



Original Article

Development and Optimization of an RT-qPCR Assay for Determining miRNA-1202 Expression Levels in Human Blood Samples

Le Thi Minh Phuong^{1,*}, Vu Ngoc Diep¹, Nguyen Hien Mai¹,
Le Khanh Linh², Vu Van Nga¹, Do Thi Quynh¹

¹*VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

²*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology,
1 Dai Co Viet, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam*

Received 7th May 2026

Revised 18th August 2026; Accepted 22nd September 2026

Abstract: Objectives: To develop a protocol and optimize RT-qPCR reaction conditions for determining the expression levels of miRNA-1202 in human peripheral venous blood. Materials and Methods: Peripheral blood samples were collected from 10 healthy volunteers, strictly adhering to the requirements for biological sample collection and preservation. Quantitative PCR reaction conditions were optimized, including primer annealing temperature, primer concentration, and template concentration. Optimization efficiency was evaluated based on the analysis of amplification curves and melting curves. Using the optimized parameters, the RT-qPCR protocol was established and finalized. The relative expression level of miRNA-1202 was calculated using the Livak method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), with miRNA-16 serving as the endogenous control. Results: The optimal reaction conditions included a primer concentration of 125 nM, an annealing temperature of 65°C, and a template concentration of 10 ng/μL. The study successfully established an RT-qPCR assay for determining miRNA-1202 expression levels utilizing these optimal conditions.

Keywords: RT-qPCR, miRNA-1202.

* Corresponding author.

E-mail address: phuongltm.ump@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5005>

Xây dựng và tối ưu quy trình RT-qPCR xác định mức độ biểu hiện của miRNA-1202 trong mẫu máu ở người

Lê Thị Minh Phương^{1,*}, Vũ Ngọc Diệp¹, Nguyễn Hiền Mai¹,
Lê Khánh Linh², Vũ Văn Nga¹, Đỗ Thị Quỳnh¹

¹Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội,
1 Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 7 tháng 5 năm 2026

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 8 năm 2026; Chấp nhận đăng ngày 22 tháng 9 năm 2026

Tóm tắt: Mục tiêu: Xây dựng quy trình và tối ưu các điều kiện phản ứng RT-qPCR xác định mức độ biểu hiện của miRNA-1202 trong mẫu máu ngoại vi ở người. Vật liệu và phương pháp: mẫu máu ngoại vi từ 10 tình nguyện viên, đảm bảo các yêu cầu về lấy và bảo quản mẫu sinh học. Tối ưu hoá các điều kiện phản ứng PCR định lượng gồm: nhiệt độ gắn mồi, nồng độ mồi và nồng độ khuôn mẫu. Phân tích đồ thị đường cong khuếch đại và đồ thị đường cong nóng chảy để đánh giá hiệu suất của phản ứng PCR. Dựa trên bộ thông số đã được tối ưu, tiến hành xây dựng và hoàn thiện quy trình RT-qPCR, tính toán mức độ biểu hiện tương đối của miRNA-1202 theo phương pháp Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), sử dụng miRNA-16 làm đối chứng nội. Kết quả: điều kiện tối ưu cho phản ứng gồm nồng độ mồi là 125 nM, nhiệt độ gắn mồi là 65°C và nồng độ khuôn mẫu là 10 ng/μL. Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình RT-qPCR xác định mức độ biểu hiện miRNA-1202 sử dụng các điều kiện tối ưu.

Từ khóa: RT-qPCR, miRNA-1202.

1. Mở đầu

MicroRNA (miRNA) là các phân tử RNA nhỏ, mạch đơn, không mã hóa protein (chiều dài khoảng 18-22 nucleotide), đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa biểu hiện gen ở người [1]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy rối loạn biểu hiện của miRNA có liên quan mật thiết đến cơ chế bệnh sinh của nhiều bệnh lý như ung thư, bệnh tim mạch, bệnh truyền nhiễm và tự miễn. MiRNA-1202 là một microRNA đặc trưng ở loài linh trưởng, được ghi nhận nhiều nhất ở mô não của người, hoặc lưu hành trong máu ngoại vi [2, 3]. Nghiên cứu của Lopez và cộng sự (2014) đã chỉ ra sự sụt giảm đáng kể mức độ biểu hiện của

miRNA-1202 ở vỏ não trước trán (Prefrontal Cortex - PFC) có liên quan đến bệnh rối loạn trầm cảm nặng (Major Depressive Disorder - MDD) – một bệnh lý có tính di truyền khoảng 30-40% [4]. Ngoài ra, sự thay đổi mức độ biểu hiện của miRNA-1202 còn được chứng minh liên quan tới một số bệnh ung thư (ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung, ung thư phổi,...) và các bệnh lý tim mạch (suy tim, xơ vữa động mạch,...) [5, 6]. Bên cạnh đó, miRNA là một phân tử có tính bảo tồn cao, tương đối ổn định trong các mẫu dịch cơ thể, do đó, miRNA-1202 trong mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học tiềm năng trong y học lâm sàng.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phuongltm.ump@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5005>

Mặc dù có vai trò quan trọng, việc xác định mức độ biểu hiện của miRNA vẫn đối mặt với nhiều thách thức. Các phương pháp truyền thống (như Northern Blot) hay các kỹ thuật tiên tiến (như giải trình tự gen thế hệ mới) đều bộc lộ những hạn chế nhất định về chi phí, thời gian hoặc yêu cầu kỹ thuật phức tạp. Trong bối cảnh đó, kỹ thuật RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR) hiện được coi là "tiêu chuẩn vàng" nhờ độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội [7]. Tuy nhiên, việc xác định mức độ biểu hiện miRNA còn gặp nhiều thách thức do đặc điểm kích thước nhỏ, nồng độ thấp trong mẫu sinh học, cùng với sự tương đồng trình tự giữa các miRNA. Bên cạnh đó, các điều kiện của phản ứng PCR như nhiệt độ gắn môi, nồng độ môi hay nồng độ mẫu đưa vào có thể ảnh hưởng đáng kể đến kết quả. Những hạn chế này đòi hỏi quy trình phân tích cần được tối ưu hóa và chuẩn hóa nhằm đảm bảo độ chính xác và tin cậy. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu xây dựng quy trình và tối ưu các điều kiện phản ứng RT-qPCR xác định mức độ biểu hiện của miRNA-1202 trong mẫu máu ngoại vi ở người.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Vật liệu: 2 mL mẫu máu ngoại vi được thu thập từ các tình nguyện viên tham gia nghiên cứu, mẫu được lưu trữ trong ống chống đông EDTA, sau đó được chuyển ngay vào dung dịch Trizol để phân tích. Lượng mẫu còn lại bảo quản trong tủ đông ở -20°C khi không sử dụng.

Tiêu chuẩn loại trừ: Tình nguyện viên có tiền sử mắc các bệnh lý tâm thần hoặc các hội chứng tâm lý; Tình nguyện viên mắc các bệnh lý viêm/loét mạn tính, bệnh lý tim mạch hoặc ung thư; Các mẫu máu bị huyết tán, đông đặc, mỡ máu cao, hoặc bảo quản không đúng điều kiện.

2.2. Hóa chất và thiết bị

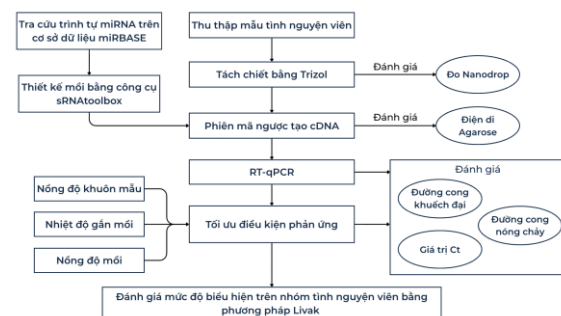
Các hoá chất: TRIzol™ LS Reagent (ThermoFisher – Mỹ), Chloroform, Isopropanol, Ethanol 75%, RNase-free water, RevertAid First

Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher – Mỹ), Thermo Scientific™ SYBR™ Green qPCR Master Mix (ThermoFisher – Mỹ).

Các trang thiết bị: Tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm (Eppendorf – Đức), máy đo quang phổ NanoDrop (Implen – Đức), máy 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems – Mỹ).

2.3. Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu: mô tả cắt ngang.



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu.

2.3.1. Tra cứu trình tự mục tiêu và thiết kế mồi

Trình tự của miRNA mục tiêu được tra cứu từ cơ sở dữ liệu miRBase. Sử dụng đối chứng nội là miRNA-16. Đây là miRNA đã được sử dụng làm đối chứng nội rộng rãi trong các nghiên cứu khác do có hàm lượng cao và ổn định trong huyết tương [8, 9].

Các cặp mồi đặc hiệu cho miRNA được thiết kế dựa trên nền tảng sRNAtoolbox/sRNAprimerDB, đảm bảo tính đặc hiệu và phù hợp với phản ứng RT-qPCR. Hệ thống mồi gồm hai mồi đặc hiệu RP1/RP2 sử dụng trong phản ứng phiên mã ngược và hai mồi chung (universal) P1/P2 sử dụng trong phản ứng RT-qPCR. Nhằm kéo dài phân tử miRNA để thuận lợi cho quá trình phân tích, mỗi mồi đặc hiệu có chiều dài khoảng 35 nucleotide, gồm đầu 5' là trình tự universal và đầu 3' gồm 11 nucleotide đặc hiệu bổ sung với trình tự của miRNA-1202 hoặc miRNA-16. Cặp mồi P1/P2 có chiều dài 20-24 nucleotide, tỷ lệ GC khoảng 45-55% và nhiệt độ nóng chảy (Tm) từ 59-65°C, phù hợp với điều kiện khuếch đại của phản ứng RT-qPCR.

2.3.2. Tách chiết RNA tổng số

2 mL mẫu máu toàn phần của tình nguyện viên được thu thập bằng ống chống đông EDTA. Mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi được trộn với thuốc thử TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen, Life Sciences, Carlsbad, CA) theo tỷ lệ 1:3 và ủ ở nhiệt độ phòng nhằm ly giải tế bào và bất hoạt RNase. Sau đó, bổ sung chloroform để tách pha, ly tâm thu pha nước chứa RNA. RNA được kết tủa bằng isopropanol, tiếp tục ly tâm để thu cặn RNA, sau đó rửa bằng ethanol 75% nhằm loại bỏ tạp chất và muối còn sót lại. Cặn RNA được làm khô hoàn toàn rồi hòa tan trong nước không chứa

RNase và ủ ở 60°C để tăng hiệu quả hòa tan. RNA thu được được sử dụng cho các bước định lượng và phân tích biểu hiện miRNA tiếp theo. Độ tinh sạch và nồng độ RNA thu được được đánh giá qua phổ hấp thụ UV (tỉ lệ A260/280) trên máy đo quang phổ Nanodrop. Độ tinh sạch của RNA đạt chuẩn nếu chỉ số A260/280 đạt 1,8-2,2.

2.3.3. Tổng hợp cDNA (phiên mã ngược)

Phiên mã ngược miRNA bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher – Hoa Kỳ). Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1. Trình tự mỗi được sử dụng trong quy trình phiên mã ngược

	Tên mỗi	Trình tự mỗi
Phiên mã ngược	hsa-miR1202RP1specific	5'-GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTGCTCCCCCACTG-3'
	hsa-miR1202RP2specific	5'-GGGATTCTGGAAGATGATGATGACGTGCCAGCTGC-3'
	hsa-miR16-5p RP1specific	5'-GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTGCGCCAATATTT-3'
	hsa-miR16-5p RP2specific	5'-GGGATTCTGGAAGATGATGATGACTAGCAGCACGT-3'
PCR	P1 (universal)	5'-GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTG-3'
	P2 (universal)	5'-GGGATTCTGGAAGATGATGATGAC-3'

Quy trình tổng hợp cDNA gồm hai bước chính, thực hiện hoàn toàn trên đá lạnh. Đầu tiên, trộn 4 µL RNA khuôn, 2 µL mỗi và 6 µL nước không chứa nuclease, rồi ủ ở 65°C trong 5 phút để làm biến tính, sau đó làm lạnh nhanh trên đá để mỗi bắt cặp. Tiếp theo, bổ sung 4 µL đệm 5X, 1 µL chất ức chế RNase, 2 µL dNTP và 1 µL enzyme RevertAid RT. Hỗn hợp được ủ trên máy PCR ở 42°C trong 60 phút để tổng hợp chuỗi polynucleotide, và kết thúc bằng việc ủ ở 70°C trong 5 phút nhằm bất hoạt enzyme.

Sử dụng mỗi đặc hiệu trong phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA giúp tăng sản lượng cDNA mục tiêu và giảm hiện tượng khuếch đại không đặc hiệu. Độ đặc hiệu của sản phẩm cDNA được đánh giá bằng điện di trên gel Agarose.

2.3.4. Thiết lập và tối ưu hóa phản ứng RT-PCR

Phản ứng realtime PCR thực hiện trên hệ thống 7500 Fast Real-Time PCR System. Thành phần phản ứng bao gồm cDNA khuôn, mỗi universal với trình tự như bảng 1 và master mix phù hợp.

Các điều kiện phản ứng được tối ưu hóa bao gồm: nồng độ mỗi, nhiệt độ gắn mỗi và nồng độ mẫu.

Tối ưu nồng độ mỗi: Phản ứng được thử nghiệm trên dải nồng độ mỗi là: 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM. Hỗn hợp phản ứng sau đó được đưa vào hệ thống máy luân nhiệt 7500 Fast Real-time PCR (Thermo Fisher Scientific) với chu trình nhiệt độ được tối ưu hóa để rút ngắn thời gian chạy xuống còn 30-40 phút bao gồm: Giai đoạn biến tính ban đầu (Initial Denaturation) ở 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ luân nhiệt gồm: 1. Bước biến tính ở 95°C trong 5 giây và 2. Bước gắn mỗi và kéo dài kết hợp (Annealing/Extension) ở 65°C trong 30 giây.

Tối ưu nồng độ mẫu: Nồng độ mẫu được pha loãng về dải nồng độ mong muốn để tối ưu: 10 ng/µL, 5 ng/µL, 1.25 ng/µL, 0.625 ng/µL.

Tối ưu nhiệt độ gắn mỗi: Hỗn hợp phản ứng được đưa vào hệ thống máy Real-time PCR và cài chu trình nhiệt độ 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ luân nhiệt gồm bước biến tính ở 95°C trong 5 giây và bắt cặp và kéo dài kết hợp thử nghiệm ở 55°C, 60°C, 65°C trong 30 giây.

Mẫu đối chứng âm không chứa mạch khuôn được sử dụng để phát hiện khả năng nhiễm bẩn trong phản ứng. Đồng thời, tính đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại được đánh giá thông qua hình dạng đường cong khuếch đại và phân tích đường cong nóng chảy.

2.3.5. Tính toán mức độ biểu hiện của miRNA-1202

Mức độ biểu hiện của miRNA-1202 được phân tích thông qua các biểu đồ khuếch đại, đường cong nóng chảy và tính toán thông qua chu kỳ ngưỡng bằng phương pháp Livak [10]:

$$\text{Giá trị biểu hiện tương đối (RQ)} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Dữ liệu và các biểu đồ được trích xuất trực tiếp từ phần mềm phân tích kết nối với hệ thống máy 7500 Fast Real-Time PCR. Quá trình tính toán mức độ biểu hiện tương đối theo phương pháp Livak được phần mềm phân tích chuyên dụng của thiết bị thực hiện tự động.

2.5. Đạo đức nghiên cứu

Tình nguyện viên đồng thuận nghiên cứu bằng văn bản sau khi được giải thích chi tiết về nghiên cứu, mọi thông tin đều được bảo mật và chỉ sử dụng cho mục đích nghiên cứu. Việc thực hiện nghiên cứu tuân thủ các nguyên tắc trong nghiên cứu y sinh.

3. Kết quả

3.1. Xây dựng quy trình

3.1.1. Tách chiết RNA

Bảng 2. Kết quả tách chiết RNA tổng số (đơn vị: ng/μL)

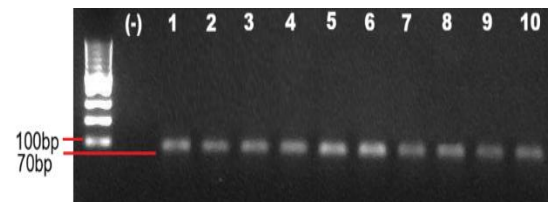
	Nồng độ RNA tổng số	Độ tinh sạch (A260/A280)
Nhỏ nhất	12,92	1,843
Lớn nhất	145,16	1,850
Trung bình	140,8	1,801

Chúng tôi tiến hành tách chiết RNA tổng số bằng TRIzol. Kết quả đo quang phổ được thể hiện ở Bảng 3.

Nồng độ RNA tổng số thu được nằm trong khoảng 121,92 - 145,16. Độ tinh sạch nằm trong khoảng 1,843 - 1,850.

3.1.2. Tổng hợp cDNA

Sản phẩm cDNA sau khi được tổng hợp trên máy 7500 Fast Realtime PCR được kiểm tra trên gel điện di 3%. Nạp mỗi giếng 5 μL sản phẩm PCR + 1 μL loading dye 6× với điện áp 110V, cường độ dòng điện 70 mA và công suất 8W. Kết quả điện di được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm cDNA từ các mẫu nghiên cứu.

Kết quả điện di có 1 vạch duy nhất ở đoạn khoảng 70bp, sáng rõ, không có vạch phụ.

3.2. Tối ưu điều kiện phản ứng RT-qPCR

3.2.1. Tối ưu nồng độ môi

Chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ môi với 4 nồng độ. Kết quả khi phân tích từng nồng độ môi được thể hiện ở Hình 3 và chạy cả 4 dải nồng độ được thể hiện ở Hình 4.

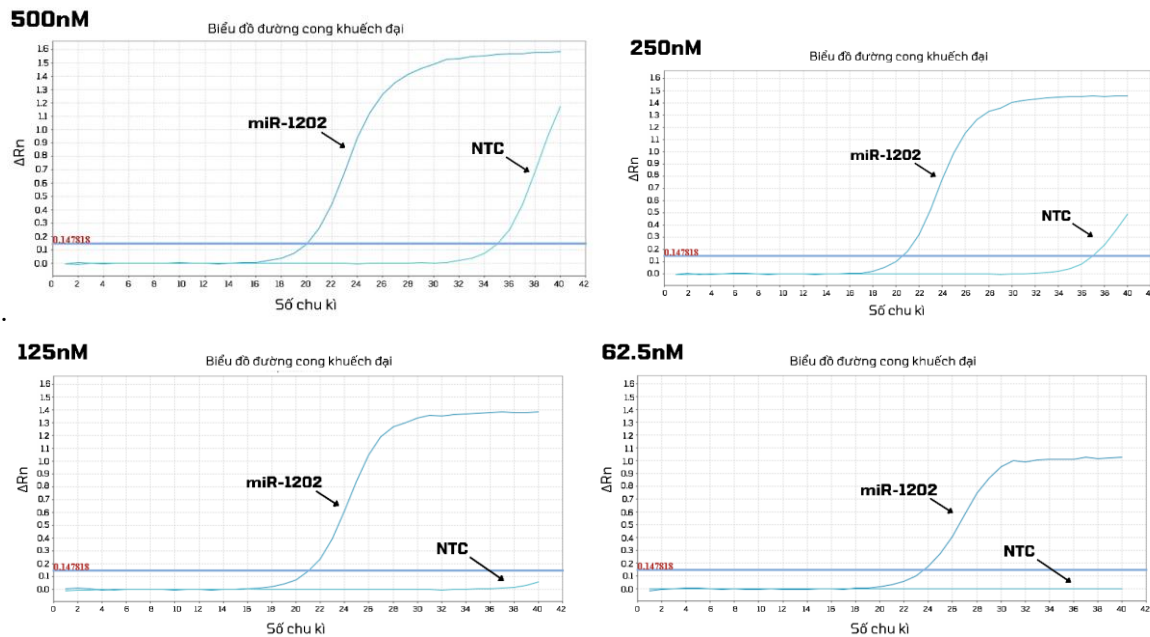
Kết quả cho thấy nồng độ môi 125nM có giá trị Ct (Cycle threshold - số chu kỳ PCR tại đó tín hiệu huỳnh quang của phản ứng lần đầu tiên vượt qua ngưỡng (threshold) được đặt trong vùng khuếch đại theo cấp số nhân) nằm trong khoảng phù hợp, tín hiệu huỳnh quang (ΔR_n) duy trì ở mức tốt. Đồ thị của mẫu đối chứng âm (NTC) gần như nằm ngang và không cắt ngưỡng.

3.2.2. Tối ưu nồng độ cDNA khuôn mẫu

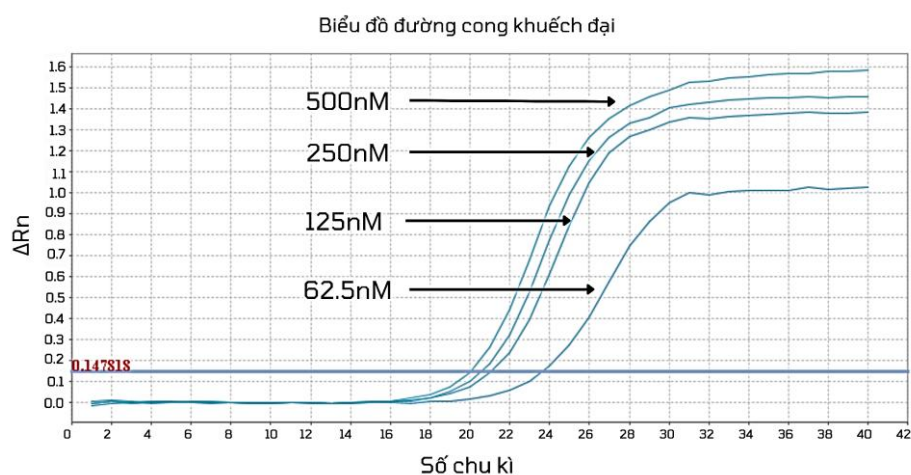
Chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ mẫu với 4 nồng độ. Kết quả tối ưu trên dải 4 nồng độ cDNA khuôn mẫu được thể hiện ở Hình 5.

Kết quả khảo sát bốn nồng độ cDNA khuôn mẫu (0,625; 1,25; 5 và 10 ng/ μ L) cho thấy tất cả các nồng độ đều tạo được đường cong khuếch đại đặc trưng. Tuy nhiên, khi nồng độ khuôn tăng, giá trị Ct giảm và cường độ tín hiệu huỳnh quang tăng rõ rệt. Nồng độ 10 ng/ μ L cho đường cong vượt ngưỡng sớm nhất, pha khuếch đại rõ

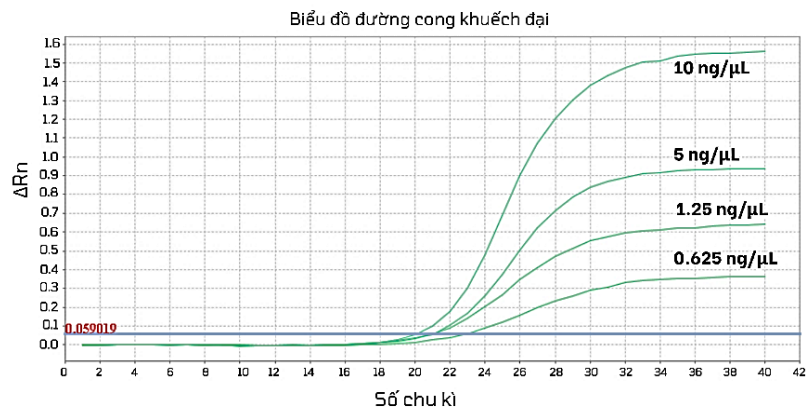
ràng và tín hiệu huỳnh quang cao nhất, phản ánh hiệu quả khuếch đại tối ưu. Trong khi đó, các nồng độ thấp hơn cho tín hiệu yếu hơn và Ct cao hơn. Do đó, nồng độ cDNA 10 ng/ μ L được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đảm bảo độ nhạy và tính ổn định của phản ứng RT-qPCR.



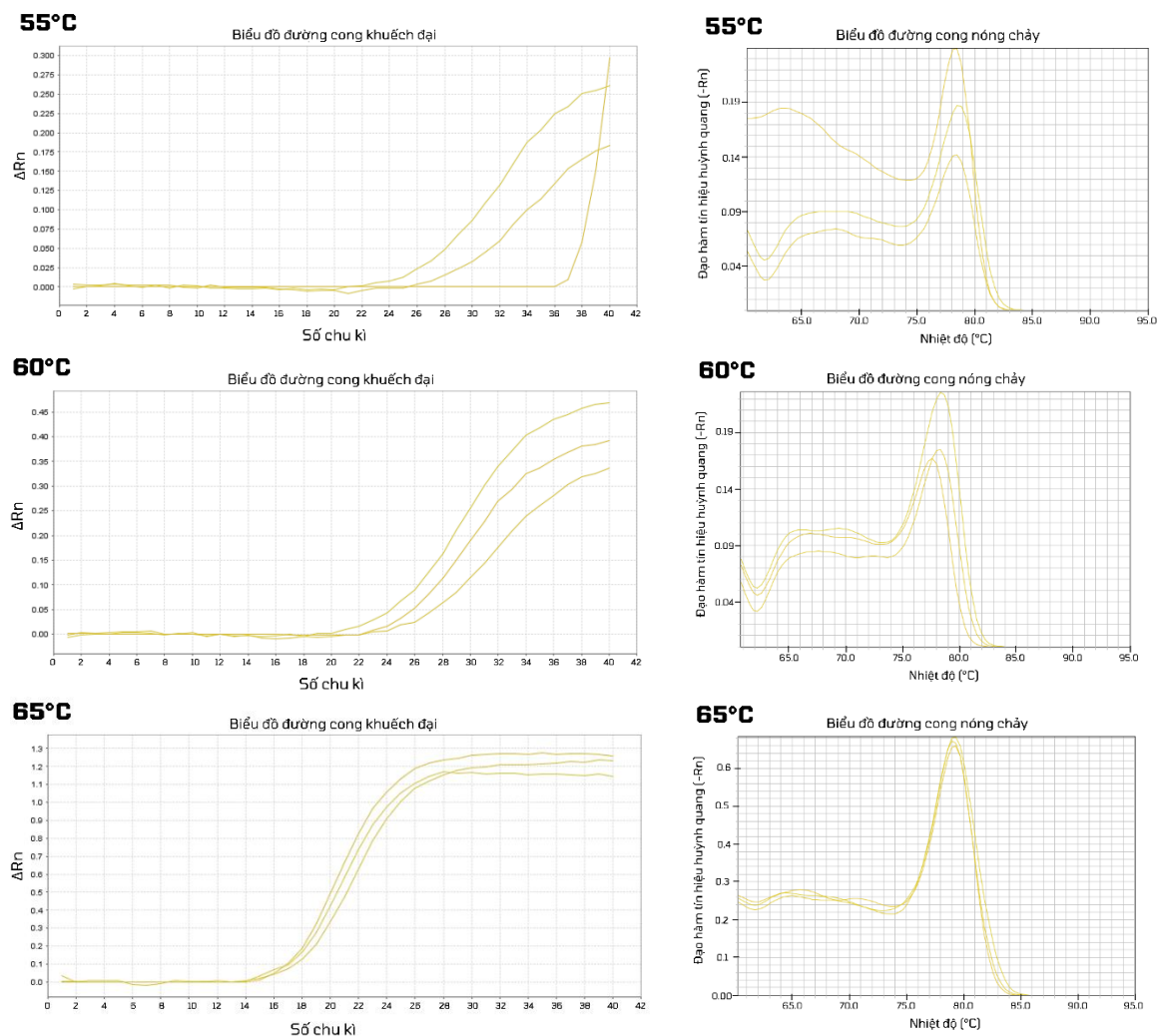
Hình 3. Kết quả tối ưu trên từng nồng độ môi.
 Chú thích: miR-1202: đường cong khuếch đại của miRNA-1202 mẫu;
 NCT: đường cong khuếch đại của chứng âm.



Hình 4. Đồ thị đường cong khuếch đại trên dải 4 nồng độ môi.



Hình 5. Kết quả tối ưu trên dải 4 nồng độ DNA khuôn mẫu.



Hình 6. Đồ thị đường cong khuếch đại và đường cong nóng chảy của 3 nhiệt độ.

3.2.3. Tối ưu nhiệt độ gắn mẫu

Để đánh giá nhiệt độ gắn mẫu tối ưu cho phản ứng, một mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số của một mẫu máu ngoại vi có chất lượng đạt yêu cầu được lựa chọn làm mẫu khảo sát. Chúng tôi tiến hành thử nghiệm với 3 mức nhiệt độ gắn mẫu. Với mỗi mức nhiệt độ, thực hiện chạy lặp lại 3 lần, đánh giá biểu đồ đường cong khuếch đại và biểu đồ đường cong nóng chảy để lựa chọn nhiệt độ gắn mẫu tối ưu.

Ở các ngưỡng nhiệt độ 55°C và 60°C, đường cong khuếch đại không ổn định, đường cong nóng chảy xuất hiện đỉnh phụ. Khi nâng nhiệt độ lên ngưỡng 65°C, đường cong khuếch đại của mẫu ổn định và có đủ 3 pha rõ ràng, tín hiệu

huỳnh quang thu được mạnh và ổn định. Biểu đồ đường cong nóng chảy chỉ có 1 đỉnh duy nhất, tăng cao và sắc nét.

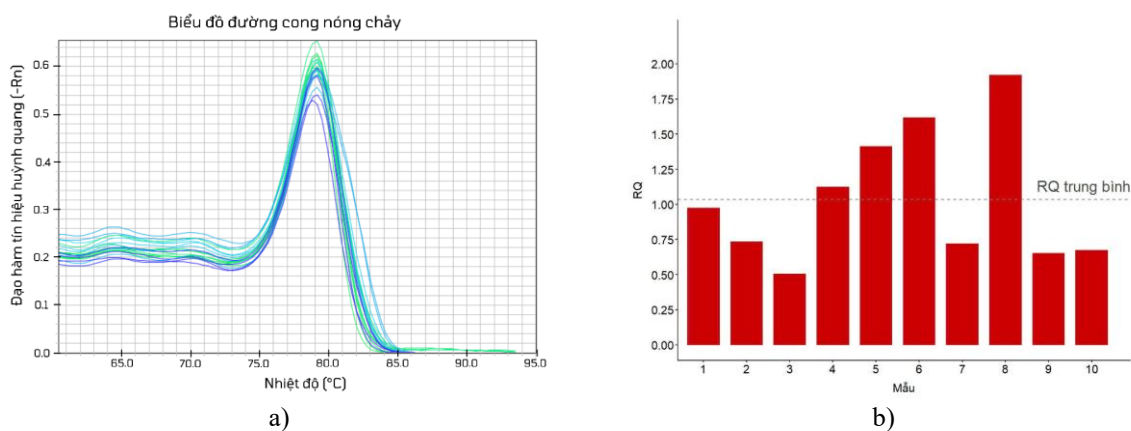
3.3. Đánh giá mức độ biểu hiện miRNA-1202 trong mẫu máu ngoại vi

Từ các kết quả trên, chúng tôi đã xác định được điều kiện tối ưu của phản ứng đánh giá mức độ biểu hiện miRNA-1202 trong mẫu máu ngoại vi là: Nồng độ mẫu là 125 nM, nhiệt độ gắn mẫu là 65°C, nồng độ khuôn mẫu là 10 ng/ μ L. Sử dụng các điều kiện này, chúng tôi tiến hành xác định mức độ biểu hiện của miRNA trong mẫu máu ngoại vi của 10 tình nguyện viên bằng kỹ thuật RT-qPCR. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 3. Kết quả định lượng mức độ biểu hiện tương đối của miR-1202 cho 10 mẫu

Mẫu	Ct miRNA-16	Ct miRNA-1202	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ
1	23,789	24,03	0,241	0,035	0,976
2	24,127	24,778	0,651	0,445	0,735
3	23,148	24,334	1,186	0,980	0,507
4	23,578	23,615	0,037	-0,169	1,124
5	23,701	23,406	-0,295	-0,501	1,415
6	24,556	24,067	-0,489	-0,695	1,619
7	23,452	24,132	0,680	0,474	0,720
8	24,019	23,284	-0,735	-0,941	1,920
9	23,773	24,596	0,823	0,617	0,652
10	24,371	25,147	0,776	0,570	0,674
Mẫu chứng	20,991	21,197	0,206	0,000	1,000
RQ trung bình					1,034

Chú thích: Xác định mức độ biểu hiện của miRNA-1202 theo công thức của Lyvak (2013). Trong đó: Ct (Cycle threshold): giá trị ngưỡng chu kỳ; Δ Ct = Ct(miRNA-1202) – Ct(miRNA-16); $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(mẫu nghiên cứu) – Δ Ct(mẫu đối chứng); RQ (Relative Quantification) = $2^{(-\Delta\Delta$ Ct)}. Theo nghiên cứu của Pieter Mestdagh (2009), mẫu đối chứng được sử dụng là mẫu pool của 10 mẫu phân tích [11].



Hình 7. a) Biểu đồ đường cong nóng chảy; b) Biểu đồ so sánh mức độ biểu hiện của 10 mẫu.

Đường cong nóng chảy của tất cả các mẫu đều cho 1 đỉnh đặc hiệu. Bảng dữ liệu cho thấy giá trị Ct của các mẫu duy trì ở mức ổn định, trong khoảng từ 23,1 đến 24,5. Giá trị RQ (Relative Quantification – Định lượng tương đối) của các mẫu có sự phân tán từ 0,5 đến 1,9, với giá trị trung bình xấp xỉ 1 cho thấy sự biến thiên sinh học ở mức độ vừa phải giữa các cá thể trong nhóm nghiên cứu.

4. Bàn luận

Chất lượng RNA đầu vào là yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả phiên mã ngược và độ tin cậy của phản ứng RT-qPCR. Nhiều nghiên cứu đã so sánh kết quả tách chiết RNA bằng các phương thức khác nhau, như tách bằng Trizol, bằng cột Silica hoặc bằng hạt từ, kết quả cho thấy về nồng độ RNA thu được có sự khác biệt và chênh lệch đáng kể giữa các nghiên cứu. Tuy nhiên, về các tiêu chí như độ tinh sạch, độ ổn định của RNA khi tách chiết bằng phương pháp này đáp ứng được yêu cầu mẫu đầu vào khi tiến hành phản ứng RT-PCR [12, 13]. Đáng chú ý, Aarti Gautam và cộng sự còn chỉ ra rằng, tách chiết RNA bằng TRIzol cho hiệu suất thu được miRNA cao hơn các phương pháp khác [14]. Trong nghiên cứu của chúng tôi bước đầu thử nghiệm với 10 mẫu thấy rằng tất cả 10 mẫu RNA thu được đều có độ tinh sạch với tỷ lệ hấp thụ A260/A280 dao động từ 1,8–1,9, đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Do phân tử miRNA có kích thước rất nhỏ, chỉ khoảng 20-22bp, tương đương với kích thước của 1 primer, nên việc thiết kế mồi để khuếch đại phân tử này có nhiều khó khăn. Chen và cộng sự (2005) đã đề xuất phương pháp stem-loop RT-PCR, theo đó 1 mồi vòng đặc biệt được thiết kế nhằm kéo dài kích thước phân tử cDNA. Sau đó phản ứng realtime PCR được thực hiện với một cặp mồi đặc hiệu và một mồi chung. Sản phẩm PCR được phát hiện với Taqman Probe [15]. Tuy nhiên, kỹ thuật này không cho phép phát hiện sản phẩm đặc hiệu thông qua phân tích đường cong nóng chảy, do vậy, nếu xuất hiện sản phẩm không đặc hiệu, phương pháp này sẽ rất khó để kiểm tra được [16]. Jingli Yan và cộng sự

(2013) đã đề xuất phương pháp RT-qPCR, trong đó sử dụng bộ bốn mồi: RP1, RP2, P1 và P2. RP1 chứa P1 và trình tự 11 base R1c bổ sung cho đầu 3' của miRNA mục tiêu. RP2 chứa P2 và trình tự 11 base R2 giống với đầu 5' của miRNA mục tiêu, phát hiện sản phẩm PCR sử dụng thuốc nhuộm SYBR Green cho phép kiểm soát các sản phẩm PCR không mong muốn bằng phân tích đường cong nóng chảy [17]. Trong đó, cặp mồi RP1, RP2 được đưa vào ngay từ bước phiên mã ngược để tạo cDNA đặc hiệu cho phân tử miRNA khảo sát.

Nghiên cứu của chúng tôi áp dụng theo phương pháp của Jingli Yan và cộng sự, sản phẩm cDNA sau tổng hợp được đánh giá bằng điện di trên gel agarose cho thấy xuất hiện một băng rõ nét, đồng nhất và không ghi nhận băng phụ. Kết quả này cho thấy phản ứng phiên mã ngược diễn ra hiệu quả và có tính đặc hiệu tương đối cao.

Trong phản ứng realtime PCR xác định mức độ biểu hiện của miRNA, các mồi có nguy cơ liên kết với các trình tự RNA ngoài mục tiêu. Tuy vậy, chưa có đủ thông tin về các yếu tố ảnh hưởng đến sự liên kết của mồi và nồng độ RNA thực tế để tính toán sự cân bằng tối ưu giữa nồng độ mồi và nồng độ RNA [18]. Vì vậy, cần phải thử nghiệm với từng điều kiện cụ thể.

Đối với nồng độ mồi, mặc dù các mức nồng độ khảo sát đều cho giá trị Ct nằm trong khoảng 20–23 chu kỳ, tuy nhiên ở các nồng độ cao (250 nM và 500 nM) xuất hiện tín hiệu khuếch đại không đặc hiệu trên mẫu đối chứng âm. Hiện tượng này có thể liên quan đến sự hình thành primer-dimer hoặc khuếch đại ngoài mục tiêu khi nồng độ mồi quá cao. Trong khi đó, nồng độ 125 nM vừa đảm bảo tín hiệu khuếch đại tốt vừa hạn chế được sản phẩm không đặc hiệu, do đó được lựa chọn là điều kiện tối ưu. Kết quả này phù hợp với các khuyến cáo hiện nay đối với phản ứng SYBR Green khi khuếch đại các trình tự đích ngắn như miRNA, trong đó nồng độ mồi thấp thường giúp cải thiện độ đặc hiệu của phản ứng [18].

Về nồng độ khuôn mẫu, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy khi nồng độ khuôn giảm, giá trị Ct tăng lên và tín hiệu huỳnh quang suy

giảm rõ rệt. Trong các mức khảo sát, nồng độ 10 ng/ μ L cho kết quả tối ưu với Ct thấp nhất, tín hiệu tách nền rõ và đường cong khuếch đại ổn định.

Trình tự của các phân tử miRNA có độ tương đồng rất cao dẫn đến phản ứng realtime PCR rất dễ xảy ra tình trạng khuếch đại không đặc hiệu. Một trong các biện pháp khắc phục tình trạng này được các tác giả đề xuất là nâng nhiệt độ gắn mỗi cao hơn T_m của mỗi [19]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhiệt độ T_m của các cặp mỗi miRNA 1202 trong khoảng 58-63°C. Kết quả thử nghiệm cho thấy ở 55°C và 60°C, phản ứng xuất hiện tín hiệu yếu và sản phẩm không đặc hiệu, trong khi ở 65°C phản ứng tín hiệu huỳnh quang mạnh, đường cong khuếch đại rõ ba pha và không ghi nhận sản phẩm phụ. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó.

Sau khi tối ưu các điều kiện phản ứng, chúng tôi tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện miRNA-1202 trên 10 mẫu nghiên cứu. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện đường cong nóng chảy đơn đỉnh, sắc nét và không ghi nhận tín hiệu bất thường ở vùng nhiệt độ thấp, cho thấy phản ứng có tính đặc hiệu tốt và hạn chế được hiện tượng khuếch đại ngoài mục tiêu. Giá trị biểu hiện tương đối (Relative Quantification - RQ) dao động trong khoảng 0,5–1,9, phản ánh sự biến thiên sinh học nhất định giữa các cá thể nhưng vẫn nằm trong giới hạn phù hợp đối với mẫu máu ngoại vi ở người khỏe mạnh. Kết quả này cho thấy quy trình được xây dựng có khả năng tạo kết quả ổn định khi tái lập trên nhiều mẫu khác nhau.

Mặc dù đạt được mục tiêu đề ra, nghiên cứu vẫn còn hạn chế là quy trình mới được đánh giá trên số lượng mẫu chưa nhiều và chủ yếu ở người khỏe mạnh nên chưa phản ánh đầy đủ sự biến thiên trong các nhóm bệnh lý.

Nhìn chung, các kết quả thu được cho thấy quy trình RT-qPCR được xây dựng trong nghiên cứu có khả năng phát hiện và định lượng miRNA-1202 với tín hiệu khuếch đại ổn định và đặc hiệu trong điều kiện phòng thí nghiệm tại đơn vị. Quy trình này có thể tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến vai trò của miRNA-1202 trong bệnh học và ứng dụng của miRNA như dấu ấn sinh học trong y học phân tử.

5. Kết luận

Phương pháp RT-qPCR xác định mức độ biểu hiện của miRNA-1202 trong máu ngoại vi đã được thiết lập thành công, sử dụng 3 điều kiện đã được tối ưu: nồng độ mỗi là 125nM, nhiệt độ gắn mỗi là 65°C, nồng độ khuôn mẫu là 10 ng/ μ L.

Lời cảm ơn

Đề tài này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp cơ sở của Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội mã số CS.25.02. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Y Dược – và Khoa Y Dược học cơ sở - Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội đã ủng hộ và tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] H. Kim, Y. Y. Lee, V. N. Kim, The Biogenesis and Regulation of Animal Micromas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 26, 2025, pp. 276-296, <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00805-0>.
- [2] J. P. Lopez, R. Lim, C. Cruceanu, L. Crapper, C. Fasano, B. Labonte, G. Maussion, J. P. Yang, V. Yerko, E. Vigneault, S. E. Mestikawy, N. Mechawar, P. Pavlidis, G. Turecki, Mir-1202 is A Primate-Specific and Brain-Enriched Micromas Involved in Major Depression and Antidepressant Treatment, *Nat. Med.*, Vol. 20, 2014, pp. 764-768, <https://doi.org/10.1038/nm.3582>.
- [3] L. M. Fiori, J. P. Lopez, S. R. Devantoy, M. Berlim, E. Chachamovich, F. Jollant et al., Investigation of miR-1202, miR-135a, and miR-16 in Major Depressive Disorder and Antidepressant Response, *Int J Neuropsychopharmacol.*, Vol. 20, 2017, pp. 619-62.
- [4] S. Han, Q. Zheng, Z. Zheng, J. Su, X. Liu, C. Shi, B. Li, X. Zhang, M. Zhang, Q. Yu, Z. Hou, T. Li, B. Zhang, Y. Lin, G. Wen, Y. Deng, K. Liu, K. Xu, Exosomal Mir-1202 Mediates Brodmann Area 44 Functional Connectivity Changes in Medication-Free Patients With Major Depressive Disorder: An Fmri Study, *J. Affect. Disord.*, Vol. 356, 2024, pp. 470-476, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.04.042>.

- [5] X. Chen, Y. Du, W. Chen, X. Yang, J. Fang, S. Qu, MiR-1202 Increases Radioresistance in Nasopharyngeal Carcinoma by Targeting NAIF1/MAPK/ERK Pathway, *iScience*, Vol. 29, 2026, pp. 115135.
- [6] J. Xiao, Y. Zhang, Y. Tang, H. Dai, Y. O. Yang, C. Li et al., MiRNA-1202 Promotes the TGF- β 1-Induced Proliferation, Differentiation and Collagen Production of Cardiac Fibroblasts by Targeting nNOS, *PLoS One*, Vol. 16, 2021, pp. e0256066.
- [7] Y. Chen, J. A. Gelfond, L. M. McManus, P. K. Shireman, Reproducibility of Quantitative RT-PCR Array in Mirna Expression Profiling and Comparison with Microarray Analysis, *BMC Genomics*, Vol. 10, 2009, pp. 407, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-407>.
- [8] K. Schlosser, L. A. McIntyre, R. J. White, D. J. Stewart, Customized Internal Reference Controls for Improved Assessment of Circulating MicroRNAs in Disease, *PLOS ONE*, Vol. 10, 2015, pp. e0127443, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127443>.
- [9] N. X. Hoan, D. P. Giang, N. T. P. Thao, D. H. Tra, M. T. Binh, The Initial Assessment of Microrna-21 Expression Levels in Peripheral Blood in Gastric Cancerin Vietnamese Patients (in Vietnamese), *J. 108-Clin. Med. Phamarcy*, Vol. 19, No. 4, 2024, <https://doi.org/10.52389/ydls.v19i4.2245>.
- [10] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, Vol. 25, 2001, pp. 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [11] P. Mestdagh, P. V. Vlierberghe, A. D. Weer, D. Muth, F. Westermann, F. Speleman, J. Vandesompele, A Novel and Universal Method for Microrna RT-qPCR Data Normalization, *Genome Biol*, Vol. 10, 2009, pp. R64, <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r64>.
- [12] T. Lederer, N. M. Hipler, C. Thon, J. Kupcinkas, A. Link, Comparison of Fecal MicroRNA Isolation Using Various Total RNA Isolation Kits, *Genes*, Vol. 15, 2024, pp. 498, <https://doi.org/10.3390/genes15040498>.
- [13] K. Trakunram, N. Champoochana, P. Chaniad, P. Thongsuksai, P. Raungrut, MicroRNA Isolation by Trizol-Based Method and Its Stability in Stored Serum and cDNA Derivatives, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, Vol. 20, 2019, pp. 1641-1647, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1641>.
- [14] A. Gautam, R. Kumar, G. Dimitrov, A. Hoke, R. Hammamieh, M. Jett, Identification of Extracellular miRNA in Archived Serum Samples by Next-Generation Sequencing from RNA Extracted Using Multiple Methods, *Mol. Biol. Rep*, Vol. 43, 2016, pp. 1165-1178, <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4043-6>.
- [15] C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen et al., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, 2005, pp. e179-e179.
- [16] I. Balcells, S. Cirera, P. K. Busk, Specific and Sensitive Quantitative RT-PCR of miRNA with DNA Primers, *BMC Biotechnol*, Vol. 11, 2011, pp. 70, <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-70>.
- [17] J. Yan, N. Zhang, C. Qi, X. Liu, D. Shangguan, One-Step Real Time RT-PCR for Detection of microRNAs, *Talanta*, Vol. 110, 2013, pp. 190-195, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.028>.
- [18] P. K. Busk, A Tool for Design Of Primers for MicroRNA-Specific Quantitative RT-qPCR, *BMC Bioinformatics*, Vol. 15, 2014, pp. 29, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>.
- [19] X. He, Q. Zhang, Y. Liu, X. Pan, Increasing Specificity of Real time PCR to Detect MicroRNA Through Primer Design and Annealing Temperature Increase, *Beijing Da Xue Xue Bao*, Vol. 41, 2009, pp. 691-698.