

# MDCK 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 27 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 MDCK 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 MDCK 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
MDCK 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 *E.coli*、Human、Vero、NS1、CHO 和 Yeast 分别加入 30000pg 的 DNA 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
	84bp	204bp	300bp		
<i>E.coli</i>	$3.53 \times 10^{-5}$	N/A	N/A	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
Human	N/A	N/A	N/A		无干扰
Vero	$2.18 \times 10^{-5}$	N/A	N/A		无干扰
NS1	$1.91 \times 10^{-5}$	N/A	N/A		无干扰
CHO	$5.02 \times 10^{-6}$	N/A	N/A		无干扰
Yeast	$4.88 \times 10^{-6}$	N/A	N/A		无干扰

## 5.2 线性范围

84bp 检测体系线性范围为  $3 \times 10^{-3}$ - $3 \times 10^2$  pg/μL，标准曲线斜率平均-3.480， $R^2$  为 0.999，扩增效率 93.834%；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<30%。

204bp 检测体系的线性范围  $3 \times 10^{-3}$ - $3 \times 10^2$  pg/μL，标准曲线斜率平均-3.474， $R^2$  为 0.999，扩增效率 94.014%；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<30%。

300bp 检测体系的线性范围  $3 \times 10^{-3}$ - $3 \times 10^2$  pg/μL，标准曲线斜率平均-3.491， $R^2$  为 1，扩增效率 93.439%。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<30%。

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

## 5.3 定量限

试剂盒各检测体系定量限均为  $3 \times 10^{-3}$  pg/μL。

表 2 定量限结果分析

检测片段	84bp	204bp	300bp
理论浓度 (pg/μL)	$3 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$
检测浓度 (pg/μL)	$2.745 \times 10^{-3}$	$3.692 \times 10^{-3}$	$3.087 \times 10^{-3}$
检测 CV%	13.668	13.778	16.381

偏差%	8.508	23.06	2.887
可接受标准	84bp, 204bp, 300bp: 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
84bp	$3 \times 10^2$	$3.174 \times 10^2$	1.367	5.813	84bp, 204bp, 300bp 片段; CV%与偏差值均 <30%	合格
	$3 \times 10^1$	$3.026 \times 10^1$	3.143	0.87		合格
	$3 \times 10^0$	$2.929 \times 10^0$	3.824	2.376		合格
	$3 \times 10^{-1}$	$2.722 \times 10^{-1}$	5.021	9.276		合格
	$3 \times 10^{-2}$	$2.711 \times 10^{-2}$	9.849	9.633		合格
	$3 \times 10^{-3}$	$2.776 \times 10^{-3}$	15.426	7.463		合格
204bp	$3 \times 10^2$	$2.888 \times 10^2$	4.698	3.724		合格
	$3 \times 10^1$	$2.850 \times 10^1$	8.014	4.987		合格
	$3 \times 10^0$	$2.475 \times 10^0$	7.002	17.496		合格
	$3 \times 10^{-1}$	$2.425 \times 10^{-1}$	7.792	19.16		合格
	$3 \times 10^{-2}$	$2.543 \times 10^{-2}$	19.174	15.22		合格
	$3 \times 10^{-3}$	$2.965 \times 10^{-3}$	22.795	1.167		合格
300bp	$3 \times 10^2$	$3.087 \times 10^2$	4.844	2.918		合格
	$3 \times 10^1$	$2.925 \times 10^1$	8.312	2.496		合格
	$3 \times 10^0$	$2.475 \times 10^0$	13.378	17.513		合格
	$3 \times 10^{-1}$	$2.464 \times 10^{-1}$	17.17	17.855		合格
	$3 \times 10^{-2}$	$2.473 \times 10^{-2}$	14.004	17.579		合格
	$3 \times 10^{-3}$	$2.765 \times 10^{-3}$	26.589	7.846		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	84bp	204bp	300bp	84bp	204bp	300bp	84bp	204bp	300bp
曲线斜率	-3.446	-3.48	-3.481	-3.463	-3.442	-3.415	-3.49	-3.48	-3.49
R <sup>2</sup>	1	1	1	0.998	1	0.999	1	1	0.999
扩增效率 (%)	95.067	93.797	93.75	94.447	95.23	96.246	93.5	93.89	93.54
理论浓度 (pg/μL)	3×10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-2</sup>
测得浓度 (pg/μL)	2.745×10 <sup>-3</sup>	3.442×10 <sup>-3</sup>	3.087×10 <sup>-3</sup>	3.140×10 <sup>-2</sup>	3.165×10 <sup>-2</sup>	2.910×10 <sup>-2</sup>	3.06×10 <sup>-2</sup>	2.9×10 <sup>-2</sup>	2.957×10 <sup>-2</sup>
检测CV%	13.67	10.64	16.38	8.63	7.93	11.48	7.53	2.69	3.22
检测值与理论值偏差%	8.51	14.73	2.89	4.67	5.50	3.01	2.00	3.33	1.44
可接受标准	84bp, 204bp, 300bp: 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

MDCK 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		84bp	204bp	300bp	结论
标曲参数	斜率	-3.421	-3.425	-3.41	合格
	R <sup>2</sup>	1	1	1	合格
	扩增效率 (%)	96.029	95.86	96.455	合格
准确性	不同浓度样本检测 CV%均值	4.765	6.791	5.517	合格
	不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值	5.899	4.299	3.084	合格
可接受标准		1. 斜率-3.1~-3.8, R <sup>2</sup> 大于 0.99, 扩增效率 90%~110%; 2. 84bp, 204bp, 300bp 片段: CV%与偏差值在 30%以内。			