



Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Uygulamalarında Kullanılan RNA'ların Kalite Kontrolleri ve Önemi

Ali Osman TURGUT, Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Ali Osman TURGUT; E-posta: aoturgut@mehmetakif.edu.tr; ORCID: 0000-0001-6863-0939.

Atıf yapmak için: Turgut AO, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) uygulamalarında kullanılan RNA'ların kalite kontrolleri ve önemi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 334-341.

Özet: RNA kalitesi, RT-qPCR performansı ve güvenilirliği açısından dikkat edilmesi gereken önemli bir husustur. RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirilmesine dikkat edilmemesi, yapılan bilimsel çalışmaların güvenilirliği açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu noktada, RT-qPCR çalışmasının her aşamasında gerekli standartlara uyulması ve RNA kalite değerlendirmesinin mutlaka yapılması gerekmektedir. RNA kalitesinin çalışmanın her aşamasında yüksek tutulması, RT-qPCR verimliliğinin ve elde edilen sonuçların güvenilirliğinin artırılmasına olanak tanımaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçları üzerine olan etkisini ve RNA kalite değerlendirmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu derlemede, RNA kalitesi, RNA kalite değerlendirmesine kullanılan yöntemler ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerinden bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gen ekspresyonu, MIQE, RNA kalitesi, RT-qPCR

Quality Controls and Importance of RNAs Used in Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) Applications

Summary: RNA quality is an important consideration for RT-qPCR performance and reliability. The lack of attention to RNA quality assessment poses a significant risk for the reliability of scientific studies in RT-qPCR studies. At this point, the required standards must be followed, and RNA quality assessment must be performed at every stage of the RT-qPCR study. Maintaining high RNA quality at each stage of the study enables to increase efficiency of RT-qPCR and reliability of the results. Numerous studies have demonstrated the effect of RNA quality on RT-qPCR results and the need for RNA quality assessment. In this review; RNA quality, methods used for RNA quality assessment and the effects of RNA quality on RT-qPCR performance are discussed.

Key words: Gene expression, MIQE, RNA quality, RT-qPCR

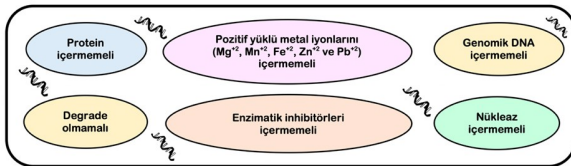
Giriş

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction; RT-qPCR); her bir PCR siklusu süresince oluşan PCR ürünlerin gerçek zamanlı olarak tespitine ve miktarının belirlenmesine olanak sağlayan moleküler bir tekniktir (VanGuilder ve ark., 2008). RT-qPCR'da oluşan PCR ürünlerinin gerçek zamanlı olarak görümlenmesi, çift iplikçikli DNA'ya bağlanan floresan boyalar yardımıyla mümkün olmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan boyalardan biri Syber Green I'dir (Li ve ark., 2016). Bunun yanı sıra, TaqMan prob ve moleküler boncuk (molecular beacon) gibi, yükseltgen bölgeye bağlanarak floresan ışığı yapan daha gelişmiş ve spesifik oligonükleotid temelli sistemler de bulunmaktadır (Kozera ve Rapacz, 2013). RT-qPCR; gen ekspresyon çalışmaları (Agaoglu ve ark., 2015; Agaoglu ve ark., 2016), genomik ve viral DNA kopya sayısı hesaplanması (Ingham, 2005), allelik varyasyonların incelenmesi (Johnson ve ark., 2004) ile genlerin spesifik sığıpları

(splicing) varyantlarının ekspresyon analizleri (Sethi ve Palefsky, 2004) gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Ancak, RT-qPCR özellikle gen ekspresyon çalışmalarında daha yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Kozera ve Rapacz, 2013; Green ve Sambrook, 2018). RT-qPCR tekniğinde; genetik bilginin transkripsiyonu sonucu oluşan mesajcı RNA (messenger RNA; mRNA), reverse transkriptaz (reverse transcriptase; RT) enzimi ile komplementer DNA'ya (complementary DNA; cDNA) dönüştürülmektedir. Oluşan bu cDNA'lar qPCR reaksiyonunda hedef DNA olarak kullanılmaktadır. Bu sayede ilgili genin ekspresyon düzeyinin tespiti mümkün olmaktadır (Valasek ve Repa, 2005).

RT-qPCR çalışmalarının ilk adımını örneklerin toplanması, saklanması ve RNA'nın izole edilmesi oluşturmaktadır. RNA izolasyonunda dikkat edilmesi gereken bazı kriterler bildirilmiştir (Fleige ve Pfaffl, 2006) (Şekil 1). Bu anlamda, izole edilen RNA'ların kalite ve kantite kontrollerinin yapılması önemlidir (Green ve Sambrook, 2018). Öyle ki, yapılan çok sayıda çalışma, RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçlarının güvenilirliği açısından kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Imbeaud ve ark., 2005; Fleige ve ark., 2006; Becker ve ark., 2010; Vermeulen ve ark., 2011;

McGovern ve ark., 2018). RNA oldukça hassas bir moleküldür (Becker ve ark., 2010). RNA'nın uzun süre saklanması, olumsuz saklama koşulları, UV ışınlar, alkalik pH, yüksek ısı, metal iyonları ve ortamda sürekli olarak bulanabilen ribonükleazlar (RNaz) RNA'nın kalitesi açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Becker ve ark., 2010; Nielsen, 2010; Vermeulen ve ark., 2011). Alkalik pH, nükleotidler arasındaki fosfat gruplarının yapısını bozarak, RNA'nın hızlı bir şekilde yıkımlanmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, RNA ile çalışırken pH'nın nötral veya hafif asidik değerlerde bulunması gerektiği belirtilmektedir (Nielsen, 2010; Nilsen, 2013). Benzer şekilde, yüksek ısı RNA'nın yıkımlanmasına sebep olmaktadır (Nielsen, 2010). Bu nedenle, toplanan örnekler sıvı nitrojen içerisinde dondurularak (Nilsen, 2013) veya koruyucu solüsyonlar (RNALater) ile muamele edilerek ısıya bağlı RNA kalitesinin düşmesinin engellenmesi sağlanabilmektedir (Nielsen, 2010). Ayrıca, RT-qPCR çalışmalarında kullanılan RNA'ların kalitesinin korunabilmesi için yapılan uygulamaların buz üzerinde (0-4 °C) gerçekleştirilmesi önerilmektedir (Das ve ark., 2010; Nielsen, 2010). Pozitif yüklü metal iyonları (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2}) ise nötral pH'da fosfat grupları ile etkileşim halinde bulunmaktadır. pH'nın yükselmesi durumunda metal iyonları hidrolizi tetikleyerek RNA zincirinin kırılmasına sebep olmaktadır (Nilsen, 2013). Ancak, RNA kalitesine etki eden en önemli faktör RNaz'dır (Nilsen, 2013). RNaz; yüksek ısı ve kimyasal uygulamalara karşı oldukça dirençli bir ribonükleazdır (Nilsen ve ark., 2013). RNaz; iyi temizlenmemiş cam malzemelerde, bakterilerde, insan derisinde, kontamine olmuş pipet ve malzemelerde bulunmakta ve RNA moleküllerini hızlı bir biçimde yıkımlayarak, RNA kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Nielsen, 2010; Green ve Sambrook, 2018). Bu nedenle; RT-qPCR çalışmalarında; cDNA aşamasından önce izole edilen RNA'nın yeterli kalitede ve miktarda olduğunun kesin olarak belirlenmesi ve PCR reaksiyonunun yüksek kalitedeki RNA ile sürdürülmesi gerekmektedir (Green ve Sambrook, 2018). Bu sayede, RT-PCR çalışmalarında daha güvenli sonuçların elde edilmesi mümkün olmaktadır (Fleige ve ark., 2006; Green ve Sambrook, 2018).



Şekil 1. RNA izolasyonunda dikkat edilmesi gereken bazı önemli kriterler

RT-qPCR uygulamalarında; gen ekspresyon profillerinin daha sağlıklı bir şekilde ortaya konulabilmesi için PCR aşamalarında izlenilmesi gereken temel gereksinimleri içeren bir makale (Minimum Information for

Publication of Quantitative Real Time PCR; MIQE guidelines) yayımlanmıştır (Bustin ve ark., 2009). RT-PCR uygulamaları için belirlenen bu standartlar sayesinde, yapılan çalışmaların güvenilirliğinin ve verimliliğinin artırılması ve farklı laboratuvarlar arasında uygulama birliği oluşturulması hedeflenmiştir (Becker ve ark., 2010). MIQE standartlarında, RNA kalite değerlendirmesi üzerinde önemle durulmuş ve dikkat edilmesi gereken hususlar belirtilmiştir (Bustin ve ark., 2009).

Bu derlemede, RNA'nın kalite kontrolü, RNA'nın kalite kontrolünde kullanılan yöntemler, RNA kalitesinin RT-qPCR sonuçlarının güvenilirliği üzerine olan etkileri ve önemi hakkında bilgiler özetlenmiştir.

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu amacıyla geliştirilmiş farklı yöntemler bulunmaktadır. Genel olarak bu yöntemler; solüsyon temelli yöntemler (klasik RNA izolasyon yöntemi) ve kolon temelli yöntemler (katı faz nükleik asit izolasyonu) olarak sınıflandırılmaktadır ve bu yöntemlerle ilgili geliştirilmiş çok sayıda ticari kit bulunmaktadır (Tan ve Yiap, 2009).

Klasik RNA İzolasyon Yöntemi

Nükleik asitlerin izolasyonu; hücrenin ve hücresel bileşenlerin parçalanması, nükleaz aktivitesinin engellenmesi ve istenilen nükleik asit moleküllerinin hücresel bileşenlerden ayrılarak saflaştırılması aşamalarından oluşmaktadır (Nilsen ve ark., 2013). İzolasyon işlemi, RNA'nın izole edileceği materyalin organik bir çözücü de yıkımlanması ile başlamaktadır (Li ve ark., 2016). Guanidin izotiyosinat ve sodyum dodesil sülfat (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS) gibi kimyasallar, RNA izolasyonu amacıyla kullanılan materyalin yıkımlanması ve RNaz aktivitesinin engellenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Nilsen, 2013).

Guanidin izotiyosinat kullanılarak RNA izolasyonu, ilk olarak Ullrich ve ark., (1977) tarafından yapılmıştır. Daha sonra bu yöntem Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından modifiye edilerek, tek bir adımdan oluşan bir izolasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin prensibi, RNA'nın guanidin izotiyosinat, fenol ve kloroformdan oluşan asidik solüsyon içerisinde, DNA'dan ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Chomczynski ve Sacchi 2006). Fenol, proteinlerin hızlı bir şekilde yıkımlanmasını sağlamaktadır (Sambrook ve Russel, 2001). Kloroform ise RNA'nın, DNA ve diğer hücresel moleküllerden ayrıştırılması için gerekli faz oluşumunu sağlamaktadır. Kloroform, solüsyonda üç ayrı faz oluşturmaktadır (Li ve ark., 2016). Alt kısımda proteinleri içeren organik faz (organic phase), üst kısımda izole edilecek RNA'yı içeren sıvı faz (aqueous phase) bulunmaktadır (Nilsen ve ark., 2013; Li ve ark., 2016). İki faz arasında ise (interfaz) DNA ve bazı denatüras-

yonu uğramış proteinler bulunmaktadır (Nilsen, 2013). Kloroform aynı zamanda sıvı faz içerisindeki fenolün uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Nielsen, 2010). İzolasyon sırasında kontaminasyonu engellemek için sadece RNA'yı içeren üstteki sıvı fazın alınması ve kullanılan pipetin diğer fazlara temasından kaçınılması gerekmektedir (Nilsen ve ark., 2013). Sıvı faz alındıktan sonra izopropanol ile muamele edilerek izole edilen RNA'nın saflığı artırılabilir (Sambrook ve Russel, 2001).

RNA izolasyonunda fenol ve guanidin izotiyosinat içeren TRIzol solüsyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2016; Green ve Sambrook; 2018). TRIzol, hücreleri ve hücresel bileşenleri hızlı bir şekilde yıkımlayarak total RNA'nın izole edilmesine olanak tanımaktadır. (Nilsen, 2013). RNA izolasyonunda TRIzol kullanımının; kullanılan kimyasalların hazır olması, elde edilen RNA miktarının yüksek olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması gibi avantajları bulunmaktadır (Nilsen, 2013; Green ve Sambrook, 2018). Ancak TRIzol solüsyonunda bulunan fenolik bileşikler, RT-qPCR'in inhibisyonuna neden olabilmektedir (Nilsen, 2013). Bu nedenle, izole edilen RNA'daki tüm fenol bileşiklerinin kesin olarak uzaklaştırılması gerektiği belirtilmektedir (Green ve Sambrook, 2018). RNA izolasyonu sonrasında, RNA pelletini içeren sıvı kısmın berrak olması gerekmektedir. Herhangi bir bulanıklık, RNA'nın kontamine olduğuna işaret etmektedir. Böyle bir durumda izolasyon işleminin tekrarlanması gerektiği bildirilmektedir (Nilsen, 2013).

Katı Faz Nükleik Asit İzolasyon Yöntemleri

Katı faz nükleik asit izolasyonu, çoğu ticari RNA izolasyon kitinin temel prensibini oluşturmaktadır (Tan ve Yiap, 2009). Bu yöntem, klasik izolasyon yöntemi ile kıyaslandığında nükleik asitlerin hızlı ve etkili bir şekilde izolasyonuna olanak tanımaktadır (Esser ve ark., 2005). Ayrıca klasik yöntemde karşılaşılan faz oluşumu ile ilgili problemleri de ortadan kaldırmaktadır (Tan ve Yiap, 2009). Katı faz nükleik asit izolasyonunda, nükleik asitleri (RNA ve DNA) bir silika membran üzerinde toplayan saflaştırma kolonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Rio ve ark., 2010a; Li ve ark., 2016). Kolon içerisindeki membranlar nükleik asitleri tutarken, nükleik asitler dışındaki diğer moleküllerin geçişine izin vermekte ve bu sayede RNA'nın saflaştırılmasını sağlamaktadır (Li ve ark., 2016). Ancak cam partikül, diyatumlu toprak ve manyetik boncuk gibi farklı prensiplerde çalışan katı faz nükleik asit izolasyon sistemleri de bulunmaktadır (Tan ve Yiap, 2009; Rio ve ark., 2010a).

Katı faz izolasyon yöntemi; hücrenin parçalanması, nükleik asitlerin adsorpsiyonu, yıkama ve elüsyon aşamalarından oluşmaktadır (Kojima ve Ozawa, 2002). İlk aşamada biyolojik materyal bir lizis solüsyonu kullanılarak yıkımlanmakta ve saflaştırma kolonlarına aktarılmaktadır. Daha sonra, yüksek pH ve tuz

konsantrasyonunun yardımıyla nükleik asitler kolonlardaki membranlara tutunmaktadır (Gjerse ve ark., 2009). Nükleik asitlerin yanı sıra proteinler de membranlara tutunabilmektedir (Tan ve Yiap, 2009). Bu nedenle, proteinler çeşitli yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmaktadır. Proteinler uzaklaştırıldıktan sonra, elüsyon solüsyonları ile nükleik asit membranlardan ayrılmaktadır (Gjerse ve ark., 2009). Yıkama ve elüsyon aşamalarında yüksek devirlerde santrifüj uygulanarak RNA izole edilmektedir (Tan ve Yiap, 2009).

Katı faz RNA izolasyonu amacıyla farklı firmalar tarafından geliştirilmiş ticari kitler kullanılmaktadır (Tan ve Yiap, 2009; Rio ve ark., 2010a). Bu RNA izolasyon kitlerinin bazıları total RNA izolasyonu amacıyla kullanılırken, bazıları da istenilen spesifik RNA fragmentlerinin [microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), transfer RNA (tRNA), small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), mRNA] izolasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Rio ve ark., 2010a).

RNA İzolasyonu Sonrası RNA Kalitesinin Artırılması İçin Yapılan Uygulamalar

RNA saflığının artırılması için izolasyon sonrası ilave protokollerin uygulanması gerekebilmektedir (Nolan ve Bustin, 2008). RNA hidrofilik bir yapıdadır ve suda kolayca çözünebilmektedir (Rio ve ark., 2010b). Bu nedenle, RNA'nın hidrofilik yapısının azaltılması ve RNA saflığının artırılması için örneklere etanol presipitasyonu yapılması önerilmektedir (Rio ve ark., 2010b; Nilsen, 2013; Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonunda, RNA'nın hidrofilik yapısının azaltılması için pozitif yüklü tuz molekülleri (sodyum asetat, amonyum asetat, lityum klorid) kullanılmaktadır. Pozitif yüklü tuz molekülleri RNA'nın negatif yükünü nötralize etmektedir. Etanol ise tuz molekülleri ile RNA'nın daha rahat bir şekilde etkileşime geçmesini sağlayarak, RNA'nın santrifüj sonrası rahat bir şekilde çöktürülmesine olanak tanımaktadır (Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonunda, tuz moleküllü olarak sodyum asetat yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nilsen, 2013; Walker ve Lorsch, 2013). Sodyum asetat RNA moleküllerinin etkili bir şekilde çöktürülmesine yardımcı olurken, herhangi bir reaksiyonun inhibisyonuna neden olmamaktadır (Walker ve Lorsch, 2013). Etanol presipitasyonu sayesinde, 15 nükleotid ve daha büyük RNA fragmentleri kolayca çöktürülmekte ve RNA saflığı artırılabilir (Rio ve ark., 2010b). Ancak etanol presipitasyonu için RNA örneklerinin konsantrasyonunun en az 10 µg/mL olması gerektiği belirtilmektedir (Rio ve ark., 2010b; Nilsen, 2013).

RNA izolasyonu sonrasında, RNA'nın saflığının artırılması için yapılan bir diğer işlem genomik DNA'nın uzaklaştırılmasıdır (Nolan ve Bustin, 2008; Green ve Sambrook; 2018). Genomik DNA, PCR sırasında hedef mRNA ile birlikte yükseltgenerek yanıltıcı sonuçlara sebep olabilmektedir. Hedef mRNA miktarı-

nın yüksek olması durumunda, genomik DNA'nın yükseltgenmesi önemsiz olarak değerlendirilebilmektedir. Ancak hedef mRNA miktarının düşük olması durumunda genomik DNA'nın yükseltgenmesi, hedef mRNA'nın yükseltgendiği şeklinde değerlendirilebilmektedir (Green ve Sambrook, 2018). Bu nedenle, genomik DNA'nın uzaklaştırılması ve RNA saflığının artırılması için RNA örneklerine DNaz uygulaması yapılması önerilmektedir (Nolan ve Bustin; 2008; Bustin ve ark., 2009).

RT-qPCR Uygulamaları İçin Kullanılan RNA'nın Kalite Kontrolleri ve Önemi

RNA kalitesi, izole edilen RNA'nın bütünlüğüne (RNA integrity) ve saflığına (RNA purify) bakılarak değerlendirilmektedir (Becker ve ark., 2010). RNA'nın saflığı ve bütünlüğü farklı kavramlardır. Bu nedenle, RNA saflığı ve bütünlüğü ile ilgili ölçümlerin birbirinden bağımsız bir biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir (Die ve Román, 2012). Güvenilir RT-qPCR çalışmaları için RNA bütünlüğünün ve saflığının iyi olması gerekmektedir (Fleige ve Pfaffl, 2006; McGroven ve ark., 2018). Bu nedenle de çalışma öncesi RNA kalitesinin belirlenmesi önem taşımaktadır (Green ve Sambrook, 2018).

RNA Kalite ve Kantite Kontrolleri

RNA'nın kalite kontrolü için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak RNA kalite kontrolleri genel olarak; klasik jel elektroforezi, spektrofotometrik yöntemler, mikrofluidik kapiller elektroforez sistemi ve 3':5' oranı kullanılarak yapılmaktadır (Fleige ve Pfaffl, 2006; Becker ve ark., 2010; Green ve Sambrook, 2018).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan klasik bir yöntemdir. Bu yöntem, ribozomal RNA (rRNA) kalitesinin aynı zamanda mRNA kalitesini yansıttığı prensibine dayanmaktadır (Die ve Román, 2012). Bu yöntemde, rRNA bantlarının yoğunlukları birbirine oranlanarak (28S/18S) değerlendirme yapılmaktadır. Bu oranın 2'ye yakın olması; RNA bütünlüğünün iyi olduğuna dair bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Becker ve ark., 2010; Nilsen, 2013). Ancak bu yöntemde rRNA bantlarının görünümü; elektroforez şartlarına, yüklenen rRNA miktarına ve floresan ışığa amacıyla kullanılan kimyasala göre değişebilmektedir. Bu nedenle, bu yöntem diğer yöntemlere kıyasla daha az güvenilir kabul edilmektedir (Die ve Román, 2012). Ayrıca hassasiyet ve spesifitenin düşük olması (Fleige ve Pfaffl, 2006) ve etidyum bromid gibi toksik kimyasalların kullanılması bu yöntemin diğer dezavantajlarından (Huang ve Fu, 2005). Buna rağmen RNA jel elektroforezi, RNA kalitesinin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerin doğruluğunun teyit edilmesi ve güvenilirliğin artırılması için kullanılmaya devam edilmektedir (Die ve Román, 2012).

Spektrofotometrik Yöntemler

RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem, RNA kalitesinin optik yoğunluğun (optical density; OD) ölçümüdür (Becker ve ark., 2010). Bu yöntemde RNA'nın saflığı, örneklerin farklı dalga boylarındaki ölçümlerine bakılarak yapılmaktadır (Die ve Román, 2012). Nükleik asitler 260 nm ve proteinler 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahipken, kontamine edici faktörler 230 nm ve 320 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahiptir (Becker ve ark., 2010). RNA saflığının değerlendirilmesinde çoğunlukla, örneklerin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerinin 280 nm dalga boyundaki absorbans değerine oranı ($OD_{260/280}$) dikkate alınmaktadır. Bu oranın 1.8-2.0 arası olması durumunda, fenol ve protein kontaminasyonunun olmadığı ve RNA saflığının iyi olduğu kabul edilmektedir (Taylor ve ark., 2010). Ancak bu yöntemin, RNA'nın bütünlüğünün ve yıkılma durumunun (degradation) tespiti noktasında yetersiz kaldığı belirtilmektedir (Nolan ve Bustin, 2008).

Mikrofluidik Kapiller Elektroforez

Bu sistem, total RNA bütünlüğünün ölçülmesinde kullanılan kapiller elektroforez temelli otomatize bir sistemdir (Becker ve ark., 2010). RNA kalite kontrolü amacıyla, farklı firmalar tarafından geliştirilmiş ticari ürünler (Agilent Technologies; 2100 Bioanalyzer ve Bio-Rad Laboratories; Experion) bulunmaktadır (Becker ve ark., 2010; Die ve Román, 2012). Bu sistemde, bir çip üzerine yüklenen örneklerin elektroforezdeki pik değerleri kaydedilerek değerlendirme yapılmaktadır. Sistem aynı zamanda örneklerin jel benzeri bir görüntüsünü oluşturmaktadır. Elde edilen pik değerleri kullanılarak örneklerin 28S/18S oranı hesaplanmaktadır. Örneklerin bütünlüğünü değerlendirmek için ise RNA bütünlük değeri (RNA Integrity Number; RIN) ve RNA kalite göstergesi (RNA Quality Indicator; RQI) değerleri hesaplanmaktadır (Becker ve ark., 2010).

RIN değeri; 28S pikinin yüksekliği, 18S ve 5S pikleri arasındaki alanın oranı (fast area ratio) ve belirteç pikinin yüksekliği dikkate alınarak hesaplanmaktadır. RQI değeri ise; 28S, 18S ve pre-18S alanları değerlendirmeye alınarak hesaplanmaktadır. Elde edilen RIN/RQI değerleri 1-10 arasında sınıflandırılmaktadır (Die ve Román, 2012). En düşük RIN/RQI değeri olan 1; tüm RNA'nın yıkıldığını gösterirken; RIN/RQI değeri 10; RNA örneklerinin bütünlüğünün iyi ve RNA'nın kaliteli olduğunu göstermektedir (Becker ve ark., 2010; Die ve Román, 2012). Bu iki RNA kalite değerlendirme sisteminin de benzer güvenilirlik oranına sahip olduğunu bildirilmektedir (Riedmaier ve ark., 2011). RIN değerlerinin 8'in üzerinde olması sağlam, yüksek kaliteli RNA örneklerini, 5 ile 8 arasında olması orta derecede bozulmuş örnekleri, 5'in altında olması ise yıkılanmış RNA örneklerini işaret etmekte-

dir (Fleige ve Pfaffl, 2006; Pazzagli ve ark., 2013). Buradan hareketle, RIN değerleri 5'in üzerinde olan RNA örneklerinin kullanılması, RT-qPCR ile güvenilir bir şekilde sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır (Fleige ve Pfaffl, 2006; Pazzagli ve ark., 2013).

Genel olarak, ürün boyutu 400 baz çiftinden (bç) daha uzun olan RNA fragmentlerinin yükseltgenmesinde RNA bütünlüğünün önemli olduğu ve böyle bir durumda örneklerin RIN değerlerinin en az 5 olması gerektiği ifade edilmektedir. Ürün boyutunun 70-250 bç arası olması durumunda ise RNA bütünlüğünün daha az önem taşıdığı belirtilmektedir. RNA kalitesinin RT-qPCR üzerine olan etkisinin azaltılması için primerlerin genin daha iç bölgelerinden dizayn edilmesinin bir çözüm yolu olabileceği belirtilmektedir (Fleige ve Pfaffl, 2006).

RNA Kalitesinin Değerlendirilmesinde 3':5' Oranı

RNA kalite değerlendirmesinde kullanılan 3':5' oranı, bir referans genin cDNA sentezi sonucu oluşan ampikonlarının tüm mRNA kalitesini yansıttığı prensibine dayanmaktadır (Nolan ve ark., 2006; Die ve Román, 2012). Buna göre, bir referans genin mRNA'sının 3' ucundaki poli A kuyruğuna bağlanan RT enzimi, 5' uçta herhangi bir yıkımlanma olması durumunda bu bölgeyi atlamaktadır. Bunun sonucunda 5' ucuna yakın olan dizilerin cDNA ürün miktarı, 3' uçtaki poli A kuyruğuna yakın dizilere göre daha az olmaktadır (Nolan ve ark., 2006; Die ve Román, 2012). Bu oranın 1 olması durumunda RNA kalitesinin iyi olduğu, 5 üzeri olması durumunda RNA kalitesinin düşük olduğu kabul edilmektedir (Nolan ve ark., 2006; Nolan ve Bustin, 2008). Bu yöntemin avantajı, RNA kalitesinin rRNA bütünlüğüne göre değil, direkt olarak mRNA kalitesine göre değerlendiriliyor olmasıdır (Vermeulen ve ark., 2011; Die ve Román, 2012). Dezavantajı ise, cDNA sentezinde kullanılan oligo dT primerlerin birden fazla diziyi hedef almasıdır. Böyle bir durumda, hedef mRNA kısmen yıkımlanmış olsa bile, hedef dışı dizilerin yükseltgenmesine bağlı olarak RNA kalitesinin yanlış yorumlanabileceği belirtilmektedir (Die ve Román, 2012).

Gen Ekspresyonu Çalışmalarında RNA Kalitesinin Önemi

RNA Kalitesinin RT-qPCR Performansı Üzerine Etkisi

Yapılan çok sayıda çalışmada, RNA kalitesinin RT-qPCR performansını önemli ölçüde etkileyebileceği ortaya konmuştur (Imbeaud ve ark., 2005; Fleige ve ark., 2006; Vermeulen ve ark., 2011; McGovern ve ark., 2018). Imbeaud ve ark. (2005) insanlarda farklı dokulardan RNA'yı izole etmiş ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RIN değerine sahip örneklerin ekspresyon düzeyinin daha düşük RIN değerine sahip örneklerle göre daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Bu ne-

denle, RNA bütünlüğünün RT-qPCR sonuçlarına önemli bir etkisi olduğunu ve farklı RNA bütünlük değerlerinin gen ekspresyon seviyesinin 2-7 kata kadar etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Fleige ve ark. (2006) sığırlara ait farklı doku örneklerinden RNA'yı izole etmişler ve RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla deneysel olarak belli oranlarda RNA'yı yıkımlamışlardır. Çalışma sonunda RIN değerleri ile Cq (quantification cycle) değerleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirlemişler ve düşük kalitedeki RNA'nın Cq değerini artırdığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirmesinin gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. Hammerle-Fickinger ve ark. (2009) sığır kan örneklerinden farklı izolasyon yöntemlerini kullanarak total RNA izole etmişler ve RNA kalitesinin RT-qPCR üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RIN değerine sahip örneklerde RT-qPCR etkinliğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Becker ve ark. (2010) farklı sığır dokularında (karaciğer, kas ve akyuvarlar) yaptıkları çalışmada, RNA yıkımlanmasının RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yıkımlanma oranının artmasıyla, örneklerin RIN değerlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. RIN değeri ve Cq arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirlemişler ve düşük RNA kalitesinin RT-qPCR performansını olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Vermeulen ve ark. (2011) nöroblastoma hücre hattı ve biyopsilerinden izole edilen RNA örneklerinin kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yüksek RNA kalitesinin RT-qPCR performansını artırdığını ve bu nedenle RNA kalite kontrolünün, daha güvenilir sonuçlar için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Karlsson ve ark. (2016) ratlarda yaptıkları çalışmada donmuş ve stabilizatör kullanılmış doku örneklerindeki (oda sıcaklığında) RNA kalitesini ve bu RNA kalitesinin RT-qPCR performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Donmuş doku örneklerinde RIN değerinin stabilizatör kullanılmış örneklerden 1 birim daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca spektrofotometrik ölçümlerde de RNA kalitesinin stabilizatör kullanılan örneklerde daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebinin stabilizatör kullanılan örneklerde devam eden RNaz aktivitesinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak her iki yöntemde de RT-qPCR performansı arasında önemli bir farklılık bulunmadığını rapor etmişlerdir. McGovern ve ark. (2018) kuzularda yaptıkları çalışmada, ölüm sonrası sürenin (karaciğer, dalak, iskelet kası, ileum, tiroid) farklı post-mortem dokularda RNA kalitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sürenin artmasıyla birlikte dokuların çoğunda RNA örneklerinin RIN değerlerinin düştüğünü (karaciğer hariç), buna bağlı olarak tiroid, iskelet kası ve ileum örneklerinde RT-qPCR performansının azaldığını bildirmişlerdir.

RNA bütünlüğünün, gen ekspresyon çalışmalarından elde edilecek sonuçların güvenilirliği açısından önem-

li olduğu vurgulansa da, kısmi olarak yıkılan RNA örnekleri ile de güvenilir sonuçların elde edilebileceği belirtilmektedir (Özalp ve ark., 2010; Die ve Román, 2012; Romero ve ark., 2014). Özalp ve ark. (2010) sıcaklığın RNA saflığı ve bütünlüğünü olumsuz etkilediğini ancak buna karşın bütünlüğü iyi olmayan RNA örnekleri ile de RT-qPCR uygulamasının başarılı bir şekilde yürütülebileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Romero ve ark. (2014) da düşük kalitedeki RNA ile gen ekspresyon çalışmalarının yürütülebileceğini ifade etmişlerdir.

RNA Kalitesinin Referans Gen Stabilitesi Üzerine Etkisi

Referans genler veya diğer bir adıyla housekeeping genler; RT-qPCR sonuçlarının normalizasyonu amacıyla kullanılan genlerdir (Bustin ve ark., 2009). RT-qPCR çalışmalarında, RNA bütünlüğündeki varyasyonların normalizasyon ile birlikte elimine edileceği düşünülmektedir (Die ve Román, 2012). Ancak Pérez-Novo ve ark. (2005) RT-qPCR çalışmalarında kullanılan 10 farklı referans genin, kısmen yıkılan ve RNA kalitesi iyi olan örneklerdeki stabilitesini karşılaştırmışlar ve bu referans genlerin ekspresyon seviyelerinin, kısmen yıkılan RNA örneklerinde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle, düşük RNA kalitesinin RT-qPCR normalizasyonu açısından bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Vermeulen ve ark. (2011) da benzer şekilde RNA kalitesinin referans gen stabilitesini etkilediğini ve düşük RNA kalitesinin referans gen stabilitesinde azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir. McGovern ve ark. (2018) post-mortem kuzu dokularında RIN değerinin düşmesine bağlı olarak referans gen stabilitesinin azaldığını belirlemişlerdir. RIN değerlerindeki ufak düşüşlerin bile normalizasyon için risk oluşturduğunu, bu nedenle daha güvenilir RT-qPCR sonuçları için RIN değerlerinin de dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Genel olarak RNA kalitesi düşük örneklerde normalizasyon işlemi yapmanın güvenilir sonuçlar vermeyeceği ve bu örneklerin değerlendirilmeden çıkarılması gerektiği ifade edilmektedir (Pérez-Novo ve ark., 2005; McGroven ve ark., 2018).

RNA Kalitesinin Tüm Genom Gen Ekspresyon Profili Üzerine Etkileri

RNA kalitesi yalnızca RT-qPCR sonuçlarını değil, mikroçipler ile yapılan tüm genom gen ekspresyon profillemeye sonuçlarını da etkileyebilmektedir. Schoor ve ark. (2003) RNA yıkılanmasının tüm genom gen ekspresyon profili üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kısmi RNA yıkılanmasının gen ekspresyon profilini az bir oranda da olsa olumsuz etkilediğini belirlemişlerdir. RT-qPCR ile de gen ekspresyon profili sonuçlarını doğrulamışlardır. Buna karşın, kısmi olarak yıkılan RNA örnekleri ile gen ekspresyon çalışmalarının yapılabileceğini ve güvenilir sonuçların elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Opitz ve ark. (2010)

düşük RNA kalitesinin gen ekspresyon profili üzerine etkilerini araştırmışlardır. Deneysel olarak kanser biyopsi örneklerini 60 °C'de farklı sürelerde tutarak, RNA'yı farklı derecelerde yıkılamışlardır. RNA yıkılanmasının artmasıyla RIN değerlerinde azalma olduğunu ve RNA yıkılanmasının çip üzerinde test edilen 41000 probdan 275'ini etkilediğini belirlemişlerdir. Yıkılan RNA örneklerinin gen ekspresyon profili değerlendirmesinin yanlış yorumlamaya sebep olacağını ve bu nedenle gen ekspresyon analizinde düşük kalitedeki RNA örneklerinin ekspresyon profillerinin değerlendirilmeden çıkarılması gerektiğini bildirmişlerdir. Romero ve ark. (2014) ise, savunma sistemi hücrelerinden elde ettikleri RNA örneklerini farklı oranda yıkımlayarak RNA kalitesinin tüm genom gen ekspresyonu profili üzerine etkilerini incelemişlerdir. Oda sıcaklığında RNA örneklerini; 0-12, 12-24, 24-48 ve 48-84 saat arasında değişen farklı sürelerde yıkılamışlardır. Yıkılanma süresinin artmasıyla örneklerin RIN değerlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. RIN değeri azalmasına bağlı olarak ekspresyonu etkilenen gen sayısında artış olduğunu ve düşük RIN değerine sahip örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Buna rağmen, farklı bir normalizasyon stratejisi oluşturarak, düşük RIN değerine sahip örneklerin gen ekspresyon profillerinin değerlendirilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Sonuç

RT-qPCR sonuçlarını etkileyen RNA kalitesinin önemli bir faktör olması sebebiyle, çalışmanın her aşamasında MIQE standartlarına uyulması ve çalışma öncesinde güncel kalite kontrol yöntemleriyle RNA kalite değerlendirilmesinin yapılması önem taşımaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma, RT-qPCR çalışmalarında RNA kalite değerlendirmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, gen ekspresyon analizi çalışmalarının yüksek kalitede RNA ile yürütülmesi gerekmektedir. Bu anlamda gen ekspresyonu çalışmalarında RT-qPCR performansının artması ve daha güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

- Agaoglu OK, Agaoglu AR, Guzeloglu A, Aslan S, Kurar E, Kayis SA, Schäfer-Somi S. Gene expression profiles of some cytokines, growth factors, receptors and enzymes (GM-CSF, IFN γ , MMP-2, IGF-II, EGF, TGF- β , IGF-IIR) during pregnancy in the cat uterus. *Theriogenology* 2016; 85(4): 638-44.
- Agaoglu OK, Agaoglu AR, Guzeloglu A, Kurar E, Kayis SA, Ozmen O, Aslan S. Expression of hypoxia inducible factors and vascular endothelial growth factor during pregnancy in the feline uterus. *Theriogenology* 2015; 84(1): 24-33.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl

- MW. mRNA and MicroRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010; 50(4): 237-43.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1(2): 581-5.
- Das PJ, Pari N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, Chaki SP, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* 2010; 74 (6): 1099-106.
- Die JV, Román B. RNA Quality assessment: A view induces from plant qPCR Studies. *J Exp Bot* 2012; 63(17): 6069-77.
- Esser KH, Marx WH, Lisowsky T. Nucleic acid free matrix: regeneration of DNA binding columns. *Biotechniques* 2005; 39(2): 270-1.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 126-39.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 1601-13.
- Gjerse DT, Hoang L, Hornby D. RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography. First Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2009; p. 4.
- Green MR, Sambrook J. Quantification of RNA by Real-Time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 10: 847-56.
- Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Becker C, Meyer HHD, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses. *Biotechnol Lett* 2009; 32: 35-44.
- Huang Q, Fu WL. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(8): 841-2.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaboriski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(6): 1-12.
- Ingham DJ. The study of transgene copy number and organization. *Methods Mol Biol* 2005; 286: 273-90.
- Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine* 2004; 27: 135-41.
- Karlsson O, Segerström L, Sjöback R, Nylander I, Boren Mats. QPCR Based mRNA quality score show intact mRNA after heat stabilization. *Biomol Detect Quantif* 2016; 7: 21-6.
- Kojima K, Ozawa S. Method for isolating and purifying nucleic acids. United State patent 2002; Patent no: US 6,905,825 B2.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in Real-Time PCR. *J Appl Genetics* 2013; 54: 391-406.
- Li Y, Wang K, Chen L, Zhu X, Zhou J. Quantification of mRNA levels using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). *Methods Mol Biol* 2016; 1406: 73-9.
- McGovern F, Tommy B, Marion R, Torres S. Assessment of RNA stability in postmortem tissue from New-Born lambs. *Anim Biotechnol* 2018; 29(4): 269-75.
- Nielsen H. Working with RNA. Nielsen H eds. *Methods in Molecular Biology*. 2010; pp. 15-28.
- Nilsen TW. The fundamentals of RNA purification. *Cold Spring Harb Protoc* 2013; 7: 618-24.
- Nolan T, Bustin SA. Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. Keer JT, Birch L. eds. In: *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*, 2008; pp.189-207.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using Real-Time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1559-82.
- Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beissbarth T, Gaedcke J. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genet* 2010; 3 (36): 1-14.
- Özalp GR, Şimşek G, Akçağlar S, Shenavai S. Trizol

RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek plasentomu için oldukça etkili metod değerlendirilmesi. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2010; 29(1): 1-6.

- Pazzagli M, Malentacchi F, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Günther K, Hartmann CC, Verderio P, Pizzamiglio S, Ciniselli CM, Tichopad A, Kubista M, Gelmini S. SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods* 2013; 59(1): 20-31.
- Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, Van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *BioTechniques* 2005; 39: 52-56
- Riedmaier I, Bergmaier M, Pfaffl MW. Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnol Biotec Eq* 2011; 24: 2154-9.
- Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Ethanol precipitation of RNA and the use of carriers. *Cold Spring Harb Protoc* 2010b; 6: 1-5.
- Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Guidelines for the use of RNA purification kits. *Cold Spring Harb Protoc* 2010a; 7: 1-4.
- Romero IG, Pai AA, Tung J, Gilad Y. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol* 2014; 12(42): 1-13.
- Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; p. 613.
- Schoor O, Weinschenk T, Hennenlotter J, Corvin S, Stenzl A, Rammensee H-G, Stevanović S. Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques* 2003; 35: 1192-201.
- Sethi N, Palefsky J. Transcriptional profiling of dysplastic lesions in K14-HPV16 transgenic mice using laser microdissection. *FASEB J* 2004; 18(1): 1243-5.
- Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 1-10.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A Practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010; 50(4): 1-5.
- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, Goodman HM. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 1977; 196(4296): 1313-9.
- Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29(3): 151-9.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44(5): 619-26.
- 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 Res* 2011; 39(9): e63.
- Walker SE, Lorsch J. RNA Purification - Precipitation Methods. *Methods Enzymol* 2013; 530: 337-43