

# Tạo bộ mẫu chuẩn định lượng tuyệt đối một số RNA dài không mã hóa phục vụ nghiên cứu ung thư biểu mô tế bào gan

## Development of standard templates for absolute quantification of some long non-coding rnas for hepatocellular carcinoma research

Bùi Lan Anh<sup>1,\*</sup>, Lê Thị Hồng Vân<sup>2</sup>,  
Nguyễn Văn Tâm<sup>1</sup>, Phạm Nhật Hằng<sup>3</sup>  
và Hoàng Văn Tổng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Học viện Quân y,  
<sup>2</sup>Trường ĐHKHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) là loại ung thư có tỷ lệ tử vong cao. Long non-coding RNA (lncRNA) là RNA không mã hóa protein, được xem như dấu ấn sinh học tiềm năng cho chẩn đoán sớm ung thư. Nghiên cứu thực hiện nhằm tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hóa một số lncRNA, nhân dòng trong *E. coli* và thiết lập bộ mẫu chuẩn phục vụ định lượng tuyệt đối. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** lncRNA lựa chọn gồm *LINC02560*, *LINC02487*, *HCG22*, *HN44-AS1*, *C5orf66-AS1*. Các kỹ thuật chính gồm PCR, tái tổ hợp, nhân dòng và định lượng tuyệt đối bằng Real-time PCR. **Kết quả:** năm vector tái tổ hợp mang gen lncRNA được nhân dòng thành công trong *E. coli* và các bộ mẫu chuẩn định lượng tuyệt đối đã được thiết lập. Các mẫu đạt hiệu suất khuếch đại cao (95,45-109,14%), đặc hiệu và lặp lại tốt (CV% < 10%), tuyến tính cao ( $R^2 > 0,99$ ). **Kết luận:** Kết quả này tạo cơ sở quan trọng cho nghiên cứu định lượng lncRNA trong UTBMTBG, góp phần chẩn đoán sớm và tiên lượng điều trị ung thư gan.

**Từ khóa:** Long non-coding RNA (lncRNA); nhân dòng; bộ mẫu chuẩn

### Summary

**Objective:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the cancers with the highest mortality rate. Long non-coding RNAs (lncRNAs), a class of non-protein-coding RNAs, have been recognized as potential biomarkers for early cancer diagnosis. This study aims to develop a lncRNA panel samples for absolute quantification of lncRNAs. **Subjects and Methods:** Five lncRNAs (*LINC02560*, *LINC02487*, *HCG22*, *HN44-AS1*, and *C5orf66-AS1*) were selected. Recombinant cloning was performed using PCR amplification, DNA recombination, and propagation in *E. coli*. Standard DNA templates were developed, and absolute quantification was conducted using real-time PCR. **Results:** Recombinant vectors harboring sequences of the five target lncRNAs were successfully cloned into *E. coli*. Standardized reference materials for absolute quantification were established, demonstrating high amplification efficiency (95.45 - 109.14%), strong specificity, good reproducibility (CV% < 10%), and high linearity ( $R^2 > 0.99$ ). **Conclusion:** The results provide standard panel samples that enable the

Ngày nhận bài: 24/12/2025, ngày chấp nhận đăng: 10/4/2026

\* Tác giả liên hệ: [anhbuibiovn@gmail.com](mailto:anhbuibiovn@gmail.com) - Học viện Quân y

accurate identification of lncRNA biomarkers in HCC research, supporting early diagnosis and prognostic evaluation in liver cancer.

**Keywords:** Long non-coding RNAs (lncRNAs), cloning, standard templates.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là căn bệnh có xu hướng gia tăng nhanh chóng cả về tỷ lệ mắc mới lẫn tỷ lệ tử vong hàng năm trên toàn cầu<sup>1</sup>. Tại Việt Nam, ung thư gan đứng thứ hai về số ca mắc mới và đứng đầu về số ca tử vong do ung thư<sup>2</sup>. Trong đó, ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) chiếm đến 90% các trường hợp ung thư gan<sup>3</sup>. Một trong những yếu tố nguy cơ chính dẫn đến UTBMTBG là tình trạng xơ gan, thường do nhiễm virus viêm gan B hoặc viêm gan C, chiếm đến 80-90% tổng số trường hợp<sup>4</sup>. Gần đây, các RNA dài không mã hóa (long non-coding RNA - lncRNA) là những phân tử RNA có chiều dài trên 200 nucleotide không dịch mã thành protein, đã được xác định có vai trò điều hòa quan trọng trong hoạt động của hệ gen<sup>5</sup>. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy lncRNA có sự biểu hiện bất thường trong UTBMTBG, gợi mở tiềm năng của chúng như các dấu ấn sinh học mới trong chẩn đoán, theo dõi tiến triển bệnh<sup>5,6</sup>. Đa số các công trình này chủ yếu sử dụng phương pháp định lượng tương đối, do quy trình thực hiện đơn giản, chi phí thấp và đáp ứng được yêu cầu khảo sát ban đầu. Tuy nhiên, phương pháp này phụ thuộc nhiều vào gene nội chuẩn, vốn có thể dao động giữa các loại mô hoặc trong các điều kiện sinh lý, bệnh lý khác nhau, từ đó ảnh hưởng đến độ tin cậy khi so sánh giữa các nhóm mẫu hoặc giữa các nghiên cứu độc lập<sup>7</sup>. Để tiến đến ứng dụng thực tiễn, đặc biệt trong bối cảnh lncRNA được xem là dấu ấn sinh học tiềm năng thì việc định lượng chính xác số lượng bản sao tuyệt đối là yêu cầu cần thiết. Điều này không chỉ đánh giá chính xác biểu hiện của một số lncRNA cụ thể mà còn xây dựng một nền tảng kỹ thuật định lượng có tính ứng dụng cao, có thể sử dụng lâu dài và linh hoạt trong các nghiên cứu khác. Việc chuẩn hóa quy trình và tạo sẵn các mẫu chuẩn định lượng tuyệt đối sẽ góp phần giảm sự phụ thuộc vào các gen nội chuẩn biến thiên, đồng thời nâng cao độ chính xác trong đánh giá biểu hiện của lncRNA ở các mẫu bệnh. Chính vì vậy,

nghiên cứu này được tiến hành nhằm: *tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hóa một số đoạn RNA dài không mã hóa và nhân dòng các vector này trong tế bào E. coli và thiết lập bộ mẫu chuẩn dùng để định lượng tuyệt đối một số RNA dài không mã hóa phục vụ nghiên cứu ung thư biểu mô tế bào gan.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nhân dòng các đoạn gene mã hóa lncRNA

DNA được tách chiết từ máu người khỏe mạnh được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen mã hóa lncRNA (*LINC02560*, *LINC02487*, *HCG22*, *HNF4A-AS1*, *C5orf66-AS1*) bằng phản ứng PCR với Master Mix 2X DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên vùng exon. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ), sau đó gắn vào vector pJET1.2/Blunt nhờ enzyme T4 DNA Ligase thuộc bộ CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) để tạo vector tái tổ hợp.

Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt, nuôi cấy trên môi trường thạch LBA và tăng sinh trong môi trường LBA lỏng ở 37°C, 150 rpm qua đêm. Sinh khối tế bào được thu hồi và tách chiết plasmid tái tổ hợp bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Mỹ).

Các plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc, cắt enzyme giới hạn BglII và giải trình tự Sanger sử dụng cặp mồi pJET1.2F/R nhằm xác nhận trình tự chèn. Nồng độ plasmid được xác định bằng máy SpectraMax QuickDrop (Molecular Devices, Mỹ), sau đó quy đổi sang số bản sao (copies/μL) theo công thức:

$$\text{Số bản sao (copies)} = \frac{N \times 6,022 \times 10^{23}}{L \times 660 \times 10^9}$$

Trong đó, *N* là nồng độ DNA (ng/μL), *L* là chiều dài plasmid (bp).

**2.2. Xây dựng bộ mẫu chuẩn**

Các dung dịch plasmid được pha loãng hệ số thập phân (log10) từ 10<sup>8</sup> đến 10<sup>1</sup> copies/μL để xây dựng đường chuẩn cho phản ứng định lượng real-time PCR sử dụng SYBR Green 2X Master Mix. Mỗi nồng độ được định lượng ba lần để đánh giá độ lặp lại. Phản ứng đạt yêu cầu khi có CV < 15%, SD < 0,5 Ct, hiệu suất 90-110%, độ dốc -3,6 ≤ Slope ≤ -3,3, hệ số tương quan R<sup>2</sup> ≥ 0,98 và đồ thị melting cho thấy một đỉnh duy nhất, không xuất hiện dimer<sup>8,9</sup>. Đường chuẩn được thiết lập dựa trên giá trị Ct trung bình theo phương trình tuyến tính:

$$Ct = Slope \times \log_{10}(Sq) + intercept$$

Công thức rút gọn:

$$Y = Slope.x + intercept$$

Trong đó: Slope là độ dốc, Intercept là hệ số cắt trục Ct.

Phân tích thống kê: Dữ liệu được thu thập, quản lý và phân tích xử lý bằng phần mềm Excel 2020.

Đường hồi quy tuyến tính được biểu diễn thông qua giá trị Ct trung bình của nồng độ lncRNA được pha loãng hệ số thập phân.

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian nghiên cứu: 6/2024 – 6/2025, tại Phòng Xét nghiệm An toàn Sinh học, Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

**III. KẾT QUẢ**

**3.1. Kết quả tạo vector tái tổ hợp mang gen mã hóa các đoạn RNA dài không mã hóa và nhân dòng các vector này trong tế bào *E. coli***

Năm cặp mỗi đặc hiệu cho các lncRNA mục tiêu được thiết kế dựa trên trình tự exon của các gen gốc, phục vụ cho quá trình nhân dòng (Bảng 1). DNA toàn phần tách từ máu người khỏe mạnh đạt độ tinh sạch tiêu chuẩn (A260/A280 nằm trong khoảng 1,8–2,0) và được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR.

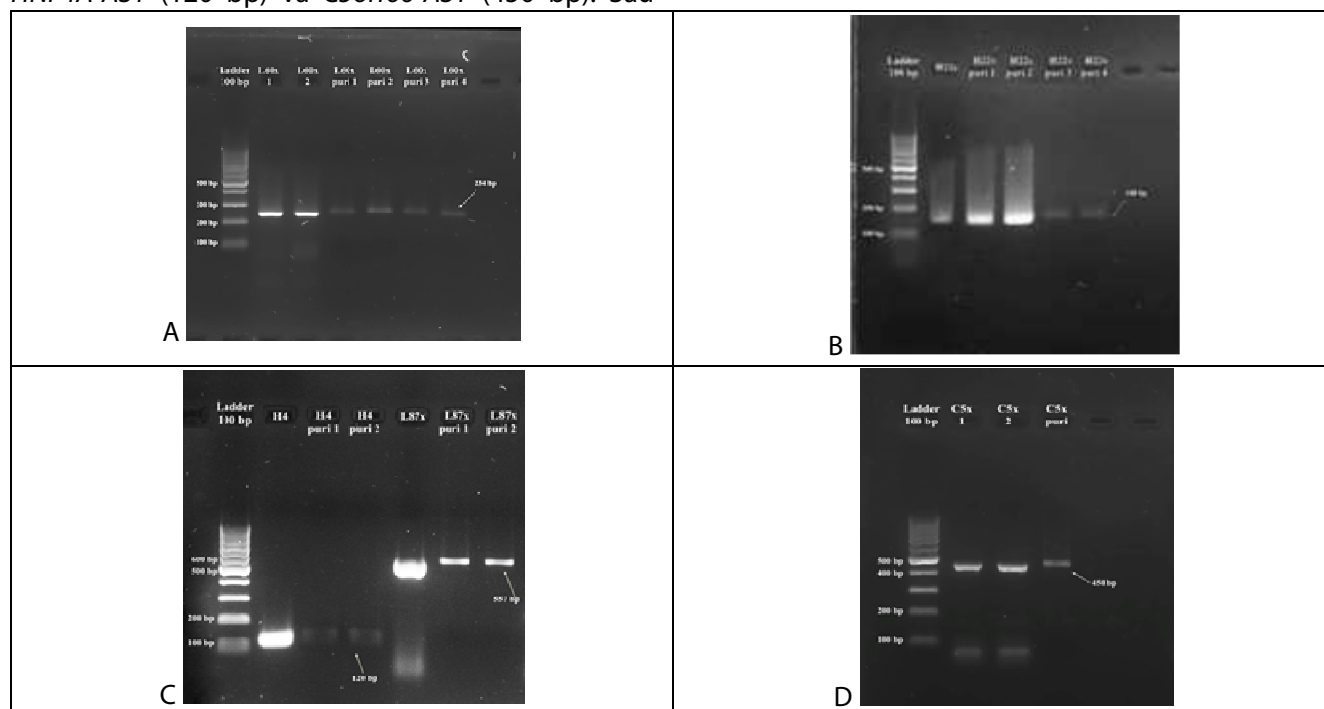
**Bảng 1. Kết quả thiết kế mỗi đoạn sử dụng trong nghiên cứu**

| LncRNA              | Loại mỗi  | Tên mỗi | Trình tự (chiều 5'-3')          | Chiều dài (bp) | Chiều dài sản phẩm (bp) |
|---------------------|-----------|---------|---------------------------------|----------------|-------------------------|
| LINC02560           | Nhân dòng | L60x.F  | TTTGAGCTCCTTTTGTGGCTTCTGCACTCTA | 31             | 234                     |
|                     |           | L60x.R  | TTTGCATGCAGAGAAAGAGGAGATTGGCTGA | 31             |                         |
|                     | Phát hiện | L60.F   | TCTTGCAGTAAAATGAGGCTGA          | 22             | 116                     |
|                     |           | L60.R   | CTCTTTGTTTGAAAGCAGTGGA          | 22             |                         |
| LINC02487           | Nhân dòng | L87x.F  | CCAGCCTCTGAAAAACAACCTCT         | 22             | 557                     |
|                     |           | L87x.R  | CTAGCATTGGATGGACACAGAA          | 22             |                         |
|                     | Phát hiện | L87.F   | CTTGACAACCTGAGAGTCCACCA         | 22             | 90                      |
|                     |           | L87.R   | CAGTGCTGGTTTTCCTAAGTCC          | 22             |                         |
| HCG22 <sup>10</sup> | Nhân dòng | H22x.F  | TTTGAGCTCCCTGGGGAGAGGTGTCATTT   | 29             | 148                     |
|                     |           | H22x.R  | TTTGCATGCTGGTCTCTGGGTGCTTAGTG   | 29             |                         |
|                     | Phát hiện | H22.F   | CCTGGGGAGAGGTGTCATTT            | 20             | 148                     |
|                     |           | H22.R   | TGGTCTCTGGGTGCTTAGTG            | 20             |                         |
| HNF4A-AS1           | Nhân dòng | H4.F    | GAAATGATGGGCTTAAAACAGC          | 22             | 120                     |
|                     |           | H4.R    | GGCAAATACAAGGACCAAAGAC          | 22             |                         |
|                     | Phát hiện | H4.F    | GAAATGATGGGCTTAAAACAGC          | 22             | 120                     |
|                     |           | H4.R    | GGCAAATACAAGGACCAAAGAC          | 22             |                         |
| C5orf66-AS1         | Nhân dòng | C5x.F   | GCGGGAATGTCTTTATTGGAC           | 21             | 450                     |
|                     |           | C5x.R   | GAAGGGCACAACCTGAGAAG            | 20             |                         |

| LncRNA | Loại<br>mồi  | Tên<br>mồi | Trình tự (chiều 5'-3') | Chiều<br>dài<br>(bp) | Chiều<br>dài sản<br>phẩm<br>(bp) |
|--------|--------------|------------|------------------------|----------------------|----------------------------------|
|        | Phát<br>hiện | C5.F       | AAGGGAATTGGGGTTTCTCTC  | 21                   | 232                              |
|        |              | C5.R       | GCGTCAAGAGGGTATTTTCCT  | 22                   |                                  |

Kết quả điện di cho thấy tất cả các cặp mồi đều khuếch đại thành công sản phẩm đúng kích thước thiết kế, không xuất hiện băng phụ hay nhiễu nền, khẳng định tính đặc hiệu cao và điều kiện khuếch đại ổn định (Hình 1). Các sản phẩm gồm: *LINC02560* (234 bp), *HCG22* (148 bp), *LINC02487* (557 bp), *HNF4A-AS1* (120 bp) và *C5orf66-AS1* (450 bp). Sau

khuếch đại, sản phẩm được tinh sạch hiệu quả để loại bỏ tạp chất và mồi thừa, thu được DNA có nồng độ từ 13-35 ng/ $\mu$ L. Hiệu quả tinh sạch được xác nhận lại bằng điện di nhằm so sánh sản phẩm PCR trước và sau tinh sạch, đảm bảo chất lượng cho các bước nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 1.** Kết quả điện di agarose sản phẩm PCR sau tinh sạch của các lncRNA nghiên cứu.

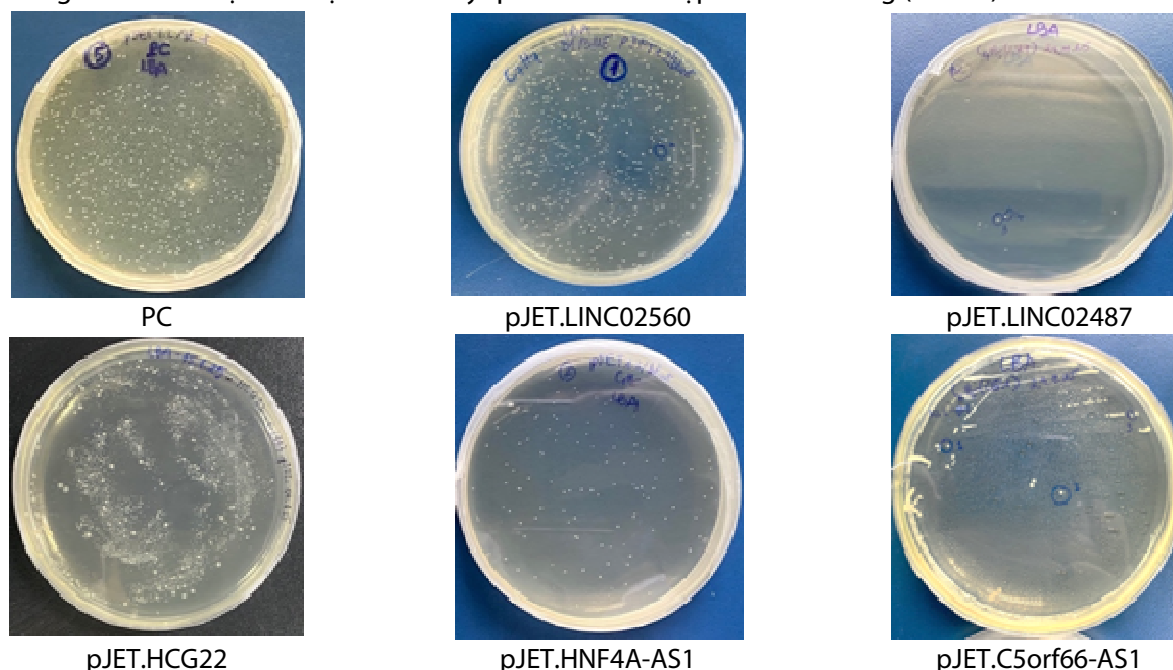
(A) L60x 1,2: sản phẩm PCR của *LINC02560*; L60x puri 1–4: sản phẩm PCR sau tinh sạch của *LINC02560*, cho băng DNA kích thước 234 bp.

(B) H22x: sản phẩm PCR của *HCG22*; H22x puri 1–4: sản phẩm PCR sau tinh sạch của *HCG22*, cho băng DNA kích thước 148 bp.

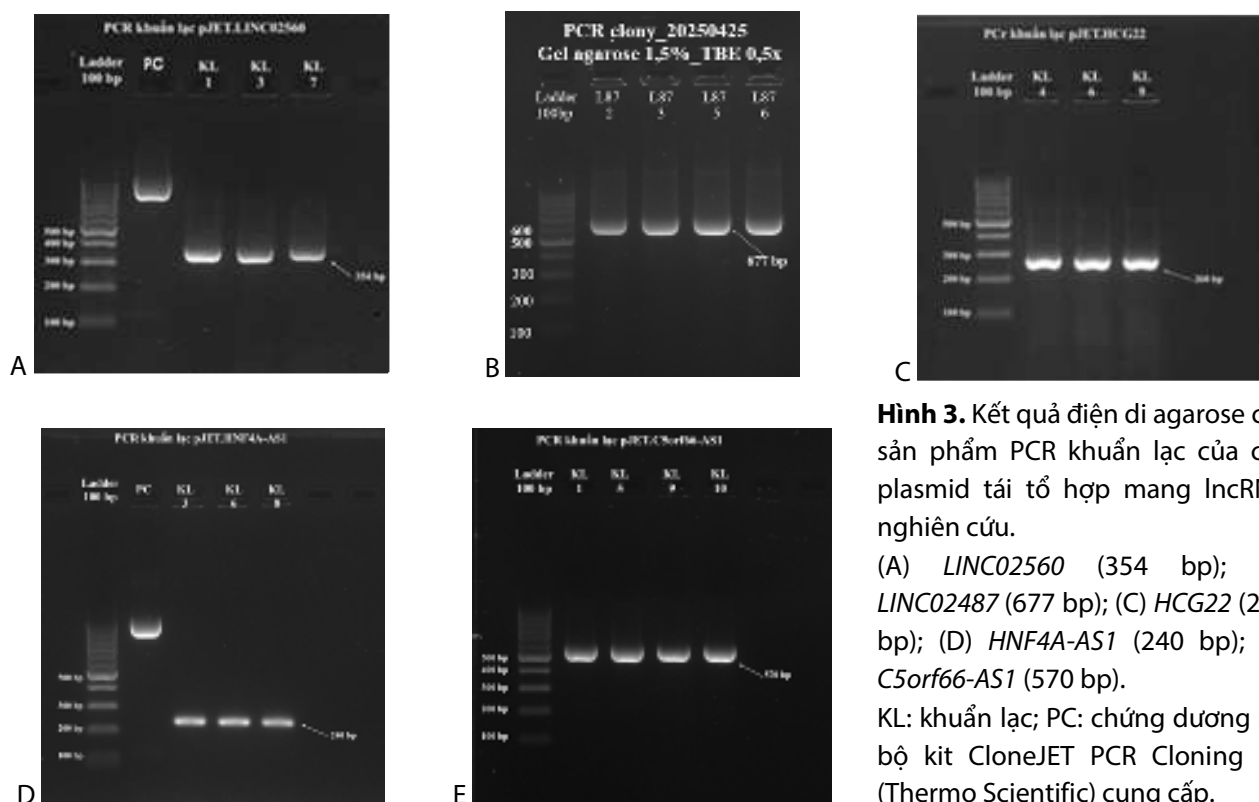
(C) H4: sản phẩm PCR của *HNF4A-AS1*; H4 puri 1,2: sản phẩm PCR sau tinh sạch của *HNF4A-AS1*, cho băng DNA kích thước 120 bp. L87x: sản phẩm PCR của *LINC02487*; L87x puri 1,2: sản phẩm PCR sau tinh sạch của *LINC02487*, cho băng DNA kích thước 557 bp.

(D) C5x 1,2: sản phẩm PCR của *C5orf66-AS1*; C5x puri: sản phẩm PCR sau tinh sạch của *C5orf66-AS1*, cho băng DNA kích thước 450 bp.

Đoạn gen mục tiêu được gắn vào vector pJET1.2/Blunt bằng enzyme T4 ligase, sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  và nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung ampicillin. Sự xuất hiện của các khuẩn lạc trắng riêng lẻ trên bề mặt đĩa thạch cho thấy quá trình biến nạp đã thành công (Hình 2).



**Hình 2.** Các khuẩn lạc trắng xuất hiện trên môi trường thạch rắn



**Hình 3.** Kết quả điện di agarose các sản phẩm PCR khuẩn lạc của các plasmid tái tổ hợp mang lncRNA nghiên cứu.

(A) *LINC02560* (354 bp); (B) *LINC02487* (677 bp); (C) *HCG22* (268 bp); (D) *HNF4A-AS1* (240 bp); (E) *C5orf66-AS1* (570 bp).

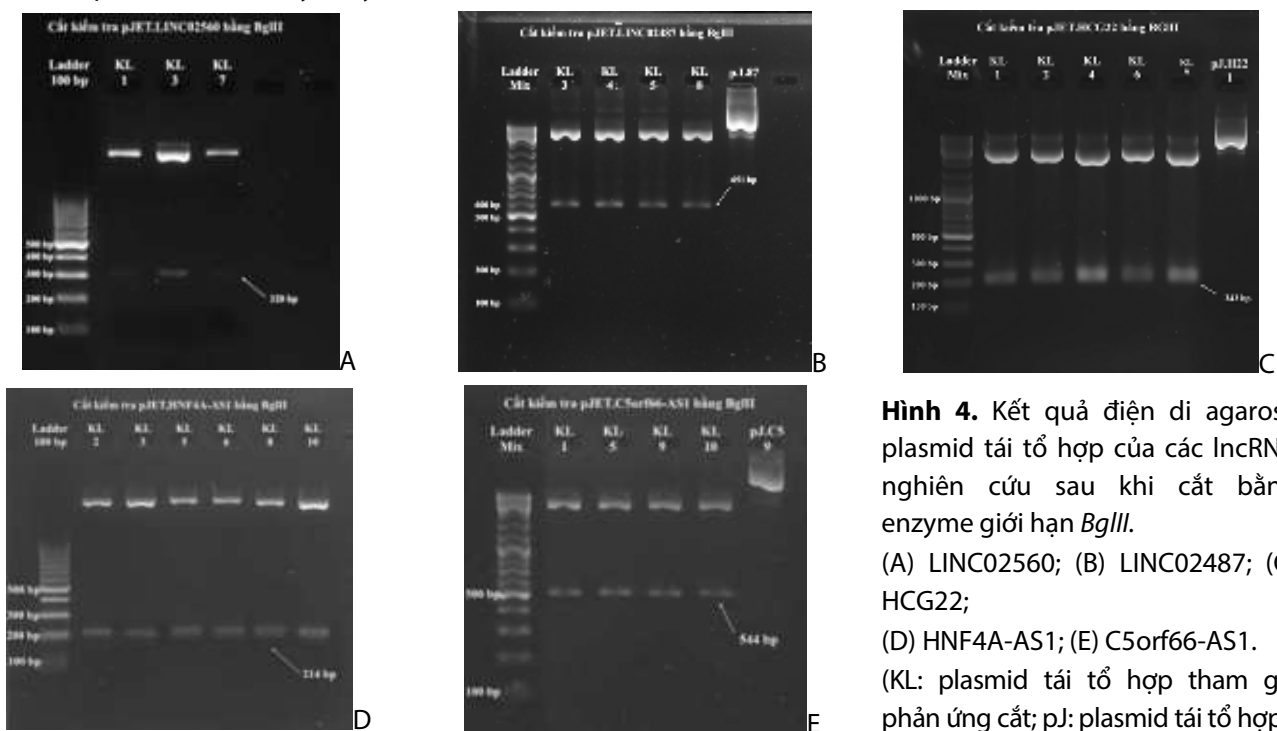
KL: khuẩn lạc; PC: chứng dương do bộ kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) cung cấp.

Nhằm kiểm tra bước đầu, nghiên cứu thực hiện PCR trực tiếp từ khuẩn lạc trắng bằng cặp mồi đặc hiệu pJET1.2F/pJET1.2R. Kết quả điện di (Hình 3) cho thấy kích thước băng khuếch đại tương ứng với lý thuyết, xác nhận sự hiện diện của các plasmid tái tổ hợp: pJET.LINC02560, pJET.LINC02487, pJET.HCG22, pJET.HNF4A-AS1 và pJET.C5orf66-AS1.

Từ các khuẩn lạc lựa chọn, nghiên cứu tiến hành nhân dòng, tách chiết và tinh sạch plasmid. Phân tích cho thấy DNA thu được có nồng độ cao và độ tinh sạch đạt chuẩn (A260/A280: 1,8-2,0; A260/A230: 2,0-2,2), đảm bảo chất lượng cho các bước phân tích tiếp theo. Sản phẩm cắt plasmid bằng enzyme *Bgl*II (Hình 4) cho hai băng rõ ràng: một băng khoảng 3000 bp tương ứng với vector pJET1.2 và một băng kích thước nhỏ hơn tương ứng với đoạn lncRNA chèn, khớp với kích thước lý thuyết.

Để xác nhận chính xác, các plasmid tái tổ hợp tiếp tục được giải trình tự Sanger hai chiều bằng cặp mồi nhân dòng. Phân tích kết quả bằng công cụ tin sinh UseGalaxy và BLAST (NCBI) cho thấy trình tự chèn phù hợp với đoạn gen mục tiêu mã hóa lncRNA, không phát hiện đột biến lớn, có độ tương đồng 92-100% so với trình tự tham chiếu. Những sai khác nhỏ xuất hiện ở đuôi đọc, không làm thay đổi thông tin di truyền.

Từ các kết quả trên, có thể khẳng định các plasmid tái tổ hợp pJET.LINC02560, pJET.LINC02487, pJET.HCG22, pJET.HNF4A-AS1 và pJET.C5orf66-AS1 đã được chèn đúng đoạn gen mục tiêu, nhân dòng thành công và đủ điều kiện sử dụng cho các ứng dụng tiếp theo như định lượng tuyệt đối bằng real-time PCR.



**Hình 4.** Kết quả điện di agarose plasmid tái tổ hợp của các lncRNA nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *Bgl*II.

(A) LINC02560; (B) LINC02487; (C) HCG22;

(D) HNF4A-AS1; (E) C5orf66-AS1.

(KL: plasmid tái tổ hợp tham gia phản ứng cắt; pJ: plasmid tái tổ hợp)

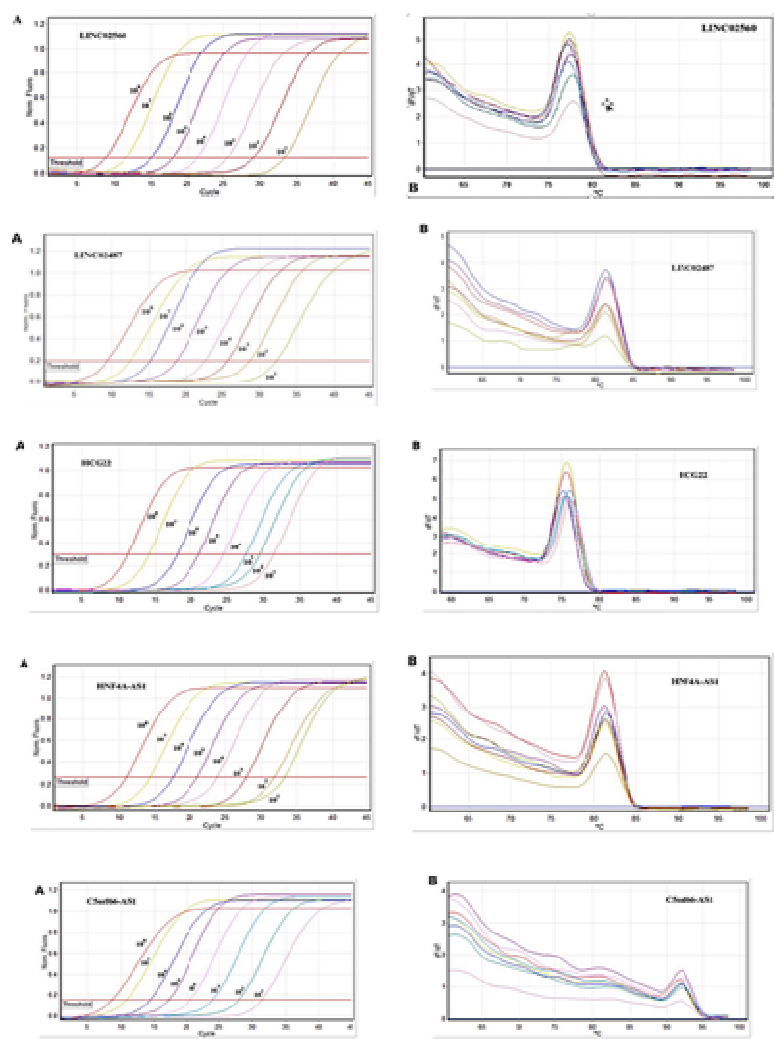
### 3.2. Thiết lập bộ mẫu chuẩn dùng để định lượng tuyệt đối các RNA dài không mã hóa

Nghiên cứu đã thiết lập và đánh giá bộ mẫu chuẩn dựa trên phản ứng real-time PCR. Tất cả plasmid tái tổ hợp đều được pha loãng từ nồng độ ban đầu  $10^{10}$  copies/ $\mu$ L, xây dựng dải đường chuẩn

từ  $10^8$  đến  $10^1$  copies/ $\mu$ L. Kết quả cho thấy các phản ứng PCR nhìn chung có độ lặp lại tốt, với hệ số biến thiên CV% chủ yếu dưới 10% và độ lệch chuẩn SD thường  $\leq 1,5$  Ct, phản ánh sự ổn định và độ tin cậy cao. Một số trường hợp tại nồng độ cao hoặc trung gian có CV hoặc SD vượt nhẹ ngưỡng khuyến nghị, nhưng vẫn nằm trong giới hạn chấp nhận.

**Bảng 2. Độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% của các lncRNA ở dải nồng độ 10<sup>8</sup> - 10<sup>1</sup> copies/μL**

| Nồng độ<br>(copies/μL) | LINC02560 |       | LINC02487 |      | HCG22 |      | HNF4A-AS1 |      | C5orf66-AS1 |      |
|------------------------|-----------|-------|-----------|------|-------|------|-----------|------|-------------|------|
|                        | SD        | CV    | SD        | CV   | SD    | CV   | SD        | CV   | SD          | CV   |
| 10 <sup>8</sup>        | 1,17      | 11,69 | 0,50      | 5,10 | 0,05  | 0,45 | 1,01      | 9,53 | 0,33        | 3,74 |
| 10 <sup>7</sup>        | 0,94      | 7,42  | 0,90      | 7,19 | 0,19  | 1,34 | 1,28      | 9,43 | 0,31        | 2,81 |
| 10 <sup>6</sup>        | 0,72      | 4,54  | 0,70      | 4,48 | 0,84  | 4,69 | 1,59      | 9,39 | 0,43        | 2,97 |
| 10 <sup>5</sup>        | 1,11      | 5,81  | 0,81      | 4,24 | 1,26  | 5,91 | 1,50      | 7,41 | 0,43        | 2,44 |
| 10 <sup>4</sup>        | 1,26      | 5,50  | 1,59      | 6,86 | 0,40  | 1,64 | 1,15      | 4,80 | 0,81        | 3,88 |
| 10 <sup>3</sup>        | 0,95      | 3,57  | 0,73      | 2,80 | 0,31  | 1,12 | 0,87      | 3,21 | 0,78        | 3,13 |
| 10 <sup>2</sup>        | 0,73      | 2,42  | 0,75      | 2,55 | 1,02  | 3,32 | 1,89      | 6,16 | 0,56        | 2,00 |
| 10 <sup>1</sup>        | 1,01      | 3     | 0,69      | 2,17 | 1,20  | 3,73 | 1,08      | 3,14 | 0,40        | 1,26 |

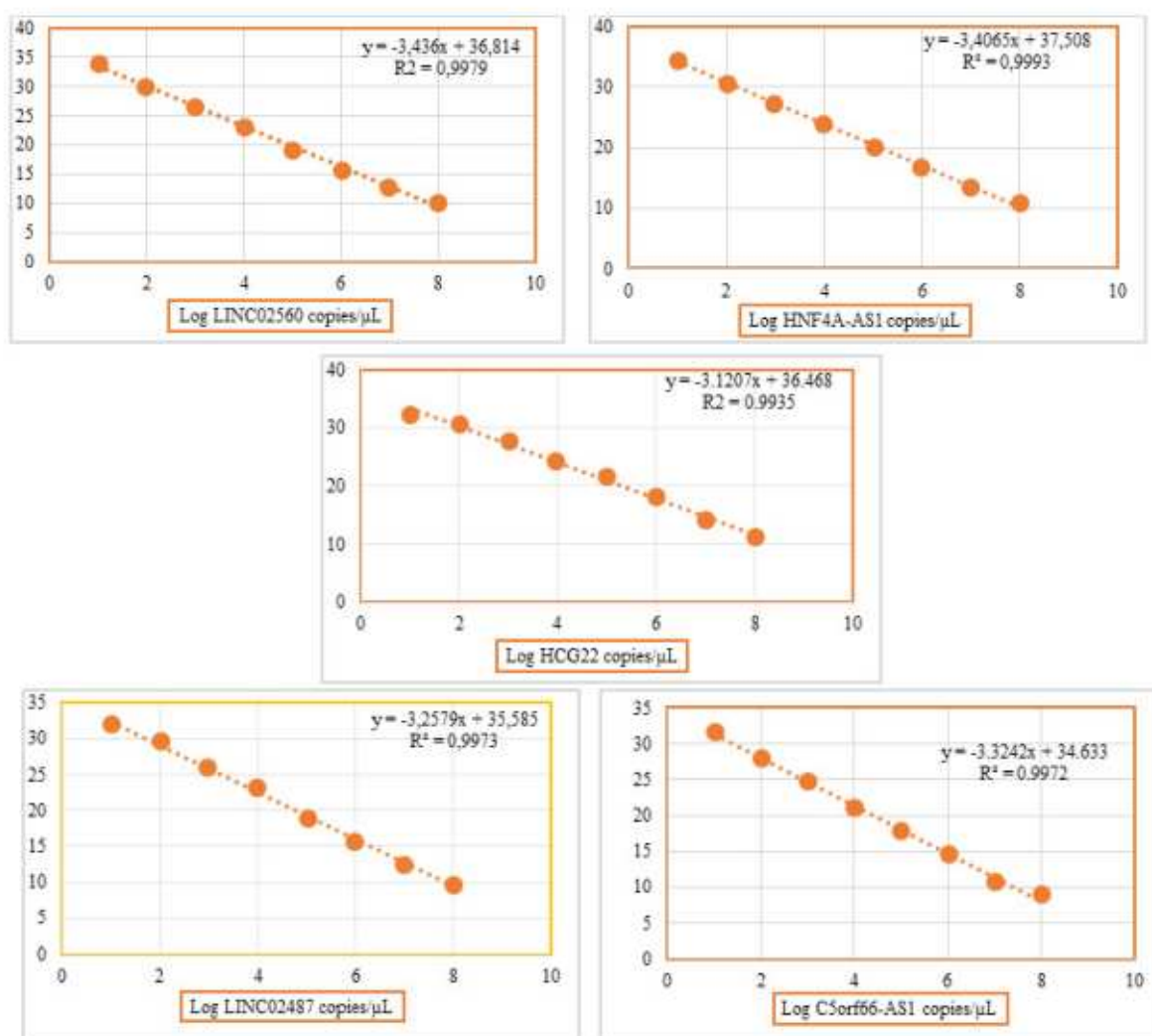


**Hình 5.** Biểu hiện của các lncRNA trên dải nồng độ 10<sup>8</sup>-10<sup>1</sup> copies/μL  
A: Tín hiệu huỳnh quang khuếch đại, B: Đường cong nóng chảy melting curve

Phân tích đường cong nóng chảy melting curve của từng lncRNA đều cho kết quả đặc hiệu, chỉ xuất hiện một đỉnh duy nhất, không phát hiện đỉnh phụ hoặc tín hiệu primer-dimer. Điều này chứng minh phản ứng real-time PCR có tính đặc hiệu cao, sản phẩm khuếch đại duy nhất và phản ứng được tái lập ổn định giữa các lần lặp lại.

**Bảng 3. Thông số đánh giá khác của đường chuẩn các lncRNA ở dải nồng độ  $10^8$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L**

| LncRNA             | Hệ số tương quan $R^2$ | Độ dốc Slope |
|--------------------|------------------------|--------------|
| <i>LINC02560</i>   | 0,9979                 | -3,436       |
| <i>LINC02487</i>   | 0,9973                 | -3,2579      |
| <i>HCG22</i>       | 0,9935                 | -3,1207      |
| <i>HNFA-AS1</i>    | 0,9993                 | -3,4065      |
| <i>C5orf66-AS1</i> | 0,9972                 | -3,3242      |



**Hình 6.** Đường chuẩn các lncRNA xây dựng từ dải nồng độ  $10^8$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L

#### IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này tập trung vào việc xây dựng hệ thống chuẩn định lượng tuyệt đối cho các lncRNA tiềm năng trong sinh ung thư gồm *LINC02560*, *LINC02487*, *HCG22*, *HNF4A-AS1* và *C5orf66-AS1*. Các đoạn exon đặc hiệu được chọn làm mục tiêu khuếch đại, đảm bảo tính đặc hiệu và hiệu quả nhân dòng cao, tương tự như các nghiên cứu trước <sup>11,12</sup>.

Nghiên cứu đã sử dụng vector pJET1.2 để chèn và nhân dòng trong *E. coli*, kết quả cho thấy sự xuất hiện khuẩn lạc trắng và xác nhận thành công bằng PCR khuẩn lạc, enzyme giới hạn và giải trình tự Sanger. Mặc dù một số đoạn ngắn như *HCG22*, *HNF4A-AS1* chỉ đạt mức tương đồng 92-97%, song các plasmid đều vượt ngưỡng QC chuẩn  $\geq 90\%$ , phù hợp để sử dụng làm mẫu chuẩn <sup>13</sup>.

Từ đó, các đường chuẩn real-time PCR được thiết lập cho năm lncRNA, với hiệu suất khuếch đại 95,45-109,14% và  $R^2 > 0,99$ , đảm bảo độ chính xác và lặp lại cao <sup>14</sup>. Kết quả này nhất quán với các nghiên cứu gần đây, đồng thời cho thấy plasmid tái tổ hợp là lựa chọn phù hợp cho định lượng tuyệt đối lncRNA, đặc biệt ở dải nồng độ thấp <sup>15</sup>. Việc phát triển hệ thống chuẩn này không chỉ giúp chuẩn hóa quy trình phân tích lncRNA mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng lâm sàng trong chẩn đoán và tiên lượng ung thư, đặc biệt là UTBMTBG.

#### V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo thành công các plasmid tái tổ hợp chứa năm lncRNA (*LINC02560*, *LINC02487*, *HCG22*, *HNF4A-AS1*, *C5orf66-AS1*) và nhân dòng ổn định trong *E. coli* DH5 $\alpha$ , thu được DNA plasmid có nồng độ cao và độ tinh sạch đạt chuẩn. Đồng thời, đã xây dựng bộ mẫu chuẩn cho phản ứng real-time PCR với độ chính xác, hiệu suất và độ lặp lại cao, khẳng định tính tin cậy và khả năng sẵn sàng ứng dụng trong định lượng tuyệt đối phục vụ nghiên cứu ung thư nói chung và UTBMTBG nói riêng ở giai đoạn tiếp theo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Laversanne M, Sung H et al (2024) *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of*

- incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* 74(3): 229-263. doi:<https://doi.org/10.3322/caac.21834>
2. Observatory GC (2025) *GLOBOCAN 2022: Viet Nam Fact Sheet.* International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization. Updated <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheet.pdf>
3. Patresan J, Patel H, Chandrasekaran K, Reynolds G (2024) *Current Treatment Paradigm and Approach to Advanced Hepatocellular Carcinoma.* Cureus 16(12): 75471. doi:10.7759/cureus.75471
4. Mittal S, El-Serag HB (2013) *Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population.* J Clin Gastroenterol 47 Suppl(0): 2-6. doi:10.1097/MCG.0b013e3182872f29
5. Li Y, Egranov SD, Yang L, Lin C (2019) *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs-mediated cancer metastasis.* Genes Chromosomes Cancer 58(4): 200-207. doi:10.1002/gcc.22691
6. Jansone B, Kadish I, van Groen T et al (2016) *Memory-enhancing and brain protein expression-stimulating effects of novel calcium antagonist in Alzheimer's disease transgenic female mice.* Pharmacological Research 113: 781-787. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.020>
7. Sang J, Wang Z, Li M et al (2017) *ICG: A wiki-driven knowledgebase of internal control genes for RT-qPCR normalization.* Nucleic Acids Research. 46(D1):D121-D126. doi:10.1093/nar/gkx875
8. Hays A, Islam R, Matys K, Williams D (2022) *Best Practices in qPCR and dPCR Validation in Regulated Bioanalytical Laboratories.* The AAPS Journal 24(2): 36. doi:10.1208/s12248-022-00686-1.
9. Hashish A, Sinha A, Sato Y, Macedo NR, El-Gazzar M (2022) *Development and Validation of a New TaqMan Real-Time PCR for the Detection of Ornithobacterium rhinotracheale.* Microorganisms 10(2): 341.
10. Li X, Xiao X, Chang R, Zhang C (2020) *Comprehensive bioinformatics analysis identifies lncRNA HCG22 as a migration inhibitor in esophageal squamous cell carcinoma.* Journal of Cellular Biochemistry 121(1): 468-481. doi:<https://doi.org/10.1002/jcb.29218>

11. Wapinski O, Chang HY (2011) *Long noncoding RNAs and human disease*. Trends in Cell Biology 21(6): 354-361. doi:10.1016/j.tcb.2011.04.001
12. Quinn JJ, Chang HY (2016) *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nature Reviews Genetics 17(1): 47-62. doi:10.1038/nrg.2015.10
13. Tang X, Shang J, Ji Y, Sun Y (2023) *PLASMe: A tool to identify PLASMid contigs from short-read assemblies using transformer*. Nucleic Acids Res 51(15): 83. doi:10.1093/nar/gkad578
14. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al (2009) *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem. Apr 55(4): 611-22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
15. Nguyễn MN, Nguyễn TTD, Đinh TTH và cộng sự (2024) *Xây dựng đường chuẩn để định lượng nồng độ long non-coding RNA IFI6lnc2 và EPB41L4A-AS1 bằng phương pháp Real-time PCR*. Tạp chí Y Dược học Quân sự 49(2): 245-255. doi:10.56535/jmpm.v49i2.720