

E.coli DNA 残留片段分析试剂盒（PCR-荧光探针法）

性能验证报告

编制日期：2024 年 8 月 7 日

一、简介

此份报告数据为北京阅微基因技术股份有限公司 *E.coli* DNA 残留片段分析试剂盒的性能验证结果总结。本数据仅供客户参考，本公司还可提供详细版验证报告，如使用详细版报告则只需进行方法适用性验证。

二、验证目的

本实验依据《中国药典》等对使用 qPCR 荧光探针法检测宿主 *E.coli* 残留的不同大小的 DNA 片段残留量进行专属性、线性、范围、定量限、准确性、精密度、耐用性等性能验证。

三、参考依据

《中国药典》2020 年版 3407 外源性 DNA 残留量测定法

《生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则》2005 版

《分析程序的验证》ICH Q2 (R1)

四、实验材料

4.1 主要仪器

仪器	制造商	型号
qPCR 扩增仪	赛默飞	ABI 7500
qPCR 扩增仪	赛默飞	ABI Q6
qPCR 扩增仪	杭州博日	FQD-96A

4.2 主要试剂

试剂	厂家	规格
<i>E.coli</i> DNA 残留片段分析试剂盒 (PCR-荧光探针法)	阅微基因	3*100 反应/盒

五、验证内容及结果

5.1 专属性

生产常用的工程细胞 CHO、Human、MDCK、NS1、Vero 和 Yeast 分别加入 3000pg 的 DNA 和 RNA 量，对检测体系均无干扰。

表 1 物种特异性检测结果

干扰物种	检测均值(pg/μL)			可接受标准	结果
	103bp	203bp	343bp		
<i>E.coli</i> RNA	5.7×10^{-4}	2.4×10^{-4}	2.5×10^{-4}	干扰 DNA/RNA 检测均值小于体系检测限的浓度，则判定为无干扰。	无干扰
CHO DNA	N/A	N/A	N/A		无干扰
Human DNA	1.6×10^{-3}	3.5×10^{-3}	2.0×10^{-3}		无干扰
Human RNA	N/A	1.1×10^{-3}	N/A		无干扰
MDCK DNA	1.1×10^{-3}	N/A	N/A		无干扰
NS1 DNA	6.7×10^{-4}	N/A	N/A		无干扰
Vero DNA	1.3×10^{-3}	1.2×10^{-3}	N/A		无干扰
Yeast DNA	8.2×10^{-4}	4.7×10^{-4}	N/A		无干扰
Yeast RNA	N/A	4.4×10^{-4}	5.1×10^{-4}		无干扰

5.2 线性范围

103bp 检测体系线性范围为 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/μL，标准曲线斜率平均-3.283， R^2 为 0.998，扩增效率 101.64%；最高和最低浓度点相对偏差和 CV<30%，其余浓度点相对偏差和 CV<20%。

203bp 检测体系的线性范围 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/μL，标准曲线斜率平均-3.436， R^2 为 0.999，扩增效率 95.44%；最高和最低浓度点相对偏差和 CV<20%，其余浓度点相对偏差和 CV<20%。

343bp 检测体系的线性范围 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/μL，标准曲线斜率平均-3.44， R^2 为 1，扩增效率 95.29%。最高和最低浓度点相对偏差和 CV<30%，其余浓度点相对偏差和 CV<20%。

综上，各检测体系标准曲线浓度范围设定为 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/μL。

5.3 定量限

试剂盒各检测体系定量限均为 3×10^{-2} pg/μL。

表 2 定量限结果分析

检测片段	103bp	203bp	343bp

理论浓度 (pg/μL)	3 x 10 ⁻²	3x 10 ⁻²	3 x 10 ⁻²
检测浓度 (pg/μL)	2.75 x 10 ⁻²	2.4 x 10 ⁻²	2.7 x 10 ⁻²
检测 CV%	15.29	17.52	16.71
偏差%	8.47	20.16	10.02
可接受标准	103bp, 203bp, 343bp: CV 与偏差均<30%		
结果	合格	合格	合格

5.4 精密度

各检测体系内设置不同浓度的样本，每个浓度重复 10 次检测，CV 均符合要求。

表 3 精密度结果分析

检测片段	理论浓度 (pg /μL)	测得浓度 (pg /μL)	检测 CV%	检测值与理论值偏差%	可接受标准	结论
103	300	316.089	9.50	5.363	103bp, 203bp, 343bp 片段; CV%与偏差值均 <30%	合格
	3	3.085	6.07	2.833		合格
	0.03	0.026	19.07	13.333		合格
203	300	310.290	5.42	3.430		合格
	3	3.281	5.39	9.367		合格
	0.03	0.029	25.03	3.333		合格
343	300	313.515	2.63	4.505		合格
	3	3.202	3.64	6.733		合格
	0.03	0.026	17.20	13.333		合格

6. 耐用性

6.1 仪器适用性

试剂盒适用于但不限于以下仪器：ABI 7500、ABI QuantStudio™ 6（ABI Q6）、博日 Bioer 9600 FQD-96A。

表 4 仪器耐用性结果分析

制造商	赛默飞			赛默飞			博日		
机型	ABI 7500			ABI Q6			FQD-96A		
检测片段	103bp	203bp	343bp	103bp	203bp	343bp	103bp	203bp	343bp
曲线斜率	-3.527	-3.393	-3.516	-3.572	-3.533	-3.6	-3.56	-3.46	-3.73
扩增效率 (%)	92.111	97.121	92.511	90.523	91.894	90	90.81	94.4	85.33
理论浓度 (pg/ μ L)	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}	3×10^{-1}
测得浓度 (pg/ μ L)	3.35×10^{-1}	2.63×10^{-1}	3.47×10^{-1}	2.71×10^{-1}	2.44×10^{-1}	3.3×10^{-1}	3.6×10^{-1}	2.32×10^{-1}	2.37×10^{-1}
检测CV%	5.03	5.10	5.30	11.44	26.18	4.31	29.58	6.54	8.56
检测值与理论值偏差%	11.70	12.30	11.70	9.80	18.60	9.90	19.90	22.80	20.90
可接受标准	103bp, 203bp, 343bp: CV与偏差均<30%								
结论	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格

6.2 冻融稳定性

E.coli DNA 残留片段分析试剂盒反复冻融 5 次后, 试剂盒性能不受影响。

表 5 冻融稳定性分析结果

检测片段		103bp	203bp	343bp	结论
标曲参数	斜率	-3.283	-3.436	-3.44	合格
	R ²	0.998	0.999	1	合格
	扩增效率 (%)	101.64	95.44	95.29	合格
准确性	不同浓度样本检测 CV%均值	9.7	4.33	8.48	合格
	不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值	12.14	11.31	6.98	合格
可接受标准		1. 斜率-3.1~-3.8, R ² 大于 0.99, 扩增效率 90%~110%; 2. 103bp, 203bp, 343bp 片段: CV%与偏差值在 30%以内。			