

Évaluation comparative de la pureté d'échantillons d'ARN à l'aide de mesures simultanées de différents paramètres en spectroscopie UV-Visible

Évaluation des effets du pH et de la force ionique sur le ratio $A_{260/280}$ d'échantillons d'ARN à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500



Auteur

Aveline Neo
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

La méthode standard pour évaluer la pureté d'acides nucléiques consiste à mesurer à l'aide d'un spectrophotomètre les absorbances aux longueurs d'onde de 260 nm (A_{260}) et 280 nm (A_{280}). Cette note d'application démontre que des changements de pH et de force ionique du tampon d'échantillons d'acide ribonucléique (ARN) ont une influence sur les ratios $A_{260/280}$. D'autres résultats montrent que la détection d'une contamination protéique est améliorée de façon significative lorsque l'échantillon d'ARN est analysé en milieu alcalin. À l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Agilent Cary 3500 Multicell Peltier, cette étude souligne les avantages liés à la réalisation simultanée de mesures multiples et à l'utilisation des fonctionnalités du logiciel d'analyse intégré au système UV-Visible Cary 3500 pour évaluer la pureté de l'ARN.

Introduction

L'évaluation de l'intégrité et de la pureté d'échantillons d'ARN est essentielle pour garantir la qualité de l'ARN dans les analyses et applications qui reposeront sur son utilisation. De l'ARN altéré ou contaminé peut résulter en des produits d'expression génique non fiables, avec un risque d'impact sur les conclusions qui seront tirées à partir de l'analyse de ces produits. ¹ De plus, puisque l'ARN encapsulé peut être utilisé comme produit thérapeutique, la qualité de l'ARN est un attribut de qualité critique dans le secteur pharmaceutique.

La spectrophotométrie est fréquemment utilisée pour la quantification de l'ARN et l'évaluation de sa pureté. Le ratio $A_{260/280}$, déterminé à partir des mesures d'absorbance de l'échantillon à 260 et 280 nm, est utilisé pour évaluer la pureté d'échantillons d'acide nucléique. L'absorbance à 260 nm indique la présence d'acides nucléiques, tandis que l'absorbance à 280 nm indique la présence de contaminants de nature protéique. Le ratio $A_{260/280}$ d'un échantillon d'ARN pur devrait être de 2,00 et celui d'un échantillon de protéine de 0,57.²

Si le ratio $A_{260/280}$ est utile, Wilfinger *et al.* ont démontré que le pH et la concentration de la solution utilisée pour les mesures spectrophotométriques pouvaient affecter de manière significative ce ratio.³ La quantification d'acide nucléique contenu dans des échantillons est également affectée par le pH et la concentration.

Dans la présente étude, des mesures similaires à celles effectuées par Wilfinger *et al.* ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier (Figure 1). Le système innovant UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier inclut huit positions de cuves afin d'améliorer l'efficacité des mesures. Le système Cary 3500 permet de mesurer simultanément l'absorbance UV de plusieurs échantillons, et donc d'éviter l'apparition de variables indésirables et d'augmenter la fiabilité des résultats générés. La fonctionnalité de calcul d'équation intégrée au logiciel de la station de travail Agilent Cary UV Workstation calcule automatiquement le ratio $A_{260/280}$ à partir des résultats d'absorbance UV, améliorant davantage la cadence analytique.

Les effets du pH et de la force ionique de la solution d'échantillon d'ARN sur le ratio $A_{260/280}$ ont été étudiés avec le système Cary 3500. De plus, l'impact du pH et de la force ionique sur la détection d'une contamination protéique de l'ARN a également été étudié. Des comparaisons de mesures d'absorbance UV d'échantillons d'ARN dans deux tampons différents et dans de l'eau ont également été effectuées.



Figure 1. Spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier

Méthode expérimentale

Instruments

Les mesures de cette étude ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-Visible Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. L'acquisition des données a été effectuée par le logiciel de la station de travail Agilent Cary UV Workstation (version 1.4.256) doté du module complémentaire Cary 3500 Multizone, en utilisant les paramètres figurant dans le tableau 1. Le logiciel comprend plus de 50 fonctions d'équation. Des cuves rectangulaires à ultra-microvolume avec un trajet optique UV de 10 mm et un volume de remplissage de 70 μ L (référence 5062-2496) ont été utilisées. Un volume d'échantillon de 50 μ L a été ajouté dans chaque cuve. Le système Cary 3500 permet de réaliser des mesures sur des volumes aussi petits grâce à son faisceau uniforme hautement focalisé, qui mesure moins de 1,5 mm de large, et à l'alignement optique permanent des porte-cuves fixes.

Tableau 1. Paramètres d'analyse du spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier.

Paramètres	Valeur
Mode de l'axe X	nm
Mode de l'axe Y	Absorbance
Mode de collecte	Balayage
Début de la gamme de balayage	400 nm
Fin de la gamme de balayage	220 nm
Durée d'intégration	0,020 s
Intervalle de données	1,00 nm
Taux de balayage	3 000 nm/min
Bande passante spectrale	2,00 nm
Modules de détection	UV-Vis Peltier multicuve

Méthode expérimentale

Cette étude a consisté en trois phases expérimentales, détaillées ci-dessous :

1. Étude des effets du pH et de la concentration en Na_2HPO_4 sur le ratio $A_{260/280}$ et l'absorbance de l'ARN

Du Na_2HPO_4 a été dilué dans de l'eau ultrapure aux concentrations suivantes : 0,01 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mM. De l'eau ultrapure a été incluse dans les mesures en tant que contrôle. Toutes les mesures de pH ont été réalisées avec un pH-mètre SevenCompact S220 de Mettler Toledo (Greifensee, Suisse). L'ARN a été dilué à une concentration de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ avec les différentes concentrations de solutions de Na_2HPO_4 .

2. Étude des effets du pH et de la force ionique sur le ratio $A_{260/280}$ de l'ARN en présence de protéine d'ASB solubilisée

Du Na_2HPO_4 a été dilué aux concentrations suivantes : 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 mM. L'eau a été incluse dans les mesures en tant que contrôle. L'ARN a été dissous dans les solutions tampon respectives jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. L'ARN enrichi avec la protéine (contenant à la fois de l'ARN à une concentration finale de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et de l'ASB à une concentration finale de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a été dissous dans les solutions tampon respectives. L'ASB a également été préparée dans les solutions tampon respectives à une concentration de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3. Mesures d'absorbance UV de l'ARN provenant de cellules HeLa dans du Na_2HPO_4 à 1 mM, du tampon TNE et de l'eau

Un tampon TNE contenant du tampon tris à 10 mM, de l'EDTA à 1 mM et du NaCl à 0,2 mM à pH 7,4 a été préparé. L'ARN a été dilué à une concentration finale de 0,0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans le tampon TNE, dans du Na_2HPO_4 à 1 mM et dans de l'eau.

Mesures d'absorbance

Les valeurs d'absorbance de tous les échantillons ont été mesurées sur un spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier. Une solution de blanc adaptée a été utilisée pour effectuer le zéro du spectrophotomètre avant chaque mesure, et une correction de la ligne de base a été effectuée pendant l'analyse.

La capacité du spectrophotomètre UV-Vis Cary 3500 Multicell Peltier à analyser plusieurs échantillons simultanément permet de bénéficier d'une grande efficacité analytique tout en maintenant des conditions expérimentales constantes. Équipé de huit emplacements de cuve répartis en quatre zones, le spectrophotomètre Cary 3500 permet d'effectuer des analyses d'échantillons dans une seule zone (huit cuves), dans deux zones (quatre cuves par zone) ou dans quatre zones (deux cuves par zone). Chaque zone dispose de son propre canal de référence.

La fonctionnalité à deux zones du système UV-Vis Cary 3500 a été utilisée pour l'étude de contamination protéique. Cette configuration a permis d'étudier deux solutions tampon au cours d'une même mesure (Figure 3). La fonctionnalité à quatre zones de l'instrument a été utilisée pour les mesures concomitantes d'absorbance de l'ARN dans trois solutions différentes (dans du tampon TNE, dans du Na_2HPO_4 à 1 mM ou dans de l'eau), comme présenté sur la Figure 4. Après chaque mesure, la fonctionnalité de calcul d'équation intégrée au logiciel de la station de travail Agilent Cary UV Workstation a calculé et enregistré automatiquement dans un rapport d'analyse les ratio $A_{260/280}$ (Figure 5). Ces caractéristiques du système Cary 3500 permettent d'augmenter les cadences de mesures d'absorbance UV par rapport à un système mono-cuve.

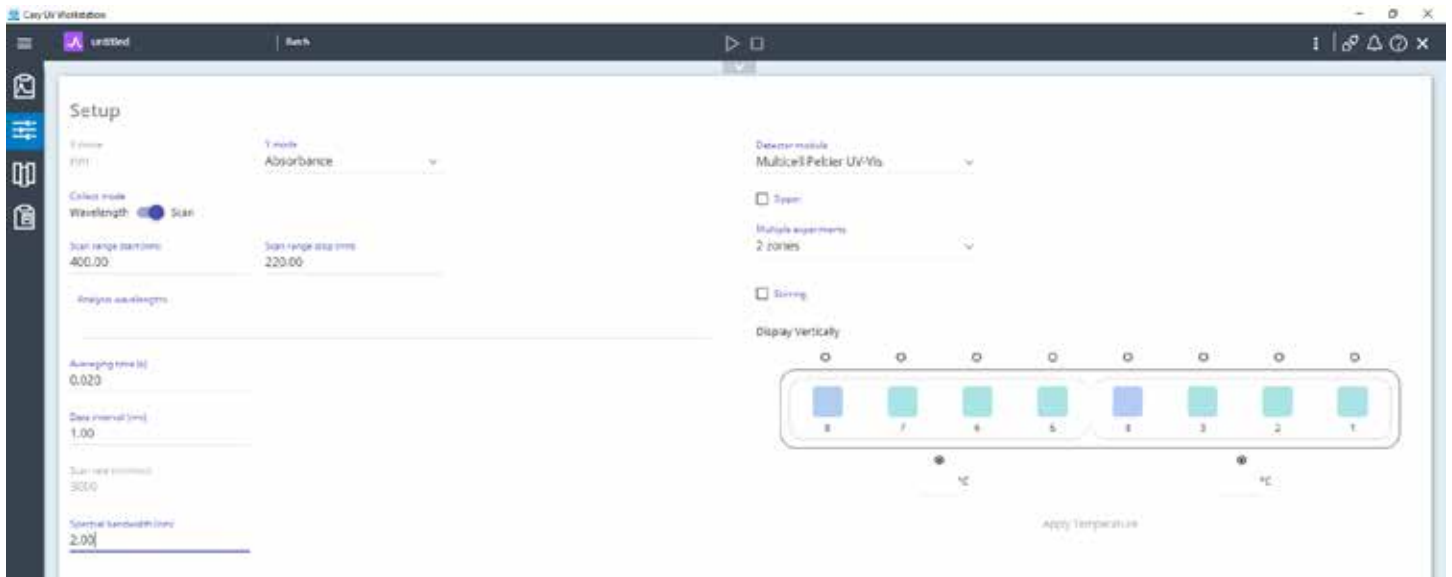


Figure 3. Fonctionnalité d'analyses multiples à « deux zones » du système UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. Les emplacements verts et violets correspondent, respectivement, aux échantillons et solutions de référence.

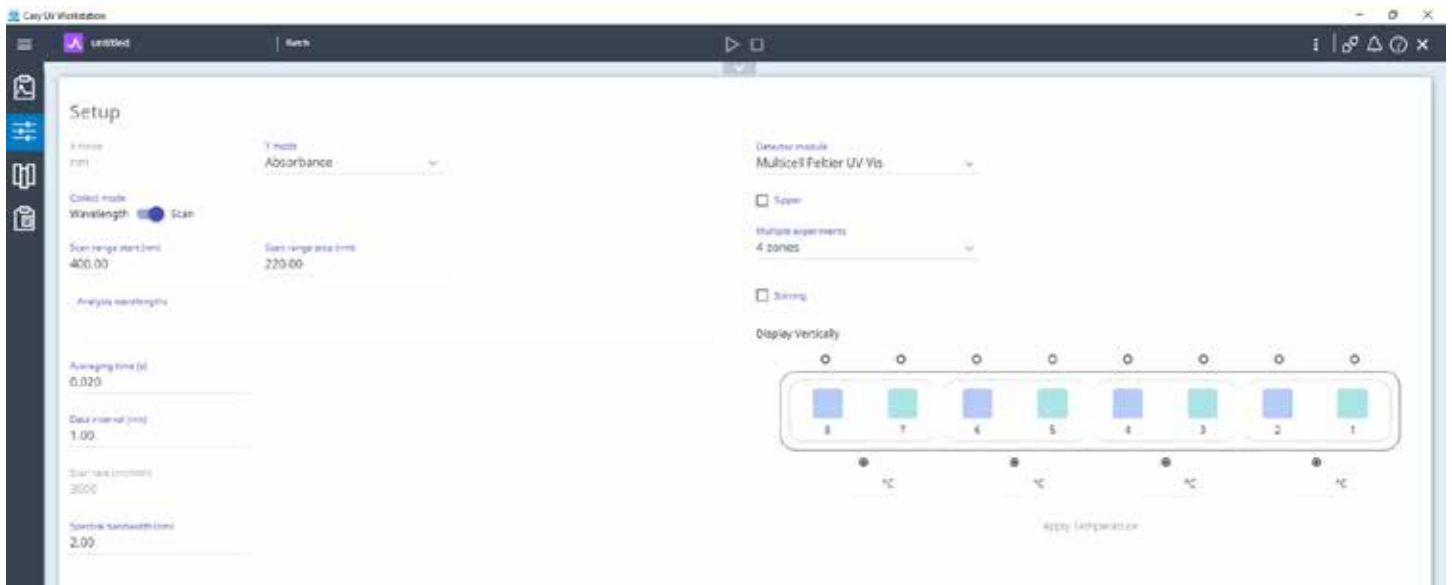


Figure 4. Fonctionnalité d'analyses multiples à « quatre zones » du système UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. Les emplacements verts et violets correspondent, respectivement, aux échantillons et solutions de référence.

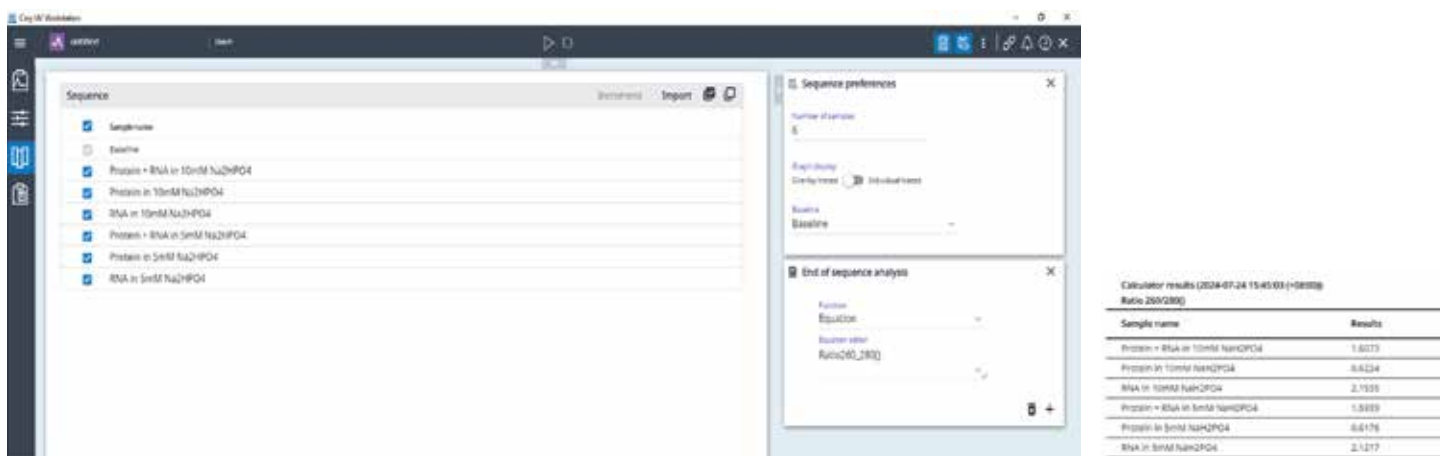


Figure 5. Calcul et enregistrement automatique dans un rapport d'analyse des ratios $A_{260/280}$ à l'aide de la fonctionnalité de calcul d'équation intégrée dans le logiciel de la station de travail Agilent Cary UV Workstation.

Résultats et discussion

Effets du pH et de la concentration en Na_2HPO_4 sur le ratio $A_{260/280}$ et sur l'absorbance de l'ARN

Afin d'évaluer les effets du pH et de la concentration en Na_2HPO_4 sur le ratio $A_{260/280}$ et sur l'absorbance de l'ARN, 11 solutions de Na_2HPO_4 de concentrations comprises entre 0,1 et 10 mM ont été utilisées comme solutions tampon.³ L'augmentation du ratio $A_{260/280}$ était directement proportionnelle à l'augmentation du pH et de la concentration en Na_2HPO_4 . Une nette augmentation a été observée pour des valeurs de pH comprises entre 7,2 et 8,6 et pour des concentrations en Na_2HPO_4 comprises entre 0,02 et 1 mM (Figure 6A).

La Figure 6B montre une diminution des valeurs d'absorbance A_{260} et A_{280} lors de l'augmentation du pH ou de la concentration en Na_2HPO_4 . Le pourcentage de diminution des absorbances en fonction des concentrations en Na_2HPO_4 correspondantes a été déterminé par rapport à de l'eau. La pente de la courbe de pourcentage de diminution de l'absorbance A_{280} est plus importante que la pente de la courbe de pourcentage de diminution de l'absorbance A_{260} , comme représenté par les pointillés respectifs sur la Figure 6C. Ces résultats indiquent que l'augmentation du ratio $A_{260/280}$ est due à une diminution de l'absorbance à 280 nm liée au pH ou à la force ionique.

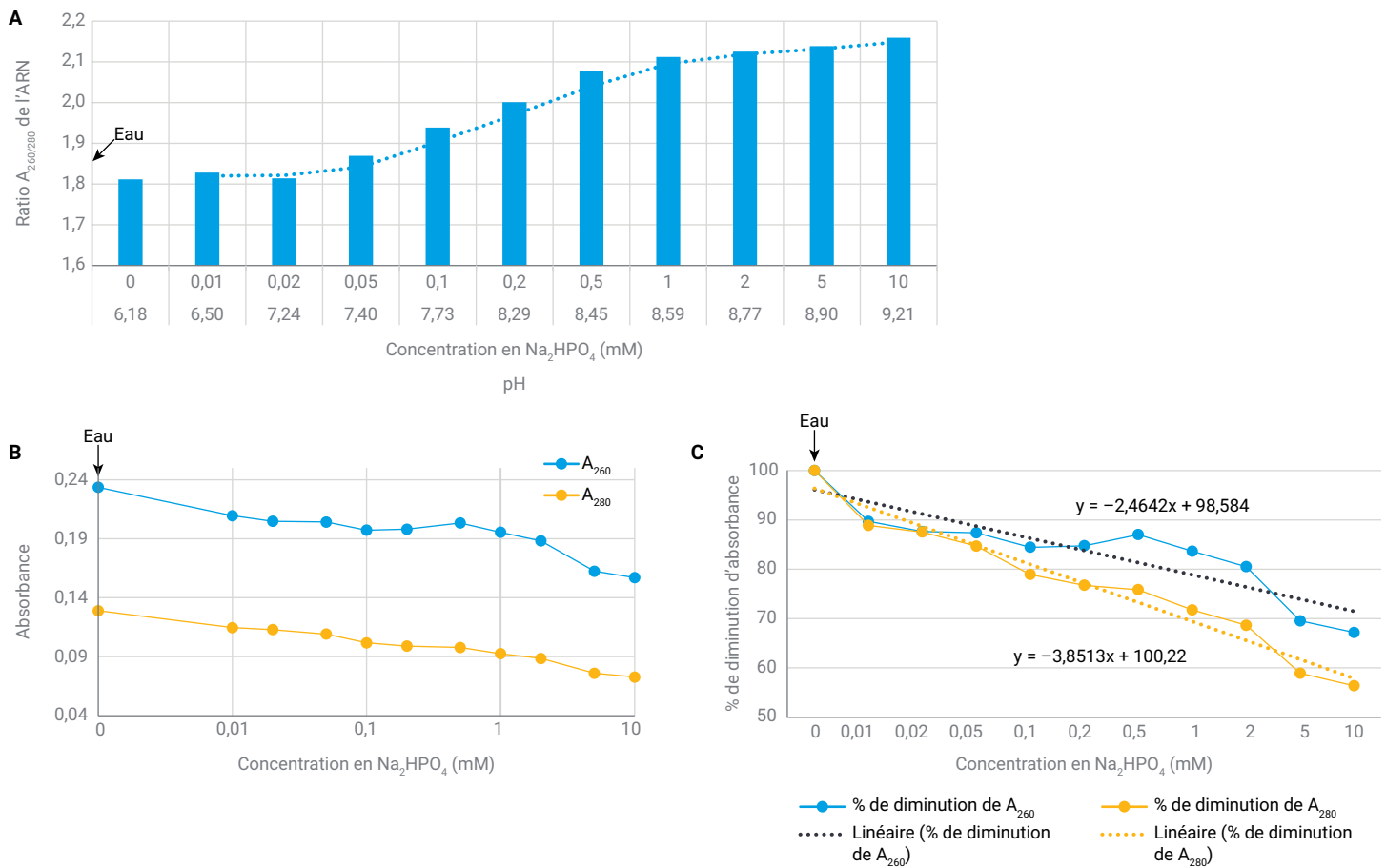


Figure 6. Effets du pH et de la concentration en Na_2HPO_4 sur (A) le ratio $A_{260/280}$ et (B) l'absorbance. (C) Pourcentage de variation des absorbances à 260 et 280 nm.

Les mesures ont été réalisées en triple exemplaire pour chacune des 11 solutions de Na_2HPO_4 . En utilisant la fonctionnalité à deux zones du système Cary 3500, des mesures en triple exemplaire d'échantillons à deux concentrations de Na_2HPO_4 ont été réalisées. Il a été possible d'analyser les effets du Na_2HPO_4 à chacune des 11 concentrations en 60 minutes (six mesures de 33 échantillons et 11 solutions de référence). Cette approche multicuve a permis une augmentation de six fois de la cadence d'analyse par comparaison à un système monocuve.

Effets du pH et de la force ionique sur la détection de protéine dans l'ARN

Afin d'étudier les effets du pH et de la force ionique de la solution tampon sur la détection d'une contamination protéique³, des mesures d'absorbance ont été effectuées sur des échantillons d'ARN dans chacune des 11 solutions de Na_2HPO_4 en présence d'ASB.

La Figure 7A montre les profils d'absorbance du Na_2HPO_4 avec et sans ajout de protéine. L'échantillon d'ARN dans du Na_2HPO_4 à 10 mM a permis d'obtenir un ratio $A_{260/280}$ de 2,15 ; cependant, en présence de protéine, le ratio $A_{260/280}$ a chuté à 1,61. La figure montre clairement que la présence de la protéine modifie le profil d'absorbance de l'ARN.

La diminution du ratio $A_{260/280}$ entre l'ARN seul et le mélange protéine/ARN était de 19,1 % dans l'eau par comparaison avec la diminution de 26,6 % observée dans une solution de Na_2HPO_4 à 1,0 mM. Ces résultats indiquent que la contamination protéique est plus facilement détectée dans des conditions alcalines.

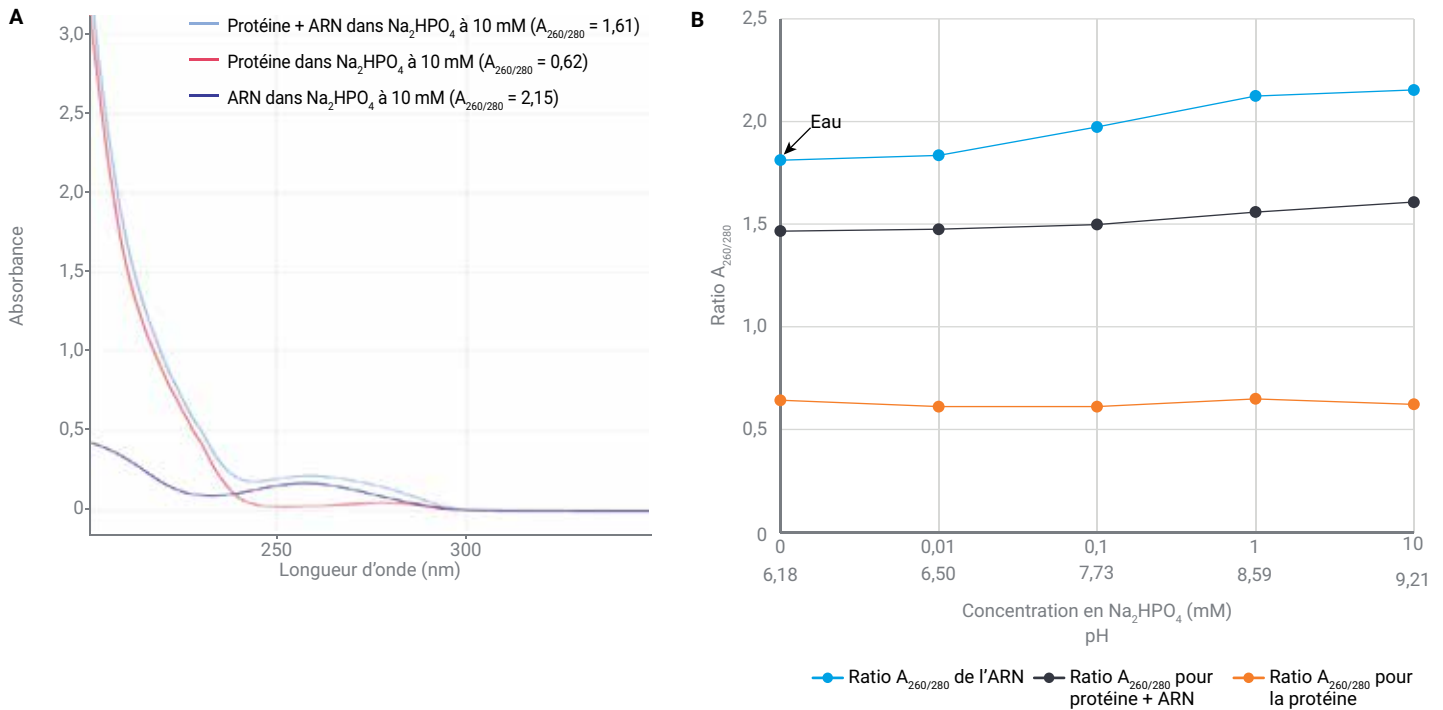


Figure 7. Effets du pH et de la force ionique sur le ratio $A_{260/280}$ de l'ARN avec et sans protéine. (A) Profils d'absorbance d'échantillons d'ARN, de protéine, et d'ARN enrichi avec une protéine dans une solution de Na_2HPO_4 à 10 mM. (B) Graphe représentant les ratio $A_{260/280}$ obtenus pour des échantillons d'ARN, de protéine, et d'ARN enrichi avec une protéine dans des solutions de Na_2HPO_4 à une concentration comprise entre 0,01 et 10 mM.

Effets de différentes solutions tampon sur l'absorbance de l'ARN total de cellules HeLa

Afin d'étudier les effets de différentes solutions tampon sur le spectre d'absorbance UV de l'ARN, des mesures ont été effectuées dans de l'eau (pH 6,18), dans une solution de Na_2HPO_4 à 1 mM (pH 8,59), et dans une solution de tampon TNE. Le tampon TNE a été utilisé dans cette étude car il est fréquemment recommandé pour les analyses spectrophotométriques d'acides nucléiques.³

La Figure 8 montre que les spectres d'absorbance UV de l'ARN sont similaires dans les deux solutions tampon (Na_2HPO_4 à 1 mM et TNE), alors que le profil UV de l'ARN dans l'eau est décalé vers une longueur d'onde supérieure. Ces résultats indiquent que le spectre d'absorbance UV de l'échantillon d'ARN dissous dans une solution tampon est différent de celui d'un ARN dissous dans de l'eau. Les solutions tampon alcalines permettent d'obtenir une meilleure estimation de la pureté de l'ARN que lorsque celui-ci est dissous dans de l'eau pure. Il est donc recommandé d'utiliser une solution tampon alcaline pour dissoudre l'ARN extrait.

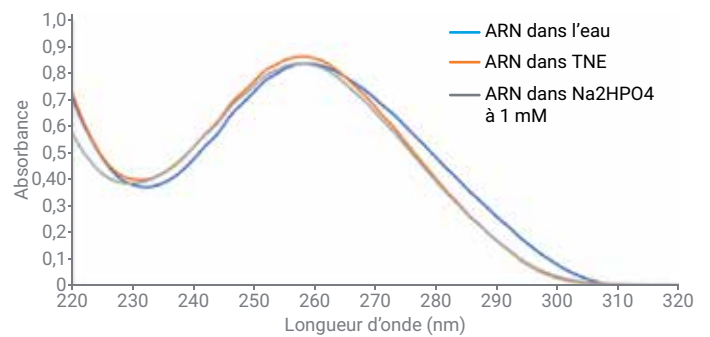


Figure 8. Profils d'absorbance UV d'ARN extrait de cellules HeLa et analysé dans de l'eau, dans du tampon TNE et dans une solution de Na_2HPO_4 à 1 mM. Ces résultats sont concordants avec les résultats obtenus par Wilfinger *et al.*³, démontrant ainsi la cohérence des résultats obtenus dans les deux études.

Conclusion

Cette note d'application présente une méthode efficace d'évaluation de la pureté de l'ARN fondée sur le ratio A_{260}/A_{280} calculé à partir de mesures réalisées avec le spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicell Peltier. Le système Cary 3500 permet de tester simultanément plusieurs conditions expérimentales, et d'éviter ainsi des variables expérimentales non désirées.

Les résultats ont montré que le pH et la force ionique des solutions d'ARN affectaient de façon significative le ratio A_{260}/A_{280} , et qu'une contamination protéique des échantillons d'ARN était plus facilement évaluée dans des conditions alcalines. Les fonctionnalités de calcul d'équation intégrées au logiciel Cary 3500 permettent de calculer et d'enregistrer automatiquement dans un rapport d'analyse le ratio A_{260}/A_{280} . Ces fonctionnalités ont permis d'évaluer précisément et efficacement la pureté d'échantillons d'ARN dans différentes solutions tampon. Le logiciel est compatible avec la suite logicielle OpenLab Agilent pour une utilisation dans des environnements réglementés. OpenLab permet d'effectuer des contrôles techniques pour acquérir et stocker des données de manière sécurisée dans les laboratoires tenus de respecter la réglementation 21 CFR Part 11 de la FDA, l'Annexe 11 de l'UE et autres réglementations nationales similaires.

Agilent propose l'ensemble des consommables (p. ex. le kit de micropréparation Absolutely RNA), instruments (p. ex. le système Agilent TapeStation 4200 et le spectrophotomètre UV-Visible Cary 3500) et des fonctionnalités analytiques permettant d'évaluer la qualité des échantillons d'ARN.

Références

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. Note d'application Agilent Technologies, numéro de publication 5994-2538FR, **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

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Imprimé aux États-Unis, le 14 novembre 2024
5994-7892FR
PR7001-3461