4. Wyodrębnianie RNA z drożdży

RNA obecne w drożdżach można wyekstrahować ze zhomogenizowanych komórek za pomoc 2% roztworu soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS). Tak otrzymany ekstrakt zawiera niewielkie ilości DNA (<0,5%) i białka (<2,0%).

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny.
1. świeże drożdże
2. 2% roztwór SDS (soli sodowej siarczanu dodecylu)
3. 2 M roztwór NaOH
4. 2 M roztwór HCl
5. 95% Etanol
6. Roztwór octanu potasu (200 g/L, pH 5,0)
7. 0,2 M roztwór NaOH
8. Wirówka
9. Probówki wirówkowe
10. Probówki zwykłe szklane
11. Łaźnia wodna
12. Kolby płaskodenne i okrągłodenne
13. Cylindry miarowe
14. Zlewki

Wykonanie doświadczenia:

*1. Izolacja RNA**

* Izolację RNA przeprowadzać w rękawiczkach

W erlenmajerce doprowadzić do wrzenia 10 mL 2% roztworu soli sodowej siarczanu dodecylu. Do wrzącego roztworu dodać 2 g rozdrobnionych świeżych drożdży i zawartość ogrzewać przez 3 minuty. Następnie kolbę schłodzić strumieniem zimnej wody z kranu, przenieść zawartość kolby do probówki wirówkowej i odwirować przez 10 minut przy 6000 RPM. Supernatant przenieść do erlenmajerki, dodać 1 mL octanu potasu, aby końcowe stężenie soli wynosiło 20 g/L, a następnie dwie objętości etanolu (22 mL). Mieszaninę z wytrąconym RNA pozostawić na łaźni lodowej przez 0,5 godziny, a następnie odwirować przez 6 minut przy 6000 RPM. Roztwór znad osadu zdekantować, zaś otrzymany osad RNA rozpuścić w 8 mL 0,2 M roztworu NaOH. Tak otrzymany roztwór RNA zawiera stosunkowo dużo frakcję białkową, którą można dalej oddzielić na drodze chromatograficznej.

2. Oszacowanie zawartości RNA i białek

Pomiary absorbancji wykonujemy w kuwetach kwarcowych

Zawartość RNA i białek można oszacować wykorzystując charakterystyczne dla tych grup związków pasma absorbcji w ultrafiolecie. Kwasy nukleinowe wykazują maksimum absorbcji przy 260 nm. Empirycznie stwierdzono, że A_{260}=1 odpowiada stężeniu około 50 µg/mL. Podobnie dla białek, wykorzystując ich charakterystyczne pasma absorbcji w ultrafiolecie, wyznaczono empirycznie kilka wzorów, pozwalających na oszacowanie ich stężenia. Kilka z nich przedstawiono poniżej:

$$C\ (mg/mL) = 0{,}4\ (A_{235} - A_{280})$$
$$C\ (mg/mL) = 1{,}55\ A_{280} - 0{,}76\ A_{260}$$
$$C\ (mg/mL) = 0{,}144\ (A_{215} - A_{225})$$

Przed pomiarem wykonać rozcieńczenie wyizolowanego RNA. Z przygotowanego w pkt 1 roztworu pobrać 20 µl i dodać do 2 mL 0,2 M roztworu NaOH.

Na podstawie pomiarów absorbcji charakterystycznych pasm dla białek i kwasów nukleinowych oszacować ilość obydwu grup związków w wyizolowanym preparacie 9 (w obliczeniach uwzględnić rozcieńczenie roztworu podstawowego (8 ml)).

3. Określenie rozpuszczalności RNA

- *w roztworach kwasów i zasad*
  Z otrzymanego w poprzednim doświadczeniu roztworu RNA w 0,2 M roztworze NaOH (rybonukleinianu sodu) pobrać 1 mL, umieścić w probówce szklanej, a następnie dodawać kroplami 2 M roztwór HCl. Zaobserwować wytrącanie się RNA. Następnie do tej samej probówki ponownie dodawać kroplami 2 M roztwór NaOH. Zaobserwować rozpuszczanie osadu.

- *w etanolu*
  Z otrzymanego w poprzednim doświadczeniu roztworu RNA w 0,2 M roztworze NaOH (rybonukleinianu sodu) pobrać 1 mL, umieścić w probówce szklanej, a następnie dodawać kroplami etanol. Opisać pojawiające się w probówce zmiany.

Zakres materiału:
Budowa i funkcje kwasów nukleinowych.