

E.coli 总 RNA 残留检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

性能验证报告

编制日期：2024 年 8 月 28 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* 总 RNA 残留检测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* 总 RNA 的残留量进行专属性、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 |
|--|------|----------|
| <i>E.coli</i> 总 RNA 残留检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) | 阅微基因 | 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 |
|-------------------|----------------------|------------------------------------|-----|
| <i>E.coli</i> DNA | 1.4x10 ⁻³ | 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 | 3.3x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| Human DNA | 2x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| Human RNA | 5.4x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| MDCK DNA | 1.8x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| NS1 DNA | 2.8x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| Vero DNA | 2.9x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| Yeast DNA | 2.6x10 ⁻⁴ | | 无干扰 |
| Yeast RNA | 1.4x10 ⁻³ | | 无干扰 |

5.2 线性范围

该检测体系线性范围为 2×10⁻³-2×10¹ pg/μL，标准曲线斜率为-3.397，R² 为 1，扩增效率 96.96%；相对偏差和 CV<30%。

综上，该检测体系标准曲线浓度范围设定为 2×10⁻³-2×10¹ pg/μL。

5.3 定量限

试剂盒检测体系定量限为 2×10⁻³ pg/μL。

表 2 定量限结果分析

| 理论值 (pg/μL) | 测得值 (pg/μL) | CV% | 偏差% | 可接受标准 | 结果 |
|----------------------|------------------------|------|------|-------------|----|
| 2 x 10 ⁻³ | 2.1 x 10 ⁻³ | 4.03 | 5.60 | CV 与偏差均<30% | 合格 |

5.4 精密度

该检测体系内设置不同浓度的样本，每个浓度重复 9-10 次检测，CV 均符合要求。

表 3 精密度结果分析

| 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 |
|--------------|--------------|--------|------------|--------------|----|
| 20 | 21.7868 | 17.01 | 8.934 | CV%与偏差值均<30% | 合格 |
| 2 | 2.13 | 6.34 | 6.5 | | 合格 |

| | | | | |
|-------|--------|-------|------|----|
| 0.2 | 0.1965 | 12.12 | 1.75 | 合格 |
| 0.02 | 0.0194 | 4.2 | 3 | |
| 0.002 | 0.0021 | 15.64 | 5 | |

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 | 机型 | 曲线斜率 | R ² | 扩增效率 (%) | 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 |
|-----|----------|--------|----------------|----------|--------------------|----------------------|--------|------------|-------------|----|
| 赛默飞 | ABI 7500 | -3.397 | 1 | 97 | 2×10 ⁻³ | 2.2×10 ⁻³ | 2.93 | 9.20 | CV与偏差均 <30% | 合格 |
| 赛默飞 | ABI Q6 | -3.39 | 0.99 | 97.2 | 2×10 ⁻³ | 2.2×10 ⁻³ | 3.16 | 9.00 | | 合格 |
| 博日 | FQD-96A | -3.4 | 1 | 96.9 | 2×10 ⁻³ | 2.0×10 ⁻³ | 2.27 | 1.00 | | 合格 |

6.2 冻融稳定性

E. coli 总 RNA 残留检测试剂盒反复冻融 5 次后，试剂盒性能不受影响。

表 5 冻融稳定性分析结果

| 标曲参数 | | | 准确性 | | 可接受标准 |
|--------|----------------|----------|----------------|--------------------|---|
| 斜率 | R ² | 扩增效率 (%) | 不同浓度样本检测 CV%均值 | 不同浓度样本检测值与理论值偏差%均值 | 1. 斜率-3.1 ~ -3.8, R ² 大于 0.99, 扩增效率 90% ~ 110%; 2. CV%与偏差值在 30% 以内。 |
| -3.531 | 0.99 | 91.96 | 5.51 | 8.95 | |
| 合格 | 合格 | 合格 | 合格 | 合格 | |