

Snap Frozen ve Doğrudan -80°C'de Dondurulan Karaciğer Dokularında RNA Kalitesi

Hüseyin Özkan, Akın Yakan

Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik AD Antakya/ Hatay

Geliş Tarihi / Received: 10.11.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 15.05.2018

Özet: Gen ekspresyonu çalışmalarıyla hücre ve dokulardan RNA izole edilerek hücrelerin fizyolojik ve biyolojik değişikliklere verdikleri cevap mRNA düzeyinde incelenebilmektedir. Oldukça hassas bir molekül olan RNA'nın stabilitesi dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. Dokulardaki RNA, ilgili canlıdan alınmasından itibaren nükleazlara maruz kalarak hızlı bir şekilde yıkılmaktadır. Yıkılmanın (degradasyon) kontrol altına alınması amacıyla ilgili dokunun dondurulması ya da bazı kimyasallarla muamele edilmesi gerekmektedir. Protein tabiatındaki nükleazlar düşük sıcaklıklarda inaktif olmakta ve bu yüzden birçok çalışmada bazı kimyasallar ile doğrudan -80°C'de dondurma ya da snap frozen olarak bilinen sıvı azotla dondurma yöntemleri tercih edilmektedir. Bu araştırma, ratlarda iki farklı yöntem kullanılarak stoklanan karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyon, saflık ve bütünlük kriterlerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 6 aylık yaşta 8 rata ait karaciğer dokusu kullanılmıştır. Doğrudan -80°C ve snap frozen yöntemiyle dondurulan karaciğer dokularından izole edilen RNA konsantrasyonları sırasıyla 1039,64 ve 503,14 ng/μl, saflıkları 1,98 ile 1,97 ve referans gene (PPIA) ait Ct sonuçları 16,537 ve 17,463 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılacak RNA'nın kalite değerlendirmesinde konsantrasyon, agaroz jel görüntüsü, erime eğrisi ve Ct değerleri bakımından bir bütün olarak değerlendirilmesi gerektiği ve snap frozen yöntemin halen en uygun yöntemlerden biri olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Snap Frozen, Doğrudan -80°C, RNA kalitesi, Gen ekspresyonu

RNA Quality in Snap and Directly -80°C Frozen Liver Tissues

Abstract: Cells response can be analyzed at the level of mRNA with gene expression studies to physiological and biological changes. The stability of RNA, a highly sensitive molecule, varies from tissue to tissue. The RNA in the tissues can be rapidly degraded by exposure to nucleases after collecting from the species of animate. In order to control the degradation, the tissue should be frozen or treated with some chemicals. Nucleases are protein nature and they are inactive at low temperatures so in many studies freezing method at directly -80°C with some chemical solutions or snap frozen with using liquid nitrogen method are preferred. This study was conducted to evaluate the concentration, purity and integrity criteria of nucleases from stock of liver tissues using different methods in rats. 8 rats which were six months old rats used in the study. The RNA isolated from liver tissues for Directly -80°C and Snap Frozen groups and examined of concentrations (1039,64 and 503,14 ng/μl), purity (1,98 and 1,97) and Ct values (16,537 and 17,463) of RNA in PPIA as reference gene. Consequently, RNA used in gene expression studies should be evaluated as a whole in terms of concentration, agarose gel image, melting curve and Ct values for quality assessment and the Snap Frozen method has been still considered one of the most appropriate method.

Key words: Snap Frozen, Directly -80°C, RNA quality, Gene expression

Giriş

RNA, genden protein sentezi sırasındaki mekanizmalarda en önemli rolü oynayan aracı moleküldür. mRNA'nın transkripsiyonunun ve translasyonunun regülasyonu ile protein sentezi mekanizması sürdürülmektedir. Bu sürecin tamamına ise Gen Ekspresyonu denilmektedir [16]. Biyolojik olaylara ait mekanizmaların açıklanabilmesi için son yıllarda çok sayıda gen ekspresyonu çalışması yapılmaktadır. Gen ekspresyonu çalışmalarının ana molekülü olan

mRNA'lar moleküler yapılarından dolayı in-vitro koşullarda nükleazlardan çok kolay etkilenebilmektedirler. Bu sebeple, gen ekspresyonu çalışmalarında mRNA ekstraksiyonu yapılarına kadar geçen sürede nükleazların aktivitelerini durdurmak gerekmektedir [3, 6]. Aksi halde hücrede RNA yıkılması başlayacak ve bu durum da gen ekspresyonu seviyesinde hatalı sonuçlara yol açabilecektir [4, 7].

Biyolojik mekanizmaların açığa kavuşturulması amacıyla yapılan çalışmalarda RNA yıkılma

durumu çalışma bulgularının doğruluğu bakımından büyük önem taşırken, diğer taraftan postmortem ölüm zamanının belirlenmesinde de kritiktir. Zira yapılan bir çok çalışmada [5, 10, 12, 17] postmortem ölüm zamanının RNA yıkımlanma seviyesinin belirlenmesi ile tespit edilebileceği bildirilmektedir. Zhao ve ark. (2006), VEGF ve HIF1A genlerinin oda ısısında (24°C) postmortem 72. saate kadar mRNA transkripsiyonunu sağlayabilecek miktarda bulunabildiğini, ancak EPO geninin postmortem yıkımlanmasının zaman ile stabil olarak meydana geldiğini bildirmişlerdir. Böylece, postmortem RNA yıkımlanmasının inceleneceği çalışmalarda gen seçiminin de önemli olduğu ortaya konulmuştur. Benzer durum Sampaio-Silva ve ark. (2013) tarafından da bildirilmektedir.

Gen ekspresyonu çalışmaları için hücre metabolizmadan alındıktan sonra RNA ekstraksiyonuna kadar olan aşama için RNA stabilitesinin sağlanması oldukça önemlidir. Bu kapsamda araştırmalarda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılan ve en stabil kabul edilen hücrenin derhal sıvı azot içine daldırılması (snap frozen) ile nükleazların aktivitelerinin aniden durdurulmasıdır [8, 11]. Diğer taraftan snap frozen ile birlikte RNAlater [3], formaline ve etanol gibi fiksatörler ile parafine gömme [2, 11], AMeX (acetone-methylbenzoate-xylene) ve HOPE (hepes-glumatic acid buffer-mediated organic solvent protection effect) [14] gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin hemen hepsi snap frozen yöntemine karşı hem RNA yıkımlanması bakımından hem de ekstradan iş gücü ve masraf oluşturması bakımından dezavantajlar taşımaktadırlar. Diğer taraftan, -196°C'de sıvı formda olan azot depolanması ve taşınmasındaki zorluklar ile temas halinde canlıya verebileceği zarardan dolayı kullanımında bazı sınırlamalar oluşturmaktadır. RNA molekülünün stabilitesini sağlamak için nükleazların aktivitesini durduracak yukarıda bahsedilen yöntemlerin herhangi birisi uygulandıktan sonra tüm örnekler nükleazların aktivite gösteremediği -80°C'deki derin dondurucularda saklanmaktadır [1, 2, 11, 14].

Bu çalışmada, enzimatik aktivitenin en yüksek olduğu doku olan karaciğerde snap frozen yöntemine karşı doğrudan -80°C'ye konulan dokulardan gen ekspresyonu çalışması için elde edilecek RNA'daki değişimin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

RNA yıkımlanması enzimatik (nükleaz) aktivite ile olduğu için en yüksek enzimatik aktiviteye sahip olan karaciğer seçilmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma Düzeni ve Hayvan Materyali

Çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen yaklaşık 6 aylık yaşta, 8 adet erkek Wistar Albino ratlardan alınan karaciğer dokularında yapılmıştır. Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2016/2-8 sayılı kararı ile yürütülmüştür.

Ratlar ötenaziye edildikten sonra karaciğer dokusunun Lobus heparis dexter'inden yaklaşık 3 gr alınan örnekler ikiye bölünmüş ve bir parçası derhal sıvı azot içine daldırılarak 5 dk beklenmiş (Snap Frozen grubu) ardından analizler yapılana kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır. İkinci karaciğer parçası örnekleri ise doğrudan -80°C'lik derin dondurucuda (Doğrudan -80°C grubu) saklanmıştır.

RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-qPCR Uygulaması

Gruplardaki örnekler total RNA izolasyonu için -80°C'den çıkartıldıktan sonra her doku örneğinden yaklaşık 50 mg alınarak TRI Reagent (Sigma-Aldrich) kit protokolüne göre total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon amacıyla TRI Reagent solüsyonu içerisindeki doku örnekleri doku homojenizatöründe soğuk şartlara uyarak homojenize edilmiştir. İzole edilen RNA'lar, pellet büyüklüklerine göre 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırılmıştır. İzolasyon prosedüründeki uygulamalardan dolayı saflık (<1,7) ve konsantrasyon (<125 ng/µl) parametreleri bakımından uygun olmayan örnekler için ilgili örnek ya da örneklerden RNA izolasyon protokolü tekrarlanmıştır.

Saflık, konsantrasyon ve kalite bakımından uygun olan örnekler olası DNA kontaminasyonuna karşı DNaz ile muamele edilmiştir. Daha sonra her örnekten 1µg RNA alınarak cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, ThermoFisher Scientific) ile cDNA sentezi yapılmıştır.

Doku stoklarken Doğrudan -80°C ve Snap Frozen yöntemlerinin örneklerdeki etkilerini değerlendirmek amacıyla örneklerden elde edilen cDNA'lardan PPIA (Cyclophilin A) referans geni (Tablo 1)

kullanılarak RT-qPCR uygulaması yapılmıştır. RT-qPCR protokolü 95°C'de 10 dk denatürasyon sonrası 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 60 saniye, 72°C'de 30 saniye 40 siklus olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan referans gene ait bilgiler

Gen	Genbank kodu	Dizi	bp	Kaynak
PPIA	NM_017101.1	F: 5'-CAGACAAAGTTCCAAAGACAGCA-3' R: 5'-CACCTGGCACATGAATCCT-3'	117	Santos ve ark., 2016

Verilerin Değerlendirilmesi

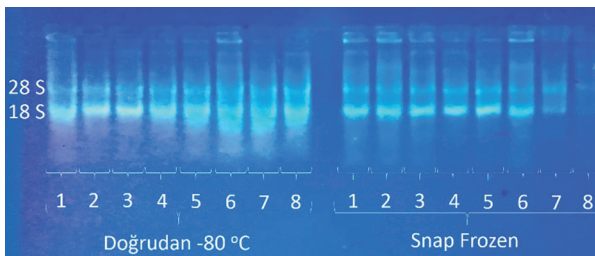
Çalışmada konsantrasyon, saflık ve Ct değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık t- testi ile SPSS 22.0 paket programında analiz edilmiştir.

Bulgular

Total RNA izolasyonundan sonra örneklerin saflık (A260/A280 oranı) ve konsantrasyon değerleri nükleik asit ölçer (Merinton SMA-1000) ile tespit edilmiştir (Tablo 2). Daha sonra örnekler kabaca degradasyonun kontrolü için %1'lik agaroz jel elektroforezinde 100 V'da yaklaşık 30 dk koşturularak 28S ve 18S bant bütünlükleri bakımından kontrol edilmiştir (Resim 1).

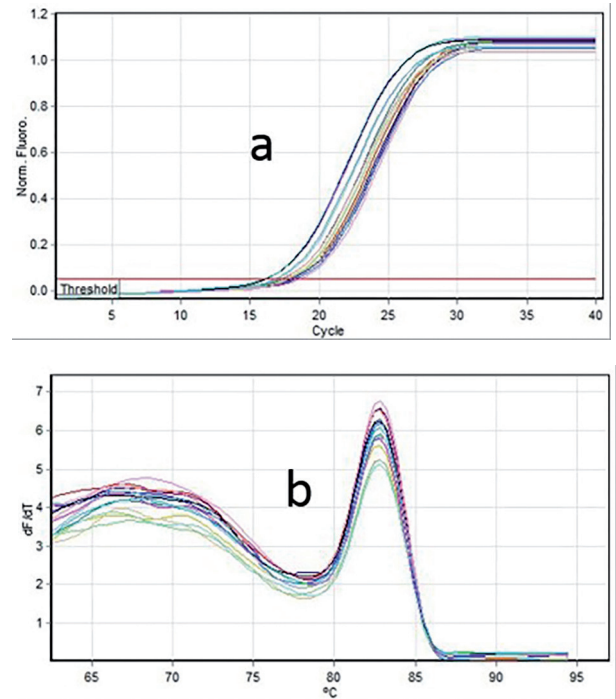
Tablo 2. Total RNA izolasyonundan sonra belirlenen konsantrasyon ve saflık değerleri (Ort±S_n)

Grup	Özellik	
	Konsantrasyon (ng/µl)	Saflık (A260/A280)
Doğrudan -80°C	1039,64±118,63	1,98±0,01
Snap Frozen	503,14±84,87	1,97±0,01
P	0,002	0,398

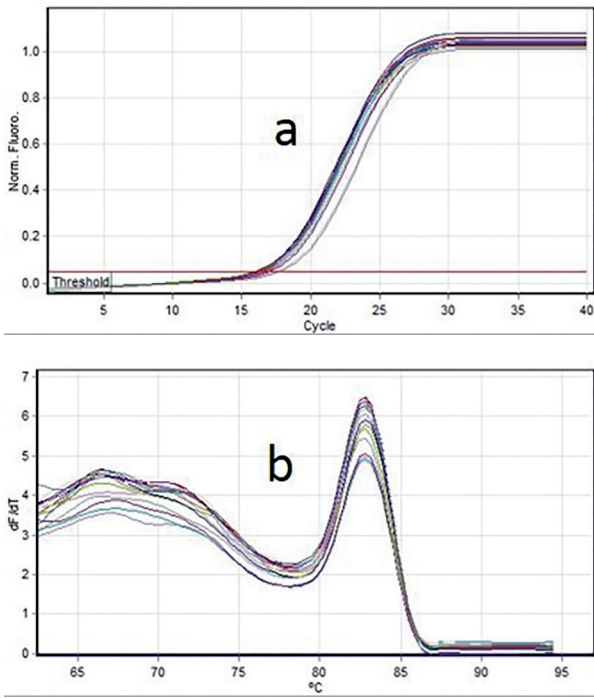


Resim 1. Total RNA İzolasyonu Sonrasındaki Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü

Kullanılan primer dizisinin çoğalttığı bölge/bölgeler ve primer-dimer oluşumu Ct grafiği ve erime eğrisi üzerinden de kontrol edilerek, primerin ilgili gen bölgesine bağlandıkları, primer dimerlerinin oluşmadığı ve DNA kontaminasyonunun bulunmadığı teyit edilmiştir (Resim 2 ve 3).



Resim 2. Doğrudan -80°C Grubu a) Ct Grafiği, b) Erime Eğrisi

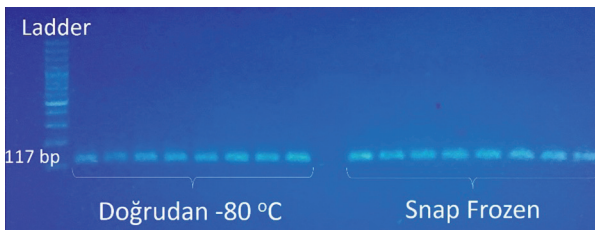


Resim 3. Snap Frozen Grubu a) Ct Grafiği, b) Erime Eğrisi

PPIA'nın RT-qPCR uygulaması sonucunda elde edilen Ct değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Doğrudan -80°C grubunun snap frozen grubuna göre yaklaşık 1 kat daha erken Ct değeri verdiği tespit edilmiştir. RT-qPCR sonrası elde edilen ürünler % 1,5'lük agaroz jel elektroforezinde 100 V'da yaklaşık 40 dk koşturularak kontrol edilmiştir (Resim 4).

Tablo 3. Doğrudan -80°C ve Snap Frozen Gruplarında PPIA Referans Genine ait Ct Değerleri (Ort±S_{ht})

Özellik	Grup		P
	Doğrudan -80°C	Snap Frozen	
Ct değeri	16,537±0,18	17,463±0,26	0,013



Resim 4. PPIA Geni için Rt-qPCR Ürünü Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü

Tartışma ve Sonuç

Gen ekspresyonu çalışmalarında materyal olarak kullanılan RNA'nın bütünlüğü çalışmanın sonuçlarını doğrudan etkileyebilmektedir. Bu sebeple ilgili dokunun toplanması, saklanması ve RNA izolasyonu basamağı büyük önem taşımaktadır [15]. RNA'nın yıkılmadan elde edilebilmesi için hücredeki nükleaz aktivitesinin hızlı bir şekilde durdurulması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada [8, 11, 14] bu aktivitenin Snap Frozen yöntemi ile sıvı azotta hızlıca durdurulabildiği bildirilmektedir. Ancak, sıvı azotun her zaman temin edilemediği durumlar olabilmektedir. Bunun için gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmak üzere RNA later ve bazı fikzasyon solüsyonlarının kullanıldığı bilinmektedir [14]. Zira Perlmutter ve ark. (2004) insan prostat dokusunda yaptıkları çalışmada, bu çalışma ile uyumlu olarak Snap Frozen yönteminin diğer yöntemlere (fiksativlerin kullanıldığı saklama koşulları) göre daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Ancak, dokuların Doğrudan -80°C'de saklanması ile gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılabilme olanaklarının da tespit edilmesi önemlidir. Postmortem RNA yıkılması doku ve genlere bağlı olarak farklılık gösterdiği için bu çalışmada enzimatik aktivite bakımından en çok tehdit altında olan karaciğer dokusu ve stabilitesi tespit edilmiş olan PPIA geni [13] kullanılmıştır.

Doğrudan -80°C grubunda izole edilen toplam RNA miktarı (1039, 64 ng/μl) Snap Frozen grubundan (503,14 ng/μl) oldukça yüksek bulunmuştur (P<0,01). Ancak bu durumun RNA kalitesi ile ilişkilendirilmesi mümkün değildir. İzolasyon sonucundaki RNA miktarının fazla olması izolasyona başlamadan önceki hücre sayısının fazla olması veya pellet büyüklüklerine göre kullanılan DEPC'li su miktarındaki farklılık ile ilişkilendirilebilir. Zira izolasyona sırasında kullanılan dokudaki hücre miktarını tespit edebilmek mümkün değildir. RNA miktarı ile ilgili olarak dikkat edilmesi gereken husus kullanılan kitin protokolünde belirtilen miktara ulaşabilmektir. Bu çalışmada kullanılan kit en az 125 ng/μl total RNA protokolüne sahip olduğu için her iki grupta tespit edilen miktar yeterli olmuştur. Diğer taraftan RNA'nın kalitesini belirleyen önemli bir değer *saflık*'tır. Bu çalışmada her iki grupta elde edilen değer beklenen sınırlar (>1,7) içindedir ve gruplar arasında bir fark oluşmamıştır. RNA izolasyon

yonundan sonra RNA kalitesinin ikinci tespit basamaklarından biri olan agaroz jel görüntüsünde (Resim 1) Snap Frozen grubunda daha keskin 18S/28S bantları tespit edilirken, Doğrudan -80°C grubunda bu bantlar bazı sürüntüler ile tespit edilmiştir. Aynı örneklerin RT-qPCR uygulamaları sonucunda elde edilen Ct ve erime eğrisi grafiklerinde (Resim 2) bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Normal bir RT-qPCR reaksiyonunda Ct değerinin 15-20 civarında olması beklenir. Bu değer biyolojik olaylar sonucu meydana gelebilen değişimler dışında, PCR koşulları, örnek miktarı, kullanılan kitin yapısı gibi faktörlere bağlı olarak da bir miktar değişebilmekte ancak referans gene göre yapılan normalizasyon işlemi bu farklılığı ortadan kaldırmaktadır [9]. Ancak, RNA yapısındaki bozulmalar bu değeri yıkımlanmanın boyutuna göre az yada çok değiştirebilmektedir. Doğrudan -80°C grubunda referans gen için 1 Ct farklılık ($P<0,05$) tespit edilmesi bu örneklerden yapılacak çalışmalarda bazı hatalı yorumlamalara sebep olunabileceğini düşündürmektedir.

Biyolojik olayların açığa kavuşturulması amacıyla yapılan çalışmalarda oluşabilecek olası RNA yıkımlanması dezavantaj olarak ortaya çıkarken, adli olaylarda ölüm zamanını tespit edilebilmesi bakımından önem taşımaktadır [18, 19]. Bu çalışmada dokuların ölüm sonrasında nükleaz aktivitesini derhal durduracak bir uygulamaya maruz bırakılmaları durumunda klasik soğuk zincirde dahi RNA yıkımlanmasının başlayabileceği düşüncesi oluşmuştur. Gonzales-Herrera ve ark. (2013) kardiyak metabolizma ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinin miyokardiyal iskemi ve onun tamiri ile ilişkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada RNA yıkımlanmasının miyokardiyal iskemide kısa sürede başlayabildiğini göstermiştir. Bu durum mevcut çalışma bulguları ile uyum göstermektedir.

Hücredeki RNA yıkımlanma derecesinin tespit edilebileceği çalışmaların yapılması postmortem ölüm süresinin belirlenmesi bakımından oldukça önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar [1, 12, 17] RNA kalitesinin postmortem iskemiye maruz kalma süresine göre değişebildiğini ancak bu sürelerin kesin olarak henüz tanımlanamadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada RNA yıkımlanmasının iskemiye maruz kalmanın hemen ardından Snap

Frozen'e maruz bırakılmama durumunda hemen başladığı (Resim 1) gösterilmiştir.

Bu çalışmada rat karaciğer dokusunda Doğrudan -80°C'ye maruz bırakmanın bir miktar RNA yıkımlanmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Karaciğerde enzimatik aktivitenin fazla olması bu durum için öncül olmuş olabilir. Enzimatik aktivitenin çok fazla olmadığı dokularda (kas ve adipöz doku gibi) bu yöntemin uygunluğunun denemesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılacak RNA'nın kalitesini tespit etmek için konsantrasyon ve saflık ölçümü, Ct ve erime eğrisi grafiği ile RT-qPCR ürünü agaroz jel görüntüsünün yanıtıcı olabileceği, aynı zamanda yalın olarak Ct değerleri üzerinden değerlendirmeler yapılmasının yanıtıcı olabileceği tespit edilmiştir. RT-qPCR ile gen ekspresyonu çalışmalarında yukarıda bahsedilen kriterler ile birlikte mutlaka total RNA agaroz jel görüntüsünün de beraber değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır.

RNA yıkımlanmasına bağlı olarak postmortem ölüm zamanı ya da iskemiye maruz kalma sürelerinin belirlenebilmesi için çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüştür.

Kaynaklar

1. Bao W, Zhang X, Zhang J, Zhou W, Bi T, Wang J, Yan W, Lin A (2012): Biobanking of fresh-frozen human colon tissue: Impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. *Ann Surg Oncol*. DOI 10.1245/s10434-012-2440-1.
2. Botling J, Edlund K, Segersten U, Tahmasebpoor S, Engström M, Sundström M, Malmström P, Micke P (2009): Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue. *Diagn Mol Pathol*, 18: 44- 52.
3. Faix PH (2008): Preventing RNA degradation is difficult, but newer systems for protecting this molecule may lead the way to better gene expression analysis. *Drug Discovery and Development*, 4: 44- 47.
4. Fleige S, Pfaffl MW (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 126- 139.
5. Gonzales-Herrera L, Valenzuela A, Marchal JA, Lorente JA, Villanueva E (2013): Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Science International*, 232: 218- 228.
6. Houseley J, Tollervey D (2009): The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136: 763- 776.
7. LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervey D (2005): RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 121: 713- 724.

8. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O (2007): Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin- fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*, 7(36): 1- 6.
9. Ma H, Shich K, Chen G, Qiao T, Chuang M (2006): Application of Real-Time Polymerase Chian Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2(3): 1- 15.
10. Ma J, Pan H, Zeng Y, Lv Y, Zhang H, Xue A, Jiang J, Ma K, Chen L (2015): Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profikling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures. *Forensic Sci Med Pathol*, 11: 530-537.
11. Perlmutter MA, Best CJM, Gillespie JW, Gathright Y, Gonzales S, Velasco A, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Chuaqui RF (2004): Comparison of snap freezing versus ethanol fixation for gene expression profiling of tissue specimens. *Journal of Molecular Diagnostics*, 6(4): 371- 377.
12. Sampaio-Silva F, Magalhaes T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ (2013): Profiling of RNA degradation for estimation of Post Mortem interval. *PLOS One*, 8(2): 1- 8.
13. Santos BP, Costa Diesel LF, Silva Meirelles L, Nardi NB, Camassola M (2016): Identification of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in rat adipose stromal cells induced to trilineage differentiation. *Gene*, 594(2): 211-219.
14. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *American Journal of Pathology*, 161: 1961- 1971.
15. Vermeulen J, Preter K, Lefever S, Nuytens J, Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J (2011): Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39:1- 12.
16. Watson JD (2004): *Molecular biology of the gene*. p: 97- 128. In: *The structures of DNA and RNA*, 5th Edition, CSHL Press, USA.
17. Wen-Can L, Kai-Jun M, Ping Z, Hui P, Heng Z, Hui-Jun W, Duan M, Long C (2014): Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Science and Justice*, 54: 307- 310.
18. Zhao D, Zhu B, Ishikawa T, Quan L, li D, Maeda H (2006): Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Legal Medicine*, 8: 132- 136.
19. Zhang H, Zhang P, Ma K, Lv Y, Li W, Luo C, Li L, Shen Y, He M, Jiangle Q, Chen L (2013): The selection of endogenous genes in human postmortem tissues. *Science and Justice*, 53: 115- 120.