

Evaluación comparativa de la pureza del ARN mediante medidas simultáneas en el espectro UV-Vis

Evaluación de los efectos del pH y de la fuerza iónica sobre la relación $A_{260/280}$ del ARN utilizando un sistema UV-Vis Agilent Cary 3500



Autor

Aveline Neo
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

El método estándar para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos emplea medidas espectrofotométricas de absorbancia a unas longitudes de onda de 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}). Esta nota de aplicación demuestra que los cambios en el pH y en la fuerza iónica del tampón de una muestra de ácido ribonucleico (ARN) influyen en la relación $A_{260/280}$. Otros resultados indican que la detección de la contaminación por proteínas mejora significativamente cuando el ARN se mide en una solución alcalina. Este estudio, en el que se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier, destaca las ventajas de realizar varios experimentos de forma simultánea y de usar las funciones de ecuaciones integradas en el software del sistema UV-Vis Cary 3500 para evaluar la pureza del ARN.

Introducción

Evaluar la integridad y pureza del ARN es fundamental para garantizar su calidad en experimentos y aplicaciones posteriores. Un ARN deteriorado o contaminado puede dar lugar a resultados de expresión génica poco fiables, lo que podría afectar a las conclusiones extraídas de este tipo de análisis¹. Además, dado que el ARN encapsulado se puede utilizar como fármaco, la calidad del ARN es un atributo de calidad crítico en las aplicaciones de fabricación de productos farmacéuticos.

El uso de la espectrofotometría para la cuantificación del ARN y la evaluación de su pureza está muy consolidado. La relación $A_{260/280}$, que se determina midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm, se emplea para evaluar la pureza de una muestra de ácido nucleico. La absorbancia a 260 nm indica principalmente la presencia de ácidos nucleicos, mientras que la absorbancia a 280 nm indica la presencia de proteínas contaminantes. Así pues, una muestra de ARN puro tendría una relación $A_{260/280}$ de 2,00, mientras que una muestra de proteínas tendría una relación de 0,57².

Aunque la relación $A_{260/280}$ es un parámetro útil, Wilfinger *et al.* observaron que el pH y la concentración de la solución utilizada en las evaluaciones espectrofotométricas pueden afectar significativamente a la relación³. La evaluación cuantitativa de las preparaciones de ácidos nucleicos también se ve afectada por el pH y la concentración.

En este estudio, se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos por Wilfinger *et al.* utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier (Figura 1). El espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier es un sistema innovador que incluye ocho posiciones para cubetas con el fin de mejorar la eficiencia de las medidas. La medición simultánea de la absorbancia UV de varias muestras mediante el sistema Cary 3500 evita las variables no deseadas e incrementa la fiabilidad de los resultados. La función de ecuación integrada en el software Agilent Cary UV Workstation calcula automáticamente la relación $A_{260/280}$ a partir de los barridos UV, lo que mejora aún más la productividad de los análisis.

Los efectos del pH y de la fuerza iónica de la solución de muestra de ARN sobre la relación $A_{260/280}$ también se investigaron utilizando el sistema Cary 3500. Además, se estudió el impacto del pH y de la fuerza iónica en la identificación de la contaminación por proteínas en el ARN. También se realizaron comparaciones de los barridos de absorbancia UV del ARN en dos tampones diferentes y en agua.



Figura 1. Espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier.

Experimento

Instrumentos

En este estudio se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. La adquisición de datos se realizó mediante el software Agilent Cary UV Workstation (versión 1.4.256) con el complemento de software Cary 3500 Multizone, empleando los parámetros que se muestran en la Tabla 1. El software incluye más de 50 funciones de ecuaciones. Se usaron celdas rectangulares de ultramicrovolumen con una longitud de paso UV de 10 mm y un volumen de llenado de 70 μ l (número de referencia 5062-2496). Se utilizó un volumen de muestra de 50 μ l para cada celda. El sistema Cary 3500 permite la medición de esos volúmenes de muestra tan pequeños gracias a su haz uniforme altamente colimado, de menos de 1,5 mm de ancho, y a la alineación óptica permanente de sus soportes para celdas fijos.

Tabla 1. Parámetros del espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier.

Parámetros	Valor
Modo X	nm
Modo Y	Absorbancia
Modo de recogida	Barrido
Inicio del intervalo de barrido	400 nm
Parada del intervalo de barrido	220 nm
Tiempo promedio	0,020 s
Intervalo de datos	1,00 nm
Velocidad de barrido	3.000 nm/min
Ancho de banda espectral	2,00 nm
Módulos del detector	Peltier Multicell UV-vis

Reactivos y materiales

La estirpe celular HeLa se adquirió a American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, EE. UU.). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) se adquirió a Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Se utilizó un kit Agilent Absolutely RNA microprep para extraer el ARN de las células HeLa (número de referencia 400805).

La seroalbúmina bovina (BSA), el fosfato disódico (Na_2HPO_4), el clorhidrato de tris (tris-HCl) y el cloruro sódico (NaCl) se adquirieron a Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). La solución de EDTA se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania).

Se obtuvo agua ultrapura nueva a partir de un sistema Milli-Q Integral (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) equipado con un cartucho de membrana de 0,22 μm en el punto de consumo.

Extracción de ARN a partir de sedimentos de células HeLa

Las células HeLa se cultivaron hasta obtener 100.000 células en el medio de cultivo celular DMEM. Las células se rasparon de la placa para depositarlas en el medio y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml. La suspensión celular se centrifugó a 1.200 rpm durante cinco minutos para sedimentar las células antes de la extracción de ARN mediante el protocolo del kit Absolutely RNA Microprep. Se realizó un control de calidad del ARN extraído utilizando un sistema Agilent 4200 TapeStation (número de referencia G2991AA) con un

dispositivo ScreenTape para ARN (número de referencia 5067-5576), tampón para muestra ScreenTape para ARN (número de referencia 5067-5577) y una escalera de peso molecular ScreenTape de ARN (número de referencia 5067-5578).

El ARN se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ y solo se descongeló antes del análisis.

Flujo de trabajo de extracción de ARN de células HeLa y evaluación de la pureza

Como se muestra en la Figura 2A, las células HeLa se cultivaron internamente y el ARN total se extrajo aplicando el protocolo del kit Absolutely RNA Microprep. La calidad del ARN extraído se comprobó utilizando el sistema 4200 TapeStation (una solución de electroforesis automatizada para el control de calidad de muestras de ADN y ARN). El uso de un dispositivo ScreenTape para ARN para el análisis de ARN total permite evaluar la calidad del ARN total mediante la identificación de los picos ribosómicos y de los posibles productos de degradación. A cada muestra se le asignó una puntuación individual de calidad del ARN, conocida como número de integridad del ARN equivalente (RIN°), basada en una escala de 1 a 10, en la que el 1 indica que el ARN está muy degradado y el 10, que el ARN está prácticamente intacto. El ARN extraído que se usó en este estudio tenía un valor RIN° de 10 (Figura 2B). A continuación, se midió la absorbancia del ARN extraído en el sistema UV-Vis Cary 3500 para evaluar la pureza del ARN.

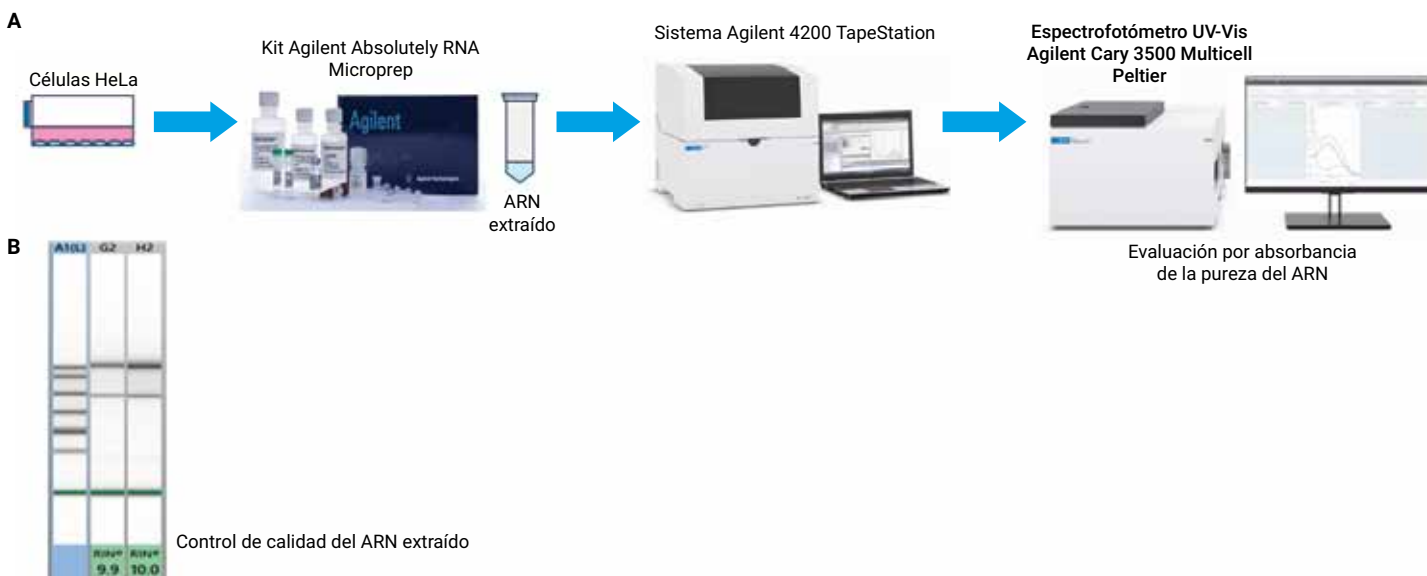


Figura 2. (A) Diagrama del flujo de trabajo que muestra el uso de consumibles de Agilent para extraer ARN y del sistema Agilent 4200 TapeStation y el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 para evaluar su calidad y pureza. (B) El ARN extraído de las células HeLa se analizó en el sistema TapeStation 4200; se obtuvo un valor RIN° de 10.

Experimento

En este estudio se realizaron los tres experimentos siguientes:

1. Estudio de los efectos del pH y de la concentración de Na_2HPO_4 sobre la relación $A_{260/280}$ y la absorbancia del ARN

El Na_2HPO_4 se diluyó con agua ultrapura hasta las siguientes concentraciones: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mM. En el experimento se incluyó agua ultrapura como control. Todas las medidas de pH se realizaron con un medidor de pH SevenCompact S220 de Mettler Toledo (Greifensee, Suiza). El ARN se diluyó hasta 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con las soluciones de Na_2HPO_4 de las concentraciones correspondientes.

2. Estudio de los efectos del pH y de la fuerza iónica sobre la relación $A_{260/280}$ del ARN en presencia de una proteína (BSA solubilizada)

El Na_2HPO_4 se diluyó hasta las siguientes concentraciones: 0,01, 0,1, 1 y 10 mM. En el experimento se incluyó agua como control. El ARN se disolvió en las disoluciones de tampón correspondientes hasta obtener una concentración final de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Asimismo, se disolvió ARN enriquecido con proteínas (que contenía tanto una concentración final de ARN de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ como una concentración final de BSA de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en los tampones correspondientes. También se preparó BSA en los tampones correspondientes con una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3. Barridos de absorbancia UV del ARN de células HeLa analizado en Na_2HPO_4 1 mM, tampón TNE y agua

Se preparó un tampón TNE con un pH de 7,4 que contenía tris 10 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,2 mM. El ARN se diluyó hasta una concentración final de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el tampón TNE, en Na_2HPO_4 1 mM y en agua.

Medidas de absorbancia

Los valores de absorbancia de todas las muestras experimentales se midieron con el espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier. Se utilizó una solución en blanco adecuada para poner a cero el espectrofotómetro en cada experimento y se aplicó una corrección de la línea de base durante el análisis.

La capacidad del sistema UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier para medir varias muestras simultáneamente posibilita que las medidas espectrofotométricas sean más eficientes, manteniendo al mismo tiempo unas condiciones de medición uniformes. Gracias a sus ocho posiciones para celdas que se pueden agrupar en hasta cuatro zonas, el instrumento puede realizar análisis de muestras en una sola zona (ocho cubetas), dos zonas (cuatro cubetas en cada zona) o cuatro zonas (dos cubetas en cada zona). Cada zona tiene su propio canal de referencia.

La función de dos zonas del sistema UV-Vis Cary 3500 se utilizó para el estudio de la contaminación por proteínas. Esta configuración permitió estudiar dos tampones en una sola medición (Figura 3). La función de cuatro zonas del instrumento se utilizó para la medición simultánea de ARN en tres soluciones diferentes (tampón TNE, Na_2HPO_4 1 mM y agua), como se muestra en la Figura 4. Después de cada medición, la función de ecuación integrada en el software Cary UV Workstation calculó y notificó automáticamente las relaciones $A_{260/280}$ (Figura 5). Estas funciones del sistema Cary 3500 incrementan la productividad de los barridos de absorbancia UV en comparación con el uso de un sistema de una sola cubeta.

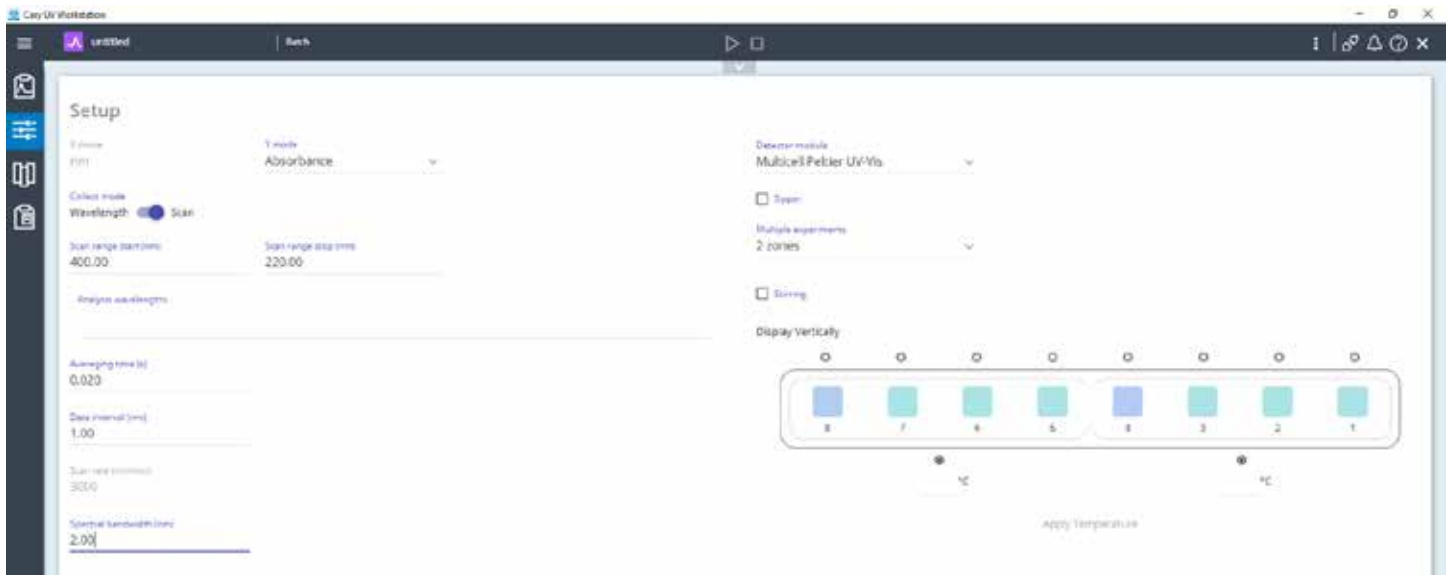


Figura 3. Función de experimentos múltiples en “dos zonas” del sistema UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. Las posiciones verdes y moradas representan las muestras y las soluciones de referencia, respectivamente.

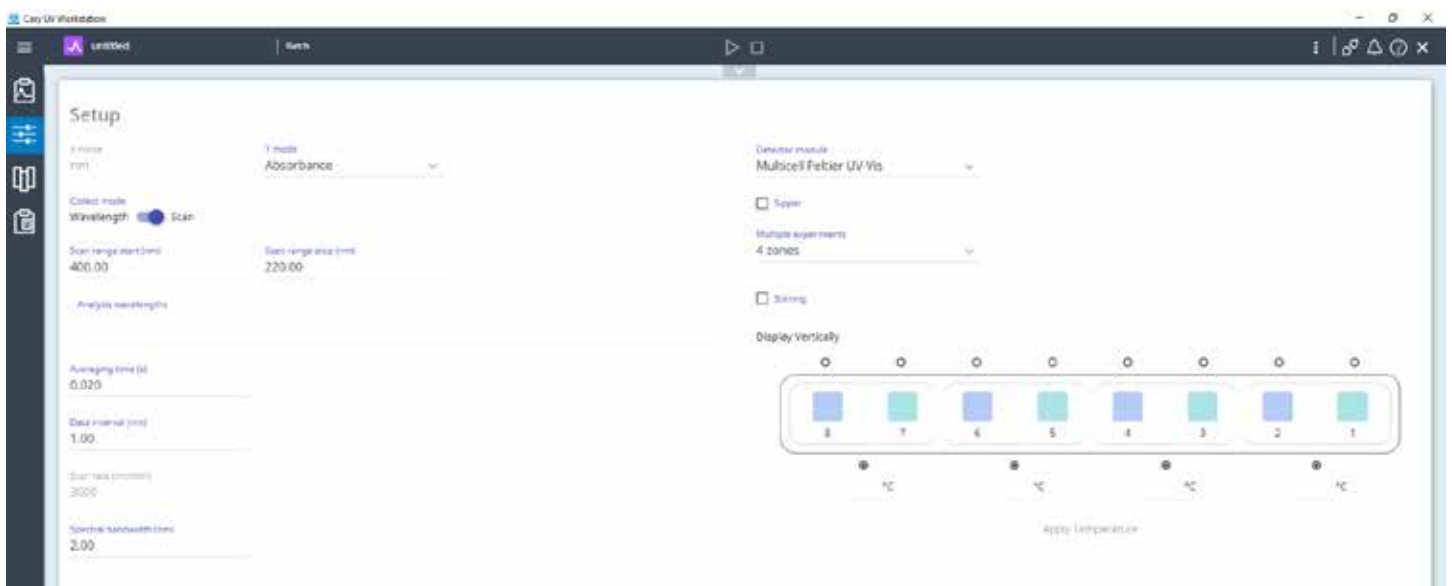


Figura 4. Función de experimentos múltiples de “cuatro zonas” del sistema UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. Las posiciones verdes y moradas representan las muestras y las soluciones de referencia, respectivamente.

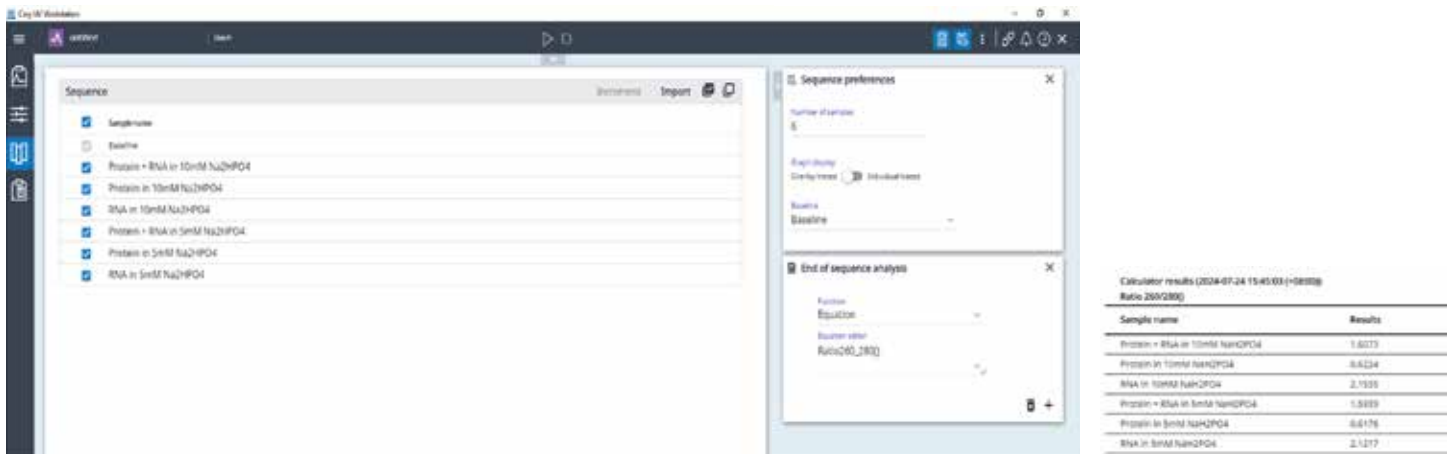


Figura 5. Cálculo y notificación automáticos de las relaciones $A_{260/280}$ mediante la función de ecuación integrada en el software Agilent Cary UV Workstation.

Resultados y comentarios

Efectos del pH y de la concentración de Na_2HPO_4 sobre la relación $A_{260/280}$ y la absorbancia del ARN

Para evaluar los efectos del pH y de la concentración de Na_2HPO_4 sobre la relación $A_{260/280}$ y la absorbancia del ARN, se utilizaron 11 soluciones de Na_2HPO_4 como tampón con concentraciones que oscilaron entre 0,1 y 10 mM^3 . El aumento de la relación $A_{260/280}$ fue directamente proporcional al aumento del pH y de la concentración de Na_2HPO_4 . Se produjo un incremento pronunciado entre los valores de pH de 7,2 y 8,6 y las concentraciones de Na_2HPO_4 de 0,02 y 1 mM (Figura 6A).

En la Figura 6B se observa una disminución de los valores de A_{260} y A_{280} con el aumento de la concentración de Na_2HPO_4 o del pH. Se determinó la disminución porcentual de las absorbancias para las concentraciones correspondientes de Na_2HPO_4 en relación con el agua. La pendiente de la curva de disminución porcentual de A_{280} es más pronunciada que la pendiente de la curva de A_{260} , como muestran las respectivas líneas de puntos de la Figura 6C. Estos resultados indican que el aumento de la relación $A_{260/280}$ se debe a una disminución de la absorbancia a 280 nm dependiente del pH o de la fuerza iónica.

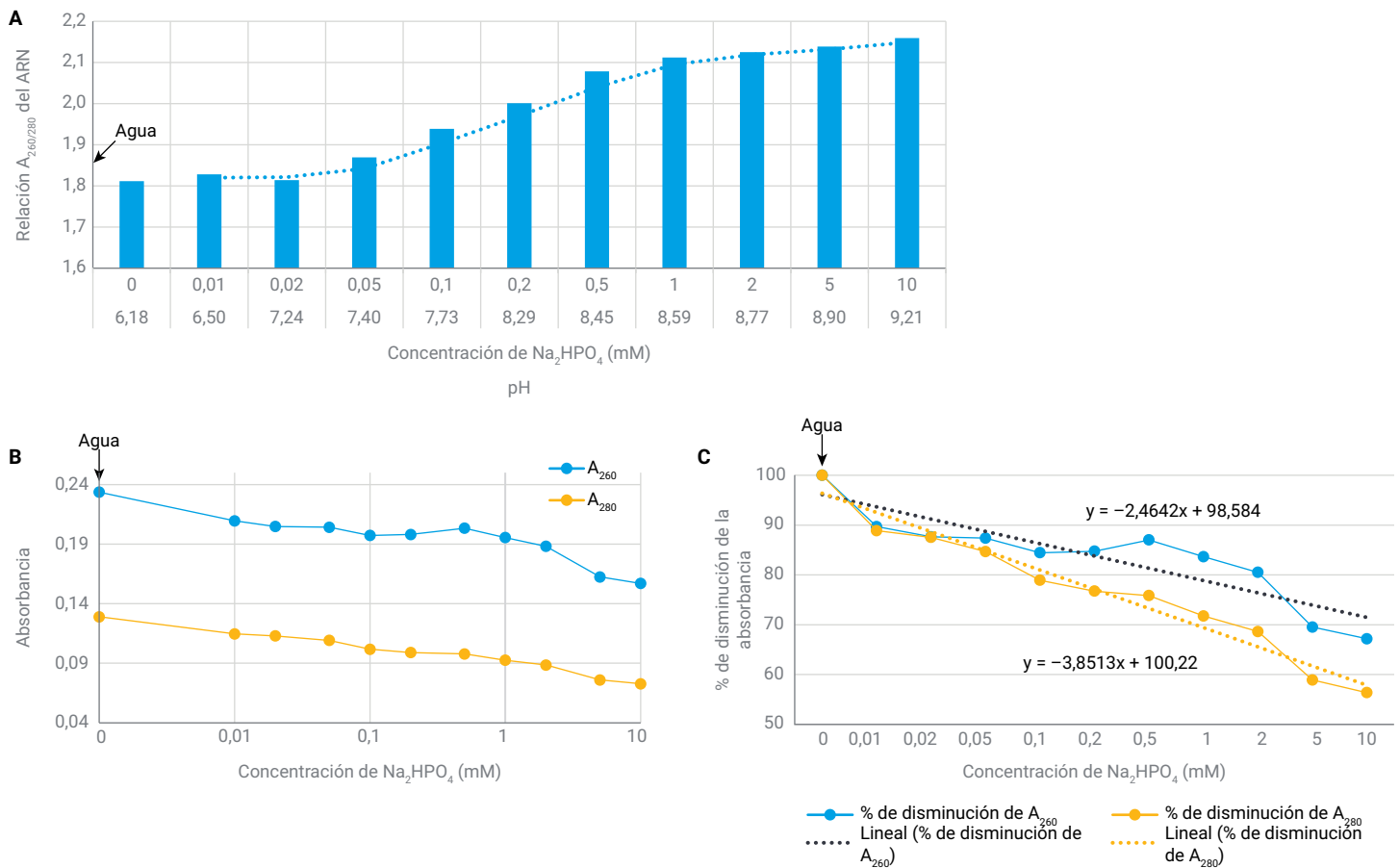


Figura 6. Efectos del pH y de la concentración de Na_2HPO_4 sobre: (A) la relación $A_{260/280}$; y (B) la absorbancia. (C) Cambio porcentual en la absorbancia a 260 y 280 nm.

Se realizaron medidas por triplicado para cada una de las 11 soluciones de Na_2HPO_4 . Se utilizó la función de experimentos múltiples en dos zonas del sistema Cary 3500 para realizar medidas por triplicado de muestras de Na_2HPO_4 con dos concentraciones distintas. Gracias al uso de esta metodología, se pudieron analizar las 11 concentraciones de Na_2HPO_4 en 60 minutos (seis medidas de 33 muestras y 11 soluciones de referencia). Esta estrategia multicelda multiplicó por seis la productividad del análisis en comparación con un sistema de una sola cubeta.

Efectos del pH y de la fuerza iónica sobre la detección de proteínas en el ARN

Para investigar los efectos del pH y de la fuerza iónica del tampón sobre la detección de la contaminación por proteínas³, se evaluó la absorbancia del ARN en las 11 soluciones de Na_2HPO_4 en presencia de una proteína (BSA).

En la Figura 7A se muestran los perfiles de absorbancia del Na_2HPO_4 con y sin proteína añadida. La relación $A_{260/280}$ obtenida para el ARN en Na_2HPO_4 10 mM fue de 2,15; sin embargo, en presencia de la proteína, la relación $A_{260/280}$ disminuyó a 1,61. La figura muestra claramente que la proteína altera el perfil de absorbancia del ARN.

La disminución de la relación $A_{260/280}$ entre el ARN y la proteína con ARN fue del 19,1 % en agua, frente a la disminución del 26,6 % observada en Na_2HPO_4 1,0 mM (Figura 7B). Este hallazgo indica que la contaminación por proteínas se detecta más fácilmente en condiciones alcalinas.

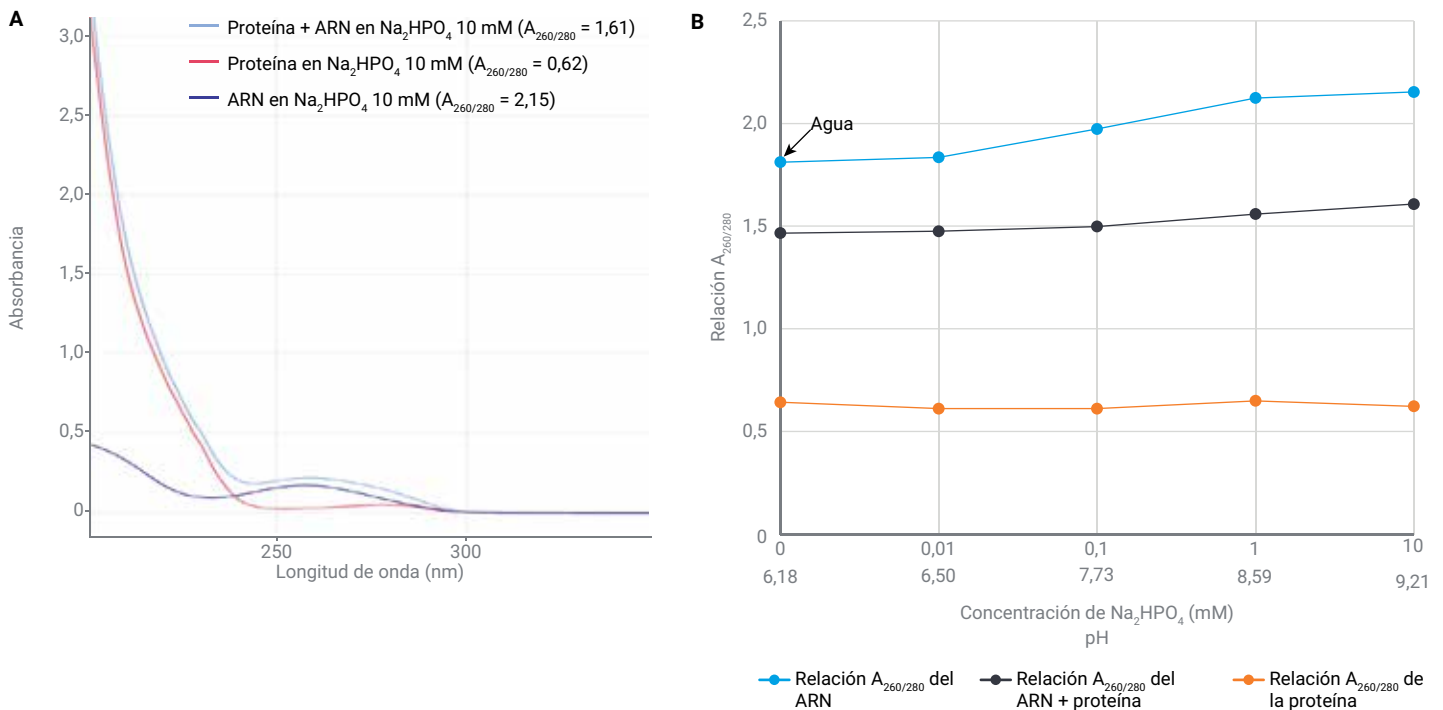


Figura 7. Efectos del pH y de la fuerza iónica sobre la relación $A_{260/280}$ del ARN en presencia y ausencia de proteínas. (A) Perfiles de absorbancia de muestras de ARN, proteína y ARN enriquecido con proteína en Na_2HPO_4 10 mM. (B) Gráficos de la relación $A_{260/280}$ del ARN, la proteína y el ARN enriquecido con proteína en Na_2HPO_4 con concentraciones entre 0,01 y 10 mM.

Medidas de ARN total de células HeLa en diferentes disoluciones de tampón

Para investigar los efectos de diferentes tampones en los espectros de absorbancia UV del ARN, se realizaron análisis en agua (pH = 6,18), Na_2HPO_4 1 mM (pH = 8,59) y una disolución de tampón (TNE). El tampón TNE se incluyó en este experimento porque se suele recomendar para el análisis espectrofotométrico de ácidos nucleicos³.

Como se observa en la Figura 8, los espectros de absorbancia UV del ARN en las dos disoluciones de tampón (Na_2HPO_4 1 mM y TNE) son similares, mientras que el perfil UV del ARN en agua presenta un desplazamiento hacia una longitud de onda mayor. Los resultados indican que una muestra de ARN disuelta en una disolución de tampón genera una curva de absorbancia UV diferente en comparación con el ARN disuelto en agua. La solución amortiguadora alcalina ofrece una mejor estimación de la pureza del ARN que la muestra de ARN disuelta en agua pura. Por lo tanto, se recomienda utilizar una solución amortiguadora alcalina para disolver el ARN extraído.

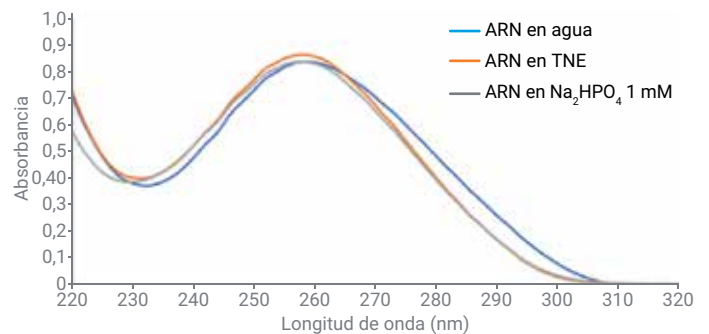


Figura 8. Perfiles de absorbancia UV del ARN de células HeLa analizado en agua, tampón TNE y Na_2HPO_4 1 mM. Los resultados coinciden con los de Wilfinger *et al.*³, lo que demuestra la coherencia de los resultados de ambos estudios.

Conclusión

Esta nota de aplicación describe un método eficaz para evaluar la pureza del ARN que se basa en la relación $A_{260/280}$ y en el uso de un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. El sistema Cary 3500 permitió estudiar varias condiciones experimentales de forma simultánea y evitar variables experimentales no deseadas.

Los datos mostraron que el pH y la fuerza iónica de las soluciones de ARN afectan significativamente a la relación $A_{260/280}$ y que la contaminación por proteínas de las muestras de ARN se estima mejor en condiciones alcalinas. Las funciones de ecuaciones integradas en el software del sistema Cary 3500 permitieron calcular y notificar automáticamente la relación $A_{260/280}$. Estas funciones permitieron una evaluación exacta y eficaz de las muestras de ARN en diferentes condiciones en lo referente al tampón. El software es compatible con el paquete de software Agilent OpenLab para su uso en entornos regulados. OpenLab proporciona controles técnicos para adquirir y almacenar datos de manera segura en laboratorios que deban cumplir normativa como la Parte 11 del Título 21 del CFR de la FDA, el anexo 11 de la UE y normas similares de otros países.

Agilent proporciona los consumibles (p. ej., el kit Absolutely RNA Microprep), los instrumentos (p. ej., el sistema 4200 TapeStation y el espectrofotómetro UV-Vis Cary 3500) y las soluciones de flujo de trabajo necesarios para llevar a cabo las determinaciones de calidad del ARN.

Referencias

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. Nota de aplicación de Agilent Technologies, número de publicación 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

RA45590.3881944444

Solo para uso de investigación. No usar en procedimientos de diagnóstico.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Impreso en EE. UU., 14 de noviembre de 2024
5994-7892ES
PR7001-3461