



Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi

Özge SİDEKLİ, Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU

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

Sorumlu yazar: Özge SİDEKLİ; E-posta: vethek.ozge@gmail.com; ORCID: 0000-0002-4891-1968

Atıf yapmak için: Sidekli Ö, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile mikroRNA (miRNA) ekspresyon profillemesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 18(1): 48-56

Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile MikroRNA (miRNA) Ekspresyon Profillemesi

Özet: Gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenleyicisi olarak bilinen miRNA'lar ökaryotik canlılarda çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynamaktadır. miRNA'ların rollerinin ortaya konulması ile birlikte miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalar ile birlikte miRNA'ların bütün hücre ve doku tiplerinde eksprese olduğu ortaya konmuştur. miRNA ekspresyon profilinin ortaya konması için çeşitli yöntemler önerilmesine rağmen, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle RT-qPCR altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu derlemede; RT-qPCR ile miRNA ekspresyon profillemesi sürecindeki adımlar detaylı olarak özetlenmiş ve konu ile ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ekspresyon, miRNA, normalizasyon, RT-qPCR

MicroRNA (miRNA) Expression Profiling by Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Summary: miRNAs, known as post-transcriptional regulators of gene expression, play a crucial role in various physiological and pathological processes in eukaryotic organisms. As the roles of miRNAs have been revealed, the number of studies on miRNAs is increasing day by day. Studies have shown that miRNAs are expressed in all cell and tissue types. Although various methods have been proposed to demonstrate miRNA expression profile, RT-qPCR is considered as a gold standard technique due to its high sensitivity and specificity. In this review; the steps in the miRNA expression profiling process by RT-qPCR were summarized in detail and relevant literature knowledge was given.

Key words: Expression, miRNA, normalization, RT-qPCR

Giriş

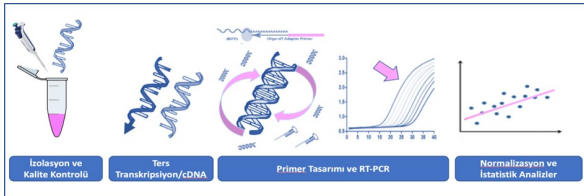
miRNA'lar; mesajcı RNA (messenger RNA; mRNA) transkriptlerine bağlanarak doğrudan gen ekspresyonunu düzenleyen 17-25 nükleotid (nucleotide; nt) uzunluğunda, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir (Guo ve Chen, 2014). miRNA'lar; hem gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel aşamada düzenlenmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunun baskılanmasında veya tamamen ortadan kaldırılmasında, hem de hücreler arası etkileşimde mRNA'lar gibi görev almaktadır. Bu fonksiyonel rolleri ile birlikte miRNA'lar hücre gen ekspresyonunun %60'ından fazlasının kontrolünden sorumludur (Kozomara ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar ile birlikte farklı genomik organizasyona sahip organizmalarda 2019 yılında miRbase veri tabanında 38.589 miRNA lokusu ve 48.860 olgun miRNA belirlenmiştir (Kozomara ve ark., 2019; Sidekli ve Korkmaz Ağaoğlu, 2019). Tanımlanan miRNA'ların bir kısmının dokuya spesifik olarak hücre içinde, büyük bir kısmının ise hücre dışı ortamda bulunduğu ortaya konmuştur (Mendell ve Olson, 2012; Weber ve

ark., 2010). Hücre içi miRNA'ların stres, hastalık ve çevresel uyarıcılara yanıt olarak kritik araçlar oldukları ve çeşitli dış faktörlerden kolayca etkilendikleri bildirilmektedir (Mendell ve Olson, 2012). Hücre dışı miRNA'ların ise kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, tükürük, semen ve anne sütü gibi çeşitli biyolojik sıvılarda ekspresyonlarının oldukça stabil olduğu saptanmıştır. Ayrıca hücre dışı miRNA'ların kararlı bir formda bulunarak, endojen RNAaz'lerden kendilerini korudukları için hücre dışı iletişimde rol oynadıkları rapor edilmiştir (Weber ve ark., 2010). Yapılan çalışmalar; hücre dışı miRNA'ların, yüksek veya düşük pH seviyelerinde, uzun süreli depolama ve birden fazla donma-çözme işlemleri gibi sert koşullara maruz kalmaları durumunda dahi ekspresyon seviyelerinin değişmeden kaldığını bildirmektedir (Bravo ve ark., 2007; Mraz ve ark., 2009). Ayrıca; hücre dışı miRNA'ların ekzozom gibi mikroveziküllerin yanı sıra Argonate 2 (Argonate2; AGO2) ribonükleoprotein kompleksi ile RNaz aktivitesinden kendilerini korudukları ve dolaşım sistemine geçebildikleri bildirilmektedir (Arroyo ve ark., 2011). Dolaşımda bulunan miRNA'ların ise; diğer hücre/doku tiplerine parakrin veya telektrin yol ile geçerek, hedefledikleri gen bölgelerini düzenledikleri belirlenmiştir (Cheng ve ark., 2013; Mendell ve Olson, 2012).

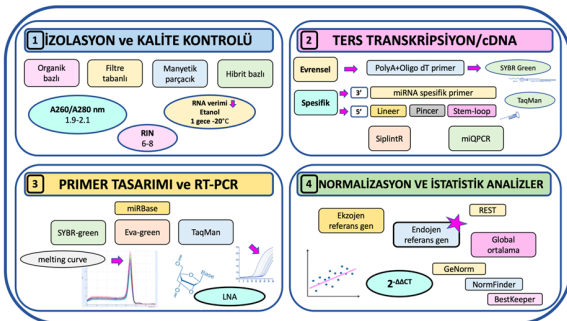
Geliş Tarihi/Submission Date : 08.10.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 03.03.2020

miRNA'ların hücreye/doku tiplerine olan özgüllüğünden dolayı çeşitli hastalıkların patogeneğinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmiş, bu nedenle de buna yönelik çalışmalara olan ilgi ve merak artmıştır (Benes ve Castoldi, 2010). Ancak; miRNA'ların GC içeriğine göre heterojen bir yapıya sahip olmaları, olgun miRNA'nın kısa olması (~22 nt), miRNA'ların ortak bir diziyeye sahip olmaması ve aynı aile içerisindeki miRNA'ların tek bir nükleotidin (örneğin; Let-7 ailesi) değişimi ile farklı yapısal özelliğe bürünmelerinden dolayı ekspresyon analizlerinin yapılmasında bazı zorluklara ortaya çıkmaktadır (Benes ve Castoldi, 2010; Guo ve Chen, 2014; Nolan ve ark., 2013). Bu yapısal zorluklara rağmen mikroarray, northern blot, yeni nesil sekanslama ve RT-qPCR ile miRNA ekspresyon profilleri başarılı bir şekilde analiz edilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019; Dellett ve Simpson, 2016). Bu yöntemlerin çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmasına karşın, gen ekspresyon çalışmalarında RT-qPCR yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedir (Dellett ve Simpson, 2016). RT-qPCR analizi ile doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi, ayrı ayrı optimizasyon gerektiren bir dizi kritik adıma bağlıdır (Bollati ve Dioni, 2019). Bu adımlar; RNA izolasyonu ve kalite kontrolü, ters transkripsiyon/komplementer DNA (complementary DNA; cDNA) sentezi, primer tasarımı ve RT-qPCR ile normalizasyon ve istatistiksel analizlerdir (Şekil 1).



Şekil 1: RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizindeki adımlar



Şekil 2: RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizindeki gerekli adımlar

miRNA ekspresyon profilinin ortaya konması için; RT-qPCR adımlarının dikkatli bir şekilde gözden geçirilmesi gerekmektedir (Dellett ve Simpson, 2016). RT-

qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon analizi için gerekli adımlar Şekil 2'de verilmiştir.

Bu derlemede; RT-qPCR uygulaması ile miRNA ekspresyon profillemesi sürecindeki adımlar detaylı olarak özetlenmiş ve konu ile ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir.

RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

miRNA izolasyonu için önerilen çeşitli yaklaşım metodları bulunmaktadır. Bu yaklaşım metodları genel olarak küçük RNA molekülleri (small RNA; sRNA)'nin zenginleştirilmesi için eklenen kritik adımlar dışında total RNA izolasyonu için kullanılan metotlara oldukça benzemektedir. Ortaya konan bu miRNA izolasyon metodları temelde dört ana izolasyon yöntemi altında sınıflandırılmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019). Bunlar; organik bazlı, filtre tabanlı, manyetik parçacık bazlı ve hibrit bazlı izolasyon yöntemleridir.

Organik bazlı izolasyon yöntemi

Organik bazlı izolasyon yöntemi; total RNA izolasyonu için yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem; numune matriksinin fenol içeren bir çözelti içinde homojenleştirilmesi temeline dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar ile birlikte organik bazlı yöntemlerin kullanımı ile maksimum verim sağlanabildiği ortaya konmuştur (Bravo ve ark., 2007; Mraz ve ark., 2009).

Filtre tabanlı izolasyon yöntemleri

Filtre tabanlı "spin basket" izolasyon yönteminde; küçük bir plastik tüpün dibinde bulunan membran veya membranlar (genellikle cam lifi, silis türeyi veya iyon değiştirme membranı) kullanılmaktadır. Filtre bazlı yöntemler oldukça kolay uygulanmasına rağmen organik bazlı yöntemlerden daha pahalı yöntemlerdir. Ancak, bu izolasyon yöntemlerinin yüksek verim beklenen çalışmalar için uygun olduğu bildirilmektedir (Blondal ve ark., 2013; Bollati ve Dioni, 2019).

Manyetik parçacık bazlı izolasyon yöntemleri

Manyetik parçacık bazlı izolasyon yöntemleri, paramanyetik bir çekirdeğe ve RNA'ya bağlanmak üzere modifiye edilmiş 0.5-1 µm çapındaki küçük parçacıkların kullanımı prensibine dayanmaktadır. Bu izolasyon yönteminde; numuneler RNaz inhibitörlerini içeren bir çözeltide parçalanmakta ve küçük parçacıklar RNA molekülleriyle etkileşime girmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

Hibrit bazlı izolasyon yöntemleri

Organik bazlı izolasyon metodu ile "spin basket" metodunun birleşimi olan bu yöntem küçük RNA (<200 nükleotitler) moleküllerinin zenginleştirilmesi ve/veya büyük RNA (>200 nükleotitler) bileşeninin çökeltilmesi prensibine dayanmaktadır (Mraz ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalar; organik bazlı izolasyon metodu içerisinde yer alan guanidinyum tiyosiyanat (Trizol / TRI-Reaktif) gibi konsantrasyon kaotropik tuzlar ile az miktardaki bir örnekten fazla sayıda ve kalitede miRNA elde edilebildiğini göstermektedir (Bravo ve ark., 2007; Nolan ve ark., 2006). Trizol/TRI-Reaktif ile miRNA izolasyonu temel olarak total RNA izolasyonu ile benzer aşamaları içermektedir. Ancak bu yöntem ile yapılan miRNA izolasyon metodunda total RNA izolasyon protokolüne ek olarak çöktürme ve sRNA moleküllerinin zenginleştirilmesi aşaması da eklenmektedir (Mraz ve ark., 2009). Trizol yöntemi ile birlikte ticari olarak satılan çeşitli total RNA izolasyon kitleri bulunmaktadır (Nolan ve ark., 2013). Ancak 200 nt'den küçük RNA'ların etkin bir şekilde geri kazanımındaki zorluklardan dolayı total RNA izolasyonu için ticari olarak satılan filtre tabanlı izolasyon kitleri miRNA izolasyonu için uygun değildir (Mraz ve ark., 2009). miRNA gibi 200nt'den küçük sRNA'ların doğrudan izolasyonu için özelleştirilmiş çeşitli kitler bulunmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019; Nolan ve ark., 2013). miRNA izolasyonu için bu ticari kitlerin kullanımı zaman ve iş gücü yönünden araştırmacıya önemli avantaj kazandırmasına rağmen guanidinyum tiyosiyanat gibi organik bazlı miRNA izolasyon metodları ile daha kaliteli RNA elde edilebildiği (Mraz ve ark., 2009) ve ayrıca bu reaktiflerin kullanımının numunelerde genomik DNA kirliliğini engellediği ortaya konulmuştur (Dellet ve Simpson, 2016). Ancak; Guo ve Chen. (2014) miRVana ve Trizol ile yapmış oldukları total RNA izolasyon metodunda; miRVana ile daha kaliteli olgun ve öncü miRNA elde edildiğini saptamışlardır.

miRNA izolasyonu için hangi yöntemin kullanılacağı çalışma bütçesine ve araştırmacının çalışmadan beklentisine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca tercih edilen metod veya metodlar ile elde edilen RNA'ların verimlerinin beklenenden düşük olduğu durumlarda izopropanol alkol veya etanol ile 1 gece boyunca -20° C'de çöktürme basamağının uygulanması önerilmektedir (Mraz ve ark., 2009). Elde edilen total RNA moleküllerinin, bir sonraki adım için yüksek konsantrasyonlarda (>100 ng / mL) saklanması, ayrıca kalite ve kantite kontrollerinin de yapılması önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

Elde edilen total RNA'nın kalitesinin ve miktarının değerlendirilmesi; miRNA ekspresyon analizlerinin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu için oldukça önemlidir (Nolan ve ark., 2013). Bunun için Nano-Drop ve diğer spektrofotometre cihazları kullanılarak 260 ve 280nm (A260/A280 nm) ve 260 ve 230nm (A260/A230 nm) absorbans değerlerinde total RNA moleküllerinin kalite ölçümleri yapılabilmektedir. Ayrıca Bioanalyzer gibi otomatik kılcal elektroforez cihazları kullanılarak toplam RNA bütünlüğünün verimi ve kalitesi değerlendirilebilmektedir (Becker ve ark., 2010). RNA kalite ölçümlerindeki A260/A280 dalga boylarındaki oran, RNA saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bu doğrultu-

da; RNA için A260/A280 absorbans değerinin 1.9-2.1 oranına sahip olması önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

Otomatik kılcal elektroforez temeline dayanan Bioanalyzer gibi cihazlar sRNA (15-40 nt) moleküllerinin analizlerinde tercih edilen bir diğer yöntemdir. Ancak bu cihaz kullanılarak miRNA'ların kalite ve kantite ölçümünün yapılabilmesi için özel sRNA çipinin bulunması gerekmektedir (Becker ve ark., 2010). Ayrıca bu cihazlarda RNA bütünlüğünün doğru yorumlanması ve anlaşılabilmesi için RNA bütünlük değeri (RNA integrity number; RIN) ortaya konmuştur. RIN yazılım algoritması, 1'den 10'a kadar olan bir numaralandırma sistemi ile total RNA'nın sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Bu anlamda; 1 en fazla degradasyona uğramış, 10 ise en kaliteli olan RNA'dır. Çalışma için tercih edilen en uygun RIN değerinin 6 ile 8 arasında olduğu bildirilmektedir (Nolan ve ark., 2006).

Ters Transkripsiyon/cDNA Sentezi

RT-qPCR ile gen ekspresyon çalışmalarında ilk aşama; elde edilen RNA'ların tasarlanan primerler yardımı ile cDNA'ya dönüştürülmesidir. Ancak; miRNA'ların dizi uzunluğunun tipik bir DNA primeri ile hemen hemen benzer olmasından dolayı miRNA'ların ters transkripsiyon basamağı klasik yöntemlerden farklıdır (Bollati ve Dioni, 2019; Nolan ve ark., 2013). Bu doğrultuda bu adım için "evrensel" ve "spesifik" RT primerinin kullanımına dayanan iki farklı yaklaşım metodu bulunmaktadır (Huang ve ark., 2015; Nolan ve ark., 2013; Benes ve Castoldi, 2010). İlk yaklaşım olan evrensel RT primerinin kullanımına dayanan metod; miRNA'nın 3' ucuna bir poli(A) polimeraz (poly(A) polymerase; PAP) kuyruğunun eklenmesi ve ardından oligo (dT) primerinin poliA kuyruğuna hibridize olması temeline dayanmaktadır. PoliA-oligo (dT) metodu genellikle SYBR® green bazlı analizlerde tercih edilmektedir (Nolan ve ark., 2013). Spesifik RT primerinin kullanımına dayanan diğer önemli yaklaşım metodunda ise; 3' ucuna miRNA ya spesifik tamamlayıcı, 5' ucuna "doğrusal (Linear)" primer (Benes ve Castoldi, 2010), "pincer" problemleri (Huang ve ark., 2015) ve "kök halka (stem-loop)" RT primerleri (TaqMan) (Nolan ve ark., 2013) gibi primerler kullanılmaktadır. qPCR çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen spesifik RT primerleri hedef miRNA'nın 3' ucuna spesifik olarak tasarlanmaktadır. Bu oligonükleotidler genel olarak TaqMan yöntemine dayanan qPCR analizlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bu oligonükleotidlerin olgun miRNA'nın tanı özgülüğünü artırdığı bildirilmektedir (Dellet ve Simpson, 2016; Nolan ve ark., 2013). Ancak tasarlanan primer ve/veya problemlerin hedeflenen miRNA'ya özgü olmasından dolayı reaksiyon yalnızca spesifik primere sahip olan miRNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesine izin vermektedir (Dellet ve Simpson, 2016).

Bu yaklaşım metodları dışında; Castoldi ve ark. (2011) tarafından miQPCR adı verilen yeni bir metod

ortaya konmuştur. miQPCR metodu; olgun miRNA'nın 3' hidroksil grubuna, T4 RNA ligaz 1 (tek iplikli RNA ligaz) aracılığı ile 26 nt uzunluğunda ki bir RNA/DNA adaptörü (miLINKER)'nün bağlanması temeline dayanmaktadır. Olgun miRNA dizisinin uzatılmasıyla birlikte miLINKER'in 3' ucundan özgülüğü ve duyarlılığı yüksek cDNA sentezi gerçekleştirilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010).

Evsensel ve spesifik RT metotları dışında Jin ve ark. (2016) tarafından miQPCR'a göre daha hızlı ve yüksek kalitede cDNA eldesini sağlayan ve RT reaksiyonu gerektirmeyen diğer bir prob ligasyon yöntemi (SplintR® Ligaz) ortaya konmuştur. İki aşamadan oluşan bu yöntemde hedef miRNA'ya hibridize olan 4-6 nt'lik iki DNA probu kullanılmaktadır. Bu DNA problemlerinin yüksek sıcaklıkta hibridizasyon özelliğinin artırılması ve geniş çaplı miRNA analizlerinde kullanımının uygun olduğu bildirilmektedir (Jin ve ark., 2016).

Primer Tasarımı ve RT-qPCR

RT-qPCR analizlerinin özgülüğü ve duyarlılığı uygun primer tasarımına bağlıdır (Nolan ve ark., 2006). Primerin hedef diziye olan özgünlüklerinin artırılması, analiz sürecinde sekonder yapıların oluşumunu azaltmaktadır (Dellet ve Simpson, 2016). Bu nedenle; hedeflenen miRNA oligonükleotid dizileri ve bu dizilerin doğruluğu miRBase veritabanından (Kozomara ve ark., 2019) belirlenebilmektedir. miRBase dışında; TargetScan (Agarwal ve ark., 2015) veya miRTarBase (Chou ve ark., 2018) gibi veri tabanları da kullanılabilir.

miRNA'ya spesifik primerlerin tasarımı hedef sekansın GC içeriği, cDNA sentezi ve amplikon tespiti için kullanılan yöntemle bağlı olarak değişmektedir (Benes ve Castoldi, 2010). Aday primerler ile ilişkili olarak sekonder yapıların ve primer dimerlerinin oluşumunu en aza indirmek için nükleotitlerin ve optimum primer çiftlerinin boyları kısaltılabilir veya uzatılabilir (Dellet ve Simpson, 2016). Hedef miRNA'ya spesifik primerler sRNAPrimerDB (Xie ve ark., 2019) veya miRprimer (Kang ve ark., 2018) gibi çeşitli algoritma programları kullanılarak tasarlanabilmektedir.

RT-qPCR analizlerinde çeşitli algoritma programları ile dizayn edilen primerler ile hedef diziler arasında öngörülen erime sıcaklığının (melting Temperature; Tm) fazla olduğu durumlarda çeşitli hassasiyet sorunları ile karşılaşabilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010). Hassasiyet sorununun ortadan kaldırılmasında sentetik kilitli nükleik asit analogu (locked nucleic acid; LNA) gibi problemlerin kullanımı önerilmektedir (Nolan ve ark., 2013). Prob bazlı analizlerde kullanımı tercih edilen LNA problemleri; oligonükleotitlerin hibridizasyon özelliğini ve primerlerin Tm'lerini 2-8 °C'ye kadar arttıran kimyasal olarak modifiye edilmiş RNA nükleotitleridir (Dellet ve Simpson, 2016). LNA nükleotidin riboz halkası, hedef dizinin 2'-oksijen ve 4'

karbon atomlarına bağlanan bir köprü ile modifiye edilmektedir. Bu köprü; 3'-endo konformasyondaki riboz halkası ile kilit yapı oluşturur (Nolan ve ark., 2013). Ticari olarak satılan ve PCR reaksiyonuna spesifik olan bu LNA problemleri miRNA'lar arasında ayırmanın yapılmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Ancak; LNA nükleotitlerinin DNA nükleotitlerinden daha pahalı olması bu problemlerin miRNA ekspresyon çalışmalarında kullanımını sınırlandırmaktadır (Benes ve Castoldi, 2010; Nolan ve ark., 2013).

RT-qPCR; gerçek zamanlı olarak floresan ışığa ile birlikte hedef molekülün saptanması temeline dayanmaktadır (Nolan ve ark., 2006). qPCR analizi çeşitli floresan ışığa teknikleri (SYBR green®, EvaGreen® TaqMan prob, moleküler boncuk gibi) ile gerçekleştirilebilmektedir. Ancak, bu teknikler arasında miRNA analizi için SYBR green® (Nolan ve ark., 2006), EvaGreen® (Nolan ve ark., 2013) ve TaqMan prob (Nolan ve ark., 2006) temelli teknolojilerin kullanımı önerilmektedir.

SYBR green® ve Evagreen® floresan boyalar; çift zincirli DNA (double stranded; dsDNA)'ya bağlanarak floresan ışığa meydana getiren ucuz ve kullanımı kolay qPCR analiz yöntemleridir. Ancak bu boyalar amplifikasyon ürünleri dışında primer dimerleri gibi sekonder yapılarada bağlanabilmektedir (Nolan ve ark., 2006). Bu nedenle; bu yöntemlerde mutlaka erime eğrisi (melting curve) analizinin yapılması önerilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010). Amplifikasyon ürünlerinin tespitinde kullanılan bir diğer yöntem; TaqMan prob olarak bilinen hidroliz problemlerinin kullanımıdır (Nolan ve ark., 2013). TaqMan problemler PCR amplifikasyonu ile çoğaltılan PCR ürünlere bağlanma miktarına göre orantılı bir floresan madde artışı meydana getirmektedir. TaqMan prob teknolojisinde de primer-dimerler veya diğer spesifik olmayan amplifikasyon ürünler meydana gelebilmektedir. Ancak SYBR® green metodunun aksine yalnızca spesifik hedeflere bağlandığı için miRNA ekspresyon analizlerinde bu yöntemin kullanımı daha yaygındır (Benes ve Castoldi, 2010).

Androvic ve ark. (2017) miRNA ekspresyon analizinde kullanılmak üzere "two-tailed RT-qPCR" adı verilen yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Ayrıca; bu yöntemin hedeflenen miRNA'ları yüksek özgüllükte ayırt edilebildiğini ve miRNA ekspresyon analizlerinde yaygın olarak kullanılan TaqMan prob temelli RT-qPCR çalışma sonuçları ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

RT-qPCR kullanılarak miRNA ekspresyon profil analizinin doğruluğu büyük ölçüde PCR etkinliğine bağlıdır. RT-qPCR analizinin etkinlik analizi; genellikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bir dizi dilüsyon serisi ile ortaya konmaktadır (Dellet ve Simpson, 2016). Seyreltme serileri ile elde edilen eşik döngü (cycle threshold; Ct) değerinin logaritmik artış miktar-

larına göre standart eğri ve eğrinin eğiminin hesaplanması ile de PCR etkinlik değeri hesaplanabilmektedir (Becker ve ark., 2010). Ayrıca standart bir eğri oluşturmadan LinRegPCR veya FPK-PCR gibi yazılım programları kullanılarak PCR etkinlik değerleri saptanabilmektedir (Tellinghuisen ve Spiess, 2016). PCR analizinin kabul edilebilir etkinlik değeri; optimizasyon işlemine başlamadan önce araştırmacı tarafından tanımlanmalıdır. PCR etkinlik değerinin genel olarak %90'dan fazla olması önerilmektedir. Bununla birlikte; PCR etkinliği değeri; numunelerdeki PCR inhibitörlerinin varlığına, primer prob tasarımına ve araştırmacıya bağlı teknik nedenler ile değişebilmektedir (Dellet ve Simpson, 2016; Nolan ve ark., 2013).

Normalizasyon ve İstatistik Analizler

RT-qPCR verilerinin analiz edilmesi için yaygın olarak mutlak ve göreceli ölçüm yöntemleri kullanılmaktadır (Schwarzenbach ve ark., 2015). Mutlak ölçüm; genel olarak RT-qPCR analizlerinde ortaya çıkan sinyallerin standart bir eğriyle ilişkilendirilmesi prensibine dayanmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu normalizasyon yönteminin miRNA miktarlarının tam olarak ortaya konması için yeterli olmadığı bildirilmektedir (Schwarzenbach ve ark., 2015). Göreceli miktar ölçümünde ise; hedef transkriptin qPCR analizi sonucu elde edilen verilerin referans genler ile karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu doğrultuda; miRNA ekspresyon analizlerinin doğru yorumlanabilmesi için çeşitli normalizasyon stratejileri ortaya konmuştur (Bollati ve Dioni, 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015). RT-qPCR verilerinin normalizasyonunda en yaygın kullanılan yaklaşımlar; analiz edilen bütün miRNA kümesinin global ortalamasının alınması, ekzojen sentetik oligonükleotid veya endojen miRNA'ların kullanılmasıdır (Faraldi ve ark., 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015).

miRNA ekspresyon verilerinin global Ct değerlerinin global ortalama (aritmetik ve geometrik ortalama)'sının alınması yaygın olarak büyük ölçekli miRNA ekspresyon çalışmalarında veri normalizasyonu için kullanılmaktadır (Bollati ve Dioni, 2019). Bu yaklaşım metodunda belirli bir referans gen seçmek yerine, eksprese olan bütün genlerin global ortalaması bir normalizasyon faktörü olarak kullanılmaktadır. Elde edilen normalizasyon faktörünün miRNA ekspresyon sonuçlarının yorumlanmasındaki sorunları ortadan kaldırdığı düşünülmektedir (Faraldi ve ark., 2019).

Veri normalizasyonu için kullanılan ekzojen oligonükleotidler (örneğin; *Caenorhabditis elegans*'dan elde edilen cel-miR-39, cel-miR-54 veya cel-miR-238 gibi) ise; miRNA ekspresyon analizlerinde meydana gelebilecek teknik hatalara bağlı varyasyonların azaltılması için yaygın olarak tercih edilen stratejilerden biridir (Faraldi ve ark., 2019). Ekzojen miRNA'lar; örnek sette bulunan miRNA miktarındaki farklılıkları önle-

mek ve ters transkripsiyon aşamasının reaksiyon verimini arttırmak için genellikle ters transkripsiyon aşamasından hemen önce örneğe sete eklenmektedir. Ticari olarak satılan bu sentetik kontrol ürünleri (spike-in) miRNA ekspresyon sonuçlarını daha güvenilir bir hale getirmesine rağmen mikrovezikül içerisinde taşınan miRNA'ların ve gen ekspresyon analizlerinde canlıya ait faktörlere bağlı miRNA ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin normalize edilmesinde güvenilir değildir. Bu nedenle endojen miRNA'lar ile birlikte kullanımları önerilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019; Schwarzenbach ve ark., 2015).

Normalizasyon için kullanılan bir diğer önemli strateji ise; endojen miRNA'lardır. Genel olarak endojen miRNA'lar; örnek setteki büyük ölçüde ekspresyonu değişmeyen küçük nükleolar RNA (small nucleolar RNA; snoRNA)'lar arasından seçilmektedir (Benes ve Castoldi, 2010; Nolan ve ark., 2013). snoRNA (örneğin; RNU6, RNU6B, RNU44 ve RNU48)'lar hücre ve dokularda sürekli eksprese olmalarına rağmen; bazı hastalık koşullarında ekspresyon seviyelerinde değişikliklerin meydana gelebileceği bildirilmektedir (Schwarzenbach ve ark., 2015). Buna rağmen; endojen miRNA'lar hedef genler ile aynı değişkenlerden etkilendikleri için en uygun referans genler olarak düşünülmektedir. Bu nedenle; bu normalizasyon yönteminde hedef miRNA'ların PCR amplikasyon ürünleri ile ilişkili Ct değerleri, endojen referans gen olarak seçilen miRNA'ların Ct değerleri ile karşılaştırılmaktadır (Schwarzenbach ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda normalizasyon için referans gen olarak kullanılabilecek olan snoRNA'ların seçiminde NormFinder (Andersen ve ark., 2004) ve GeNorm (Vandesompele ve ark., 2002) gibi yazılım algoritmalarının kullanılabileceği bildirilmektedir.

RT-qPCR analizlerinin tamamlanması ile birlikte her bir miRNA'nın miktarının karşılaştırılmasında $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu yaygın olarak tercih edilmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu istatistiksel model ile analiz sonuçlarının ortaya konması için mirBridge (Tsang ve ark., 2010) veya miFRame (Backes ve ark., 2015) gibi programlar kullanılabilmektedir. Bu yazılım programları dışında çeşitli istatistiksel veya biyoinformatik analizlerde miRNA'nın GC içeriğinin tahmini, dizi uzunluğunun ve hedef gen analizinin belirlenmesi için OligoSCAN, Matlab ve Pajek gibi yazılım programları da yaygın olarak tercih edilmektedir (Chakraborty ve ark., 2015).

MikroRNA Ekspresyon Analizine Etki Eden Etmenler

Kantitatif miRNA ekspresyon analizlerinin sonuçları çeşitli değişkenlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Bollati ve Dioni, 2019). Bu değişkenler; yaş ve beslenme gibi canlıya ait olan faktörler ile teknik nedenlere bağlı numunenin alınma zamanı, kontaminasyon, örnek tipi, taşıma, işleme ve depolama gibi çeşitli iş-

faktörlerdir (Bollati ve Dioni, 2019; Mraz ve ark., 2009). Grasedieck ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada; qPCR analizlerinde dondurma ve çözme işlemlerinin miRNA ekspresyon analizlerini doğrudan etkilediğini, bu nedenle de bu işlemlerin bazal seviyeye düşürülmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca; hücre dışı miRNA'ların ekspresyon analizlerinde numune matrisi olarak tam kan kullanılması amaçlanan çalışmalarda kullanılacak olan tüplerin EDTA (Nolan ve ark., 2013), heparin veya sitrat gibi antikoagülan içermesi gerektiği bildirilmektedir (Bollati ve Dioni, 2019).

miRNA ekspresyon analizinde elde edilen veriler, izolasyon yönteminden ve izolasyon sonrası depolama koşullarından da etkilenmektedir (Mraz ve ark., 2009). Bravo ve ark. (2007) Trizol veya mirVana izolasyon kiti ile elde edilen ve -80 °C'de depolanan miRNA'ların oldukça kararsız bir yapıda olduklarını ortaya koymuşlardır. Ayrıca elde edilen miRNA'ların farklı depolama koşullarına bağlı olarak kaliteli cDNA'nın elde edilemediğini bildirmişlerdir. Mraz ve ark. (2009) ise; miRNA'ların farklı koşullar altındaki stabilitelemlerinin değerlendirilmesi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada; -80°C'de 14 gün, -80°C'de 10 ay boyunca saklanan ve taze olarak elde edilen 29 adet miRNA numunesinin ekspresyon seviyelerindeki değişimi incelemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda; miRNA'ların uygun koşullar altında saklama işlemi uygulandığında dondurma süresinin miRNA stabilitesini etkileyen önemli bir faktör olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; izole edilen miRNA'lardan elde edilen cDNA'ların 11 gün boyunca saklanan ve taze olarak elde edilen 29 adet miRNA numunesinin ekspresyon seviyelerindeki değişimi incelemişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda; miRNA'ların uygun koşullar altında saklama işlemi uygulandığında dondurma süresinin miRNA stabilitesini etkileyen önemli bir faktör olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde; Grasedieck ve ark. (2012) miRNA'ların -80°C ve -20°C'de uzun süre depolanmaları ile birlikte miRNA ekspresyon stabilitesini incelemişlerdir. Elde etmiş oldukları sonuçlara göre; serumların 2-4 yıl boyunca -20°C'de saklanmalarının toplam miRNA ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı, ancak 6 yıldan daha uzun süreli depolama sonrasında miRNA ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüşün meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca; -80°C'de uzun süreli dondurmaya bağlı olarak sürekli dondurma ve çözme işlemlerinin miRNA miktarının azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Grasedieck ve ark., 2012).

Formaline sabitlenmiş parafine gömülü dokulardan (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE) da kaliteli miRNA elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Szafranska ve ark. (2008) dondurulmuş ve FFPE numunelerinde miRNA ekspresyon profilini incelemişlerdir. Her iki numune tipinde de miRNA ekspresyon seviyesinin benzer olduğu saptanmıştır. Ancak; FFPE numunelerinde tespit edilen miRNA miktarında %5 ile %8,6 arasında bir kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca; 10 yıl boyunca saklanan FFPE numunelerinde miRNA ekspresyonunun saptanabildiği ve miRNA'ların mRNA'lara göre daha az degradasyona uğradığı

saptanmıştır (Szafranska ve ark., 2008).

Ekspresyon çalışmalarında; kontaminasyon ve kullanılan örnek tipi analiz sonuçlarını etkileyen diğer etmenlerdendir. Örneğin; Cheng ve ark. (2013) plazma numunesinde trombosit kontaminasyonundan dolayı dolaşımdaki miRNA seviyelerinin değiştiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca; hücre dışı miRNA ekspresyon analizlerinde kanın plazma kısmı yerine serumunun miRNA ekspresyon analizlerinde kullanılması önerilmektedir. Kirschner ve ark. (2013) hemolizin miRNA ekspresyon seviyesine olan etkisini incelemişler ve sıklıkla normalizasyon için kullanılan bir miRNA olan endojen miR-16 konsantrasyonunun, kırmızı kan hücrelerinde mevcut olan en bol miRNA'lardan biri olduğunu bildirmişlerdir. Hemolize edilen plazma veya serum numunelerinde miR-16 konsantrasyonu daha yüksek ve değişken olmasından dolayı miR-16'nın hemolize edilen numunelerde normalizasyon için kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

miRNA ekspresyonunun canlıya bağlı beslenme, kondüsyon, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerden de etkilendiği ortaya konulmuştur (Blondal ve ark., 2013). Örneğin; miRBase veri tabanında serum ve plazma örneklerinde 1000'den fazla miRNA'nın ekspresyonunun stabil olduğu belirlenmiştir. Ancak; Blondal ve ark. (2013) incelemiş oldukları serum ve plazma numunelerinde 1000'den fazla miRNA'nın içinden yalnızca 114 adet miRNA'nın ekspresyonunun stabil olduğunu saptamışlardır. Elde edilen sonuçlar ile veritabanı arasındaki farkın canlıya bağlı faktörlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Veteriner Bilimleri Alanında miRNA'lar

miRNA'ların, keşfedilmesi ile birlikte insan da dahil olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde sRNA moleküllerinin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozisi gibi birçok biyolojik sürece aracılık ettiği ortaya konmuştur (Mendell ve Olson, 2012; Su ve ark., 2010). miRNA'lar ile ilişkili bu hızlı gelişim ve ilerlemeler sonucunda, miRNA'ların ifade düzeylerinde meydana gelebilecek değişikliklerin çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarla ilişkili tanı kriteri olarak kullanılabilirler (Singh ve ark., 2019) ve hastalık patogenezisinde de (Stenfelt ve ark., 2017) rol oynayabilecekleri belirlenmiştir. Örneğin; insanlarda malign akciğer kanserinin ve kronik pankreatitis ile pankreas kanseri hastalıkları arasındaki farklılıkların saptanmasında non-invaziv miRNA tanı testleri geliştirilmiştir (Singh ve ark., 2019). miRNA'ların tanı kriteri olarak kullanılabilirliğine dair insanlarda bildirilen gelişmeler doğrultusunda; miRNA'ların veteriner bilimleri alanında da belirteç olarak kullanılabilirlikleri ileri sürülmüştür. Örneğin; Stenfelt ve ark. (2017) sığırlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan Şap hastalığında eksprese olan miRNA'ları ortaya koymak için yapmış oldukları bir çalışmada miR-1281'in hastalığın akut ve kronik safhasında azaldığını buna karşın bta-

miR-17-5p (akut safhada) ve bta-miR-31 (kronik safhada) ekspresyon seviyelerinin arttığını saptamışlardır. Zheng ve ark. (2018) sığırlarda miR-185'in retensio sekondaryum hastalığında eksprese olduğunu ve hastalığın patogeneziinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Köpeklerde yapılan bir çalışmada ise insanlarda tümör ile ilişkili miRNA dizisine ait problemlerin %90'nının köpeklerde B ve T hücre kökenli tümörlerin tanısında kullanılabileceği belirlenmiştir (Uhl ve ark., 2011). Fleischhacker ve ark. (2013) ise miR-122 ve miR-193b'nin diyabetik kedilerde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Dolaşımda bulunan miRNA'ların çeşitli helmint enfeksiyonları ile de ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Guo ve Zheng, (2017) *Eshinococcus Multilocularis* ile enfekte olmuş farelerin dolaşımında parazit hastalığı ile ilişkili emu-miR-10 ve emu-miR-277'yi tanımlamışlardır.

miRNA'ların tanı amaçlı kullanımlarının yanı sıra terapötik amaçlı da kullanılabilecekleri ön görülmektedir. Örneğin; tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve kanser oluşumuna neden olmaktadır. Bu durumun tersi ise; "onkomiR" olarak bilinen bazı miRNA'ların kanser gelişimini arttırdığı saptanmıştır. Bu nedenle miRNA'ların etki şekli değiştirilerek kanserlerin gelişim sürecinin yavaşlatılabileceği ileri sürülmektedir (Singh ve ark., 2019).

miRNA'ların hastalık patogeneziindeki rolleri ve terapötik yaklaşım amaçlı kullanımlarını ortaya koyan bu umut verici gelişmelerin dışında reproduktif süreç gibi önemli biyolojik fonksiyonların yürütülmesinde de etkin bir role sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin; Donadeux ve ark. (2013) miR-21, miR-23a, miR-145, miR-503, miR-224, miR-383, miR-378, miR-132 ve miR-212'nin kısıraklarda ovulasyon sürecini kontrol ettiklerini belirlemişlerdir. Gebelik sürecinde ise miR-92, miR-17 ve miR-27'nin anjiyogenezisi düzenlediği ortaya konmuştur. Ayrıca Li ve ark. (2012) laktasyon döneminde de miRNA ekspresyon seviyesinde farklılıklara rastlamışlardır. Laktasyon döneminde bulunan ineklerde yapmış oldukları bir çalışmada emzirmeye bağlı olarak 56 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesinin değiştiğini bildirmişlerdir.

Sonuç

miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısının artması ile birlikte hücresel gen ekspresyonunun büyük bir kısmının miRNA'lar tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur. Ancak; hücre ve/veya dokuya spesifik miRNA'ların hedefledikleri gen bölgeleri ve etki mekanizmaları henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. miRNA'ların hedefledikleri gen bölgeleri ve etki mekanizmalarının belirlenmesi ile çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin moleküler alt yapısı anlaşılacak böylece farklı tanı ve tedavilerin geliştirilmesinde etkili olabilecektir. Bu nedenle; miRNA'ların potansiyel rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için, kullanımı

kolay ve farklı tanı laboratuvarları arasında tekrarlanabilirliği mümkün olan yüksek düzeyde standartlaştırılmış metodolojiler geliştirilmeli ve tercih edilmelidir. Teknolojide görülen gelişmelere paralel olarak; aday miRNA'ların, hedefledikleri gen bölgeleri ile etki mekanizmaları ve ekspresyon profillerinin; mikroarray, yeni nesil sekanslama, northern blot ile qPCR gibi çeşitli yöntemlerle belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntemler içerisinde; RT-qPCR moleküler analizlere yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle öne çıkmaktadır.

Kaynaklar

- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015; 12: 4.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-50.
- Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: 144.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 5003-08.
- Backes C, Haas J, Leidinger P, Frese K, Grossmann T, Ruprecht K, Meder B, Meese E, Keller A. miF-Rame: analysis and visualization of miRNA sequencing data in neurological disorders. *J Transl Med* 2015; 13: 224.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010; 50: 237-43.
- Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010; 50: 244-9.
- Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma and other biofluids. *Methods* 2013; 59: 1-6.
- Bollati V, Dioni L. *Methods for Analyzing miRNA Expression*. Academic Press 2019; 379-405.

- Bravo V, Rosero S, Ricordi C, Pastori RL. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 1052-5.
- Castoldi M, Spasia MV, Altamura S, Elman J, Lindow M, Kiss J, Stolte J, Sparta R, D'Alessandro LA, Klingmullers U, Fleming RE, Longerich T, Groenes HJ, Benes V, Kauppinen S, Hentze MW, Muckenthaler MU. The liver-specific microRNA miR-122 controls systematic iron homeostasis in mice. *JIC* 2011; 121: 1386-96.
- Chakraborty M, Chatterjee A, Krithika S, Vasulu TS. A Statistical Analysis of MicroRNA: Classification, Identification and Conservation Based on Structure and Function. Dasgupta R. ed. In: *Growth Curve and Structural Equation Modeling*. Switzerland: Springer Proceedings in Mathematics & Statistics, 2015; pp. 223-58.
- Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, Goodman MT, Trait JF, Teewari, Pritchard CC. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS ONE* 2013; 8(6): 64795.
- Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 296-302.
- Dellett M, Simpson DA. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis. *Expert Rev Mol Diagnost* 2016; 16:407-14.
- Donadeux FX, Schauer SN. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2013, 45: 122-5.
- Faraldi M, Gomarasca M, Sansoni V, Perego S, Banfi G, Lombardi G. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Nature* 2019; 9: 1584.
- Fleischhacker SN, Bauersachs S, Wehner A, Hartmann K, Weber K. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. *Vet J* 2013; 197: 688-93.
- Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, Niess JH, Tuman H, Roughi A, Bloehdorn J, Liebisch P, Mertens D, Döhner H, Buske C, Langer C, Kuchenbauer F. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia* 2012; 26: 2414-6.
- Guo L, Chen F. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene* 2014; 544: 1-7.
- Guo X, Zheng Y. Expression profiling of circulating miRNAs in mouse serum in response to *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasitology* 2017; 144: 1079-87.
- Huang T, Yang J, Liu G, Jin W, Liu Z, Zhao S, Yao M. Quantification of mature microRNAs using pincer probes and real-time PCR amplification. *PLoS ONE* 2015; 10: 0120160.
- Jin J, Vaud S, Zhelkovsky AM, Posfai J, McCreynolds LA. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR ligase. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 116.
- Kang ST, Hsies YS, Feng CT, Chen YT, Yang PE, Chen WM. miPrimer: An empirical-based qPCR primer design method for small noncoding microRNA. *RNA* 2018; 24: 304-12.
- Kirschner MB, Kirschner MB, Edelman JJB, Kao ACH, Valley MP, Zandwijk NV, Reid G. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet* 2013; 4: 94.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Jones-Griffiths S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: 155-62.
- Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics* 2012; 13: 731
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta c(t)) method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012; 148: 1172-87.
- Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1-4.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1: 1559-82.
- Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR), *LGC* 2013; 1-99.

- Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem* 2015; 61: 1333-42.
- Sidekli Ö, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Gebelik Sürecinde Rol Oynayan mikroRNA (miRNA)'lar. *Lalahan Hay Araştırma Derg* 2019; 59(1): 36-48.
- Singh B, Mal G, Gautam S, mukesh M. Big from small: MicroRNA in Relation to veterinary sciences. *Advances in Animal Biotechnology* 2019; 447-53.
- Stenfelt C, Arzt J, Smoliga G, LaRocco M, Gutkoska J, Lawrence P. Proof-of- concept study: profile of circulating microRNAs in bovine serum harvested during acute and persistent FMDV infection. *Virology* 2017; 14: 71.
- Su L, Zhao S, Zhu M, Yu M. Differential expression of microRNAs in porcine placentas on Days 30 and 90 of gestation. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(8): 1175-82.
- Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Rigganbach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn* 2008; 10: 415-23.
- Tellinghuisen J, Spiess AN. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. *Anal Biochem* 2016; 449: 76-82.
- Tsang J, Ebert MS, Van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microRNA functions and co-targeting networks using gene set signatures. *Mol Cell* 2010; 38: 140-53.
- Uhl WE, Suter S, Krimer P, Schliekelman P, Tompkins SM, Suter S. Identification of altered MicroRNA expression in canine lymphoid cell lines and cases of B- and T-Cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 950-67.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7).
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56: 1733-41.
- Xie S, Zhu Q, Qu W, Xu Z, Liu X, Li X, Li S, Ma W, Miao Y, Zhang L, Du X, Dong W, Li H, Zhao C, Wang Y, Fang Y, Zhao S. sRNAprimerDB: Comprehensive primer design and search web service for small non-coding RNAs. *Bioinformatics* 2019; 35: 1566-72.
- Zheng CY, Zou X, Lin HJ, Zhou BC, Zhang ML, Luo CH, Fu SX. miRNA-185 regulates the VEGFA signaling pathway in dairy cows with retained fetal membranes. *Therio* 2018; 110: 116-21.

