

Genexpressionsanalyse

Qualitätsmanagement in der RT-qPCR

CATRIN WERNICKE, PHILIPP FRANKE, LARS RADKE, STEPHAN BERGE,
MARCUS FROHME
TECHNISCHE HOCHSCHULE WILDAU

Several aspects in the numerous steps of a reverse transcription (RT) quantitative PCR may interfere with the result's validity. Therefore, before starting the proper investigation, a particular assay establishment is required.

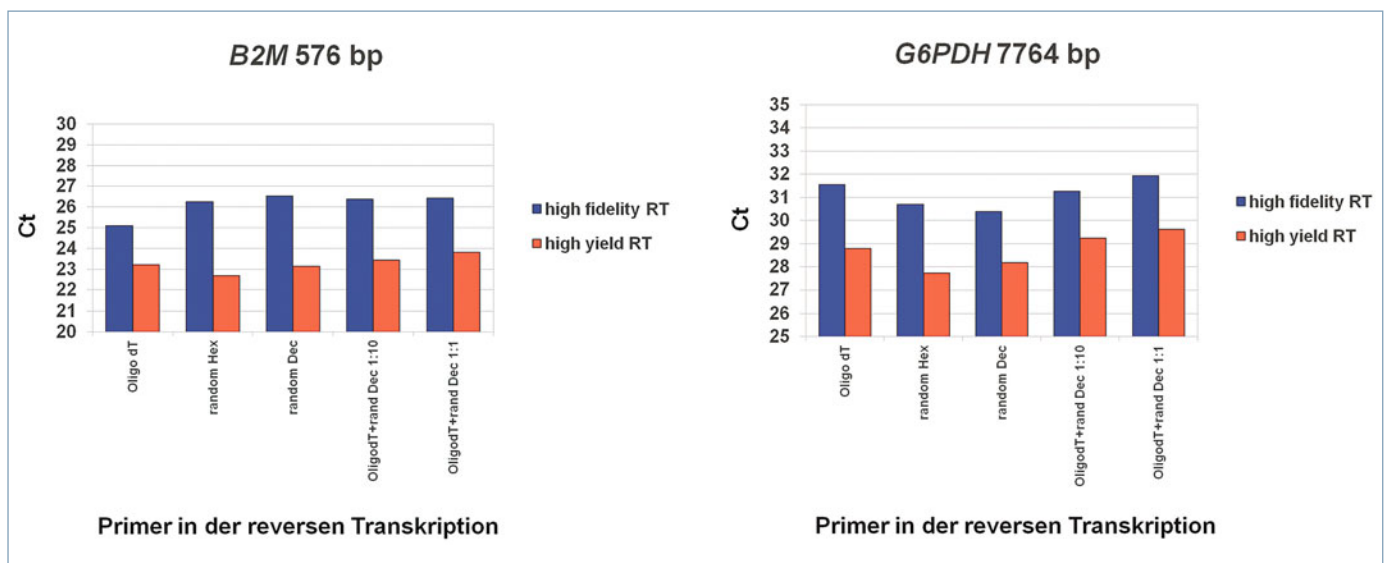
10.1007/s12268-012-0142-7
© Springer-Verlag 2012

Die quantitative PCR (qPCR) hat eine ähnlich rasante Entwicklung wie die PCR gemacht. In PubMed wurden die ersten beiden Artikel zur qPCR bereits 1992 gelistet. Zu einer grundlegenden Methode in der biomedizinischen Forschung und Diagnostik entwickelte sich die qPCR jedoch erst nach der Einführung von Real-Time-PCR-Geräten. Für 2011 weist PubMed 1.716 Artikel zum Suchbegriff „qPCR“ aus. Mittlerweile hat die Methode auch Eingang in weitere Bereiche wie Landwirtschaft und Industrie gefunden. Weiter vorangetrieben wurde diese Entwicklung auch durch die Vermarktung von anwenderfreundlichen Kits.

Die weite Verbreitung dieser Methode kann den falschen Eindruck erwecken, dass ihre Anwendung trivial ist. Wie bei den meisten Methoden reicht es jedoch nicht, nur das Grundprinzip zu kennen, um die Daten richtig interpretieren und mögliche Fehlerquellen erkennen zu können.

Eine reproduzierbare Methodik war bei vielen Publikationen nur schlecht erkennbar. Dieses Problem wurde mit den MIQE-Richtlinien [1] adressiert, die vorgeben, welche Informationen bei der Publikation von qPCR-Ergebnissen angegeben werden sollten. Diese umfassen Aspekte der Probengewinnung und -aufarbeitung, des Assaydesigns und der Vali-

dierung sowie die Datenanalyse. Diese Richtlinien sind auch hilfreich, um sich der möglichen Störfaktoren bewusst zu werden und die Versuche optimal zu planen (Tabelle 1 zeigt eine kurze Zusammenfassung, ausführliche Darstellung in [1]). Beispielsweise hat bei der Expressionsanalyse mithilfe der Real-Time-RT-PCR die Gewinnung und Lagerung des Probenmaterials großen Einfluss auf die Qualität der RNA. Die von stärker degradiert RNA synthetisierte cDNA erzeugt in der Regel höhere Ct-Werte (*cycle threshold*; Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal über den Hintergrund ansteigt). Bei der relativen Quantifizierung, bei der die Menge des Transkripts eines Zielgens im Verhältnis zu einem oder mehreren Referenzgenen bestimmt wird, wird dies durch die Normierung auf ausgewählte Referenzgene meistens ausgeglichen [2, 3], aber die erzeugten Daten weisen stärkere Schwankungen auf [4] und können auch die Auswahl der optimalen Referenzgene beeinflussen [5]. Bei Verwendung von Oligo-dT-Primern in der cDNA-Synthese sollten auch die in der anschließenden qPCR verwendeten Primer nahe dem 3'-Ende liegen. Gerade bei nur mittelmäßiger RNA-Qualität kann es sonst durch zu kurze cDNA



▲ **Abb. 1:** Ct-Werte für qPCR-Läufe für die Gene *B2M* (Transkript ist 576 Basenpaare vom 3'-Ende entfernt) und *G6PDH* (Transkript ist 7.764 Basenpaare vom 3'-Ende entfernt). Die cDNA wurde unter Verwendung verschiedener Primer und zweier Reverser Transkriptasen synthetisiert. Oligo dT: Oligo-p(dT)₁₅-Primer; random Hex: *random*-Hexamerprimer; random Dec: *random*-Dekamerprimer; high fidelity RT: reverse Transkription mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche); high yield RT: reverse Transkription mit der Maxima[®] Reverse Transcriptase (Fermentas).

schnell zu hohen Ct-Werten kommen [6]. Auch sollte man sich über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Reversen Transkriptasen bewusst sein. M-MuLV-basierte Reverse Transkriptasen generieren mehr cDNA, aber mit einer höheren Fehlerrate als AMV-basierte Reverse Transkriptasen oder Enzymgemische mit *proofreading*-Aktivität. Diese Besonderheiten müssen in Abhängigkeit von den nachfolgenden Applikationen berücksichtigt werden.

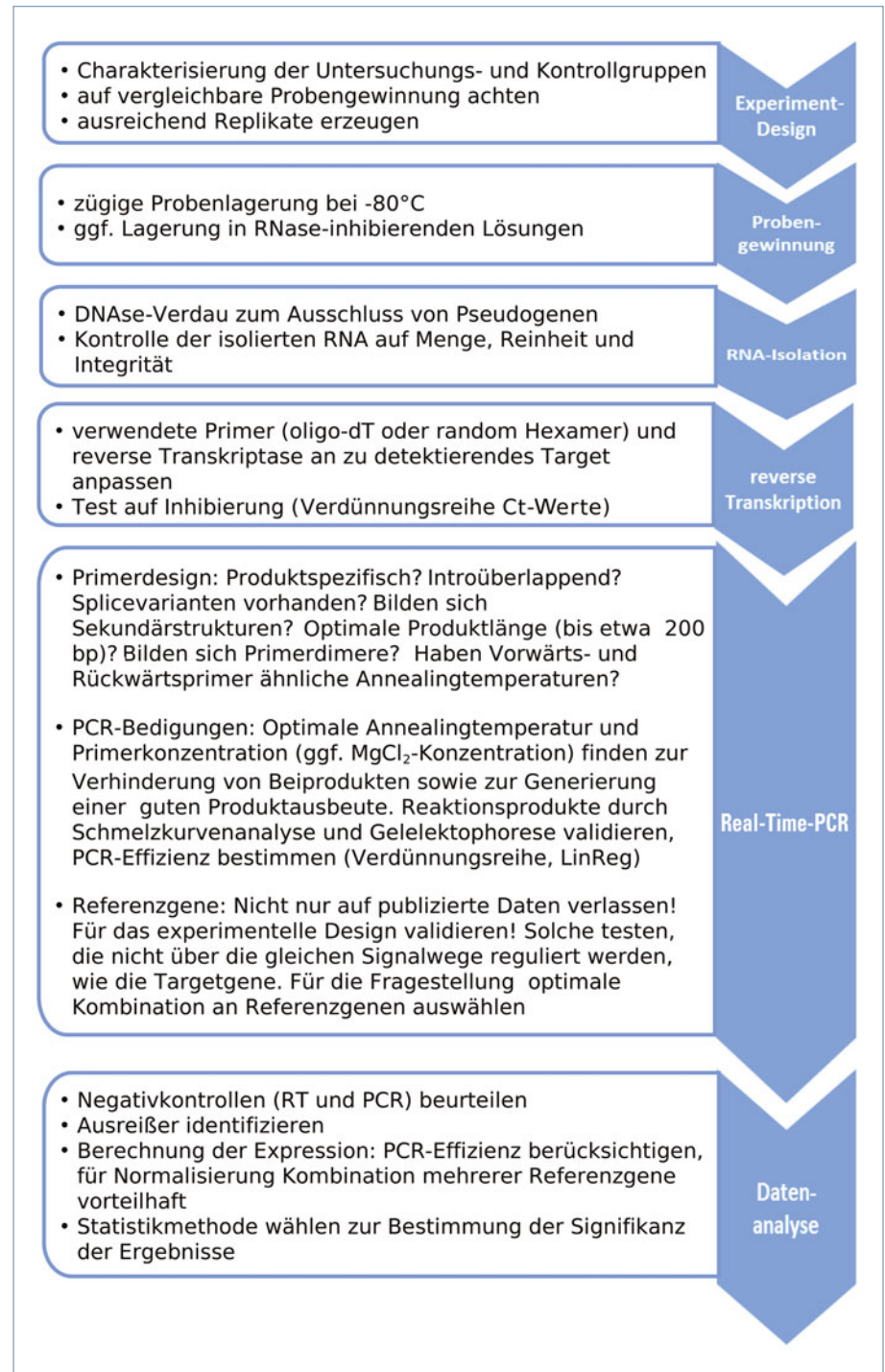
An zwei Beispielen sollen nun Probleme und mögliche Lösungswege bei der Ermittlung der qPCR-Effizienz und der Bestimmung geeigneter Referenzgene gezeigt werden.

Bestimmung der PCR-Effizienzen

Im Rahmen eines Projektes wurden qPCR-Referenzgene für Ramos-Zellen (eine B-Zell-Lymphomzelllinie) etabliert und die PCR-Effizienzen bestimmt. Nach einer Literaturstudie wurde eine Vorauswahl möglicher Referenzgene getroffen, für die dann Primer nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden: Die Länge sollte 18 bis 24 Basenpaare betragen und Intron-überlappend sein; die Schmelztemperatur sollte sich um maximal 1 °C unterscheiden; die Amplikongröße sollte zwischen 70 und 200 Basenpaaren liegen. Für das Design wurde die Software PerlPrimer mit Sequenzen aus der Datenbank Ensembl genutzt, oder es wurden Primer aus der Real-Time-Primerdatenbank (www.rtpimerdb.org) verwendet.

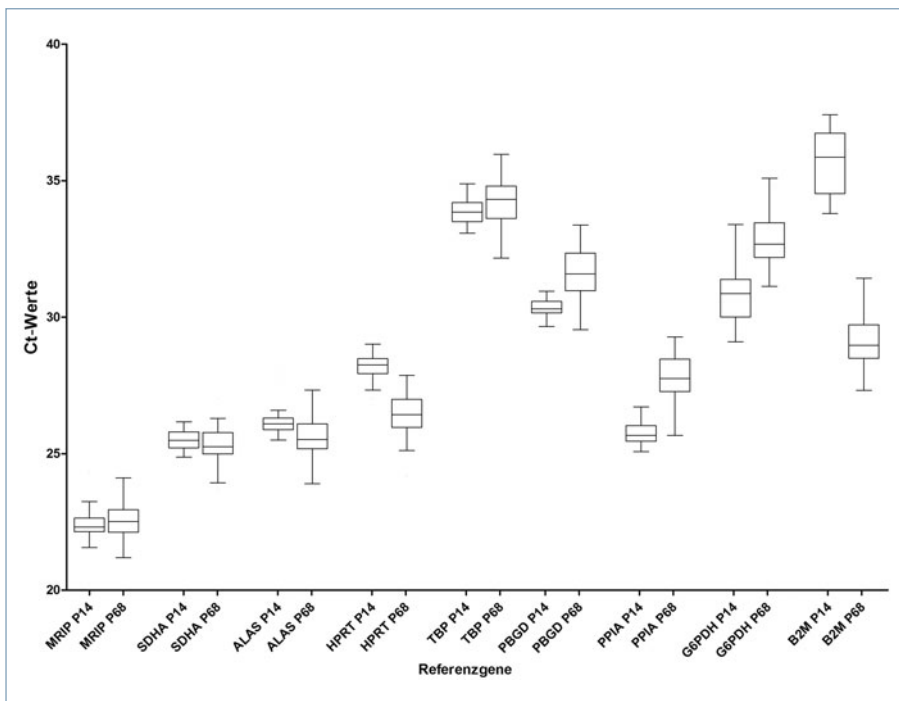
Zur Etablierung der PCR wurden zunächst mittels konventionellem Thermocycler und Gelelektrophorese verschiedene Primerkonzentrationen (je 2,5, fünf bzw. zehn Pikomol im 20-Mikroliter-Ansatz) und Annealingtemperaturen getestet. Danach wurde die Methode auf den LightCycler480 (Roche) unter Verwendung des SybrGreen Master I Kits übertragen. Anfangs wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe von 1:25, 1:75, 1:225, 1:675 und 1:2.025 mit je drei Replikaten verwendet. Dabei zeigte sich, dass die 1:25-Verdünnungen einen gleichen Ct-Wert generierten wie die 1:75-Verdünnungen, was auf eine Inhibition hindeutet. Die 1:2.025-Verdünnung wies meist keine Amplifikation auf. Die technischen Replikate zeigten eine starke Streuung. Eine zuverlässige Effizienzbestimmung war so nicht möglich. Zunächst wurde die Verdünnungsreihe angepasst und mit Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 sichergestellt, dass alle generierten PCR-Daten im linearen Bereich lagen. Außerdem wurde die RT-Reaktion opti-

Tab. 1: Ablaufschema zur Etablierung und Durchführung einer Genexpressionsanalyse mithilfe der Real-Time-RT-PCR. Zu jedem Schritt sind exemplarische Faktoren genannt, die einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse haben können und deshalb auch bei Publikation der Ergebnisse angegeben werden sollten. Für eine vollständige Auflistung siehe MIQE-Richtlinien [1].



miert, indem verschiedene Primer ausgetestet wurden: Oligo-dT-Primer, *random*-Hexamerprimer, *random*-Dekamerprimer sowie Mischungen aus Oligo-dT-Primern mit *random*-Primern. Parallel wurde im Vergleich zum High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, enthält ein *proofreading*-Enzym) mit der Maxima® Reverse Transcriptase (Fer-

mentas) ein M-MuLV-basiertes Enzym getestet. Im direkten Vergleich erzielte in unserem System (**Abb. 1**) eine Kombination von *random*-Hexamerprimern mit der Maxima Reverse Transcriptase das beste Resultat. Liegt das Amplikon in der Nähe der 3'-Region (z. B. *B2M*, 576 Basenpaare), generieren Oligo-dT-Primer die zweitbesten



▲ **Abb. 2:** Vergleich der Ct-Werte und Standardabweichungen von neun Referenzgenen der SH-SY5Y-Zelllinie in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Zellkultur. P14: Passage 14; P68: Passage 68.

Ergebnisse, aber bei einer größeren Entfernung (z. B. *G6PDH*, 7.764 Basenpaare) schneiden sie am schlechtesten ab. *Random*-Dekamerprimer sind bei einer großen Entfernung vom 3'-Ende (über 2.500 Basenpaare) ähnlich gut wie *random*-Hexamerprimer. Die Mischungen von Oligo-dT-Primern und *random*-Dekamerprimern (1:1 und 1:10) erbrachten immer die schlechtesten Resultate.

Für die weiteren Versuche wurden *random*-Hexamerprimer und die für diese Bedingungen als optimal ermittelte Maxima Reverse Transcriptase verwendet. Dadurch konnten die Ct-Werte durchschnittlich um etwa drei Zyklen verringert werden (**Abb. 1**) und auch die Streuung der technischen Replikate nahm ab. Für die meisten Gene war damit eine Effizienzbestimmung über eine Verdünnungsreihe möglich. Um auch für gering exprimierte Gene eine Effizienzbestimmung vorzunehmen, wurde das LinReg-Programm genutzt [7], das eine direkte Berechnung der Effizienz ohne Verdünnungsreihen ermöglicht. Dies spart Zeit und Geld und hat den Vorteil, dass die Effizienz direkt an den Proben in jeder PCR ermittelt werden kann. Die mit diesem Programm ermittelten Effizienzen sind häufig etwas niedriger als die durch eine Verdünnungsreihe erhaltenen Daten,

und zwar auch dann, wenn die gleichen PCR-Läufe für die Berechnungen verwendet werden. Diese Unterschiede basieren auf den verschiedenen mathematischen Methoden zur Berechnung der Effizienz. Während bei der Verdünnungsreihe eine Regressionsgerade für die ermittelten Ct-Werte der Verdünnungsschritte ermittelt wird, berechnet LinReg den Anstieg des Fluoreszenzsignals in der linearen Phase jeder einzelnen Kurve bzw. mittelt diesen Wert für alle Kurven der gleichen PCR in einem Lauf.

Validierung geeigneter Referenzgene

Bei der Auswahl von Referenzgenen werden oft bereits publizierte Referenzgene genutzt, die häufig als Haushaltsgene (*housekeeping genes*) bezeichnet werden; für Experimente mit humanen Zellen z. B. Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (*G6PDH*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPD*) und Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase (*HPRT*). Häufig wird auch, in Anlehnung an Western-Blot-Analysen, Beta-Aktin (*ACTB*) verwendet. Dabei werden drei Aspekte außer Acht gelassen. Erstens gibt es keine echten Haushaltsgene, die in allen Zelltypen und unter allen Umständen konstant exprimiert werden. Bei der ersten Auswahl möglicher Referenzgene sollte deshalb darauf geachtet

werden, dass diese nicht in die gleichen *pathways* involviert sind wie die zu untersuchenden Zielgene. Zweitens werden die traditionell verwendeten Referenzgene meistens hoch exprimiert. Das kann, wenn die Zielgene nur gering exprimiert werden, zu systematischen Fehlern führen, insbesondere wenn die PCR-Effizienzen der Ziel- und Referenzgene um mehr als zehn Prozent voneinander abweichen. Drittens wurden für drei der genannten Referenzgene (*GAPD*, *HPRT* und *ACTB*) Pseudogene beschrieben. Da Pseudogene meistens keine Introns enthalten, können mögliche DNA-Kontaminationen die Ergebnisse auch dann verfälschen, wenn Intron-überspannende Primer verwendet werden. Im Rahmen eines Projektes wurde an jungen (P14) und alten Passagen (P68) der SH-SY5Y-Zelllinie der Einfluss verschiedener Zellkulturmedien auf die neuronale Differenzierbarkeit durch Retinsäure und die Expression neuronaler Gene untersucht. Zur Bestimmung der geeigneten Referenzgene wurden nach einer Literaturrecherche neun Gene in die Testung eingeschlossen (**Abb. 2**). Das Primerdesign erfolgte wie oben beschrieben. 36 Proben wurden in die Analyse eingeschlossen. Die RNA wurde mit dem RNA Isolation Kit (Roche) isoliert. Die OD_{260/280}-Werte der Proben lagen bei $2,051 \pm 0,024$ und $2,081 \pm 0,117$ für die frühe und späte Passage und die RIN-Werte bei $9,11 \pm 0,97$ und $8,69 \pm 0,96$. Jeweils 0,6 Mikrogramm RNA wurden mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde 1:4 mit Wasser verdünnt, und es wurden zwei Mikroliter pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die Ct-Werte für die frühe und späte Passage sind in **Abbildung 2** dargestellt. Die Referenzgenanalyse wurde mit den Programmen Normfinder, GeNorm und Bestkeeper durchgeführt. Anhand der Schnittmengenanalyse wurden *ALAS*, *SDHA* und *MRIP* als die stabilsten Gene ermittelt. Normfinder ermittelt noch die Änderungen der Standardabweichung in Abhängigkeit von der Anzahl der verwendeten Referenzgene. Der Einschluss von drei Referenzgenen zeigte die niedrigste Standardabweichung, doch der Unterschied zu zwei Referenzgenen betrug nur 0,01 – ein minimaler Unterschied, der keinen Einfluss auf das Endergebnis hat. Deshalb ist aus Kostengründen für diesen Versuchsansatz der Einschluss von zwei Referenzgenen (*ALAS* und *SDHA*) als optimal anzusehen. Bei einem weiteren Projekt, bei dem die Zelllinie mit anderen Substanzen behandelt wurde, änder-

te sich die ALAS-Expression in Abhängigkeit von der Behandlung, sodass hier erneut eine Bestimmung der optimalen Referenzgene erfolgen musste.

Fazit

In unserem Labor wird die qPCR in verschiedenen Projekten angewandt. Hierbei hat sich gezeigt, dass die intensive Einarbeitung in die Methode die beste Voraussetzung für die Gewinnung reproduzierbarer Daten ist. Wichtige Parameter für die jeweilige Fragestellung sind die RNA-Qualität, die Optimierung der reversen Transkription, die Auswahl der Real-Time-PCR-Primer einschließlich der Etablierung der Real-Time-PCR mit Effizienzbestimmung sowie die Bestimmung geeigneter Referenzgene; diese sollten vor den eigentlichen Versuchen validiert werden.

Danksagung

Die Arbeiten sind Bestandteil des vom Bundesministerium für Wirtschaft geförderten Projektes „Standardisierte Etablierung von Genexpressionsanalytikanwendungen in den LifeSciences“ (Förderkennzeichen: 01FS10014). ■

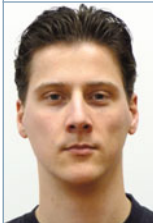
Literatur

- [1] Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622
- [2] Antonov J, Goldstein DR, Oberli A et al. (2005) Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 85:1040–1050
- [3] Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27:126–139
- [4] Huggett J, Dheda K, Bustin S et al. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284
- [5] Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F et al. (2005) Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques* 39:52–56
- [6] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50:227–230
- [7] Ruijter JM, Ramackers C, Hoogaars WM et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45

Korrespondenzadresse:

PD Dr. habil. Catrin Wernicke
Technische Hochschule Wildau (FH)
Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik
Bahnhofstraße 1
D-13075 Wildau
Tel.: 03375-508-330
cwernicke@th-wildau.de
www.th-wildau.de/molekularbiologie

AUTOREN



Lars Radke

Jahrgang 1983. 2004–2009 Studium der Biosystemtechnik/Bioinformatik, Technische Hochschule Wildau (FH). Seit 2009 wissenschaftlicher Projektmitarbeiter im Labor Molekularbiologie und Funktionelle Genomik, Technische Hochschule Wildau. Seit 2012 externer Doktorand an der medizinischen Fakultät der Charité.



Philipp Franke

Jahrgang 1986. 2006–2011 Studium der Biosystemtechnik/Bioinformatik, Technische Hochschule Wildau (FH). Seit 2012 wissenschaftlicher Projektmitarbeiter im Labor Molekularbiologie und Funktionelle Genomik, Technische Hochschule Wildau (FH).



Stephan Berge

Jahrgang 1979. 2006–2011 Studium der Biosystemtechnik/Bioinformatik, Technische Hochschule Wildau (FH).



Marcus Frohme

Biologiestudium an der Universität Heidelberg. 2001 Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, anschließend stellvertretender Abteilungsleiter in der Abteilung Funktionelle Genomanalyse. Seit 2007 Professur für Molekularbiologie an der Technischen Hochschule Wildau (FH).



Catrin Wernicke

Biochemie- und Molekularbiologiestudium an der HU Berlin. 1997 Promotion in Molekularbiologie am Institut für Medizinische Genetik der Charité-Universitätsmedizin Berlin. 2001–2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik für Psychiatrie und Institut für Pharmakologie, Charité. 2011 Habilitation und Dozentin an der Charité. Seit 2011 wissenschaftliche Projektmitarbeiterin im Labor Molekularbiologie und Funktionelle Genomik, Technische Hochschule Wildau (FH).