat. No. 08 146 829 001 1 式

バージョン 02

改訂：2020 年 3 月

15~25°Cで保存すること。

1. 一般情報

1.1 キット内容

バイアル/ボトル	キャップの色	ラベル	機能/説明	内容量
1	橙	Proteinase K		4 バイアル、各 850 ml
2	茶	Lysis Buffer	グアニジンチオシアン酸塩、トリス緩衝液、界面活性剤含有。	5 バイアル、各 6 ml
3	グレー	Precipitation Reagent	核酸沈殿用。	5 バイアル、各 7 ml
4	白	Washing Buffer	洗浄ステップ用。	6 バイアル、各 9 ml
5	青	Dissolution Buffer	抽出した核酸の溶解用。	5 バイアル、各 5 ml
6	白	Water, DNA-free		10 バイアル、各 1 ml
7	白	Poly(A)	Lyophilizate	7 ボトル、各 2 mg
8		Reaction Vials		3 袋、各ポリプロピレンチューブ (2 ml) 35 本入り

1.2 保存方法・安定性

キットの内容物は +15~+25°C でラベルに記載の有効期限まで安定です。

△ 開封後は、キットの内容物はすべて +15~+25°C で保存してください。

+2°C~+8°C や -15°C~-25°C で保存しないでください。

1.3 その他の必要器具・試薬

標準的な実験器具

- ・ヌクレアーゼフリー、DNA フリー、エアロゾル耐性のピペットチップ
- ・アルコールワイブ
- ・バイオセーフティーキャビネットクラス II

- ・サーモミキサー
- ・ベンチトップ遠心分離機 (2 ml チューブ用)
- ・ボルテックスミキサー

1.4 用途

QC Sample Preparation Kit で実施できる内容は以下のとおりです。

- ・哺乳類細胞培養サンプルの抽出 26 回 (1 ml あたり)
- ・または高密度細胞培養サンプルの抽出 10 回 (1 ml あたり)
- ・または発酵プロセスサンプルの抽出 100 回 (100 µl あたり)。

本キットを用いることにより、マイコプラズマ汚染や宿主細胞 DNA の検出といったさらなる PCR 検査用サンプルの調製に最適な抽出プロトコールを実現できます。

マイコプラズマ汚染の検出

- ・PCR ブロックサイクラーを用いる場合は、MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit* の使用説明書を参照してください。

・ 5×10^6 cell/ml の CHO または SP2/0 細胞の試験用 (標準プロトコール)

・ 1×10^8 cell /ml までの CHO または SP2/0 サンプルの試験用 (高密度細胞用プロトコール)

- ・リアルタイム PCR 装置を用いる場合は、哺乳類細胞培養サンプルの試験については、MycoTOOL Real-Time PCR Kit* の使用説明書を参照してください。本 PCR キットには、サンプル物質に添加できる偽陰性防止用コントロールプラスミド (Recovery Control) が含まれています。

宿主細胞 DNA の検出

QC Sample Preparation Kit は、大腸菌・CHO 細胞由来の残留 DNA 検出を目的とした、発酵プロセス由来宿主細胞不純物を含有するバイオ医薬品製造サンプルの処理に適しています。

詳しくは、Residual DNA *E. coli* Kit* の使用説明書または Residual DNA CHO Kit* を参照してください。

これらの PCR キットには、偽陰性防止用ワークフロー陰性コントロールと、サンプル物質に添加できる標準 DNA が含まれています。

1.5 準備時間

用手作業の所要時間：約 2 時間

2. 本製品の使い方

2.1 ご使用の前に

注意事項

汚染を避けるため、DNA フリーの条件下でワークフローをセットアップしてください。

- ヌクレアーゼフリー・DNA フリーの機器および消耗品を用いてすべての溶液の調製・ピペット操作を行ってください。
- ピペット操作の前に層流フード（クリーンベンチ）をUV処理してください。
- 滅菌済みの使い捨て手袋とクリーニング済白衣を着用してください。
- ピペット操作後直ちにバイアルに蓋をしてください。
- 分離された作業場所でワークフローの各操作を実施してください。

実験室	各操作
サンプル調製室	Recovery Control サンプルの調製などの試験サンプルの抽出および精製。
マスターミックス調製室	マスターミックスの調製およびPCR 陰性コントロールの NTC ウェルへのピペット操作。
セットアップおよび増幅実行用 PCR 室	サンプルと PCR Positive Control の希釈および PCR プレートへのピペット操作。 LightCycler® 480 Instrument II の操作。

2.2 サンプル調製

図 1 に細胞培養サンプルから DNA を調製するワークフローを示します。

ワークフロー-A	ワークフロー-B	ワークフロー-C	ワークフロー-D (オプション)
サンプル	ワークフロー-陰性コントロール ⁽¹⁾ (または緩衝液)	ワークフロー-陰性コントロール ⁽¹⁾ + DNA 標準または内部コントロール ⁽¹⁾	サンプル + DNA 標準または内部コントロール ⁽¹⁾
↓	↓	↓	↓
サンプル調製	サンプル調製	サンプル調製	サンプル調製
↓	↓	↓	↓
溶出 DNA	溶出 DNA (ワークフロー-陰性コントロール)	溶出 DNA (ワークフロー-陽性コントロール)	溶出 DNA (回収コントロール)

⁽¹⁾ PCR キットに含まれているバイアル

図 1: サンプル調製の実験概要。

△ 一貫した結果を得るには、慎重なピペット操作を行うことが大切です。液体を移す前に、ピペットチップの外側に余

分な液がついていないことを確認してください。チューブに溶液を添加するときは、チップを反応混合物に浸し、ゆっくりと送液してから、チップを容器壁に添わせて滑らせながら取り出します。

2.3 細胞培養物からの DNA サンプル調製手順

以下のプロトコールは一般的な概要説明です。サンプルの前処理、溶液添加量、インキュベーション時間の詳細については、各 PCR キットを参照してください。

- ① サーマミキサーの温度を +56°C にします。
- ② 対応する PCR キットの使用説明書に従ってサンプルを調製します。
 - Proteinase K (バイアル 1) をそれぞれ 30~50 µl 添加して、適切な数の反応バイアルを作製します。
 - それに応じたラベルを反応バイアルにつけます。
- ③ 各反応バイアルにサンプルを 200~450 µl 添加します。
- ④ Lysis Buffer (バイアル 2) または実際に使用する溶液 (working solution) ⁽¹⁾ (Poly A+溶解緩衝液) を 220~700 µl、反応バイアルに添加します。
- ⑤ 反応バイアルに蓋をして、5 秒間、3 回ボルテックスします。
- ⑥ サーマミキサーに入れ、+56°C、600~900 rpm で 15~30 分間インキュベーションします。
- ⑦ 反応バイアルを取り出します。
 - 次のインキュベーションステップのために、サーマミキサーを +80°C にします。
- ⑧ 各反応バイアルに Precipitation Reagent (バイアル 3) を 290~800 µl 添加します。
 - 反応バイアルに蓋をして 20 回上下転倒した後、5 秒間ボルテックスします。
- ⑨ 16,000×g で 3 分間遠心します。
 - ペレットを取り出さずに上清をデカンテーションします。
- ⑩ Washing Buffer (バイアル 4) を 450~1000 µl 添加します。
- ⑪ 反応バイアルに蓋をして 5 回転倒します。
 - 直ちに 16,000×g で 3 分間遠心し、すべての上清を静かに捨てます。
- ⑫ 16,000×g で 3 秒間さっと遠心し、残っている上清を静かに捨てます。
- ⑬ Dissolution Buffer (適用 5) を 100~600 µl ⁽¹⁾ 添加します。
- ⑭ 反応バイアルに蓋をし、サーマミキサー内でペレットを +80°C、900~1300 rpm で 10~30 分間溶解します。
- ⑮ ペレットが完全に溶解するまでボルテックスします。
- ⑯ 反応バイアルを PCR 室に移します。
 - △ 溶出された DNA は -15~-25°C で 3 日間安定です。

⁽¹⁾ 実際に使用する溶液 (working solution) の調製については、Residual DNA *E. coli* Kit* または Residual DNA CHO Kit* の使用説明書を参照してください。

3. 補足資料

3.1 検査の原理

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるサンプル分析の前提条件として、細胞培養物からの分析物の分離が必要です。細胞溶解は、特別な細胞溶解緩衝液中において Proteinase K の存在下でサンプルをインキュベーションすることで実現できます。次いで、洗浄ステップによって DNA を沈殿させ、塩、タンパク質、その他の不純物を除去することによって DNA を精製します。最終ステップで、DNA を低塩濃度の緩衝液に溶解します。

3.2 品質管理

QC Sample Preparation Kit : ロットごとに MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit を用いた残留宿主細胞の CHO DNA およびマイコプラズマ検出機能試験が実施されています。

QC Sample Preparation Kit の試薬 : マイコプラズマ、CHO 細胞、大腸菌由来の DNA の否定試験が全試薬に対して実施されています。

4. 追記事項

4.1 凡例

書式

本文書は、統一感と読みやすさを確保する書式を用いています。

書式	用法
①、②などの付番のあるステージ	通常、記載順に起こるプロセスの段階。
❶、❷などの付番のある指示	記載順に実行しなければならない手順のステップ。
アスタリスク*	ロシュ社から購入可能な製品。

記号

本文書では、重要情報を示す記号を用いています。

記号	説明
○	参考情報 : 現在のトピックや手順に関する追加情報。
△	重要事項 : うまく手順を実施したり製品を使用したりするのに不可欠な情報。

4.2 改訂履歴

編集上の変更を行いました。
問い合わせ先情報を更新しました。

4.3 注文情報

製品	内容量	Cat No.
MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit		05 184 240 001
MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR キット		06 495 605 001
Residual DNA CHO Kit		07 427 689 001
Residual DNA <i>E. coli</i> Kit*		07 728 735 001

4.4 商標

MYCOTOOL および LIGHTCYCLER はロシュ社の商標です。第三者製品の製品名および商標はすべて、それぞれの所有者に帰属します。

4.5 規制上の免責事項

品質管理/製造プロセス専用。

本製品の詳細、および使用説明書や製品安全データシートなどの文書については、custombiotech.roche.com をご覧ください。

© 2020 Roche Diagnostics GmbH. 全著作権保有。

詳細については、最寄りのロシュ代理店にお問い合わせください。

欧州、中東、アフリカ、南米 : Tel +49 621 759 8580 Fax +49 621 759 6385	アジア太平洋地域 : Tel +65 6371 6638 Fax +65 6371 6601	米国 : Tel +1 800 428 5433 内線 14649 (フリーダイヤル) Tel +1 317 521 4065
日本 : Tel +81 3 6634 1046 Fax +81 3 5479 0585	カナダ : Tel +1 450 686 7050 Fax +1 450 686 7012	

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

