

R4144 的 A260/230 的提升

实验一：吸附柱和温育溶解 SDS

- 在离心管中，加入 50ul Carrier RNA (50ug), 2000ul Buffer FRL, 200ul Proteinase K 至样品中，涡旋重悬样品。
- 加入 200ul DNase Booster Buffer 至上清液中，涡旋混匀 10 秒。
- 加入 100ul DNase I (20Units/ μ l)至上清液中。轻轻振荡混匀，静置 5 分钟。
现象：溶液浑浊，这是因为 FRL 中的 SDS 被 DNase Booster Buffer 中的 CaCl₂ 沉淀了，产生了一部分沉淀。
- 加入 2000ul Buffer FBD 至样品中，涡旋混匀 15 秒。
 - 取一半混匀液，不温育。【加入 FBD 时混匀后，室温放置 3~5 分钟，沉淀不消失】
 - 取一半混合液，55 度水浴 10 分钟。【加入 FBD 时混匀后，温育 3~5 分钟，沉淀消失】
- 取 450ul 混和液，加入 300ul 无水乙醇至上清液中。涡旋混匀 10 秒。【现象：加入乙醇，沉淀都消失了。】
- 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500ul Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500ul Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500ul Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
- 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 50ul RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
- 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

柱法类型	加温	样品名称	核酸(ng/ μ L)	产量 (μ g)	A260/A280	A260/A230
白色柱子	室温	不加 RWC	45.23	2.26	3.34	1.02
			19.60	0.98	3.21	0.66
		加 RWC	113	5.66	3.49	2.16
			115	5.74	3.53	1.05
	55°水浴	不加 RWC	67.46	3.37	3.37	0.94
			65.47	3.27	3.38	2.56
		加 RWC	116	5.78	3.44	3.02
			119	5.93	3.46	2.85
配套红色柱子	室温	不加 RWC	52.86	2.64	3.04	0.74
			53.60	2.68	3.01	0.72
		加 RWC	112	5.60	3.40	1.29
			118	5.88	3.52	3.01
	55°水浴	不加 RWC	94.44	4.72	3.12	1.27
			95.26	4.76	3.12	1.26
		加 RWC	130	6.48	3.53	1.16
			130	6.50	3.54	2.48

结果表明，

- 加入 RWC 非常重要，而且 RWC 不是影响 A260/230 的关键因素。
- 从结果来看，这个方法都存在 OD260/230 不稳定性的现象。可能的原因：SDS/CaCl₂ 形成的沉淀物没有充分溶解，或被核酸/未消化的颗粒物附着，这些物质在被滤膜截留，未能充分洗涤，最终造成 260/230 不稳定。

实验二：调整结合液对 A260/230 影响。

1. 在离心管中，加入 50ul Carrier RNA, 2000ul Buffer FRL, 200ul Proteinase K 至样品中，涡旋重悬样品。
2. 加入 200ul DNase Booster Buffer 至上清液中，涡旋混匀 10 秒。
3. 加入 100ul DNase I (20Units/ μ l)至上清液中。涡旋混匀 15 秒，静置 1 分钟。
- 条件 1：取 800ul 混和液，加入 800ul Buffer AL， 涡旋混匀，室温放置 3 分钟。
- 条件 2：取 800ul 混和液，加入 800ul Buffer FBD， 涡旋混匀，室温放置 3 分钟。
4. 取 450ul 混和液，加入 300ul 无水乙醇至上清液中。涡旋混匀 10 秒。
5. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500ul Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
2 个柱子加入 RWC 清洗，2 个柱子不加入 RWC 清洗。
7. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500ul Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
8. 弃流出液，把柱子重新装回收集管中。加入 500ul Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 50ul RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。

	样品名称	核酸(ng/ μ l)	产量 (μ l)	回收率%	A260/A280	A260/A230
BUFFER AL	不加 RWC	92.87	4.64	77.72%	3.25	2.58
		98.96	4.95	82.82%	3.28	2.78
	加 RWC	100	5.00	83.76%	3.23	2.35
		104	5.19	86.83%	3.40	2.78
BUFFER FBD	不加 RWC	75.49	3.77	63.18%	3.40	1.91
		76.16	3.81	63.74%	3.39	2.56
	加 RWC	97.41	4.87	81.52%	3.44	2.13
		96.11	4.81	80.43%	3.38	0.83
对照		119	5.97		3.70	3.81

结果：

- 1: 从 Buffer FBD 的 A260/230 都在存不稳定的现象。
- 2: 从这个结果来看，Buffer AL 作为结合液时，在 260/230 更为稳定。

原因：由于 DNase Booster Buffer 需要把 SDS 完全沉淀后，DNase 才能高效起作用。选择好的结合液，让沉淀后的 SDS 充分溶解，然后再过滤吸附才能让 A260/230 更加稳定。结果表明，Buffer AL(盐酸胍) 作为结合液，A260/230 最为稳定。