

UV-Vis での一斉分析による RNA 純度の比較評価

Agilent Cary 3500 UV-Vis を用いた RNA $A_{260/280}$ に対する
pH とイオン強度の影響の評価



著者

Aveline Neo
Agilent Technologies, Inc.

概要

核酸の純度を評価するための標準メソッドでは、260 nm (A_{260}) と 280 nm (A_{280}) の波長で分光光度計による吸光度を測定します。このアプリケーションノートでは、リボ核酸 (RNA) サンプルバッファの pH とイオン強度の両方の変化が $A_{260/280}$ 比に影響することを実証します。他の結果では、RNA をアルカリ溶液で測定すると、タンパク質汚染の検出は大幅に増加することが示されています。この研究では、Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計を使用し、RNA 純度の評価のために、複数の実験を同時に実行し、Cary 3500 UV-Vis のソフトウェアに搭載された計算式機能を使用することのメリットに注目します。

はじめに

RNA の完全性と純度の評価は、後工程の実験とアプリケーションにおいて RNA の品質を確保するために不可欠です。劣化したり汚染されたりした RNA は信頼性の低い遺伝子発現の結果につながり、この種の分析によって導き出される結論に影響を及ぼす可能性があります。¹ また、カプセル化した RNA は医薬品として使用できるため、RNA の品質は医薬品製造アプリケーションにおいて重要な品質特性です。

RNA の定量と純度の評価に分光光度計を使用することは、十分に確立された手法となっています。260 nm と 280 nm の両方で測定したサンプルの吸光度から求める $A_{260/280}$ 比は、核酸サンプルの純度を評価するために使用します。260 nm の吸光度は主に核酸の存在を、280 nm の吸光度は汚染タンパク質の存在を示します。したがって、高純度 RNA サンプルの $A_{260/280}$ 比は 2.00 で、タンパク質サンプルでは 0.57 となります。²

$A_{260/280}$ 比は有用なパラメータである一方、分光光度法による評価で使用される溶液の pH と濃度がその比の評価に大きく影響を及ぼす可能性があることを、Wilfinger らが報告しています。³ 核酸の前処理における定量評価も pH と濃度の影響を受けます。

この研究では、Wilfinger らが報告したものと同様の実験を、Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計を使用して実施しました (図 1)。Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis は 8 つのキュベット位置を備える革新的なシステムで、より効率的に測定できます。Cary 3500 による複数サンプルの UV 吸光度の同時測定では、不要な可変性要素を取り除き、生成される結果の信頼性を高めます。Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアに組み込まれている計算式機能が UV スキャンに基づいて自動で $A_{260/280}$ 比を計算し、分析のスループットを促進します。

RNA サンプル溶液の pH とイオン強度の $A_{260/280}$ 比に対する影響についても Cary 3500 を使用して調査しました。さらに、RNA のタンパク質汚染の判別に対する pH とイオン強度の影響も調べました。また、2 種類の異なるバッファと水に含まれる RNA の UV 吸光度スキャンも比較しました。



図 1. Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計

実験方法

装置構成

この研究では Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計を使用しました。Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェア (バージョン 1.4.256) と Cary 3500 マルチゾーンソフトウェアアドオンを使用し、表 1 に示すパラメータによりデータを取り込みました。ソフトウェアには 50 以上の計算式機能が組み込まれています。UV 光路長 10 mm、充填量 70 μ L の超微量角型セル (部品番号 5062-2496) を使用しました。各セルで 50 μ L のサンプル量を使用しました。Cary 3500 では、幅 1.5 mm 未満の高度に集束された均一なビームと、固定セルホルダの恒久的な光学アライメントにより、これほど少量のサンプルを測定することが可能です。

表 1. Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計のパラメータ

パラメータ	設定値
X モード	nm
Y モード	吸光度
収集モード	スキャン
スキャン範囲開始	400 nm
スキャン範囲停止	220 nm
平均化時間	0.020 秒
データ間隔	1.00 nm
スキャン速度	3,000 nm/min
スペクトルバンド幅	2.00 nm
検出器モジュール	マルチセルペルチェ UV-Vis

試薬と試料

HeLa 細胞株は American Type Culture Collection (ATCC、バージニア州マナサス、米国) から購入しました。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は Thermo Fisher Scientific (マサチューセッツ州ウォルサム、米国) から購入しました。

Agilent Absolutely RNA マイクロプレップキットを使用して、HeLa 細胞から RNA を抽出しました (部品番号 400805)。

ウシ血清アルブミン (BSA)、リン酸二ナトリウム (Na_2HPO_4)、トリス-塩酸塩 (トリス-HCl)、塩化ナトリウム (NaCl) は Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス、米国) から購入しました。EDTA 溶液は Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から入手しました。

超純水は、0.22 μm メンブレンフィルターを装着した Milli-Q Integral システム (Millipak, Merck-Millipore、マサチューセッツ州ビレリカ、米国) で製造しました。

HeLa 培養細胞切片からの RNA の抽出

HeLa 細胞を DMEM 細胞培地で 100,000 個に増殖させました。細胞をプレートからこすり取って培地に移し、15 mL Falcon チューブに入れました。Absolutely RNA マイクロプレップキットプロトコルを使用して RNA 抽出を行う前に、細胞懸濁液を 1,200 rpm で 5 分間遠心分離して細胞を沈殿させました。抽出された RNA の品質チェックは、Agilent 4200 TapeStation システム (部品番号 G2991AA) と RNA

ScreenTape (部品番号 5067-5576)、RNA ScreenTape サンプルバッファ (部品番号 5067-5577)、RNA ScreenTape ラダー (部品番号 5067-5578) を使用して実行しました。

RNA は -80°C で冷凍し、分析の前に解凍しました。

HeLa 細胞からの RNA 抽出と純度評価のワークフロー

図 2A に示すように、HeLa 細胞は社内で増殖させ、全 RNA は Absolutely RNA マイクロプレップキットプロトコルを用いて抽出しました。抽出した RNA は、DNA/RNA サンプルの品質管理のための自動電気泳動ソリューション、4200 TapeStation システムを使用して、RNA 品質チェックを行いました。RNA ScreenTape 機器を用いた全 RNA の分析では、リボソームピークと可能性のある分解生成物を同定することにより、全 RNA 品質を評価することが可能です。RNA Integrity Number equivalent (RIN[®]) として知られる RNA Quality Number はそれぞれ、1 ~ 10 のスケールに基づき各サンプルに割り当てられます (1 は高度に分解された RNA、10 はほとんど分解されていない RNA を表します)。この研究で使用した、抽出された RNA の RIN[®] 値は 10 でした (図 2B)。次に、RNA 純度の評価のために、Cary 3500 UV-Vis で抽出された RNA の吸光度を測定しました。

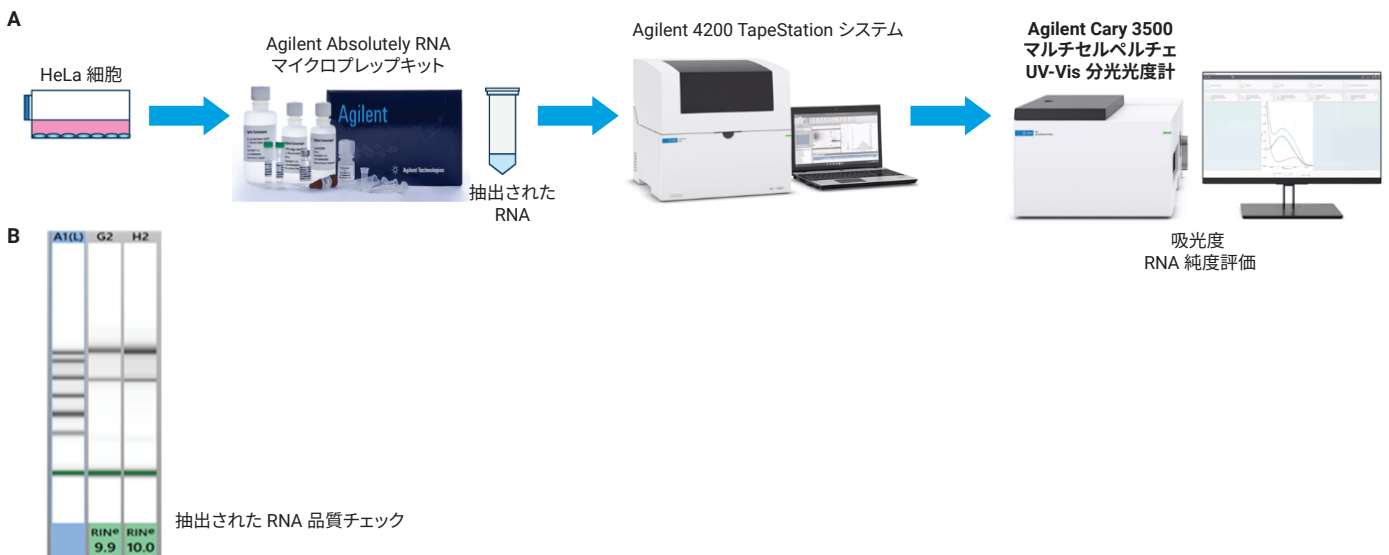


図 2. (A) RNA を抽出するためのアジレントの消耗品、および RNA の品質と純度を評価するための Agilent 4200 TapeStation システムと Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の使用を示したワークフロー図。(B) HeLa 細胞から抽出された RNA は 4200 TapeStation で分析し、10 の RIN[®] 値が得られました。

実験方法

この研究では次の3つの実験を実行しました。

1. RNA の $A_{260/280}$ 比と吸光度に対する pH と Na_2HPO_4 濃度の影響の調査

Na_2HPO_4 は超純水で次の濃度に希釈しました：0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mM。コントロールとして実験に超純水を含めました。pH の測定はすべて、Mettler Toledo (グライフェンゼー、スイス) の SevenCompact pH メーター S220 を使用して実施しました。RNA は各濃度の Na_2HPO_4 溶液で 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈しました。

2. 溶解性の高い BSA タンパク質の存在下における、RNA の $A_{260/280}$ 比に対する pH とイオン強度の影響の調査

Na_2HPO_4 は 0.01、0.1、1、10 mM の濃度に希釈しました。コントロールとして実験に水を含めました。RNA はそれぞれのバッファ溶液中に溶解し、0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の最終濃度にしました。タンパク質 (最終濃度 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の RNA および最終濃度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の BSA の両方を含む) を添加した RNA をそれぞれのバッファ中に溶解しました。BSA はまた、それぞれのバッファで濃度 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製しました。

3. 1 mM Na_2HPO_4 、TNE バッファ、水で分析した、HeLa RNA の UV 吸光度スキャン

pH 7.4 で 10 mM トリス、1 mM EDTA、0.2 mM NaCl を含む TNE バッファを調製しました。TNE バッファ、1 mM Na_2HPO_4 、水で、RNA を 0.0062 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の最終濃度に希釈しました。

吸光度測定

すべての実験サンプルの吸光度の値を、Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計を使用して測定しました。適切なブランク溶液を使用して各実験に対し分光光度計をゼロに設定し、分析中はベースライン補正を使用しました。

複数のサンプルを同時に測定する Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis の性能により、一定の測定条件を維持しつつ、分光光度測定の実効性が向上します。この機器には 4 ゾーン内に 8 つのセルポジションがあり、1 ゾーン (8 つのキュベット)、2 ゾーン (各ゾーンに 4 つのキュベット)、または 4 ゾーン (各ゾーンに 2 つのキュベット) でサンプルを分析できます。各ゾーンにはそれぞれのリファレンスチャネルがあります。

タンパク質汚染を調査するために、Cary 3500 UV-Vis の 2 ゾーン機能を使用しました。この構成により、1 回の測定で 2 つのバッファを分析できます (図 3)。図 4 に示されているように、3 つの異なる溶液 (TNE バッファ、1 mM Na_2HPO_4 、水) 中の RNA の同時測定のために、機器の 4 ゾーン機能を使用しました。各測定の後には、Cary UV ワークステーションソフトウェアに搭載された計算式機能により、 $A_{260/280}$ 比が自動で計算され、レポートが作成されます (図 5)。単一キュベットシステムを使用した場合と比較して、Cary 3500 のこれらの機能により、UV 吸光度スキャンのスループットが向上します。

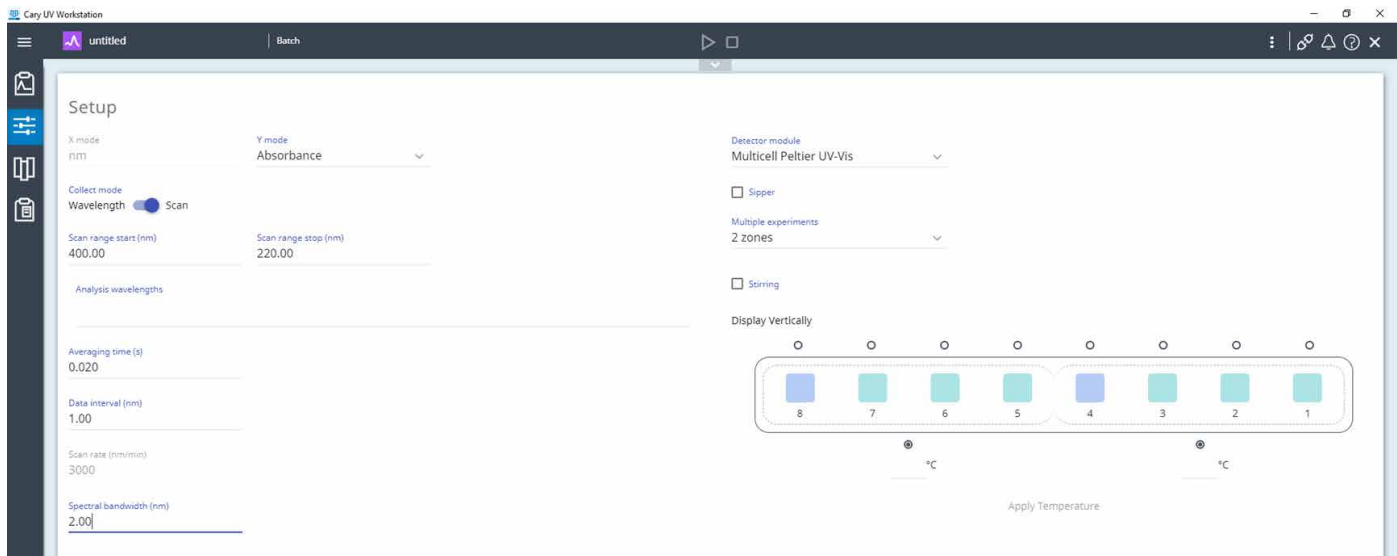


図 3. Agilent Cary 3500 マルチセルペルチエ UV-Vis の「2 ゾーン」複数実験機能。緑色と紫色は、それぞれサンプルとリファレンス溶液の位置を表しています。

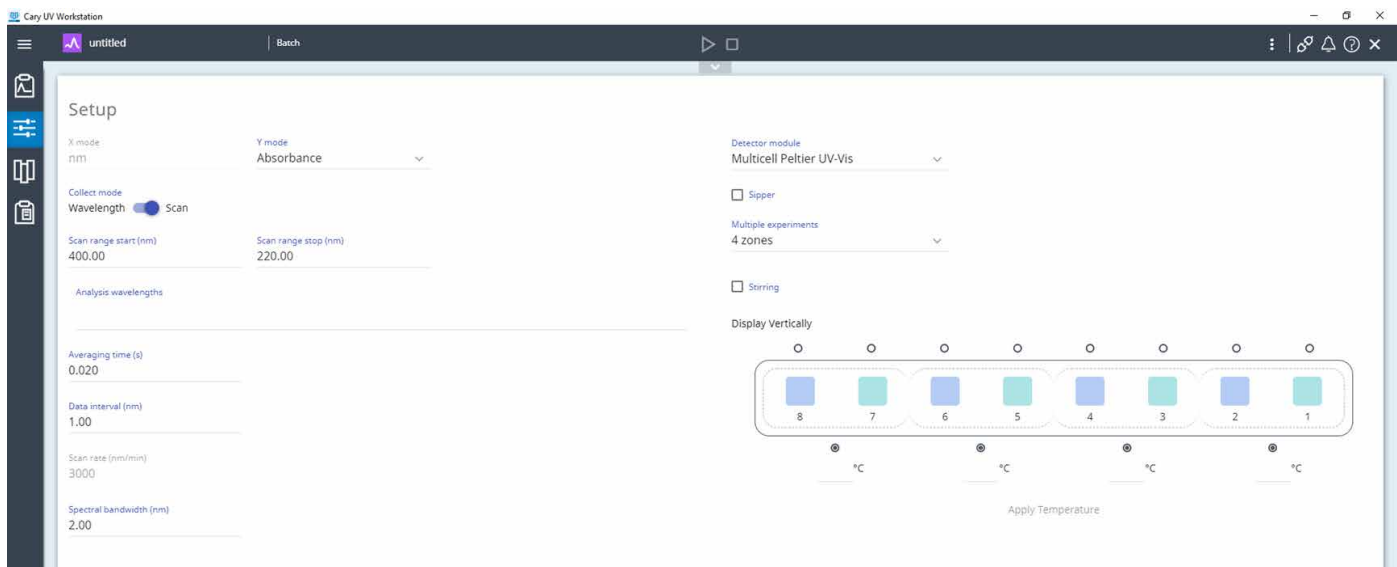


図 4. Agilent Cary 3500 マルチセルペルチエ UV-Vis の「4 ゾーン」複数実験機能。緑色と紫色は、それぞれサンプルとリファレンス溶液の位置を表しています。

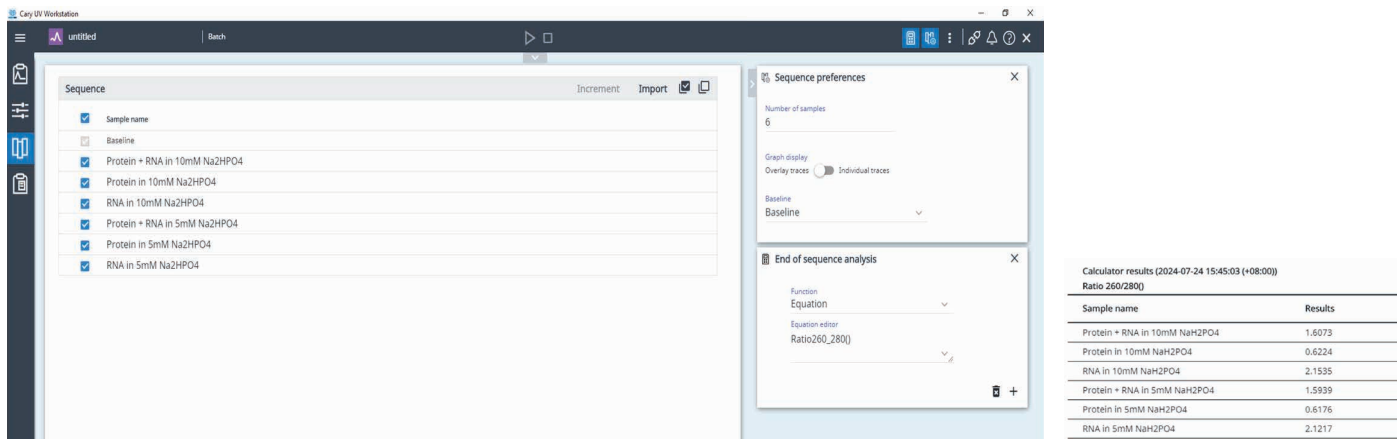


図 5. Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアに搭載された計算式機能による、 $A_{260/280}$ 比の自動計算およびレポート作成

結果と考察

RNA の $A_{260/280}$ 比と吸光度に対する pH と Na_2HPO_4 濃度の影響

RNA の $A_{260/280}$ 比と吸光度に対する pH と Na_2HPO_4 濃度の影響を評価するために、緩衝剤として濃度 0.1 ~ 10 mM の 11 種類の Na_2HPO_4 溶液を使用しました。³ $A_{260/280}$ 比の増加は、pH と Na_2HPO_4 濃度の上昇と直接比例していました。7.2 ~ 8.6 の pH 値、および 0.02 ~ 1 mM の Na_2HPO_4 濃度で急な上昇が生じています (図 6A)。

図 6B に、 A_{260} と A_{280} 値の減少と、 Na_2HPO_4 濃度や pH の上昇を示します。それぞれの Na_2HPO_4 濃度の吸光度の低下率は、水を基準としました。図 6C に各点線で示されているように、 A_{280} の下降率曲線は、 A_{260} 曲線よりも急な傾きとなっています。これらの結果は、 $A_{260/280}$ 比の増加が、280 nm における pH またはイオン強度に依存した吸光度の低下によるものであることを示しています。

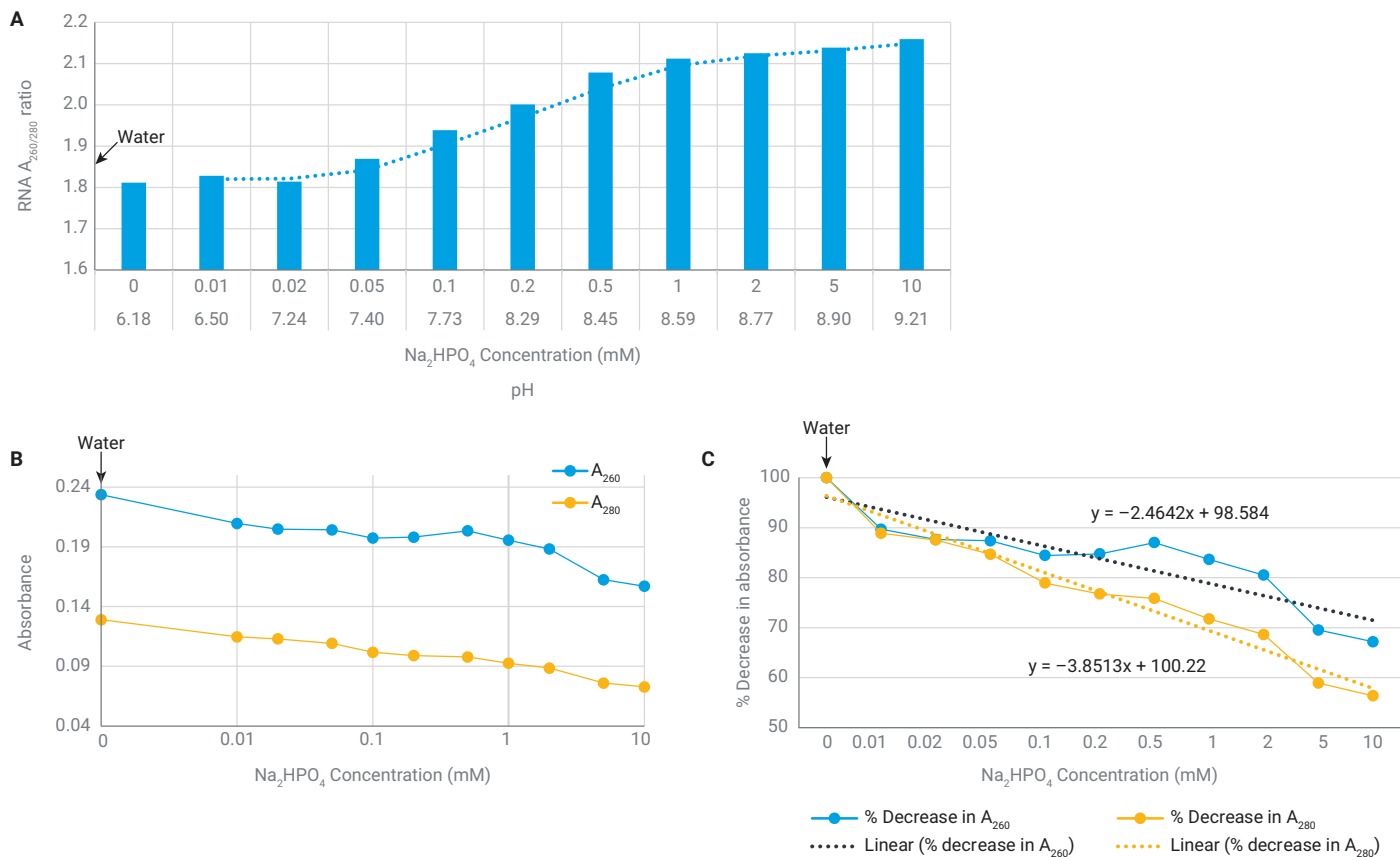


図 6. pH と Na_2HPO_4 濃度の影響による (A) $A_{260/280}$ 比、および (B) 吸光度、(C) 260 nm と 280 nm での吸光度の変化率

11 種類それぞれの Na_2HPO_4 溶液に対して 3 回測定を実行しました。Cary 3500 の 2 ゾーン複数実験機能を使用して、2 つの濃度で Na_2HPO_4 サンプルを 3 回測定しました。この手法を使用して、60 分の間に 11 種類すべての濃度で Na_2HPO_4 を分析することができました (33 のサンプルと 11 のリファレンス溶液を 6 回測定)。このマルチセル手法により、単一キュベットシステムと比較し、分析のスループットが 6 倍向上しました。

RNA 中のタンパク質の検出に対する pH とイオン強度の影響

タンパク質汚染の検出に対するバッファの pH とイオン強度の影響を調べるために³、BSA タンパク質の存在下で 11 種類の Na_2HPO_4 溶液で RNA の吸光度を評価しました。

図 7A に、タンパク質添加あり/なしの Na_2HPO_4 の吸光度プロファイルを示します。10 mM Na_2HPO_4 の RNA の $A_{260/280}$ 比は 2.15 となりましたが、タンパク質の存在下では、 $A_{260/280}$ 比は 1.61 に低下しました。図に、どのようにタンパク質によって RNA の吸光度プロファイルが変化するかが明確に示されています。

RNA と RNA を含むタンパク質との間の $A_{260/280}$ 比の低下は、水では 19.1% であるのに対し、1.0 mM Na_2HPO_4 では 26.6% の低下が観察されました (図 7B)。このような所見は、タンパク質汚染がアルカリ性条件の下でより容易に検出されることを示唆しています。

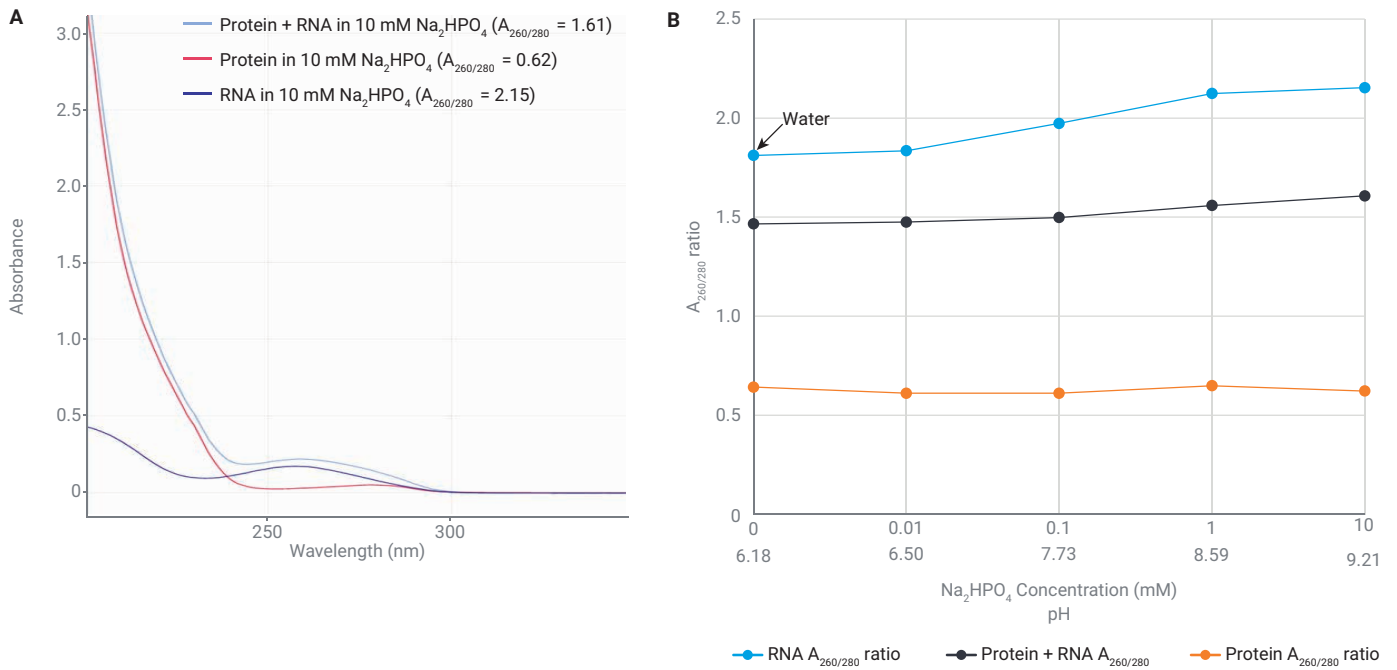


図 7. タンパク質が存在する/存在しない場合の、RNA $A_{260/280}$ 比に対する pH とイオン強度の影響。(A) 10 mM Na_2HPO_4 中の RNA/タンパク質/タンパク質を添加した RNA サンプルの吸光度プロファイル。(B) 0.01 ~ 10 mM Na_2HPO_4 中の、RNA/タンパク質/タンパク質を添加した RNA の $A_{260/280}$ 比プロット

異なるバッファ溶液での HeLa 細胞の全 RNA 測定

RNA の UV 吸収スペクトルに対する異なるバッファの影響を調べるために、水 (pH 6.18)、1 mM Na_2HPO_4 (pH 8.59)、バッファ溶液 (TNE) で分析を実行しました。この実験に TNE バッファを含めたのは、核酸の分光分析に推奨されることが多いからです。³

図 8 に示されているように、2 つのバッファ溶液 (1 mM Na_2HPO_4 および TNE) 中の RNA の UV 吸収スペクトルは類似していますが、水中の RNA の UV プロファイルより高い波長へシフトしています。この結果は、バッファ溶液中に溶解された RNA サンプルでは、水中に溶解された RNA と異なる UV 吸光度トレースとなることを示しています。アルカリバッファ溶液は、純水中に溶解された RNA サンプルよりも、RNA 純度をより良好に評価できます。したがって、抽出された RNA を溶解するためには、アルカリ性バッファ溶液を使用することが推奨されます。

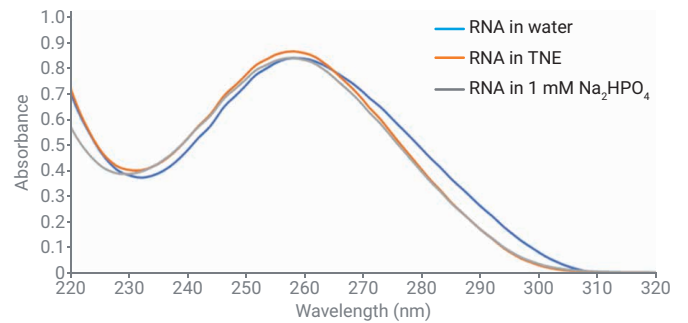


図 8. 水、TNE バッファ、1 mM Na_2HPO_4 で分析した HeLa RNA の UV 吸光度プロファイル。結果は、Wilfinger ら³ が報告している所見と一致しており、研究全体の成果との一貫性が実証されています。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 3500 マルチセルペルチェ UV-Vis 分光光度計を使用した、 $A_{260/280}$ 比に基づく RNA 純度の評価のための効率的なメソッドを実証しています。Cary 3500 で、好ましくない実験変数を回避しつつ、複数の実験条件の検査を同時に実行できました。

データにより、RNA 溶液の pH とイオン強度が $A_{260/280}$ 比に大きな影響を及ぼし、アルカリ性条件の下で RNA サンプルのタンパク質汚染をより良好に評価できることが明らかとなりました。Cary 3500 ソフトウェアに搭載された計算機能で、 $A_{260/280}$ を自動で計算し、レポートを作成することができました。これらの機能により、異なるバッファ条件の下で、正確かつ効率的に RNA サンプルを評価できました。Cary 3500 ソフトウェアは、Agilent OpenLab ソフトウェアスイートと互換性があり、規制対象環境で使用できます。OpenLab は、FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11、および他国の同様の規制に準拠することが求められるラボにおいて、データを安全に取得して保存するための技術的管理を実現します。

アジレントは、必要な消耗品（Absolutely RNA マイクロプレップキットなど）、機器（4200 TapeStation システムや Cary 3500 UV-Vis 分光光度計など）、RNA 品質判断を行うためのワークフローソリューションを提供しています。

参考文献

1. Vermeulen, J.; De Preter, K.; Lefever, S.; Nuytens, J.; De Vloed, F.; Derveaux, S.; Hellemans, J.; Speleman, F.; Vandesomepele, 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, publication number 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.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45590.3881944444

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, November 14, 2024

5994-7892JAJP