

ICS 07.080

CCS A 40

团体标准

T/SPEMF 0049-2023

T/SZLSBA 01-2023

0n-DNA 的酰胺缩合反应

0n-DNA Amide Condensation Reaction

2023-06-19 发布

2023-06-20 实施

深圳市卓越绩效管理促进会
深圳市生命科学与生物技术协会

发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义、缩略语	1
4 原理	2
5 试剂和材料	3
6 仪器设备	3
7 反应底物的一般要求	3
8 实验步骤	4
9 样品检测	4
10 样品保存	5
附录 A（规范性附录）HPLC 纯化设备分离条件	6

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》的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由深圳市卓越绩效管理促进会和深圳市生命科学与生物技术协会提出并归口。

本文件起草单位：深圳市小分子新药创新中心有限公司、深圳市新樾生物科技有限公司、深圳奇点药物科技有限公司、深圳市生命科学与生物技术协会、深圳市卓越绩效管理促进会。

本文件主要起草人：熊峰、徐林林、陈美红、何询、雷志奇、金锋、张英、王艳梅、王莹。

本文件为首次发布。

On-DNA 的酰胺缩合反应

1 范围

本文件规定了On-DNA酰胺缩合反应的定义、反应底物的一般要求，反应产物的定性和定量检测方法、反应转化率的检测方法、样品的保存和报告。

本文件适用于在DNA编码化合物库构建中On-DNA的酰胺缩合反应。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 39512 磷酸化标记核酸检测通则

GB/T 30988 多酚类植物基因组DNA提取纯化及测试方法

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

脱氧核糖核酸 DNA

是由脱氧核苷酸按一定碱基顺序彼此用3', 5'-磷酸二酯键相连构成的长链。

3.1.2

氨基修饰的 DNA amino modified DNA

在DNA长链的某一位置以化学键的形式连接上氨基官能团，作为化学反应底物。如：



3.1.3

羧基修饰的 DNA carboxyl modified DNA

在DNA长链的某一位置以化学键的形式连接上羧基官能团，作为化学反应底物。

3.1.4

缩合反应 condensation reaction

缩合反应指两个或两个以上有机分子相互作用后以共价键结合成一个大分子,并常伴有失去小分子(如水、氯化氢、醇等)的反应。

3.1.5

On-DNA 的酰胺缩合反应 On-DNA amide condensation reaction

生成酰胺键的缩合反应称为酰胺缩合反应,酰胺缩合反应中以DNA上的反应位点参与化学反应,并在DNA上形成酰胺键的反应称为On-DNA的酰胺缩合反应。如氨基修饰的DNA和羧酸类化合物,相互作用脱去水生成On-DNA酰胺化合物的过程。

3.1.6

DNA 编码化合物库 DNA encoded library

由大量被特异性的已知DNA序列所标记的化合物混合而成的化合物的集合。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

HATU: 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (2-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate)

DMA: N,N-二甲基乙酰胺 (N,N-dimethylacetamide)

DIPEA: N,N-二异丙基乙胺 (N,N-diisopropylethylamine)

ACN: 乙腈 (acetonitrile)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic 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 spectrometry)

ddH₂O: 超纯水 (double distilled water)

TEAA: 三乙基铵醋酸盐 (triethylammonium acetate)

4 原理

4.1 产物定性检测原理

采用LC-MS对DNA样品的相对分子质量 (MW) 进行检测,测得的相对分子质量和计算的理论相对分子质量进行比较得出相对误差,且MW偏差±0.05%内,产物结果正确。

4.2 产物纯度测试原理

采用HPLC对产物核酸的纯度进行测定,根据检测结果计算目标峰面积占所有峰面积的比值,得出产物核酸的纯度。

5 试剂和材料

- 5.1 核酸底物
- 5.2 羧酸底物
- 5.3 ddH₂O
- 5.4 无水乙醇
- 5.5 5M 氯化钠溶液
- 5.6 HATU
- 5.7 DMA
- 5.8 DIPEA
- 5.9 ACN
- 5.10 EDTA
- 5.11 HFIPA
- 5.12 离心管(EP 管)
- 5.13 枪头
- 5.14 离心管架

6 仪器设备

- 6.1 分析天平：感量 0.001g
- 6.2 低温高速离心机
- 6.3 冻干机
- 6.4 酶标仪
- 6.5 高效液相色谱仪
- 6.6 液相色谱-质谱联用仪

7 反应底物的一般要求

7.1 On-DNA 反应底物

氨基修饰的 DNA 或羧基修饰的 DNA 等 On-DNA 反应底物需溶解性良好，溶解后为无色或浅黄色澄清液体，应无悬浮物和机械杂质。

On-DNA 反应底物的分子量和纯度应达到表 1 要求，并按表 1 要求进行抽样检测。
反应前需进行样品定量。

表 1 On-DNA 反应底物要求

测试项目	方法	验收准则
分子量	LC-MS	偏差±0.05%
纯度	HPLC	≥90.00%

7.2 小分子化合物

小分子化合物应有对应的编号、CAS号、分子量、名称、结构式。纯度需达到90%以上，并按标准存放，以及按要求称量。

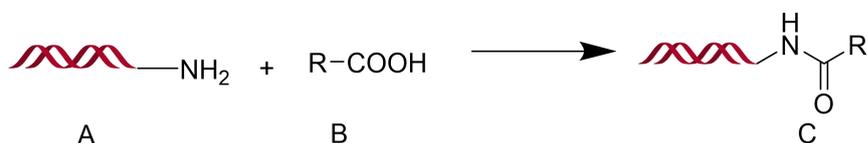
7.3 反应催化剂

反应催化剂应有对应的编号、CAS号、分子量、名称、结构式。纯度90%以上，应按标准存放，以及按要求称量。

反应过程中所使用的缓冲液配置日期不宜超过3个月，以确保缓冲液均为无色透明澄清液体。

8 实验步骤

以氨基修饰的DNA和羧酸化合物为底物的反应方法示例：



8.1 称量化合物

称量化合物前应确保对应小分子化合物的CAS号以及分子量满足称量的要求。

8.2 配液

用N-N-二甲基乙酰胺将羧酸化合物B、DIPEA、HATU均配成0.1M溶液，用超纯水溶解氨基修饰的DNA(A)配置成1nmol/μL。

8.3 活化

将0.1M的羧酸化合物B、DIPEA、HATU各取50μL加入离心管，涡旋5分钟。

8.4 反应

取150μL活化混合物加入到50μL氨基修饰的DNA中，加入100μL超纯水和100μL 0.5M硼酸钠缓冲液(pH9.4)，室温反应1.5h。

8.5 乙醇沉淀

向EP管加入反应液体积10%的5M氯化钠溶液，振荡混匀后，加入总体积3倍的在-20℃储存的冷无水乙醇，于-80℃冰箱冷冻2小时后，在4℃以13500rpm的转速下离心30分钟，吸除上清液后用冻干机冷冻干燥残余液体。

9 样品检测

9.1 HPLC 样品准备

样品冻干后用250μL的超纯水溶解，过滤后加入进样小瓶，确保样品编号准确无误。

9.2 HPLC 纯化

采用 HPLC 仪器对样品的纯度进行测定,设备分离条件参考附录 A ,仪器正常运行,纯化后有 HPLC 报告图。

9.3 LC-MS 样品准备

将 HPLC 纯化后的样品冻干后用超纯水溶解定量,取适量样品进行 LC-MS 检测。

9.4 LC-MS 检测-产物定性检测

产物的理论分子量= $MW(A)+MW(B)-H_2O$

采用 LC-MS 对样品的相对分子质量 (MW) 进行检测,设备分离条件参考附录 A,测得的相对分子量和计算的理论相对分子质量进行比较得出相对误差,且 MW 偏差 $\pm 0.05\%$ 内,产物结果正确。

9.5 产物纯度检测

9.5.1 高效液相色谱法

按照 GB/T 39512 的规定执行。

采用 HPLC 对产物核酸的纯度进行测定,设备运行参考附录 A.根据检测结果计算目标峰面积占所有峰面积的比值,得出产物核酸的纯度。

9.5.2 液相色谱质谱法

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产物核酸的纯度。

9.6 产物总量检测及反应转化率检测

按照 GB/T 30988 的规定执行。

采用紫外分光光度法对产物核酸进行紫外吸收强度检测,测得核酸在 260nm 处的吸收强度即 OD260 数值,测得的 OD260 数值乘以稀释倍数作为最终定量的 OD260 数值,用 OD260 数值除以消光系数转换为样品浓度,样品浓度乘以体积可得出样品总量。

转化率=产物样品总量/On-DNA 底物量*100%

10 样品保存

检测完成后将样品冻干后贮存于-20℃的冰箱,避免反复冻融。稀释后的样品-20℃不宜超过半年。其他酰胺缩合反应条件均可用于构建 DNA 编码化合物库的 On-DNA 的酰胺化反应。

附录 A
(规范性附录)
HPLC纯化设备分离条件

A.1 HPLC分离条件

HPLC 分离参照 GB/T 39512 执行。

A.1.1 色谱柱: C18 Horizon, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm;

A.1.2 流动相 A:0.1mol/L TEAA; 流动相 B: 乙腈;

A.1.3 检测器: 紫外检测器;

A.1.4 检测波长: 260nm、280nm;

A.1.5 流速: 1.0mL/min;

A.1.6 梯度洗脱参见表 A.1。

表 A.1 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	60	40
10.5	50	50
11.5	50	50
12	95	5
15	95	5

A.2 液相色谱-质谱法

液相色谱-质谱法参照 GB/T 39512 执行。

A.2.1 液相色谱-质谱法流动相配制参见表 A.2;

A.2.2 质谱条件: 电喷雾电离源, 离子阱质量分析器;

A.2.3 毛细管电压: 4000V;

A.2.4 雾化气压力: 0.28MPa;

A.2.5 雾化气温度: 350 $^{\circ}$ C;

A.2.6 破裂电压: 150V;

A.2.7 雾化气: 氦气;

A.2.8 色谱柱: C18 Horizon, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm;

A.2.9 流速: 0.5mL/min。

表 A.2 流动相 A、流动相 B 配置

流动相 A (以 1L 计算)	0.075% HFIPA (750 μ L)	0.0375% DIPEA (375 μ L)	10 μ mol/L EDTA 10mL 1mmol/L EDTA	100% H ₂ O (990mL H ₂ O)
流动相 B (以 1L 计算)	0.075% HFIPA (750 μ L)	0.0375% DIPEA (375 μ L)	10 μ mol/L EDTA 10 mL 1mmol/L EDTA	80% ACN,20% H ₂ O (800mLACN, 190mL H ₂ O)