

P-GE14: DESIGNING A STEM-LOOP RT-qPCR METHOD FOR MEASURING miRNA-16 EXPRESSION IN HUMAN PLASMA SAMPLES

Nguyen Hoang Thao Vy, Nguyen Thi Ngoc Thanh, Huynh Huu Luan, Nguyen Thi Hue

Human Genetics Group - Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science Ho Chi Minh

SUMMARY

MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, small non-coding RNA molecules. They have the potential use as excellent biomarkers in many disease states. Stem-loop RT-qPCR is known as a high specific and consistent technique for measuring miRNA levels. In this study, a stem-loop RT-qPCR is designed and optimized for circulating miRNA quantification in human plasma. Total RNA was extracted from plasma following by the reverse transcription (RT) to cDNA using gene-specific primer. Subsequently, the expression levels of miRNA-16 were called out by the amplification curve – the fluorescent signal released during real-time PCR. The sensitivity, stability and specificity of the assay was consecutively estimated by the ability to amplify the concentration of template, the consistence of amplification and the melting peak. The primary results revealed that 85.7% of samples were amplified during PCR whereas only one did not appear in the amplification plot. Moreover, there is not significant difference ($p > 0.05$) of expression levels among samples, which indicates the stability of this PCR method. With small numbers of samples tested and non-specific products appearance, the specificity of the assay was low (16.7%). Up to date, a stem-loop RT-qPCR primer has been designed for miRNA-16 expression analysis. However, the optimal method could be obtained after being validated with stability and higher specificity.

Keywords: circulating miRNA, miRNA, miRNA-16, plasma, Stem-loop RT-qPCR.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP STEM-LOOP RT-qPCR ĐỊNH LƯỢNG miRNA-16 TRONG MẪU HUYẾT TƯƠNG

Nguyễn Hoàng Thảo Vy, Nguyễn Thị Ngọc Thanh, Huỳnh Hữu Luân và Nguyễn Thị Huệ*

Nhóm Nghiên cứu Di truyền Người - Bộ môn Sinh lý học Động Vật, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh.

TÓM TẮT

MicroRNA (miRNA), một họ các phân tử RNA nội bào không mã hóa (non-coding RNAs) đóng vai trò điều hòa sau phiên mã biểu hiện gen, từ đó ảnh hưởng những quá trình cốt yếu trong hệ thống sinh học, bao gồm phát triển ung thư. Các phân tử này có khuynh hướng được sử dụng như dấu chứng sinh học trong các giai đoạn phát triển bệnh. Stem-loop RT-qPCR được biết như một phương pháp đặc hiệu cao và ổn định để định lượng biểu hiện miRNA ở tế bào mô. Trong nghiên cứu này, phương pháp stem-loop RT-qPCR được thiết kế và tối ưu để định lượng miRNA tuần hoàn ở huyết tương người, loại mô đã được kiểm chứng là có nồng độ miRNA thấp hơn so với các tế bào mô khác. Lượng RNA tổng được tách chiết từ huyết tương và phiên mã ngược thành DNA bổ sung (cDNA) bằng mỗi đặc hiệu. Sau đó, biểu hiện của miRNA-16 được khuếch đại và ghi nhận bởi các tín hiệu huỳnh quang trong real-time PCR. Độ nhạy, độ ổn định và độ đặc hiệu của phương pháp lần lượt được đo lường bởi khả năng khuếch đại nồng độ khuôn mẫu, sự thống nhất trong quá trình khuếch đại và kết quả đỉnh nóng chảy. Các kết quả chính thu nhận 85,7% mẫu được khuếch đại sau PCR trong khi chỉ có một mẫu không xuất hiện sự khuếch đại. Hơn nữa, không có sự khác biệt lớn về sự biểu hiện giữa các mẫu, chứng minh độ ổn định của phương pháp PCR này. Với số lượng mẫu nhỏ và sự xuất hiện của sản phẩm phụ, độ đặc hiệu khá thấp (16,7%). Nghiên cứu này đã thiết kế thành công mỗi stem-loop RT-qPCR cho các phân tích biểu hiện miRNA-16, tuy nhiên phương pháp cần được tối ưu thêm để gia tăng độ đặc hiệu.

Từ khóa: miRNA tuần hoàn, miRNA, miRNA-16, huyết tương, Stem-loop RT-qPCR.

* Author for correspondence: Tel: 0948364680; Email: nthue@hcmus.edu.vn