

核酸适配体折叠动力学探究

蔡瑾¹

¹ 中山大学 物理学院，广州 510275

目录

1	Adaptor1 的制备	2
1.1	Annealing	2
2	5’Bio-2.9k handle-Adaptor1 的制备	2
2.1	质粒扩增	2
	质粒扩增	2
	琼脂糖凝胶电泳	2
2.2	PCR——制备 2.9k handle	3
	PCR	3
	Purification	3
2.3	检验 Biotin	3
	琼脂糖凝胶电泳	4
2.4	BsaI 酶切	4
	BsaI Digestion	4
	Purification	4
2.5	Ligate 5’Bio-2.9k handle with Adaptor1	5
	Ligation	5
	Purification	5
3	Pepper RNA 的制备	5
3.1	Transcription	5
3.2	降解 DNA 模板链	6
3.3	乙醇沉淀法提纯	6
4	Annealing: Bio-handle-adaptor1 + Pepper RNA + Adaptor2-dig	7
4.1	Annealing	7
4.2	Purification	8
5	MT 实验	8
5.1	Chamber	8
5.2	MT	11

中山大学本科生
科研训练项目
(2025)

归属人
蔡瑾

学号
23363052

通讯邮箱
caij77@mail2.sysu.edu.cn

1 Adaptor1 的制备

1.1 Annealing

表 1. Annealing: Adaptor1

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
Pepper Adaptor1 Upper	100 μ M	5	
Pepper Adaptor1 Lower	100 μ M	5	
Annealing Buffer	10×	2	1×
H ₂ O		8	
Total		20	

95°C for 5min, then decrease the temperature at the rate of 0.1°C/10s, for 910 cycles, 4°C for ∞ .

2 5'Bio-2.9k handle-Adaptor1 的制备

2.1 质粒扩增

我们已有足量 PLB601。

质粒扩增

用感受态细胞 trans5a 扩增 PLB601 质粒。参考我的笔记。

琼脂糖凝胶电泳

质粒应有 3 个条带，从快到慢分别是环状、线性、带 Nick 环状 DNA。

2.2 PCR——制备 2.9k handle

PCR

表 2. PCR: 制备带 Biotin 的 2.9k handle

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
KOD Fx	1U/ λ	1	
KOD Buffer	2×	25	1×
PLB601	10ng/ μ L	5	
2.9k-Bsal-handle-F(100 μ M)	10 μ M	2	
5'Bio-2.9k-Bsal-handle-R(100 μ M)	10 μ M	2	
dNTPs	2mM each	10	
H ₂ O		5	
Total		50	

蓝色字的试剂需要稀释。

1. 94°C, 2min
2. 98°C, 10s
3. 53.9°C, 30s
4. 68°C, 3min10s. Return to 2, for 40 cycles.
5. 68°C, 5min
6. 4°C, ∞

程序保存在 PCR 仪中: CJ-HKY/KOD.

Purification

Purify via **TIANGEN**. Add **3 times volume of PC** into DNA first. Elute with 50 μ L TE(65°C).

2.3 检验 Biotin

Add 1 μ L SA into 100ng Bio-handle, mix well. Incubate at room temperature for 15min. Then run gel.

琼脂糖凝胶电泳

- #1: 250-10000 marker
- #2: Bio-handle①
- #3: Bio-handle①+SA
- ...
- #n: 250-10000 marker

120V for 60min.

若加了 SA 的比未加 SA 的慢，则说明 PCR 获得的 handle 上的确有 Biotin, 可以进行下一步实验。

2.4 BsaI 酶切

BsaI Digestion

表 3. BsaI Digestion

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
5 ' Bio-handle	c	V	
BsaI-HF v2	$20U/\mu L$	$x \approx \frac{cV(pN)}{0.031 \times 7} \times 2/20$	
rCutSmart Buffer	10×	$y/10$	1×
H ₂ O		$y - (V + x + \frac{y}{10})$	
Total		y	

37°C for 3h.

Purification

Purify via **PureLink** with **B3**, elute with 50 μ L EB. (不可以用天根的 DNA 纯化试剂盒，因为酶切下来的片段长度约为 34-39bp，谭老师说 >30bp 后就不能用天根取代 PureLink 的 B3 了。)

2.5 Ligate 5'Bio-2.9k handle with Adaptor1

Ligation

表 4. Ligation

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
BsaI Cut 5'Bio-2.9k Handle	c	V_1 (such as 13)	
Pepper Adaptor 1	2.5 μ M	$V_2 = \frac{c \times V}{2.5\mu M}$	
T4 DNA Ligase	400U/ μ L	1.5	
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	10 \times	2	
H ₂ O		20 - V_1 - V_2 - 3.5	
Total		20	

Incubate at 16°C for 16h.

Purification

Purify via **PureLink** with **B3**, elute with 20 μ L TE(65°C). (同样不可用天根取代)

3 Pepper RNA 的制备

3.1 Transcription

表 5. Pepper RNA Transcription

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
Pepper RNA Template	5 μ M	2	100nM
Transcription Buffer	5 \times	20	1 \times
NTPs	25mM	2	0.5mM
RNase Inhibitor	40U/ μ L	2.5	1U/ μ L
DTT	100mM	10	10mM
His-tag T7 RNA Polymerase	\sim 1 μ M	2.5	
H ₂ O		61	
Total		100	

37°C for 80min.

3.2 降解 DNA 模板链

DNase Digestion

表 6. DNase Digestion

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
RNA		100	
RQ1 RNase-free DNase Reaction Buffer	10×	12	1×
RQ1 RNase-free DNase	1U/ μ L	2	0.017U/ μ L
RNase Inhibitor	40U/ μ L	2	0.73U/ μ L
H ₂ O		4	
Total		120	

37°C for 40min. Then add 13 μ L **RQ1 DNase stop solution**, 65° for 10min.

3.3 乙醇沉淀法提纯

乙醇沉淀法（一）

表 7. 乙醇沉淀法

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
RNA		133(20%)	
乙酸铵	10M	33.25(5%)	0.5M
乙醇	100%	498.75(75%)	75%
Total		665	

乙醇、乙酸铵需要预冷。

-20°C overnight, but things could be better if time is longer.

乙醇沉淀法（二）

1. 4°C 下 16000rpm(~ 17794g) 离心 10min。
2. 去除上清液，注意不要接触到核酸沉淀。
3. 加入 0.5mL 冷 70% 乙醇。4°C 下 16000rpm(~ 17794g) 离心 10min。
4. 室温下敞盖约 5min 至残留液体（主要是乙醇）挥发干净。
5. 用 100 μ L 的 TE 溶解 RNA。

乙醇沉淀法（三）

表 8. 乙醇重沉淀

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
RNA		~ 100(20%)	
乙酸铵	10M	25(5%)	0.5M
乙醇	100%	375(75%)	75%
Total		500	

乙醇、乙酸铵需要预冷。

-20°C 下保存。

4 Annealing: Bio-handle-adaptor1 + Pepper RNA + Adaptor2-dig

4.1 Annealing

取用 RNA

1. 4°C 下 16000rpm(~ 17794g) 离心 10min。
2. 去除上清液，注意不要接触到核酸沉淀。
3. 加入 0.5mL 冷 70% 乙醇。4°C 下 16000rpm(~ 17794g) 离心 10min。
4. 室温下敞盖约 5min 至残留液体（主要是乙醇）挥发干净。
5. 用 100 μ L 的 TE 溶解 RNA。

Annealing

表 9. Annealing

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
5'Bio-2.9k Pepper Handle+Adaptor1	c_1	18(1:10:20)	
Pepper RNA	c_2	$V_1 = \frac{c_1 \times 18}{c_2} \times 10$	
5'Dig-Pepper Handle2	$c_3 = 2\mu M$	$V_2 = \frac{c_1 \times 18}{c_3} \times 20$	
SSC Buffer ¹	20×	$V/20$	1×
EDTA	50mM	$V/50$	1mM
H ₂ O		$V - (18 + 1.5 + 0.6 + V_1 + V_2)$	
Total		V	

¹SSC Buffer: 3M NaCl, 300mM NaOAc pH7.0

80°C for 10min, then decrease the temperature at the rate of 0.1°C/10s, for 760 cycles, 4°C for ∞ .

RNA 的乙醇重沉淀

表 10. 乙醇重沉淀

Reagent	ini con.	volume(λ)	final con.
RNA		~ 100(20%)	
乙酸铵	10M	25(5%)	0.5M
乙醇	100%	375(75%)	75%
Total		500	

乙醇、乙酸铵需要预冷。

-20°C 下保存。

4.2 Purification

Purify via PureLink, with **B3** buffer. Elute with 20 μ L TE(room temperature because of RNA). (同样不能用天根取代)

5 MT 实验

5.1 Chamber

- #1: 2.8k DNA
- #2: Pepper RNA Sample

- #3: Pepper RNA Sample

表 11. 稀释

试剂	稀释前浓度	稀释后浓度	在冰箱中的位置
SB	1/10	1/100	-4°C 冰箱 QGZ 盒/GYH 盒
anti-dig	0.2	0.02 mg/mL	-4°C 冰箱 QGZ 盒/GYH 盒
cassein	12	6 mg/mL	-20°C 冰箱 QGZ 盒
M270	1/10	1/20	-4°C 冰箱 QGZ 盒/GYH 盒
2.8k DNA		10pM	-20°C 冰箱 QGZ 盒
pepper RNA sample		50pM	-20°C 冰箱 CJHKY 盒

稀释 SB: $1/10 \xrightarrow{\div 10} 1/100$

表 12. SB for DNA

Reagent	volume(λ)
SB	1
H ₂ O	9
Total	10

表 13. SB for Pepper

Reagent	volume(λ)
SB	2
5× TB	4
H ₂ O	14
Total	20

稀释 anti-dig: $0.2 \xrightarrow{\div 10} 0.02\text{mg/mL}$

表 14. Anti-dig for DNA

Reagent	volume(λ)
Anti-dig	1
H ₂ O	9
Total	10

表 15. Anti-dig for Pepper

Reagent	volume(λ)
Anti-dig	2
5 \times TB	4
H ₂ O	14
Total	20

稀释 casein: $12 \xrightarrow{\div 2} 6\text{mg/mL}$

表 16. Casein for DNA

Reagent	volume(λ)
Casein	10
H ₂ O	10
Total	20

表 17. Casein for Pepper

Reagent	volume(λ)
Casein	20
5 \times TB	8
H ₂ O	12
Total	40

稀释 M270: $1/10 \xrightarrow{\div 2} 1/20$

表 18. M270 for DNA

Reagent	volume(λ)
Cassein	5
H ₂ O	5
Total	10

表 19. M270 for Pepper

Reagent	volume(λ)
Cassein	10
5 \times TB	4
H ₂ O	6
Total	20

Chamber

表 20. Chamber

试剂	Volume(λ)	等待时间 (min)
PBS/TB	10	
SB	10	20
PBS/TB	20	
anti-dig	10	10
PBS/TB	10	
cassein	20	15
PBS/TB	20	
DNA	10	15
PBS/TB	10	
M270	10	10
PBS/TB	40	

5.2 MT

拉伸到约 35pN 时开始回复，否则样品会断。