ICS 07.080
CCS A 40

团 体 标 准

T/SPEMF 0050-2023
T/SZLSBA 02-2023

无须配体的活细胞筛选技术规程

Technical standards for selection of ligand-free on living cells

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 3
5 试剂和材料 3
6 仪器设备 3
7 筛选步骤 3
8 qPCR 4

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、谢岸桦、何询、梁文珊、金锋、张英、王艳梅、王莹。

本文件为首次发布。

无须配体的活细胞筛选技术规程

1 范围

本文件规定了无须配体的DNA编码化合物库的活细胞筛选相关流程及检验方法。

本文件适用于无须配体的DNA编码化合物库的活细胞筛选。

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实验方法

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 23814 莲蓉制品中芸豆成分定性PCR检测方法

GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

GB/T 38477 基因表达的测定　蛋白印迹法

GB/T 42076.1 生物技术　细胞计数　第1部分：细胞计数方法通则

GB/T 42077 生物技术　核酸靶序列定量方法的性能评价要求qPCR法和dPCR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

DNA 编码化合物库　DNA encoded library

由大量带已知序列的特异性DNA的化合物混合而成的化合物的集合。

3.1.2

配体　ligand

本身具有特别的生物活性，能和受体特异性结合的生物活性分子。

3.1.3

细胞培养　cell culture

使细胞在体外生长、扩增并维持其生物学特性的过程。

3.1.4

基础培养基 minimalmedium

含细胞生长和增殖必要的基础物质的培养基。

3.1.5

完全培养基　completemedium

含各种添加物,能够满足包括营养缺陷突变型细胞在内的细胞最大限度生长和繁殖需要的培养基。

3.1.6

蛋白质印迹法　western blot

将蛋白样本经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转移到杂交膜上，通过一抗/二抗复合物对靶蛋白进行特异性检测的方法。

3.1.7

聚合酶链式反应　polymerase chain reaction

模板DNA先经高温变性为单链，在DNA聚合酶和适宜的温度下，两条引物分别与模板DNA两条链上的一段互补序列发生退火，接着在DNA聚合酶的催化下以四种dNTP为底物，使退火引物得以延伸，如此反复变性、退火和DNA合成这一循环，使位于两段已知序列之间的DNA片段呈几何倍数扩增。

[来源：引用 GB/T 19495.1-2004 转基因产品检测 通用要求和定义]

3.1.8

琼脂糖凝胶电泳　agarose gel electrophoresis

以琼脂糖作支持介质，根据核酸片段大小进行分离的电泳方法。

3.1.9

实时荧光定量聚合酶链式反应　realtime fluorescence quantitative polymerase chain reaction

将特定DNA片段的体外扩增，与利用荧光信号的积累实时检测和定量扩增过程中特定PCR产物的过程相结合的聚合酶链式反应。

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）

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

qPCR：实时荧光定量聚合酶链式反应（realtime fluorescence quantitative polymerase chain reaction）

PBS：磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline）

FP：正向引物（forward primer）

RP：反向引物（reverse primer）

H2O：水(water)

4 原理

DNA编码化合物库与目标细胞孵育后，高亲和力的目标DNA编码化合物与目标蛋白结合形成复合物，收集与目标蛋白结合的DNA编码化合物，通过测定目标DNA编码化合物的DNA序列信息，确定结合目标蛋白的化合物信息，实现无须配体的活细胞筛选。

5 试剂和材料

5.1 筛选所使用的水为一级水，应符合 GB/T 6682 的要求。
5.2 基础培养基
5.3 完全培养基
5.4 胰酶
5.5 PBS
5.6 NEB Next® Ultra™ II Q5®mastermix
5.7 胶回收试剂盒

6 仪器设备

6.1 细胞培养箱
6.2 细胞计数仪
6.3 生物安全柜
6.4 水平电泳仪
6.5 垂直电泳仪
6.6 金属浴
6.7 离心机
6.8 PCR 仪
6.9 凝胶成像系统

7 筛选步骤

7.1 细胞培养

7.1.1 用适宜的基础培养基复苏细胞，置于适宜环境中培养。
7.1.2 待细胞稳定，更换为适宜的完全培养基。
7.1.3 细胞生长至密度约 80%时，用胰酶消化，800 rpm 离心 3 min，收集细胞。
7.1.4 用完全培养基重悬细胞，以适当密度分装，传代培养。
7.1.5 收集细胞，按照 GB/T 42076.1 的规定执行细胞计数实验。

7.2 蛋白质印迹法

按照GB/T 38477执行。

7.3 筛选

7.3.1 收集 2-3M 细胞，用 PBS 清洗两次。

7.3.2 用 PBS 重悬细胞，加入 DNA 编码化合物库孵育。

7.3.3 用 PBS 充分清洗样品后，置于金属浴中，95 °C 维持 10 min。

7.3.4 13000 rpm 离心 10 min，取上清液。

7.4 PCR

7.4.1 用 PCR 仪扩增筛选产物。

7.4.2 扩增体系：

a）NEB Next® Ultra™ II Q5®mastermix	25μL
b）FP（5μM）	5μL
c）RP（5μM）	5μL
d）筛选产物	8μL
e）H2O	7μL
Total	50μL

7.4.3 扩增程序：

a）92℃ 2min；

b）92℃ 30s，60℃ 1min，72℃ 1min，循环29次。

c）72℃ 7min

d）4℃ forever

7.4.4 进行琼脂糖凝胶电泳，按照 GB/T 23814 的规定执行。

7.5 胶回收

按照胶回收试剂盒说明的流程进行回收。

7.6 回收浓度测定

按照GB/T 34796的规定执行。

8 qPCR

按照GB/T 42077的规定执行。