

Human 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 5 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 Human 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 Human 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
Human 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

➤ 检测能力

测试 293T、HEK293、MRC-5 和 HeLa 细胞基因组 DNA，针对上述 4 种人源细胞株，不同片段检测体系均能检出。

表 1 人不同细胞株检出能力

细胞株	加样浓度	检测均值		检测均值		检测均值	
	pg/μL	102bp	CV%	198bp	CV%	301bp	CV%
293T	450	489.33	2.639	412.91	0.984	358.74	1.632
HEK293	45	42.509	3.812	42.893	2.933	39.011	0.627
HeLa	10	10.483	4.414	9.52	2.575	7.794	3.726
MRC5	15	13.415	0.06	13.616	1.455	12.646	1.618

➤ 物种特异性

生产常用的工程细胞 CHO、*E.coli*、MDCK、NS1 和 Yeast 对检测体系均无干扰。Vero 细胞 DNA 对检测体系在 30pg/μL~300pg/μL 有轻微干扰：300 pg/μL 的 Vero DNA 检出均值为 0.52 pg/μL，约为真实量的 0.173%；30 pg/μL 的 Vero DNA 检出均值为 0.0563 pg/μL，约为真实量的 0.188%；其它浓度梯度的均无干扰。

表 2 物种特异性检测结果

干扰 DNA	实际浓度	检测均值 (pg/μL)			可接受标准	结果
	pg/μL	102bp	198bp	301bp		
CHO1	300	0.023	0.017	0.014	干扰 DNA 检测均值小于体系检测限的浓度，则判定为无干扰。	无干扰
CHO2	30	N/A	N/A	N/A		无干扰
CHO3	3	N/A	N/A	N/A		无干扰
CHO4	0.3	N/A	N/A	N/A		无干扰
CHO5	0.03	N/A	N/A	N/A		无干扰
<i>E.coli</i>	300	N/A	N/A	N/A		无干扰
MDCK	300	N/A	N/A	N/A		无干扰
NS1	300	N/A	N/A	N/A		无干扰
Vero1	300	0.682	0.847	0.031		有干扰
Vero2	30	0.064	0.095	0.01		有干扰
Vero3	3	0.021	0.015	0.011		无干扰

Vero4	0.3	N/A	N/A	N/A	无干扰
Vero5	0.03	N/A	N/A	N/A	无干扰
Yeast	300	N/A	N/A	N/A	无干扰

5.2 线性范围

102bp 检测体系线性范围为 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/ μ L，标准曲线斜率平均-3.358， R^2 为 0.999，扩增效率 98.537%；最高和最低浓度点相对偏差和 CV<10%，其余浓度点相对偏差和 CV<10%。

198bp 检测体系的线性范围 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/ μ L，标准曲线斜率平均-3.457， R^2 为 0.999，扩增效率 94.717%；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%。

301bp 检测体系的线性范围 3×10^{-2} - 3×10^2 pg/ μ L，标准曲线斜率平均-3.389， R^2 为 1，扩增效率 97.456%。最高和最低浓度点相对偏差和 CV<10%，其余浓度点相对偏差和 CV<10%。

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/ μ L。

5.3 定量限

试剂盒各检测体系定量限均为 3×10^{-2} pg/ μ L。

表 3 定量限结果分析

检测片段	102bp	198bp	301bp
理论浓度 (pg/ μ L)	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}
检测浓度 (pg/ μ L)	2.775×10^{-2}	2.727×10^{-2}	3.101×10^{-2}
检测 CV%	10.763	15.844	13.163
偏差%	7.515	9.095	3.368
可接受标准	102bp, 198bp, 301bp: CV 与偏差均<20%		
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 4 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
102bp	3×10^2	2.938×10^2	6.052	2.065	100bp, 200bp, 300bp片段: CV%与偏差值均<20%	合格
	3×10^1	2.984×10^1	2.098	0.546		合格
	3×10^0	2.996×10^0	3.745	0.132		合格
	3×10^{-1}	2.814×10^{-1}	4.19	6.215		合格
	3×10^{-2}	2.958×10^{-2}	9.032	1.399		合格
198bp	3×10^2	2.971×10^2	5.873	0.959		合格
	3×10^1	2.931×10^1	6.015	2.318		合格
	3×10^0	2.77×10^0	7.049	7.665		合格
	3×10^{-1}	2.538×10^{-1}	11.509	15.412		合格
	3×10^{-2}	2.814×10^{-2}	12.059	6.197		合格
301bp	3×10^2	3.104×10^2	4.852	3.465		合格
	3×10^1	3.048×10^1	3.223	1.604		合格
	3×10^0	2.917×10^0	3.454	2.753		合格
	3×10^{-1}	2.715×10^{-1}	6.091	9.49		合格
	3×10^{-2}	2.774×10^{-2}	13.033	7.526		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 5 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	102bp	198bp	301bp	102bp	198bp	301bp	102bp	198bp	301bp
曲线斜率	-3.363	-3.415	-3.368	-3.351	-3.461	-3.371	-3.38	-3.58	-3.37
R ²	0.999	0.999	1	0.998	1	0.999	1	0.999	0.998
扩增效率 (%)	98.33	96.269	98.113	98.801	94.518	97.976	97.44	90.29	98.11
理论浓度 (pg/μL)	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}
测得浓度 (pg/μL)	2.973×10^{-2}	2.667×10^{-2}	2.895×10^{-2}	3.140×10^{-2}	3.165×10^{-2}	2.910×10^{-2}	2.670×10^{-2}	2.873×10^{-2}	2.870×10^{-2}
检测CV%	8.469	14.398	7.416	16.435	18.680	5.227	7.497	11.189	15.663
检测值与理论值偏差%	0.887	11.103	3.504	3.860	10.123	8.722	11	4.222	4.333
可接受标准	102bp, 198bp, 301bp: CV与偏差均<20%								
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

Human 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 6 冻融稳定性分析结果

检测片段		102bp	198bp	301bp	结果
标曲参数	斜率	-3.436	-3.546	-3.447	合格
	R^2	1	1	0.999	合格
	扩增效率 (%)	95.443	91.412	95.025	合格
准确性	不同浓度样本检测 CV%均值	6.951	3.138	4.649	合格
	不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值	4.472	5.425	3.848	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. 102bp, 198bp, 301bp片段: CV%与偏差值在20%以内。			