

## Carrier RNA 对 A260/280 和 A260/230 的影响

Carrier RNA, 也叫载体 RNA、poly A 多聚腺苷酸, 是通过多核苷酸磷酸化酶聚合腺苷酸而成的, 长度为 100~10000nt 的寡聚腺苷酸混合物。在核酸提取应用中, Carrier RNA 常常作为添加剂, 添到裂解液或结合液中来提高微量样品的核酸提取效率。因 Carrier RNA 为寡聚单链核苷酸, 其 OD260/280 和 OD260/230 都比较高, 与双链 DNA 和总 RNA (18S, 28S, mRNA) 有明显不同。

取 5mg 不同厂家的 Carrier RNA, 加入 10ml DEPC 处理水溶解成 500ng/ul, 然后测量 OD 值, 结果如下。从表格可知纯化的 Carrier RNA, 其 OD260/280 在 2.9-3.0, A260/230 在 4.0-5.0。而双链 DNA 和总 RNA (18S, 28S, mRNA), 其 OD260/280=1.8~2.0, OD260/230=1.5-2.5, 有明显差别。

品牌	溶解后浓度	浓度 (ng/ul)	A260/280	A260/230
Magen	取 5mg	530.90	2.96	4.62
A 公司	Carrier RNA	566.95	2.92	4.43
B 公司	干粉, 溶解成 500ng/ul	473.52	3.01	4.78

在美基的产品中, D3125 (微量 DNA 提取试剂盒), R4171 (病毒 RNA 提取试剂盒), R4173 (病毒 DNA/RNA 提取盒), D3182 (游离 DNA 提取试剂盒), IVD5412 (磁珠法病毒 RNA/DNA 试剂盒) 等都提供了 Carrier RNA 来提高微量样品的核酸回收率。经试剂盒提取纯度, Carrier RNA 也被回收, 并洗脱到产物中, 其回收率高达 70-85%, 进行分光光度计测量时, 样品核酸 (DNA/RNA) 与 Carrier RNA 形成的混合物会造成 OD260/280, D260/230 和核酸浓度的变化。为验证在不同核酸含量的样品中, Carrier RNA 对 OD 值和浓度的影响, 我们采用了 IVD541217 磁珠提取试剂盒, 用超纯水 (无核酸)、超纯水稀释的 DNA Marker (DNA), 以及不同含量的细菌培养液作为样品, 然后用试剂盒进行提取和纯化, 测量 OD 值。

样品类型	提取试剂盒	Carrier RNA 添加量	核酸 (ng/ul)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
超纯水	IVD541217	添加 2.5ug Carrier RNA	26.87	2.42	3.45	3.12
			27.63	2.49	3.21	2.81
		不加	0.38	0.03	0.75	0.25
			0.35	0.03	0.53	0.26
超纯水 (加 20ul DNA Marker)		添加 2.5ug Carrier RNA	49.66	4.47	2.53	2.74
			51.30	4.62	2.50	2.70
		不加	20.51	1.85	1.84	2.10
			20.35	1.83	1.81	2.06
100ul LB 细菌培养液	添加 2.5ug Carrier RNA	66.27	5.96	2.29	2.40	
		67.00	6.03	2.29	2.40	
	不加	51.90	4.67	2.11	2.14	
		50.83	4.58	2.11	2.21	
200ul LB 细菌培养液	添加 2.5ug Carrier RNA	115.48	10.39	2.22	2.37	
		117.64	10.59	2.24	2.39	
	不加	103.45	9.31	2.13	2.26	
		100.25	9.02	2.13	2.28	

由结果可以,

1. 用无核酸的超纯水作为样品时，Carrier RNA 可以被 IVD541217 试剂盒高效回收，回收率高达 85%以上。此时 OD260/280，OD260/230 基本与寡聚单链核苷酸相当。
2. 不同含量的样品中，Carrier RNA 对 OD260/280 的影响不一样的。随着核酸浓度上升，OD260/280 从 3.0 下降至 2.2，这是因为洗脱产物中 Carrier RNA 占比逐步降低，细胞双链 DNA 和总 RNA 上升，所以比值更为正常。当核酸浓度上升至 60-70ng/ul，OD260/280<2.3，已经开始接近总 RNA 的 OD260/280=2.0~2.1。超过 60-70ng/ul 时，添加组 A260/280 会提升 0.1-0.2。
3. 不同含量的样品中，Carrier RNA 对 OD260/230 的影响不一样的。随着核酸浓度上升，OD260/230 从 3.0 下降至 2.2，这也是因为洗脱产物中 Carrier RNA 占比逐步降低，细胞 DNA 和总 RNA 上升，所以比值更为正常。当核酸浓度上升至 60-70ng/ul，OD260/230<2.4。对比 100ng/ul 的实验组，添加组和未添加组中，A260/230 比值相差 0.1~0.2，说明双链 DNA 和总 RNA 占比越高，Carrier RNA 影响就越少。
4. 本次实验只添加 2.5ug Carrier RNA 作为辅助剂来提高核酸回收效果。若使用 R4171，R4173 等柱法病毒提取试剂盒，Carrier RNA 添加量高达 5ug，对核酸浓度、OD260/230，OD260/280 影响更为明显。且大部分病毒提取试剂盒处理的生物样品都是血浆、血清、培养液上清、组织匀浆液上清，拭子浸泡液等都是无细胞样品，其本身样品的核酸含量很低 (<10ng/ul)。添加大量的 Carrier RNA 后，得到的洗脱产物中，Carrier RNA 占比 98-99%以上，此时测 OD 得到的比例和浓度只反应了 Carrier RNA 的属性，没有太大的参考价值。