**六边形折纸单体及其二聚体的验证实验**

**准备：**

1. Scaffold：M13mp18
2. Staple

分类：将单体1与单体2不同的staple，分为两类，写好标签，保存在冰箱冷冻层。

1. Buffer 1：1x TAE，含12.5 mM Mg2+

制备方法：50 mL橙盖细胞培养管。冰箱取购置的50x TAE，抽屉取一次性移液管（50 mL规格），用电动移液器取1 mL 50x TAE加入培养管，加入49 mL超纯水（超纯水仪取水，干净烧杯接）。天平秤量m g 氯化镁六水或醋酸镁四水，加入混匀。（药品在天平下面柜子里，计算公式：m=Mn=MCV）。

4） Buffer 2： 10x TAE，含125 mM Mg2+

制备方法：取一个50 mL培养管。取10 mL 50x TAE，加40 mL超纯水，加10m g氯化镁六水or醋酸镁四水，混匀。

**一、六边形折纸单体的验证实验**

1. **溶解干粉**
2. 沉降：离心60 s，让运输过程中飘散的干粉沉降到试管底。离心后轻轻取出。
3. 溶解：按试管壁上要求，加入对应体积的Buffer 1溶解（scaffold、staple）。
4. 混匀：使用桌面震荡仪震荡数秒，离心。
5. **封装同类staple**
6. 将staple每条取5 uL混合在1500 uL小试管内，得到混合母液。
7. 混匀：震荡离心。
8. **计算浓度（估值）**
9. 做配置液：将上述混合母液分别加Buffer 1稀释1/10。
10. 测浓度：用IMPLEN超微量分光光度计NanoPhotometer测量配置液的吸光度（ng/uL）。
11. 加入Buffer 1进行空白测试
12. 加入Buffer 1+scaffold / Buffer 1+staple 分别进行3次测量，取中间值（ng/uL）
13. 计算：将测量的ng/uL单位转化为nMol/L（将管内所有staple视为一条长链，除以 （总碱基数）\*300 g/Mol）
14. **计算反应体系，并加样**

Cstaple配Vstaple配 = Cstaple终V终

Cscaffold配Vscaffold配 = Cscaffold终V终

V终 = 30 uL

Cstaple终 = 25 nMol/L

Cscaffold终 = 2.5 nMol/L

Cstaple配、Cscaffold配由步骤3得出

1. 计算体系：根据n=CV终点反应体积30 uL，scaffold终点浓度为2.5 nMol/L；staple终点浓度为25 nMol/L，计算scaffold和staple的取液体积V配。计算Buffer 2的取液体积V2。剩余用Buffer 1补充。
2. 加样：取 100uL PCR管，按计算取样混合，加入 1/10 Vscaffold配 的Buffer 2补充Mg2+，在混合溶液的体积接近30uL的时候，使用Buffer 1进行填充，补充到30uL。
3. 混匀：震荡离心。
4. **退火形成折纸结构**
5. 写PCR程序[1]

95°C to 85°C: -0.1°C Every 8 sec

85°C to 65°C: -0.1°C Every 30 sec

65°C to 45°C: -0.1°C Every 40 sec

45°C to 25°C: -0.1°C Every 2 min

25°C to 4°C: -0.1°C Every 15 sec

1. 选通道，填反应体积，运行。
2. **通过原子力显微镜进行结构的观察**

结果：观察是否形成六边形折纸单体

**二、六边形折纸二聚体的验证实验**

1. **孵育法**

将上述制备好的两类六边形分为两组，分别加入等量的不同组的六边形在37°C进行孵育，使用原子力显微镜进行观察二聚体。

结果：观察是否形成六边形折纸二聚体

**参考文献**

[1] Chen C, Lin T, Ma M, et al. Programmable and scalable assembly of a flexible hexagonal DNA origami[J]. Nanotechnology, 2021, 33(10): 105606.