

## Valutazione comparativa della purezza di RNA tramite misure UV-Vis simultanee

Valutazione degli effetti del pH e della forza ionica sul rapporto  $A_{260/280}$  dell'RNA mediante uno spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500



### Autore

Aveline Neo  
Agilent Technologies, Inc.

### Abstract

Il metodo standard per la valutazione della purezza degli acidi nucleici impiega le misure spettrofotometriche dell'assorbanza alle lunghezze d'onda di 260 nm ( $A_{260}$ ) e 280 nm ( $A_{280}$ ). La presente nota applicativa dimostra che variazioni sia nel pH che nella forza ionica di una soluzione tampone contenente campioni di acido ribonucleico (RNA) incide sui valori del rapporto  $A_{260/280}$ . Altri risultati indicano che il rilevamento della contaminazione da proteine migliora in misura significativa quando la misura sull'RNA viene effettuata in una soluzione alcalina. Impiegando uno spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500 il presente studio mette in luce i vantaggi associati all'esecuzione simultanea di più esperimenti e all'uso delle equazioni integrate nel software del sistema UV-Vis Cary 3500 per valutare la purezza dell'RNA.

## Introduzione

La valutazione dell'integrità e della purezza dell'RNA è fondamentale per garantire la qualità dell'RNA nelle applicazioni e negli esperimenti successivi. Se l'RNA è compromesso o contaminato si possono ottenere risultati di espressione genica non affidabili, con potenziali conseguenze per le conclusioni tratte da questi tipi di analisi.<sup>1</sup> Inoltre, poiché l'RNA incapsulato può essere impiegato come farmaco, la qualità dell'RNA è un attributo critico per la qualità in applicazioni di produzione farmaceutica.

Il ricorso alla spettrofotometria per la quantificazione e la valutazione della purezza dell'RNA è una pratica ben consolidata. Il rapporto  $A_{260/280}$ , calcolato misurando l'assorbanza del campione a 260 e 280 nm, è usato per valutare la purezza di un campione di acido nucleico. L'assorbanza a 260 nm indica principalmente la presenza di acidi nucleici, mentre l'assorbanza a 280 nm quella di eventuali proteine contaminanti. Di conseguenza, un campione di RNA puro presenterebbe un valore del rapporto  $A_{260/280}$  pari a 2,00, mentre per un campione di proteina tale valore sarebbe pari a 0,57.<sup>2</sup>

Sebbene il rapporto  $A_{260/280}$  sia un parametro utile, Wilfinger *et al.* hanno segnalato che il pH e la concentrazione della soluzione impiegata nelle valutazioni spettrofotometriche possono avere un effetto significativo su tale rapporto.<sup>3</sup> Anche la valutazione quantitativa di preparazioni di acidi nucleici è influenzata da pH e concentrazione.

Nel presente studio esperimenti simili a quelli descritti da Wilfinger *et al.* sono stati condotti utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Cary 3500 (Figura 1). Lo strumento UV-Vis Peltier multicella Cary 3500 è un sistema innovativo dotato di otto posizioni per cuvette allo scopo di migliorare l'efficienza di misurazione. La misurazione simultanea dell'assorbanza UV per più campioni mediante il sistema Cary 3500 evita la presenza di variabili indesiderate, incrementando l'affidabilità dei risultati. Le equazioni integrate nel software Agilent Cary UV Workstation consentono il calcolo automatico del rapporto  $A_{260/280}$  in base alle scansioni UV, migliorando ulteriormente la produttività delle analisi.

Anche gli effetti del pH e della forza ionica della soluzione del campione di RNA sul valore del rapporto  $A_{260/280}$  sono stati esaminati utilizzando il sistema Cary 3500. È stato inoltre studiato l'effetto del pH e della forza ionica sull'identificazione della contaminazione da proteine nell'RNA. Sono stati infine eseguiti confronti tra scansioni di assorbanza UV dell'RNA in due differenti soluzioni tampone e in acqua.



Figura 1. Spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500.

## Condizioni sperimentali

### Strumentazione

Nel presente studio è stato impiegato uno spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500. L'acquisizione dei dati è stata condotta usando il software Agilent Cary UV Workstation (versione 1.4.256) abbinato al software aggiuntivo Cary 3500 Multizone e usando i parametri riportati nella Tabella 1. Nel software sono incluse più di 50 equazioni. Sono state utilizzate celle rettangolari per ultra-microvolumi con lunghezza del percorso UV pari a 10 mm e volume di riempimento di 70  $\mu$ L (codice 5062-2496). Per ciascuna cella è stato utilizzato un volume di campione pari a 50  $\mu$ L. Lo strumento Cary 3500 consente la misurazione di volumi di campione di dimensioni così ridotte grazie a un fascio luminoso uniforme ad alta collimazione di larghezza inferiore a 1,5 mm e all'allineamento ottico permanente dei suoi supporti cella stazionari.

Tabella 1. Parametri dello spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500.

Parametri	Valore
Modalità X	nm
Modalità Y	Assorbanza
Modalità raccolta	Scansione
Inizio intervallo di scansione	400 nm
Fine intervallo di scansione	220 nm
Tempo per la media	0,020 s
Intervallo dati	1,00 nm
Velocità di scansione	3.000 nm/min
Larghezza di banda spettrale	2,00 nm
Modulo rivelatore	UV-Vis Peltier Multicella



## Condizioni sperimentali

Nel presente lavoro sono stati condotti i tre esperimenti seguenti:

### 1. Studio degli effetti del pH e della concentrazione di $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ sul rapporto $A_{260/280}$ e sull'assorbanza dell'RNA

L' $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  è stato diluito con acqua ultra pura alle seguenti concentrazioni: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 e 10 mM. Nell'esperimento è stata inclusa acqua ultra pura come controllo. Tutte le misurazioni del pH sono state effettuate con un pH-metro SevenCompact S220 di Mettler Toledo (Greifensee, Svizzera). L'RNA è stato diluito fino a 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con le rispettive concentrazioni delle soluzioni di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

### 2. Studio degli effetti del pH e della forza ionica sul rapporto $A_{260/280}$ dell'RNA in presenza di proteina BSA solubilizzata

L' $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  è stato diluito fino alle seguenti concentrazioni: 0,01; 0,1; 1 e 10 mM. Nell'esperimento è stata inclusa acqua come controllo. L'RNA è stato disciolto nelle rispettive soluzioni tampone fino alla concentrazione finale di 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . L'RNA con aggiunta di proteina (contenente sia RNA alla concentrazione finale di 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  sia BSA alla concentrazione finale di 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) è stato disciolto nelle rispettive soluzioni tampone. Anche la BSA è stata preparata nelle rispettive soluzioni tampone alla concentrazione di 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3. Scansioni di assorbanza UV di RNA di HeLa analizzato in $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1 mM, soluzione tampone TNE e acqua

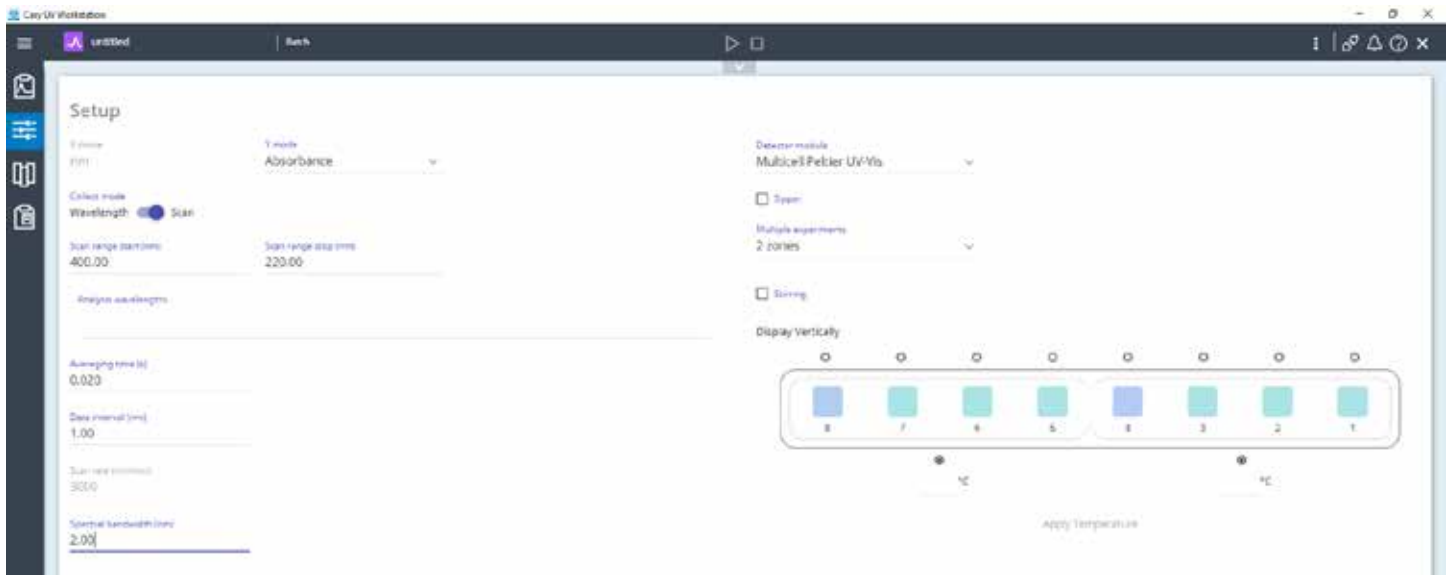
È stata preparata una soluzione tampone TNE contenente tris 10 mM, EDTA 1 mM ed NaCl 0,2 mM con pH 7,4. L'RNA è stato diluito fino alla concentrazione finale di 0,0062  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  nella soluzione tampone TNE, in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM e in acqua.

## Misure di assorbanza

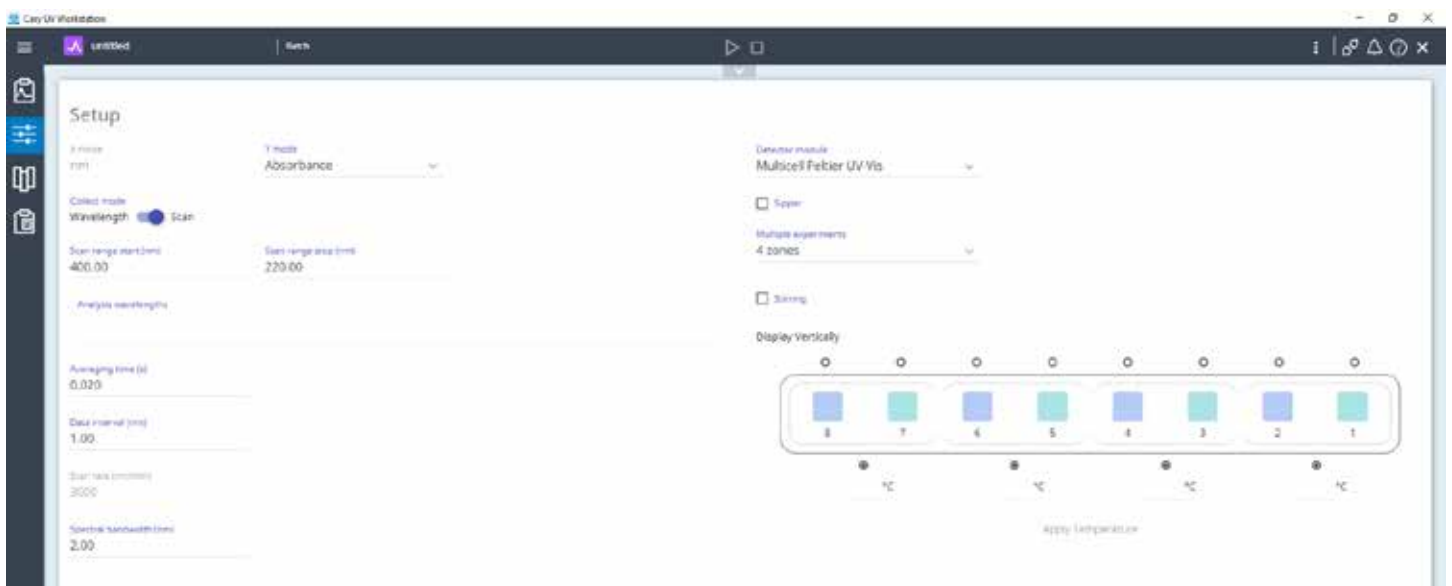
I valori di assorbanza di tutti i campioni sperimentali sono stati misurati con lo spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Cary 3500. Per azzerare lo spettrofotometro per ciascun esperimento è stata utilizzata un'opportuna soluzione di bianco e nel corso dell'analisi è stata applicata la correzione della linea di base.

La capacità dello strumento UV-Vis Peltier multicella Cary 3500 di misurare più campioni simultaneamente rende le misure spettrofotometriche più efficienti, mantenendo al tempo stesso omogenee le condizioni di misura. Grazie alle otto posizioni in quattro zone per le celle, lo strumento è in grado di analizzare campioni in una singola zona (otto cuvette), due zone (quattro cuvette per zona) o quattro zone (due cuvette per zona). Ogni zona possiede il proprio canale di riferimento.

Per gli studi sulla contaminazione da proteine è stata utilizzata la funzionalità a due zone del sistema UV-Vis Cary 3500. Questa configurazione ha consentito di esaminare due soluzioni tampone in un'unica misura (Figura 3). La funzionalità a quattro zone dello strumento è stata utilizzata per la misura simultanea dell'RNA in tre diverse soluzioni (tampone TNE,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM o acqua), come mostrato nella Figura 4. Dopo ogni misurazione, le equazioni integrate nel software Cary UV Workstation hanno permesso di calcolare e refertare automaticamente i rapporti  $A_{260/280}$  (Figura 5). Queste funzionalità del sistema Cary 3500 incrementano la produttività delle scansioni di assorbanza UV rispetto ai sistemi a singola cuvetta.



**Figura 3.** La funzionalità per esperimenti multipli "a due zone" dello spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500. Le posizioni verdi e viola corrispondono rispettivamente ai campioni e alle soluzioni di riferimento.



**Figura 4.** La funzionalità per esperimenti multipli "a quattro zone" dello spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500. Le posizioni verdi e viola corrispondono rispettivamente ai campioni e alle soluzioni di riferimento.

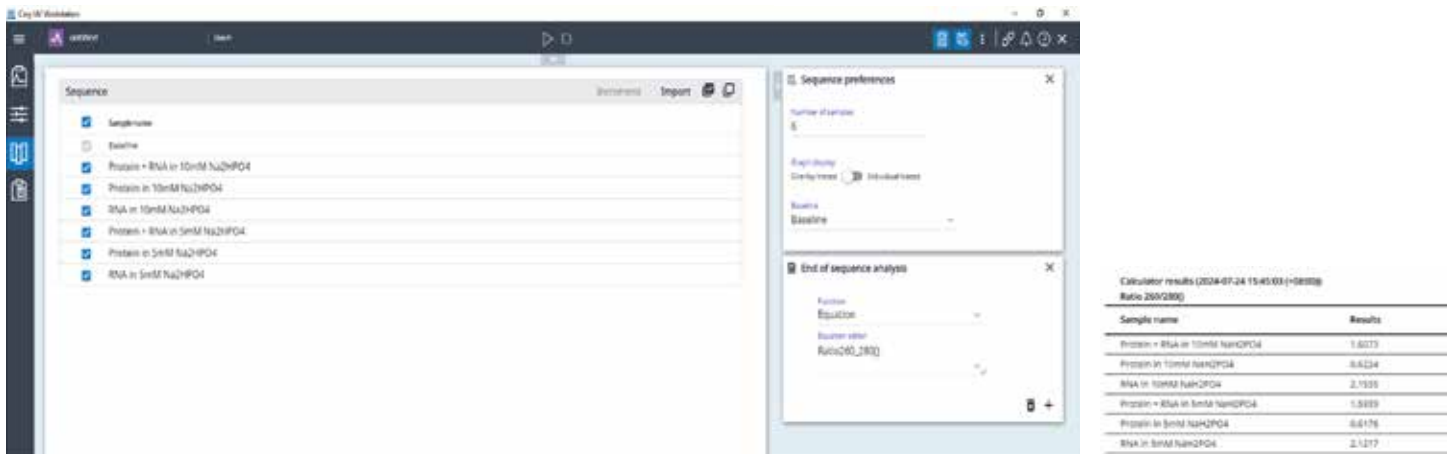


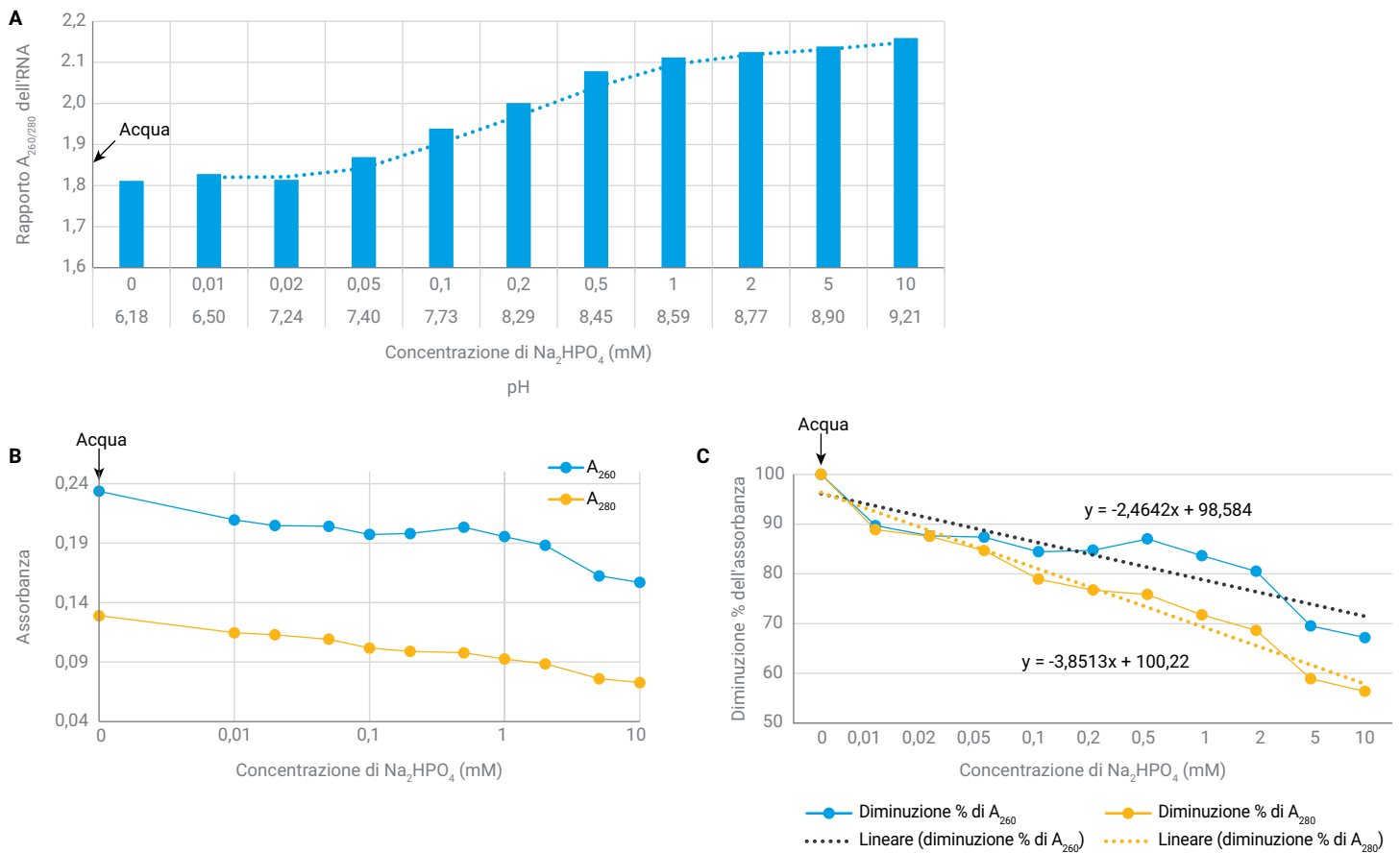
Figura 5. Calcolo e refertazione automatici dei rapporti  $A_{260/280}$  tramite le equazioni integrate nel software Agilent Cary UV Workstation.

## Risultati e discussione

### Gli effetti di pH e concentrazione di $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ sul rapporto $A_{260/280}$ e sull'assorbanza dell'RNA

Per valutare gli effetti di pH e concentrazione di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sul rapporto  $A_{260/280}$  e sull'assorbanza dell'RNA, sono state impiegate come agente tamponante 11 soluzioni di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  con concentrazioni comprese tra 0,1 e 10 mM.<sup>3</sup> L'incremento del rapporto  $A_{260/280}$  è risultato essere direttamente proporzionale all'incremento del pH e della concentrazione di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Un marcato incremento è stato registrato tra i valori di pH 7,2 e 8,6 e tra le concentrazioni di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,02 e 1 mM (Figura 6A).

Nella Figura 6B è visibile una diminuzione dei valori di  $A_{260}$  e  $A_{280}$  al crescere della concentrazione di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o del pH. La diminuzione percentuale dei valori di assorbanza per le rispettive concentrazioni di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  è stata determinata rispetto all'acqua. La pendenza della curva di diminuzione percentuale del valore di  $A_{280}$  è più marcata rispetto alla pendenza della curva di  $A_{260}$ , come indicato dalle rispettive linee tratteggiate nella Figura 6C. Questi risultati indicano che l'incremento del rapporto  $A_{260/280}$  si deve a una riduzione dell'assorbanza a 280 nm dipendente dal pH o dalla forza ionica.



**Figura 6.** Gli effetti di pH e concentrazione di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> su: (A) rapporto A<sub>260/280</sub> e (B) assorbanza. (C) Variazione percentuale dell'assorbanza a 260 e 280 nm.

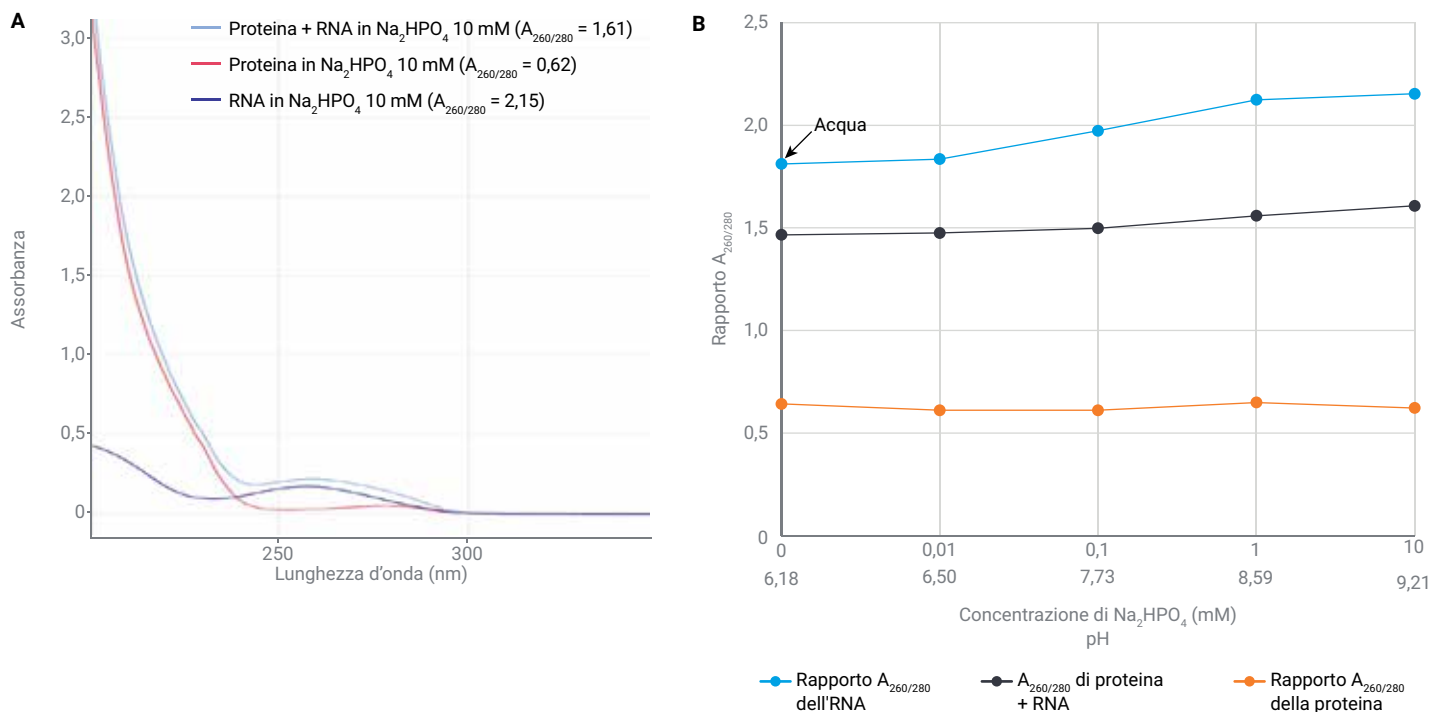
Per ciascuna delle 11 soluzioni di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sono state acquisite misure in triplicato. Gli esperimenti multipli a due zone, funzionalità offerta dallo strumento Cary 3500, hanno consentito di effettuare misure su campioni di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in triplicato a due concentrazioni. L'uso di questa metodologia ha permesso di analizzare l'Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> per ognuna delle 11 concentrazioni in 60 minuti (sei misurazioni di 33 campioni e 11 soluzioni di riferimento). Questo approccio multicella ha incrementato la produttività dell'analisi di un fattore sei rispetto a un sistema a singola cuvetta.

### Gli effetti di pH e forza ionica sul rilevamento di proteine nell'RNA

Per esaminare gli effetti del pH e della forza ionica della soluzione tampone sul rilevamento della contaminazione da proteine<sup>3</sup>, l'assorbanza dell'RNA è stata valutata nelle 11 soluzioni di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in presenza di una proteina BSA.

Nella Figura 7A sono riportati i profili di assorbanza in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con e senza aggiunta di proteina. L'RNA in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM ha generato un rapporto A<sub>260/280</sub> pari a 2,15; in presenza di proteina, invece, il rapporto A<sub>260/280</sub> è sceso fino a 1,61. La figura mostra chiaramente come la proteina modifica il profilo di assorbanza dell'RNA.

La diminuzione del rapporto A<sub>260/280</sub> tra RNA e proteina con RNA è risultata pari a 19,1% in acqua, mentre la diminuzione osservata in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 mM è stata del 26,6% (Figura 7B). Questo risultato indica che la contaminazione da proteine viene rilevata più facilmente in condizioni alcaline.

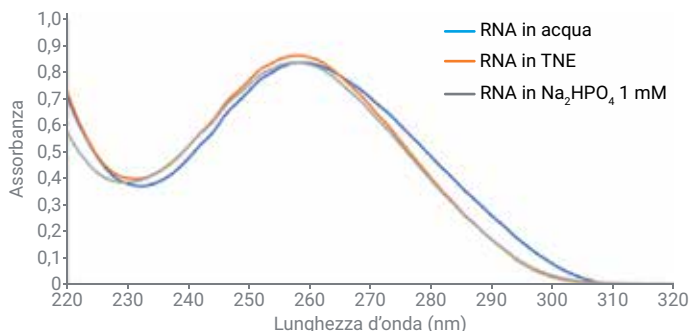


**Figura 7.** Gli effetti di pH e forza ionica sul rapporto  $A_{260/280}$  dell'RNA in presenza e in assenza di proteina. (A) Profili di assorbanza di campioni di RNA, di proteina e di RNA con aggiunta di proteina in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM. (B) Grafici dei rapporti  $A_{260/280}$  per RNA, proteina ed RNA con aggiunta di proteina in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tra 0,01 e 10 mM.

### Misurazioni di RNA totale da cellule HeLa in differenti soluzioni tampone

Per esaminare gli effetti di differenti soluzioni tampone sugli spettri di assorbanza UV dell'RNA sono state effettuate analisi in acqua (pH 6,18),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM (pH 8,59) e una soluzione tampone (TNE). La soluzione tampone TNE è stata inclusa nell'esperimento in quanto viene spesso raccomandata per l'analisi spettrofotometrica di acidi nucleici.<sup>3</sup>

Come mostrato nella Figura 8, gli spettri di assorbanza UV dell'RNA nelle due soluzioni tampone ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM e TNE) sono simili, mentre il profilo UV dell'RNA in acqua si è spostato a una lunghezza d'onda più alta. I risultati mostrano che un campione di RNA disciolto in una soluzione tampone genera una traccia di assorbanza UV diversa rispetto all'RNA disciolto in acqua. La soluzione tamponata alcalina offre una stima migliore della purezza dell'RNA rispetto al campione di RNA disciolto in acqua pura. Per disciogliere l'RNA estratto si consiglia pertanto l'uso di una soluzione tamponata alcalina.



**Figura 8.** Profili di assorbanza UV di RNA di HeLa analizzato in acqua, tampone TNE ed  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM. I risultati sono in linea con quelli pubblicati da Wilfinger *et al.*<sup>3</sup>, a dimostrazione della coerenza dei risultati tra gli studi.

## Conclusione

La presente nota applicativa illustra un metodo efficace per valutare la purezza dell'RNA in base al rapporto  $A_{260/280}$  mediante lo spettrofotometro UV-Vis Peltier multicella Agilent Cary 3500. Lo strumento Cary 3500 ha consentito di testare più condizioni sperimentali simultaneamente, evitando variabili sperimentali indesiderate.

I dati hanno mostrato che il pH e la forza ionica delle soluzioni di RNA incidono in misura significativa sul rapporto  $A_{260/280}$  e che in presenza di condizioni alcaline si ottiene una stima migliore della contaminazione da proteine dei campioni di RNA. Le equazioni integrate nel software del sistema Cary 3500 hanno consentito di calcolare e refertare il rapporto  $A_{260/280}$  automaticamente. Queste funzionalità hanno permesso la valutazione accurata ed efficiente di campioni di RNA in condizioni di tampone differenti. Il software è compatibile con la suite di software Agilent OpenLab per l'uso in ambienti regolamentati. OpenLab fornisce controlli tecnici che permettono di acquisire e archiviare in modo sicuro i dati nei laboratori che devono sottostare alle normative CFR 21 Parte 11 dell'FDA, Allegato 11 della UE e altri regolamenti simili in altri paesi.

Agilent fornisce i prodotti di consumo (per esempio il kit Absolutely RNA Microprep), la strumentazione (per esempio il sistema TapeStation 4200 e lo spettrofotometro UV-Vis Cary 3500) e le soluzioni per flusso di lavoro necessari per svolgere analisi di determinazione della qualità dell'RNA.

## Bibliografia

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 applicativa Agilent Technologies, codice pubblicazione 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)

RA45590.388194444

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono essere soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Stampato negli Stati Uniti, 14 novembre 2024  
5994-7892ITE  
PR7001-3461