**实验六 酵母RNA的分离及组分鉴定**

一、目的

学习核酸的制备方法，了解核酸的组分，并掌握鉴定核酸组分的方法。

二、原理

酵母中富含核酸，主要是RNA(约占干重3-10%)，DNA则很少，酵母RNA提取过程是先使RNA从酵母细胞中释放出来，并把它和蛋白质分离。RNA与蛋白质的分离是采用稀碱溶液溶解法，再离心使之与菌体蛋白分离。由于DNA在稀碱溶液中较稳定，因而DNA随菌体蛋白一起弃去，使得DNA和RNA分离。然后利用核酸在酸性乙醇中不溶解的性质，使RNA沉淀下来。

RNA含有核糖、嘌呤碱、嘧啶碱和磷酸各组分，加硫酸煮沸可使其水解，从水解液中可以测出上述组分的存在。

三、试剂及器材

试剂：

1．干酵母粉或新鲜酵母(市售)

2．0.2%氢氧化钠溶液：2g NaOH溶于蒸馏水并稀释至1000mL 。

3．10%硫酸：量取10mL浓硫酸(比重1.84)缓缓倒人86mL蒸馏水中。

4．95%乙醇。

5．无水乙醚。

6．氨水。

7．乙酸。

8．5%硝酸银溶液：5g AgNO3溶于蒸馏水并稀释至100mL，贮于棕色瓶。

9．钼酸铵试剂：29.0g钼酸铵溶于3mol/L 400mL的硝酸溶液中。

10．苔黑酚一三氯化铁试剂：将100mL浓盐酸中，再加入100mgFCl3.6H2O(临用时配制)。

器材：

量筒(100mL)、烧杯(100mL)、锥形瓶(100mL)、移液管(1mL、2mL)、滴管、玻璃、离心机、离心管(80mL)、试管及试管夹、水浴锅、台秤、天平、石蕊试纸等。

四、操作方法

（一）RNA的提取

1、稀碱溶解RNA（此步骤已做好）：称取50g干酵母粉，放于500ml烧杯中，倒入0.1M NaOH 250ml，搅匀后沸水浴60分钟，中途用0.1M NaOH调节PH值不低于7.5 ，最后用水定容至500ml，

2、冷却后量取20ml离心（4000rpm\*20min）【**用水平衡**】，将上清液倒入另一离心管中备用。

3、沉淀RNA：在上清液中加入50%乙酸2 mL调酸，此时溶液pH值在5左右，溶液开始出现白色沉淀。再加入无水乙醇20mL，此时溶液含乙醇55%左右，摇匀后静止5分钟，离心（4000rpm\*10min）【**用水或95%乙醇平衡**】，倒去上清液留沉淀。

4、洗涤沉淀：加入95%乙醇15ml，充分搅碎后静止5分钟，离心（4000rpm\*5min）【**用95%乙醇平衡**】，留沉淀。

5、脱水：加入无水乙醇10ml，充分搅碎后静止5分钟，离心（4000rpm\*5min），留沉淀。【**用无水乙醇平衡**】

6、脱脂：加入无水乙醚10ml（此操作在通风橱内进行，取量尽量准确，离心时不再平衡），充分搅碎后放置10min,离心（2000rpm\*5min）【**注意调低转速，不再平衡**】，(离心时，离心管盖子一定要盖紧)。留沉淀，上清液倒在通风橱内的废液杯中。

7、风干，将沉淀物敞开在通风橱中（将离心管插在通风橱内的离心管架上），下次再称量。

（二）RNA的鉴定

1、RNA的水解：将上个实验制备的RNA粗品称量后移入试管，捣碎后加10% H2SO4 5 mL，搅匀后沸水浴至透明（约需40min，中途搅拌1~2次）。

2、冷却后，移入15mL离心管，4000rpm\*10min，将上清液倒入一干净试管中备用，离心管立即冲洗干净。

3、嘌呤碱鉴定：取水解液1mL，加入浓氨水1 mL，摇匀，滴加 5% AgNO3 2滴，静止片刻→白色絮状沉淀。

4、核糖鉴定：取水解液1mL，0.2% FeCl3 0.5mL，0.2% 苔黑酚 0.5mL，摇匀，沸水浴约5min →（草绿→鲜绿→深绿）

5、磷酸鉴定：取水解液1mL，加入饱和钼酸铵试剂1 mL（注意别吸出试剂瓶底部的沉淀物），摇匀后静止片刻→ 黄色乳状沉淀。

五、实验结果

六、讨论

七、思考题

本实验中氢氧化钠、硫酸、醋酸、乙醇、乙醚分别起到什么作用？