

Vero 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 15 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 Vero 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 Vero 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
Vero 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*、MDCK、NS1、CHO、Yeast 分别加入 3000pg 的 DNA 量，对检测体系均无干扰。Human 细胞 DNA 对检测体系有轻微干扰。

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
	85bp	195bp	399bp		
<i>E.coli</i>	0.0057	0.0050	0.0035	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
MDCK	0.0053	0.0080	0.0015		无干扰
NS1	0.0060	0.0066	0.0043		无干扰
CHO	0.0055	0.0073	0.0028		无干扰
Yeast	0.0079	0.0064	0.0033		无干扰
Human	25.8299	29.0608	27.7882		有干扰

5.2 线性范围

85bp 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-3.4186， R^2 为 0.9991，扩增效率 96.12%；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%。

195bp 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-3.4217， R^2 为 0.9976，扩增效率 96%；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%。

399bp 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-3.6745， R^2 为 0.9998，扩增效率 86.95%。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/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	85bp	195bp	399bp
理论浓度 (pg/μL)	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}
检测浓度 (pg/μL)	2.92×10^{-2}	3.54×10^{-2}	3.36×10^{-2}
检测 CV%	4.29	7.09	5.92

偏差%	2.77	17.86	12.01
可接受标准	85bp, 195bp, 399bp: 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 3 精密度结果分析

检测片段	理论浓度 (pg / μ L)	测得浓度 (pg / μ L)	检测 CV%	检测值与理论值偏差%	可接受标准	结论
85bp	300	258.74	2.16	13.75	85bp, 195bp, 399bp 片段; CV%与偏差值均 <30%	合格
	3	2.882	5.22	3.93		合格
	0.06	0.0525	6.13	12.5		合格
195bp	300	389.83	6.37	29.94		合格
	3	3.500	4.17	16.67		合格
	0.06	0.0649	6.48	8.17		合格
399bp	300	322.97	7.23	7.66		合格
	3	2.742	6.15	8.60		合格
	0.06	0.0559	8.80	6.83		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	85bp	195bp	399bp	85bp	195bp	399bp	85bp	195bp	399bp
曲线斜率	-3.3615	-3.536	-3.5168	-3.4348	-3.317	-3.5879	-3.4851	-3.4717	-3.29
扩增效率 (%)	98.4	91.8	92.5	95.5	100.2	90	93.6	94.1	101.4
理论浓度 (pg/ μ L)	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/ μ L)	2.3×10^{-2}	2.9×10^{-2}	2.5×10^{-2}	3.2×10^{-2}	3.8×10^{-2}	3.1×10^{-2}	3.2×10^{-2}	3.0×10^{-2}	3.7×10^{-2}
检测CV%	7.51	7.24	3.05	4.49	1.65	10.69	12.59	6.93	13.09
检测值与理论值偏差%	21.69	3.60	16.06	8.14	27.89	1.73	7.89	1.33	23.44
可接受标准	85bp, 195bp, 399bp: 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

Vero 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		85bp	195bp	399bp	结论
标曲参数	斜率	-3.5230	-3.4681	-3.5785	合格
	R ²	0.9995	0.9946	0.9996	合格
	扩增效率 (%)	92.2	94.2	90.3	合格
准确性	不同浓度样本检测 CV%均值	3.67	4.80	9.47	合格
	不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值	7.06	14.02	1.40	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. 85bp, 195bp, 399bp 片段: CV%与偏差值在 20%以内。			