

CHO 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 CHO 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 CHO 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
CHO 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、Vero、Yeast 和 293T 分别加入 3000pg 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
	88bp	209bp	368bp		
<i>E.coli</i>	N/A	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
MDCK	N/A	0.003	N/A		无干扰
NS1	N/A	N/A	N/A		无干扰
Vero	N/A	N/A	N/A		无干扰
Yeast	N/A	N/A	N/A		无干扰
293T	N/A	N/A	N/A		无干扰

5.2 线性范围

88bp 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-3.345， R^2 为 0.996，扩增效率 99.05%；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%。

209bp 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-3.356， R^2 为 0.997，扩增效率 98.59%；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%。

368bp 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-3.361， R^2 为 0.998，扩增效率 98.38%。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 3×10^{-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	88bp	209bp	368bp
理论浓度 (pg/μL)	3×10^{-2}	3×10^{-2}	3×10^{-2}
检测浓度 (pg/μL)	3.19×10^{-2}	2.92×10^{-2}	23.3×10^{-2}
检测 CV%	22.1	5.04	25.7

偏差%	6.2	2.6	22.4
可接受标准	88bp, 209bp, 368bp: 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 / 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
88bp	300	318.38	7.14	6.127	88bp, 209bp, 368bp 片段: CV%与偏差值均 <30%	合格
	3	2.95	11.65	1.667		合格
	0.3	0.24	13.45	20.00		合格
	0.03	0.0327	18.81	8.889		合格
209bp	300	344.09	3.67	14.697		合格
	3	2.91	10.99	3.0		合格
	0.3	0.26	18.64	13.333		合格
	0.03	0.031	23.29	4.444		合格
368bp	300	338.88	7.42	12.958		合格
	3	3.36	10.65	12.0		合格
	0.3	0.22	13.20	26.667		合格
	0.03	0.0347	19.84	15.56		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	88bp	209bp	368bp	88bp	209bp	368bp	88bp	209bp	368bp
曲线斜率	-3.291	-3.308	-3.445	-3.345	-3.356	-3.361	-3.482	-3.5	-3.485
R ²	0.993	0.997	0.998	0.996	0.997	0.998	0.999	0.999	0.996
扩增效率 (%)	101.32	100.58	95.1	99.05	98.59	98.38	93.73	95.57	93.62
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 ⁻¹	3×10 ⁻¹	3×10 ⁻¹
测得浓度 (pg/μL)	3.2×10 ⁻²	2.9×10 ⁻²	2.3×10 ⁻²	3.4×10 ⁻²	2.6×10 ⁻²	3.2×10 ⁻²	3.3×10 ⁻¹	2.964×10 ⁻²	2.95×10 ⁻²
检测CV%	22.08	5.05	25.72	24.91	22.24	20.48	9.89	8.98	2.40
检测值与理论值偏差%	6.22	2.57	22.44	14.32	14.43	7.87	10.24	1.21	1.71
可接受标准	88bp, 209bp, 368bp:CV与偏差均<30%								
结论	合格			合格			合格		

6.2 冻融稳定性

CHO 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		88bp	209bp	368bp	结论
标曲参数	斜率	-3.434	-3.448	-3.505	合格
	R ²	0.997	0.996	0.998	合格
	扩增效率 (%)	94.1	93.85	91.74	合格
准确性	不同浓度样本检测 CV%均值	12.06	14.29	10.88	合格
	不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值	5.16	8.91	6.42	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. 88bp, 209bp, 368bp 片段: CV%与偏差值在 30%以内。			