

XÂY DỰNG ĐƯỜNG CHUẨN ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG NỒNG ĐỘ
LONG NON-CODING RNA IFI6lnc2 VÀ EPB41L4A-AS1
BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

Nguyễn Minh Nam^{1,2}, Nguyễn Thị Thùy Diệu¹, Đinh Thị Thu Hằng¹
Nguyễn Đăng Dũng¹, Bùi Lan Anh¹, Ella Sklan³, Hoàng Văn Tổng^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng đường chuẩn để định lượng nồng độ lncRNA IFI6lnc2 và EPB41L4A-AS1 bằng phương pháp real-time PCR. **Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng phương pháp real-time PCR định lượng tuyệt đối để xây dựng đường chuẩn dựa trên các mẫu chuẩn có nguồn gốc từ các plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa cho lncRNA IFI6lnc2 và EPB41L4A-AS1. **Kết quả:** Nghiên cứu đã nhân dòng thành công plasmid pJET-IFI6lnc2 và pJET-EPB41L4A-AS1. Các plasmid tái tổ hợp thu được có nồng độ và độ tinh sạch cao (pJET-IFI6lnc2 có nồng độ $1,8 \times 10^{10}$ copy/ μ L; pJET-EPB41L4A-AS1 có nồng độ $2,4 \times 10^{10}$ copy/ μ L). Hàm số biểu thị cho đường chuẩn của lncRNA IFI6lnc2: $Y = -3,408X + 35,989$ ($R^2 = 0,998$, $E = 96,5\%$); với lncRNA EPB41L4A-AS1: $Y = -3,4706X + 36,225$ ($R^2 = 0,999$, $E = 94,0\%$). **Kết luận:** Các đường chuẩn thu được có tương quan tuyến tính và hiệu suất phản ứng tốt.

Từ khóa: Long non-coding RNA (LncRNA); EPB41L4A-AS1; IFI6lnc2; Đường chuẩn.

ESTABLISHMENT OF THE STANDARD CURVE TO QUANTIFY
LONG NON-CODING RNA IFI6lnc2 AND EPB41L4A-AS1
CONCENTRATION USING REAL-TIME PCR METHOD

Abstract

Objectives: To establish the standard curve for quantifying the concentration of lncRNA IFI6lnc2 and EPB41L4A-AS1. **Methods:** The absolute quantitative

¹Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

³Đại học Tel Aviv (Israel)

*Tác giả liên hệ: Hoàng Văn Tổng (hoangvantong@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 19/01/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 29/01/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i2.720>

real-time PCR method was employed to establish the standard curve based on standard samples derived from recombinant plasmids containing the coding genes for these lncRNAs. **Results:** The coding genes for lncRNAs IFI6lnc2 and EPB41L4A-AS1 were cloned successfully in pJET1.2 by conventional recombinant methods. The recombinant plasmids exhibited high concentration, with pJET-IFI6lnc2 at a concentration of 1.8×10^{10} copy/ μ L and pJET-EPB41L4A-AS1 at a concentration of 2.4×10^{10} copy/ μ L. Standard curve equation of lncRNA IFI6lnc2: $Y = -3.408X + 35.989$ ($R^2 = 0.998$, $E = 96.5\%$) and lncRNA EPB41L4A-AS1: $Y = -3.4706X + 36.225$ ($R^2 = 0.999$, $E = 94.0\%$). **Conclusion:** The results of the standard curve demonstrated a linear correlation and high amplification efficiency.

Keywords: Long non-coding RNA (LncRNA); EPB41L4A-AS1; IFI6lnc2; Standard curve.

ĐẶT VẤN ĐỀ

RNA dài không mã hóa (long non-coding RNA, lncRNA) là các phân tử RNA không mã hóa protein, có chiều dài > 200 nucleotide [1]. Ngày càng có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các lncRNA rất cần thiết trong diễn biến của các bệnh truyền nhiễm [2]. Trong đó, hai lncRNA là EPB41L4A-AS1 (EPB41L4A antisense RNA 1) và IFI6lnc2 (LINC02574 - Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2574), đã được chứng minh có vai trò điều hòa miễn dịch, ức chế hoặc tăng cường sự sao chép của một số virus như SARS-CoV-2, virus cúm A [3, 4]. Do đó, việc định lượng nồng độ của hai lncRNA này đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu bệnh truyền nhiễm.

Hiện nay, real-time PCR vẫn được coi là phương pháp chuẩn để phát hiện và phân tích biểu hiện của các gen và lncRNA [5]. Tại Việt Nam, hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu về định lượng nồng độ các lncRNA IFI6lnc2 và EPB41L4A-AS1. Để phục vụ cho việc định lượng nồng độ hai lncRNA trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Xây dựng quy trình định lượng nồng độ lncRNA EPB41L4A-AS1 và IFI6lnc2 bằng phương pháp real-time PCR.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Plasmid chứa các trình tự gen mã hóa cho lncRNA IFI6lnc2 và EPB41L4A-AS1 được cung cấp bởi

TS. Ella Sklan, Đại học Tel Aviv (Israel) ký hiệu pJET-IFI6lnc2 kích thước 3.275bp; pJET-EPB41L4A-AS1 kích thước 3.376bp. Tế bào khả biến *E. coli* DH5 α -T1 của hãng Invitrogen được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen.

Các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu được đặt tổng hợp bởi hãng IDT - Mỹ (trình tự mồi được cung cấp bởi TS. Ella Sklan) bao gồm lncRNA EPB41L4A-AS1_F 5'- GGG AGC TTC GTC GAT TTG TG-3', lncRNA EPB41L4A-AS1_R 5'-CGG TAA GGC CTT TTC ACT GAC-3'; IFI6lnc2_F 5'- TTA CCA TCA GGC TTC CGC CC-3', IFI6lnc2_R 5'-GGC GCT GTG CTG GGT TCT A-3'. Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Scientific, Mỹ), nước khử ion DNA/RNAase free, kit tách plasmid GeneJET Plasmid Miniprep, các môi trường nuôi cấy LBA, agarose, đệm TBE. Kỹ thuật real-time PCR được thực hiện trên thiết bị Real time PCR Rotor Gene Q (Qiagen, Đức).

2. Phương pháp nghiên cứu

Biến nạp vector vào tế bào khả biến *E. coli*: Từ các plasmid tái tổ hợp được cung cấp, chúng tôi tiến hành biến nạp

các plasmid này vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Đảo nhẹ nhàng để DNA phân bố đều trong dịch tế bào khả biến. Sau đó, để mẫu trên đá trong khoảng 30 phút, sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây. Tiếp theo, ngay lập tức chuyển sang khay đá, ủ 2 phút. Hỗn hợp sau đó được nuôi trong môi trường giàu dinh dưỡng SOC (250 μ L), lắc 225 vòng/phút ở 37°C trong 60 phút. Sử dụng 100 μ L dung dịch biến nạp cấy trải trường môi trường LBA đặc, ủ đĩa ở 37°C qua đêm. Khuẩn lạc mọc trên môi trường LBA đặc được nuôi trong 5mL dung dịch LB lỏng, có bổ sung ampicilin (100 μ L/mL), lắc 200 vòng/phút, qua đêm. Ly tâm lạnh 4°C, 8000 vòng/phút trong 5 phút để thu cặn tế bào. Cặn tế bào vi khuẩn được sử dụng để tách chiết plasmid tái tổ hợp bằng Kit GeneJET Plasmid Miniprep.

Kiểm tra plasmid tái tổ hợp: Sau khi tách chiết, DNA plasmid tái tổ hợp được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn BglII (Thermo scientific, Mỹ). Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme BglII bao gồm: Nước (6 μ L), Buffer 10X (1 μ L), Plasmid (2 μ L), enzyme giới hạn (1 μ L). Kiểm tra sản phẩm cắt bằng điện di trên gel agarose 1,2%. Để khẳng định chính xác, các plasmid có

thể được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc và giải trình tự vector sử dụng cặp mồi pJET1.2F/R.

Thiết lập bộ mẫu chuẩn DNA: Nồng độ plasmid tái tổ hợp được xác định bằng hệ thống SpectraMax Quickdrop (Molecular Devices, Mỹ). Từ nồng độ (ng/μL) quy đổi thành (copy/μL) dựa trên kích thước của plasmid theo công thức sau:

$$\text{Số bản sao} = \frac{6,23 \times 10^{23} \left(\frac{\text{bản sao}}{\text{mol}} \right) \times \text{Nồng độ DNA (ng)}}{\text{kích thước đoạn DNA (bp)} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \times 10^6}$$

Từ dung dịch DNA plasmid ban đầu, 6 dải nồng độ được pha loãng với hệ số 10 (từ $10^6 \div 10^1$ copy/μL) bằng cách pha loãng plasmid với nước khử ion.

Tối ưu hóa phản ứng real-time PCR: Để tối ưu nồng độ mồi, nghiên cứu tiến hành các phản ứng real-time PCR giống nhau về thành phần và chu trình nhiệt, chỉ khác nhau về nồng độ mồi với nồng độ mồi xuôi, mồi ngược, mỗi loại trong khoảng từ 0,2μM - 0,4 μM/phản ứng.

Xây dựng đường chuẩn: Đường chuẩn được xây dựng dựa trên các mẫu chuẩn có nồng độ từ $10^6 \div 10^1$ copy/μL. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần với mỗi lncRNA, dựa vào hệ số biến thiên giữa

các lần chạy real-time PCR để đánh giá độ tin cậy. Kết quả thí nghiệm có độ chính xác cao khi có hệ số biến thiên liên phản ứng < 15% [6].

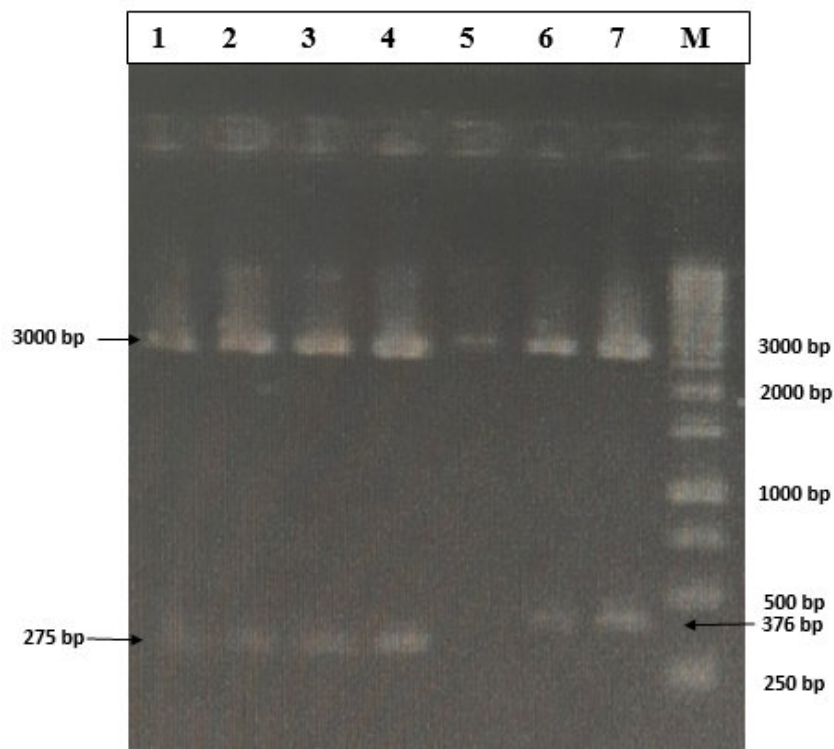
Phân tích thống kê: Dữ liệu được thu thập và quản lý bằng phần mềm Excel 2016, các kết quả thu được sử dụng phần mềm SPSS version 22 để phân tích. Đường hồi quy tuyến tính được biểu diễn thông qua giá trị Ct trung bình của nồng độ lncRNA được pha loãng bậc 10.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Nhân dòng các mẫu chuẩn mang gen đích mã hóa lncRNA

Sau khi biến nạp, tế bào *E. coli* DH5α được nuôi cấy trên môi trường LBA đặc. Kết quả thu được cho thấy xuất hiện nhiều khuẩn lạc trắng (chứa plasmid tái tổ hợp) mọc trên các đĩa LB chọn lọc có bổ sung ampicilin.

Để xác định chính xác khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp, tiến hành nuôi riêng rẽ các khuẩn lạc trắng, tách plasmid và kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bgl*III. Khi plasmid tái tổ hợp được cắt bằng enzyme *Bgl*III sẽ cho hai băng có kích thước khoảng 3,0kb (vector) và đoạn chèn lncRNA tương ứng (Hình 2).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector pJET-IFI6lnc2 và pJET-EPB41L4A-AS1 bằng enzyme giới hạn BglII trên gel agarose 1,2%.

M: Marker 1kb (Thermo Scientific); 1 - 4: Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp từ 4 dòng khuẩn lạc vector pJET IFI6lnc2; 5 - 7: Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp từ 3 dòng khuẩn lạc vector pJET-EPB41L4A-AS1.

Trên hình ảnh điện di cho thấy, sản phẩm cắt plasmid cho hai băng có kích thước phân biệt. Trong đó, băng có kích thước nhỏ tương ứng với kích thước của đoạn gen chèn lncRNA tương ứng và băng có kích thước lớn (khoảng 3,0kb) tương ứng với vector pJET1.2. Do đó, bước đầu có thể khẳng định, những dòng tế bào này đã mang plasmid tái tổ hợp pJET-IFI6lnc2, pJET-EPB41L4A-AS1.

Để khẳng định chính xác, chúng tôi tiến hành kiểm tra bổ sung bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc trắng thu được trên đĩa thạch, sử dụng cặp mồi trên vector pJET1.2(F&R), khuếch đại từ hai đầu vùng đa điểm cắt của vector, khẳng định bằng giải trình tự sử dụng mồi pJET1.2F và pJET1.2R (dữ liệu không trình bày). Như vậy, đã tạo dòng thành công vector tái tổ hợp pJET-IFI6lnc2, pJET-EPB41L4A-AS1 trong tế bào *E. coli*.

2. Thiết lập bộ mẫu chuẩn

Sau khi tách chiết plasmid tái tổ hợp, nồng độ plasmid được xác định bằng máy đo quang phổ SpectraMax Quickdrop.

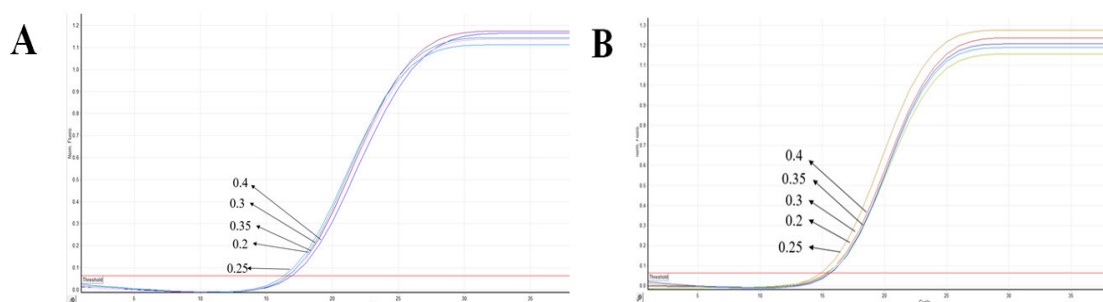
Bảng 1. Thông tin các mẫu plasmid tái tổ hợp tách dòng.

Ký hiệu	Nồng độ (Mean, ng/ μ L)	A260/280	Mean Copy/ μ L
pJET-IFI6lnc2	64	2,0	$1,8 \times 10^{10}$
pJET-EPB41L4A-AS1	90	2,0	$2,4 \times 10^{10}$

Đối với kết quả tách plasmid tái tổ hợp cho thấy, hàm lượng DNA khá cao, độ tinh sạch tốt ($A_{260}/A_{280} = 2,0$), lượng mẫu tách không lẫn nhiều RNA hoặc protein. Như vậy, kết quả tách DNA plasmid đạt yêu cầu. Từ nồng độ gốc, nhóm nghiên cứu tiến hành pha loãng theo cơ số 10 thành 6 nồng độ ($10^6 \div 10^1$ copy/ μ L) để tạo thành bộ mẫu chuẩn để thiết lập đường chuẩn cho hai lncRNA trên bằng phương pháp real-time PCR.

3. Tối ưu kỹ thuật real-time PCR

Việc sử dụng nồng độ môi thích hợp đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến việc cho sản phẩm khuếch đại hay không [6]. Theo hướng dẫn nhà sản xuất, nồng độ môi tối thiểu cho phản ứng real-time PCR là $0,2\mu$ M [7]. Nghiên cứu tiến hành khảo sát nồng độ môi ở các nồng độ $0,2\mu$ M; $0,25\mu$ M; $0,3\mu$ M; $0,35\mu$ M; $0,4\mu$ M (Hình 3). Kết quả cho thấy nồng độ môi có độ tin cậy cao cho phản ứng real-time PCR của hai lncRNA là $0,25\mu$ M. Do đó, nồng độ môi tối ưu cho phản ứng real-time PCR được lựa chọn là $0,25\mu$ M.



Hình 2. (A) Tối ưu nồng độ môi lncRNA IFI6lnc2, lncRNA EPB41L4A-AS1; (B) Cho phản ứng RT-PCR.

Sau khi tối ưu được nồng độ môi $0,25\mu$ M, giá trị này được sử dụng cho tối ưu các điều kiện khác của phản ứng real-time PCR. Kết quả tối ưu các thành phần

CHÀO MỪNG 75 NĂM NGÀY TRUYỀN THỐNG HỌC VIỆN QUÂN Y

của phản ứng real-time PCR được xác định gồm: Fast SYBR™ Green Master Mix (nồng độ cuối 1X - 10 μ L), mỗi xuôi và mỗi ngược (mỗi loại nồng độ cuối 0,25 μ M - 1 μ L), nước khử ion DNA/RNAase free (7 μ L), cDNA template (1 μ L).

Chu trình nhiệt của phản ứng real-time PCR gồm giai đoạn kích hoạt enzyme tại 95°C trong 20 giây, tiếp theo sau là 45 chu kỳ (biến tính ở 95°C 5 giây, gắn mồi ở 60°C 30 giây) và kết thúc bằng phân tích đường cong nóng chảy từ 58 - 99°C.

4. Xây dựng đường chuẩn

Các mẫu chuẩn có nồng độ 10⁶ - 10¹ copy/ μ L được lựa chọn để xây dựng đường chuẩn. Để xác định độ lặp lại của kỹ thuật, chúng tôi tiến hành phản ứng real-time PCR trên mỗi nồng độ, thí nghiệm được lặp lại 5 lần. Kết quả giá trị Ct trung bình và hệ số biến thiên giữa các lần thí nghiệm được trình bày trong bảng 2 và 3.

Bảng 2. Kết quả real-time PCR của lncRNA IFI6lnc2 ở 5 lần thí nghiệm với dải nồng độ 10⁶ - 10¹ copy/ μ L.

Nồng độ (copy/ μ L)	Lần 1 (Ct)	Lần 2 (Ct)	Lần 3 (Ct)	Lần 4 (Ct)	Lần 5 (Ct)	Mean (Ct)	SD	CV(%)
10 ⁶	15,43	15,59	14,97	15,04	15,68	15,342	0,32	2,0
10 ⁵	19,65	19,07	18,9	19,23	19,42	19,254	0,29	1,5
10 ⁴	22,52	22,6	22,77	21,75	22,55	22,438	0,39	1,7
10 ³	25,7	25,07	26,13	25,33	26,19	25,684	0,48	1,8
10 ²	28,99	28,57	28,82	28,83	29,15	28,872	0,21	0,7
10 ¹	33,54	33,48	32,15	32,06	32,66	32,778	0,7	2,1

Bảng 3. Kết quả real-time PCR của lncRNA EPB41L4A-AS1 ở 5 lần thí nghiệm với dải nồng độ 10⁶ - 10¹ copy/ μ L.

Nồng độ (copy/ μ L)	Lần 1 (Ct)	Lần 2 (Ct)	Lần 3 (Ct)	Lần 4 (Ct)	Lần 5 (Ct)	Mean (Ct)	SD	CV(%)
10 ⁶	15,34	15,32	15,75	14,83	16,28	15,504	0,54	3,4
10 ⁵	18,65	18,03	18,94	18,99	18,37	18,596	0,4	2,1
10 ⁴	22,45	22,8	22,29	22,77	22,14	22,49	0,29	1,2
10 ³	26,05	25,46	25,99	25,78	25,46	25,748	0,28	1,0
10 ²	29,61	29,5	30,07	29,65	28,94	29,554	0,4	1,3
10 ¹	31,79	32,41	32,5	33,13	33,03	32,572	0,54	1,6

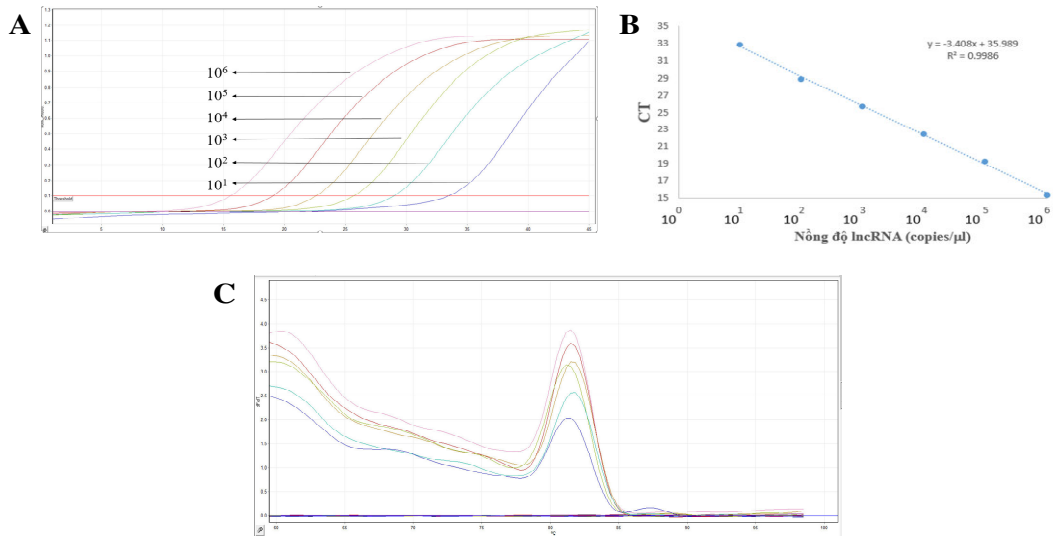
Ct: Chu kỳ ngưỡng; Mean: Trung bình; SD: Độ lệch chuẩn; CV: Hệ số biến thiên.

Kết quả giá trị Ct giữa các lần chạy real-time PCR có độ ổn định tốt khi khảo sát liên phản ứng ở nồng độ chuẩn $10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1$ copy/ μ L cho thấy kết quả có giá trị hệ số biến thiên (CV) thấp, với lncRNA IFI6lnc2 lần lượt là 2,0%, 1,5%, 1,7%, 1,8%, 0,7%, 2,1% (Bảng 2); với lncRNA EPB41L4A-AS1 lần lượt là 3,4%, 2,1%, 1,2%, 1,0%, 1,3%, 1,6% (Bảng 3).

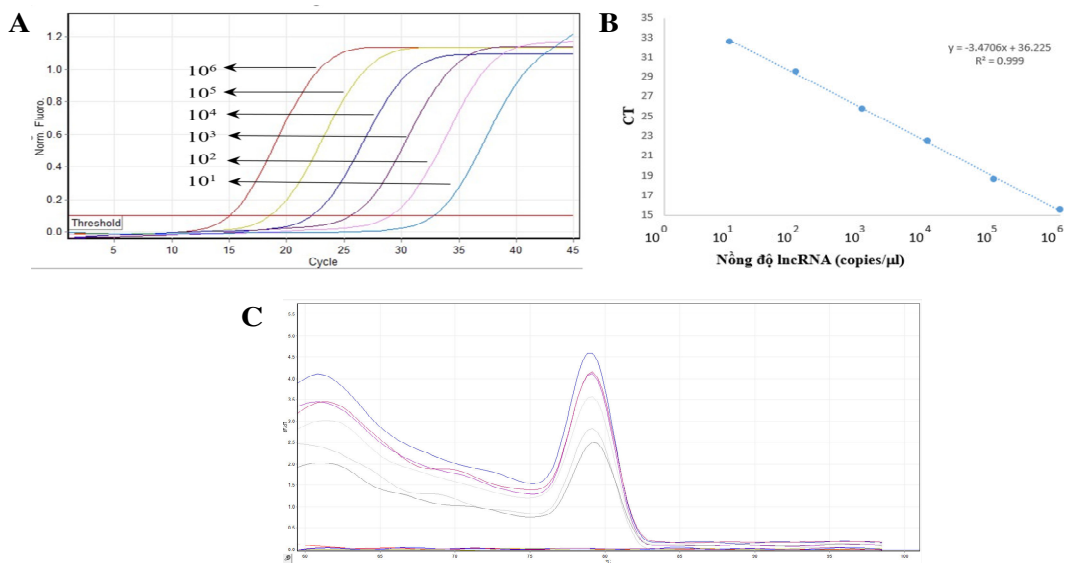
Dựa vào kết quả Ct trung bình sau 5 lần chạy ở nồng độ mẫu chuẩn $10^6 - 10^1$ copy/ μ L, nghiên cứu đã xây dựng được đường chuẩn cho hai lncRNA. Đường chuẩn được biểu thị bằng một hàm số thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng ($Y = Ct$) với \log_{10} của số lượng lncRNA đích ban đầu có trong ống phản ứng ($X = \log_{10} Sq$). Với lncRNA IFI6lnc2, hàm số đó là: $Y = -3,408X + 35,989$. Đường chuẩn có hệ số tương quan $R^2 = 0,998$, độ dốc = -3,408, hiệu quả khuếch đại $E = 96,5\%$ (Hình 3B). Trị số lncRNA IFI6lnc2 ban đầu Sq

(Starting quantity) được tính theo công thức: $Sq = 10^{[(Ct - 35,989)/-3,408]}$. Với lncRNA EPB41L4A-AS1 hàm số biểu diễn đường chuẩn là: $Y = -3,4706X + 36,225$. Đường chuẩn có hệ số tương quan giá trị $R^2 = 0,999$, độ dốc = -3,4706, hiệu quả khuếch đại $E = 94\%$ (Hình 4B). Trị số lncRNA EPB41L4A-AS1 ban đầu Sq được tính theo công thức: $Sq = 10^{[(Ct - 36,225)/-3,4706]}$.

Độ ổn định của đường chuẩn được đánh giá qua hai thông số quan trọng trong kỹ thuật real-time PCR bao gồm hệ số tương quan R^2 và hiệu quả khuếch đại E. Hệ số R^2 phải đạt từ 0,99 trở lên. Hiệu quả khuếch đại E, chấp nhận ở mức 90 - 105%. Nếu $E < 90\%$ có thể môi không nhạy hoặc pha loãng mẫu bị thiếu. Nếu $E > 105\%$ có thể do môi không đặc hiệu hoặc pha loãng mẫu bị dư. Trong biểu đồ chuẩn với các mẫu chuẩn được pha loãng theo hệ số 10 thì hiệu quả khuếch đại E được tính là bằng công thức $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100 \%$ với slope (độ dốc của đường biểu diễn chuẩn) [8].



Hình 3. Biểu hiện của IFI6lnc2 trên dải nồng độ $10^6 - 10^1$ copy/ μ L
 (A) Biểu đồ tín hiệu huỳnh quang khuếch đại lncRNA IFI6lnc2;
 (B) Đường chuẩn xây dựng từ dải nồng độ $10^6 - 10^1$;
 (C) Đường cong nóng chảy melting curve.



Hình 4. Biểu hiện của lncRNA EPB41L4A-AS1 trên dải nồng độ $10^6 - 10^1$ copy/ μ L
 (A) Biểu đồ tín hiệu huỳnh quang khuếch đại lncRNA EPB41L4A-AS1;
 (B) Đường chuẩn xây dựng từ dải nồng độ $10^6 - 10^1$;
 (C) Đường cong nóng chảy melting curve.

Nghiên cứu của Xiaoying Zhou và CS xây dựng đường chuẩn để định lượng nồng độ 8 lncRNA trong huyết tương bằng cách pha loãng nồng độ chuẩn theo cơ số 10. Kết quả thu được các đường chuẩn với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ [9]. Trong nghiên cứu của Wen-Tao Wang và CS, để xác định tính chính xác trong phân tích và nghiên cứu các ứng dụng của lncRNA trong bệnh lý phụ khoa, các tác giả đã xây dựng đường chuẩn để định lượng nồng độ của 8 lncRNA trong huyết tương, các đường chuẩn có hiệu quả khuếch đại cao, hệ số tương quan R^2 từ 0,994 - 1, độ dốc của đường chuẩn dao động từ -3,43 đến -3,65 [10]. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, đường chuẩn cũng có hệ số tương quan R^2 , độ dốc tương tự như kết quả nghiên cứu của các tác giả trên. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, kết quả phân tích đường cong nóng chảy của từng lncRNA còn cho thấy sản phẩm khuếch đại có trong phản ứng là từ một loại DNA đích, không xuất hiện cấu trúc nhị phân (Hình 3C, 4C). Như vậy, hai đường chuẩn trong nghiên cứu có kết quả đáng tin cậy.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tách dòng thành công plasmid pJET-IFI6lnc2, pJET-EPB41L4A-AS1 trong tế bào *E. coli* sử dụng phương pháp biến nạp bằng

sốc nhiệt. Các plasmid có nồng độ (pJET-IFI6lnc2 có nồng độ $1,8 \times 10^{10}$ copy/ μ L; pJET-EPB41L4A-AS1 có nồng độ $2,4 \times 10^{10}$ copy/ μ L), độ tinh sạch cao. Kết quả đó là cơ sở để xây dựng đường chuẩn bằng cách sử dụng chu kỳ ngưỡng so với nồng độ các lncRNA. Kết quả đường chuẩn thể hiện tương quan tuyến tính và hiệu suất phản ứng cao ($R^2 = 0,998$), hiệu quả khuếch đại = 96,5% với IFI6lnc2 và $R^2 = 0,999$, hiệu quả khuếch đại = 94% với lncRNA EPB41L4A-AS1.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ khoa học và Công nghệ trong nhiệm vụ KH&CN theo nghị định thư mã số NĐT/IL/21/12. Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fang Xin-yu, et al. Long noncoding RNAs: Novel insights into gastric cancer. *Cancer letters*. 2015; 356(2):357-366.
2. Liu Weiwei, Ding Chan. Frontiers in cellular, microbiology infection. *Roles of LncRNAs in viral infections*. 2017; 7, 205.
3. Mukherjee Sumit, et al. mRNA-lncRNA Co-expression network analysis reveals the role of lncRNAs in immune dysfunction during severe SARS-CoV-2 infection. 2021; 13(3):402.

4. Zhang Yanwei, et al. LncRNA LINC02574 inhibits influenza a virus replication by positively regulating the innate immune response. 2023; 24(8):7248.
5. Shi Ting, Gao Ge, Cao Yingli. Disease markers. Long noncoding RNAs as novel biomarkers have a promising future in cancer diagnostics. 2016.
6. Lê Thị Bảo Quyên. Xây dựng quy trình định lượng nồng độ BKV-DNA bằng kỹ thuật real-time PCR và phân tích đặc điểm di truyền phân tử của virus ở bệnh nhân ghép thận. *Luận văn thạc sỹ khoa học*. 2020.
7. Applied Biosystems. Fast SYBR green master mix protocol. 2010.
8. Phạm Hùng Vân. Polymerase Chain Reaction - các vấn đề cơ bản. PCR và Real time PCR các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà xuất bản y học. 2009.
9. Zhou Xiaoying, et al. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. 2015; 5(1), 11516.
10. Wang Wen-Tao, et al. Genome-wide long non-coding RNA analysis identified circulating LncRNAs as novel non-invasive diagnostic biomarkers for gynecological disease. 2016; 6(1):23343.