

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 |
|-------------------------------------|------|------------|
| E.coli 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) | 3×10^{-2} | 3×10^{-2} | 3×10^{-2} |
| 检测浓度 (pg/μL) | 2.75×10^{-2} | 2.4×10^{-2} | 2.7×10^{-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。 | | | |