ว กรมวิทย พ 2557; 56 (2) : 61-74

การตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจาก host cell ในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

รัษฎาภรณ์ คงเมือง และบุญฑริกา บุญญาภิวัฒน์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ในการผลิต recombinant protein เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคสำหรับมนุษย์ได้มีการนำ *Escherichia coli* K-12 มาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านเป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญชนิดหนึ่งที่จะต้องถูกกำจัดออกไปในระหว่างขั้นตอนการผลิต ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านในวัตถุดิบตัวยาสำคัญ วิธีการที่ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านควรเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว จำเพาะ และมีความไว การศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อใช้ตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์และยังได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ด้วย ผลการทดสอบพบว่าวิธี PCR ที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์นี้มีขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และความคงทนเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการทดสอบความถูกต้องของอาเซียน และสามารถดำเนินการทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง การทำปฏิกิริยา PCR และการตรวจวิเคราะห์ผลแล้วเสร็จภายใน 1 วัน วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอินซูลินของมนุษย์ได้

Accepted for publication, 13 February 2013

บทนำ

อินซูลินของมนุษย์ (human insulin) จัดเป็นยารักษาโรคชนิดผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnological product) หรือชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceutical product) ยากลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตที่นำมาปรับปรุงดัดแปลงจนได้สารที่เป็นประโยชน์ในการรักษาโรค อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมและการสะสมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เดิมอินซูลินที่ใช้ทางยาได้มาจากการสกัดตับอ่อนของหมูหรือวัวเพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่เนื่องจากอินซูลินของสัตว์มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างจากอินซูลินของมนุษย์ทำให้ผู้ป่วยบางรายเกิดการแพ้ยาจึงมีความพยายามคิดค้นวิธีการผลิตอินซูลินของมนุษย์มาใช้ในการรักษาทดแทน เริ่มจากดัดแปลงโครงสร้างอินซูลินของสัตว์ด้วยเอนไซม์ และต่อมามีการพัฒนาเทคโนโลยี Recombinant-DNA (rDNA) ทำให้สามารถผลิตยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจง ลดอาการแพ้ ได้ผลผลิตปริมาณสูงและต้นทุนการผลิตต่ำ ด้วยเหตุนี้เทคโนโลยี rDNA จึงเป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคชนิดชีวเภสัชภัณฑ์อย่างแพร่หลาย [2] ซึ่งโดยเทคโนโลยีนี้อินซูลินสามารถผลิตจากเซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* รวมทั้งแบคทีเรีย *E. coli*

E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีการนำมาใช้อย่างมากในงานด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อใช้ผลิตโปรตีนโดยเฉพาะสายพันธุ์ K-12 เนื่องจากมีข้อดีดังนี้ คือ มีการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาและทางพันธุศาสตร์มาแล้วอย่างละเอียดสามารถดัดแปลงด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้ง่าย จึงมีการพัฒนาสายพันธุ์อยู่สม่ำเสมอเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการใช้ตามวัตถุประสงค์ของงาน และประการสำคัญ คือ เชื้อ *E. coli* K-12 ไม่ก่อโรคในคน สัตว์และพืช [3, 4] หลักการผลิตอินซูลินของมนุษย์ด้วยเทคโนโลยี rDNA ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนของยีนที่แปลรหัสเป็นอินซูลินของมนุษย์ตัดต่อเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ (vector) แล้วนำผ่านดีเอ็นเอพาหะนั้นเข้าไปในเชื้อ *E. coli* K-12 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อนำเชื้อ *E. coli* K-12 ที่มีดีเอ็นเอพาหะซึ่งมียีนของอินซูลินของมนุษย์แทรกอยู่ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในสภาวะที่เหมาะสม เชื้อ *E. coli* K-12 จะสามารถผลิตอินซูลินของมนุษย์ออกมาได้ในปริมาณมาก จากนั้นต้องผ่านกระบวนการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกเสียก่อน วัตถุดิบอินซูลินของมนุษย์ที่ได้จะถูกนำไปใช้ผลิตเป็นยาสำเร็จรูปในระดับอุตสาหกรรมต่อไป จะเห็นได้ว่าการผลิตอินซูลินของมนุษย์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพต้องผ่านกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวด ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่เหลืออยู่ (residual host cell DNA) เป็นสารปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตต้องมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนไว้ในข้อกำหนดเฉพาะมาตรฐานของวัตถุดิบตัวยาสำคัญด้วย [5] อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานเฉพาะของตัวยาปริมาณการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (source of the residual) และวิธีการบริหารยา (route of administration) โดย U. S.Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration (US FDA) และ The European Agency of the Evaluation of Medicinal Products (EMEA) ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านไม่เกิน 100 pg/mg [6, 7] ขณะที่ World Health Organization (WHO) กำหนดไว้ไม่เกิน 10 ng/mg [8] วิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพจึงต้องเป็นวิธีที่มีความไวสูง เพื่อสามารถตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนที่น้อยมากได้ ต้องสามารถตรวจปริมาณดีเอ็นเอได้ที่ความเข้มข้นต่ำถึง 10 pg/mg [9] นอกจากนี้ต้องเป็นวิธีที่จำเพาะและสะดวกรวดเร็ว เทคนิคหลักที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านปัจจุบันมีอยู่ 4 เทคนิค ได้แก่ DNA hybridization, DNA-binding protein-based residual DNA assay (Threshold assay), Polymerase Chain Reaction (PCR) และ PicoGreen analysis [10] การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตยาอินซูลินของมนุษย์ โดยการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12

ที่สนใจ (gene marker) ในหลอดทดลอง แล้วตรวจวิเคราะห์ผลด้วยการทำ gel electrophoresis วิธี PCR ที่ได้พัฒนานี้ได้ทำการประเมินความถูกต้องของวิธีในหัวข้อ ดังนี้ คือ ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (detection limit), ความจำเพาะ (specificity), ความถูกต้อง (accuracy), ความแม่นยำ (precision) และความคงทน (robustness)

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

เชื้อ *E. coli* K-12 ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ส่วนเชื้อ *E. coli* ATCC 8739 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ได้จากกลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางชีววิทยา สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Tryptone (Difco, USA), Yeast extract (Difco, USA), Sodium chloride (Sigma-Aldrich, Switzerland), Nuclease free water (Amresco, USA), 10 x TBE buffer (Invitrogen, USA), Agarose gel (Promega, USA), Ethidium bromide (Sigma, Switzerland), SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA), Hydrochloric acid (Carlo Erba, France), Isopropanol (Carlo Erba, France), Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany), DNA Extractor Kit (Wako, Japan), Fast Start *Taq* DNA Polymerase kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

เครื่องมือ

Thermal Cycler (Biorad, USA), Dry Bath Incubator (Major Science, Taiwan), Power Supply (Biorad, USA), UV Transilluminator with digital camera (Spectronics Corporation, USA), Microcentrifuge (Labnet, USA), Agarose Gel Electrophoresis (Biorad, USA), Weighing (Mettler, USA), UV Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)

การเตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* K-12 ใน Luria Bertani (LB) medium ประกอบด้วย tryptone 1%, yeast extract 0.5% และ sodium chloride 1%ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 คืน หลังจากนั้นสกัด genomic DNA ด้วย Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany) แล้วนำ genomic DNA ที่ได้วัดปริมาณความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer

การเตรียมตัวอย่างยาอินซูลินของมนุษย์ด้วย DNA Extractor Kit (Wako, Japan)

ละลายผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ด้วย 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วสกัดดีเอ็นเอในยาด้วย DNA Extractor Kit เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

การตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี PCR

PCR primers ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ O-antigen gene *(rfb)* cluster[11] ประกอบด้วย K12IS-L 5'-CGCGATGGAAGATGCTCTGTA-3' (nt293-313 on *IS5*) และ K12-R 5'-ATCCTGCGCACCAATCAACAA-3' (nt 508-488 on *orf264*) เตรียม PCR mixture ปริมาตร 50 µl

ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วยคือ 1 × reaction buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM KCl, 5mM $(NH_4)_2SO_4$, pH 8.3), deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ชนิดละ 200 µM, $MgCl_2$ 1.5 mM และ *Taq* DNA Polymerase 2.5 U ส่วนประกอบเหล่านี้เป็นของ Fast Start *Taq* DNA Polymerase kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) primer K12IS-L และ K12-R อย่างละ 0.2 µM DNA template และ nuclease free water จากนั้นกำหนดโปรแกรมเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอดังนี้ คือ 1 รอบที่ 95.0˚C นาน 4 นาที และ 30 รอบที่ 94.0˚C นาน 30 วินาที, 60.0˚C นาน 30 วินาที, 72.0˚C นาน 1.5 นาที ตามด้วย 1 รอบที่ 72.0˚C นาน 2 นาที แล้วทำให้เย็นที่ 4.0˚C ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกครั้งต้องมี positive control ซึ่งเป็น genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ปริมาณ 100 pg และ negative control ซึ่งเป็น nuclease free water เพื่อเป็นการประกันคุณภาพการทดสอบ หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR จะได้ PCR product ขนาด 970 base pairs (bp) นำ PCR product ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.0% ใน 1 × TBE buffer ความต้านทานไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดของแถบ PCR product ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder (Promega, USA) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 1,500, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp

การประเมินความถูกต้องของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR

การทดสอบความถูกต้องของวิธีต้องเติม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ที่เตรียมขึ้นเองลงไปในยาอินซูลินของมนุษย์ เพราะตัวอย่างของยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบว่ามีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้าน ยาอินซูลินของมนุษย์ที่ใช้ในการทดสอบผลิตมาจากเซลล์เจ้าบ้านชนิด *E. coli* K-12 ได้มาจากผู้ผลิตจำนวน 2 ราย คือ A และ B ยาจากผู้ผลิต A ใช้ทดสอบหัวข้อ ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และความคงทน ส่วนยาจากผู้ผลิต B ใช้ทดสอบหัวข้อความจำเพาะเท่านั้น

ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Detection Limit)

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ให้มีความเข้มข้น 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl และ 1 pg/µl เติมดีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

ความจำเพาะ (Specificity) แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

- ผลของสายพันธุ์เชื้อและแบคทีเรียชนิดอื่น

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ความเข้มข้น 100 pg/µl เติมดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 1 µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

- ผลของส่วนประกอบอื่นที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต 2 ราย (A และ B) 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วดำเนินการสกัดดีเอ็นเอที่อยู่ในยาและ 0.1 N HCl ต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

ความถูกต้อง (Accuracy)

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl จำนวน 3 ชุดแล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบผลการทดสอบกับ genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/µl ที่นำมาทำ PCR จำนวน 3 ชุดเช่นกัน

ความแม่นยำ (Precision) แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

- Repeatability

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl จำนวน 5 ชุดแล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ภายในวันเดียวกันมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

- Intermediate precision

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/µl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR แล้วดำเนินการซ้ำตั้งแต่แรกโดยวันที่ทดสอบต่างกัน

ความคงทน (Robustness) ดำเนินการทดสอบ 2 สภาวะ

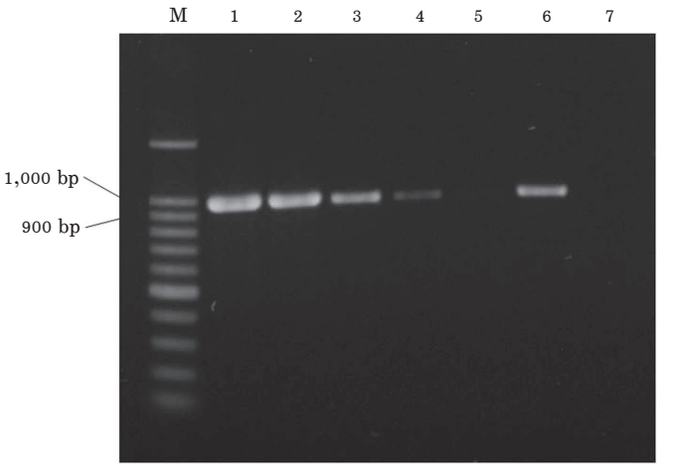
- เตรียมตัวอย่างเหมือนหัวข้อการหาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยเปลี่ยนแปลงโปรแกรมเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR จาก 30 เป็น 35 รอบ
- หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำ PCR product ไปทำ gel electrophoresis เปลี่ยนชนิดสีย้อมดีเอ็นเอจาก SYBR® Safe DNA Gel Stain เป็น ethidium bromide

ผล

การประเมินความถูกต้องของการตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR

ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

จากการตรวจหาการปนเปื้อนของ DNA จาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR พบว่าผงยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ปนเปื้อนความเข้มข้น 10 ng/mg, 1 ng/mg, 100 pg/mg และ 10 pg/mg ให้ผลเป็นบวกโดยตรวจพบแถบ PCR product ขนาด 970bp เช่นเดียวกับ positive control ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเห็นได้ชัดเจนและมีความแตกต่างกันตามปริมาณของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน สำหรับผงยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ปนเปื้อนความเข้มข้น 1 pg/mg ให้ผลเป็นบวกเช่นเดียวกัน แต่แถบของ PCR product ที่เกิดขึ้นเห็นไม่ชัดเจน ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ คือ ไม่ปรากฏว่ามีแถบของดีเอ็นเอใด ๆ เกิดขึ้น (ภาพที่ 1) ด้วยวิธี PCR ที่พัฒนาในครั้งนี้สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ความเข้มข้นต่ำที่สุด 10 pg/mg (ภาพที่ 1)

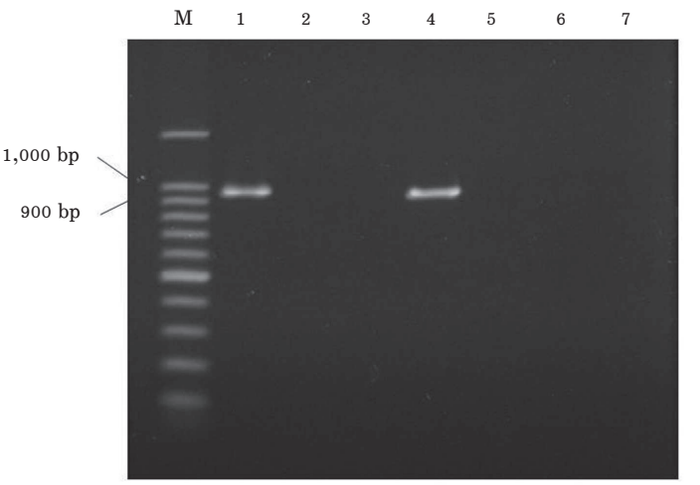


ภาพที่ 1 ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

Lane M : 100 bp DNA ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 ng/mg
Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 ng/mg
Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 100 pg/mg
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 pg/mg
Lane 5 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 pg/mg
Lane 6 : Positive control
Lane 7 : Negative control

ความจำเพาะ

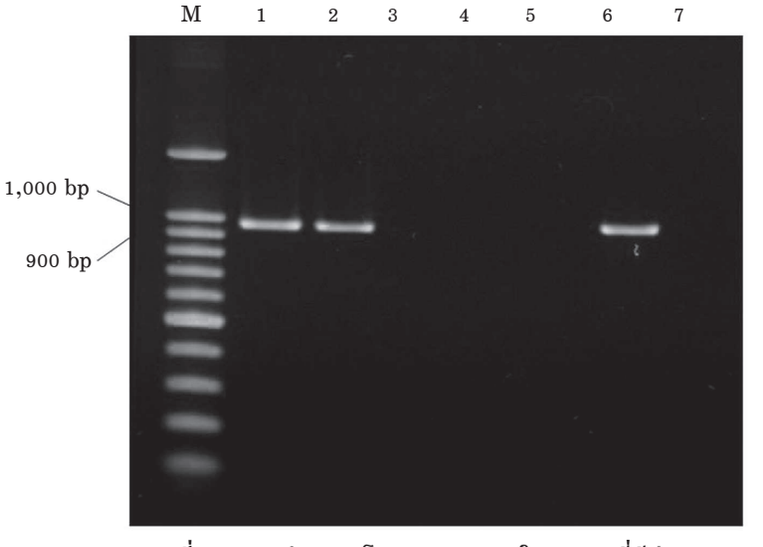
จากการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* K-12, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR พบว่าเฉพาะผงยาที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก พบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียว positive control ส่วนผงยาที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ จาก *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ให้ผลเป็นลบเช่นเดียวกับ negative control (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ความจำเพาะ โดยการทดสอบกับแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12
Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* ATCC 8739
Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *S.aureus* ATCC 6538
Lane 4 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 (Positive control)
Lane 5 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *E. coli* ATCC 8739
Lane6 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 6538
Lane 7 : Negative control

ส่วนการทดสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต 2 ราย พบว่าผลทั้งหมดเป็นบวก ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียวกับ positive control ส่วนผลการทดสอบ 0.1 N HCl ซึ่งเป็น diluent ช่วยละลายผงยาพบว่าเป็นลบเช่นเดียวกับ negative control (ภาพที่ 3)

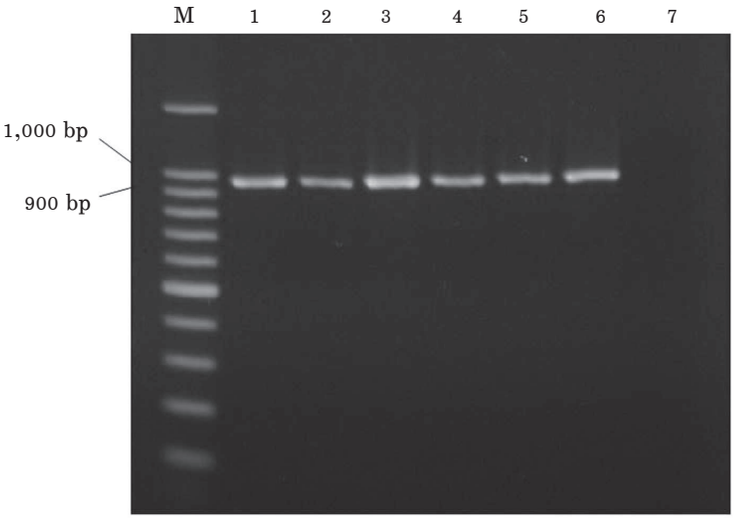


ภาพที่ 3 ความจำเพาะ โดยการทดสอบในสภาวะที่มีส่วนประกอบในตัวอย่างที่แตกต่างกัน

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต A ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA
Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต B ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA
Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต A
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต B
Lane 5 : PCR product ของ 0.1 N HCl
Lane 6 : Positive control
Lane 7 : Negative control

ความถูกต้อง

การตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ทั้ง 3 ชุดให้ผลบวกเช่นเดียวกับ positive control ทั้ง 3 ชุด โดยตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ตรวจไม่พบแถบของดีเอ็นเอใด ๆ (ภาพที่ 4)

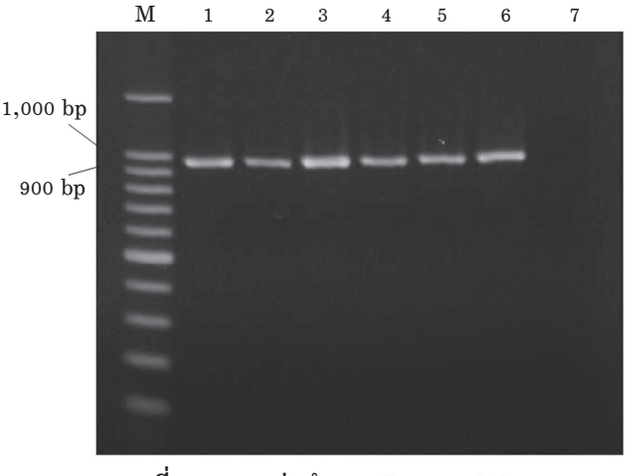


ภาพที่ 4 ความถูกต้อง

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1, 2 และ 3: PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA
Lane 4, 5 และ 6: PCR product ของ host cell DNA (Positive control)
Lane 7 : Negative control

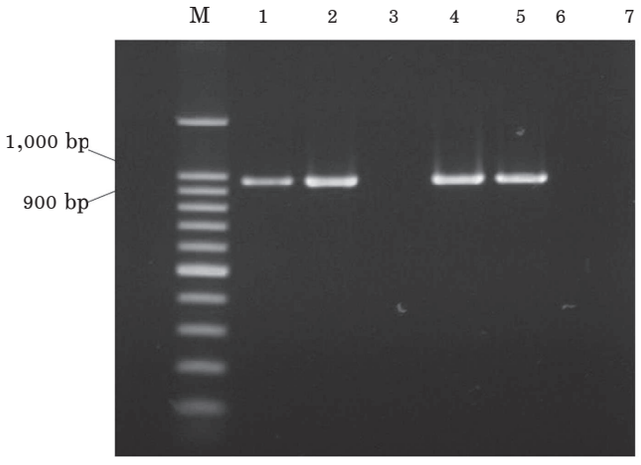
ความแม่นยำ

การตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์โดยการทำซ้ำภายในวันเดียวกัน ทั้งหมด 5 ชุด ให้ผลเป็นบวกเหมือนกันทั้งหมด ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียวกับ positive control ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ (ภาพที่ 5) ส่วนการตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์โดยการทดสอบต่างวันพบว่าให้ผลเหมือนกัน คือ ยาที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 และ positive control ให้ผลบวก ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ความแม่นยำแบบ Repeatability

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1, 2, 3, 4 และ 5: PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ที่ทำการทดสอบในวันเดียวกัน
Lane 6 : Positive control
Lane 7 : Negative control

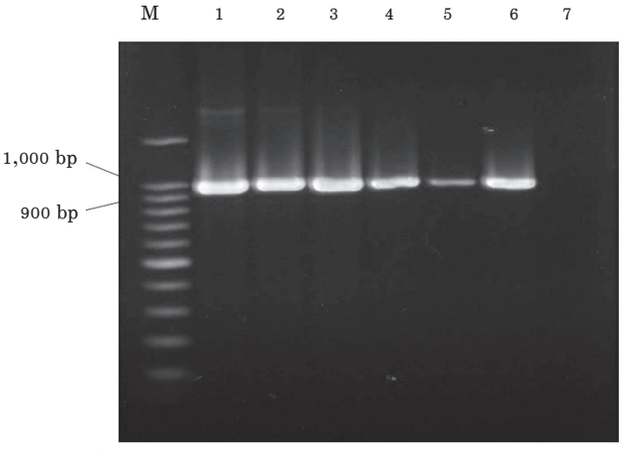


ภาพที่ 6 ความแม่นยำแบบ Intermediate precision

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ทดสอบวันที่ 1
Lane 2 : Positive control ทดสอบวันที่ 1
Lane 3 : Negative control ทดสอบวันที่ 1
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ทดสอบวันที่ 2
Lane 5 : Positive control ทดสอบวันที่ 2
Lane 6 : Negative control ทดสอบวันที่ 2

ความคงทน

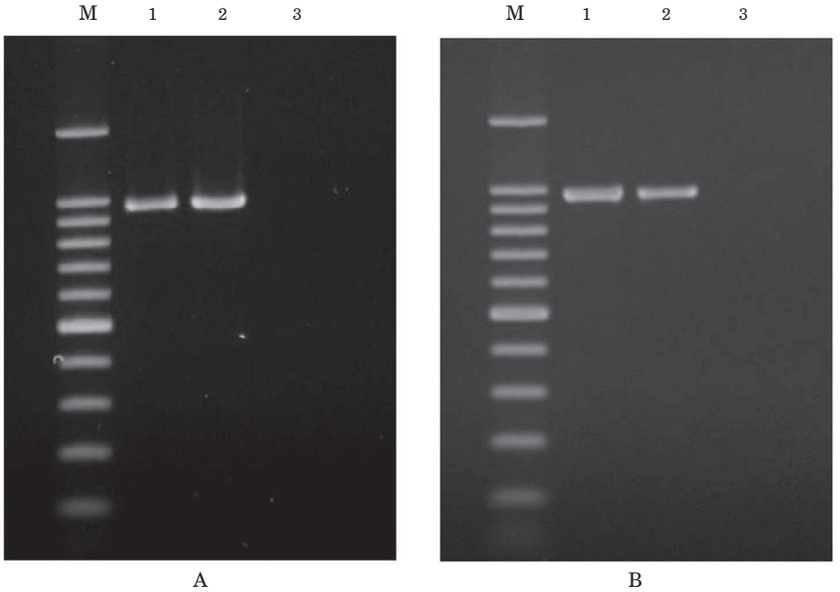
การเพิ่มจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR จาก 30 รอบ เป็น 35 รอบ สามารถตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ปริมาณต่ำสุดได้ถึง 1 pg/mg ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าการตรวจโดยการทำปฏิกิริยา 30 รอบ พบ PCR product ขนาดเท่ากับ positive control คือ 970 bp แถบ PCR product ของการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอปริมาณ 1 pg/mg เห็นได้ชัดเจน ส่วนแถบ PCR product ของการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอปริมาณอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจะหนามากกว่าการทำปฏิกิริยา PCR 30 รอบ ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ความคงทนของการทำปฏิกิริยา PCR 35 รอบ

Lane M : 100 bp DNA ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 ng/mg
Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 ng/mg
Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 100 pg/mg
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 pg/mg
Lane 5 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 pg/mg
Lane 6 : Positive control
Lane 7 : Negative control

การเปลี่ยนชนิดสีย้อมเพื่อตรวจสอบ PCR product ที่ได้ พบว่าการใช้สีย้อมทั้ง SYBR® Safe DNA Gel Stain และ ethidium bromide ให้ผลเหมือนกัน คือ ยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 และ positive control พบแถบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ สิ่งที่แตกต่างกันคือสีที่เกิดขึ้น สีของแถบ PCR product ที่ย้อมด้วย SYBR® Safe DNA Gel Stain จะติดสีเขียว ส่วนสีของแถบ PCR product ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จะติดสีส้ม (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ความคงทนของสีย้อม DNA ระหว่าง SYBR®Safe DNA Gel Stain (A) และ ethidium bromide (B)

Lane M : 100 bp ladder
Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนของ host cell DNA
Lane 2 : Positive control
Lane 3 : Negative control

วิจารณ์

ในกระบวนการผลิตยาโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพต้องมีการนำเซลล์เจ้าบ้านมาเพาะเลี้ยงหรือหมัก เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนที่ต้องการในปริมาณที่เพียงพอ ก่อนที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกไป ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านทั้งที่มาจาก prokaryote, eukaryote, cell culture และเซลล์อื่น ๆ ที่มีการปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์ยาอาจทำให้เกิดมะเร็งหรือเกิดอาการข้างเคียงได้ ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานว่าดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจะส่งผลเสียต่อมนุษย์ แต่มีการรายงานตรวจพบผลเสียดังกล่าวแล้วในสัตว์ทดลอง การปนเปื้อนดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบ การตรวจหาดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่ปนเปื้อนในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR ครั้งนี้เป็นการทดสอบแบบ limit test โดยกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ไว้ไม่เกิน 100 pg/mg เกณฑ์กำหนดมาตรฐานนี้คณะผู้วิจัยเลือกจากปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอตามที่ US FDA และ EMEA ได้แนะนำไว้ ซึ่งเกณฑ์นี้มีความเข้มงวดกว่าของ WHO

การเตรียมตัวอย่างยาอินซูลินของมนุษย์เพื่อสกัดดีเอ็นเอก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วย commercial kit (DNA Extractor kit, Wako Chemicals) อาศัยหลักการทำงานของ chaotrope (sodium iodide) และ detergent (sodium N-lauroyl sarcosinate) ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากยา จากนั้นดีเอ็นเอจะเกิดการตกตะกอนร่วมกับ glycogen ที่อยู่ใน isopropanol เนื่องจาก commercial kit ชนิดนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอปริมาณน้อย ๆ ได้ด้วยค่า recovery สูงถึง 80 - 120%[12] จึงเหมาะสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพมากกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol และ chloroform ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปในงานอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่มีค่า recovery ต่ำ[9]

วิธี PCR ที่พัฒนาครั้งนี้มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านเนื่องจาก primer คู่ที่ใช้เพิ่มขยายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR นี้ออกแบบมาจากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* K-12 โดย primer คู่นี้ได้ถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ *E. coli* K-12 เพื่อประเมินความปลอดภัยในห้องปฏิบัติทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์[13] การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* ATCC 8739 ซึ่งเป็นตัวแทนของ *E. coli* สายพันธุ์อื่นและ *S. aureus* ATCC 6538 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแกรมบวกไม่สามารถเพิ่มขยายโดย primer คู่นี้ได้ ถึงแม้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวสูงถึง 100 ng ก็ยังให้ผลลบเช่นเดิมเป็นการยืนยันว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูงขณะที่วิธีอื่นที่ใช้ primer ที่ออกแบบมาจาก 16S ribosomal DNA ของ *E. coli* ไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* K-12 เพราะ *E. coli* ทุกสายพันธุ์จะสามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้[14]

ปฏิกิริยา PCR นี้เป็นปฏิกิริยาแบบ hot start PCR ซึ่งจะมีความแตกต่างจาก PCR แบบธรรมดามีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเกิด PCR product ชนิดไม่จำเพาะ ซึ่งเกิดจากการเกาะของ primer เข้ากับสายแม่พิมพ์แบบไม่จำเพาะในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา ดังนั้นการเลือกใช้ Fast start *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็น DNA polymerase ที่มีการเติม blocking group ที่ไม่ทนความร้อนจับอยู่จะทำให้ DNA polymerase ไม่สามารถทำงานได้ในช่วงแรก จนกว่าจะมีการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองสูงไปที่ 95 ˚C จนทำให้ blocking group ถูกขจัดออกไปแล้ว DNA polymerase จึงจะสามารถทำงานได้ ด้วยเหตุนี้ปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจะมีความจำเพาะและประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นไปอีก[15]

หลังจากทำปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้นแล้วนำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยการทำ gel electrophoresis ในการศึกษานี้ใช้สีย้อม SYBR®Safe DNA gel แทน ethidium bromide เนื่องจากสีย้อม SYBR® Safe DNA gel เป็นสีชนิด fluorescent dye มีความปลอดภัยและความไวสูงกว่า ethidium bromide[16]

ตามแนวทางการทดสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบสารเจือปนในเชิงหาขีดจำกัด (limit test) ของอาเซียนได้กำหนดลักษณะเฉพาะเพียง 2 ลักษณะ คือ ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์และความจำเพาะ[1] การทดสอบ

ครั้งนี้ได้ดำเนินการทดสอบลักษณะเฉพาะเพิ่มเติมในหัวข้อ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนด้วยเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้จริง วิธีนี้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ที่ปนเปื้อนในยาอินซูลินของมนุษย์ที่ผลิตจากเซลล์ *E. coli* K-12 ได้ปริมาณต่ำสุดถึง 10 pg/mg[9] มีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนเป็นไปตามมาตรฐานของอาเซียน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ซึ่งเป็นวิธี PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น และปริมาณดีเอ็นเอใน PCR product ได้ ปัจจุบันได้มีเทคโนโลยี real-time PCR ซึ่งจะสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีทางชีวภาพแล้ว[17, 18] เทคนิค real-time PCR ต้องอาศัยเครื่อง thermal cycler พิเศษที่ถูกออกแบบมาเพื่อรองรับการทำงานนี้โดยเฉพาะ ในอนาคตจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะพัฒนาต่อยอดสำหรับตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีทางชีวภาพด้วย real-time PCR ได้ต่อไป

สรุป

ได้ประเมินความถูกต้องของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* K-12 พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของอาเซียน อีกทั้งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนดำเนินการง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาดำเนินการทดสอบแล้วเสร็จภายใน 1 วัน จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ที่ผลิตจากเซลล์ดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* K-12 และขอขอบคุณบริษัท Eli Lilly (ประเทศไทย) จำกัด และบริษัท Sanofi-Aventis Deutschland (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ยาอินซูลินของมนุษย์ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ผู้รวบรวม. ASEAN analytical validation guideline. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 2549.
2. Pickup J. Human insulin. Br Med J 1986; 292(6514): 155-7.
3. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Service. Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2013; [cited 2013 Jan 10]; [132 screens]. Available from: URL: http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guideline/NIH_Guidelines.htm
4. U.S. Environmental Protection Agency. *Escherichia coli* K-12 derivatives final risk assessment. 1997; [cited 2013 Jul 9]; [11 screens]. Available from: URL: http://epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra004.htm
5. International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Specification: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. Geneva: ICH; 1999.

6. U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. 1997; [cited 2013 Jan 20]; [50 screens]. Available from: URL: http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf
7. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. 2001; [cited 2013 Jan 20]; [5 screens]. Available from: URL: http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/bwp114300en.pdf
8. World Health Organization. Acceptability of cell substrates for production of biologicals. 1987; [cited 2013 Jan 20]; [32 screens]. Available from: URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_747.pdf
9. U.S. Pharmacopeial Convention. General Chapter<1130> Nucleic acid-based techniques-approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing). 2012; [cited 2013 Mar 15]; [5 screens]. Available from: URL: http://usp35.infostar.com.cn/uspnf/pub/data/v35300/usp35nf30s0_c1130.html
10. Mehta S, Keer JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods. Bio Process Technical. [serial online]. 2007 oct; [cited 2013 Jan 30]; [8 screens]. Available From: URL: http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00076/070509ar06_76445a.pdf
11. Kuhnert P, Nicolet J, Frey J. Rapid and accurate identification of Escherichia coli K-12 strains. Appl Environ Microbiol 1995; 61(11): 4135-9.
12. Cai H, Gu X, Scanlan MS, Lively CR. Development of a quantitative PCR assay for residual mouse DNA and comparison of four sample purification methods for DNA isolation. J Pharm Biomed Anal 2011; 55(1): 71-7.
13. Kuhnert P, Frey J. Tools for safety assessment identification and monitoring of Escherichia coli K-12 safety strains. 1996; [cited 2012 dec 25]; [4 screens]. Available from: URL: http://www.bats.ch/bats/publikationen/1996-1_e.coli/96-1_e-coli_k12.php
14. Goldman M, Geier M, Zehnder D, Wang A, Henriksson T. Use of polymerase chain reaction for detecting DNA contaminants in pharmaceutical recombinant. Clin Chem 1991; 37(9): 1523-5.
15. Roche Applied Science. FastStart Taq DNA polymerase, dNTPack manual. 2011; [cited 2013 May 26]; [19 screens]. Available from: URL: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04738314001_en_06.pdf
16. Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). Mutat Res 1999; 439(1): 37-47.
17. Skoblov MY, Shibanova ED, Kovaleva EV, Bairamashvilli DI, Skoblov YS, Miroshnikov AI. DNA assay for recombinant pharmaceutical substances using the real-time PCR technique. Russ J Bioorg Chem 2010; 36(1): 104-8.
18. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(10): 1463-70.

Detection of Residual Host Cell DNA in Biotechnological Drugs

Rassadaphorn Kongmoung and Boontarika Boonyapiwat

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi, 11000, Thailand.

ABSTRACT *Escherichia coli* K-12 strains have been frequently used as host strain for the manufacture of recombinant proteins intended for human therapeutic use. Residual host cell DNA is an important impurity that should be eliminated during the downstream process. Therefore, the amount of residual host cell DNA in the drug substance is limited. The analytical method for detection of host cell DNA in biotechnological drug should be rapid, specific and sensitive. In this study, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was developed and validated to detect residual *E. coli* K-12 host cell DNA in human insulin. The results demonstrated that detection limit, specificity, accuracy, precision and robustness were acceptable to the ASEAN Analytical Guideline. All of steps including the sample preparation, the PCR reaction and the sample analysis can be performed within 1 day. It is concluded that the PCR method is suitable for detection of residual *E. coli* K-12 host cell DNA in the human insulin substance.

Keyword : residual host cell DNA, *E. coli* K-12, PCR, human insulin