

# Vergleichende Beurteilung der Reinheit von RNA mithilfe von UV-Vis-Simultanmessungen

Evaluierung der Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die  $A_{260/280}$  von RNA mithilfe des Agilent Cary 3500 UV-Vis



## Autor

Aveline Neo  
Agilent Technologies, Inc.

## Zusammenfassung

Die Standardmethode zur Beurteilung der Reinheit von Nukleinsäuren verwendet spektrophotometrische Extinktionsmessungen bei Wellenlängen von 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ). In dieser Application Note wird dargelegt, dass Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenstärke des Puffers einer Ribonukleinsäure(RNA)-Probe das  $A_{260/280}$ -Verhältnis beeinflussen. Andere Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis einer Proteinkontamination deutlich verbessert wird, wenn RNA in einer alkalischen Lösung untersucht wird. Diese Studie unterstreicht die Vorteile der gleichzeitigen Durchführung mehrerer Experimente mit einem Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometer und der Verwendung der eingebauten Gleichungsfunktionen der Software des Cary 3500 UV-Vis zur Beurteilung der RNA-Reinheit.

## Einleitung

Die Beurteilung der Integrität und Reinheit von RNA ist entscheidend für die Gewährleistung der RNA-Qualität für nachfolgende Experimente und Applikationen. Beschädigte oder kontaminierte RNA kann zu unzuverlässigen Genexpressionsergebnissen führen, was sich möglicherweise auf die Schlussfolgerungen aus dieser Art von Analysen auswirkt.<sup>1</sup> Da eingekapselte RNA auch als Arzneimittel verwendet werden kann, ist die RNA-Qualität ein entscheidendes Qualitätsmerkmal bei Applikationen der pharmazeutischen Herstellung.

Spektrophotometrie zur Quantifizierung und Bewertung der Reinheit von RNA ist ein etabliertes Verfahren. Das  $A_{260/280}$ -Verhältnis, das durch Messung der Extinktion der Probe bei 260 und 280 nm bestimmt wird, dient zur Beurteilung der Reinheit einer Nukleinsäureprobe. Die Extinktion bei 260 nm zeigt vor allem das Vorhandensein von Nukleinsäuren an, während die Extinktion bei 280 nm das Vorhandensein von kontaminierenden Proteinen anzeigt. Demnach hätte eine reine RNA-Probe ein  $A_{260/280}$ -Verhältnis von 2,00, während eine Protein-Probe ein Verhältnis von 0,57 aufweisen würde.<sup>2</sup>

Das  $A_{260/280}$ -Verhältnis ist ein nützlicher Parameter, allerdings berichteten Wilfinger *et al.*, dass der pH-Wert und die Konzentration der bei spektrophotometrischen Auswertungen verwendeten Lösung diesen Wert erheblich beeinflussen können.<sup>3</sup> Auch die quantitative Bewertung von Nukleinsäurepräparaten wird durch den pH-Wert und die Konzentration beeinflusst.

In dieser Studie wurden ähnliche Experimente wie die von Wilfinger *et al.* beschriebenen mit einem Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometer durchgeführt (Abbildung 1). Das Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis ist ein innovatives System mit acht Küvettenpositionen zur Verbesserung der Messeffizienz. Durch die gleichzeitige Messung der UV-Extinktion mehrerer Proben mithilfe des Cary 3500 werden unerwünschte Schwankungen vermieden und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wird verbessert. Die eingebaute Gleichungsfunktion der Agilent Cary UV Workstation-Software berechnet das  $A_{260/280}$ -Verhältnis automatisch basierend auf den UV-Scans, wodurch sich der Durchsatz der Analysen weiter erhöht.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke der RNA-Probenlösung auf das  $A_{260/280}$ -Verhältnis und auf die Identifizierung einer Proteinkontamination in RNA mithilfe des Cary 3500 untersucht. Ferner wurden Vergleiche der UV-Extinktionsscans der RNA in zwei verschiedenen Puffern und Wasser durchgeführt.



**Abbildung 1.** Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometer.

## Experimentelles

### Geräte

In dieser Studie wurde ein Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometer verwendet. Die Datenakquisition wurde mit der Agilent Cary UV Workstation-Software (Version 1.4.256) mit Cary 3500 Multizonen-Software-Add-On mit den in Tabelle 1 zusammengefassten Parametern durchgeführt. Die Software enthält mehr als 50 Gleichungsfunktionen. Es wurden rechteckige Ultra-Mikrovolumen-Küvetten mit einer UV-Schichtdicke von 10 mm und einem Füllvolumen von 70  $\mu$ l (Bestellnummer 5062-2496) verwendet. Für jede Küvette wurde ein Probenvolumen von 50  $\mu$ l verwendet. Derart kleine Probenvolumina können mit dem Cary 3500 gemessen werden, da der stark gebündelte, gleichmäßige Strahl weniger als 1,5 mm breit ist und die stationären Küvettenhalter permanent optisch ausgerichtet sind.

**Tabelle 1.** Parameter des Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometers.

Parameter	Wert
X-Modus	nm
Y-Modus	Extinktion
Erfassungsmodus	Scan
Scanbereich, Start	400 nm
Scanbereich, Stopp	220 nm
Mittelungszeit	0,020 s
Datenintervall	1,00 nm
Scanrate	3000 nm/min
Spektrale Bandbreite	2,00 nm
Detektormodul	Multiküvetten-Peltier-UV-Vis



## Experimentelles

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden drei Experimente durchgeführt:

### 1. Untersuchung der Auswirkungen des pH-Wertes und der $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Konzentration auf das $A_{260/280}$ -Verhältnis und die Extinktion der RNA

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurde mit Reinstwasser auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 und 10 mM. Reinstwasser wurde in dem Experiment als Kontrolle verwendet. Alle pH-Messungen wurden mithilfe eines SevenCompact pH-Messgeräts S220 von Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz) durchgeführt. Die RNA wurde mit den entsprechenden Konzentrationen der  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösungen auf 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt.

### 2. Die Untersuchung der Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke auf das $A_{260/280}$ -Verhältnis der RNA bei Vorhandensein von gelöstem BSA-Protein

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurde auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 0,01, 0,1, 1 und 10 mM. Wasser wurde in dem Experiment als Kontrolle verwendet. Die RNA wurde in den entsprechenden Pufferlösungen mit einer Endkonzentration von 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gelöst. Mit Protein versetzte RNA (die sowohl RNA in einer Endkonzentration von 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  als auch BSA in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  enthielt) wurde in den entsprechenden Puffern aufgelöst. BSA wurde ebenfalls in den entsprechenden Puffern in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hergestellt.

### 3. UV-Extinktionsscans von HeLa-RNA, analysiert in 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , TNE-Puffer und Wasser

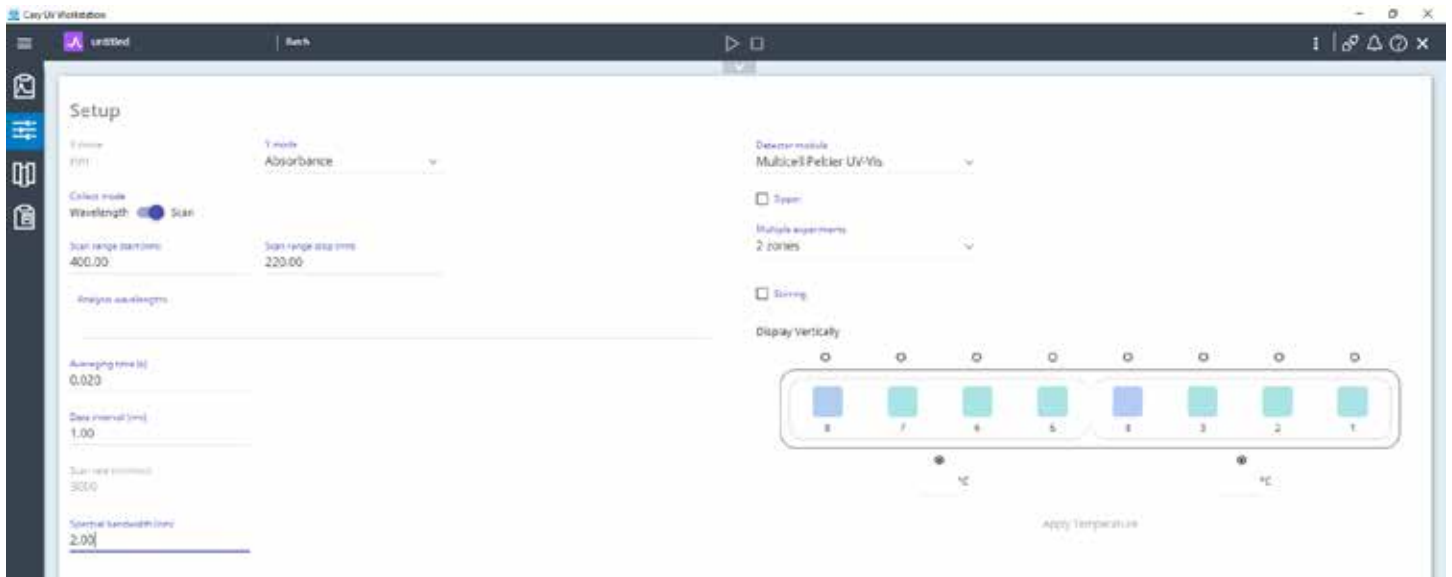
Es wurde ein TNE-Puffer mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA und 0,2 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,4 hergestellt. Die RNA wurde im TNE-Puffer, in 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und in Wasser auf eine Endkonzentration von 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt.

## Extinktionsmessungen

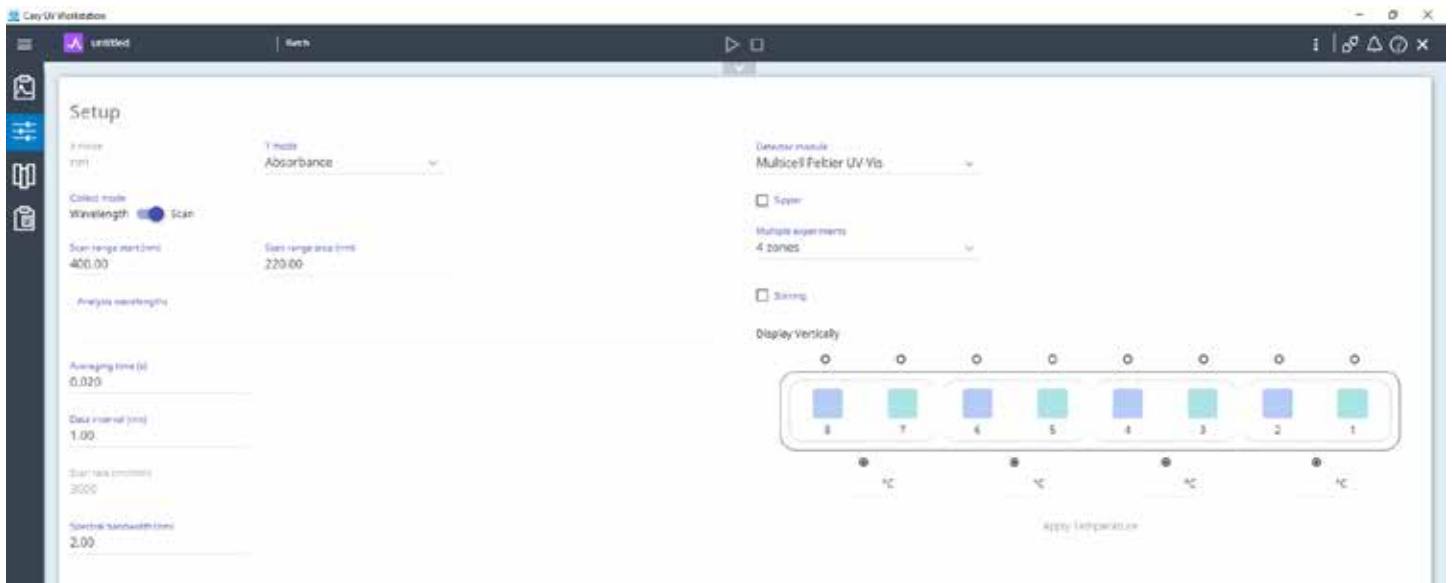
Die Extinktionswerte aller experimentellen Proben wurden mit dem Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometer gemessen. Eine geeignete Blindlösung wurde verwendet, um das Spektralphotometer für jedes Experiment auf Null zu stellen, und bei der Analyse wurde eine Basislinienkorrektur vorgenommen.

Die Fähigkeit des Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis, mehrere Proben gleichzeitig zu messen, macht spektrophotometrische Messungen effizienter und sorgt zugleich für einheitliche Messbedingungen. Das Gerät verfügt über acht Küvettenpositionen in vier Zonen und kann Proben in einer einzelnen Zone (acht Küvetten), zwei Zonen (vier Küvetten in jeder Zone) oder vier Zonen (zwei Küvetten in jeder Zone) analysieren. Jede Zone hat ihren eigenen Referenzkanal.

Die Zwei-Zonen-Funktion des Cary 3500 UV-Vis wurde für die Studie zu Proteinkontamination verwendet. Diese Konfiguration ermöglichte die Untersuchung von zwei Puffern in einer Messung (Abbildung 3). Die Vier-Zonen-Funktion des Geräts wurde für die gleichzeitige Messung der RNA in drei verschiedenen Lösungen (TNE-Puffer, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  oder Wasser) verwendet (Abbildung 4). Nach jeder Messung berechnete und berichtete die eingebaute Gleichungsfunktion der Cary UV Workstation-Software automatisch die  $A_{260/280}$ -Verhältnisse (Abbildung 5). Diese Funktionen des Cary 3500 erhöhen den Durchsatz von UV-Extinktionsscans im Vergleich zur Verwendung eines Einzelküvettensystems.



**Abbildung 3.** Die „Zwei-Zonen“-Funktion für mehrere Experimente des Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis. Die grünen und violetten Positionen stellen die Proben bzw. die Referenzlösungen dar.



**Abbildung 4.** Die „Vier-Zonen“-Funktion für mehrere Experimente des Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis. Die grünen und violetten Positionen stellen die Proben bzw. die Referenzlösungen dar.

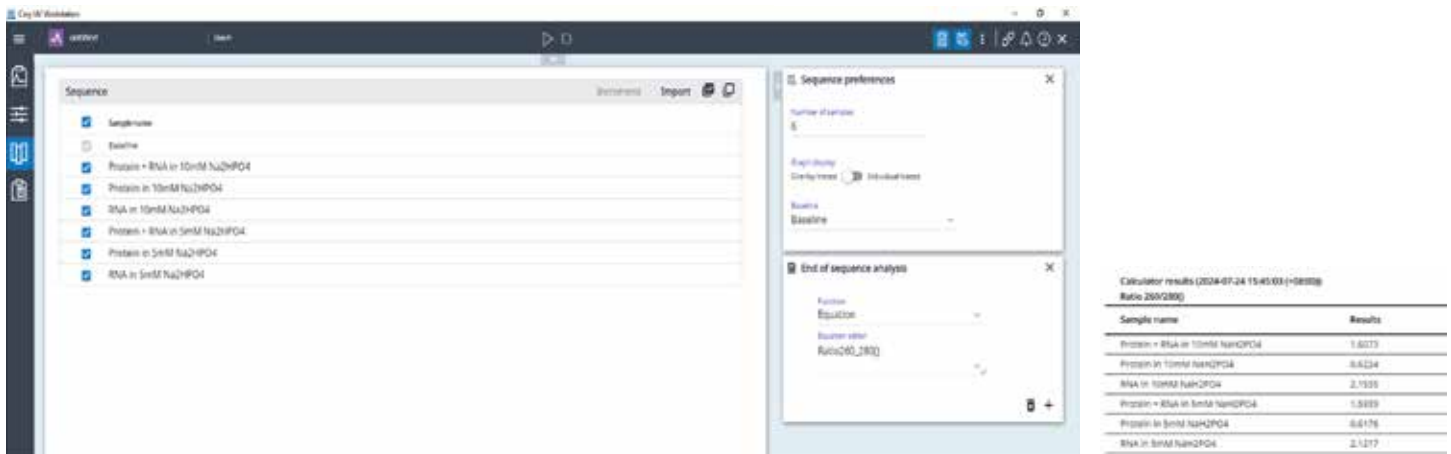


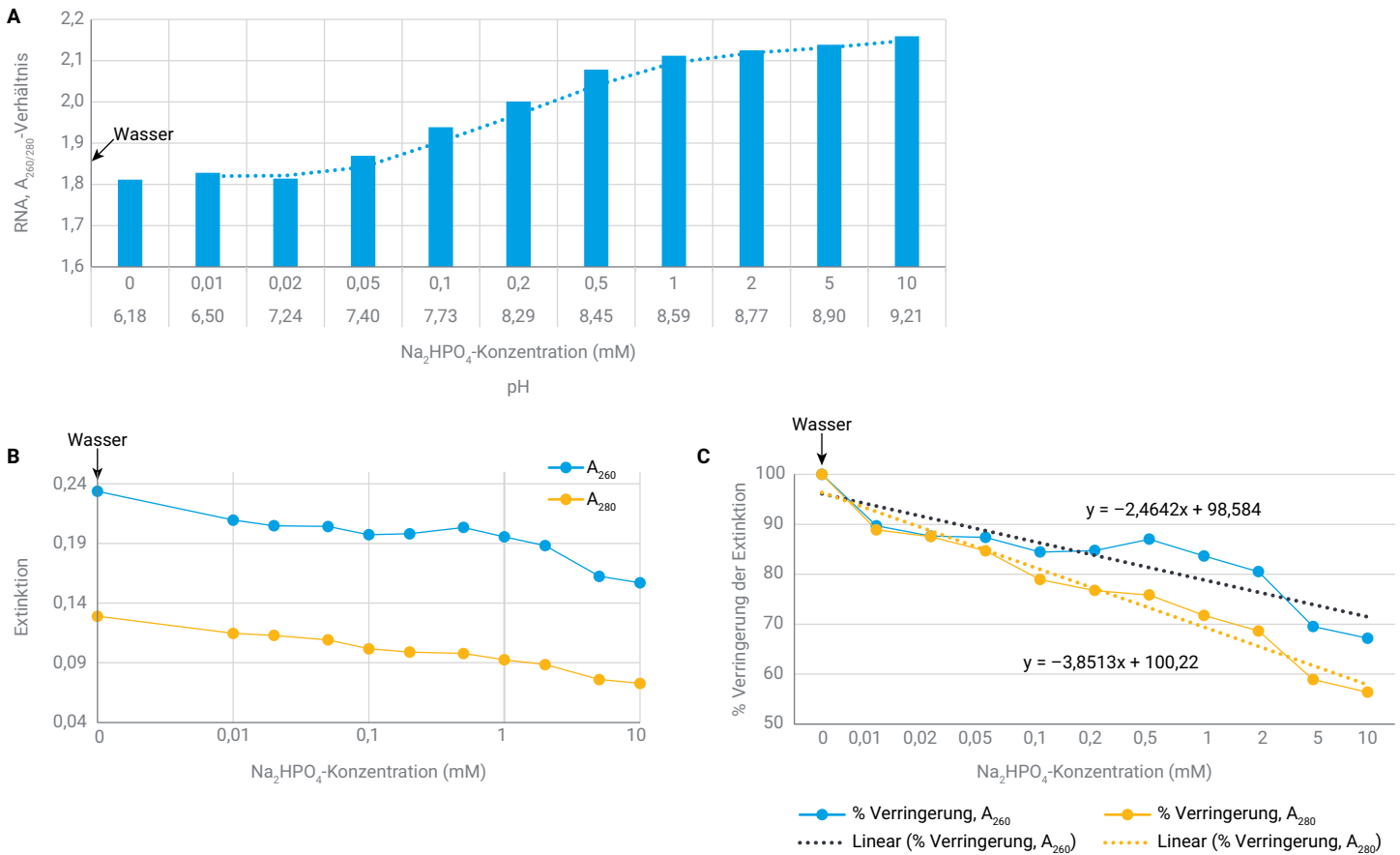
Abbildung 5. Automatische Berechnung und Meldung der A<sub>260</sub>/280-Verhältnisse mithilfe der Gleichungsfunktion in der Agilent Cary UV Workstation-Software.

## Ergebnisse und Diskussion

### Auswirkungen des pH-Wertes und der Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentration auf das A<sub>260/280</sub>-Verhältnis und die Extinktion der RNA

Zur Bewertung der Auswirkungen des pH-Wertes und der Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentration auf das A<sub>260/280</sub>-Verhältnis und die Extinktion der RNA wurden 11 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösungen mit Konzentrationen von 0,1 bis 10 mM als Puffer verwendet.<sup>3</sup> Die Erhöhung des A<sub>260/280</sub>-Verhältnisses war direkt proportional zum Anstieg des pH-Wertes und der Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentration. Ein steiler Anstieg erfolgte zwischen pH-Werten von 7,2 und 8,6 und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentrationen von 0,02 und 1 mM (Abbildung 6A).

Abbildung 6B zeigt eine Abnahme der A<sub>260</sub>- und A<sub>280</sub>-Werte bei zunehmender Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentration oder steigendem pH-Wert. Die prozentuale Abnahme der Extinktionswerte für die jeweiligen Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentrationen wurde relativ zu Wasser bestimmt. Die Steigung der Kurve für die prozentuale Abnahme von A<sub>280</sub> ist steiler als die Steigung der Kurve für A<sub>260</sub>, wie die entsprechenden gepunkteten Linien in Abbildung 6C zeigen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Anstieg des A<sub>260/280</sub>-Verhältnisses auf eine pH- oder Ionenstärke-abhängige Abnahme der Extinktion bei 280 nm zurückzuführen ist.



**Abbildung 6.** Die Auswirkungen des pH-Wertes und der Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Konzentration auf (A) das A<sub>260/280</sub>-Verhältnis und (B) die Extinktion. (C) Prozentuale Veränderung der Extinktion bei 260 und 280 nm.

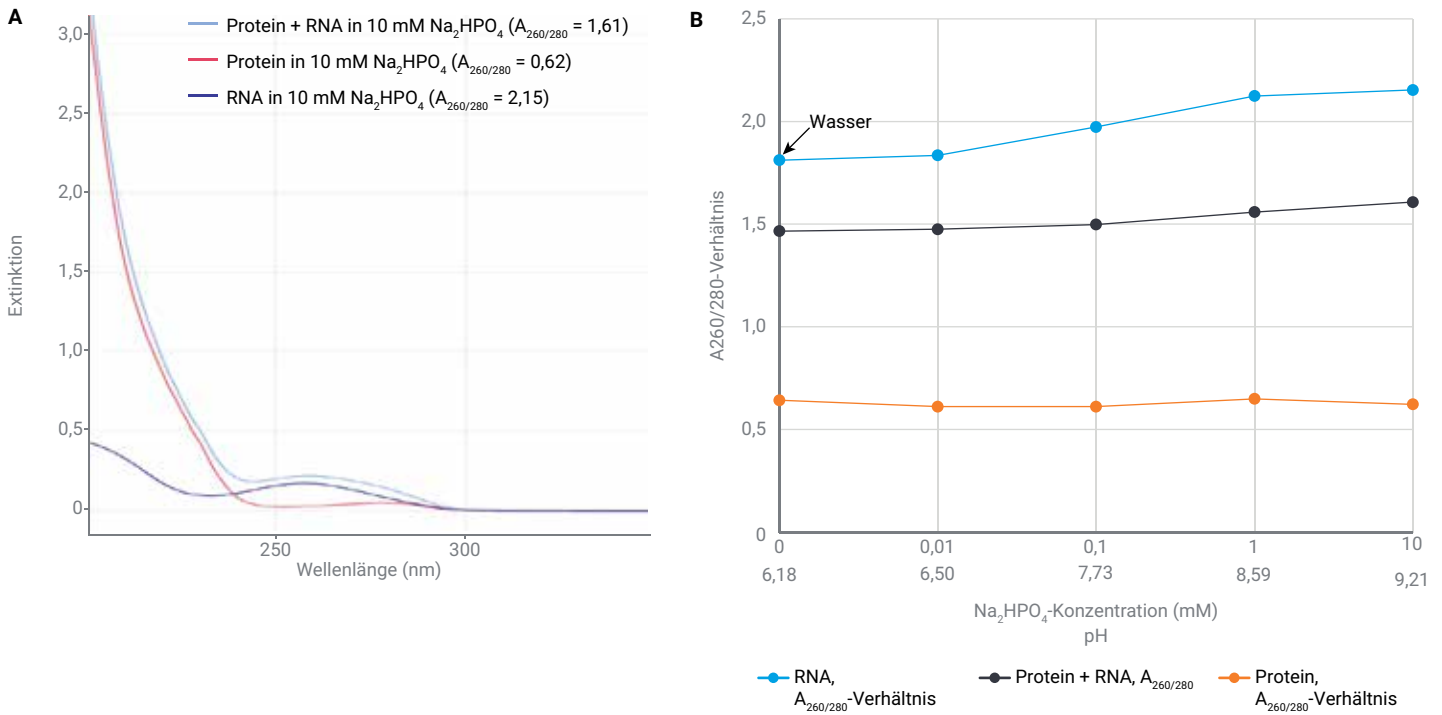
Für jede der 11 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösungen wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Unter Verwendung der Zwei-Zonen-Funktion für mehrere Experimente des Cary 3500 wurden Messungen von Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Proben in drei Replikaten in zwei Konzentrationen durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in allen 11 Konzentrationen in 60 Minuten zu analysieren (sechs Messungen von 33 Proben und 11 Referenzlösungen). Dieser Multiküvetten-Ansatz erhöhte den Durchsatz der Analyse um das Sechsfache im Vergleich zu einem Einzelküvetten-System.

### Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke auf den Nachweis von Protein in der RNA

Um die Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke des Puffers auf den Nachweis einer Proteinkontamination zu untersuchen<sup>3</sup>, wurde die RNA-Extinktion in den 11 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösungen bei Vorhandensein eines BSA-Proteins bewertet.

Abbildung 7A zeigt die Extinktionsprofile von Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit und ohne hinzugegebenes Protein. Die RNA in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ergab ein A<sub>260/280</sub>-Verhältnis von 2,15; bei Vorliegen von Protein fiel das A<sub>260/280</sub>-Verhältnis jedoch auf 1,61. Die Abbildung zeigt deutlich, wie das Protein das Extinktionsprofil der RNA verändert.

Die Abnahme des A<sub>260/280</sub>-Verhältnisses zwischen RNA und Protein mit RNA betrug 19,1 % in Wasser, verglichen mit einer Abnahme um 26,6 %, wie sie in 1,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> beobachtet wurde (Abbildung 7B). Dies deutet darauf hin, dass eine Proteinkontamination unter alkalischen Bedingungen leichter nachgewiesen werden kann.

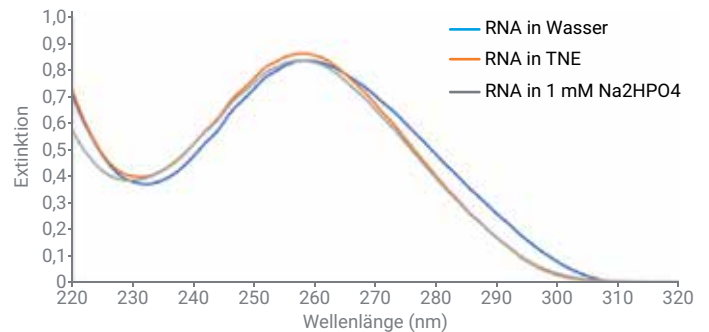


**Abbildung 7: Auswirkungen des pH-Wertes und der Ionenstärke auf das  $A_{260/280}$ -Verhältnis der RNA bei Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Protein.** (A) Extinktionsprofile von RNA, Protein und mit Protein versetzter RNA in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. (B) Darstellung des  $A_{260/280}$ -Verhältnisses von RNA, Protein und mit Protein versetzter RNA in 0,01 bis 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

### Messungen der Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen in verschiedenen Pufferlösungen

Um die Auswirkungen verschiedener Puffer auf die UV-Extinktionsspektren der RNA zu untersuchen, wurden Analysen in Wasser (pH-Wert 6,18), 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,59) und einer Pufferlösung (TNE) durchgeführt. Der TNE-Puffer wurde in diesem Experiment verwendet, da er häufig für die spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren empfohlen wird.<sup>3</sup>

Wie in Abbildung 8 dargestellt, sind die UV-Extinktionsspektren der RNA in den beiden Pufferlösungen (1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und TNE) ähnlich, während sich das UV-Profil der RNA in Wasser zu einer höheren Wellenlänge hin verschoben hat. Die Ergebnisse zeigen, dass in einer Pufferlösung gelöste RNA eine andere UV-Extinktionskurve ergibt als in Wasser gelöste RNA. Die alkalisch gepufferte Lösung ermöglicht eine bessere Schätzung der RNA-Reinheit als die in Reinwasser gelöste RNA-Probe. Es wird daher empfohlen, eine alkalisch gepufferte Lösung zu verwenden, um extrahierte RNA zu lösen.



**Abbildung 8: UV-Extinktionsprofile von HeLa-RNA, analysiert in Wasser, TNE-Puffer und 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.** Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Wilfinger *et al.*<sup>3</sup> überein und bestätigen die studienübergreifende Einheitlichkeit der Daten.

## Zusammenfassung

Diese Application Note zeigt eine effektive Methode zur Bewertung der RNA-Reinheit basierend auf dem  $A_{260/280}$ -Verhältnis unter Verwendung eines Agilent Cary 3500 Multiküvetten-Peltier-UV-Vis-Spektralphotometers auf. Mit dem Cary 3500 konnten mehrere Testbedingungen gleichzeitig getestet werden, wodurch unerwünschte experimentelle Schwankungen vermieden wurden.

Die Daten zeigten, dass der pH-Wert und die Ionenstärke von RNA-Lösungen das  $A_{260/280}$ -Verhältnis signifikant beeinflussen und dass unter alkalischen Bedingungen eine bessere Schätzung der Proteinkontamination von RNA-Proben möglich ist. Mithilfe der Gleichungsfunktionen der Cary 3500-Software konnte das  $A_{260/280}$ -Verhältnis automatisch berechnet und berichtet werden. Diese Funktionen ermöglichten die genaue und effiziente Bewertung von RNA-Proben unter verschiedenen Pufferbedingungen. Die Software ist mit der Agilent OpenLab Software-Suite zur Verwendung in einem regulierten Umfeld kompatibel. Agilent OpenLab bietet technische Kontrollen, um Daten in Labors, die mit FDA 21 CFR Part 11, EU-Anhang 11 und anderen Richtlinien in anderen Ländern konform arbeiten müssen, sicher erfassen und speichern zu können.

Die erforderlichen Verbrauchsmaterialien (z. B. das Absolutely RNA Mikropräparationskit), Geräte (z. B. das 4200 TapeStation System und das Cary 3500 UV-Vis-Spektralphotometer) und Lösungen für den Arbeitsablauf zur Durchführung von RNA-Qualitätsbestimmungen sind von Agilent erhältlich.

## Referenzen

1. Vermeulen, J.; De Preter, K.; Lefever, S.; Nuytens, J.; De Vloed, F.; Derveaux, S.; Hellemans, J.; Speleman, F.; Vandesompele, J. Measurable Impact of RNA Quality on Gene Expression Results from Quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9), **2011**, e63-e63.
2. Brescia, P. Microvolume Purity Assessment of Nucleic Acids Using  $A_{260}/A_{280}$  Ratio and Spectral Scanning. Agilent Technologies Application Note, Publikationsnummer 5994-2538EN, **2021**.
3. Wilfinger, W. W.; Mackey, K.; Chomczynski, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques*, 22(3), **1997**, 474–481.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

RA45590.3881944444

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Gedruckt in den USA, 14. November 2024  
5994-7892DEE  
PR7001-3461