

doi:10.18286/1816-4501-2025-2-133-139

УДК 636.3:619:578:577.2

Мультиплексная ПЦР для технологического контроля рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента антигена вируса КЧС

А. Г. Галеева^{1,2✉}, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов, старший научный сотрудник межкафедральной лаборатории биотехнологии и иммунологии

Н. И. Хаммадов^{1,2}, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и генетического анализа, старший научный сотрудник межкафедральной лаборатории биотехнологии и иммунологии

А. Р. Ахунова¹, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

420075, Россия, Республика Татарстан (Татарстан), Казань, Научный городок – 2

²ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»

420029, Россия, Республика Татарстан (Татарстан), Казань, Сибирский Тракт, 35

✉antonina-95@yandex.ru

Резюме. Использование штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных белков в промышленных условиях требует разработки методов контроля их подлинности и стабильности, так как риск потери рекомбинантных ДНК трансформированными бактериальными клетками ставит под угрозу эффективность производственного процесса. Цель исследования – разработка мультиплексной ПЦР для технологического контроля рекомбинантного штамма *E. coli* на модели штамма-продуцента антигена E2 вируса классической чумы свиней (КЧС). В качестве целевых участков для детекции хромосомной ДНК *E. coli* был выбран ген фосфофруктокиназы *pfkB*, плазмидной ДНК – ген *lacI*, кодирующий лактозный репрессор в экспрессирующем векторе, целевой ДНК – фрагмент гена, кодирующего антиген E2 вируса КЧС. Были оптимизированы условия постановки ПЦР «в реальном времени» в присутствии интеркалирующего красителя SYBR-Green, что позволило идентифицировать присутствие продуктов амплификации всех трех локусов путем расчета температур плавления, составивших 82 °С, 84 °С и 88 °С соответственно. Также была оценена возможность применения метода для количественного определения остаточной ДНК штамма-продуцента в очищенных белковых субстанциях. Метод характеризуется высокой чувствительностью (100 фг/мл) и точностью амплификации ($R^2 = 0,99$), а также воспроизводимостью и экономичностью, что позволяет рекомендовать его к применению в условиях масштабных производств для контроля стабильности и подлинности штаммов-продуцентов.

Ключевые слова. *Escherichia coli*, прокариотическая система экспрессии, штамм-продуцент, полимеразная цепная реакция, классическая чума свиней.

Для цитирования: Галеева А. Г., Хаммадов, Ахунова А. Р. Мультиплексная ПЦР для технологического контроля рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента антигена вируса КЧС // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2025. №2 (70). С. 133-139. doi:10.18286/1816-4501-2025-2-133-139

Multiplex pcr for technological control of recombinant *E. coli* strain – producer of CSF virus antigen

A. G. Galeeva^{1,2✉}, **N. I. Khammatov**^{1,2}, **A. R. Akhunova**¹

¹ FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety» (FSBSI «FCTRBS-ARRVI»)

420075, Russian Federation, Kazan, Nauchnyy gorodok – 2

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman

420029, Russia, Republic of Tatarstan (Tatarstan), Kazan, Siberian Tract, 35

✉antonina-95@yandex.ru

Abstract. The use of *E. coli* strains as producers of recombinant proteins in industrial conditions requires the development of methods for monitoring its authenticity and stability, since the risk of recombinant DNA loss by transformed bacterial cells jeopardizes the efficiency of production process. The aim of this study was to develop a multiplex PCR for technological control of a recombinant *E. coli* strain using a model strain producing the E2 antigen of the classical swine fever virus (CSFV). The *pfkB* (phosphofruktokinase) gene was selected as target site for detecting *E. coli* chromosomal

DNA, the *lacI* gene encoding the lactose repressor in the expression vector was selected for detecting plasmid DNA, and a fragment of the gene encoding CSFV E2 antigen was selected for detecting target DNA. The conditions for setting up real-time PCR in the presence of the intercalating dye SYBR-Green were optimized, which made it possible to identify the presence of amplification products of all three loci by calculating the melting temperatures, which were 82 °C, 84 °C and 88 °C, respectively. The possibility of using the method for the quantitative determination of residual DNA of the producer strain in purified protein substances was also assessed. The method is characterized by high sensitivity (100 fg/ml) and amplification accuracy ($R^2 = 0.99$), as well as reproducibility and cost-effectiveness, which allows us to recommend it for use in large-scale production to control the stability and authenticity of producer strains.

Keywords: *Escherichia coli*, prokaryotic expression system, polymerase chain reaction, classical swine fever.

For citation: Galeeva A. G., Khammatov N. I., Akhunova A. R. Multiplex PCR for technological control of recombinant *E. coli* strain – producer of CSF virus antigen // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2025;2(70): 133-139 doi:10.18286/1816-4501-2025-2-133-139

Введение

Рекомбинантные белки все чаще применяются в составе иммунобиологических препаратов (антител, гормонов, вакцин) для промышленного и сельскохозяйственного применения. *Escherichia coli* является наиболее популярным бактериальным продуцентом для производства рекомбинантных белков благодаря быстрой скорости роста (время генерации в оптимизированных условиях – 20 мин), доступным инструментам молекулярных манипуляций и способности достигать высокой плотности биомассы с использованием недорогих культуральных реагентов [1]. Использование подобных продуцентов в промышленных условиях требует разработки методов контроля их стабильности: так, существует риск потери рекомбинантных ДНК трансформированными бактериальными клетками из-за неравномерного распределения плазмид между дочерними клетками во время деления, что снижает уровень экспрессии белка и ставит под угрозу эффективность производственного процесса [2, 3]. Отдельной задачей является контроль содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в очищенных препаратах вакцин и фармацевтических субстанций, полученных путем рекомбинантного синтеза. Согласно международным рекомендациям, содержание остаточной ДНК не должно превышать 10 нг на дозу препарата согласно требованиям ВОЗ [4] и 100 пг на дозу – согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration) [5].

Для решения этих задач наиболее распространенным молекулярно-биологическим методом является амплификация нуклеиновых кислот, реализуемая в виде различных количественных и полуколичественных методов [6]. Остаточную ДНК штамма-продуцента, как правило, контролируют методами слот-блот гибридационного анализа или порогового анализа общей ДНК, однако эти методы длительны в постановке, неэкономичны и относительно низкочувствительны [7], поэтому в последние годы все более предпочтительным становится метод количественной ПЦР благодаря своей точности, прецизионности и экспрессности.

Цель исследований – разработка мультиплексной ПЦР для технологического контроля рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента антигена E2 вируса КЧС.

Материалы и методы

Исследования были проведены в лаборатории вирусных антропоозоонозов и лаборатории молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках темы НИР 4.2 «Разработка технологии производства рекомбинантной вакцины против классической чумы свиней» (2024-2026 гг.)

Штамм-продуцент и экстракция ДНК. Рекомбинантный штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный вектором pET-28a(+) со вставкой, кодирующей фрагмент мажорного гликопротеина E2 вируса КЧС [8], культивировали на питательной среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением селективных антибиотиков (50 мкг/мл канамицина, 34 мкг/мл хлорамфеникола, НПП «Панэко», Россия) на орбитальном шейкере «OS-20» («Biosan», Латвия) при 37 °C и 180 г/м. В эксперименте применяли аликвоты рабочих расплеков штамма-продуцента, глицериновых стоков, хранящихся при минус 80 °C, и субстанции хроматографически очищенного рекомбинантного белка. Экстракцию ДНК из образцов проводили с применением коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Дизайн олигонуклеотидных праймеров. Биоинформационный анализ вариабельных и консервативных участков геномов штамма *E. coli* BL21 (NZ_CP053601.1) и его производных осуществлялся на основе первичной структуры нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных GenBank (NCBI, NIH, США). Подбор праймеров, фланкирующих выбранные области для амплификации, анализ их структуры на возможность образования шпилек и димеров производили при помощи программы Vector NTI Advance 11.0 («Invitrogen Corporation», США). Праймеры были синтезированы на аутсорсе (ЗАО «Евроген»).

Полимеразная цепная реакция. Подбор условий ПЦР проводили с использованием стандартной плазмиды pET-28a(+)/E2-V5. Реакционная смесь для постановки классической ПЦР (на 1 пробу объемом 20 мкл) включала: 2 мкл 10x Taq-Turbo буфера (2,5 mM Mg²⁺), 3 mM смеси dNTP, 1,0 единицу Taq ДНК-полимеразы, 5 мкМ прямого и обратного праймеров (ЗАО «Евроген», Россия), 15 нг ДНК-матрицы, ddH₂O – до 20 мкл; для постановки ПЦР-PB: 4 мкл 5x реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR, 5 мкМ

прямого и обратного праймеров (ЗАО «Евроген», Россия), 15 нг ДНК-матрицы, ddH₂O – до 20 мкл. Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», США) со следующей исходной программой амплификации: (I) – начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин, (II) – 40 циклов, состоящих из: денатурации – 20 с при 95 °С, отжига олигонуклеотидов – 30 с при температурном градиенте от 53 до 59 °С, элонгации – 40 с при 72 °С, (III) элонгация – 5 мин при 72 °С. Графический анализ кривых плавления ампликонов проводили в программе «CFX Manager» («Bio-Rad», США).

Технологический контроль рекомбинантного штамма и продуктов экспрессии. О функциональности штамма-продуцента в процессе пассивирования и длительного хранения судили по сохранности двух характеристик: способности к гиперэкспрессии целевого антигена и обнаружению в ПЦР соответствующих локусов хромосомной и плазмидной ДНК *E. coli*. Наличие антигена E2 в клеточных лизатах оценивали методом электрофореза в денатурирующих условиях в 15 % полиакриламидном геле. Степень загрязненности конечного продукта

экспрессии – антигена, подвергнутого металл-хелатной хроматографической очистке в денатурирующих условиях с последующим рефолдингом, оценивали по наличию в образцах остаточной ДНК штамма-продуцента. В связи с многостадийностью процесса очистки частично растворимого рекомбинантного антигена условия постановки ПЦР были проверены на совместимость с различными буферными системами, применяемыми в ходе лизиса клеток штамма-продуцента, солиubilизации телец включения, денатурации и рефолдинга белка.

Результаты

Для детекции ДНК *E. coli*, как правило, применяют праймеры, отжигающиеся на гене 16S или 23S рРНК [9, 10]. В качестве целевых участков для детекции хромосомной ДНК продуцента выбран ген фосфофруктокиназы-2 *pfkB*, плазмидной ДНК – ген *lacI*, кодирующий лактозный репрессор в экспрессирующем векторе (таб. 1). Для отбора локусов, удобных для мультиплексирования, был уточнен диапазон температур отжига, в котором проходит специфичная ПЦР для каждой пары праймеров в градиенте температур от 53 °С до 59 °С.

Таблица 1. Праймеры для специфичного определения целевых участков генома штамма-продуцента в ходе технологического контроля

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Длина, н.	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>pfkB</i> <i>E. coli</i>	pfkB-forw	TGGTTTCACTGTTGGCGGATG	21	103
	pfkB-rev	TGCTCACCGCTTGCTTCC	18	
<i>lacI</i> pET28a	lacI-forw	AAAGTGGAAAGCGGCGATGG	19	174
	lacI-rev	CACGCTGGCACCCAGTTGA	19	
<i>E2</i> ВКЧС	E2-forw	CGTCAACCAATGAGATAGGGCTGT	24	272
	E2-rev	GCACAGCCCGAATCCGAAGT	20	

Для выбора программы амплификации и соотношения концентрации праймеров в различных вариантах реакционной смеси предварительно были

проведены моно- и мультилокусные реакции с последующей электрофоретической детекцией (рис. 1 А, Б).

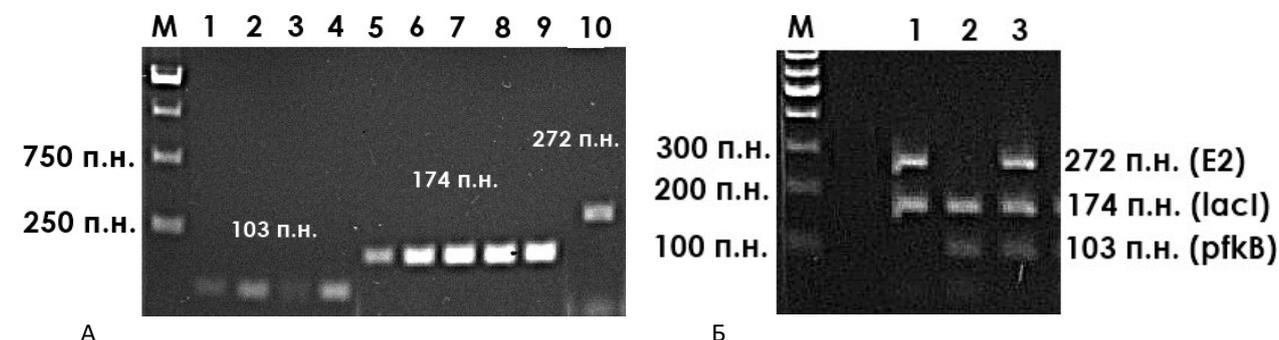


Рис. 1. Результаты ПЦР-исследования штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-E2 в монолокусном (А) и мультилокусном (Б) вариантах. Треки: А – М – маркер длин ДНК 1 kb («Сибэнзим», Россия), результаты амплификации: 1-4 – гена *pfkB* *E. coli*, 5-9 – гена *lacI* плазмиды pET-28a(+), 10 – гена *E2* вируса КЧС; Б – М – маркер длин ДНК 100 бп («Сибэнзим», Россия), результаты мультиплексной амплификации: 1 – рекомбинантной плазмиды pET-28a(+)-E2, 2 – штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного плазмидой pET-28a(+)-E2 без вставки, 3 – штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-E2

Следующим этапом исследования явилась отработка варианта реакции «в реальном времени» (ПЦР-РВ). Постановка мультиплексной ПЦР-РВ

осуществлялась в присутствии интеркалирующего красителя SYBR-Green; критерием корректности проведения реакции служило подтверждение

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

амплификации всех трех продуктов наличием соответствующих кривых плавления. О специфичности продуктов реакции судили по форме пиков плавления (каждому ампликону соответствует один острый пик, т.к. плавление происходит в узком диапазоне температур) и отсутствию в контрольном образце

широких пиков, соответствующих кривым плавления праймер-димеров [11, 12]. В результате проведения мультиплексной ПЦР-РВ было подтверждено наличие в образце всех трех специфических продуктов (рис. 2 А, Б).

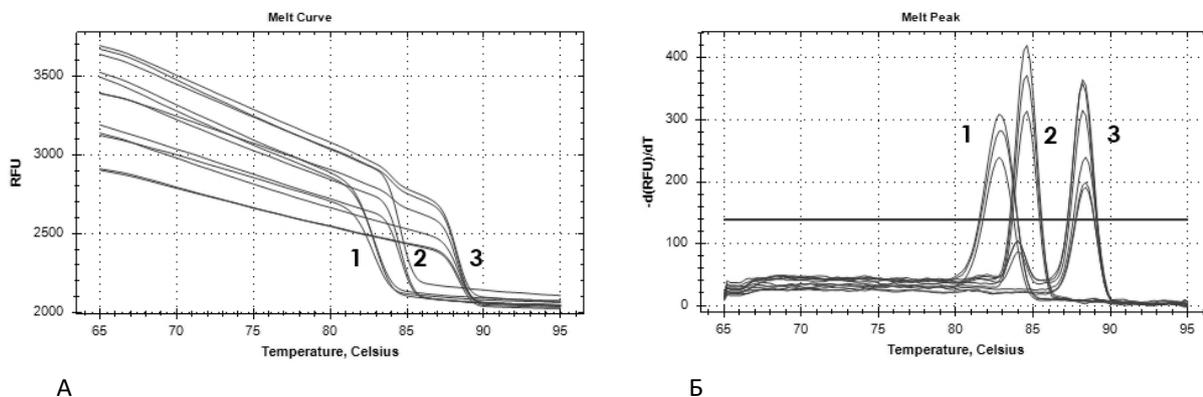


Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР-РВ штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-E2 с SYBR-Green, где А – кривые плавления, Б – пики плавления. Обозначения продуктов ампликации: 1 – гена *pfkB* *E. coli* (82 °С), 2 – гена *lacI* плазмиды pET-28a(+) (84 °С), 3 – гена *E2* вируса КЧС (88 °С)

В ходе выполнения экспериментов по оптимизации условий постановки ПЦР-РВ на ген *E2* была определена чувствительность реакции. Для этого реакция была поставлена с 10-кратными разведениями стандартной плазмиды pET-28a(+)/E2, содержащей вставку участка гена *E2* вируса КЧС. Было установлено, что чувствительность метода составила

100 фг на реакцию. Линейность метода была рассчитана при помощи коэффициентов детерминации (R^2): стандартные кривые, полученные при проведении трех независимых анализов, отражали зависимость среднего значения C_q (порогового цикла) от концентрации ДНК; стандартная кривая приведена на рис. 3.

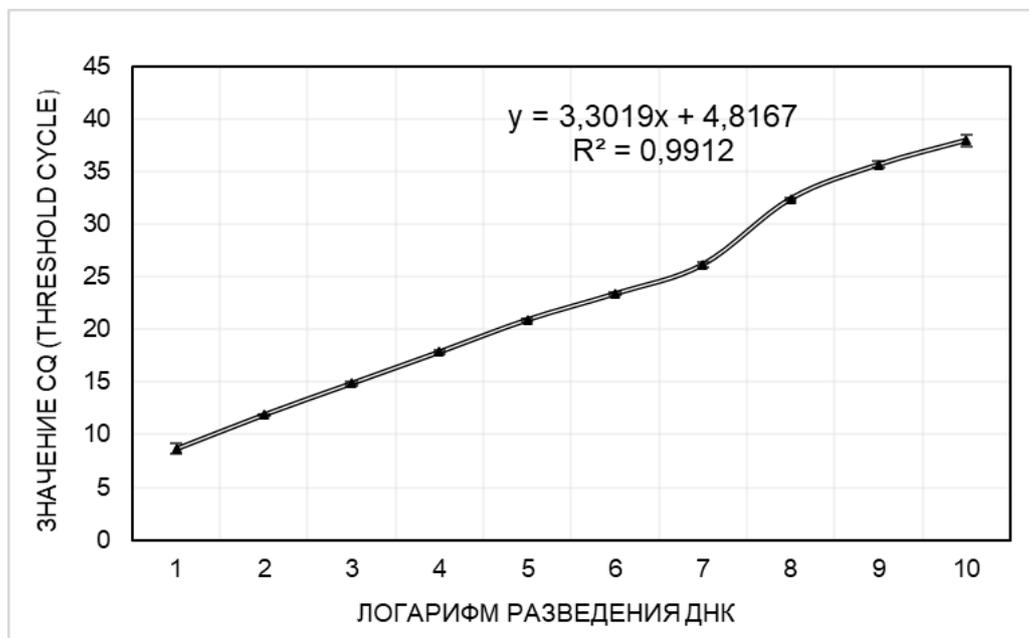


Рис. 3. Стандартная кривая количественной ПЦР-РВ с ДНК штамма-продуцента *E. coli* (с 1 мкг/мл до 1 фг/мл)

На заключительном этапе исследования работоспособность метода была оценена на образцах

штамма-продуцента и сырья, используемых на разных этапах технологического процесса (табл. 2).

Таблица 2. Результаты технологического контроля штамма-производителя *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-E2 и количественного определения остаточной ДНК в антигенсодержащих препаратах

Наименование образца	Наличие целевых локусов (pfkB/lacI/E2)	Значение C _q	Способность к гиперэкспрессии рекомбинантного E2
Главный посевной материал (длительное хранение в лиофилизированном виде)	+ / + / +	10,38	сохранена
Рабочий посевной материал (бульонная культура, 2-я генерация)	+ / + / +	14,86	сохранена
Препарат солюбилизованных телец включения	+ / + / +	21,92	—
Субстанция белка E2 после металл-хелатной хроматографической очистки	- / - / -	н/о	—

В образцах главного и рабочего посевных материалов штамма-производителя обнаруживали все три искомого локуса, при этом способность к гиперэкспрессии рекомбинантного антигена E2 была сохранена. После первичной очистки белка, продуцируемого в виде телец включения, в их солюбилизованном препарате, трехкратно отмытом в 50 мМ трис-HCl буфере, содержащем 2 М мочевины, остаточная ДНК обнаруживалась при значении порогового цикла 21,92, что количественно соответствует 67 пг/мл. В препаратах белковой субстанции, очищенной методом металл-хелатной аффинной хроматографии, наличие ДНК штамма-производителя не установлено.

Обсуждение

В связи с тем, что в последние годы для создания иммунобиологических препаратов на основе рекомбинантных белков все большее распространение получают различные системы экспрессии, в подобных производственных процессах должен применяться надежный и чувствительный метод количественной ПЦР для мониторинга примесной ДНК как потенциального фактора риска, а также для контроля стабильности штаммов-производителей. Использование коммерческих наборов зачастую увеличивает стоимость обнаружения [13], поэтому в проведенном исследовании целью явилась разработка платформенного протокола ПЦР, соответствующего по своей чувствительности, точности и экспрессности международным рекомендациям. В литературе описано применение нескольких подобных методик в отношении штаммов-производителей *E. coli*, в частности, Александровым и соавт. [14] предложен метод полуколичественного определения ДНК в образцах рекомбинантного инсулина человека с пределом обнаружения 7 пг ДНК *E. coli* на 10 мкг рекомбинантного белка; при этом маркером служил фрагмент гена устойчивости к ампициллину (*bla*). В работе Lee et al. [7] метод апробирован в отношении штамма-производителя гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с детекцией гена 16S рPHK; предел

обнаружения составил 3,73 пг ДНК на образец. Другие аналогичные протоколы, основанные на детекции генов 16S либо 23S рPHK, обеспечивали достаточно высокую чувствительность реакции вплоть до 10 фг/мкл [9, 15-18]. Помимо оценки содержания примесных ДНК, немаловажным является контроль генетической стабильности рекомбинантного штамма: так, вероятность возникновения мутаций увеличивается при повторном субкультивировании и пассировании штаммов, что, в свою очередь, приводит к фенотипическим изменениям [19, 20]. С учетом этих двух факторов нами был выбран вариант мультиплексной ПЦР, позволяющий одновременно детектировать локусы хромосомной ДНК, плазмидной ДНК и фрагмента специфического экспрессируемого гена. Учитывая аналитическую чувствительность предлагаемого метода, можно утверждать, что он будет достаточно информативным в технологическом контроле рекомбинантного вакцинного сырья.

Заключение

Разработан метод мультиплексной ПЦР для технологического контроля рекомбинантных штаммов *E. coli* на примере штамма BL21(DE3)/pET-28a(+)-E2 – производителя антигена E2 вируса КЧС. Предлагаемый метод позволяет контролировать как наличие в геноме штамма-производителя хромосомной, плазмидной и специфической ДНК, что в совокупности с сохранением способности к гиперэкспрессии белка свидетельствует о подлинности и стабильности штамма, так и количество остаточной ДНК штамма-производителя в конечных продуктах – очищенных белковых субстанциях. Реакция характеризуется высокой чувствительностью (100 фг) и точностью амплификации ($R^2 = 0,99$). Применение интеркалирующего красителя SYBR-Green позволяет подтвердить амплификацию всех трех целевых локусов по наличию соответствующих кривых плавления, что делает метод экономически доступным и позволяет рекомендовать его для использования на масштабных производствах.

Литература

1. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications / A. Bhatwa, W. Wang, Y.I. Hassan et al. // Front Bioeng Biotechnol. 2021. No. 9. P. 630551. doi: 10.3389/fbioe.2021.630551

2. Testing plasmid stability of *Escherichia coli* using the Continuously Operated Shaken BIOreactor System / M. Sieben, G. Steinhorn, C. Müller et al. // *Biotechnol Prog*. 2016. No. 32(6). P.1418-1425. doi: 10.1002/btpr.2341.
3. Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli* / M. Popov, S. Petrov, G. Nacheva et al. // *BMC Biotechnol*. 2011. No.11 (18). doi:10.1186/1472-6750-11-18
4. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products (2001). Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use, EU. CPMP/BWP/1143/00
5. 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*. 1997. No. 20(3). P. 214-43. doi: 10.1097/00002371-199705000-00007
6. Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК / Е. Д. Мыца, Н. В. Чертова, Е. В. Эльберт и др. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018. №18 (2). С. 75-80.
7. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR / D. H. Lee, J. E. Bae, J. H. Lee et al. // *J Microbiol Biotechnol*. 2010. No. 20 (10). P. 1463-70. doi: 10.4014/jmb.1004.04035
8. Дизайн антигенной композиции на основе фрагмента гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней / А. Г. Галеева, К. В. Усольцев, Н. И. Хаммадов и др. // *Ветеринарный врач*. 2024. № 1. С. 28-33. doi: 10.33632/1998-698X_2024_1_28
9. Detection of residual *E. coli* host cell DNA by 23S ribosomal RNA gene-targeted quantitative polymerase chain reactions / D. Li, Q. Zhang, G. Liu et al. // *J Pharm Biomed Anal*. 2021. No. 198. P. 114000. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114000.
10. Ёлшин Н. Д. Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. Coli* и *CHO* в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016. Т. 16. № 4. С. 245-252.
11. Калько Г. В., Мусина Е. Р. Использование кривых плавления ампликонов при оценке пригодности nSSR-локусов ели европейской для мультиплексирования // *Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства*. 2020. № 1. С. 16-31. doi: 10.21178/2079-6080.2020.1.16
12. Белов Д. А., Белов Ю. В., Манойлов В. В. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени // *Научное приборостроение*. 2016. № 3. С. 10-14.
13. Development and Validation of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of Residual CHO Host Cell DNA and Optimization of Sample Pretreatment Method in Biopharmaceutical Products / W. Zheng, L. Jiang, Q. Lei et al. // *Biol Proced Online*. 2019. No. 21 (17). doi: 10.1186/s12575-019-0105-1
14. Полуколичественное определение ДНК в препаратах рекомбинантных ДНК методом ПЦР / А. Н. Александров, Ю. С. Скоблов, М. Ю. Скоблов и др. // *Биоорганическая химия*. 2005. Т. 31. № 1. С. 73-76.
15. Establishment and evaluation of detection methods for process-specific residual host cell protein and residual host cell DNA in biological preparation / Y. Tian, X. Wang, D. Shao et al. // *Cell biochemistry and function*. 2024. Vol. 42, No. 2. P. e3986. doi: 10.1002/cbf.3986
16. Direct quantitative detection of host cell residual DNA in recombinant Filgrastim by qPCR / A. Gholizadeh-Hashjin, N. Abedi, H. R. Heidari, et al. // *Analytical Biochemistry*. 2021. Vol. 629. 114296. doi: 10.1016/j.ab.2021.114296.
17. Overcoming Biopharmaceutical Interferents for Quantitation of Host Cell DNA Using an Automated, High-Throughput Methodology / M. L. Lauro, A. M. Bowman, J. P. Smith et al. // *AAPS J*. 2022. No. 25(1). P. 10. doi: 10.1208/s12248-022-00764-4
18. Quality Control of Widely Used Therapeutic Recombinant Proteins by a Novel Real-Time PCR Approach / B. Mamnoon, T. Naserpour Farivar, A. R. Kamyab et al. // *Iran Biomed J*. 2016. No. 20 (1). P. 56-62. doi: 10.7508/ibj.2016.01.008
19. Tuttle A. R., Trahan N. D., Son M. S. Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains // *Curr Protoc*. 2021. No. 1(1). P. e20. doi: 10.1002/cpz1.20
20. Mori H., Kataoka M., Yang X. Past, Present, and Future of Genome Modification in *Escherichia coli* // *Microorganisms*. 2022. No. 10(9). P. 1835. doi: 10.3390/microorganisms10091835

References

1. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications / A. Bhatwa, W. Wang, Y.I. Hassan et al. // *Front Bioeng Biotechnol*. 2021. No. 9. P. 630551. doi: 10.3389/fbioe.2021.630551
2. Testing plasmid stability of *Escherichia coli* using the Continuously Operated Shaken BIOreactor System / M. Sieben, G. Steinhorn, C. Müller et al. // *Biotechnol Prog*. 2016. No. 32(6). P.1418-1425. doi: 10.1002/btpr.2341.
3. Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli* / M. Popov, S. Petrov, G. Nacheva et al. // *BMC Biotechnol*. 2011. No.11 (18). doi:10.1186/1472-6750-11-18

4. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products (2001). Biotechnology Working Party, Committee for Proprietary Medicinal Product, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicinal Products for Human Use, EU. CPMP/BWP/1143/00
5. 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.* 1997. No. 20(3). P. 214-43. doi: 10.1097/00002371-199705000-00007
6. Molecular biological methods of quality control of biological medicinal products substances obtained using recombinant DNA technology / E. D. Myts, N. V. Chertova, E. V. Elbert et al. // *Biologics. Prevention, diagnosis, and treatment.* 2018. No. 18 (2). P. 75-80.
7. Quantitative detection of residual *E. coli* host cell DNA by real-time PCR / D. H. Lee, J. E. Bae, J. H. Lee et al. // *J Microbiol Biotechnol.* 2010. No. 20 (10). P. 1463-70. doi: 10.4014/jmb.1004.04035
8. Design of an antigenic composition based on a fragment of glycoprotein E2 of the classical swine fever virus / A. G. Galeeva, K. V. Usoltsev, N. I. Hammadov et al. // *Veterinarian.* 2024. No. 1. P. 28-33. doi: 10.33632/1998-698X_2024_1_28
9. Detection of residual *E. coli* host cell DNA by 23S ribosomal RNA gene-targeted quantitative polymerase chain reactions / D. Li, Q. Zhang, G. Liu et al. // *J Pharm Biomed Anal.* 2021. No. 198. P. 114000. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114000.
10. Elshin N. D. Determination of residual DNA of *E. Coli* and CHO producing cells in substances of recombinant proteins by the qPCR method. *Prevention, diagnosis, and treatment.* 2016. Vol. 16. No. 4. P. 245-252.
11. Kalko G. V., Musina E. R. The use of amplicon melting curves in assessing the suitability of European Spruce nSSR loci for multiplexing // *Proceedings of the St. Petersburg Scientific Research Institute of Forestry.* 2020. No. 1. P. 16-31. doi: 10.21178/2079-6080.2020.1.16
12. Belov D. A., Belov Yu. V., Manoilov V. V. Data processing methods for melting polymerase chain reaction products in real time // *Scientific instrumentation.* 2016. No. 3. P. 10-14.
13. Development and Validation of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of Residual CHO Host Cell DNA and Optimization of Sample Pretreatment Method in Biopharmaceutical Products / W. Zheng, L. Jiang, Q. Lei et al. // *Biol Proced Online.* 2019. No. 21 (17). doi: 10.1186/s12575-019-0105-1
14. Semi-quantitative determination of DNA in recombinant DNA preparations by PCR / A. N. Alexandrov, Yu. S. Skoblov, M. Yu. Skoblov et al. // *Bioorganic chemistry.* 2005. Vol. 31. No. 1. P. 73-76.
15. Establishment and evaluation of detection methods for process-specific residual host cell protein and residual host cell DNA in biological preparation / Y. Tian, X. Wang, D. Shao et al. // *Cell biochemistry and function.* 2024. Vol. 42, No. 2. P. e3986. doi: 10.1002/cbf.3986
16. Direct quantitative detection of host cell residual DNA in recombinant Filgrastim by qPCR / A. Gholizadeh-Hashjin, N. Abedi, H. R. Heidari, et al. // *Analytical Biochemistry.* 2021. Vol. 629. P. 114296. doi: 10.1016/j.ab.2021.114296.
17. Overcoming Biopharmaceutical Interferents for Quantitation of Host Cell DNA Using an Automated, High-Throughput Methodology / M. L. Lauro, A. M. Bowman, J. P. Smith et al. // *AAPS J.* 2022. No. 25(1). P. 10. doi: 10.1208/s12248-022-00764-4
18. Quality Control of Widely Used Therapeutic Recombinant Proteins by a Novel Real-Time PCR Approach / B. Mamnoon, T. Naserpour Farivar, A. R. Kamyab et al. // *Iran Biomed J.* 2016. No. 20 (1). P. 56-62. doi: 10.7508/ibj.2016.01.008
19. Tuttle A. R., Trahan N. D., Son M. S. Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains // *Curr Protoc.* 2021. No. 1(1). P. e20. doi: 10.1002/cpz1.20
20. Mori H., Kataoka M., Yang X. Past, Present, and Future of Genome Modification in *Escherichia coli* // *Microorganisms.* 2022. No. 10(9). P. 1835. doi: 10.3390/microorganisms10091835