

4. Wyodrębnianie RNA z drożdży

RNA obecne w drożdżach można wyekstrahować ze zhomogenizowanych komórek za pomocą 2% roztworu soli sodowej siarczanu dodecyłu (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 dodecyłu)
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 30 mL 2% roztworu soli sodowej siarczanu dodecyłu. Do wrzącego roztworu dodać 10 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 taką objętość octanu potasu, aby końcowe stężenie soli wynosiło 20 g/L, a następnie dwie objętości etanolu. Mieszaninę z wytrąconym RNA pozostawić na łaźni lodowej przez 0,5 godziny, a następnie odwirować przez 6 minut przy 6000 RPM. Roztwór z nad osadu zdekantować, zaś otrzymany osad RNA rozpuścić w 10 mL 0,2 M roztworu NaOH. Tak otrzymany roztwór RNA zawiera stosunkowo dużą frakcję białkową, którą można dalej oddzielić na drodze chromatograficznej.

2. Oszacowanie zawartości RNA i białek

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

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

Na podstawie pomiarów absorpcji charakterystycznych pasm dla białek i kwasów nukleinowych oszacować zawartość obydwu grup związków w wyizolowanym preparacie.

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.