

使用同步紫外-可见光测量对 RNA 纯度进行比较评估

利用 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计评估 pH 和离子强度对 RNA $A_{260/280}$ 的影响



作者

Aveline Neo
安捷伦科技有限公司

摘要

评估核酸纯度的标准方法，是使用分光光度法测定 260 nm (A_{260}) 和 280 nm (A_{280}) 波长处的吸光度。本应用简报表明，核糖核酸 (RNA) 样品缓冲液的 pH 值和离子强度变化会影响 $A_{260/280}$ 比值。同时，结果还表明，在碱性溶液中检测 RNA 时，更容易检测到蛋白质污染。本研究采用 Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计，重点探讨了其在同步开展多个实验以及利用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计的内置方程计算软件功能评估 RNA 纯度方面的优势。

前言

评估 RNA 的完整性和纯度对于确保下游实验和应用中的 RNA 质量至关重要。受损或受污染的 RNA 可能导致基因表达结果不可靠，从而影响此类分析得出的结论^[1]。此外，由于包封 RNA 可作为药品使用，因此 RNA 质量已成为药品生产中的一种关键质量属性。

使用分光光度法进行 RNA 定量分析和纯度评估的方法已经非常成熟。 $A_{260/280}$ 比值常用于评估核酸样品的纯度，通过测量样品在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度可以得到这一比值。260 nm 处的吸光度主要用于检测核酸，而 280 nm 处的吸光度主要用来检测各种蛋白质污染。因此，纯 RNA 样品的 $A_{260/280}$ 比值为 2.00，而蛋白质样品的比值为 0.57^[2]。

$A_{260/280}$ 比值虽然是一个非常有用的参数，但 Wilfinger 等人发现，使用分光光度法进行评估时，使用的溶液的 pH 值和浓度会显著影响该比值^[3]。因此，核酸制剂的定量评估也会受到 pH 值和浓度的影响。

本研究使用 Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计，开展了与 Wilfinger 等人类似的实验（图 1）。Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计是一款创新系统，包含八个比色皿位置，可提高检测效率。Cary 3500 能够同步测量多个样品的紫外吸光度，避免不利变量的影响，提高结果的可靠性。Agilent Cary UV Workstation 软件的内置方程计算功能可根据紫外扫描结果自动计算 $A_{260/280}$ 比值，进一步提高了分析通量。

本研究采用 Cary 3500，考察了 RNA 样品溶液的 pH 值和离子强度对 $A_{260/280}$ 比值的影响。此外，还考察了 pH 值和离子强度对鉴定 RNA 中蛋白质污染的影响，还比较了 RNA 在两种不同缓冲液和水中的紫外吸光度扫描结果。



图 1. Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计

实验部分

仪器

本研究采用 Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计。使用 Agilent Cary UV Workstation 软件（1.4.256 版）和 Cary 3500 多区控温附件进行数据采集，所用参数如表 1 所示。该软件包含 50 多项方程计算功能。使用的比色皿为 70 μ L 超微量矩形比色皿，紫外线路程为 10 mm（部件号 5062-2496）。实验中，每个比色皿装有 50 μ L 样品。Cary 3500 具有高度准直的均匀光束（宽度小于 1.5 mm），以及永久光学对准的固定池支架，因此能够在如此小的样品量下进行检测。

表 1. Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计参数

参数	设定值
X 模式	nm
Y 模式	吸光度
采集模式	扫描
扫描范围起始波长	400 nm
扫描范围结束波长	220 nm
信号平均时间	0.020 s
数据间隔	1.00 nm
扫描速率	3000 nm/min
光谱带宽	2.00 nm
检测器模块	多池控温 UV-Vis

试剂与材料

HeLa 细胞系购自 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA)。Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 购自赛默飞世尔科技公司 (Waltham, Massachusetts, USA)。

使用 Agilent Absolutely RNA Microprep 试剂盒，从 HeLa 细胞中提取 RNA (货号 400805)。

牛血清白蛋白 (BSA)、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (tris-HCl) 和氯化钠 (NaCl) 均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。EDTA 溶液来自 Merck (Darmstadt, Germany)。

新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。

从 HeLa 细胞沉淀中提取 RNA

将 HeLa 细胞在 DMEM 细胞培养基中培养至 100000 个细胞。然后将培养皿中的细胞刮入培养基中，然后转移到 15 mL Falcon 管中。将细胞悬液以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟，使细胞沉淀，然后使用 Absolutely RNA Microprep 试剂盒

方案提取 RNA。使用 Agilent 4200 TapeStation 系统 (货号 G2991AA)，搭配 RNA ScreenTape (货号 5067-5576)、RNA ScreenTape 样品缓冲液 (货号 5067-5577) 和 RNA ScreenTape 分子量标准品 (货号 5067-5578) 对提取的 RNA 进行质量检查。

将 RNA 在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 下冷冻保存，直到分析前再解冻。

HeLa 细胞 RNA 提取及纯度评估的工作流程

如图 2A 所示，由实验室内部培养 HeLa 细胞，然后使用 Absolutely RNA Microprep 试剂盒方案提取总 RNA。使用 4200 TapeStation 系统 (一种用于 DNA 和 RNA 样品质量控制的自动化电泳解决方案) 检查提取的 RNA 的质量。使用 RNA ScreenTape 胶条分析总 RNA，可通过识别核糖体 RNA 峰和任何潜在的降解产物来评估总 RNA 质量。分析完成后，将为每个样品分配一个 RNA 质量评分，也称为 RNA 完整值当量 (RIN°)，数值为 1-10，其中 1 表示 RNA 高度降解，而 10 表示 RNA 非常完整。本研究中使用的提取 RNA 的 RIN° 值为 10 (图 2B)。然后使用 Cary 3500 UV-Vis 测量提取的 RNA 的吸光度，以评估 RNA 纯度。

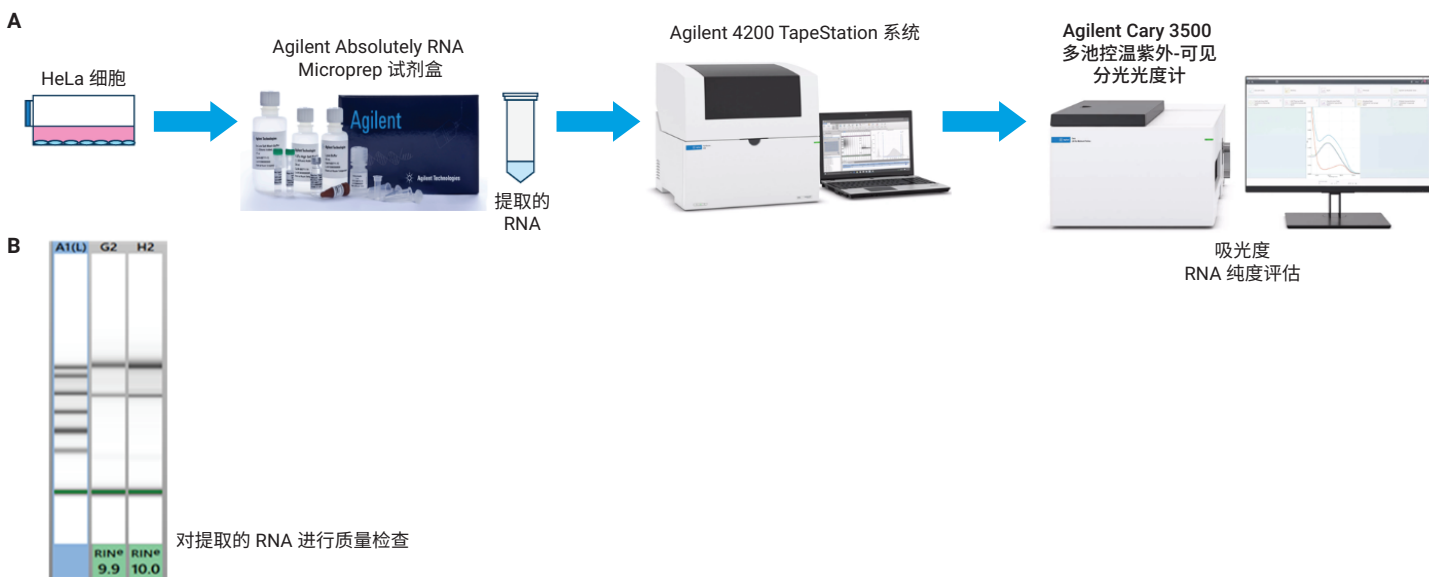


图 2. (A) 工作流程示意图，使用安捷伦消耗品提取 RNA，并使用 Agilent 4200 TapeStation 系统和 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计评估其质量和纯度。(B) 在 4200 TapeStation 上分析从 HeLa 细胞中提取的 RNA，得到 RIN° 值为 10

实验部分

本研究进行了以下三项实验：

1. 研究 pH 和 Na_2HPO_4 浓度对 RNA $A_{260/280}$ 比值和吸光度的影响

用超纯水将 Na_2HPO_4 稀释至以下浓度：0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 和 10 mM。实验中还包含了超纯水作为对照。所有 pH 值的测量均使用 Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) 的 SevenCompact pH 计 S220 进行。使用不同浓度的 Na_2HPO_4 溶液，将 RNA 稀释至 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2. 在存在溶解态 BSA 蛋白质时，研究 pH 值和离子强度对 RNA $A_{260/280}$ 比值的影响

将 Na_2HPO_4 稀释至以下浓度：0.01、0.1、1 和 10 mM。实验中还包含了水作为对照。将 RNA 溶于各缓冲溶液中，使最终浓度为 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。将添加了蛋白质的 RNA（其中 RNA 最终浓度为 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，BSA 最终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）溶于各缓冲液中。此外，将 BSA 溶于各缓冲溶液中，使最终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

3. 1 mM Na_2HPO_4 、TNE 缓冲液和水中 HeLa RNA 的紫外吸光度扫描

配制含有 10 mM tris、1 mM EDTA 和 0.2 mM NaCl 的 TNE 缓冲液，pH 7.4。将 RNA 分别稀释于 TNE 缓冲液、1 mM Na_2HPO_4 和水中，使最终浓度为 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

吸光度测量

使用 Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计测量所有实验样品的吸光度值。每次实验时使用适当的空白溶液对分光光度计调零，并在分析过程进行基线校正。

Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计能够同时测量多个样品，不仅能够实现更高效的分光光度测量，还能保持一致的测量条件。这款仪器设有四个温区，共八个比色皿位置，可以以单个温区（八个比色皿）、两个温区（每个温区四个比色皿）或四个温区（每个温区两个比色皿）对样品进行分析。每个温区都有各自的参比通道。

利用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计的双温区功能进行蛋白质污染研究。这种配置可以在一次测量中同时研究两种缓冲液（图 3）。此外，使用仪器的四温区功能同时测量三种不同溶液中的 RNA（TNE 缓冲液、1 mM Na_2HPO_4 或水），如图 4 所示。每次测量后，Cary UV Workstation 软件的内置方程计算功能会自动计算并报告 $A_{260/280}$ 比值（图 5）。与使用单比色皿系统相比，Cary 3500 的这些功能提高了紫外吸光度扫描的通量。

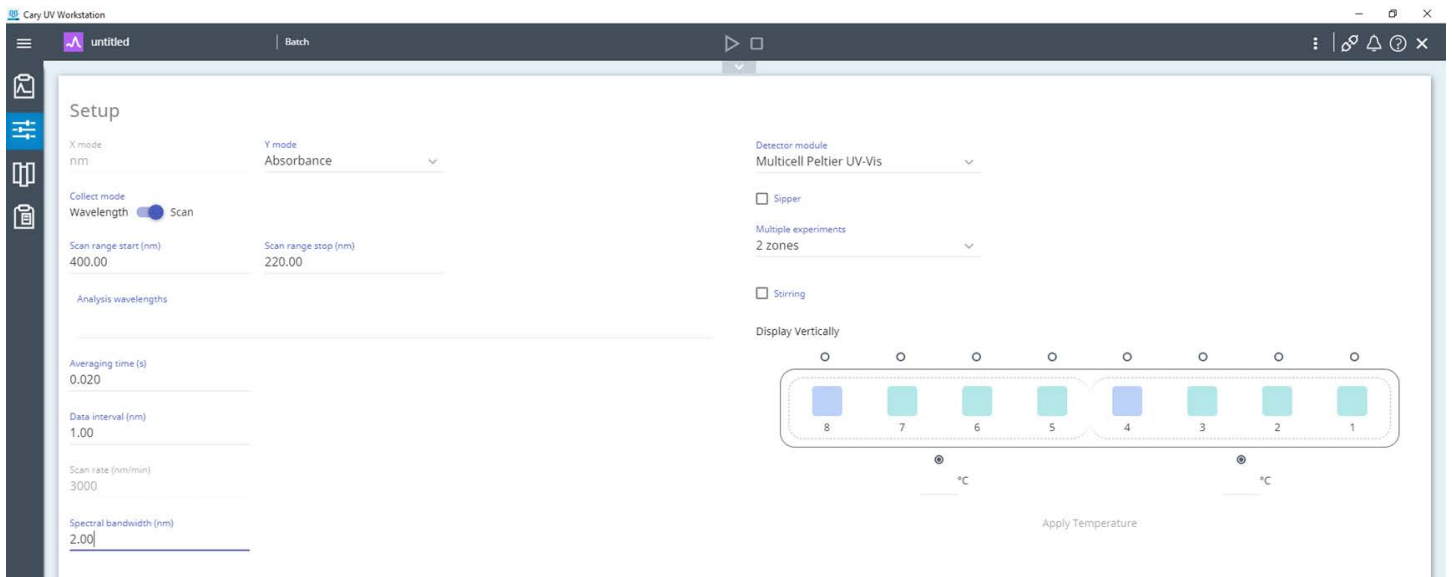


图 3. Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计的“双温区”同步实验功能。绿色和紫色位置分别代表样品和参比溶液

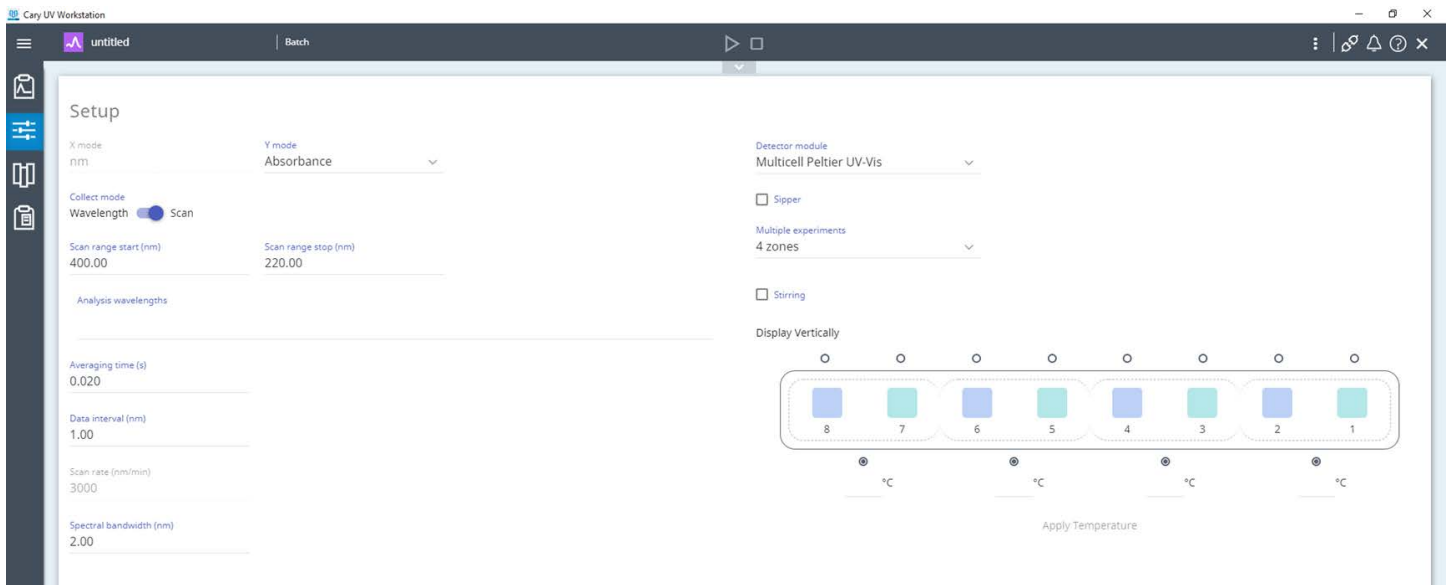


图 4. Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计的“四温区”同步实验功能。绿色和紫色位置分别代表样品和参比溶液

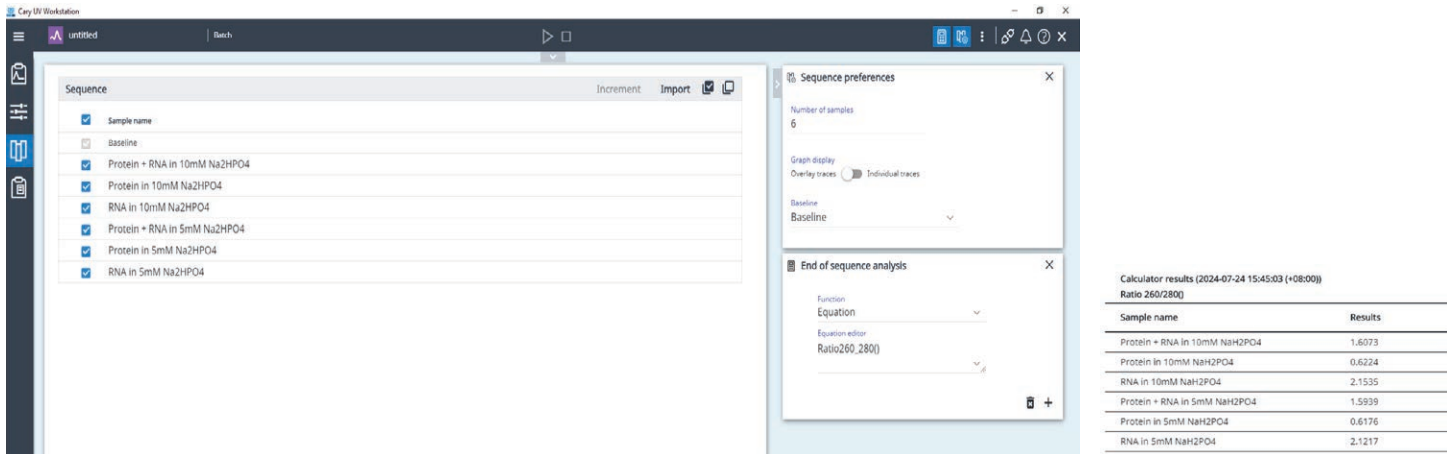


图 5. 使用 Agilent Cary UV Workstation 软件的内置方程计算功能自动计算并报告 A260/280 比值

结果与讨论

pH 和 Na₂HPO₄ 浓度对 RNA A_{260/280} 比值和吸光度的影响

为评估 pH 和 Na₂HPO₄ 浓度对 RNA A_{260/280} 比值和吸光度的影响，使用 0.1–10 mM 浓度范围内的 11 个 Na₂HPO₄ 溶液作为缓冲试剂^[3]。A_{260/280} 比值随着 pH 和 Na₂HPO₄ 浓度的增加而成比例地升高，并在 pH 7.2–8.6 之间，以及 Na₂HPO₄ 浓度 0.02–1 mM 范围内显著增加（图 6A）。

图 6B 显示，A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值随 Na₂HPO₄ 浓度或 pH 值的增加而减小。我们考察了不同 Na₂HPO₄ 浓度下相对于水的吸光度下降百分比。A₂₈₀ 的下降百分比曲线的斜率比 A₂₆₀ 曲线的斜率更陡，如图 6C 中相应虚线所示。这些结果表明，A_{260/280} 比值的增大是由于 pH 值或离子强度的变化导致 280 nm 处的吸光度降低所致。

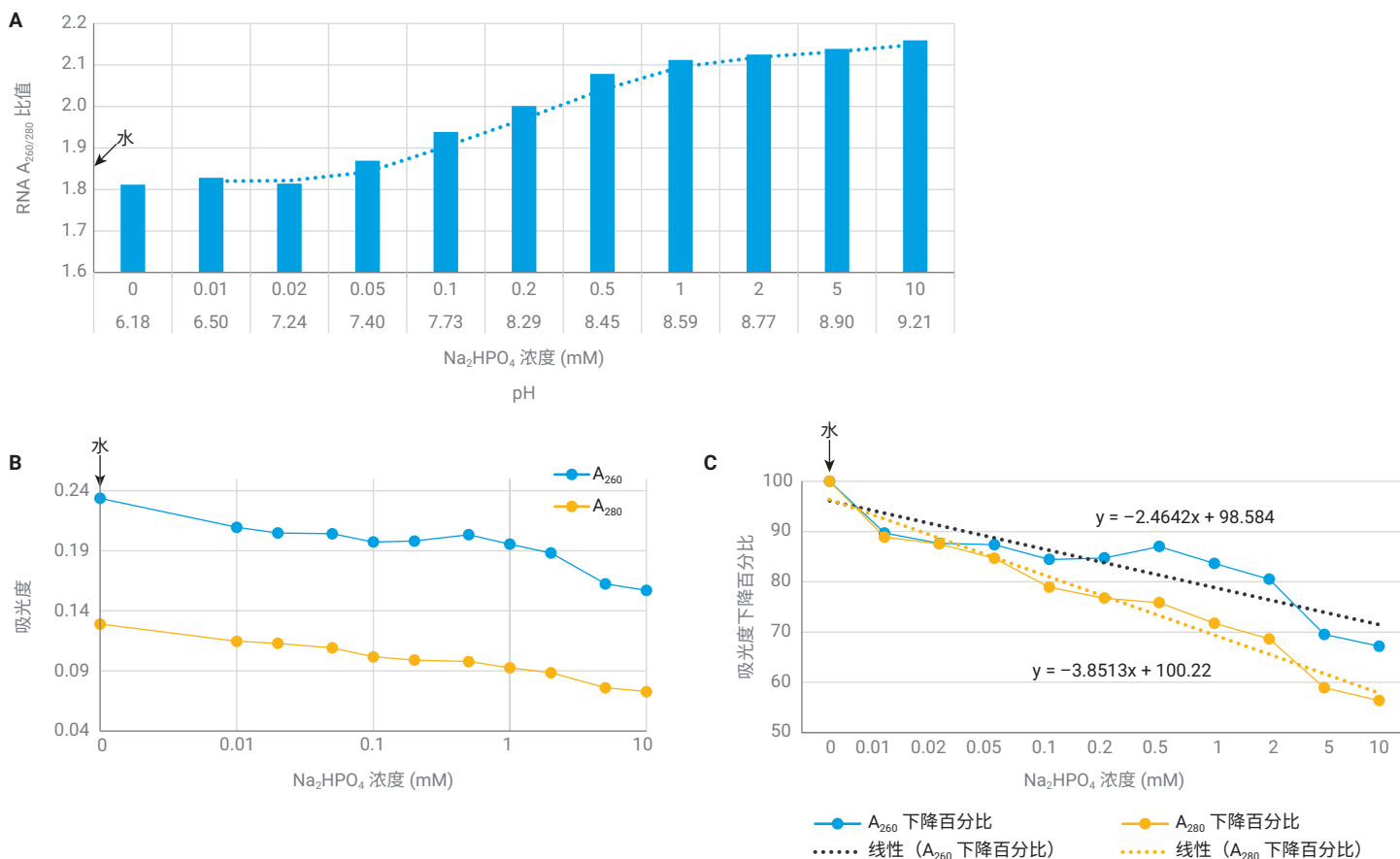


图 6. pH 和 Na₂HPO₄ 浓度对 (A) A_{260/280} 比值和 (B) 吸光度的影响。 (C) 260 nm 和 280 nm 处吸光度变化的百分比

对 11 个 Na₂HPO₄ 溶液分别进行了三次重复测定。使用 Cary 3500 的双温区同步实验功能，对两种浓度下各三个 Na₂HPO₄ 重复样品进行测定。利用这一方法，可以在 60 分钟内完成所有 11 个浓度的 Na₂HPO₄ 的分析（33 个样品和 11 个参比溶液分别进行 6 次测量）。与单比色皿系统相比，这种多池分析方法使分析通量提高至六倍。

pH 和离子强度对 RNA 中蛋白质检测的影响

为研究缓冲液的 pH 值和离子强度对蛋白质污染物检测的影响^[3]，在添加 BSA 蛋白质的情况下测定了 11 个 Na₂HPO₄ 溶液中 RNA 的吸光度。

图 7A 为添加或不添加蛋白质的情况下，Na₂HPO₄ 的吸光度曲线。10 mM Na₂HPO₄ 中 RNA 的 A_{260/280} 比值为 2.15；然而，在存在蛋白质的情况下，A_{260/280} 比值下降至 1.61。图中清楚地显示了蛋白质如何改变了 RNA 的吸光度曲线。

在水中，RNA 与蛋白质 + RNA 间的 A_{260/280} 比值下降了 19.1%，而在 1.0 mM Na₂HPO₄ 中，该比值则下降了 26.6%（图 7B）。这一结果表明，在碱性条件下更容易检测到蛋白质污染。

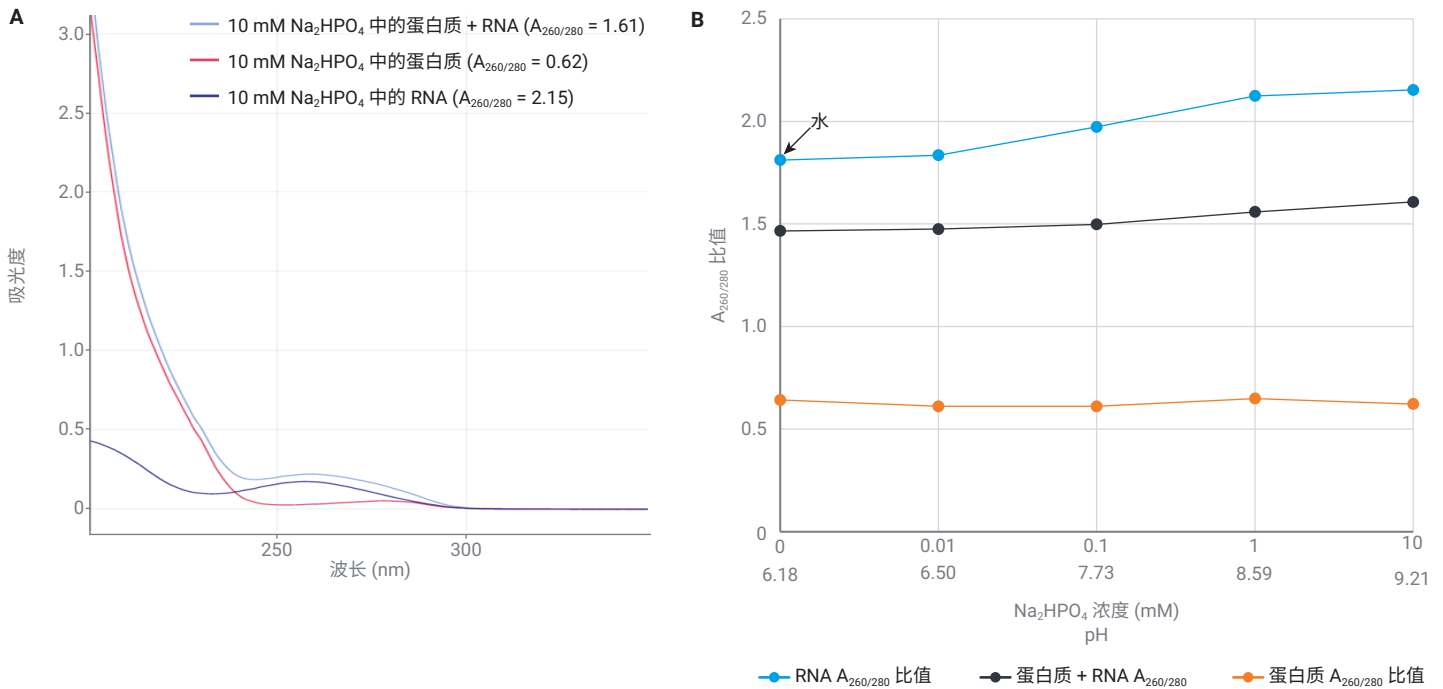


图 7. 存在或不存在蛋白质时, pH 值和离子强度对 RNA $A_{260/280}$ 比值的影响。(A) 10 mM Na₂HPO₄ 中 RNA、蛋白质以及添加蛋白质的 RNA 样品的吸光度曲线。(B) 0.01–10 mM Na₂HPO₄ 中 RNA、蛋白质以及添加蛋白质的 RNA 样品的 $A_{260/280}$ 比值

不同缓冲溶液中的 HeLa 细胞总 RNA 测量

为了考察不同缓冲液对 RNA 紫外吸收光谱的影响, 分别对水 (pH 6.18)、1 mM Na₂HPO₄ (pH 8.59) 和缓冲溶液 (TNE) 中的 RNA 进行了研究。本实验之所以考察了 TNE 缓冲液, 是因为它是核酸分光光度分析常推荐使用的缓冲液^[3]。

如图 8 所示, RNA 在两种缓冲溶液 (1 mM Na₂HPO₄ 和 TNE) 中的紫外吸收光谱相似, 而水中 RNA 的紫外吸收光谱则向更高波长偏移。这些结果表明, 缓冲溶液中的 RNA 与水中的 RNA 具有不同的紫外吸收曲线。与溶于纯水中的 RNA 样品相比, 碱性缓冲溶液有助于更好地评估 RNA 纯度。因此建议使用碱性缓冲溶液来溶解提取的 RNA。

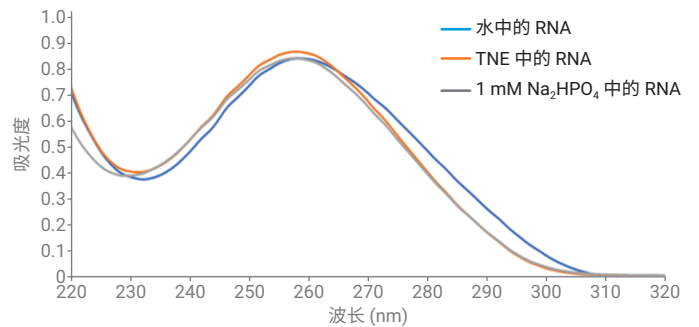


图 8. 分析水、TNE 缓冲液和 1 mM Na₂HPO₄ 中的 HeLa RNA 得到的紫外吸收曲线。该结果与 Wilfinger 等人^[9] 报告的结果一致, 证明了各项研究结果的一致性

结论

本应用简报介绍了一种使用 Agilent Cary 3500 多池控温紫外-可见分光光度计，基于 $A_{260/280}$ 比值高效评估 RNA 纯度的方法。Cary 3500 支持在不同的实验条件下同步进行检测，可避免不必要的实验变量引入误差。

结果表明，RNA 溶液的 pH 值和离子强度会显著影响 $A_{260/280}$ 比值，并且在碱性条件下可以更好地检测 RNA 样品的蛋白质污染。Cary 3500 软件内置的方程计算功能可以自动计算并报告 $A_{260/280}$ 的计算结果。这些功能有助于在不同的缓冲条件下准确、高效地评估 RNA 样品。该软件与 Agilent OpenLab 软件套装兼容，可在法规监管环境下使用。OpenLab 提供了充足的技术控制手段，确保遵循 FDA 21 CFR Part 11、欧盟附录 11 及其他国家/地区类似法规的实验室能够安全地采集和存储数据。

安捷伦提供了 RNA 质量评估所需的消耗品（如 Absolutely RNA Microprep 试剂盒）、仪器（如 4200 TapeStation 系统和 Cary 3500 紫外-可见分光光度计）以及工作流程解决方案。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

RA45590.3881944444

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 11 月 14 日，中国出版
5994-7892ZHCN
PR7001-3461

参考文献

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 (使用 A_{260}/A_{280} 比值和光谱扫描进行微量核酸的纯度评估)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 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