

Qualität und Richtigkeit von qPCR-Ergebnissen steigern

PD Dr. Michael W. Pfaffl, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan

Die Anwendung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) oder die Kombination der qPCR mit der reversen Transkription (RT) ist zu einem Routinewerkzeug in der modernen molekularbiologischen Forschung und molekularen Diagnostik geworden. Das Expression Profiling biologischer Proben auf mRNA- und microRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR) ist von großem Nutzen und liefert wichtige Ergebnisse in zahlreichen biologischen Disziplinen. Vor allem in der Routinediagnostik, der universitären und industriellen Forschung sowie in der funktionellen Genomforschung ist sie unverzichtbar.

Dennoch gilt es, der selbst in Fachmedien oft als „einfach und reproduzierbar“ bezeichneten qPCR-Methodik weiter kritisch gegenüberstehen und weiter an der Richtigkeit der erzeugten quantitativen Ergebnisse zu arbeiten. Dazu gehört es, den gesamten qPCR-Arbeitsablauf – von der Probennahme bis zur statistischen Auswertung der Ergebnisse – gründlich zu hinterfragen und die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. In der aktuellen publizierten Literatur mangelt es oft an Informationen hinsichtlich der experimentellen Details darüber, welche Reagenzien in welcher Konzentration eingesetzt und wie die signifikanten Expressionsunterschiede berechnet wurden. In vielen Publikationen hochrenommierter Journale fehlen essentielle Informationen, die es erlauben, die wissenschaftliche Qualität der dargestellten Resultate kritisch zu bewerten oder das Experiment im eigenen Labor zu wiederholen. Deshalb wurden im vergangenen Jahr von einem kleinen Kreis

an Wissenschaftlern die MIQE-Richtlinien¹ ins Leben gerufen – The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Diese zielen darauf ab, die Richtigkeit der gewonnenen Resultate zu verbessern und die Vollständigkeit der publizierten wissenschaftlichen Literatur sicherzustellen, um experimentelle Transparenz herzustellen und die Interlabor-Reproduzierbarkeit zu fördern.

Die MIQE Guidelines stellen einen Richtlinien-satz dar – gruppiert in neun Überschriften mit 85 Unterpunkten –, der das Minimum an essentiellen Informationen zu qPCR-Experimenten beschreibt, die in Publikationen beschrieben werden müssen (Abb. 1), damit sie für den Leser verständlich, transparent und vollständig nachvollziehbar sind. Des Weiteren fordern die Autoren, dass alle relevanten experimentellen Bedingungen – wie etwa die Probeneigenschaften, die exakte Beschreibung der verwendeten Chemikalien und Kits, sämtliche Sequenzen

für Primer und Sonden – offengelegt und zur Verfügung gestellt werden, sodass die Leser die Richtigkeit der verwendeten Protokolle beurteilen können. Dies schafft Vertrauen in veröffentlichte Daten, und gegebenenfalls können die gewonnenen Ergebnisse reproduziert und bestätigt werden.

Insgesamt sollen die MIQE-Richtlinien eine bessere experimentelle Praxis sowie vollständige Publikation der Methoden anregen, um in Zukunft eine zuverlässigere und unmissverständlichere Deutung der qPCR-Resultate zu ermöglichen. Die MIQE-Datensätze sollten der Leserschaft entweder als Kurzform in der Publikation oder als online-Supplement zur Verfügung gestellt werden. Dadurch sollen die Qualität der Experimente und die richtige biologische Deutung der Ergebnisse möglich sowie fehlerhafte biologische Schlussfolgerungen infolge mangelhafter qPCR-Ergebnisse verhindert werden.

Die größten Fehlerquellen der qPCR

Betrachtet man den Arbeitsablauf der qPCR, von der Probennahme bis hin zur statistischen Auswertung der Ergebnisse, so fällt auf, dass vor allem in den Prä- und Post-qPCR-Arbeitsschritten häufig Fehler auftreten. Dies kann einerseits im experimentellen Design des Versuchs begründet sein oder in den ersten Arbeitsschritten, die zur Degradierung der biologischen Proben und Nucleinsäure führen². Im Post-PCR-Bereich fällt oft die mangelnde oder fehlerhafte Datenauswahl bei der Normalisierung auf, was zu einer signifikanten Verschiebung der Expressionslevel und somit zu unrichtigen Quantifizierung führen kann³. Weitere Fehler, die in der Praxis auftreten, sind im Folgenden exemplarisch genannt.

Inadäquate Probennahme: Der Zeitraum zwischen der Beprobung und der Fixierung der DNA oder RNA in stabilisierender Lösung ist zu lang. In der Folge kommt es zur Degradierung niedrig exprimierter Nucleinsäuren und zur Verschiebung des gesamten Expressionsmusters.

Lagerung: Die Lagerung der biologischen Probe oder der extrahierten RNA in falschem Puffer (Stabilisator) sowie bei falscher Temperatur haben signifikanten Einfluss auf die quantitativen Ergebnisse.

Nucleinsäureextraktion: Die Reproduzierbarkeit der Extraktion bestimmter Nucleinsäurefraktionen (total-RNA, mRNA, microRNA, small RNAs oder genomische DNA) stellt immer noch ein zentrales Problem dar. Wird die extrahierte Nucleinsäurekonzentrationen aus identischen Mengen an zu untersuchendem Gewebestücken verglichen, kommt es oft zu bemerkenswerten Unterschieden. Weshalb? Vielleicht sollte man doch noch einmal am Protokoll, an der Beprobungsmethode und an der Wiederholbarkeit der Methode zweifeln oder sich Gedanken über die Gewebeszusammensetzung der biologischen Probe machen! Komplexe und heterogen zusammengesetzte biologische

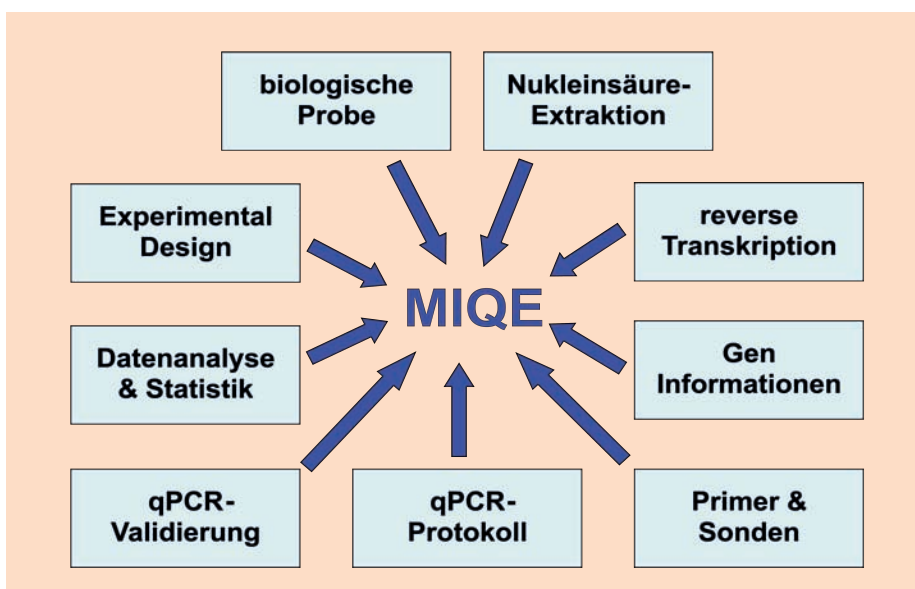


Abb. 1: Hauptüberschriften der MIQE-Richtlinien

Proben ergeben heterogene quantitative Nukleinsäurekonzentrationen.

Degradierung der RNA: Was bedeutet der RIN- oder RQI-Wert, und welchen Effekt hat er auf die Ergebnisse? Das sollte jedem Wissenschaftler bewusst sein, der quantitative Expressionsstudien durchführt^{4,5}.

Reverse Transkription (RT): In der Literatur wurde wiederholt gezeigt^{6,7}, dass der RT-Schritt eine immense Varianz birgt, die es zu vermeiden gilt. Leider glauben die meisten Wissenschaftler heute immer noch, dass die RT-Effizienz nahezu 100% beträgt. Weit gefehlt! Die Effizienzen und Varianzen sind enzymabhängig und von Gewebe zu Gewebe sowie von mRNA zu mRNA unterschiedlich. Hier hilft nur Optimierung der reversen Transkription und technische Replikate auf RT-Ebene².

Primer und Sonden: Die Wahl der Primer- und Sondensequenzen haben einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionseffizienz und entscheiden über Erfolg oder Misserfolg sowie über die Robustheit des verwendeten Assays in unterschiedlichen Geweben¹. Deshalb ist es wichtig, über die PCR-Effizienz und über die Wiederholbarkeit bei verschiedenen Expressionsniveaus Bescheid zu wissen⁸⁻⁹.

Datenauswertung: Seit nunmehr acht Jahren gibt es das Schlüsselpaper von Vandesompele et al.¹⁰, und noch immer liest man in hochrangigen Journalen, dass die Referenzgene anhand anderer Publikationen ausgewählt wurden und nicht hinsichtlich ihrer Eignung als unregulierte Referenzgene überprüft wurden. Bei der relativen Quantifizierung kommt es durch mangelnde Validierung der Referenzgene zu quantitativ falschen Ergebnissen und somit zu falschen biologischen Schlussfolgerungen. Wird die Normalisierung mit mehreren validierten Referenzgenen durchgeführt, und verlässt man sich bei der relativen Berechnung sowie der statistischen Auswertung nicht auf seine selbstgeschriebenen Excel-Tabellen, sondern auf frei verfügbare Quantifizierungssoftware^{11,12}, lässt sich die technische Varianz reduzieren. Dann erhält man validere Ergebnisse^{11,13}, die richtiger sind (Richtigkeit!), eine kleine Varianz aufweisen (Wiederholbarkeit!), und zu einer signifikanten Abgrenzung der Expressionsunterschiede in den untersuchten Gruppen führen können (biologische Relevanz!).

Aber warum wollen wir heute die voll quantitative PCR-Methode anwenden und nicht wie früher die klassische Block-PCR mit Endpunktanalyse auf dem Agarosegel? Weil wir mit den vergangenen sehr fraglichen „semi-quantitativen“ Ergebnissen nicht zufrieden waren und uns jetzt bessere Methoden zur Wahl stehen. Aber wir müssen es schaffen, die wirklichen Vorteile der qPCR herauszuarbeiten und nicht blind den Cq-Werten zu vertrauen, die unsere real-time Cycler auswerfen. Ziel ist es nicht, weitere Hürden auf dem Weg zum Publizieren einzubauen, sondern die Qualität der Wissenschaft zu verbessern. Zweifellos ist es wichtig, den gesunden Menschenverstand

anzuwenden, um zu entscheiden was im individuellen Studiendesign wichtig ist und was mit den Ergebnissen ausgesagt werden soll.

Ziel ist es, möglichst viele der 85 Unterpunkte, zumindest aber die 57 essentiellen Punkte auf der Checkliste zu beachten. Um die Sache ein wenig zu vereinfachen, sind kürzlich für Publikationen, die eine reine „relative Quantifizierung“ durchführen, verkürzte Richtlinien mit 29 Unterpunkten publiziert worden - MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments¹⁴.

Nachschlag

Wir bekommen sehr viele Nachfragen aus allen Anwendungsbereichen der qPCR und auch von Editoren diverser Journale bzw. Verlagshäusern, wie streng die MIQE-Richtlinien anzuwenden und zu werten sind. Der Diskussionsbedarf ist groß, und deshalb widmen wir auf unserer nächsten qPCR Tagung im März 2011 (www.qPCR2011.net) wieder eine Session den MIQE Guidelines und der qPCR-Qualitätskontrolle.

Literatur

- [1] Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, Carl T. Wittwer (2009) *Clin Chem* 55(4): 611 - 622
- [2] Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M. (2009) *Clin Chem* 55(10): 1816-1823
- [3] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. (2010) *Methods* 50(4): 227-230
- [4] Fleige S. and Pfaffl M. W. (2006) *Mol Aspects Med* (27): 126-139
- [5] Becker C, Hammerle-Fickinger A., Riedmaier I, Pfaffl M.W. (2010) *Methods* 50(4): 237-243
- [6] Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. (2004) *Clin Chem* 50: 509-515
- [7] Stahlberg A, Kubista M, Pfaffl M. (2004) *Clin Chem* 50: 1678-1680
- [8] Pfaffl MW, Hageleit M (2001) *Biotech Letters*, 23: 275-282
- [9] Pfaffl MW (2001) *Nuc Acids Res* 29 (9): e45
- [10] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) *Genome Biology*, 3(7): 0034. 1-0034.11
- [11] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) *Genome Biol.* 8(2): R19
- [12] Michael W. Pfaffl, Graham W. Horgan & Leo Dempfle (2002) *Nuc Acids Res* 2002, 30(9): e36
- [13] Bergkvist A, Rusnakova V, Sindelka R, Garda JM, Sjögreen B, Lindh D, Forootan A, Kubista M. (2010) *Methods* 50(4):323-35.
- [14] Stephen A Bustin, Jean-Francois Beaulieu, Jim Huggett, Rolf Jaggi, Frederick SB Kibenge, Pal A Olsvik, Louis C Penning and Stefan Toegel (2010) *BMC Mol Biol* (11): 74 - 78

Korrespondenzadresse

PD Dr. Michael W. Pfaffl
Lehrstuhl für Physiologie
Life Science Zentrum Weihenstephan
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85350 Freising-Weihenstephan
Tel.: +49-(0)8161-71-3511
Fax: +49-(0)8161-71-4204
michael.pfaffl@wzw.tum.de
www.gene-quantification.info

Good conditions



13 Innovation centers

9 Universities and colleges

2 University Medical Centers

12 Renowned research institutes

2 Strong industry associations

500 Medtech, biotech- and pharmaceutical companies

Business, science, and quality of life – North Germany provides the ideal setting for your objectives.

www.life-science-nord.net

Powering Life Sciences

SCHLESWIG-HOLSTEIN, HAMBURG