

# Opsætning og optimering af en mikroRNA qPCR-analyse

Et bachelorprojekt blev udarbejdet på Hvidovre Hospital KBA med det formål at detektere det specifikke mikroRNA miR-375

MikroRNA (miRNA) er korte enkeltstrengede molekyler på ca. 21-23 nukleotider, der kan regulere genekspressionen ved at binde sig til 3' UTR-delen af mRNA og dermed bl.a. hæmme translationen af mRNA til protein [1]. Ét miRNA-molekyle kan binde sig til flere mRNA, og omvendt kan forskellige miRNA binde sig til det samme mRNA [2]. Man mener, at miRNA regulerer 1/3 af menneskets samlede genom [3].

Det specifikke miRNA, miR-375, er undersøgt i flere forskellige studier hvad angår dets rolle i diabetes mellitus type 2 (DM2) [4,5]. Det er påvist, at miR-375 regulerer insulinproduktionen og -sekretionen i  $\beta$ -cellerne i pancreas [5] og findes ekstracellulært i plasma [1].

På Hvidovre Hospital KBA havde man en hypotese om, at netop miR-375 koncentration i plasma hos DM2-patienter ændres efter en gastric bypass-operation (fedmeoperation). Hypotesen er bygget på, at patienters koncentration af HBA1C (primær DM2-markør) er faldet, efter at de har gennemgået gastric bypass-operationen. miR-375 forårsager muligvis den ændrede HBA1C-konc. efter operationen, da en overekspression af miR-375 associeres med en hæmning af insulinproduktionen og -sekretionen. Ved at sammenligne DM2-patienters miR-375-koncentration henholdsvis før og efter gastric bypass-operationen vil det være muligt at undersøge, om den ændrede HBA1C-konc. evt. skyldes et fald i miR-375-konc. Dermed vil man evt. opnå en bedre forståelse af miR-375 patofysiologiske rolle i DM2. Med en bedre forståelse af sygdommen kan en terapeutisk intervention af DM2 evt. etableres, inden de komplikationer, som DM2 medfører, opstår.

Formålet med dette projekt var at etablere en standardiseret qPCR-analysemetode til at detektere miR-375 på Hvidovre KBA. Inden måling af miRNA ved en qPCR-analysemetode er det nødvendigt at optimere forskellige analyseparametre, således at miR-375 analyseresultater er pålidelige og brugbare til vurdering. Analysens optimering omhandlede i mit projekt bl.a. korrekt koncentration af et passivt reference-fluorokrom

(ROX) samt identifikation af et eller flere endogene (in vivo) kandidat-referencegener til normalisering af miR-375 analyse-resultater [6]. Referencegenet virker som en intern kontrol for præanalytiske og analytiske faktorer, da referencegenet parallelt med målegenet er udsat for præcis de samme forhold (fx opbevaring, qPCR-opformering m.m.) [7].

## Analyseprincip

### Detektion af miRNA

*Detektion af specifikt miRNA foregår i tre step:*

Oprensning af miRNA → cDNA-syntese → specifik qPCR (opformering).

### Step 1. oprensning:

Her ekstraheres de enkeltstrengede miRNA-molekyler fra plasma/serum. Ved tilsætning af reagenser til prøven i et specielt spin-column-rør, bindes RNA-molekylerne til et filter, samtidig med at andre komponenter udvaskes ned i et eppendorfrør ved centrifugering.

### Step 2. cDNA-syntese:

For at et miRNA kan opformeres i en qPCR-reaktion, skal det syntetiseres til et dobbeltstrengt DNA også kaldet cDNA (komplementær DNA). Dermed kan fluorokromet SYBR Green interkalere imellem de to komplementære strenge, så det kan detekteres i en efterfølgende qPCR-reaktion.

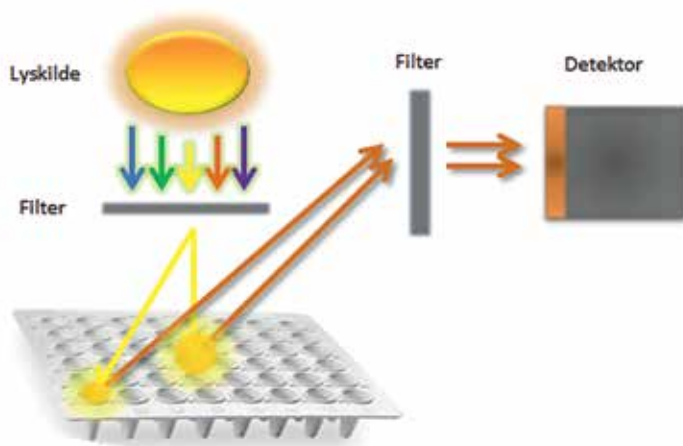
### Step 3. specifik qPCR:

Under qPCR-reaktionen denatureres først alt cDNA. Derefter binder (anealing) miR-specifikke forward og reverse primere sig til det specifikke cDNA. Efterfølgende forlænges (elongeres) det enkeltstrengede DNA af enzymet polymerase II. Ved konstant at denaturere, aneale og elongere cDNA bliver der efter hver endt PCR-cyklus eksponentielt dannet dobbelt så meget produkt. Enheden for et produkt i en qPCR-analyse betegnes



Af bioanalytiker // **Niklas Folland Lauritsen**  
Klinisk Biokemisk Afdeling, Hvidovre Hospital

Vejledere:  
Bioanalytikerunderviser Lene Gredal,  
Klinisk Biokemisk Afdeling, Hvidovre Hospital  
Christina Kjær, Professionshøjskolen Metropol  
København



Figur 1. Figuren illustrerer den optiske forskel fra lyskilden til brøndene på PCR-pladen og dermed også en forskel i styrken af fluorescenssignalet. ROX normaliserer for dette.

som en cyklus-tærskelværdi (ct-værdi). Jo lavere ct-værdi et produkt har, jo mere produkt har prøven indeholdt.

## ROX

I en qPCR-analyse er det nødvendigt at anvende et fluorokrom, der bruges til normalisering af ikke-PCR-relaterede faktorer. Ikke-PCR-relaterede faktorer er fx afpipetteringsfejl, optisk forskel fra lyskilden til afstanden til brøndene på PCR-pladen (se figur 1) og ændringer i koncentration eller volumen i de enkelte brønde under selve PCR-reaktionen. Fluorokromet kaldes ROX og er en "passiv reporter" (P), der måles fotometrisk ved en anden bølgelængde end det fluorokrom, der bliver anvendt til måling af miRNA. Det fluorokrom, der måler miRNA, betegnes som en "reporter" (R) og er fx SYBR Green. Ved at dividere hvert signal fra SYBR Green (N) med hvert signal fra ROX (P) fås et normaliseret forhold mellem de to signaler. Det normaliserede forhold betegnes  $R_n$ . Baggrundssignalet (baseline) subtraheres til sidst fra  $R_n$ , og  $\Delta R_n$  er den endelige normaliserede fluorescens [8]. En bestemt konc. af ROX tilsættes i oprensingssteppet.

$$R_n = N/P$$

$$\Delta R_n = R_n - \text{Baseline}$$

## Materialer og metode

### Prøver

Til projektet blev der brugt patientprøver fra Hvidovre Hospitals Biobank. Hver patient fik taget to blodprøver (serum + plasma) preoperativt før gastric bypass-operationen og to blodprøver (serum + plasma) igen postoperativt efter gastric bypass-operationen. Til dette projekt blev der anvendt serumprøver fra i alt 9 patienter (samlet 18 prøver pre- og postoperativt). Patient 1-5 var overvægtige og diagnosticeret med DM2 (HBA1C > 48 mmol/mol). Patient 5-9 var overvægtige og ikke diagnosticeret med DM2 (HBA1C < 48 mmol/mol).

### Reagenser og apparatur

Reagenser og materialer til isolationen af miRNA, cDNA-syntesen, qPCR-analysen samt primere er alle fra biofirmaet

Exiqon (Exiqon A/S, exiqon.com). ROX er fra Life Technologies. Andre nødvendige materialer og apparaturer til udførelsen af forsøget tilhører Hvidovre KBA.

## Kontroller

Syntetiske oligonukleotider, UniSp5 og UniSp6 (spike-ins), blev brugt som kontrol af miRNA-oprensningen, cDNA-syntesen og qPCR-reaktionen. NTC (= No Template Control) blev samtidig anvendt i alle forsøg. En kendt mængde UniSp6-template blev afpipetteret til reaktionsblandingen ved cDNA-syntesen. UniSp6 tester, om der har været elementer fra oprensningen (fx en for høj tilsat konc. af ROX), der har virket hæmmende på cDNA-syntesen. Ct-værdien for UniSp6 bør normalt ligge på ca. 18,5 ifølge Exiqon.

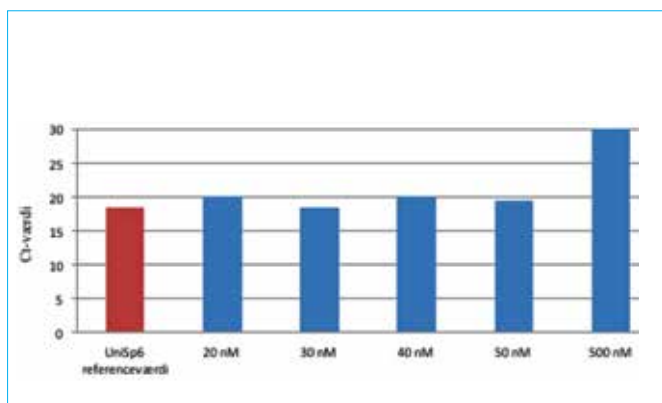
## Referencegener

Vha. litteratursøgning udvalgte jeg 6 mulige kandidat-referencegener, der evt. kunne anvendes som et referencegen til miR-375 qPCR-analysen. Kriterierne for et egnet referencegen var, at det skulle være udtrykt uafhængigt af patientens tilstand. Mange miRNA har vist sig at være involveret i DM2 og fedme [1,8], og da der hos patienterne ses en ændring i netop disse to tilstande efter en gastric bypass-operation, udvalgte jeg referencegener, der ikke er påvirket af DM2 og fedme. Ligeledes fravalgte jeg miRNA-referencegener, der er påvirket af et operativt indgreb [8].

Softwareprogrammet GeNorm blev anvendt til at finde de mest stabile referencegener i mit setup. GeNorm anvender en algoritme, som ved input af analyseresultater automatisk udregner en såkaldt m-værdi. En lav m-værdi indikerer en høj stabilitet [6].

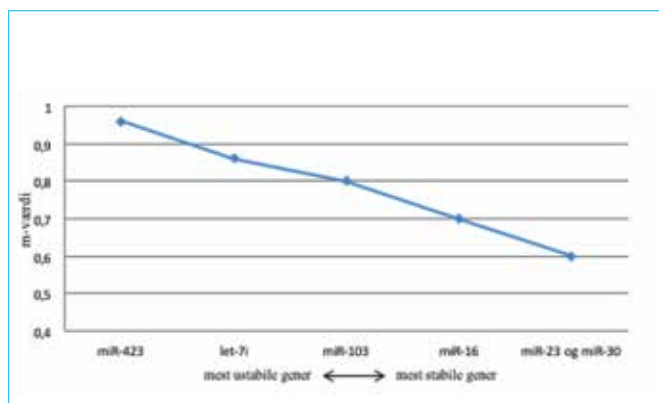
Et optimalt antal referencegener, der skulle bruges til at udregne en normaliseringsfaktor (geometrisk middelværdi af mindst to gens relative ct-værdier for en prøve), NF, blev udregnet manuelt og betegnes som en  $V_n/V_{n+1}$ -værdi. GeNorm har sat en anbefalet  $V_n/V_{n+1}$ -værdi på mindst 0,15. Hvis  $V_{2/3}$  fx er 0,25, er det nødvendigt at bruge mindst tre referencegener til udregning af normaliseringsfaktoren. Hvis derimod  $V_{3/4}$  er 0,14, er det ikke nødvendigt at bruge fire referencegener til ud-

## Resultater



### ROX

Figur 2. Sammenligning af UniSp6-referenceværdi fra Exiqon (rød søjle) med UniSp6-resultater ved tilsatte ROX-koncentrationer (blå søjler). Anvendte ROX-koncentrationer er angivet på x-aksen, og ct-værdier er angivet på y-aksen.



### Mest stabile referencegener

Figur 3. Kurven viser de enkelte referencegeners stabilitet fra lav mod høj. Y-akse: m-værdi af referencegen. X-akse: seks anvendte referencegener.

regning af normaliseringsfaktoren. Altså ville tre referencegener være optimalt at anvende i dette eksempel. Normalisering af miR-375 analyseresultater blev til sidst udført for hver respektive prøve,  $x$ , ved  $(\text{miR-375 ct-værdi for } x)/(\text{NF for } x)$ .

## Diskussion

Ved opsætningen af en miRNA qPCR-analyse er det generelt vigtigt, at ROX er noget af det første, der optimeres, da ROX normaliserer SYBR Greens fluorescenssignal. Ifølge Jordan *et al* er det primært variationen af lyskildens afstand til de forskellige brønde på PCR-pladen, som ROX normaliserer [9]. Hvis man undlod brugen af ROX (eller ikke testede for den optimale konc.), ville andre optimeringsparametre ikke nødvendigvis give pålidelige konkluderende resultater. ROX bør altid blive forsøgt optimeret, mht. hvilket PCR-apparat der anvendes.

ROX-koncentrationer på 50 nM og 500 nM blev først testet. En ROX-konc. på 500 nM har sandsynligvis virket hæmmende på cDNA-syntesen, da UniSp6 ct-værdi var målt til 30,5 (se figur 2). ROX i lavere konc. blev derfor testet. Med en ct-værdi på 18,4 var en ROX-konc. på 30 nM tættest på UniSp6 referenceværdi. En ROX-konc. på 20 nM målte en ct-værdi på 20,1. Det skyldes sandsynligvis, at et for lavt signal af ROX formentlig resulterer i et forkert normaliseret fluorescenssignal af SYBR Green, jvf.  $R_n = \text{SYBR Green}/\text{ROX}$ .

Identifikation af kandidat-referencegener til en specifik miRNA qPCR-analyse er generelt en vanskelig proces, da en sygdom/tilstand kan associeres til forskellige miRNA [5,7]. En specifik tilstand kan endvidere få de enkelte miRNA til at coregulere hinanden og således påvirke deres indbyrdes ekspressionsniveauer [10]. Det er derfor altid nødvendigt at teste og validere stabile referencegener i ens eget projekt [7].

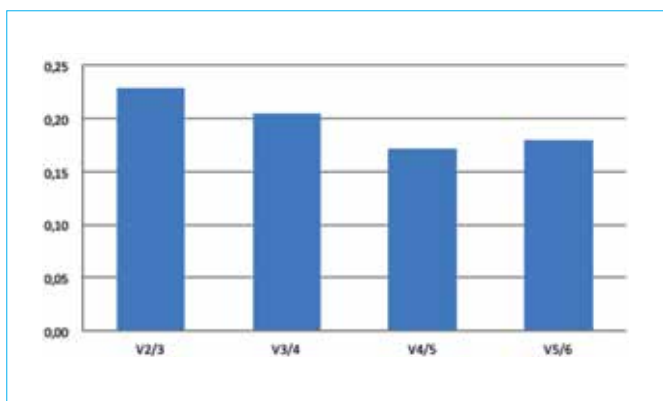
Figur 3 viser softwareprogrammet GeNorms udregning af de seks referencegeners stabilitet. Rangeringen referencegenerne viser, at miR-23 og miR-30 var mest stabile med en m-værdi på 0,6. Ifølge J. Hellemans *et al.* vurderes referencegener med en m-værdi på over 0,5 som ustabile ved brug af homogene prøver. Heterogene prøvers m-værdi kan derimod variere

helt op til 1 [11]. Da patienternes tilstand var ændret efter gastric bypass operationen, og da nogle patienter var ikke-diabetikere og andre patienter var diabetikere, blev prøverne i dette forsøg vurderet til at være heterogene. En m-værdi på op til 1,0 blev dermed anset som acceptabel til udregning af normaliseringsfaktoren.

Figur 4 viser, at  $V_4/V_5$  har den laveste værdi med 0,17. Det indikerer, at det er optimalt at anvende de fire bedst rangerede referencegener til udregning af normaliseringsfaktoren; miR-23, miR-30, miR-103 og miR-16. Studiet, der har udarbejdet algoritmen i GeNorm [6], anbefaler, at  $V_n/V_{n+1}$ -værdien skal være under 0,15 for at være acceptabel. Ingen af de udregnede  $V_n/V_{n+1}$  har en værdi på under 0,15. Dog påpeger de i GeNorms manual, at hvis ingen værdier er under 0,15, udvælges de tre bedste referencegener til udregning af normaliseringsfaktoren, da det altid er mere optimalt end ved brug af fx ét referencegen [12]. Da  $V_4/V_5$  er på 0,17, vil det sandsynligvis stadig være mere optimalt at anvende fire referencegener, da  $V_3/V_4$ -værdien er ca. 0,20.

Det var nu muligt at normalisere miR-375 analyseresultater, da det nu var fundet, hvilke referencegener samt hvor mange referencegener der skulle anvendes til udregning af normaliseringsfaktoren. Generelt er normalisering af et målegens analyseresultater vigtig, da en analytisk variation kan påvirke analyseresultaterne. Ifølge Vandesompele er normalisering vha. referencegener betegnet som en "gylden standard" [7]. En anden metode til normalisering af et målegen er bl.a. vha. syntetiske spike-in-kontroller [13]. En ulempe ved at anvende spike-in-kontroller til normalisering er dog, at de først bliver tilsat i oprensningen. Endogene referencegener findes i serum/plasmaprøven konstant efter prøvetagning og kan dermed afspejle kvaliteten af startmaterialet, som kan være påvirket af prøvebehandling og/eller -opbevaring. Endvidere forventes det ikke, at syntetiske spike-in-kontroller påvirkes på samme måde af enzymatiske reaktioner under oprensningen, cDNA-syntese samt qPCR-reaktionen som endogene referencegener [7].

## Ergonomic carts and tables for safe sample collection



### Optimalt antal af referencegener til normalisering

Figur 4. Y-akse:  $V_n / V_{n+1}$  værdier. X-akse: bedst rangerede anvendte referencegener til udregning af  $V_n / V_{n+1}$ .

En parret t-test blev udført på resultaterne af de pre- og postoperative prøver. De normaliserede miR-375-analyseresultater viste en p-værdi på 0,55 ( $\alpha = 0,05$ ). Dvs. ingen signifikant forskel var fundet mellem de pre- og postoperative patienters miR-375-analyseresultater ( $p > 0,05$ ). En konklusion af, om miR-375-konc. ændres i plasma som følge af en gastric bypass-operation, kræver dog et højere antal patienter til t-testens udregning.

### Konklusion

På baggrund af min identifikation af kandidat-referencegener til miR-375 qPCR-analysen konkluderer jeg, at miR-16, miR-23, miR-30 og miR-103 er den optimale kombination at anvende til normalisering af miR-375 analyseresultater. Endvidere viste en ROX-konc. på 30 nM sig at være den optimale at anvende til normalisering af SYBR Greens fluorescenssignal. □

### Referencer

- [1] Guay G. og Regazzi R. "Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus". Nat. Rev. Endocrinol. 2013; 9; s. 513-517, 519. REVIEW.
- [2] Kumar M., Nath S., Prasad H.K., Sharma G.D., Young Li et al. "MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus". Protein and Cell 2012, 3(10); s. 726-727.
- [3] Blondal T., Nielsen S.J et al. "Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids" Methods 59. 2013; s 1-3. REVIEW
- [4] Kadamkode V. og Banerjee G. "Micro RNA: An Epigenetic Regulator of Type 2 Diabetes". Bentham Science Publishers 2014, 3; s. 87.
- [5] Shantikumar S., Caporali A. et al. "Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications" Cardiovascular Research 2012, 93; s 584, 589-590. REVIEW
- [6] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes". Genome Biol. 2002 18;3(7); s. 1-11.
- [7] Vandesompele J, Kubista M. et al. "Reference gene software for improved normalization". S. 1-3.
- [8] Ortega F.J, Mercader J.M. et al. "Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity" Endocrinology and Metabolism, Clinical Chemistry, 2013 59;5; s. 784
- [9] Jordan L. og Kurtz Richard. "Optical Design of CFX96 Real-Time PCR Detection System Eliminates the Require of a Passive Reference Dye". Bio-Rad Laboratories 2010, tech not 6047; s. 1-5.
- [10] Ghodke-Puranik Y., Guan W. og Lamba J.K. "Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation". BMC Research Notes 2014, 7:129; s. 8.
- [11] Hellemans J., Mortier G. et al. "Method qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data" Genome Biology 2007, 8; s. 19-3
- [12] Genorm. Genorm manual: [http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/getting\\_manual.pdf](http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/getting_manual.pdf) s. 4, 6 og 7
- [13] Smith, R. D., Brown, B., Ikonomi, P., and Schechter, A. N. "Exogenous reference RNA for normalization of real-time quantitative PCR". Biotechniques 2003 34; 88-91.



**INNOPART**   
 Contact us: Innopart Oy | [www.innopart.fi](http://www.innopart.fi)  
 Phone: +358 45 342 4641 | Email: [info@innopart.fi](mailto:info@innopart.fi)