



中华人民共和国国家标准

GB/T 39512—2020

磷酸化标记核酸检测通则

Principle for phosphorylation labeled nucleic acid testing

2020-11-19 发布

2021-06-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:中国测试技术研究院生物研究所、通用生物系统(安徽)有限公司、四川省亚中基因科技有限责任公司、深圳市计量质量检测研究院、中国测试技术研究院、成都先导药业开发股份有限公司、苏州金唯智生物科技有限公司、四川大学华西医院、四川农业大学、河北医科大学。

本标准主要起草人:周李华、雍金贵、韩国全、刘宗文、杨杰斌、潘红、李怀平、张懿、马丽侠、杨国武、刘倩、蒋子敬、杨丽、郝军政、郑燕燕、吕品。



磷酸化标记核酸检测通则

1 范围

本标准规定了磷酸化标记核酸检测的术语和定义、缩略语、一般要求、测定方法、样品保存和报告。本标准适用于 DNA 编码化合物文库构建用的磷酸化标记核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 30988 多酚类植物基因组 DNA 提取纯化及测试方法

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 34797 核酸引物探针质量技术要求

3 术语和定义

GB/T 34797 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

磷酸化标记核酸 phosphorylation labeled nucleic acid

5'端标记一个磷酸基团,长度范围在 9 nt~17 nt 的单链 DNA。

3.2

DNA 编码化合物 DNA encoded compound

具有 5'端标记磷酸基团,3'端带有 2~6 个碱基黏末端,9 nt~17 nt 的两条单链 DNA 退火形成的双链。

3.3

退火 annealing

两条单链 DNA 通过加热变性、降温复性的方式,依据碱基互补配对原则结合在一起。

3.4

互补链 complementary strand

通过碱基互补配对形成的双链核苷酸链中的两条单链。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DIEA: *N,N*-二异丙基乙胺(Diisopropylethylamine)

DNA: 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EDTA: 乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid)

HFIPA: 六氟异丙醇(Hexafluoroisopropanol)

HPLC: 高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography)

LC-MS: 液相色谱-质谱联用仪(Liquid Chromatography-Mass Spectrometer)

OD: 光密度(Optical Density)

TEAA: 三乙基铵醋酸盐(Triethylammonium Acetate)

5 磷酸化标记核酸检测一般要求

5.1 样品要求

检测样品应为无色或浅黄色澄清液体,无悬浮物,无机械杂质。样品管保存完好,无破损、无漏液。

5.2 人员要求

进行磷酸化标记核酸检测的人员应具有生物、化学专业知识的教育背景。

5.3 试剂要求

除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.4 检测项目

磷酸化标记核酸的检测项目参见表 1,指标参数的参考结果参见附录 A。

表 1 磷酸化标记核酸检测指标及测定仪器

样品	指标项目		测定方法	仪器设备
磷酸化标记核酸	总量		6.1	紫外分光光度计
	相对分子质量		6.2	LC-MS
	碱基准确度		6.3.2	LC-MS
			6.3.3	测序仪
	纯度	紫外吸收强度	6.4.1	紫外分光光度计
		HPLC 纯度	6.4.2	HPLC 仪
		质谱纯度	6.4.3	LC-MS
	碱基缺失率	完全匹配度	6.5.2	测序仪
		碱基缺失率	6.5.1	LC-MS
	互补链浓度差	紫外吸收强度	6.6.1	紫外分光光度计
		质谱峰强度比	6.6.2	LC-MS
		化合物间浓度差	6.6.3	紫外分光光度计
	脱磷酸化产物	脱磷酸产物占比	6.7	LC-MS
连接效率	原料胶图转化率/ 相对分子质量	6.8	凝胶电泳仪/ LC-MS	

6 测定方法

6.1 总量检测

按照 GB/T 34797 执行。

6.2 相对分子质量检测

6.2.1 直接计算

相对分子质量可依据定制序列,按照式(1)直接计算:

$$MW = (A \times 313.21) + (C \times 289.18) + (G \times 329.21) + (T \times 304.2) + 79.98 - 61.94 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- MW —— 相对分子质量;
 A, C, G, T —— 各碱基相对应的碱基数;
 79.98 —— 5'磷酸基团相对分子质量;
 61.94 —— 磷酸二酯键残基相对分子质量。

6.2.2 质谱检测

采用 LC-MS 对磷酸化标记核酸的相对分子质量(MW)进行检测,LC-MS 通过电喷雾电离源将样品转化为运动的带电气态离子碎片,然后按质荷比(m/z)大小分离并记录,通过质谱分析软件换算出目标化合物的相对分子质量。仪器运行前检查确认仪器的离子源、检测器、数据系统等状态正常,LC-MS 的设备参数及流动相参数参考附录 B 中的 B.1。

6.2.3 测定结果

采用 6.2.2 方法测得的相对分子质量(MW)与 6.2.1 中计算的相对分子质量(MW)进行比较得出相对误差。

6.3 碱基准确度检测

6.3.1 总则

磷酸化标记核酸序列和定制序列的匹配程度,由合成仪自动生成的序列信息与质谱检测、测序检测的结果进行比对验证。

6.3.2 液相色谱-质谱法

采用 6.2.2 方法测定,将测得的相对分子质量与 6.2.1 中定制序列的理论相对分子质量(MW)进行比对验证。

6.3.3 基因测序法

按照 GB/T 30989 执行,对磷酸化标记核酸进行序列测定。

6.4 纯度检测

6.4.1 紫外分光光度法

按照 GB/T 30988 执行。

6.4.2 高效液相色谱法

采用 HPLC 仪对磷酸化标记核酸的纯度进行测定,设备运行参数参考 B.2。确保仪器状态正常后,取 10 μL 50 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸化标记核酸溶液和 20 μL 超纯水置于进样瓶中混匀,点击仪器运行按钮,仪器自动进样检测。根据检测结果计算目标峰面积占所有峰面积的比值,得出磷酸化标记核酸的纯度。

6.4.3 液相色谱-质谱法

采用 6.2.2 方法测定,计算目标峰质谱信号的强度占所有峰质谱信号强度的比值,得出磷酸化标记核酸的质谱纯度。

6.5 碱基缺失率检测

6.5.1 液相色谱-质谱法

采用 6.2.2 方法测定,计算缺碱基峰的质谱信号强度占所有峰质谱信号强度的比值,得出碱基缺失率。

6.5.2 基因测序法

采用 6.3.3 方法测定,计算碱基缺失信号比例。

6.6 互补链浓度差检测

6.6.1 紫外吸收强度检测

6.6.1.1 单链浓度检测

采用紫外分光光度法对磷酸化标记核酸进行紫外吸收强度检测,测得核酸在 260 nm 处的吸收强度即 OD_{260} 数值,测得的 OD_{260} 数值乘以稀释倍数作为最终定量的 OD_{260} 数值,用 OD_{260} 数值除以消光系数转换为样品浓度。

6.6.1.2 互补链浓度差

根据单链定量结果,计算两条互补链间的浓度差。

注:检测前离心并混匀样本,样本量大时,可采用摇床 600 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 混匀。

6.6.2 质谱峰强度比检测

采用 6.2.2 方法测定,计算双链中含量较低的单链质谱信号强度占双链总质谱信号强度的比值。

6.6.3 化合物间浓度差检测

采用紫外分光光度法对互补链退火后形成的磷酸化标记核酸双链进行紫外吸收强度测定,将检测的质量浓度除以互补链混合产物的相对分子质量得出摩尔浓度,最终计算不同的磷酸化标记核酸双链间的摩尔浓度差即化合物间浓度差。

6.7 脱磷酸化产物检测

采用 6.2.2 方法测定,计算未标记上磷酸基团的产物峰(其相对分子质量比目标相对分子质量低 79.98)的质谱信号强度占所有质谱峰信号强度的比值,得出脱磷酸率。

6.8 连接效率检测

6.8.1 样品准备

采用凝胶电泳法测定连接效率,向 5 μL 1 mmol/L 的磷酸化标记核酸原液中加入 6.5 μL 1 mmol/L 的质检底物、2 μL 10 \times 连接缓冲液和 2.5 μg T4 DNA 连接酶,定容至 20 μL 后混匀制备反应液。将配制的反应液置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 4 h,反应后取 2 μL 反应液稀释 25 倍后待用。

6.8.2 连接效率检测

反应液进行琼脂糖凝胶电泳;电泳结果采用灰度定量法进行连接效率计算,其中连接效率=连接产物灰度值/(连接产物灰度值+剩余原料灰度值)。

7 样品保存

贮存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,避免反复冻融。未稀释的干粉-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存不宜超过 1 年;稀释后的样品-20 $^{\circ}\text{C}$ 不宜超过半年。

8 报告

磷酸化标记核酸合成后应附合成报告单或等同的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分:

- a) 名称;
- b) 序列;
- c) 长度;
- d) 纯化方式;
- e) 摩尔量;
- f) 相对分子质量;
- g) 浓度;
- h) 保存条件和有效期。



附录 A
(资料性附录)

磷酸化标记核酸检测指标项目及参考结果

磷酸化标记核酸检测的各指标项目和参考结果参见表 A.1。

表 A.1 磷酸化标记核酸检测指标及参考结果

样品	指标项目		参考结果
磷酸化标记核酸	总量		偏差 $\leq\pm 15\%$
	相对分子质量		偏差 $\leq 0.05\%$
	碱基准确度		偏差 $\leq 0.05\%$
			与定制序列一致
	纯度	紫外吸收强度	 $OD_{260}/OD_{230}: 1.7\sim 1.9$ $OD_{260}/OD_{230} > 1.7$
		色谱纯度	$\geq 85\%$
		质谱纯度	$\geq 85\%$
	碱基缺失率	完全匹配度	$< 5\%$
		碱基缺失率	$< 5\%$
	互补链浓度差	紫外吸收强度	偏差 $< \pm 15\%$
		质谱峰强度比	$> 20\%$
		化合物间浓度差	偏差 $\leq 25\%$
	脱磷酸化产物	脱磷酸产物占比	$< 5\%$
	连接效率	原料胶图转化率/ 相对分子质量	$> 90\%$

附录 B

(资料性附录)

LC-MS 和 HPLC 的设备条件

B.1 液相色谱-质谱法

液相色谱-质谱法流动相配制以及检测条件如下：

- a) 液相色谱-质谱法流动相配制参见表 B.1；
- b) 质谱条件：电喷雾电离源，离子阱质量分析器；
- c) 毛细管电压：4 000 V；
- d) 雾化气压力：0.28 MPa；
- e) 雾化气温度：350 ℃；
- f) 破裂电压：150 V；
- g) 雾化气：氦气；
- h) 色谱柱： C_{18} Column, 130 Å, 2.5 μm , 4.6 mm \times 50 mm；
- i) 柱温：40 ℃；
- j) 流速：0.5 mL/min；
- k) 梯度洗脱条件参见表 B.2。

表 B.1 流动相 A、流动相 B 配制

流动相 A (以 1 L 计算)	0.075% HFIPA (750 μL)	0.037 5% DIEA (375 μL)	10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 10 mL 1 mmol/L EDTA	100% H ₂ O (990 mL H ₂ O)
流动相 B (以 1 L 计算)	0.075% HFIPA (750 μL)	0.037 5% DIEA (375 μL)	10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 10 mL 1 mmol/L EDTA	80% ACN, 20% H ₂ O (800 mL ACN, 190 mL H ₂ O)

表 B.2 梯度洗脱条件(液相色谱-质谱法)

时间 min	流动相 A 体积分数 %	流动相 B 体积分数 %
0	95	5
6	95	5
12	55	45
25	55	45
26	95	5
35	95	5

B.2 高效液相色谱法

高效液相色谱的检测条件如下：

- a) 色谱柱: C₁₈ Column, 130Å, 2.5 μm, 4.6 mm×50 mm;
- b) 流动相 A: 0.1 mol/L TEAA; 流动相 B: 乙腈;
- c) 柱温: 60 °C;
- d) 检测器: 紫外检测器;
- e) 检测波长: 260 nm;
- f) 流速: 1.0 mL/min;
- g) 梯度洗脱条件参见表 B.3。

表 B.3 梯度洗脱条件(高效液相色谱法)

时间 min	流动相 A 体积分数 %	流动相 B 体积分数 %
0	95	5
10	90	10
10.5	70	30
11.5	70	30
12	95	5
15	95	5

