

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

甲基化检测样本前处理试剂盒

Sample Pretreatment Kit for Methylation Detection

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

甲基化检测样本前处理试剂盒

1 范围

本文件规定了甲基化检测样本前处理试剂盒的术语和定义、要求、试验方法、标签和使用说明书、包装、运输和贮存。

本文件适用于采用亚硫酸氢盐转化或酶法转化的甲基化检测前处理试剂（盒），其对待检测DNA中非甲基化或甲基化的胞嘧啶进行转化，处理后的产物经回收纯化后用于甲基化检测，适用于PCR和高通量测序甲基化分析方法。

本文件不适用于对RNA甲基化进行转化的甲基化检测前处理试剂（盒）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 191-2008 包装储运图示标志

GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械制造商提供的信息（标示） 第2部分：专业用体外诊断试剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

DNA 甲基化 DNA methylation

在DNA甲基转移酶的催化下，以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体，将甲基转移至碱基特定结构上的过程。

注：引自GB/T 40183-2021 3.1.1

3.2

亚硫酸氢盐转化 Bisulfite conversion

用亚硫酸氢盐处理DNA时，胞嘧啶核苷酸发生磺化、脱氨反应生成尿嘧啶，而5-甲基化胞嘧啶基本保持不变。之后检测判断甲基化状态。

3.3

酶法转化 Enzymatic methylation conversion

利用一系列酶的特异性催化作用，对DNA中的甲基化或非甲基化胞嘧啶等位点进行特定的化学修饰或转化反应，使甲基化状态不同的碱基产生可区分的变化，从而实现DNA甲基化状态进行检测和分析。通过酶促反应将非甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶常被称为反向酶法转化，而将甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶常被称为正向酶法转化。

3.4

转化率 Conversion Efficiency

在亚硫酸氢盐处理或反向酶法转化中，非甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶的比例。

5-甲基胞嘧啶（5mC）在正向酶法转化中被转化为尿嘧啶的比例。

3.5

保护率 Protection Efficiency

5-甲基胞嘧啶（5mC）在亚硫酸氢盐处理或反向酶法转化中未被转化为尿嘧啶的比例。

非甲基化的胞嘧啶在正向酶法转化中未被转化为尿嘧啶的比例。

3.6

回收率 Recovery Efficiency

在甲基化前处理（如重亚硫酸盐转化或酶法转化）中，经过转化和纯化步骤后，可被下游分析有效利用的DNA量与初始投入量的比例。

4 要求

4.1 外观

试剂盒应符合制造商规定的外观要求。试剂盒各组分应齐全、完整、无液体渗漏。标签应符合GB/T29791.2的要求。

4.2 转化率

亚硫酸氢盐转化对非甲基化胞嘧啶的转化效率 $\geq 99\%$ 。

反向酶法转化对非甲基化胞嘧啶的转化效率 $\geq 99\%$ 。

正向酶法转化对甲基化胞嘧啶的转化效率 $\geq 80\%$ 。

4.3 保护率

亚硫酸氢盐转化对甲基化胞嘧啶的保护效率 $\geq 95\%$ 。

反向酶法转化对甲基化胞嘧啶的保护效率 $\geq 90\%$ 。

正向酶法转化对非甲基化胞嘧啶的保护效率 $\geq 80\%$ 。

4.4 重复性

检测国家或企业全甲基化率参考品，应满足以下要求：

- 1) 若采用PCR法检测转化率或保护率，平行检测10次，每次检测的转化率或保护率符合4.2和4.3的要求，且10次重复检测所得转化率或保护率指标值间的变异系数(CV,%)应分别不高于5.0%。
- 2) 若采用测序法检测转化率或保护率，平行检测3次，每次检测的转化率或保护率符合4.2和4.3的要求，且10次重复检测所得转化率或保护率指标值间的变异系数(CV,%)应分别不高于5.0%。

检测国家或企业非甲基化参考品，应满足以下要求：

- 1) 若采用PCR法检测转化率或保护率，平行检测10次，每次检测的转化率或保护率符合4.2和4.3的要求，且10次重复检测所得转化率或保护率指标值间的变异系数(CV,%)应分别不高于5.0%。
- 2) 若采用测序法检测转化率或保护率，平行检测3次，每次检测的转化率或保护率符合4.2和4.3的要求，且10次重复检测所得转化率或保护率指标值间的变异系数(CV,%)应分别不高于5.0%。

注：全甲基化率参考品在亚硫酸氢盐和反向酶法转化方法学中用于检测保护率；在正向酶法转化方法学中用于检测转化率。非甲基化参考品在亚硫酸氢盐和反向酶法转化方法学中用于检测转化率；在正向酶法转化方法学中用于检测保护率。

4.5 回收率

转化产物的纯化回收效率应考虑不同因素下的影响，如：样本类型、DNA类型（基因组DNA、cfDNA）、DNA投入量、回收率检测方法学等。制造商应对回收率做适当要求，并提供验证资料。

检测国家或企业甲基化转化回收率参考品，宜同时检测配套甲基化检测试剂预期用途中涵盖的临床样本类型（如适用）。

4.6 一致性

检测国家或企业甲基化阳性和检测限参考品，结果应均为阳性。

检测国家或企业甲基化阴性参考品，结果应均为阴性。

注1：国家参考品标示经验证定值的甲基化基因和检测范围，制造商根据配套的甲基化检测试剂（盒）预期用途，对包含在国家参考品中的基因和检测范围进行验证。

注2：企业参考品需包含制造商配套的甲基化检测试剂（盒）预期用途中所包含的基因和检测范围。

5 试验方法

5.1 外观

在自然光下以正常视力或矫正视力目视检查，判定结果是否符合4.1的要求。

5.2 转化率

检测国参或企业甲基化转化率参考品，按照制造商产品说明书检验要求进行，判定结果是否符合4.2的要求。

5.3 保护率

检测国参或企业甲基化保护率参考品，按照制造商产品说明书检验要求进行，判定结果是否符合4.3的要求。

5.4 重复性

检测国家或企业全甲基化率和非甲基化重复性参考品，若采用PCR法进行检测，每份平行检测10次；若采用测序法进行检测，每份平行检测3次。计算重复检测所得转化率或保护率指标值间的平均值($\bar{x}$)和标准差(s)，按照式(1)计算变异系数(CV)，判定结果是否符合4.4的要求。

$$CV=s/\bar{x} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

s —10次测试结果的标准差；

$\bar{x}$ —10次测试结果的平均值。

5.5 回收率

按照制造商提供的方法进行试验，判定结果是否符合4.5的要求。

5.6 一致性

检测国家或企业甲基化阳性、检测限和阴性参考品，每份检测1次，判定结果是否符合4.6的要求。

6 标签和使用说明书

应符合GB/T 29791.2 体外诊断医疗器械制造商提供的信息（标示）第2部分：专业用体外诊断试剂的规定。

7 包装、运输、贮存

7.1 包装

包装储运图示标志应符合GB/T 191的规定。包装容器应保证密封性良好，完整，无泄露，无破损。

7.2 运输

试剂盒应按制造商的要求运输。在运输过程中，应防潮，应防止重物堆压，避免阳光直射和雨雪浸淋，防止与酸碱物质接触，防止内外包装破损。

7.3 贮存

试剂盒应在制造商规定条件下保存。