

Evaluierung von RNA Bestimmungs-Kits mit dem Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence

Martin Armbrecht¹, Sandrine Hamels²,

¹Eppendorf AG, Hamburg, Germany, ²Eppendorf Application Technologies, Namur, Belgium

Zusammenfassung

Es werden Kits der Firma Promega® (QuantiFluor®) und Life Technologies® (Quant-iT™) zur Quantifizierung von RNA untersucht. Zur Optimierung des Messverfahrens werden verschiedene Regressionsverfahren, welche im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence vorprogrammiert sind, angewendet. In dem Zusammenhang soll auch gezeigt werden, dass die

Probenbestimmung durch eine einfache Veränderung der Regressionsanalyse optimiert werden kann. Durch die Verwendung der UVette® besteht die Möglichkeit, das finale Messvolumen von 2000 µL (Quant-iT™) bzw. 1000 µL (QuantiFluor®) auf 100 µL zu reduzieren. Dadurch können bei beiden Kits erhebliche Mengen an Reagenzien eingespart werden.

Einleitung

Nukleinsäure-Konzentrationen werden in der Regel über Messungen der Lichtabsorption in UV-VIS Spektrometern bestimmt. Dabei wird die Absorption bei 260 nm gemessen und mit einem probenspezifischen Faktor die Konzentration errechnet. Eine qualitative Analyse der Probe erfolgt durch zusätzliche Messungen bei 230, 280, 320 nm, wobei Verunreinigungen durch Proteine oder anderes organisches Material sowie störende Partikel festgestellt werden können [1]. Ein großer Nachteil der photometrischen Bestimmung ist aber, dass diese nicht sehr empfindlich ist und man für diese Nachweismethode relativ große Probenmengen benötigt. Deutlich geringere Nukleinsäure-Konzentrationen können mittels Fluoreszenz-Bestimmung gemessen werden [2]. Dabei wird das Zielmolekül nicht direkt detektiert, sondern indirekt über einen Fluoreszenz-Farbstoff. Die Bestimmung der Probenkonzentration erfolgt dabei über eine vorher erstellte Standardkurve. Neben der größeren Sensitivität der Messung ist diese meist auch spezifischer. Das liegt daran, dass die Fluorophore erst in der Lage sind Fluoreszenz-Licht zu emittieren, sofern diese in Kontakt mit Ihrem Zielmolekül kommen (Abbildung 1).

Die Fluorophore binden hochspezifisch an bestimmte Biomoleküle. So bindet z. B. das Fluorophor nur an dsDNA und ein anderes nur an RNA.

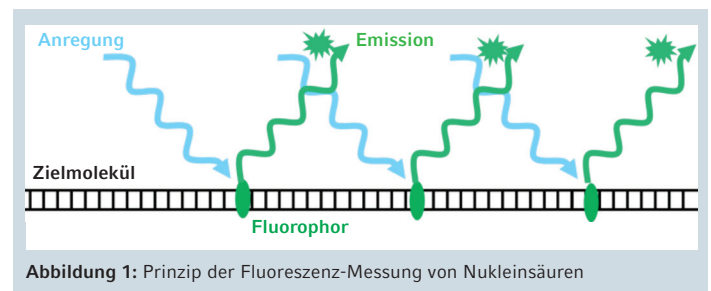


Abbildung 1: Prinzip der Fluoreszenz-Messung von Nukleinsäuren

Im vorliegenden Artikel soll die Anwendbarkeit von Nachweis-Kits der Firma Promega und Life Technologies am Eppendorf BioSpectrometer fluorescence untersucht werden. Verwendet werden dabei die Nachweismethoden zur Quantifizierung von RNA. Beide Kits werden hinsichtlich Genauigkeit und Nachweisgrenze untersucht. Dabei wird detailliert erklärt wie die jeweiligen Methoden-Parameter im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence programmiert werden und wie der Messablauf funktioniert.

Material und Methoden

Material

Kits: QuantiFluor® RNA System (Promega), Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit (Life Technologies); 1 x TE Puffer, Gesamt-RNA aus menschlicher Leber (Ambion®, # 7960), Molekularbiologisch reines Wasser

Geräte: Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence, Eppendorf Research® Pipetten

Küvetten, Gefäße: UVette®, Eppendorf Safe-Lock Tubes.

Durchführung:

Alle Standardkonzentrationen werden anhand der den Kits beiliegenden Protokolle im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence programmiert. Dabei wird nach den Empfehlungen der Hersteller vorgegangen. Die verwendeten Nukleinsäurestandards liegen den Kits ebenfalls bei. Für jede Standardkonzentration werden jeweils 3 Replikate angefertigt und gemessen. Alle Messungen werden in der UVette durchgeführt mit einem finalen Volumen von 100 µL. Insgesamt werden die Standards immer von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration gemessen. Eine Messreihe wird dabei immer in ein und derselben Küvette durchgeführt und in gleicher Richtung in den Küvettenstapel eingeführt. Zwischen den Messungen werden die Küvetten mit 200 µL 1 x TE-Puffer gespült.

Detailliertes Messprotokoll:

Alle Komponenten müssen vor der Messung bis auf Raumtemperatur aufgewärmt werden. Für beide Kits wird jeweils im „high concentration“ Bereich gearbeitet.

Herstellung des 1 x TE-Arbeitspuffer: Es liegt dem Kit ein 20 x TE-Puffer bei, der entsprechend mit Wasser verdünnt wird.

Zur Herstellung der Reagenz-Lösung muss der beigegefügte Fluoreszenz-Farbstoff 1 : 200 mit 1 x TE-Arbeitspuffer verdünnt werden.

Vorbereitung der RNA-Stammlösung: Es wird Schritt für Schritt wie in der Bedienungsanleitung des jeweiligen Kits beschrieben vorgegangen.

Dabei wird auch empfohlen, die Konzentration der hergestellten RNA-Stammlösung für die Standardkurve photometrisch zu überprüfen bevor daraus die einzelnen Standards hergestellt werden.

In Tabelle 1 sind hierzu die jeweiligen Konzentrationen für die Kits beider Hersteller aufgezeigt. Die Messungen werden in einer UVette mit 10 mm Lichtweg und einem Messvolumen von 100 µL durchgeführt.

Tabelle 1: Konzentrationen der Stammlösung

Kit	Absorption der Stammlösung bei 260 nm	Konzentration der Stammlösung [µg/mL]
Life Technologies: Quant-iT	0,05	2
Promega: Quantifluor	0,125	5

Neben den fluorimetrischen Messmethoden verfügt das Eppendorf BioSpectrometer fluorescence auch über ein vollständiges Spektrometermodul, mit dem die Kontrollmessungen durchgeführt werden können (Abbildung 2).

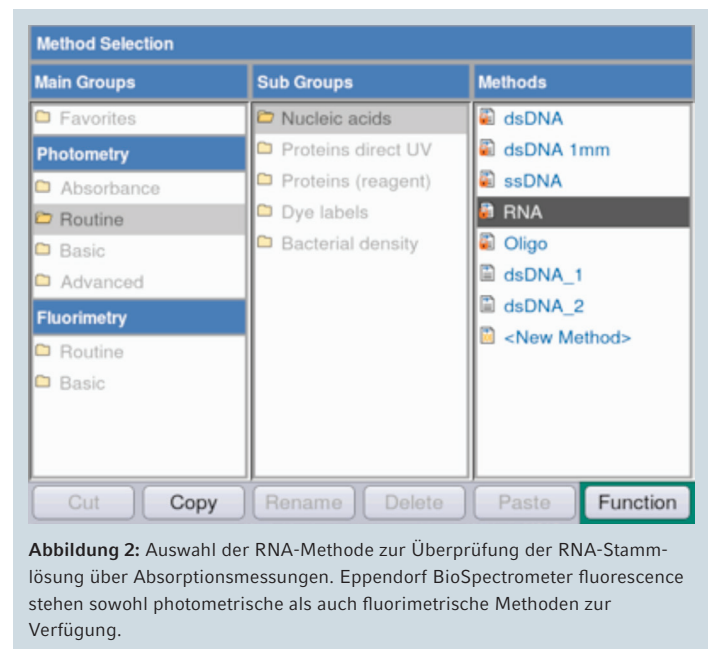
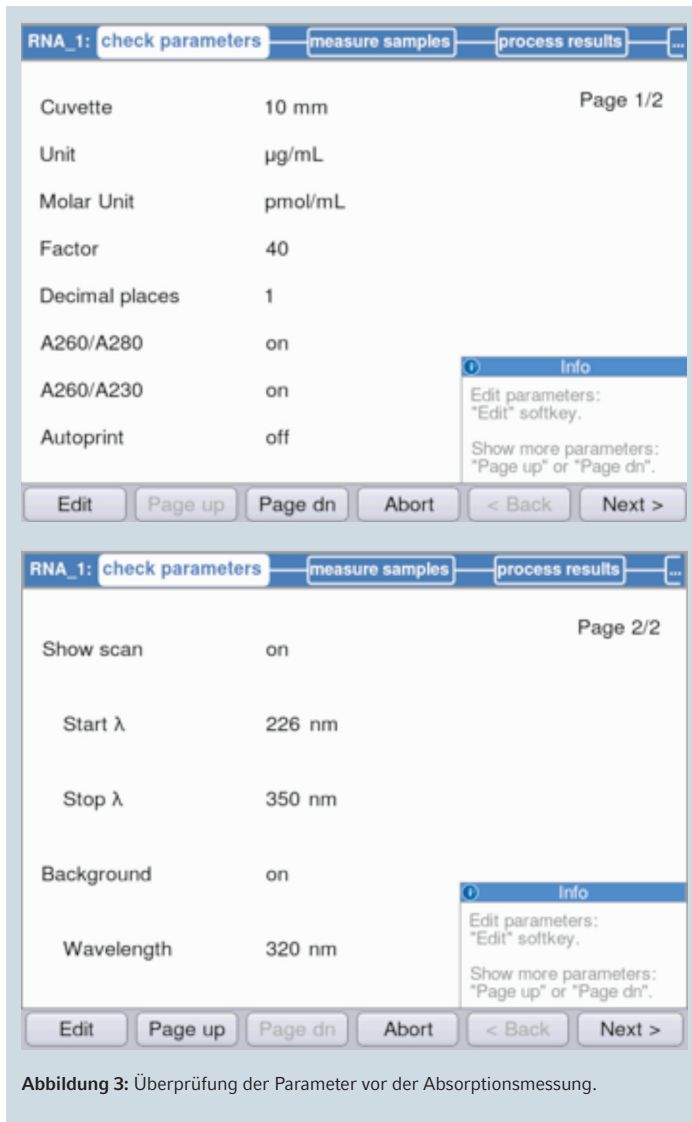


Abbildung 2: Auswahl der RNA-Methode zur Überprüfung der RNA-Stammlösung über Absorptionsmessungen. Eppendorf BioSpectrometer fluorescence stehen sowohl photometrische als auch fluorimetrische Methoden zur Verfügung.

Nach Aufruf der Methode können die Parameter überprüft und ggf. verändert werden (Abbildung 3).



Die gemessene RNA-Kurve sollte ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweisen. Ein Beispiel des Ergebnisses ist in Abbildung 4 gezeigt.

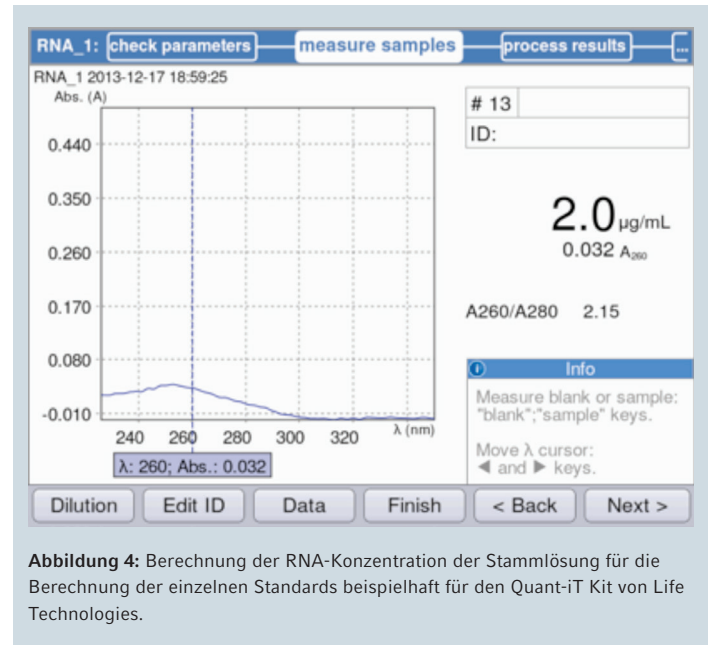


Abbildung 4: Berechnung der RNA-Konzentration der Stammlösung für die Berechnung der einzelnen Standards beispielhaft für den Quant-iT Kit von Life Technologies.

Standards und Proben werden parallel vorbereitet. Dabei werden von jeder Standard- und Proben-Lösung je 50 µL in 3 Eppendorf Safe-Lock Gefäße pipettiert. Zu jedem Gefäß werden 50 µL Reagenz-Lösung hinzugeben, gut durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung der Ansätze in eine UVette wird die Fluoreszenz der einzelnen Standards und anschließend der Proben im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence gemessen (Anregung: 470 nm/Emission: 520 nm). In Tabelle 2 sind alle zu messenden Standard- und Probenkonzentrationen für die Kits von Life Technologies bzw. Promega aufgeführt.

Tabelle 2: Zu messende Standards und Proben mit den jeweiligen RNA-Detection Kits

RNA-Standards Quant-iT/Life Technologies RNA detection kit [ng/mL]	Probenkonzentration (Leber-RNA) [ng/mL]	RNA-Standards Quantifluor/ Promega RNA detection kit [ng/mL]	Probenkonzentration (Leber-RNA) [ng/mL]
0	20	0	20
20	40	39	40
100	60	78	60
500	200	156	200
1000	400	313	400
	800	625	800
	1000	1250	1000
		2500	

Die Standardkonzentrationen werden entsprechend den Vorgaben der jeweiligen Bedienungsanleitung gewählt. Es werden für beide Kits dieselben Probenkonzentrationen gewählt, um bezüglich Genauigkeit, Wiederfindungsrate und Detektionsuntergrenze vergleichbare Rahmenbedingungen vorliegen zu haben.

Programmierung der Standards am Gerät:

Für die Messungen wird die Methode RiboGreen im Fluorimetry/Routine/Nucleic acids/RiboGreen ausgewählt (Abbildung 5).

Die RNA-Proben (s. Tabelle 2) sollen sowohl über lineare Regression als auch quadratische Regression ausgewertet werden.

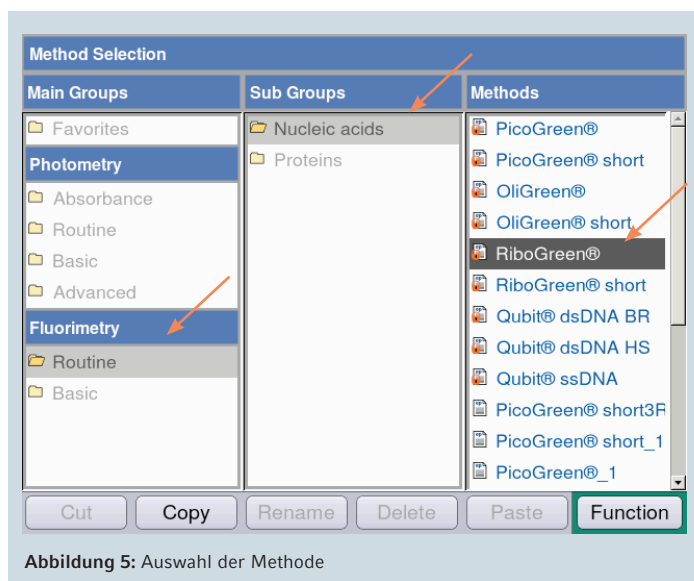


Abbildung 5: Auswahl der Methode

Nach dem Start der Methode müssen zunächst die Parameter für die Messung der Standards festgelegt werden. Je nach Kit werden jeweils 5 bzw. 8 Standards mit je 3 Replikaten programmiert.

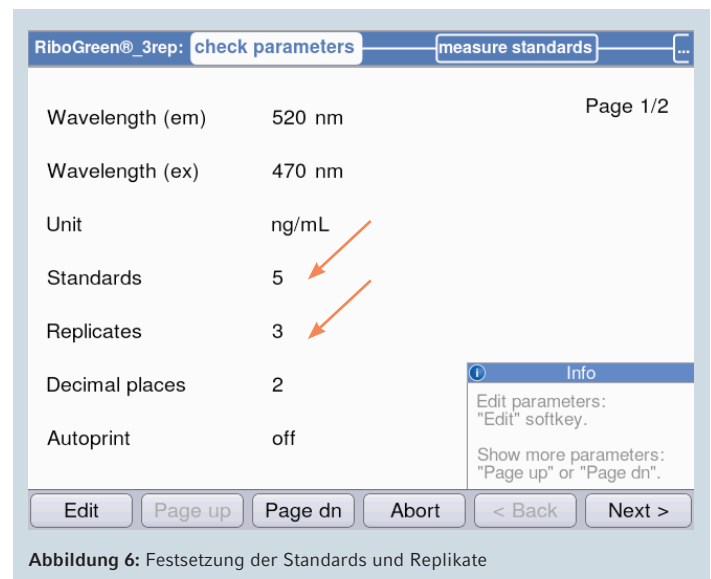
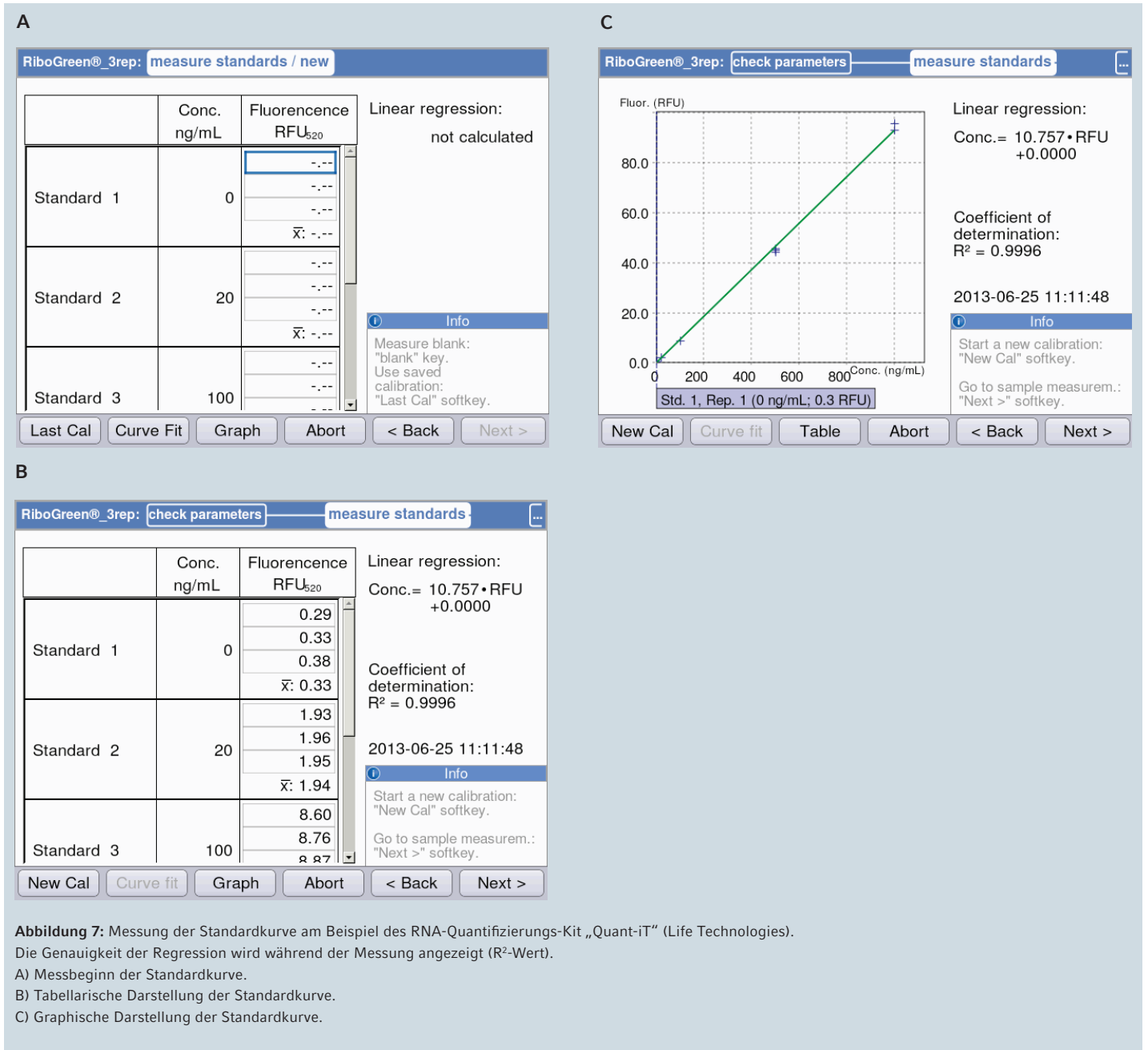


Abbildung 6: Festsetzung der Standards und Replikate

Über „Next >“ gelangt man in den Bereich „Measure standards“ (Abbildung 6). Hier werden die Standards sukzessive von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration durchgemessen (Abbildung 7). Die Standardkurve wird zunächst über lineare und anschließend über quadratische Regression ausgewertet.

Generell besteht beim Eppendorf BioSpectrometer fluorescence bei jeder Methode die Möglichkeit die Regressionsanalyse ggf. während der Erstellung der Standardkurve über „Curve fit“ anzupassen. Hier stehen insgesamt 5 mögliche Regressionsanalysen zur Verfügung: „linear interpolation“, „linear regression“, „quadratic regression“, „cubic regression“ und „spline interpolation“.



Ergebnisse und Diskussion

Es wurde zunächst die Genauigkeit der Standardkurven für beide Kits untersucht. Die Auswertung der Kurven erfolgt sowohl über lineare als auch quadratische Regression. In Tabelle 3 sind zunächst die gemessenen relativen Fluoreszenz-Werte (RFU) der DNA-Standards für den Kit von Life Technologies gezeigt. In Abbildung 8 sind die dazugehörigen Kurven abgebildet.

Tabelle 3: RNA-Standardkurve Life Technologies

Konzentration (ng/mL)	0	20	100	500	1000
	0,29	1,93	8,60	44,85	92,88
	0,33	1,96	8,76	44,07	93,05
RFU	0,38	1,95	8,87	45,48	95,52
Mittelwert (RFU)	0,33	1,94	8,74	44,80	93,82
SD (RFU)	0,05	0,01	0,14	0,71	1,48
CV (%)	/	0,75	1,60	1,58	1,58

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen, zeigen die jeweilig gemessenen Replikate gute Übereinstimmung.

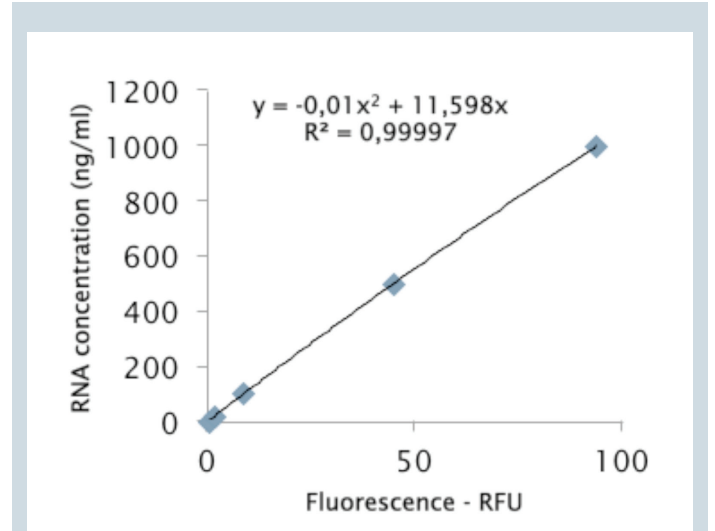


Abbildung 8b: Auswertung über quadratische Regression.

Anhand des R^2 -Wertes in Abbildung 8a zeigt sich, dass die Standardkurve sehr deutlich einem linearen Verlauf folgt. Eine leicht bessere Übereinstimmung kann, wie aus Abbildung 8b ersichtlich, über quadratische Regression erzielt werden. Im Anschluss wurde überprüft, ob durch quadratische Regression auch eine präzisere Probenbestimmung möglich ist.

Die RNA-Proben (s. Tabelle 2) wurden sowohl über lineare Regression als auch quadratische Regression ausgewertet und die jeweiligen Abweichungen vom Zielwert miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4a bzw. 4b gezeigt.

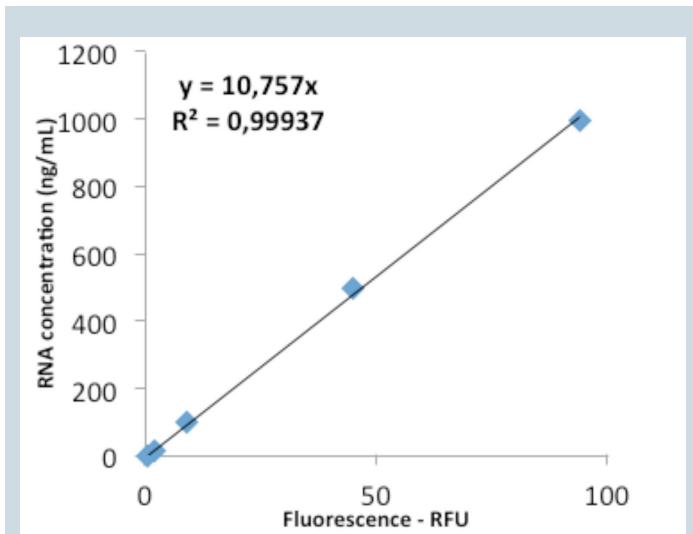


Abbildung 8a: Standardkurve „Life Technologies“ – Evaluierung mittels linearer Regression.

Tabelle 4a: Auswertung der RNA-Proben über lineare Regression – Life Technologies

Soll-Konzentration (ng/mL)	20	40	200	400	800	1000
Berechnete Konzentration (ng/mL)	21	41	194	395	806	1011
	22	43	193	397	800	992
	22	40	192	390	803	982
Mittelwert	22	41	193	394	803	995
STDV	0	1	1	3	3	15
CV (%)	1,89	3,01	0,68	0,87	0,35	1,49

Tabelle 4b: Auswertung der RNA-Proben über quadratische Regression – Life Technologies

Soll-Konzentration (ng/mL)	20	40	200	400	800	1000
Berechnete Konzentration (ng/mL)	23	44	206	413	813	1002
	24	46	205	414	808	984
	24	43	203	408	810	975
Mittelwert	24	45	205	412	810	987
STDV	0	1	1	3	3	13
CV (%)	1,88	3,00	0,67	0,84	0,32	1,36

Laut Tabelle 4a und 4b, sind die erzielten Ergebnisse unter Verwendung quadratischer bzw. linearer Regression ähnlich. Für den unteren Konzentrationsbereich (20–40 ng/mL) ist die Bestimmung über lineare Regression sogar näher am Sollwert. In Tabelle 5 sind diesbezüglich die errechneten Konzentrationen unter Verwendung beider Evaluierungsmethoden gezeigt. Es werden jeweils die prozentualen Abweichungen der gemessenen Konzentrationen in Relation zum Sollwert dargestellt.

Tabelle 5: Abweichung der Zielkonzentration von der Sollkonzentration – Life Technologies

Sollkonzentration [ng/mL]	Gemessene Konzentration – lineare Regression [ng/mL]	Abweichung [%]	Gemessene Konzentration – quadratische Regression [ng/mL]	Abweichung [%]
20	22	10	24	20
40	41	2,5	45	12,5
200	193	3,5	205	2,5
400	394	1,5	412	3
800	803	0,4	810	1,3
1000	995	0,5	987	1,3

Die in Tabelle 2 dargestellten RNA-Konzentrationen wurden auch über den Promega RNA-Kit (QuantiFluor™) bestimmt.

In Tabelle 6 sind die Messergebnisse der RNA-Standards aus dem Promega-Kit dargestellt.

Tabelle 6: RNA-Standardkurve Promega

Soll-Konzentration (ng/mL)	0	39	78	156	313	625	1250	2500
	0,83	1,54	2,48	4,59	10,08	21,97	47,21	107,47
	0,85	1,55	2,62	4,66	9,99	20,64	48,24	104,32
RFU	0,78	1,55	2,52	4,77	10,13	22,35	47,83	101,13
Mittelwert	0,82	1,55	2,54	4,67	10,07	21,65	47,76	104,31
STDV	0,04	0,01	0,07	0,09	0,07	0,90	0,52	3,17
CV (%)	/	0,36	2,89	1,96	0,73	4,16	1,09	3,04

Wie auch beim Life Technologies-Kit zeigen die einzelnen gemessenen Replikate relativ gute Übereinstimmung. Die zugehörigen Standardkurven mit linearer bzw. quadratischer Regression sind in Abbildung 9a bzw. 9b zu sehen.

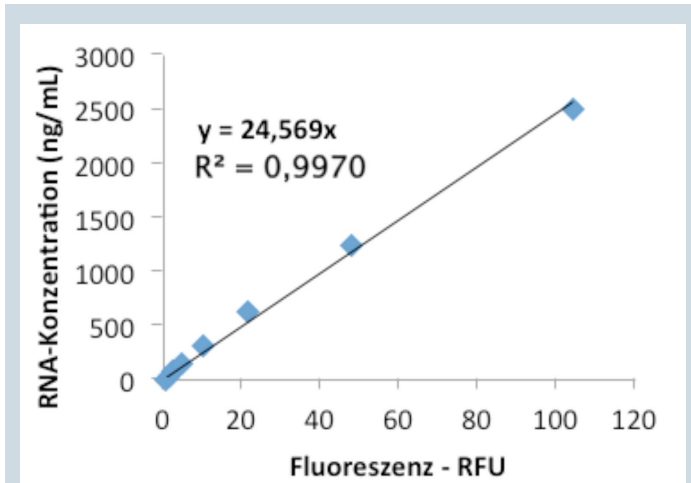


Abbildung 9a: Standardkurve „Promega“ – Evaluierung mittels linearer Regression.

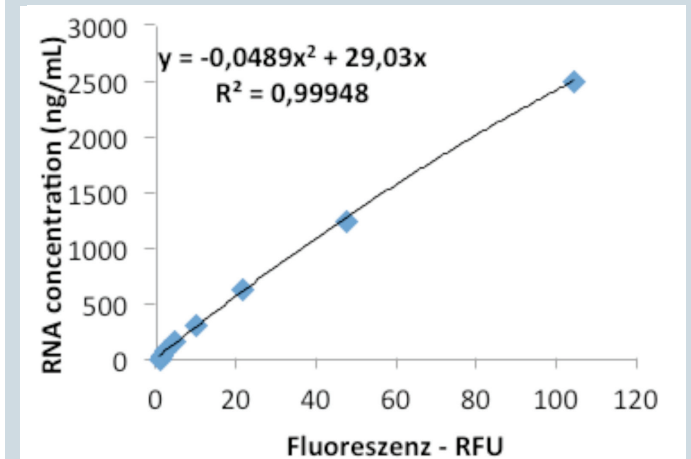


Abbildung 9b: Auswertung über quadratische Regression.

Beim Promega-Kit zeigte sich eine deutlich erhöhte Präzision (R^2) der Standardkurve bei Anwendung von quadratischer gegenüber linearer Regression. Daraufhin wurde untersucht, ob durch Änderung der Regression der Standardkurve eine Erhöhung der Präzision bei der Probenbestimmung möglich ist. In Tabelle 7a und 7b sind die Auswertungen jeweils über lineare bzw. quadratische Regression gezeigt.

Tabelle 7a: Auswertung der RNA-Proben über lineare Regression – Promega

Soll-Konzentration (ng/mL)	20	40	200	400	800	1000
Berechnete Konzentration (ng/mL)	28	41	153	328	723	914
	29	41	157	324	703	933
	29	39	158	337	720	925
Mittelwert	29	40	156	330	715	924
STDV	1	1	3	6	11	10
CV (%)	3,42	3,04	1,80	1,94	1,51	1,06

Tabelle 7b: Auswertung der RNA-Proben über quadratische Regression – Promega

Soll-Konzentration (ng/mL)	20	40	200	400	800	1000
Berechnete Konzentration (ng/mL)	33	49	181	383	820	1022
	35	49	186	378	798	1043
	35	46	187	392	816	1034
Mittelwert	34	48	184	384	812	1033
STDV	1	1	3	7	12	10
CV (%)	3,42	3,03	1,78	1,90	1,43	0,99

Wie aus Tabelle 7a bzw. 7b zu entnehmen, ist für den Kit von Promega eine genauere Probenbestimmung möglich, sofern die Standardkurve im Eppendorf BioSpectrometer fluorescence mittels quadratischer Regression ausgewertet wird. Im unteren Konzentrationsbereich liegt die gemessene Konzentration bei linearer Regression zwar näher am Sollwert (20–40 ng/mL) aber über den gesamten Messbereich (>1000 ng/mL) sind die gemessenen Werte bei quadratischer Regression präziser. In Tabelle 8 befindet sich eine Übersicht über die gemessenen RNA-Konzentrationen, welche über beide Evaluierungsmethoden festgestellt wurden und die jeweilige prozentuale Abweichung vom Sollwert.

Tabelle 8: Abweichung der Zielkonzentration von der Sollkonzentration – Promega Kit

Sollkonzentration [ng/mL]	Gemessene Konzentration – lineare Regression [ng/mL]	Abweichung [%]	Gemessene Konzentration – quadratische Regression [ng/mL]	Abweichung [%]
20	29	45	33	65
40	40	0	49	22,5
200	156	22	184	8
400	330	17,5	384	4
800	715	10,6	812	1,5
1000	924	7,6	1033	3,3

Innerhalb der gemessenen Replikate liegen auch beim Promega-Kit bei den Proben die Werte sehr dicht beieinander. Eine

Optimierung bei der Probenbestimmung müsste daher nicht über die Proben, sondern über in der Auswertung erfolgen.

Fazit

Beurteilung der Messergebnisse

Sowohl der RNA-Nachweis-Kit von Promega als auch von Life Technologies sind geeignet für eine Anwendung im Eppendorf BioSpectrometers fluorescence. Dabei bleibt festzustellen, dass die Standardkurven beim Kit von Life Technologies sowohl über lineare als auch über quadratische Regression ausgewertet werden können, wie sich bei der anschließende Probenbestimmung herausstellte. Beim RNA-Kit von Promega lagen die gemessenen Werte der Proben relativ weit entfernt vom Sollwert, sofern eine lineare statt quadratische Regressionsanalyse der Standardkurve durch-

geführt wurde. Hier zeigt sich der Vorteil des Eppendorf BioSpectrometers, Regressionsanalysen der Standardkurve ggf. anzupassen, falls hierdurch der tatsächliche Kurvenverlauf besser abgedeckt werden kann.

Für den Kit von Life Technologies ist darüber hinaus eine höhere Genauigkeit im Konzentrationsbereich von 20–40 ng/mL festzustellen als beim Kit von Promega. In Tabelle 9 ist eine Übersicht der RNA-Probenbestimmung gezeigt, welche mit beiden Kits durchgeführt wurden. Stellvertretend sind für beide Kits die Evaluierungen mittels quadratischer Regression gezeigt.

Tabelle 9: Evaluierung von RNA-Proben mittels Quant-iT™ und QuantiFluor RNA-Bestimmungskit (Standardauswertung über quadratische Regression).

Sollkonzentration [ng/mL]	Gemessene Konzentration – Life Technologies [ng/mL]	Abweichung [%]	Gemessene Konzentration – Promega [ng/mL]	Abweichung [%]
20	24	20	33	65
40	45	12,5	49	22,5
200	205	2,5	184	8
400	412	3	384	4
800	810	1,3	812	1,5
1000	987	1,3	1033	3,3

Bedienung am Eppendorf BioSpectrometer fluorescence

Der Kit von Life Technologies ist etwas einfacher zu programmieren aufgrund der geringeren Anzahl an Standards. Theoretisch lassen sich wahrscheinlich generell weniger Standards für die Evaluierung verwenden. Es konnte bereits für den Kit zur fluorimetrischen Bestimmung von dsDNA von Life Technologies gezeigt werden, dass eine Reduzierung auf 2 Standardmessungen möglich ist [2]. Generell sollte immer darauf geachtet werden, dass die Proben und Standards möglichst wenig Licht ausgesetzt werden, da dies zu starken Messabweichungen führen kann („Photobleaching“-Effekt). Bei der Standard- und Probenvorbereitung könnte daher die Benutzung von Amber-Tubes hilfreich sein. Neben der Möglichkeit, verschiedene Regressionsanalysen für Standardkurven anzuwenden, bietet das Eppendorf BioSpectrometer fluorescence den zusätzlichen Vorteil, dass alle wesentlich Messparameter in entsprechenden Methoden bereits vorprogrammiert vorliegen. Die Probenkonzentrationen werden anhand der programmierten Standardkurve

direkt umgerechnet und angezeigt. Außerdem handelt es sich beim Eppendorf BioSpectrometer fluorescence gleichzeitig um ein vollwertiges UV-VIS Spektrometer. Da die Ausgangslösung für die Standardkurve photometrisch kontrolliert wird, können somit alle Messungen in einem Gerät durchgeführt werden.

Reduzierung des Messvolumens:

Durch die Verwendung der UVette konnte das Messvolumen für die Proben und Standards auf 100 µL reduziert werden. Dadurch können für beide Kits bis zu 4000 Messungen im Küvettenmaßstab durchgeführt werden. Für den Quant-iT Kit sind hier normalerweise 200 Bestimmungen bzw. 400 für den QuantiFluor Assay vorgesehen. Durch die Kombination mit dem Eppendorf BioSpectrometer und der UVette können für beide Kits erheblich Kosten eingespart werden, da deutlich weniger Reagenz-Lösungen verbraucht werden, als bei der Verwendung von Standardküvetten.

Literatur

- [1] Gallagher, Sean R. (2001), Quantification of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy, Current Protocols in Cell Biology, Appendix 3D
- [2] Armbrrecht M, Gloe J, Goemann W (2013) – Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Farbstoffen im Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence, Eppendorf Application Note 271, Deutsch

Bestellinformationen

Bezeichnung	Bestellnummer international	Bestellnummer Nordamerika
Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence – 230 V/50–60 Hz, Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich – 120 V/50–60 Hz, Netzstecker Nordamerika	6137 000.006 6137 000.014	6137000014
Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence Referenzfiltersatz Filtersatz zur Überprüfung der photometrischen Richtigkeit und Wellenlängenrichtigkeit (gemäß NIST®) sowie zur Überprüfung der fluorimetrischen Präzision (zufällige Messabweichung) und Linearität	6137 928.009	6137928009
UVette® 220 nm–1600 nm Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, zertifiziert RNase-, DNA- und proteinfrei, 80 Stück	0030 106.300	952010051
UVette® routine pack 220 nm–1600 nm Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box, 200 Stück	0030 106.318	952010069
Küvettenständer für 16 Küvetten	4308 078.006	940001102

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Promega® und QuantiFluor® sind eingetragene Marken der Promega Corporation, USA. Life Technologies® ist eine eingetragene Marke der Life Technologies Corporation, USA. NIST® ist eine eingetragene Marke der National Institute of Standards and Technology, USA. Ambion® ist eine eingetragene Marke der Ambion, Inc. Corporation, USA. OliGreen®, RiboGreen®, PicoGreen® und Qubit® sind registrierte Marken der Molecular Probes, Inc. Corporation, USA. Quant-iT™ ist eine Marke der Life Technologies Corporation, USA.
 Eppendorf®, Eppendorf BioSpectrometer®, Eppendorf Research® und UVette® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG, Deutschland.
 Alle Rechte vorbehalten, einschließlich der Graphiken und Abbildungen. Copyright © 2014 by Eppendorf AG.