



# 用qPCR方法检测 粗品肝素的动物来源

美国SPL有限公司杭州代表处

毛兴昌

2011年9月

电话：0571-87356628

## 方法开发的背景

- 国际厂商对粗品肝素来源的要求
- PCR检测动物源方法简介

## qPCR方法开发设计

- 样品处理
- 方法设计与对照控制

# 方法开发的背景

## 对粗品肝素钠来源的要求

- 为了预防疯牛病和羊痒病的传染，国外厂商都不采购牛、山羊和绵羊来源的粗品肝素。
- 只采购猪来源的粗品肝素，不得混有牛、山羊、绵羊来源的粗品肝素。
- 生产上对屠宰场，刮肠车间，肠粘膜加工提取粗品肝素车间有一系列的要求。
- 对粗品肝素产品进行动物源检测。
- 检测方法：粗品肝素中残存的动物基因DNA。

# qPCR检测动物源方法简介

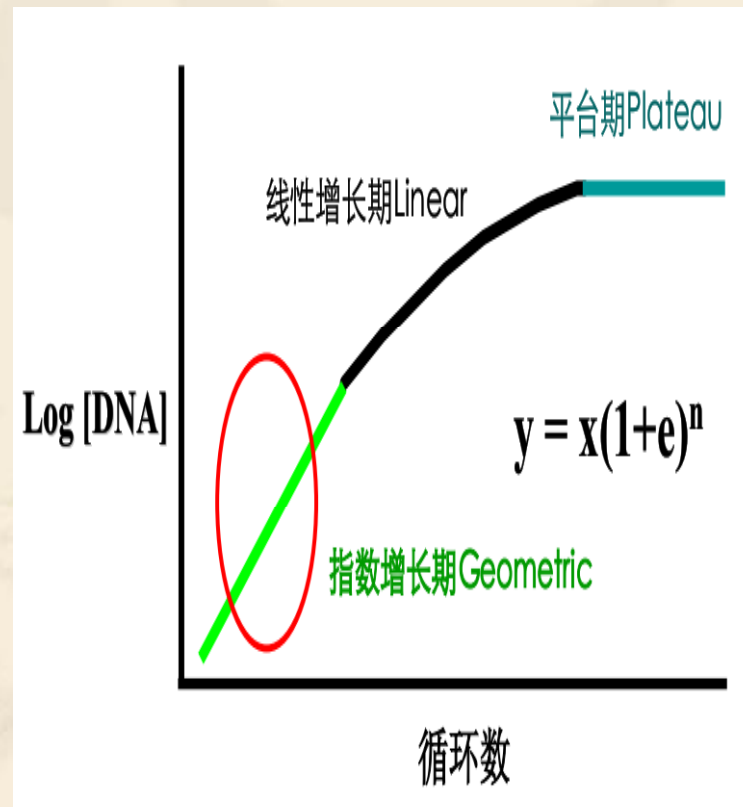
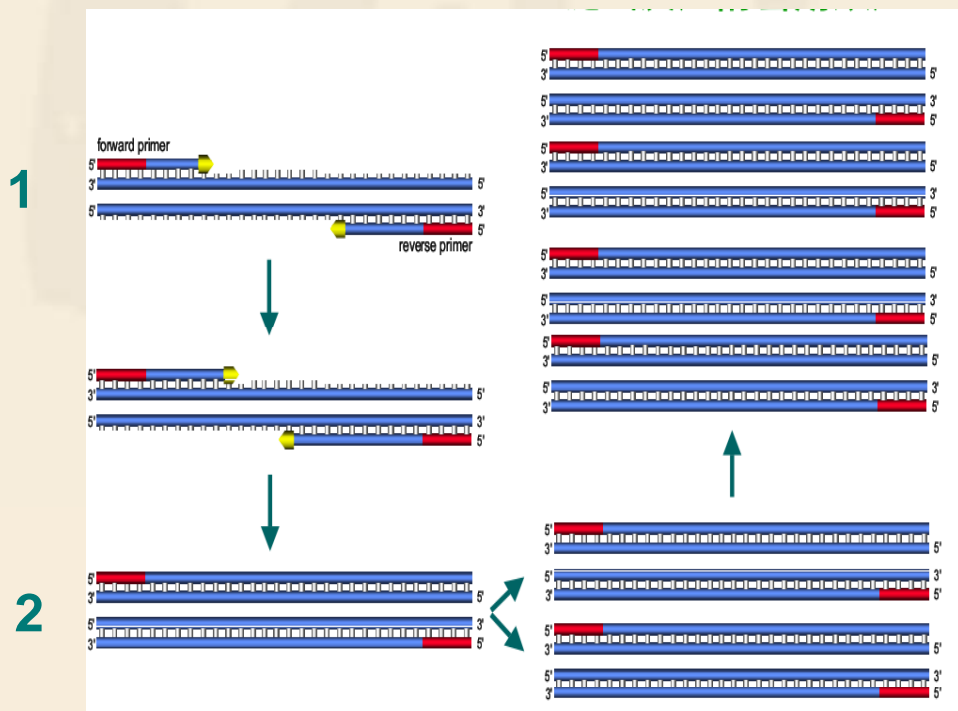
- qPCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应。
- 粗品肝素含有微量动物基因DNA。
- qPCR方法可以将微量DNA以指数级扩增并被检测到。
- qPCR方法可以检测到百万分之一以下的微量DNA。

# 国外客户对动物来源检测的要求

- 粗品肝素不可含有反刍动物的DNA（低于0.03ppm）\*。
- 粗品肝素必须有一定量的猪的DNA，以证明粗品肝素来源于猪。
- 正常粗品肝素应含有数百ppm或更多猪的DNA。如检测不出猪的DNA或含量过低，该产品有被化学处理的嫌疑。

\*注：ppm：百万分之一

# qPCR基本原理

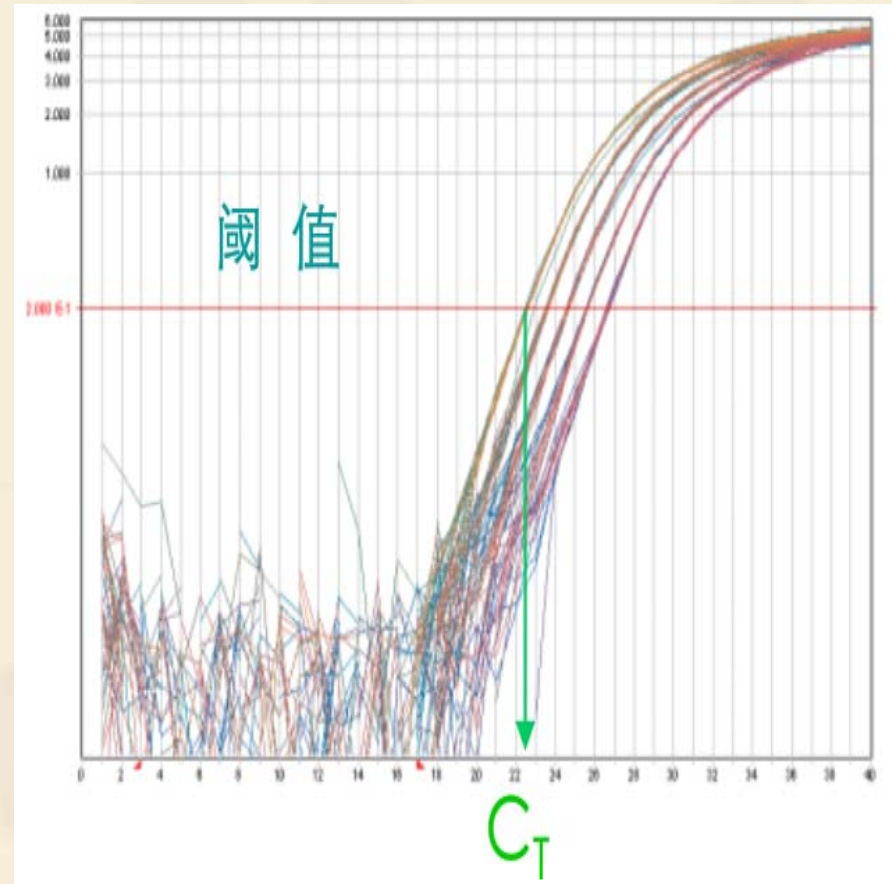


● 经过30次扩增，1个DNA片段可变为几百万个DNA片段。

● 极微量的反刍动物DNA可被扩增和检测到。

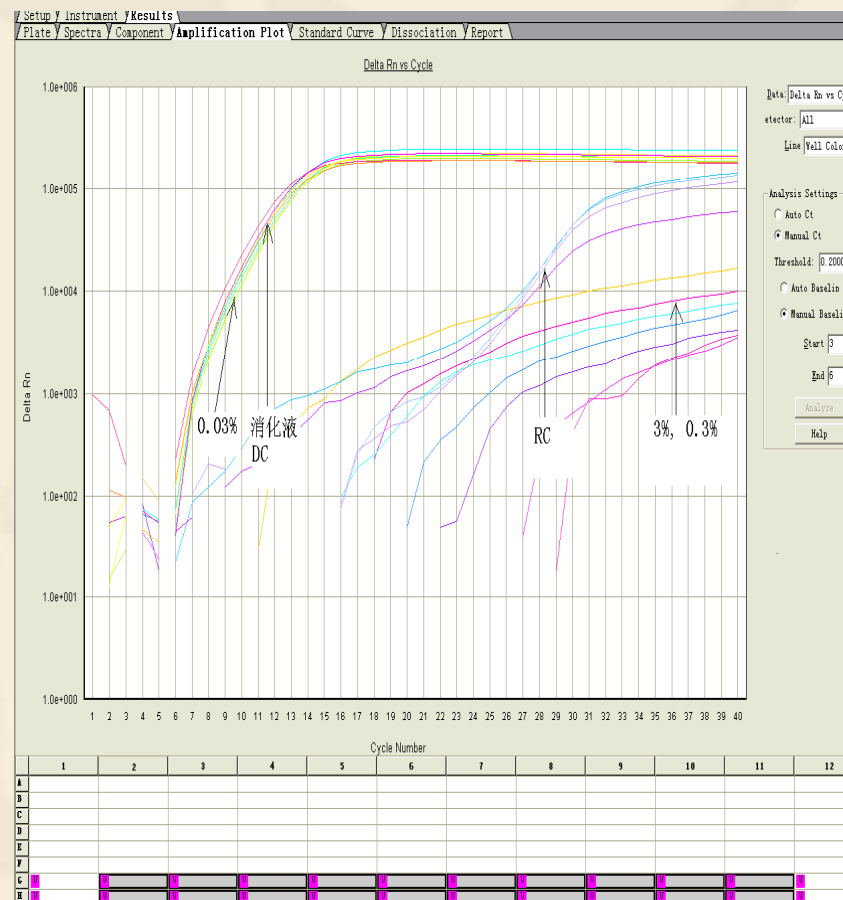
# qPCR方法的优点

- 给出猪和反刍动物的DNA定量结果。
- 定量下限可达0.03ppm，为国外客户选用为标准动物源检测方法。
- 操作步骤比普通PCR简单，快速。



# qPCR方法开发设计-样品处理

- 肝素钠对PCR有明显的抑制，用肝素酶降解肝素钠方法可消除抑制。
- 在不同浓度的粗品肝素钠溶液中（3%，0.3%，0.03%）和消化液中加入相同浓度的牛DNA。
- RC试剂空白（不含牛DNA）：Ct=28
- DC消化液：Ct=10
- 3%粗品肝素：Ct=35-----强抑制
- 0.3%粗品肝素：Ct=30-----抑制
- 0.03%粗品肝素：Ct=10-----无影响



# 方法设计与对照控制

- 酶解对照：用消化液代替样品，与样品完全相同的处理。用于评估酶解过程是否有人员导致的污染。
- 试剂空白对照：用注射用水代替样品溶液。代表试剂的背景荧光值。
- 加料控制：对每个样品定量加入猪或者反刍动物的DNA。评估样品是否对qPCR有抑制。
- 每次试验都做6个不同浓度的标准曲线。
- 每个样品平行测定3次，计算平均值和标准偏差值。

# qPCR方法评估要求

- 方法必须按国际制药业规范进行验证
- 专一性
- 准确度：检测结果的可信度
- 精密度：检测结果的重现性
- 线性：在检测区间DNA含量与检测结果成线性关系
- 范围：检测区间
- 检测限：灵敏度

# 专一性

猪DNA检测方法:

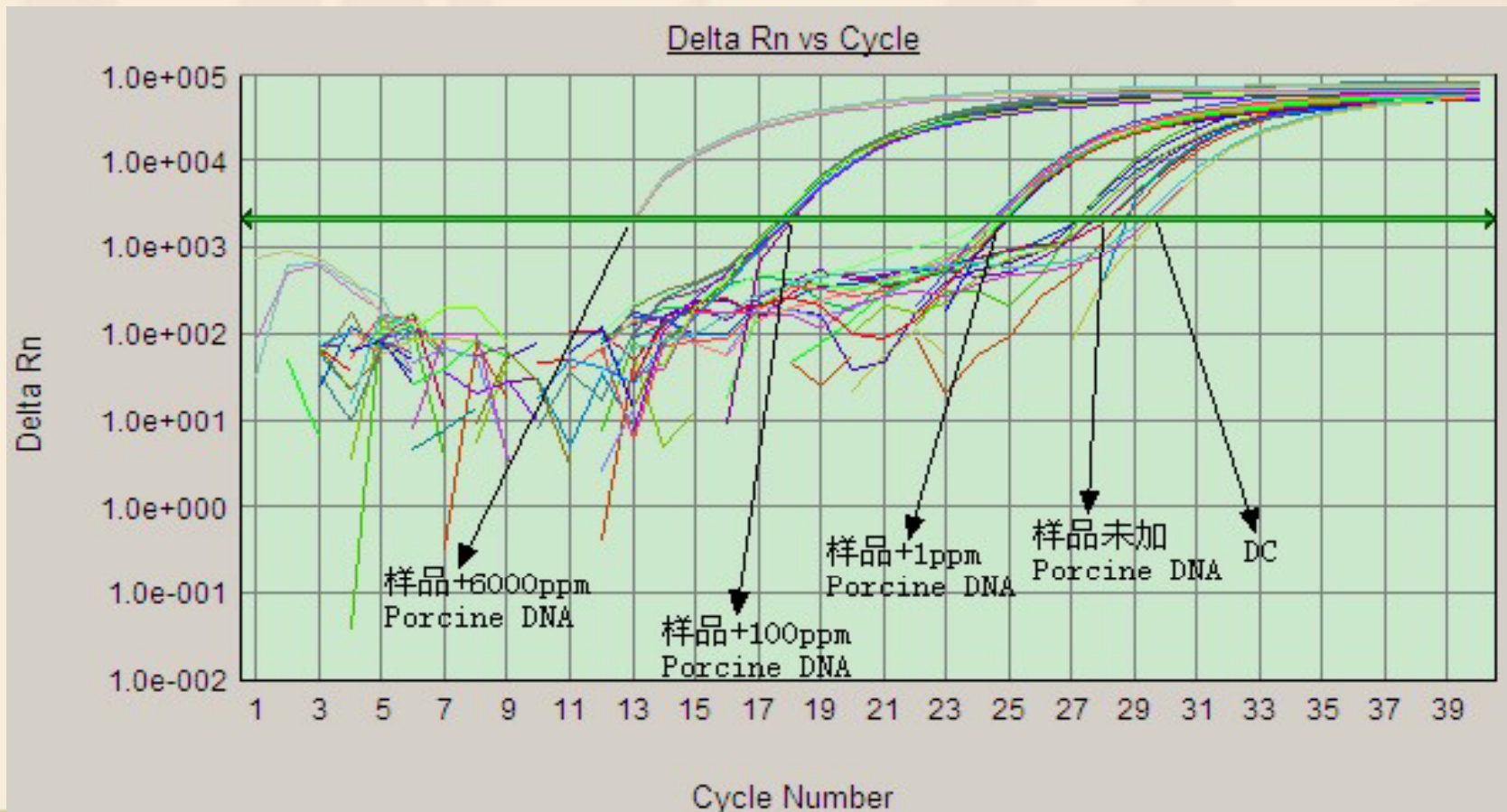
- 猪引物和探针不扩增反刍动物DNA;
- 猪引物和探针与猪DNA扩增时, 信号与猪DNA浓度成正相关。

反刍动物DNA检测方法:

- 反刍动物引物和探针不扩增猪DNA;
- 反刍动物引物和探针与反刍动物DNA扩增时, 信号与反刍动物DNA浓度成正相关。

# 准确度 (猪DNA)

往粗品肝素中加入定量猪DNA，计算回收率。



## 准确度（猪DNA）

样品	加入的猪DNA浓度 (ppm)	测得的猪DNA平均浓度 (ppm)	平均回收率 (%)
903G	未加	0.11	NA
903G+1ppm猪DNA	1	1.09	98%
903G+100ppm猪DNA	100	149	149%
903G+6000ppm猪DNA	6000	4693	78%

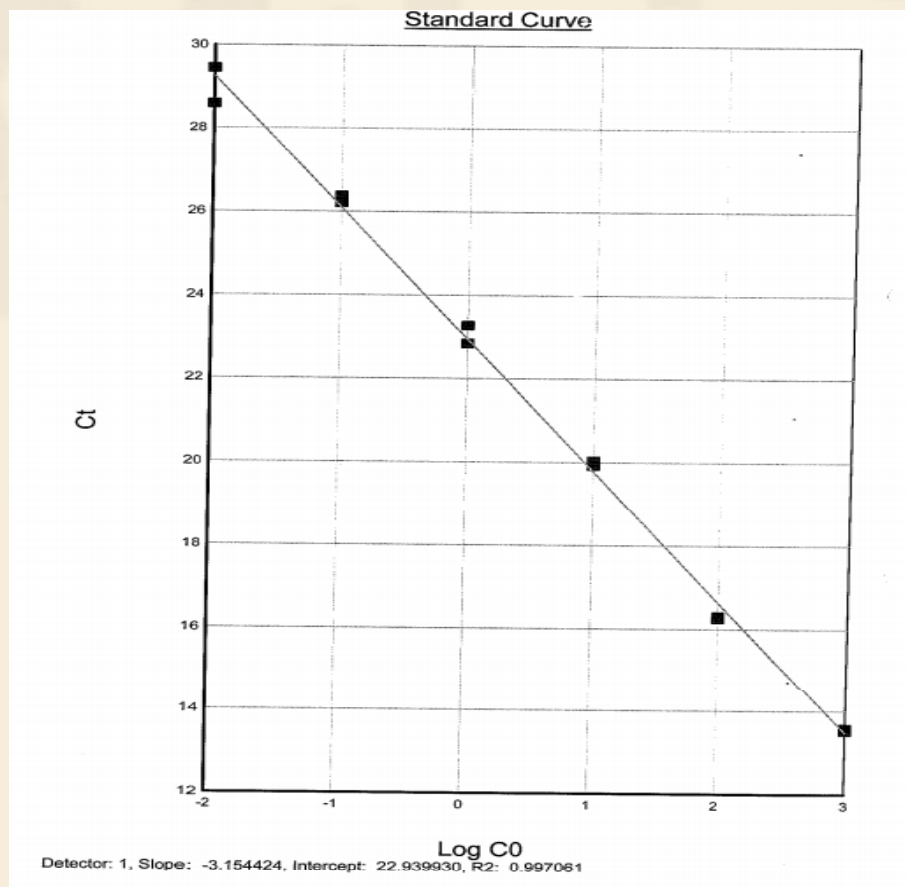
结论：回收率在许可区间内，准确度达到要求。

## 精密度 (猪DNA)

样品	平均C <sub>T</sub> 值	SD	RSD (%)
903G	27.80	0.287	1.0
903G+1ppm猪DNA	24.61	0.137	0.6
903G+100ppm猪DNA	17.82	0.211	1.2
903G+6000ppm猪DNA	13.03	0.022	0.2

结论：检测结果重现性在许可区间内，达到精密度要求。

# 线性 (猪DNA)



$R^2: 0.9970$

结论: 在检测区间内, 线性达到0.99以上。

## 范围和检测限 (猪DNA)

- 粗品肝素中猪DNA含量正常是几百ppm或更高。准确度加料回收试验最低浓度为1ppm，最高6000ppm。线性范围：1ppm-6000ppm。
- 定量检测限确定为1ppm足以满足测定要求。如有必要，0.03ppm也可能达到。

## 准确度（反刍动物DNA）

往粗品肝素中加入定量反刍动物DNA，计算回收率。

样品	加入的反刍动物DNA量（ppm）	加料回收率（%）
A+0.03ppm反刍动物DNA	0.03	109
A+10ppm反刍动物DNA	10	96
A+3000ppm反刍动物DNA	3000	70

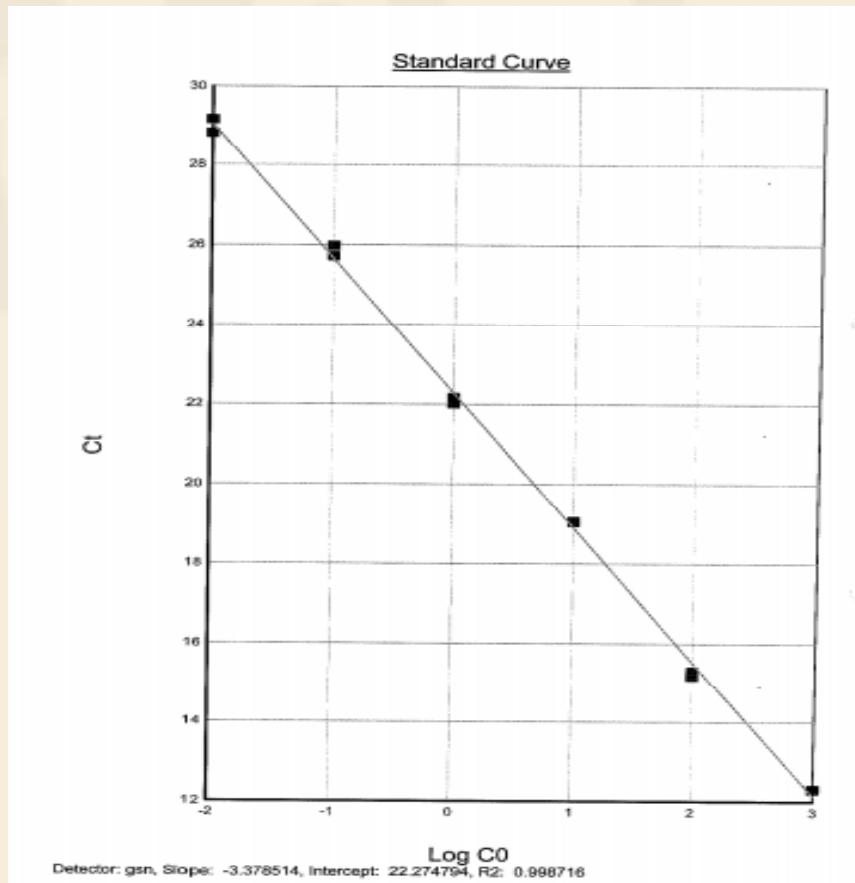
结论：回收率在许可区间内，准确度达到要求。

## 精密度（反刍动物DNA）

样品	$C_T$ 平均值	SD	RSD (%)
A+0.03ppm	28.56	0.192	0.5
A+10ppm	20.87	0.188	0.9
A+3000ppm	1295	0.146	1.1

结论：检测结果重现性在许可区间内，达到精密度要求。

# 线性和范围（反刍动物DNA）



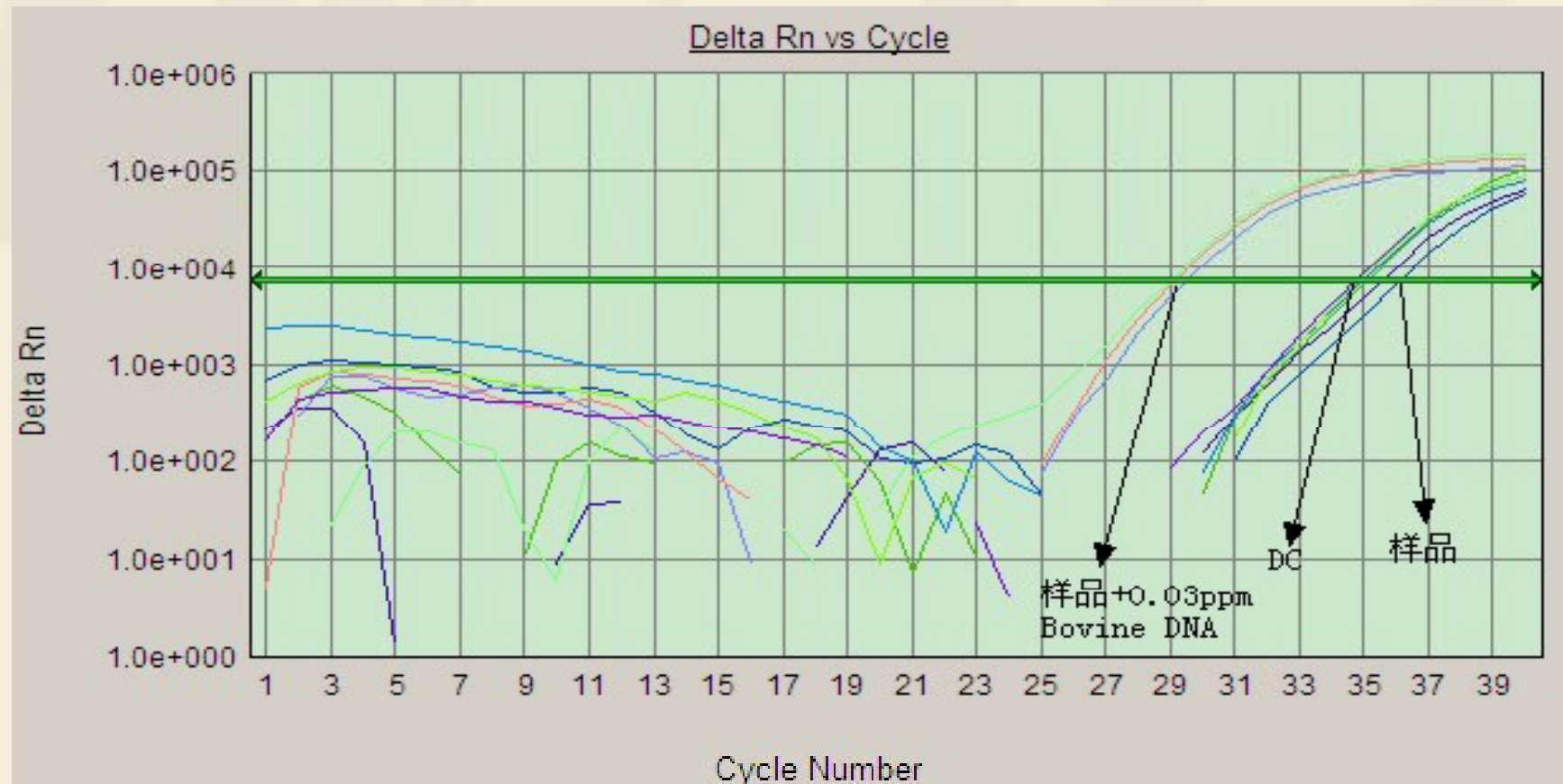
$R^2: 0.9987$

结论:

- 在检测区间内，线性达到0.99以上。
- 在0.03ppm-3000ppm范围内，符合准确度、精密度和线性的要求。

# 检测限（反刍动物DNA）

定量检测下限由本方法的线性范围的下限确定为0.03ppm.



# 结论

	猪DNA	反刍动物DNA
专一性	符合要求	符合要求
准确度	符合要求	符合要求
精密度	符合要求	符合要求
线性	$R^2: >0.99$	$R^2: >0.99$
范围	1-6000ppm	0.03-3000ppm
定量检测限	1ppm	0.03ppm

本qPCR方法在专一性、准确度、精密度、线性、范围和定量检测限方面完全符合国外客户的要求，可以用于定量测定粗品肝素钠中反刍动物和猪的DNA，从技术上保证来源的可靠性。