

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thu Trang

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG TẾ BÀO DR CALUX HƯỚNG TỚI ỨNG
DỤNG SÀNG LỌC DIOXIN HOẶC CÁC CHẤT DẪN XUẤT DIOXIN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THU TRANG

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG TẾ BÀO DR CALUX HƯỚNG TỚI ỨNG
DỤNG SÀNG LỌC DIOXIN HOẶC CÁC CHẤT DẪN XUẤT DIOXIN

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
TS. Lã Thị Huyền

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the supervisor, Lã Thị Huyền.

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài “ Nghiên cứu tạo dòng tế bào DR CALUX hướng tới ứng dụng sàng lọc dioxin hoặc các chất dẫn xuất dioxin ” trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Nguyễn Thu Trang

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS. Lã Thị Huyền Trưởng phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học & công nghệ Việt Nam. Cô đã chỉ bảo cho tôi nhiều ý kiến hướng dẫn quý báu, động viên và giúp đỡ tôi giải quyết những khó khăn vướng mắc trong quá trình thực hiện luận văn và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới tập thể cán bộ nghiên cứu phòng Công nghệ tế bào động vật - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới ban Lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ, tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu

Tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc tới ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các phòng chức năng khác của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ, tạo môi trường tốt nhất cho tôi được tham gia học tập, nâng cao trình độ chuyên môn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô khoa Công nghệ sinh học - Học viện Khoa học và Công nghệ đã nhiệt tình dạy bảo và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập. Tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình đã luôn hỗ trợ và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi chuyên tâm làm việc và hoàn thành luận văn.

Hà Nội, ngày 04 tháng 12 năm 2023

Tác giả



Nguyễn Thu Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Dioxin và độc tính của dioxin	3
1.1.1. Dioxin và các chất dẫn xuất.....	3
1.1.2. Ảnh hưởng của dioxin và các chất dẫn xuất đến sức khỏe và môi trường.....	5
1.1.3. Các hợp chất của dioxin trong chuỗi thực phẩm	8
1.1.4. Tình hình ô nhiễm và phơi nhiễm dioxin ở Việt Nam	10
1.2. Các phương pháp phân tích và phát hiện dioxin và các chất dẫn xuất	13
1.2.1. Phương pháp sắc ký khối phổ.....	13
1.2.2. Phương pháp miễn dịch ELISA.....	14
1.2.3. Phương pháp khối phổ sử dụng lazer	14
1.2.4. Phương pháp sử dụng tế bào sinh học	15
1.3. Thụ thể AhR	17
1.4. Tình hình nghiên cứu ứng dụng CALUX trong phân tích dioxin và các chất dẫn xuất trên thế giới	19
1.5. Tình hình nghiên cứu dioxin và CALUX ở Việt Nam.....	20
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	22
2.1.1. Nguyên vật liệu:.....	22
2.1.2. Thiết bị.....	22
2.2. Phương pháp nghiên cứu	23
2.2.1. Thiết kế tạo vector biểu hiện tạm thời mang cấu trúc DRE và gen phát quang GFP	23
2.2.2. Biến nạp vector tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào tế bào khả biến E. coli DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt.....	24
2.2.3. Tách plasmid lượng lớn	24

2.2.4. Chuyển plasmid tái tổ hợp vào dòng tế bào sử dụng Lipofectamin 3000	25
2.2.5. Xác định hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp PCR và real-time PCR cho dòng tế bào biểu hiện luciferase.....	25
2.2.6. Chọn lọc dòng tế bào chuyển gen.....	26
2.2.7. Đánh giá dòng tế bào chuyển gen với chất chuẩn dioxin/ chất dẫn xuất.....	27
2.2.8. Xác định ngưỡng phát hiện trong chất chuẩn.....	28
2.2.9. Xử lý số liệu.....	28
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Tạo dòng tế bào chuyển gen HepG2-Luc.....	29
3.1.1. Kết quả tách và tạo lượng lớn plasmid p4xDRE-Luc	29
3.1.2. Kết quả đồng chuyển plasmid pcDNA3.1 và plasmid p4xDRE-Luc vào tế bào HepG2	30
3.1.3. Kết quả kiểm tra tế bào HepG2-Luc sau chuyển gen.....	31
3.1.4. Kết quả sàng lọc các dòng tế bào chuyển gen thành công	33
3.1.5. Đánh giá khả năng phát hiện chất chuẩn dioxin hoặc các dẫn xuất dioxin của tế bào chuyển gen HepG2-Luc	37
3.2. Tạo tế bào chuyển gen HepG2-eGFP và HEK293-eGFP	39
3.2.1. Kết quả tạo vector biểu hiện mang cấu trúc DRE và gen phát huỳnh quang GFP	39
3.2.2. Kết quả tách lượng lớn plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP	41
3.2.3. Kết quả chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào dòng tế bào HepG2 và HEK293	41
3.2.4. Kết quả chọn lọc các dòng tế bào chuyển gen.....	43
3.2.5. Kết quả bước đầu thử nghiệm dòng tế bào HepG2-eGFP với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn	45
3.2.6. Kết quả bước đầu thử nghiệm dòng tế bào HEK293-eGFP với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	52
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	53
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
Arnt	AhR nuclear translocator
BEQ	Bioanalytical EQuivalent
BMI	Body Mass Index (Chỉ số khối cơ thể)
CALUX	Chemical Activated Luciferase Gene eXpression
CAFLUX	Chemically activated fluorescence expression
DR-CALUX	Dioxin Response Chemical Activated Luciferase Gene eXpression
DRE	Dioxin response element (Yếu tố đáp ứng dioxin)
EFSA	European food safety authority (Cơ quan an toàn thực phẩm Châu Âu)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme)
EPA	Environmental Protection Agency (Cục bảo vệ môi trường Hoa kỳ)
EU	European Union (Liên minh Châu Âu)
HRGC/HRMS	High Resolution Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (Sắc ký khí ghép khối phổ độ phân giải cao)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Tổ chức quốc tế về nghiên cứu ung thư)
LD50	Lethal dose, 50%
PCB	Polychlorinated biphenyl
PCDD	Polychlorinated dibenzo-p-dioxin
PCDEs	Polychlorinated dibenzofuran
PCDFs	Polychlorinated dibenzofurans
PHAHs	Polyhalogenated aromatic compounds
REMPI	Resonance enhanced multiple photoelectron ionization
TCDD/2,3,7,8-	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TCDD	
TEQ	Toxicity equivalency quotient
TOFM	Time-of-flight mass spectrometry
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Giá trị Ct kiểm tra độ biểu hiện của gen luciferase trong các dòng tế bào	36
Bảng 3.2. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở các nồng độ B[a]P chuẩn	47
Bảng 3.3. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ TCDD 10^{-16} M.....	47
Bảng 3.4. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ B[a]P 10^{-13} M.....	49
Bảng 3.5. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ TCDD 10^{-15} M.....	50

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất TCDD, PCDD, PCDF và PCB .	3
Hình 1.2. Cách thức con người tích lũy dioxin và các dẫn xuất từ chuỗi thức ăn	8
Hình 1.3. Nguyên lý hoạt động của phương pháp Elisa cạnh tranh trực tiếp và gián tiếp để phát hiện dioxin	14
Hình 1.4. Mô hình cơ chế hoạt động của tế bào CALUX	16
Hình 1.5. Các thể hệ CALUX khác nhau dựa trên số vùng liên kết với dioxin	16
Hình 1.7. Cấu trúc của AhR.....	18
Hình 1.8. Mô hình của con đường truyền tín hiệu AHR	18
Hình 3.1. Kết quả tách lượng lớn plasmid p4xDRE-Luc.	29
Hình 3.2. Kết quả nuôi cấy tế bào sau khi đồng chuyển plasmid pcDNA3.1 và p4xDRE-Luc.	30
Hình 3.3. Kết quả tách DNA tổng số của tế bào HepG2 và HepG2-Luc.	31
Hình 3.4. Kết quả PCR DNA tổng số của tế bào HepG2, HepG2-Luc và plasmid p4xDRE.	32
Hình 3.5. Kết quả tách DNA tổng số của các dòng tế bào chuyển gen.	33
Hình 3.6. Kết quả PCR của các dòng chuyển gen thu được.	34
Hình 3.7. Kết quả tách DNA tổng số của 12 dòng tế bào.....	34
Hình 3.8. Kết quả PCR DNA tổng số của 12 dòng tế bào.....	35
Hình 3.9. Biểu đồ khuếch đại DNA của các dòng tế bào sử dụng môi Luci F/R (A) và môi GADPH (B)	36
Hình 3.10. Biểu đồ thể hiện kết quả đo độ phát quang khi tế bào HepG2-Luc tiếp xúc với chất chuẩn B[a]P	38
Hình 3.11. Kết quả khuếch đại gen DRE và sản phẩm cắt mở vòng plasmid pcDNA3.1(+) eGFP.	39
Hình 3.12. Kết quả biến nạp plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào tế bào E.coli DH5 α	40

Hình 3.13. Kết quả tách lượng lớn plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP.....	41
Hình 3.14. Hình ảnh tế bào HepG2 sau khi chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE- cDNA3.1(+) eGFP ở các độ phóng đại khác nhau.	42
Hình 3.15. Kết quả chụp ảnh tế bào HEK293 sau khi chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP.....	42
Hình 3.16. Hình ảnh tế bào chuyển gen HepG2-eGFP ở các nồng độ kháng sinh G418 khác nhau và độ phóng đại khác nhau.....	44
Hình 3.17. Hình ảnh tế bào HEK293-eGFP sau khi chọn dòng bằng tăng cường nồng độ kháng sinh G418 khác nhau.....	45
Hình 3.18. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HepG2-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn B[a]P và TCDD sau 24 giờ	46
Hình 3.19. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HEK293-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn B[a]P sau 24 giờ	48
Hình 3.20. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HEK293-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn TCDD sau 24 giờ.....	49

MỞ ĐẦU

Dioxin thuộc nhóm các hợp chất thơm đa halogen khó phân hủy (Polyhalogenated aromatic compounds- PHAHs) là các chất gây ô nhiễm môi trường phổ biến bao gồm dibenzo-p-dioxin polychlorin hóa (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCB) và ete diphenyl (PCDEs). PCB đã được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghiệp đa dạng như chất hóa dẻo, chất chống cháy, phụ gia sơn, chất kết dính, dầu ngâm, chất bịt kín và sáp. PCBs tích lũy trong môi trường chủ yếu do tính chất hóa lý, tính ổn định sinh học và bản chất kỵ nước của chúng. Mặt khác, PCDD, PCDF và PCDE chủ yếu được hình thành dưới dạng sản phẩm phụ trong quá trình công nghiệp hoặc quá trình đốt cháy bao gồm các lò đốt rác đô thị. Dư lượng dioxin đã được phát hiện trong nhiều loại chất nền bao gồm đất, trầm tích, nước, cá, động vật hoang dã, mô mỡ của con người, huyết thanh và sữa. Mặc dù mức độ phát thải dioxin đã giảm hơn 80% kể từ những năm 1980 ở hầu hết các quốc gia, nhưng việc phơi nhiễm các hợp chất tương tự dioxin qua đất hoặc trầm tích bị ô nhiễm và tích tụ trong chuỗi thức ăn vẫn là một vấn đề cho đến ngày nay.

Con người tiếp xúc với dioxin và các hợp chất liên quan chủ yếu thông qua thực phẩm (thịt, các sản phẩm từ sữa và cá) nên an toàn thực phẩm và thức ăn chăn nuôi được ưu tiên cao. EU đã đưa ra các tiêu chuẩn giới hạn nghiêm ngặt đối với hàm lượng dioxin trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bao gồm Chỉ thị của Ủy ban EU 2003/57/EC, 2002/69/EC, 2002/70/EC và Quy định của Hội đồng số 2375/2001). Do đó, các phương pháp phát hiện dioxin đã được nghiên cứu và phát triển. Một trong số đó là xét nghiệm DR-CALUX (Dioxin Response Chemical Activated Luciferase Gene eXpression). Phương pháp DR-CALUX là một kỹ thuật dùng tế bào cảm biến sinh học đã được chuyển gen sinh tổng hợp luciferase để phát hiện dioxin và các chất dẫn xuất trong mẫu vật ra đời với nhiều ưu điểm, có thể đánh giá được đúng cơ chế của dioxin lên tế bào và phân tích sàng lọc được nhiều mẫu với thời gian ngắn.

Hiện nay, xét nghiệm tế bào đã được thiết lập tốt tại một số phòng thí nghiệm ở châu Âu và trên toàn thế giới. Các “xét nghiệm sinh học” này được thực hiện sàng lọc giám sát nồng độ và xác định các mẫu nghi ngờ vi phạm

quy định an toàn thực phẩm. Đơn vị Nghiên cứu xét nghiệm Sinh học tại Phòng thí nghiệm Tham khảo của Liên minh Châu Âu (EU-RL) về Dioxin và PCB trong Thức ăn và Thực phẩm đã đánh giá và tối ưu hóa hiệu suất của xét nghiệm sinh học gen DR CALUX để sử dụng nó trong kiểm soát thức ăn và thực phẩm chính thức của Châu Âu. Tại Bỉ, Cơ quan Liên bang về An toàn Chuỗi Thực phẩm (FASFC) sử dụng phương pháp CALUX như một công cụ sàng lọc để giám sát sự tuân thủ tiêu chuẩn thực phẩm.

Ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về dioxin và các chất dẫn xuất cũng như nghiên cứu về các phương pháp CALUX phát hiện dioxin trong đất, nước, sữa mẹ, trong máu và thực phẩm... Tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn sử dụng các bộ kit CALUX của nước ngoài với chi phí khá cao, hiện chưa có nghiên cứu nào về sản xuất dòng tế bào chuyển gen *luciferase* nhằm chủ động trong động trong việc sàng lọc phát hiện các chất độc hại đã biết cũng như góp phần phát hiện ra các chất chưa biết. Ngoài ra, dòng tế bào CALUX thương mại sau một thời gian sử dụng bị thoái hóa nên khả năng phát hiện các chất độc bị giảm đi nên cần phải mua mới, rất tốn kém. Do đó, việc chủ động được dòng tế bào CALUX là cần thiết.

Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu tạo dòng tế bào DR CALUX hướng tới ứng dụng sàng lọc dioxin hoặc các chất dẫn xuất dioxin”** với mục tiêu và nội dung như sau:

Mục tiêu:

Tạo được dòng tế bào DR CALUX mang cấu trúc DREs và gen phát quang đảm bảo độ nhạy cho việc sàng lọc/ phát hiện dioxin hoặc các dẫn xuất dioxin

Nội dung:

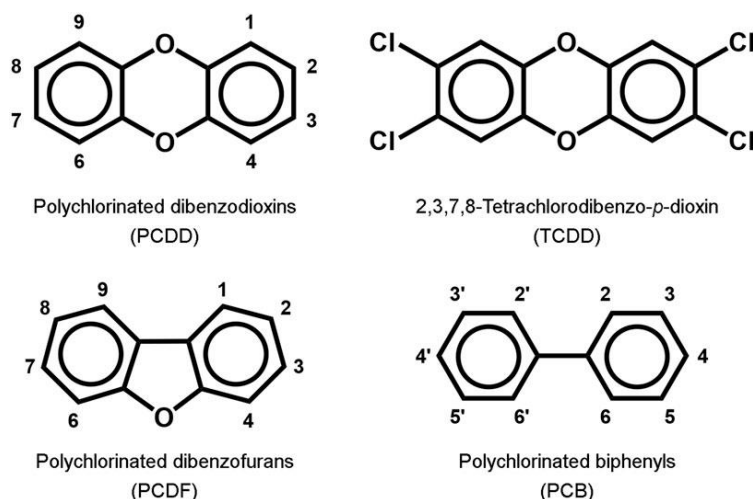
1. Tạo dòng tế bào DR CALUX mang plasmid chứa cấu trúc DREs và gen *luciferase*,
2. Thiết kế vector biểu hiện mang cấu trúc DREs+eGFP và tạo dòng tế bào DR CAFLUX chứa plasmid mang cấu trúc DREs và gen phát huỳnh quang *GFP*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Dioxin và độc tính của dioxin

1.1.1. Dioxin và các chất dẫn xuất

Dioxin là tên gọi chung của một nhóm hàng trăm hợp chất hóa học tồn tại lâu dài trong môi trường, cũng như trong cơ thể con người và các sinh vật khác. Dioxin là những hợp chất rất ổn định với tính chất phân cực thấp, ưa mỡ và kỵ nước. Chúng được phân loại thành ba nhóm: polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs, được gọi là dioxin), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs, được gọi là furan), và polychlorinated biphenyls coplanar (PCB tương tự dioxin, được gọi là dl-PCBs). Tùy theo số lượng nguyên tử clo và vị trí không gian, dioxin có 75 đồng loại PCDD (poly-chloro-dibenzo-dioxins) và 135 đồng loại PCDFs (poly-chloro-dibenzo-furans) với độc tính khác nhau. Trong 210 đồng loại, 17 đồng loại được biết là có độc tính cao vì chúng có thể có nguyên tử clo ở các vị trí 2, 3, 7 và 8 trên vòng benzen. Dựa trên hệ số tương đương độc tính quốc tế (I-TEF), 2,3,7,8-TCDD/TCDFs được biết đến là các hợp chất độc hại nhất [1]. Cấu trúc hóa học của TCDD, PCDD, PCDF và PCB được thể hiện trong Hình 1.1



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất TCDD, PCDD, PCDF và PCB [2].

Dioxin hầu như không tan trong nước, có độ ổn định nhiệt cao, chỉ có thể bị phân hủy hoàn toàn ở nhiệt độ trên 1200°C, bền với axit và kiềm mạnh và bám trên bề mặt các nguồn hữu cơ, đặc biệt là trong đất [3].

Dioxin và các chất dẫn xuất không được sản xuất mà chúng được tạo ra khi sản xuất các hóa chất hoặc sản phẩm khác, một số ít được sản xuất dùng cho nghiên cứu khoa học. Dioxin cũng được hình thành trong tự nhiên nhưng chủ yếu bắt nguồn từ sự tương tác của con người, đặc biệt là liên quan đến quá trình đốt cháy. Sự hình thành PCDD hoặc Furan được thúc đẩy bởi các phản ứng ở nhiệt độ cao giữa các hợp chất hữu cơ và clo. Do đó, các hoạt động như đốt rác thải, nấu chảy kim loại, cháy rừng và đốt nhiên liệu diesel sẽ tạo ra dioxin và các chất dẫn xuất [4].

Nồng độ dioxin trong khí quyển đã thay đổi trong những thập kỷ qua. Do sự hình thành PCDD/Fs chủ yếu chịu ảnh hưởng của các nguồn nhân tạo nên nồng độ dioxin trong môi trường không đáng kể cho đến khi có sự phát triển của ngành hóa chất vào những năm 1920. Từ đó cho đến đỉnh điểm vào những năm 1970 mức độ phát thải và nồng độ dioxin trong không khí, đất và nước đã tăng lên nhiều lần, nguyên nhân chủ yếu là do sự thiếu hiểu biết chung về tác động tiêu cực của các hợp chất này đối với sức khỏe con người. Ngoài ra, do thiếu sự kiểm soát và quy trình khắt khe trong các nhà máy công nghiệp thời đó nên đã xảy ra những tai nạn nghiêm trọng gây ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường ở các khu vực khác nhau trên thế giới, chẳng hạn như thảm họa sinh thái ở Seveso, Ý. PCDD/Fs như TCDD còn có mặt trong các cuộc xung đột vũ trang, như chất độc da cam trong Chiến tranh Việt Nam [5]. Nhưng xu hướng đã thay đổi từ những năm 1970 cho đến ngày nay; khi mà nhận thức xã hội được nâng cao, các quy trình công nghiệp hiệu quả hơn và luật pháp chặt chẽ hơn đã làm giảm mức độ phát thải và ô nhiễm của PCDD/Fs từ các nguồn công nghiệp [5]. Mặt khác, khí thải từ các nguồn phi công nghiệp hầu như không thay đổi trong những năm qua và ngày nay là một trong những nguyên nhân chính trong sự gia tăng dioxin [6].

*** Các nguồn tạo ra dioxin và các chất dẫn xuất**

Các nguồn tạo ra PCDD/Fs liên quan đến hoạt động của con người bao gồm 5 nguồn chính: (i) các sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất hóa chất clo hữu cơ (ví dụ: PCB, chlorophenol, chlorobenzene, thuốc trừ sâu clo hóa, polyvinylchloride (PVC)); (ii) kết quả của quá trình đốt cháy không hoàn toàn khi có nguồn clo (ví dụ: đốt cháy một số loại nhựa); (iii) do sử dụng clo vô cơ (ví dụ như trước đây phổ biến trong ngành tẩy trắng giấy); (iv) tái

chế/sản xuất một số loại khoáng sản; (v) kết quả của sự hình thành tự nhiên và sự hiện diện trong một số loại đất sét (ví dụ: đất sét bi Mississippi, kaolinit) tạo thành một phần của thức ăn và thực phẩm bổ sung hoặc có thể được sử dụng trong sản xuất thức ăn và thực phẩm.

Mặc dù sự hình thành dioxin xảy ra ở cấp độ cục bộ trong một khu vực nhất định, nhưng sự phân bố của các chất độc này trong môi trường có thể rộng hơn nhiều. Ví dụ, khi dioxin được giải phóng vào khí quyển sẽ liên kết với các hạt khác, thậm chí bụi mịn PM2.5 như tro hoặc khói của lò đốt, các hạt này có thể lơ lửng và bay theo gió trong thời gian dài trước khi lắng đọng trên các bề mặt trên cạn hoặc dưới nước tại các địa điểm cách xa sự phát tán ban đầu của chúng [7]. Sau đó, dioxin có thể được các sinh vật trong môi trường nước hấp thụ hoặc bám vào cỏ, rau và các loại cây trồng khác [8], [9]. Động vật ăn cỏ bị nhiễm dioxin như bò, trâu, dê, vịt và gà sẽ tích lũy dioxin trong các mô của chúng (đặc biệt là trong gan và mô mỡ dự trữ chất béo) để chất độc di chuyển qua chuỗi thức ăn và cuối cùng xâm nhập vào con người thông qua chế độ ăn uống [10]. Tốc độ hấp thụ dioxin phụ thuộc vào đường tiếp xúc, kích thước phân tử và độ hòa tan của chúng. Ví dụ, tỷ lệ hấp thụ TCDD qua ruột non và phổi lần lượt là khoảng 50% và 90% [11]. Theo các nghiên cứu thực nghiệm trên chuột [11], [12], khả năng hấp thụ qua da bị hạn chế hơn nhiều, có thể dưới 1%. Một khi dioxin được hấp thụ vào cơ thể con người, chúng sẽ dễ dàng được phân phối theo dòng máu đến tất cả các cơ quan và đặc biệt có xu hướng tích tụ trong gan và các mô mỡ. Tại gan, dioxin được chuyển hóa thành các hợp chất ít độc hơn, hòa tan trong nước, nhưng quá trình giải độc này diễn ra rất chậm. Tốc độ bài tiết và thời gian bán hủy của dioxin khác nhau giữa các loài, từ 11 ngày ở chuột đồng [13], 17–31 ngày ở chuột cống và đặc biệt ở người là 7–11 năm.

1.1.2. Ảnh hưởng của dioxin và các chất dẫn xuất đến sức khỏe và môi trường

Dioxin và furan là các hóa chất độc hại nhất được biết đến hiện nay trong khoa học. Bản báo cáo sơ thảo của Cục bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (EPA) năm 1994 đã miêu tả dioxin như là một tác nhân nguy hiểm đối với sức khỏe cộng đồng. Cũng theo EPA, dường như không có mức độ phơi nhiễm dioxin nào được coi là an toàn.

Tại Việt Nam, chất diệt cỏ có chứa dioxin do quân đội Mỹ phun rải trong chiến tranh đã gây ảnh hưởng lớn đến hệ sinh thái tại nhiều khu vực như A Lưới, Mã Đà, Hồ Biên Hùng. Các nhà khoa học Việt Nam và thế giới nhận thấy có sự suy giảm nghiêm trọng đa dạng sinh học tại những khu vực này. Nhiều loài vi sinh vật bản địa suy giảm tới mức gần như mất hẳn. Số lượng các loài động vật bậc cao cũng bị suy giảm nặng nề. Sự tích lũy dioxin trong động vật sống dưới nước cũng cao hơn hẳn các khu vực khác, dẫn đến sự suy giảm khả năng sinh sản và số lượng của các loài.

Ngoài chiến tranh Việt Nam, dioxin trong chất da cam gây nên thảm họa sinh thái ở Seveso (Ý), và Times Beach (Missouri), Love Canal (New York),... Nhưng bị nhiễm nặng nhất và lâu dài nhất vẫn là ở miền Nam Việt Nam, nơi bị Mỹ rải chất độc da cam suốt 10 năm. 2,3,7,8-TCDD là chất độc mạnh nhất trong các hóa chất, nó độc gấp 1 triệu lần so với tất cả các chất độc đã có trong tự nhiên và là tồn tại lâu bền nhất.

Dioxin là tác nhân đe dọa nguy hiểm, dù ở nồng độ thấp (một phần tỷ) cũng đủ tàn phá sức khỏe con người và môi trường. Phơi nhiễm dioxin ảnh hưởng đến chức năng sinh sản của nam giới bằng cách thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình sinh tinh và thay đổi quá trình tạo steroid; ảnh hưởng chức năng sinh sản của phụ nữ bằng cách thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến sự phát triển và trưởng thành của nang noãn, chức năng tử cung, sự phát triển của nhau thai cũng như hình thái và sự phát triển của thai nhi [14].

Ở người, phơi nhiễm dioxin ở người gây rối loạn hệ miễn dịch. Hyoung-Ah Kim và cộng sự (2003) đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của chất da cam lên hệ miễn dịch các cựu chiến binh Hàn Quốc tại Việt Nam sống ở các khu vực bị rải chất da cam. Kết quả cho thấy ở những cựu chiến binh bị phơi nhiễm có nồng độ IgE và IgG1 cao hơn nhóm đối chứng là những người khỏe mạnh không phơi nhiễm chất da cam/ dioxin cùng độ tuổi [15].

Dioxin cũng gây ảnh hưởng đến các tuyến nội tiết gây ra các bệnh ở vùng trung tâm và ngoại vi của hệ thần kinh, đặc biệt là ở hệ thần kinh và khớp.

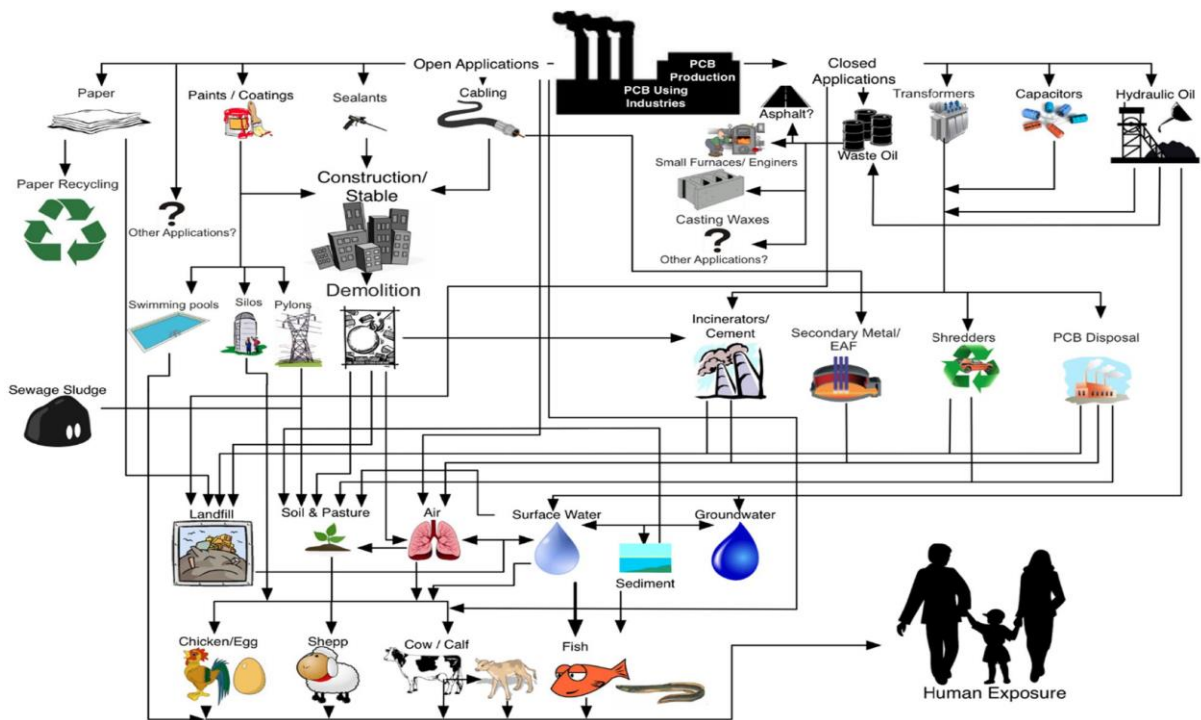
Các báo cáo của EPA đã công nhận dioxin là một chất gây ung thư cho

con người. Năm 1997, Tổ chức quốc tế về nghiên cứu ung thư (IARC) thuộc WHO đã công bố 2,3,7,8-TCDD là chất gây ung thư nhóm 1 (nghĩa là nhóm đã được công nhận là gây ung thư). Đồng thời, tháng 1 năm 2001, chương trình Độc học Quốc gia Hoa Kỳ đã chuyển dioxin vào nhóm "các chất gây ung thư cho người". Trong một nghiên cứu kiểm định năm 2003, các nhà khoa học cũng khẳng định không có một liều lượng nào là an toàn hoặc ngưỡng dioxin mà dưới nó thì không gây ung thư. Năm 2012, trong tập bản đồ về các tác nhân hóa học và môi liên quan do IARC xuất bản, TCDD được làm rõ là chất gây ung có liên quan đến sarcoma mô mềm, ung thư phổi và ung thư hạch không Hodgkin [16]. Các nghiên cứu được tiến hành sau Thảm kịch sinh thái Seveso (Ý) đã cho thấy sự gia tăng số ca mắc ung thư và tử vong liên quan đến ung thư [17], [18]. Các bệnh ung thư thường thấy nhất là; ung thư hạch, đa u tủy, sarcoma mô mềm, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung và tinh hoàn. Yi và cộng sự (2014) đã tiến hành nghiên cứu xác định mối liên quan giữa phơi nhiễm chất da cam/dioxin và tỷ lệ tử vong của các cựu chiến binh Hàn Quốc tại Việt Nam. Từ ngày 1/1/1992 đến 21/12/2005, 180 639 cựu chiến binh Hàn Quốc tại Việt Nam được theo dõi tính trạng sức khỏe và nguyên nhân tử vong. Chỉ số phơi nhiễm chất da cam/dioxin dựa vào khoảng cách giữa đơn vị cựu chiến binh với các khu vực bị rải chất da cam. Tỷ lệ rủi ro được điều chỉnh và khoảng tin cậy 95% được tính toán bằng mô hình của Cox. Nghiên cứu đã chỉ ra tỷ lệ tử vong tăng cao khi phơi nhiễm với chất da cam/ dioxin. Tỷ lệ tử vong do ung thư bao gồm: ung thư dạ dày, ruột non, gan, thanh quản, phổi, bàng quang và tuyến giáp có liên quan đến phơi nhiễm chất da cam. Tử vong do đau thắt ngực, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính và các bệnh về gan tăng lên khi phơi nhiễm chất da cam ngày càng tăng [14].

Ngoài ung thư, việc tiếp xúc với dioxin cũng có thể gây ra các vấn đề nghiêm trọng về sinh sản và phát triển. Dioxin có khả năng làm hỏng hệ thống miễn dịch và can thiệp vào hệ thống nội tiết tố. Phơi nhiễm dioxin có liên quan đến dị tật bẩm sinh, không có khả năng mang thai, giảm khả năng sinh sản, giảm số lượng tinh trùng, lạc nội mạc tử cung, tiểu đường, khuyết tật học tập, ức chế hệ thống miễn dịch, các vấn đề về phổi, rối loạn da, giảm mức testosterone...

1.1.3. Các hợp chất của dioxin trong chuỗi thực phẩm

Dioxin là mối quan tâm đặc biệt đối với môi trường và sức khỏe con người vì chúng là chất gây ô nhiễm môi trường trong thời gian dài và có khả năng tích tụ trong chuỗi thức ăn. Do đặc tính ưa mỡ của dioxin, các hóa chất dễ dàng được hấp thụ vào mô mỡ và có xu hướng tích tụ trong động vật - ví dụ như ở cá, do sự có mặt của hóa chất trong môi trường nước, gia súc và các vật nuôi khác, là kết quả của việc giải phóng các hóa chất vào môi trường trên cạn. Tiêu thụ thực phẩm có khả năng bị ô nhiễm, chẳng hạn như thịt bò và các sản phẩm từ sữa, là con đường chính để xâm nhập dioxin vào cơ thể con người. Trên thực tế, hơn 90 phần trăm phơi nhiễm dioxin ở người là do ăn uống. Khi vào cơ thể con người, dioxin được hấp thụ vào các tế bào mỡ, nơi chúng tồn tại trong thời gian dài.



Hình 1.2. Cách thức con người tích lũy dioxin và các dẫn xuất từ chuỗi thức ăn [19]

PCDD furan và PCB là các hợp chất được công nhận rộng rãi là chất gây ô nhiễm môi trường và thực phẩm [20]. Việc sử dụng PCB và quản lý chất này không tốt đã dẫn đến ô nhiễm môi trường trên diện rộng. Các phương pháp xử lý chất thải trước đây như chôn lấp vẫn đang góp phần giải phóng các chất ô nhiễm này vào môi trường và làm tiếp xúc với con người [21]. Tương

tự, PCDD/Fs được giải phóng từ khí thải công nghiệp trong hai thế kỷ qua và quá trình sản xuất clo hữu cơ trong một thập kỷ qua đã làm ô nhiễm đất và lớp trầm tích, tạo ra các điểm nóng ô nhiễm [22], [23], [24].

Con người tiếp xúc với dioxin và PCB chủ yếu qua đường ăn uống, đặc biệt là qua việc tiêu thụ các thực phẩm có nguồn gốc động vật như thịt, sữa và trứng, và các sản phẩm thủy sản. Trái cây, rau, quả, các loại hạt và ngũ cốc thường có hàm lượng PCDD / PCDF và PCBs thấp [25], nhưng khi tiêu thụ nhiều thì các loại thực phẩm này cũng góp đưa vào cơ thể các chất ô nhiễm [19] (Hình 1.2).

Năm 2002, EU quy định hàm lượng PCDD/Fs tối đa cho một số loại thực phẩm nhất định. Năm 2006, qui định hàm lượng PCB/Fs tổng và hàm lượng PCB giống dioxin (dl - PCB) [26] ra đời. Quy định đã được sửa đổi vào năm 2011, EU đưa ra quy định về hàm lượng PCDD/F, tổng PCDD/F và dl - PCB dựa trên độc tính tương đương của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đưa ra vào năm 2005 (TEF 2005), và thiết lập hàm lượng tối đa cho các PCBs không giống dioxin (ndl - PCBs) [30].

Mức PCDD/F và PCB trung bình đã giảm ở nhiều quốc gia so với những năm 1990, điều này cũng được phản ánh qua việc hàm lượng PCB và PCDD/F trong sữa mẹ giảm [28]. Hầu hết các mẫu thịt và sữa trên thị trường Châu Âu đều đáp ứng các giới hạn quy định.

Tuy nhiên, trong 10 năm qua, thịt và trứng bị nhiễm PCB được phát hiện thường xuyên hơn sau khi EU đưa dl-PCB vào quy định năm 2006.

Thức ăn chăn nuôi và phụ gia là những nguồn chính gây ô nhiễm dioxin và PCB cho thực phẩm có nguồn gốc động vật. Chăn nuôi theo phương thức truyền thống là nguyên nhân chính dẫn đến PCDD/Fs và PCB trong thực phẩm có nguồn gốc động vật vượt quá mức tối đa chắt hạn như sự cố PCB và dioxin của Bỉ năm 1999 [29] trường hợp viêm cam từ Brazil [30] vụ ô nhiễm thịt lợn ở Ireland [31] ô nhiễm thịt lợn ở Chile [32] và nhiễm diesel sinh học ở Đức [40] đã ảnh hưởng đến các trang trại công nghiệp nông nghiệp lớn.

Trong những năm gần đây, cừu (đặc biệt là gan cừu) và thịt bò [36], [37] từ quá trình sản xuất tự do cũng đã vượt quá giới hạn tối đa của EU về tổng số

PCDD/F và dl-PCB, ngay cả khi thức ăn chăn nuôi không nhiễm các chất này. Trứng từ gà đẻ được nuôi ngoài trời rất nhạy cảm với PCDD/F và PCB ô nhiễm trong đất và có thể phơi nhiễm với con người [38]. Điều này được ghi nhận ngày càng nhiều trong thập kỷ qua, ngày càng có nhiều báo cáo về trứng bị nhiễm PCDD/F và PCB [39]. Mối liên quan của sự ô nhiễm này đã được chứng minh trong một nghiên cứu gần đây, kết quả cho thấy rằng hơn 50% số trứng từ 60 đàn gà ở Hà Lan đã vượt quá giới hạn tối đa của EU [39].

Trong một nghiên cứu do Cơ quan Môi trường Đức khởi xướng, các nhà nghiên cứu đã đánh giá tác động của PCDD/F đến môi trường và lượng PCB ở các sản phẩm có nguồn gốc động vật, và đánh giá tầm quan trọng của các nguồn khác nhau [40]. Nghiên cứu đã khảo sát đất và nguồn thức ăn chăn nuôi dẫn đến thực phẩm có nguồn gốc động vật bị nhiễm PCDD/F và PCB vượt quá mức tối đa của EU, đồng thời thiết lập các giới hạn cho ô nhiễm đất. Đánh giá cho thấy gà thịt/trứng và bò thịt nuôi thả rộng có thể bị nhiễm dl-PCB và PCDD/F ngay cả khi trong đất có hàm lượng các chất này tương đối thấp (trước đây được coi là an toàn). Do đó, cần có các tiêu chuẩn khắt khe hơn về đất và kiểm soát nguồn phát thải.

1.1.4. Tình hình ô nhiễm và phơi nhiễm dioxin ở Việt Nam

Nguồn phát thải dioxin chủ yếu ra môi trường tại Việt Nam hiện nay xuất phát từ các điểm nóng mà trước đây đã từng là các sân bay quân sự, nơi quân đội Mỹ sử dụng làm kho chứa, nạp chất diệt cỏ và rửa máy bay trong suốt thời gian diễn ra cuộc chiến tranh hóa học (1961-1971). Gần nửa thế kỷ sau khi chiến tranh kết thúc, nhưng tình trạng ô nhiễm môi trường do chất da cam/ dioxin trong khu vực và xung quanh các sân bay Đà Nẵng, Biên Hòa, Phù Cát vẫn rất nghiêm trọng.

Ngay từ những năm 1970, các công trình nghiên cứu về dioxin đã được tiến hành trên các mẫu sữa của các bà mẹ sinh sống tại các khu vực bị phun rải chất da cam. Các mẫu này được thu thập để định lượng nồng độ dioxin. Nồng độ 2,3,7,8-TCDD trong các mẫu sữa mẹ ở thời điểm đó đo được trong khoảng 333-1832 pg/g mỡ. Trong những năm tiếp theo, nồng độ dioxin trong mẫu sữa mẹ giảm xuống: 133-266 pg/mỡ năm 1973, 11-19 pg/g mỡ trong năm 1985-1999) nhưng vẫn cao hơn nhiều lần so với nồng độ 2,3,7,8-TCDD trong mẫu sữa mẹ sống ở nơi không bị phun rải chất da cam [41].

Trần Thị Tuyết Hạnh và cộng sự (2013) đã nghiên cứu đánh giá nguy cơ sức khỏe môi trường do phơi nhiễm với dioxin trong thực phẩm tại sân bay Đà Nẵng- là một trong 3 điểm nóng nhiễm dioxin nghiêm trọng nhất tại Việt Nam. Nghiên cứu chỉ ra rằng nếu tiêu thụ thực phẩm nuôi trồng tại địa phương như cá, tôm, cua, ốc nước ngọt, thịt gà và vịt chăn thả tự do ở khu vực trong và xung quanh sân bay thì người dân sống tại 4 phường An Khê, Hòa Khê, Thanh Khê Tây và Chính Gián có nguy cơ cao phơi nhiễm với dioxin trong thực phẩm do có mức tiêu thụ dioxin hàng ngày vượt xa giới hạn mà tổ chức Y tế thế giới đưa ra (1 - 4 pg/kg/ngày) [42].

Năm 2014, tác giả Đào Văn Tùng đã nghiên cứu sự thay đổi hormon steroid trong nước bọt, sữa và huyết thanh trên những người sống tại Phù Cát- Bình Định, vùng phơi nhiễm chất Da cam/ dioxin. Kết quả cho thấy nồng độ đương lượng độc của dioxin trong sữa mẹ ở Phù Cát là $11,558 \pm 4.079$ pg/g lipid cao hơn gấp 3,5 lần so với những người mẹ sống ở Kim Bảng- vùng không phơi nhiễm dioxin với mức trung bình là $3,505 \pm 1,356$ pg/g lipid. Nồng độ đương lượng độc của dioxin trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng là $9,154 \pm 5,846$ pg/g lipid cao hơn những người mẹ sinh con thứ khoảng 1,5 lần với mức trung bình là $6,268 \pm 4,212$ pg/g lipid [43].

Ngày nay, dioxin và các chất dẫn xuất vẫn liên tục được tạo ra từ các sản xuất các hóa chất công nghiệp: sản xuất thuốc trừ sâu, sản xuất giấy giấy, hoặc các hợp chất chứa clo.... Dioxin cũng được tạo ra từ các quá trình đốt cháy rác thải đô thị, rác thải y tế, rác thải công nghiệp, khí thải từ các nhà máy.

* Dioxin và các chất dẫn xuất trong trầm tích

Dioxin hiện diện trong nước có thể thông qua 3 con đường: nguồn thải trực tiếp vào nước, sự lắng đọng và rơi xuống của các hạt lơ lửng trong không khí có sự tích tụ dioxin và sự rửa trôi dioxin từ vùng đất ô nhiễm ra nguồn nước theo nước mưa hoặc nước tưới tiêu. Do có tính kỵ nước cao, độ tan trong nước thấp nên các dioxin sẽ lắng đọng và tích tụ lâu dài trong môi trường trầm tích. Hàm lượng dioxin trong trầm tích tại một số khu vực ở Việt Nam được nhóm tác giả Kishida và cộng sự (2010) thực hiện phân tích từ năm 2003 đến năm 2004. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá hàm lượng các chỉ tiêu PCDD/Fs, dl-PCBs trong 10 mẫu trầm tích tại khu vực rừng ngập

mặn thuộc huyện Cần Giờ, Hồ Chí Minh; 3 mẫu lấy tại các đầm phá tại Huế và 2 mẫu lấy tại các hồ ở Hà Nội. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng TEQ trong mẫu trầm tích tại Cần Giờ là $2,7 \pm 1,7$ ng/kg trọng lượng khô tương đương với các mẫu tại Huế là $2,9 \pm 2,4$ ng/kg trọng lượng khô và thấp hơn so với mẫu ở Hà Nội là $9,6 \pm 0,35$ ng/kg trọng lượng khô. Hàm lượng dl-PCB trong trầm tích tại Cần Giờ và Huế tương đương nhau và thấp hơn tại Hà Nội. Nồng độ dl-PCB trung bình tại Hà Nội cao hơn so với tại Cần Giờ xấp xỉ 40 lần.

Trong 2 năm 2013-2014, Trung tâm Nhiệt đới Việt- Nga đã tiến hành khảo sát, lấy mẫu phân tích hàm lượng 29 chỉ tiêu PCDD/Fs và dl-PCB trong trầm tích tại một số khu vực tại Hà Nội, Thái Nguyên và Thanh Hóa. Tại Hà Nội, mẫu có hàm lượng TEQ cao nhất được lấy tại sông Tô Lịch (6,7 pg/g), mẫu trầm tích lấy tại ao rau muống thuộc địa phận xã Cát Quế, Hoài Đức có hàm lượng TEQ cao thứ 2 (6,64 pg/g). Các mẫu có hàm lượng TEQ thấp nhất được lấy tại mương La Khê, Kim Bài, Thanh Oai (0,92 pg/g) và tại hồ Đắc Di, Đống Đa (1,29 pg/g). Tỷ lệ TCDD/TEQ trong các mẫu đều thấp từ 8,6-21,2%. Tỷ lệ các dl-PCB/TEQ cũng thấp trừ mẫu lấy tại sông Nhuệ có tỷ lệ này đạt 39,5%. Tại Thái Nguyên, 4/5 mẫu trầm tích được lấy tại khu vực các nhà máy luyện kim, đây là hoạt động công nghiệp điển hình tại Thái Nguyên và cũng được cho là hoạt động có khả năng hình thành và phát sinh dioxin. Các mẫu được lấy tại khâu sau xử lý nước thải và trước khi thải ra môi trường có hàm lượng TEQ tương đối thấp (1,34-2,801 pg/g). Tại Thanh Hóa, hàm lượng TEQ trung bình trong các mẫu (0,68 pg/g) thấp hơn các mẫu lấy tại Thái Nguyên và Hà Nội. Khi so sánh với ngưỡng dioxin theo TCVN8183:2009 thì không có mẫu trầm tích nào của đợt khảo sát có hàm lượng vượt ngưỡng [44].

* Dioxin và các chất dẫn xuất trong môi trường đất

Ngoài nguồn phát thải dioxin từ chất diệt cỏ thì quá trình đốt cháy và các hoạt động sử dụng nhiệt độ cao vẫn được biết là quá trình chính dẫn đến sự phát thải PCDD/Fs vào môi trường. Môi trường đất xung quanh các nhà máy xử lý rác thải đô thị, rác thải y tế, luyện kim, năng lượng cũng phải đối mặt với nguy cơ ô nhiễm dioxin. Trung tâm Nhiệt đới Việt- Nga đã tiến hành lấy mẫu và phân tích hàm lượng 29 chỉ tiêu PCDD/Fs và dl-PCB trong đất tại Hà

Nội, Thái Nguyên và Thanh Hóa trong 2 năm 2013 và 2014. Kết quả phân tích cho thấy mức độ nhiễm dioxin trong đất ở Hà Nội không có tính đặc trưng cao cho khu vực có và không có hoạt động thiêu đốt, hàm lượng TEQ trong các mẫu tương đối thấp (0,58-7,83 pg/g), hàm lượng TCDD thấp trong khi đồng loại như OCDD hay HpCDF cao. Trong 2 mẫu đất lấy tại Nga Bạch, Nga Sơn, Thanh Hóa, hàm lượng TEQ ở 1 mẫu cao gấp 4 lần mẫu còn lại (3,42 và 0,79 pg/g), tuy nhiên với số lượng mẫu còn hạn chế nên chưa thể kết luận về nguồn ô nhiễm. Tại Thái Nguyên, mẫu đất thu được có hàm lượng TEQ (0,45 pg/g) thấp nhất so với các mẫu đất ở Hà Nội và Thanh Hóa. Khi so sánh với ngưỡng dioxin trong đất tại các điểm bị ô nhiễm nặng dioxin theo TCVN 8183:2009 thì tất cả các mẫu đất thu thập có hàm lượng TEQ không quá 10 pg/g, thấp hơn ngưỡng cho phép [44].

* Dioxin và các chất dẫn xuất trong môi trường nước

Môi trường nước không phải là môi trường tích lũy đáng kể các dioxin và các chất dẫn xuất do có tính phân cực kém và độ tan thấp. Để phân tích được dioxin với hàm lượng rất thấp trong nước cần có các kỹ thuật tách chiết, làm giàu mẫu và sử dụng thiết bị có giới hạn phát hiện thấp. Năm 2013, Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga đã tiến hành lấy mẫu và phân tích hàm lượng 29 chỉ tiêu PCDD/Fs và dl-PCBs trong nước tại Hà Nội, Thanh Hóa và Nam Định. Đối tượng phân tích bao gồm nước mặt (nước sông, nước mương, nước ở cửa biển), nước sinh hoạt lấy tại các hộ gia đình, nước dùng cho nuôi thủy sản ở Thanh Hóa và nước tại bể chứa sau xử lý của một viện ở Nam Định. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng TEQ trong các mẫu nước sinh hoạt ở Hà Nội có giá trị 0,48 đến 0,85 pg/L cho thấy không có sự ô nhiễm dioxin đáng lo ngại trong nước ngầm ở khu vực này. Trong các mẫu nước sinh hoạt tại Hà Nội đều không phát hiện được các đồng loại dioxin/furans, các dl-PCBs chủ yếu phát hiện được là PCB77, PCB118, PCB 105 [44].

1.2. Các phương pháp phân tích và phát hiện dioxin và các chất dẫn xuất

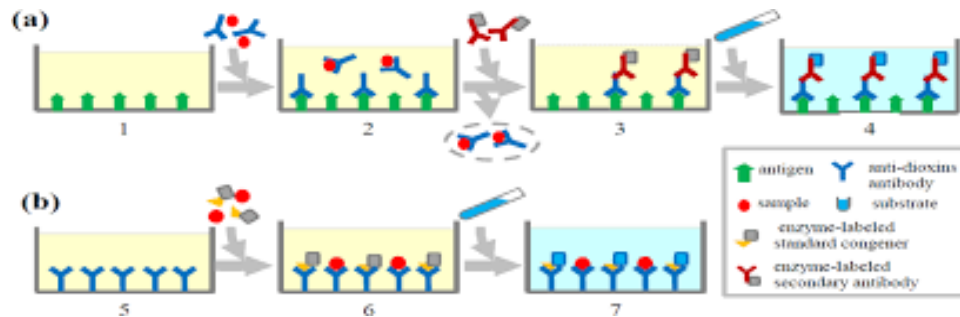
1.2.1. Phương pháp sắc ký khối phổ

Phương pháp sắc ký khí độ phân giải cao/Khối phổ độ phân giải cao (HRGC/HRMS) được coi là "tiêu chuẩn vàng" để phát hiện các dấu vết của dioxin. Các tiêu chuẩn của Hoa Kỳ về EPA1613, EPA0023A, EPA8290A,

tiêu chuẩn công nghiệp Nhật Bản JISK0311, 0312, EU EN1948 và tiêu chuẩn HJ77 của Trung Quốc đều được xây dựng theo phương pháp HRGC/HRMS.. Phương pháp HRGC/HRMS có thể phân tích và phát hiện dioxin ở nồng độ rất thấp, có độ nhạy cao, có khả năng định lượng và định tính từng đồng phân. Tuy nhiên, thời gian phân tích mẫu dài, các thiết bị hệ thống đắt tiền dẫn đến chi phí cao và yêu cầu kỹ thuật đối với các nhà phân tích rất cao [45].

1.2.2. Phương pháp miễn dịch ELISA

Nguyên tắc cơ bản của ELISA cạnh tranh là dioxin trong các mẫu môi trường và mẫu sinh học cạnh tranh với các đồng phân tiêu chuẩn được kết hợp với enzyme để liên kết với kháng thể kháng 1 đồng phân dioxin nhất định được cố định trên microplate. Cơ chất phản ứng với chất chuẩn đồng phân có gắn enzyme và tạo ra độ hấp thụ phản ánh lượng chất đồng phân chuẩn liên kết với kháng thể trên tấm. Độ hấp thụ tỷ lệ nghịch với lượng dioxin có trong các mẫu thử nghiệm. Nồng độ dioxin trong các mẫu được tính toán bằng cách so sánh với đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách thêm một lượng dioxin chuẩn đã biết.



Hình 1.3. Nguyên lý hoạt động của phương pháp Elisa cạnh tranh trực tiếp và gián tiếp để phát hiện dioxin [46].

Phương pháp miễn dịch có ưu điểm là thao tác đơn giản, phát hiện nhanh, độ chọn lọc cao nên được sử dụng rộng rãi trong phân tích và phát hiện dioxin và các chất dẫn xuất. Tuy nhiên, phương pháp này phát hiện ở phạm vi hẹp độ nhạy không cao.

1.2.3. Phương pháp khối phổ sử dụng lazer

Phương pháp khối phổ sử dụng lazer là phương pháp phát hiện 2 chiều, là sự kết hợp của quá trình ion hóa đa quang điện tử (REMPI) và khối phổ mẫu hấp thụ (TOFM). Ưu điểm của phương pháp này có tính chọn lọc cao, đo

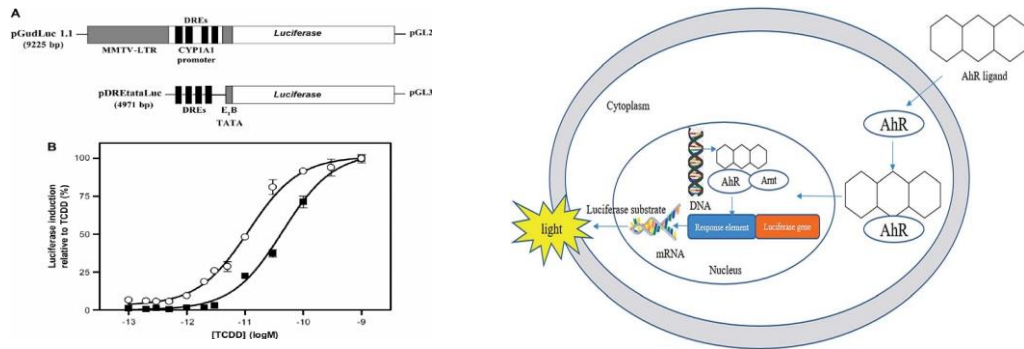
đồng thời nhiều thành phần, độ nhạy và độ phân giải cao nên thích hợp để theo dõi động học thời gian thực các loại khí gây ô nhiễm.

1.2.4. Phương pháp sử dụng tế bào sinh học

Vào cuối những năm 1980, Denison và các cộng sự đã đưa ra một thử nghiệm sinh học mới được thực hiện trong các dòng tế bào biểu hiện mức độ AhR cao và dựa trên việc kích hoạt cấu trúc gen báo cáo [47], [48]. Khi được chuyển vào các dòng tế bào gan, ruột và phôi của động vật có vú, vector chứa gen luciferase được điều khiển bởi bốn trình tự XRE của CYP1A1 promoter cho phép phát hiện nồng độ TCDD thấp tới 0,1 pM [49]. Phiên bản thành công nhất về mặt thương mại của xét nghiệm sinh học này là CALUX, được cấp bằng sáng chế vào năm 1998 và đưa vào phân tích các mẫu ở Châu Á, Châu Âu và Hoa Kỳ từ năm 2005.

Xét nghiệm CALUX hay DR CALUX là một kỹ thuật dùng tế bào cảm biến sinh học để định lượng dioxin và PCB trong mẫu phân tích. Với kỹ thuật DR CALUX, kết quả xác định được là tổng TEQ của tất cả các đồng đẳng dioxin và PCB. Khác với kỹ thuật GCMS, kỹ thuật DR CALUX không định lượng nồng độ từng đồng đẳng dioxin và PCB riêng rẽ [50].

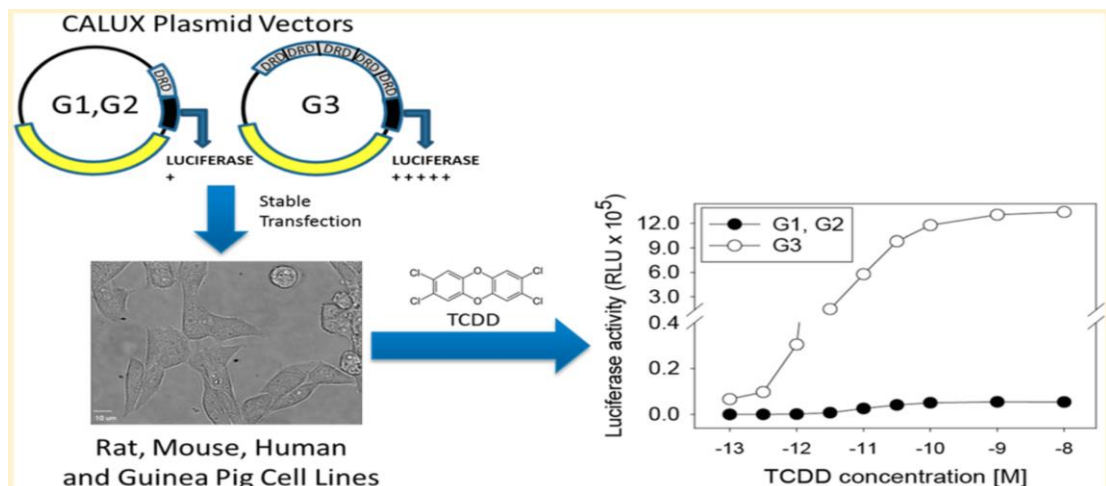
Nguyên lý của phương pháp là dựa vào đặc tính của các chất dioxin, PCB và các chất tương tự dioxin gắn đặc hiệu vào thụ thể AhR trên bề mặt tế bào, các nhà nghiên cứu đã phát triển dòng tế bào đặc trưng để phát hiện dioxin và PCB. Khi dioxin và PCB tiếp xúc với tế bào này, thụ thể AhR trên bề mặt tế bào sẽ gắn với chúng. Phức hợp này sau đó di chuyển vào trong nhân và gắn đặc hiệu với protein ARNT. Phức hợp mới dioxin-AhR-ARNT tiếp tục gắn đặc hiệu với trình tự đáp ứng dioxin DRE nằm trên chuỗi DNA. Đây là vùng nằm ở phía trên, tại vùng khởi động của rất nhiều gen, trong đó có gen mã hóa cho quá trình tổng hợp enzyme Luciferase. Enzyme Luciferase sẽ chuyển hóa cơ chất Luciferin. Phản ứng chuyển hóa cơ chất này phát ra ánh sáng. Cường độ ánh sáng sẽ tương ứng với lượng dioxin và PCB tiếp xúc với tế bào cảm biến. Giá trị cường độ ánh sáng được đo và dùng để tính toán nồng độ dioxin và các chất dẫn xuất có trong mẫu dựa trên đường chuẩn xây dựng từ việc cho tế bào tiếp xúc với TCDD ở các nồng độ đã biết trước khác nhau [48], [51] (Hình 1.4).



Hình 1.4. Mô hình cơ chế hoạt động của tế bào CALUX [52]

Cũng năm 1996, dựa trên dựa trên biểu hiện gen luciferase của đom đóm (*Photinus pyralis*) qua trung gian AhR, Murk và cộng sự phát triển một thử nghiệm sinh học invitro phát hiện PHAH. Một vector có chứa gen luciferase dưới sự kiểm soát phiên mã của DREs được phân lập từ vùng 5 của gen P450 1A1 của chuột, đã được chuyển gen ổn định vào một số dòng tế bào u gan, bao gồm các dòng tế bào chuột (Hepalclc7) và chuột (H4IIE). Xét nghiệm CALUX mới này có giới hạn phát hiện là 0,5 fmol của 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) [50].

Xét nghiệm CALUX ngày càng phổ biến và được tập trung nghiên cứu và cải tiến nhiều, cải biến vùng đáp ứng với dioxin chứa DRE: từ 1 vùng DRD lên 4-5DRD; các vector tái tổ hợp từ pGudLuc1.1 lên đến pGudLuc7.5 với độ nhạy ngày càng được nâng cao [53]. Dòng tế bào chuyển gen cũng không chỉ dừng lại ở tế bào của chuột, mà các dòng tế bào của người cũng đã được sử dụng (Hình 1.5).



Hình 1.5. Các thể hệ CALUX khác nhau dựa trên số vùng liên kết với dioxin [54]

Các cải tiến tiếp theo là cải tiến gen mã hoá cho Luciferase đảm bảo sự phát quang ngày càng tốt và đơn giản trong sử dụng hơn. Có hai yêu cầu chính để tạo ra sự phát quang sinh học, bao gồm enzyme chịu trách nhiệm xúc tác phản ứng tạo ra ánh sáng (luciferase) và cơ chất cho enzyme này (luciferin).

Hiện nay có rất nhiều sản phẩm CALUX thương mại hoá, đơn cử như hệ thống Calux của Promega [55]. Hãng sử dụng cả ba loại luciferase trong các thử nghiệm phát quang sinh học: NanoLuc® Luciferase (19 kDa), *Renilla Luciferase* (36 kDa) và *Firefly Luciferase* (61 kDa). Cả dạng tế bào biểu hiện ổn định *Luciferase* và không ổn định. Hãng cung cấp 5 dạng phát quang sinh học khác nhau và nhiều xét nghiệm phát hiện cho mỗi phiên bản. Phương pháp DR CALUX là phương pháp có độ nhạy cao, phát hiện được giới hạn 0.05 pg TEQ/ giếng, hệ thống sử dụng trang thiết bị đơn giản, không đắt tiền như hệ thống HRGC/HRMS nên chi phí phân tích thấp hơn. Phương pháp có độ lặp nhanh, phân tích phát hiện được số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn.

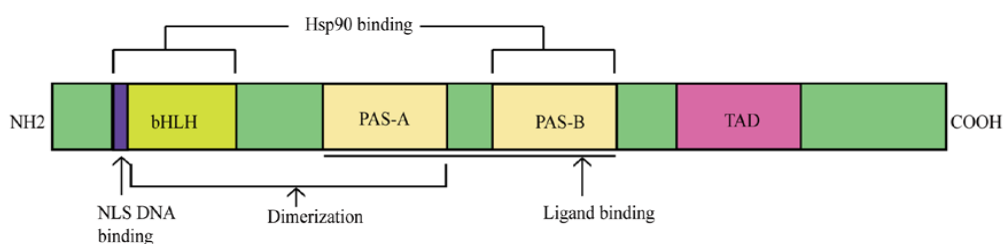
Trong khi xét nghiệm CALUX liên tục được cải tiến và phát triển, một loạt các thử nghiệm sinh học dựa trên cùng một nguyên tắc của CALUX đã được nghiên cứu, trong đó có xét nghiệm biểu hiện huỳnh quang được kích hoạt hóa học CAFLUX. Xét nghiệm này được thiết kế nhằm đơn giản hóa quy trình đo lường và cho phép phân tích các chất độc hại sử dụng các tế bào sống, bằng cách thay thế gen báo cáo luciferase bằng protein huỳnh quang eGFP [56].

1.3. Thụ thể AhR

Dioxin chịu trách nhiệm cho một loạt các hiệu ứng sinh hóa và độc hại thông qua các con đường truyền tín hiệu qua trung gian AhR. Cơ chế này bao gồm liên kết AhR của phối tử độc hại trong tế bào chất và sau đó là sự chuyển vị trí của thụ thể vào nhân. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng protein sốc nhiệt HSP90 có khả năng tương tác với AhR trong tế bào chất. Tương tác HSP90/AhR có chức năng duy trì cấu trúc của thụ thể tế bào để liên kết với TCDD theo thời gian. Khi liên kết phối tử, AhR trải qua một sự thay đổi về hình dạng trong miền PAS A (Per-Arnt-Sim), tạo điều kiện thuận lợi cho sự chuyển vị vào nhân và kết quả là sự thu nhỏ của nó với bộ chuyển vị hạt nhân

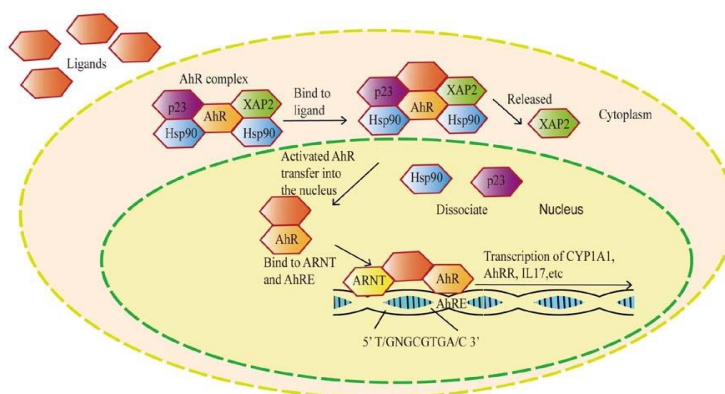
thụ thể Ah (Arnt). Sự thay đổi về hình dạng trong miền PAS A đồng thời với sự phân ly khỏi protein HSP90 và cho phép trình tự định vị nhân được bảo tồn trong đầu tận cùng N (42 axit amin) để kích thích sự chuyển vị hạt nhân của phức hợp AhR-TCDD. Sau khi chuyển vị trí của AhR trong nhân, có sự giảm thiểu của nó với Arnt và yếu tố phiên mã dị thể mới được hình thành này liên kết với các Yếu tố đáp ứng Dioxin (DRE) nằm trên promoter của gen CYP1A1 (mã hóa cho cytochrom P-450 1A1) và các gen đáp ứng AhR khác điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình chuyển hóa và giải độc hydrocarbon thơm đa vòng [57].

Thụ thể AhR được biểu hiện rộng rãi bởi các loại tế bào khác nhau trên khắp cơ thể và có cấu trúc rất đặc biệt bao gồm nhiều vùng liên kết với các protein khác nhau tham gia vào quá trình phiên mã gen (Hình 1.7).



Hình 1.6. Cấu trúc của AhR [58]

Nhiều gen được điều chỉnh bởi AhR, bao gồm cả những gen mã hóa các enzym chuyển hóa xenobiotic, chẳng hạn như Cytochrome P450 1A1 (Cyp1a1), IL-17, IL-22,... Mô hình hiện tại của tín hiệu tế bào AhR chuẩn dựa trên sự cảm ứng gen Cyp1a1 bởi AhR (Hình 1.8).



Hình 1.7. Mô hình của con đường truyền tín hiệu AHR [58]

Cho đến nay, hoạt động phiên mã qua trung gian AhR thường được thử nghiệm bằng cách sử dụng xét nghiệm luciferase (Luc) dựa trên chuyển plasmid tạm thời trong tế bào người hoặc chuột hoặc các dòng tế bào chuyển gen ổn định như tế bào ung thư gan HepG2, tế bào HEK293T, hoặc tế bào chuột H1L7.5c3/H4L7.5c2 [53]. Tuy nhiên, ở các phương pháp xét nghiệm này, các tế bào phải được ly giải để đo biểu hiện của protein Luc. Ngoài ra, một xét nghiệm dùng để đánh giá hoạt động của AhR đang được nghiên cứu và phát triển dựa trên sự phát huỳnh quang của GFP. Các xét nghiệm này liên quan đến việc sử dụng dòng tế bào chuyển gen ung thư gan chuột Hepal1c7 [51] hoặc động vật chuyển gen medaka [59] hoặc cá ngựa [60].

1.4. Tình hình nghiên cứu ứng dụng CALUX trong phân tích dioxin và các chất dẫn xuất trên thế giới

Ngay từ khi được sản xuất năm 1996, DR CALUX đã được áp dụng trong nhiều nghiên cứu phân tích dioxin và các dẫn xuất, cho tới nay vẫn được dùng phổ biến. Ví dụ, Vromman và cộng sự (2012) đã sử dụng phương pháp CALUX để tiến hành phân tích hàm lượng PCDD/Fs, DL PCBs và tổng PCDD/Fs; DL PCBs từ các mẫu thực phẩm bao gồm: sữa và sản phẩm sữa (sữa bò, sữa dê, sữa ngựa, bơ, pho mát và sữa chua); trứng; cá; chất béo động vật (thịt bò, thịt bê, thịt lợn, gia cầm, cừu, ngựa) và dầu thực vật [61].

Cùng sử dụng phương pháp DR CALUX để phân tích sự có mặt của PCDD/Fs và dl-PCB trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, Adnan Husain và cộng sự (2014) đã tiến hành nghiên cứu trên 318 mẫu thịt, sữa, trứng, cá và thức ăn chăn nuôi ở Kuwait (85 mẫu trong nước và 233 mẫu nhập khẩu). Tương đương sinh học (BEQs) thu nhận từ phương pháp DR CALUX được so sánh với tiêu chuẩn giới hạn tối đa của Châu Âu (EC). Kết quả thu được cho thấy nồng độ của tổng PCDD/Fs và dl-PCB trong một số mẫu thực phẩm nhập khẩu và trong nước, thức ăn chăn nuôi vượt quá 2/3 giới hạn cho phép theo qui định EC. Từ các kết quả DR CALUX này, ở giai đoạn này, điều cần thiết là phải thiết lập một hệ thống giám sát để theo dõi mức PCDD/Fs và dl-PCBs trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi do Bộ Y tế/ Phòng thí nghiệm thực phẩm thực hiện, để thiết lập mức PCDD/Fs tối đa cho phép và dl-PCBs trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi [62].

Ngoài ra, DR CALUX còn được dùng trong phân tích các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy POPs trong rác thải y tế, rác thải điện tử. Petrlik và cộng sự năm 2019 đã phân tích hàm lượng chất POPs trong trứng từ gà nuôi thả ở gần 6 địa điểm: bãi phế liệu chất thải điện tử lớn nhất thế giới ở Agbogbloshie (Ghana); lò đốt chất thải y tế ở Accra (Ghana), Kumasi (Ghana) và Yaoundé (Cameroon); và hai bãi rác đốt lộ thiên ở Yaoundé (Cameroon). Năm mẫu trứng gộp trong nghiên cứu này được phân tích bằng phương pháp DR CALUX. Giá trị BEQs cao nhất đo được trong mẫu từ Agbogbloshie (840 pg BEQ/g chất béo), tiếp theo là mẫu từ lò đốt chất thải y tế ở Accra (56pg BEQ/g chất béo). Ngoài ra, các mẫu từ bệnh viện Yaoundé và bệnh viện Kumasi cũng bị nghi vượt quá giới hạn chất PCDD/Fs+dlPCB (5 pg TEQ/g chất béo) [63].

1.5. Tình hình nghiên cứu dioxin và CALUX ở Việt Nam

Ở Việt Nam hiện nay đã có nhiều nghiên cứu về dioxin như nhóm nghiên cứu của PGS.TS Đặng Thị Cẩm Hà với nhiều đề tài dự án về phát hiện và xử lý ô nhiễm dioxin, nghiên cứu về đa hình gen mã hoá cho thụ thể AhR, vai trò của thụ thể AhR trong ung thư [64].

Một số nghiên cứu khác sử dụng các kit CALUX thương mại phân tích hàm lượng các chất dioxin/ chất dẫn xuất dioxin trong môi trường như trong nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Toàn (2016) đã sử dụng kỹ thuật DR CALUX để phát hiện các hợp chất dioxin ở mẫu máu 58 đối tượng phơi nhiễm với dioxin [65]. Nguyễn Thị Mơ (2014) ứng dụng phương pháp phân tích sàng lọc CALUX trong đánh giá mức độ ô nhiễm dioxin trong môi trường tại một số khu vực ô nhiễm nặng ở Việt Nam [66]. Đề tài cấp Nhà nước (2012-2015): “*Nghiên cứu sự biến động về sức khỏe, bệnh tật và nồng độ dioxin ở người có nồng độ dioxin cao; đề xuất giải pháp điều trị*” của PGS Trần Văn Khoa làm chủ nhiệm sử dụng DR CALUX sàng lọc dioxin trong máu các đối tượng phơi nhiễm dioxin.

Từ tháng 1/2014 đến tháng 12/2015, nhóm nghiên cứu tại Học viện Quân y do TS. Phạm Thế Tài đã thực hiện đề tài: “*Nghiên cứu biến đổi nồng độ một số hormone ở người phơi nhiễm dioxin*”. Kết quả nghiên cứu cho thấy phơi nhiễm dioxin gây ra sự biến đổi nồng độ một số hormone quan trọng trong cơ thể.

Năm 2022, Lã Thị Hương Giang và cộng sự đã ứng dụng phương pháp DR CALUX trong nghiên cứu xác định nồng độ dioxin trong máu của quân nhân làm việc tại 3 sân bay ô nhiễm dioxin ở Việt Nam là Biên Hòa, Đà Nẵng và Phù Cát. Kết quả cho thấy nồng độ dioxin trong máu của quân nhân tăng dần theo tuổi và thời gian công tác tại các sân bay ô nhiễm dioxin [67].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu:

Vector pcDNA3.1(+) eGFP, pcDNA3.1 đặt mua từ Genscript (Mỹ), vector XRE-pNL1.3 [secNLuc] được đặt mua từ Addgene (Mỹ), vector px4DRE-Luc được cung cấp từ phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, VAST. Dòng tế bào ung thư gan HepG2 (ATCC, Mỹ), dòng tế bào phôi thai HEK293 (ATCC, Mỹ), vi khuẩn *E. coli* DH5 α được cung cấp từ phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, VAST. Kit tinh sạch sản phẩm PCR (QIAGEN, Mỹ), Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), Kit Plasmid Midi Extraction (Qiagen, Mỹ), DNA extraction kit (QIAGEN, Mỹ), QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Mỹ), enzyme T4 ligase (Biolab, Mỹ), Dreamtaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Mỹ), Kit xét nghiệm báo cáo kép luciferase (Promega, Mỹ).

Môi trường nuôi cấy Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAN-Biotech, Đức), môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (PAN-Biotech, Đức), huyết thanh bò FBS (PAN-Biotech, Đức), kháng sinh Penicillin/ Streptomycin (Gibco, Mỹ), kháng sinh Geneticin G418 (Gibco, Mỹ), kháng sinh Ampicillin (Việt Nam). Các chất Benzo[a]pyrene (Sigma, Mỹ), 2,3,7,8-TCDD (Sigma, Mỹ) được sử dụng trong thử nghiệm. Các hóa chất Lipofectamin 3000 (Invitrogen, Mỹ), môi trường Optimem (PAN-Biotech, Đức) dùng để chuyển gen. Môi trường Luria Bertani (LB lỏng), môi trường LB/agar dùng trong nuôi vi khuẩn *E. coli*.

2.1.2. Thiết bị

Máy đo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), máy Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Đức), tủ ấm CO₂ (Esco, Mỹ), tủ nuôi cấy tế bào (Sony, Nhật Bản), kính hiển vi thường, kính hiển vi huỳnh quang (Nikon, Nhật Bản), máy PCR (Astec, Nhật Bản), máy real-time PCR (IT-IS, Anh), tủ nuôi cấy vi sinh (Esco, Mỹ), máy ly tâm (Eppendorf, Mỹ), bộ điện di DNA (Amersham Pharmacia Biotech, Mỹ), máy soi gel (Wealtec, Mỹ), tủ lạnh thường (Sanaky, Nhật Bản), tủ lạnh âm sâu -20°C; -80°C

(Sanaky, Nhật Bản), máy lắc, ... Các thiết bị được đặt tại phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện công nghệ sinh học, Trung tâm Vật lý quốc tế, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế tạo vector biểu hiện tạm thời mang cấu trúc DRE và gen phát quang GFP

Tạo gen mã hóa cho trình tự promoter CYP1A1 đáp ứng với dioxin

Gen mã hóa cho trình tự promoter CYP1A1 đáp ứng với dioxin (DRE-dioxin response element) có kích thước 1679 bp từ plasmid XRE-pNL1.3 [secNLuc] được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm vị trí của 2 enzyme *Bgl*III và *Sac*I có trình tự mồi xuôi (DRE-F): 5'-CTCACAAGATCTAGATTTGGGGGCAT-3'; mồi ngược (DRE-R): 5'-AAGGCAGAGCTCTGCTTATAGGC-3'. Chu trình nhiệt như sau: 94°C- 3 phút; 94°C- 1 phút; 54°C- 45 giây; 72°C- 1 phút; lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72°C- 8 phút.

Cắt plasmid pcDNA3.1(+)*eGFP* bằng enzyme cắt giới hạn

Vector pcDNA3.1(+)*eGFP* có sẵn gen mã hóa cho protein GFP được cắt mở vòng bằng 2 enzyme cắt giới hạn *Bgl*III và *Sac*I. Thành phần phản ứng cắt gồm 15 μ L vector, 3 μ L *Bgl*III, 3 μ L *Sac*I, 5 μ L Buffer, 24 μ L H₂O. Ủ phản ứng ở 37°C qua đêm

Gắn gen mã hóa promoter CYP1A1 vào vector pcDNA3.1(+)*eGFP* sau khi cắt

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pcDNA3.1(+)*eGFP* đã được cắt mở vòng bằng enzyme T4 DNA ligase. Thể tích phản ứng gắn nối 10 μ L gồm: 3 μ L gen, 3 μ L vector pcDNA3.1(+)*eGFP*, 1 μ L buffer, 1 μ L T4 DNA ligase, 2 μ L H₂O. Ủ phản ứng ở 22°C, 1 giờ. Sau đó, sản phẩm gắn được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Tế bào *E. coli* DH5 α sau khi biến nạp được cấy trải trên đĩa môi trường LB/agar có bổ sung Ampicillin (Amp) nồng độ 1000 μ g/mL và ủ qua đêm ở 37°C. Các plasmid được tách chiết từ tế bào DH5 α theo phương pháp mini- prep của Sambrook [68]. Sản

phẩm plasmid được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự [69].

2.2.2. Biến nạp vector tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt

*** Chuẩn bị tế bào khả biến**

- Lấy chủng tế bào được cất ở -20°C , cho 2-4% dịch giống nuôi cấy trong 2ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc ở 37°C qua đêm.
- Cấy chuyển 1% dịch nuôi tế bào qua đêm sang môi trường LB mới. Nuôi lắc ở 37°C đến khi OD_{600} đạt 0.5-0.7.
- Chuyển dịch tế bào sang ống eppendorf vô trùng, để trên đá 10 phút.
- Ly tâm thu tế bào 4500 v/ph, 10 phút.
- Loại dịch nổi, hòa tan cặn tế bào trong 500 μL CaCl_2 0.1M, đặt trong đá 10 phút.
- Ly tâm 4500 v/ph, 10 phút, loại dịch.
- Hòa tan tủa trong 60 μL CaCl_2 0.1M, đặt trong đá 30 phút.

*** Biến nạp**

- Bổ sung 10 μL sản phẩm đã gắn vào vector vào tế bào khả biến, đặt trong đá 30 phút.
- Sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây, sau đó đặt ngay ống tế bào vào đá để trong 5 phút.
- Bổ sung 250 μL môi trường LB, nuôi lắc 200 v/ph ở 37°C trong 1 giờ.
- Cấy trải dịch tế bào trên môi trường LB/agar bổ sung ampicillin (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
- Nuôi ở tủ ấm qua đêm ở 37°C .

2.2.3. Tách plasmid lượng lớn

Vi khuẩn *E. coli* DH5 α có chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi ở 100 mL. Thu tế bào và tiến hành tách chiết theo protocol của bộ Kit Plasmid Midi của hãng QIAGEN, Mỹ. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel Agarose 1% và xác định hàm lượng plasmid bằng máy Nanodrop 1000.

2.2.4. Chuyển plasmid tái tổ hợp vào dòng tế bào sử dụng Lipofectamin 3000

Dòng tế bào ung thư gan HepG2, dòng tế bào phôi thai HEK293 được lấy ra từ bình bảo quản Nitơ lỏng -196°C và được nuôi trong môi trường DMEM (HepG2) và RPMI (HEK293) có bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin, ở 37°C , 5% CO_2 . Quy trình chuyển plasmid tái tổ hợp vào tế bào được thực hiện theo hướng dẫn của hãng Thermo Fisher Scientific (Mỹ). Tế bào được chia vào đĩa 6 giếng với tỷ lệ tế bào 10^6 tế bào/giếng, trong môi trường DMEM/RPMI 10% FBS ở CO_2 5%, 37°C . Sau 24 giờ, chuyển plasmid vào tế bào sử dụng chất Lipofectamin 3000 trong môi trường OptiMEM. Sau 24 giờ chuyển gen, loại bỏ hoàn toàn môi trường nhiễm và hoà lại các tế bào trong môi trường DMEM/RPMI bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin. Sang ngày tiếp theo, loại bỏ môi trường DMEM/RPMI cũ và thay bằng môi trường DMEM/RPMI chọn lọc có chứa kháng sinh G418 (geneticin). Sau khoảng 2-3 tuần, thu được dòng tế bào sau chuyển gen và kiểm tra hiệu suất chuyển gen thành công.

2.2.5. Xác định hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp PCR và real-time PCR cho dòng tế bào biểu hiện luciferase.

*** Phương pháp PCR**

Tế bào HepG2 chuyển gen và không chuyển gen được sử dụng để tách chiết DNA tổng số bằng cách sử dụng bộ QIAamp DNA Mini Kit của hãng QIAGEN. Sau đó, phản ứng PCR được thực hiện để kiểm tra sự có mặt của gen đích và môi Luci F/R có trình tự: môi xuôi LuciF: 5'-GAGAGCAACTGCATAAGG-3', môi ngược LuciR: 5'-GCAACTCCGATAAATAACG-3'. Thành phần phản ứng: Master Mix: 12,5 μL ; môi xuôi/môi ngược: 1 μL /1 μL ; DNA khuôn: 3 μL , thêm nước vừa đủ 25 μL . Chương trình chạy: 95°C : 3 phút; 94°C : 1 phút; 55°C : 30 giây; 72°C : 2 phút; 72°C : 7 phút, chạy 35 chu kỳ. DNA tổng số và sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

*** Phương pháp real-time PCR**

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn và môi LuciF/R và môi GAPDH cho phản ứng real-time PCR giữa gen *Luciferase* và gen *GAPDH*.

Thành phần phản ứng: Luna Universal qPCR Master Mix: 10 μ L; mỗi xuôi/ mỗi ngược: 0,8 μ L/ 0,8 μ L; DNA khuôn: 2 μ L, thêm H₂O vừa đủ 20 μ L. Chương trình chạy: 95°C: 1 phút; 95°C: 10 giây; 60°C: 30 giây; lặp lại 45 chu kỳ.

Bằng cách sử dụng phương pháp 2-DDCt của Livak [70], hiệu suất chuyển gen được tính toán bằng cách kiểm tra sự hiện diện của đoạn gen Luciferase trong bộ gen tế bào đích, so sánh với gen tham chiếu GAPDH. Công thức tính như sau:

$$\begin{aligned} RQ &= \frac{2^{\Delta Ct(target)}}{2^{\Delta Ct(reference)}} \\ &= 2^{[\Delta Ct(target) - \Delta Ct(reference)]} \\ &= 2^{[Ct(target,calibrator) - Ct(target,test)] - [Ct(ref,calibrator) - Ct(ref,test)]} \end{aligned}$$

Trong đó:

- Ct (T/ Tg): là chu kỳ ngưỡng của gen đích (Tg) trong mẫu (T),
- Ct (T/ Ref): là chu kỳ ngưỡng của gen tham chiếu (Ref) trong mẫu (T),
- Ct (C/ Tg): là chu kỳ ngưỡng của gen đích (Tg) trong đối chứng (C),
- Ct (C/Ref): là chu kỳ ngưỡng của gen tham chiếu (Ref) trong đối chứng (C).

Dựa trên các thông số này, chu kỳ ngưỡng của gen đích trên mẫu (T) và đối chứng (C) được chuẩn hóa bằng cách tính toán sự khác biệt của DCt của gen đích so với gen tham chiếu:

Mẫu: $DCt(T) = Ct(T / Tg) - Ct(T / Ref)$

Kiểm soát: $DCt(C) = Ct(C / Tg) - Ct(C / Ref)$

DCt của mẫu được chuẩn hóa bằng cách tính toán sự khác biệt giữa DCt (T) và DCt (C): $DDCt = DCt(T) - DCt(C)$. Từ đó tính được nồng độ của gen mục tiêu trên mẫu so với đối chứng.

2.2.6. Chọn lọc dòng tế bào chuyển gen

* Đối với dòng tế bào chuyển gen *luciferase*, tế bào được sàng lọc bằng cách chia tế bào thành các giếng, sau đó tách DNA tổng số và thực hiện phản ứng PCR của từng dòng tế bào với chu trình nhiệt như sau: biến tính 95°C trong 1 phút, gắn mỗi 55°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 30 giây, chạy 35 chu kỳ. Lựa chọn dòng tế bào có plasmid mong muốn với nồng độ cao nhất.

* Đối với dòng tế bào chuyển gen *GFP* được chọn dòng bằng cách sử dụng kháng sinh G418 ở các nồng độ khác nhau. Tế bào được chia vào đĩa 96 giếng (SPL, Hàn Quốc) với mật độ 10^4 tế bào/ giếng 100 μ L môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh PS và kháng sinh G418 ở các nồng độ 500; 600; 700; 800 μ g/mL, các giếng lặp lại 3 lần. Sau 24 giờ, tế bào được cảm ứng bằng dioxin. Sau 72 giờ, đem tế bào kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

2.2.7. Đánh giá dòng tế bào chuyển gen với chất chuẩn dioxin/ chất dẫn xuất

Dòng tế bào chuyển gen được chia vào đĩa 96 giếng, lặp lại 3 lần với mật độ 10^4 cell/ giếng 100 μ L môi trường DMEM/RPMI bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh Penicillin/Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, tế bào được ủ với chất chuẩn 2,3,7,8-TCDD/ B[a]P ở các nồng độ pha loãng, giếng đối chứng là môi trường DMEM/ RPMI bổ sung DMSO 0,1%. Ủ tế bào với các chất trong 24 giờ. Đối với tế bào biểu hiện protein GFP, đem đo mức độ phát huỳnh quang ở máy Synergy HT Microplate Reader ở bước sóng thu 485 nm và bước sóng phát 515 nm. Đối với tế bào biểu hiện luciferase, tiến hành hút hết dịch môi trường trong các giếng, tế bào được rửa bằng đệm PBS và được phá vỡ màng bằng dung dịch ly giải tế bào (Promega). Sau đó, cơ chất Luciferin được bổ sung vào đĩa để tạo phản ứng phát quang. Cường độ phát quang được đo ở chế độ luminescence trên thiết bị Synergy HTX Microplate Reader ở bước sóng 560 nm [71].

*** Chuẩn bị chất TCDD và B[a]P chuẩn:**

- Chất TCDD chuẩn:

Dung dịch TCDD gốc có nồng độ 0,1 ppb $\sim 3,1 \times 10^{-10}$ M được pha trong môi trường DMEM/RPMI theo dải nồng độ thích hợp cho các thử nghiệm với tế bào.

- Chất B[a]P chuẩn:

Cân 3mg chất B[a]P, hòa tan trong 1 mL dung dịch DMSO thu được dung dịch B[a]P gốc nồng độ 3 mg/mL tương đương nồng độ $1,2 \times 10^{-5}$ M. Sau đó, pha loãng 1000 lần dung dịch B[a]P gốc trong môi trường DMEM/RPMI thu

được dung dịch B[a]P có nồng độ $1,2 \times 10^{-8}$ M. Khi đó, lượng DMSO trong dung dịch $< 1\%$, không ảnh hưởng đến tế bào.

Khi thử nghiệm với tế bào, dung dịch B[a]P $1,2 \times 10^{-8}$ M được pha trong môi trường DMEM/RPMI theo dải nồng độ thích hợp với các thí nghiệm.

2.2.8. Xác định ngưỡng phát hiện trong chất chuẩn

Ngưỡng phát hiện là nồng độ tối thiểu của chất phân tích mà tại đó có tối thiểu 90% cho kết quả dương tính. Để xác định ngưỡng phát hiện của tế bào chuyển gen, chất chuẩn B[a]P và TCDD được pha loãng ở dải nồng độ xác định. Sau khi tìm được tại nồng độ cần xác định thấp nhất, dòng tế bào vẫn cho tín hiệu huỳnh quang, tiến hành thí nghiệm lặp lại 10 lần. Nếu $\geq 90\%$ các lần lặp lại cho kết quả dương tính chứng tỏ giới hạn phát hiện thấp hơn hoặc bằng mức vật liệu chứng dương

2.2.9. Xử lý số liệu

Các số liệu thống kê và hình ảnh thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, imageJ.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo dòng tế bào chuyển gen HepG2-Luc

3.1.1. Kết quả tách và tạo lượng lớn plasmid p4xDRE-Luc

Để quá trình chuyển plasmid tái tổ hợp vào tế bào HepG2 thành công, vi khuẩn *E. coli* DH5 α chứa plasmid tái tổ hợp được nhân nuôi ở thể tích 100 mL. Sau đó, tiến hành tách plasmid sử dụng Kit Plasmid Midi Extraction của hãng QIAGEN. Kết quả tách plasmid lượng lớn như Hình 3.1

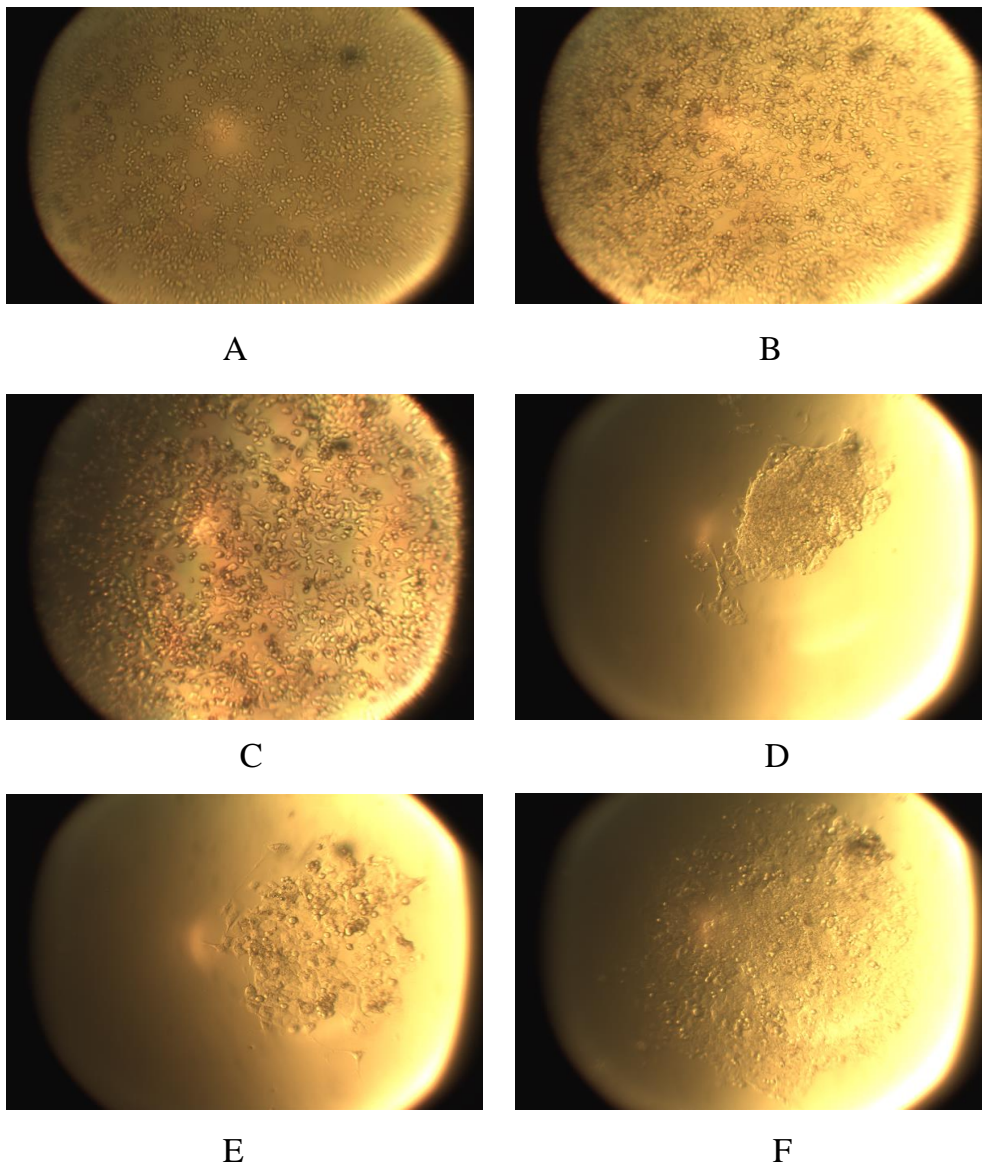


Hình 3.1. Kết quả tách lượng lớn plasmid p4xDRE-Luc. Đường chạy (ĐC)
1: Plasmid tách mini; ĐC 2: Plasmid tách midi pha loãng 5 lần

Kết quả thu được cho thấy cả 2 đường chạy đều thu được băng đậm, sáng rõ, trong đó băng ở đường chạy số 2 đậm hơn đường chạy số 1 là do nồng độ plamid cao hơn. Hai băng thu được ở 2 đường chạy có kích thước bằng nhau, điều này chứng tỏ đã tách thành công lượng lớn plasmid p4xDRE-Luc. Đem đo nồng độ plasmid thu được bằng máy đo Nano Drop cho kết quả 2888 ng/ μ L. Như vậy, plasmid thu được có nồng độ thích hợp để chuyển vào tế bào HepG2.

3.1.2. Kết quả đồng chuyển plasmid pcDNA3.1 và plasmid p4xDRE-Luc vào tế bào HepG2

Do plasmid p4xDRE-Luc không có gen kháng kháng sinh khi chuyển vào tế bào HepG2, gây khó khăn khi sàng lọc dòng tế bào, nên chúng tôi tiến hành chuyển đồng thời 2 plasmid p4xDRE-Luc và pcDNA3.1 vào tế bào HepG2. Sau khi thay bằng môi trường chọn lọc G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tế bào được nuôi và thay môi trường chọn lọc 2-3 ngày/ lần. Quan sát tế bào và chụp ảnh bằng kính hiển vi. Kết quả thu được như Hình 3.2

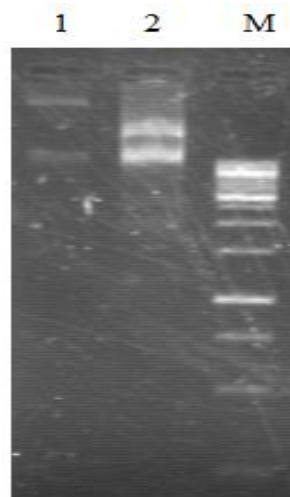


Hình 3.2. Kết quả nuôi cấy tế bào sau khi đồng chuyển plasmid pcDNA3.1 và p4xDRE-Luc. A: Tế bào sau 1 ngày chuyển gen. B: Tế bào sau 5 ngày chuyển gen. C: Tế bào sau 7 ngày chuyển gen. D-F: Tế bào sau 20 ngày chuyển gen.

Kết quả ảnh chụp tế bào cho thấy, từ 1-7 ngày đầu sau chuyển gen và nuôi trong môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh G418 500 $\mu\text{g/mL}$, tế bào chết và bong dần, bắt đầu xuất hiện các cụm tế bào nhỏ. Sau 20 ngày chuyển gen, các cụm tế bào khác nhau phát triển với số lượng tế bào tương đối nhiều. Sau đó, tế bào HepG2-Luc được cấy chuyển sang đĩa mới, tiếp tục nuôi duy trì trong môi trường DMEM có bổ sung kháng sinh G418 500 $\mu\text{g/mL}$ đến khi đủ số lượng tế bào để kiểm tra khả năng chuyển gen.

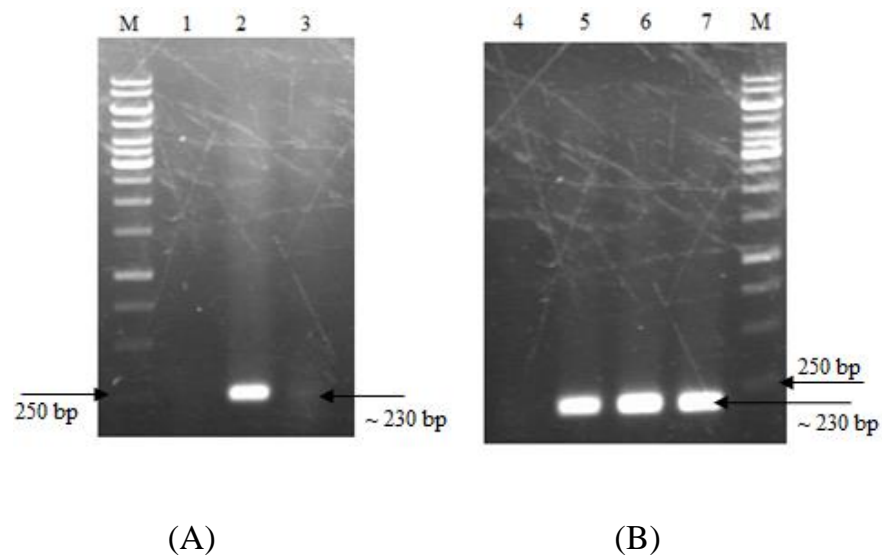
3.1.3. Kết quả kiểm tra tế bào HepG2-Luc sau chuyển gen

Sau khi cấy chuyển, nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung kháng sinh G418 500 $\mu\text{g/mL}$, tế bào chuyển gen HepG2-Luc và tế bào không chuyển gen HepG2 được tách DNA tổng số để kiểm tra sự có mặt của plasmid trong tế bào. Kết quả thu được như Hình 3.3



Hình 3.3. Kết quả tách DNA tổng số của tế bào HepG2 và HepG2-Luc.
Đường chạy (ĐC) 1: DNA tổng số của tế bào HepG2; ĐC 2: DNA tổng số của tế bào chuyển gen HepG2-Luc; ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific)

Kết quả thu được bằng DNA tổng số sáng rõ ở cả 2 đường chạy của 2 loại tế bào, chứng tỏ tách thành công DNA tổng số của tế bào HepG2 đối chứng và HepG2-Luc. Sau đó, DNA tổng số của dòng tế bào HepG2, HepG2-Luc và plasmid p4xDRE-Luc được thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi Luci F/R và chu trình nhiệt đã được mô tả trong phần phương pháp để kiểm tra khả năng chuyển plasmid p4xDRE-Luc vào tế bào HepG2. Kết quả phản ứng PCR được thể hiện trong Hình 3.4



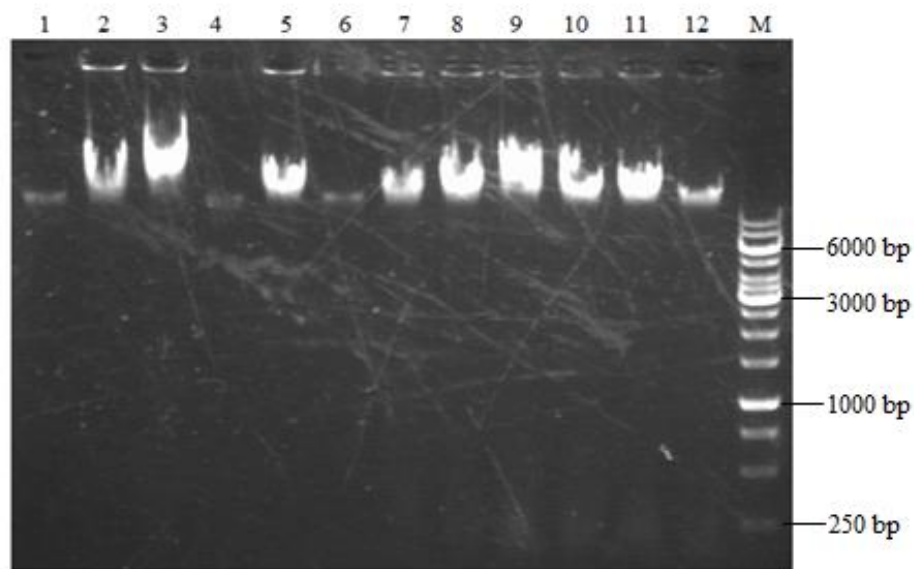
Hình 3.4. Kết quả PCR DNA tổng số của tế bào HepG2, HepG2-Luc và plasmid p4xDRE-Luc. (A) Kết quả PCR lần 1. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific). ĐC 1: Kết quả PCR của tế bào HepG2; ĐC 2: Kết quả PCR plasmid p4xDRE; ĐC 3: Kết quả PCR của tế bào HepG2-Luc. (B) Kết quả PCR lần 2. ĐC 4: Kết quả PCR của tế bào HepG2; ĐC 5: Kết quả PCR plasmid p4xDRE; ĐC 6,7: Kết quả PCR của tế bào HepG2-Luc. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific)

Ở hình 3.4 A, đường chạy đối chứng âm là DNA tổng số của tế bào HepG2 không xuất hiện băng, ở đường chạy số 3 xuất hiện 1 băng mờ có kích thước khoảng kích thước khoảng 230 bp, tương đương với kích thước gen *luciferase* theo tính toán lý thuyết là 235 bp, băng thu được có kích thước bằng với kích thước băng thu được ở đường chạy đối chứng dương là plasmid p4xDRE. Điều này chứng tỏ cặp môi thiết kế chỉ đặc hiệu với plasmid p4xDRE-Luc. Tuy nhiên, băng ở đường chạy số 3 rất mờ, để xác định lại băng thu được, tiến hành PCR vòng 2 với bộ môi và chu kỳ tương tự. Kết quả thu được như Hình 3.4 B.

Kết quả điện di cho thấy đường chạy số 4 không xuất hiện băng, đường chạy 5-7 đều xuất hiện băng đậm, sáng rõ và có cùng kích thước khoảng 230 bp. Điều này chứng tỏ, plasmid p4xDRE đã được chuyển thành công vào tế bào HepG2. Tuy nhiên, số lượng tế bào có chứa plasmid p4xDRE còn thấp, cần phải được sàng lọc để thu được dòng tế bào chuyển gen có hàm lượng plasmid lớn nhất.

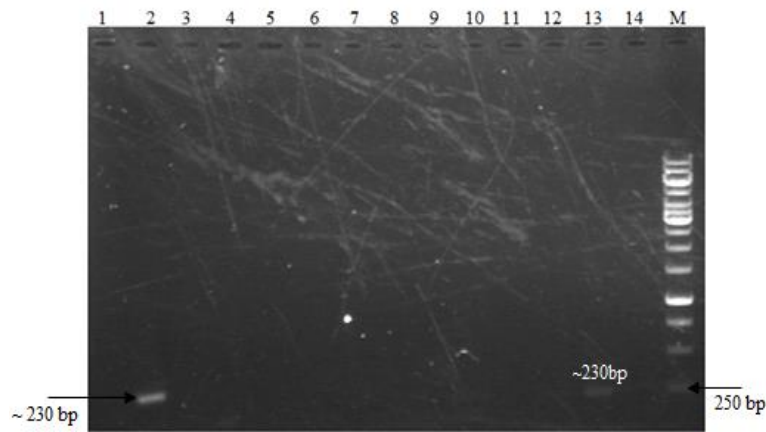
3.1.4. Kết quả sàng lọc các dòng tế bào chuyển gen thành công

Do tiến hành đồng chuyển 2 plasmid p4xDRE, pcDNA 3.1 và nuôi trong kháng sinh G418 nên tế bào thu được chủ yếu có 2 loại: tế bào chỉ chứa plasmid pcDNA3.1 và tế bào chứa đồng thời cả 2 plasmid. Để thu được dòng tế bào chuyển gen có nồng độ plasmid p4xDRE cao, toàn bộ tế bào được chia làm 12 giếng. Sau đó, tế bào thu từ 12 giếng được tách DNA tổng số và đo nồng độ DNA bằng máy Nano drop (Hình 3.5)



Hình 3.5. Kết quả tách DNA tổng số của các dòng tế bào chuyển gen. ĐC 1: Dòng tế bào A1; ĐC 2: Dòng tế bào A2; ĐC 3: Dòng tế bào A3; ĐC 4: Dòng tế bào A4; ĐC 5: Dòng tế bào B1; ĐC 6: Dòng tế bào B2; ĐC 7: Dòng tế bào B3; ĐC 8: Dòng tế bào B4; ĐC 9: Dòng tế bào C1; ĐC 10: Dòng tế bào C2; ĐC 11: Dòng tế bào C3; ĐC 12: Dòng tế bào C4. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific)

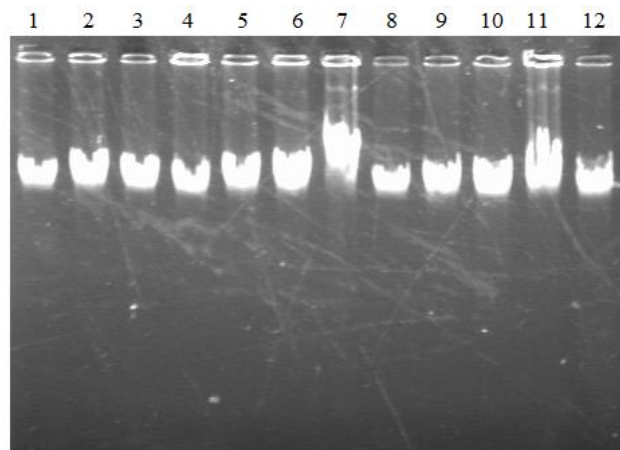
Kết quả điện di cho thấy xuất hiện các băng với độ đậm, cường độ sáng khác nhau ở cả 12 đường chạy, chứng tỏ tách thành công DNA tổng số của 12 dòng tế bào với nồng độ DNA tổng số khác nhau. Sau đó, đem mẫu thu được đem đo hàm lượng DNA bằng máy Nano drop. Các mẫu được pha loãng để nồng độ DNA tổng số tương đương nhau và tiến hành phản ứng PCR. Sản phẩm thu được được kiểm tra bằng điện di trên gel agrose 1%. Kết quả như Hình 3.6.



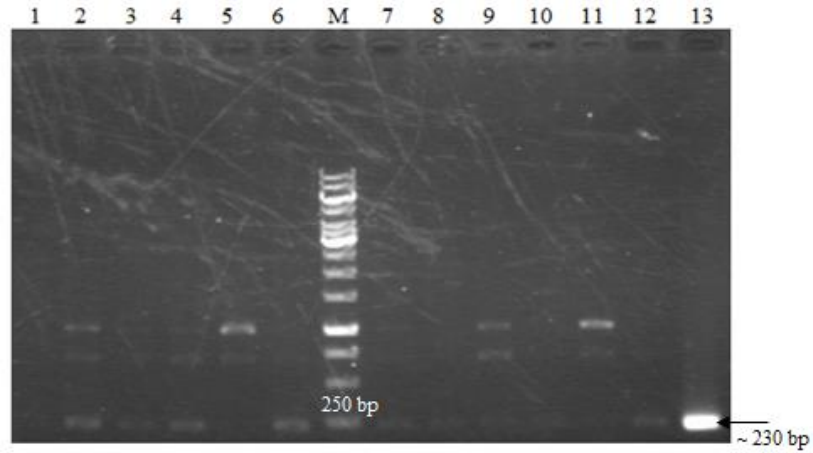
Hình 3.6. Kết quả PCR của các dòng chuyển gen thu được. ĐC 1: Kết quả PCR DNA tổng số HepG2; ĐC 2: Kết quả PCR plasmid p4xDRE-Luc; ĐC 3-14: Kết quả PCR DNA tổng số của các dòng tế bào chuyển gen A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

Kết quả điện di cho thấy, trong 12 dòng tế bào chuyển gen thì có các dòng B4, C2, C3, C4 xuất hiện băng có kích thước tương đương với kích thước băng của plasmid 4xDRE-Luc. Trong đó, băng của dòng tế bào C3 đậm hơn hẳn so với 3 dòng còn lại. Các đường chạy còn lại không thấy xuất hiện băng có thể không có tế bào chứa plasmid hoặc lượng tế bào chứa plasmid quá thấp. Do đó, lựa chọn dòng tế bào C3 nuôi tiếp và chia thành 12 giếng để chọn lọc dòng tế bào có hàm lượng plasmid p4xDRE cao nhất.

Tiếp tục tiến hành tách DNA tổng số và thực hiện phản ứng PCR như trên, thu được kết quả như Hình 3.7



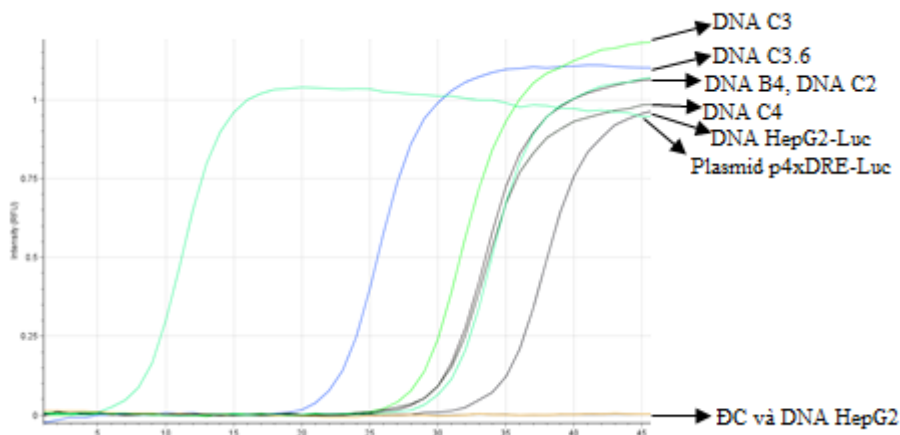
Hình 3.7. Kết quả tách DNA tổng số của 12 dòng tế bào. ĐC 1-12: DNA tổng số của các dòng C3.1, C3.2, C3.3, C3.4, C3.5, C3.6, C3.7, C3.8, C3.9, C3.10, C3.11, C3.12

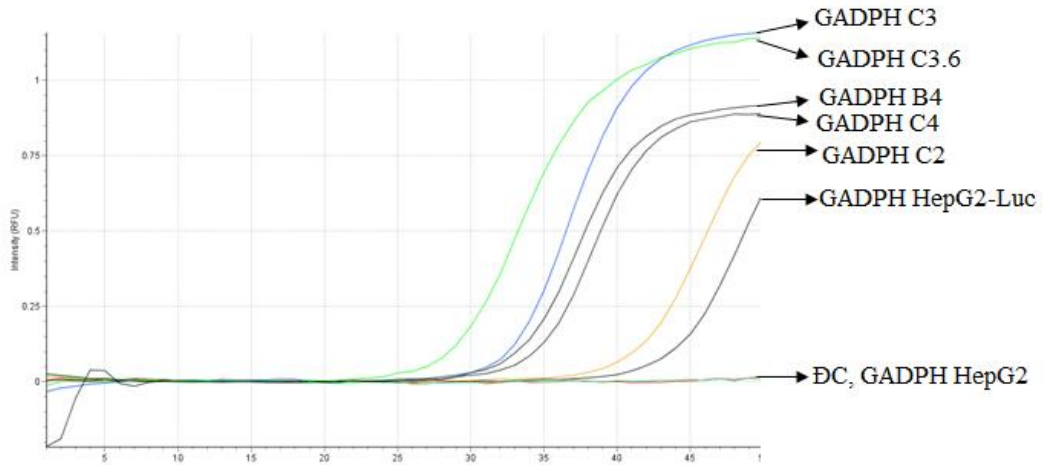


Hình 3.8. Kết quả PCR DNA tổng số của 12 dòng tế bào. ĐC 1-6: Kết quả PCR DNA tổng số của các dòng tế bào C3.1, C3.2, C3.3, C3.4, C3.5, C3.6. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific). ĐC 7-12: Kết quả PCR DNA tổng số của các dòng tế bào C3.7, C3.8, C3.9, C3.10, C3.11, C3.12. ĐC 13: Kết quả PCR plasmid p4xDRE-Luc.

Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy xuất hiện băng ở đường chạy 2-12. Trong đó, đường chạy 6 xuất hiện 1 băng duy nhất và đậm hơn các đường chạy còn lại. Do đó, dòng tế bào C3.6 được lựa chọn nuôi tiếp để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Để khẳng định lại dòng C3.6 có nồng độ plasmid p4xDRE-Luc cao nhất, phản ứng real-time PCR được thực hiện với DNA tổng số của các dòng tế bào. Thành phần và chương trình chạy như mô tả ở phần phương pháp. Kết quả chạy như Hình 3.9 dưới đây.





B

Hình 3.9. Biểu đồ khuếch đại DNA của các dòng tế bào sử dụng môi Luci F/R (A) và môi GADPH (B)

Từ kết thu được ở hình 3.9 và bảng 3.1, cho thấy với môi Luci F/R ở plasmid, các dòng tế bào chuyển gen đều xuất hiện tín hiệu huỳnh quang, không thấy xuất hiện tín hiệu huỳnh quang ở mẫu không có DNA đích và mẫu DNA của tế bào HepG2 không chuyển gen, chứng tỏ môi Luci F/R được thiết kế đặc hiệu với gen *luciferase*. Phân tích nồng độ của các gen trong các dòng tế bào bằng real-time PCR cho thấy rằng, dòng tế bào C3.6 có hàm lượng gen *luciferase* cao nhất, tiếp theo là dòng C3 và nồng độ gen *luciferase* thấp nhất là dòng HepG2-Luc. Điều này thể hiện, đã chọn được dòng tế bào C3.6 có nồng độ gen *luciferase* cao nhất trong các dòng tế bào chọn lọc. Do đó, dòng tế bào chuyển gen C3.6 được nuôi duy trì để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

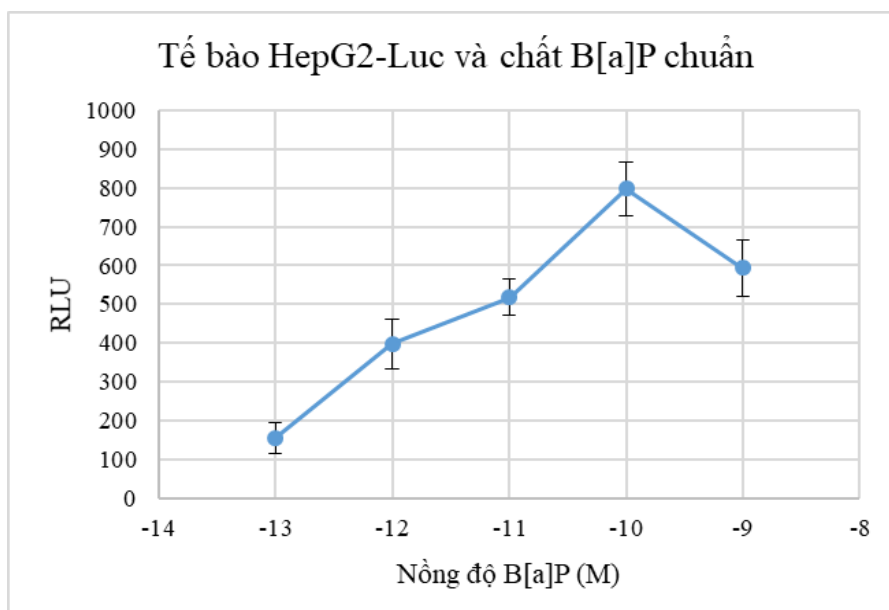
Bảng 3.1. Giá trị Ct kiểm tra độ biểu hiện của gen *luciferase* trong các dòng tế bào

STT	Mẫu		Giá trị Ct
1	Môi Luci F/R	Plasmid	7,4
2		DNA tổng số của C3.6	21,72
3		DNA tổng số của C3	27,76

4		DNA tổng số của B4	29,48	
5		DNA tổng số của C2	29,63	
6		DNA tổng số của C4	30,07	
7		DNA tổng số của HepG2-Luc	34,01	
8		DNA tổng số của HepG2	0	
9		Không DNA	0	
10		Môi GADPH	DNA tổng số của C3.6	28,44
11			DNA tổng số của C3	32,17
12			DNA tổng số của B4	33,05
13	DNA tổng số của C2		41,2	
14	DNA tổng số của C4		34,19	
15	DNA tổng số của HepG2-Luc		43,77	
16	DNA tổng số của HepG2		0	
17	Không DNA		0	

3.1.5. Đánh giá khả năng phát hiện chất chuẩn dioxin hoặc các dẫn xuất dioxin của tế bào chuyển gen HepG2-Luc

Khi thử nghiệm dòng tế bào chuyển HepG2-Luc với chất B[a]P chuẩn ở các nồng độ 10^{-13} ; 10^{-12} ; 10^{-11} ; 10^{-10} ; 10^{-9} M, đem mẫu đo ở bước sóng 560 nm, thu được kết quả như Hình 3.10 dưới đây:



Hình 3.10. Biểu đồ thể hiện kết quả đo độ phát quang khi tế bào HepG2-Luc tiếp xúc với chất chuẩn B[a]P. (Giá trị nồng độ trên biểu đồ được biểu diễn ở dạng LogX: X là nồng độ của các chất)

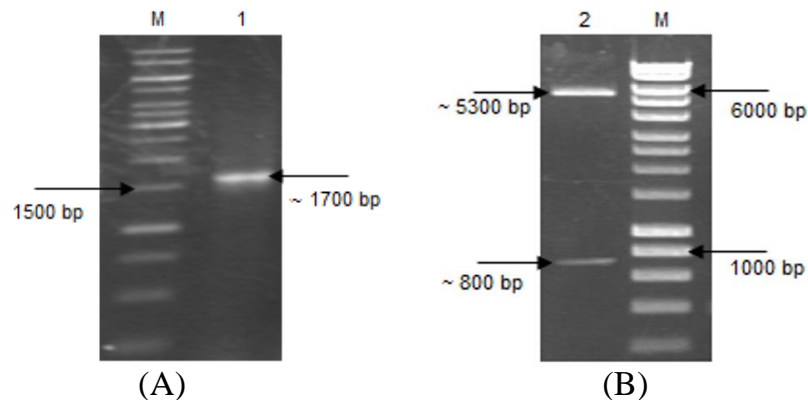
Kết quả thu được cho thấy ở các nồng độ B[a]P nghiên cứu, xuất hiện tín hiệu phát quang RLU ở nồng độ 10^{-13} M là do khi có mặt của chất B[a]P đã cảm ứng tế bào biểu hiện luciferase phản ứng với cơ chất luciferin phát ra ánh sáng. Trong khoảng nồng độ chất B[a]P tăng dần (10^{-13} M đến 10^{-10} M) đã cảm ứng tế bào biểu hiện luciferase tăng dần nên đo được tín hiệu phát quang cũng tăng dần. Khi tăng nồng độ chất B[a]P lên 10^{-9} M độ phát quang giảm, có thể giải thích rằng chất B[a]P là chất độc nên ở nồng độ cao sẽ gây chết tế bào dẫn đến luciferase được tổng hợp ra bị giảm. Tín hiệu phát quang cao nhất đạt 797 RLU ở nồng độ B[a]P 10^{-10} M. Bin Zhao và cộng sự (2008) đã tạo dòng tế bào chuyển gen ổn định H1L6.1c2 từ chuột có độ phát quang lớn nhất khoảng 2200 RLU ở nồng độ chất TCDD chuẩn đạt 5×10^{-9} ng/mL. Trong công bố năm 2011, Gouchun He và cộng sự đã tạo thành công dòng tế bào chuyển gen luciferase H1L7.5c3 từ chuột có độ phát quang lớn nhất > 150000 RLU ở nồng độ TCDD 10^{-9} M [72]. Như vậy, so với các nghiên cứu trước thì dòng tế bào HepG2-Luc có độ phát quang tương đối thấp. Chất thử nghiệm trong nghiên cứu của chúng tôi là B[a]P, là chất có ái lực với thụ thể AhR trên tế bào yếu hơn chất TCDD nên khả năng biểu hiện luciferase thấp hơn. Từ đó, tín hiệu phát quang tạo ra khi thử nghiệm với chất B[a]P thấp hơn khi thử

nghiệm với TCDD. Khi thử dòng tế bào HepG2-Luc với chất TCDD có thể sẽ thu được tín hiệu huỳnh quang cao hơn. Ngoài ra, vector trong nghiên cứu của chúng tôi có chứa 4 trình tự DRE, trong khi các bài báo công bố vector chứa tới 20 trình tự DREs, đây là trình tự đáp ứng với dioxin. Chính vì vậy, tín hiệu phát quang của dòng tế bào HepG2-Luc thấp hơn tín hiệu phát quang trong 1 số nghiên cứu đã công bố. Trong nghiên cứu năm 2015, Brennan và cộng sự đã công bố đã chuyển thành công vector pGudLuc7.5 có chứa 20 DREs vào 3 dòng tế bào ung thư gan chuột H4Ile, ung thư gan người HepG2, ung thư biểu mô tuyến ruột chuột lang GPC16. Kết quả khi thử nghiệm với chất TCDD, dòng tế bào chuyển gen HG2L6 từ HepG2 có tín hiệu phát quang cao nhất 13×10^4 RLU ở nồng độ TCDD 10^{-9} thấp hơn tín hiệu phát quang từ dòng tế bào từ chuột H4L7.5 với tín hiệu phát quang cao nhất đạt trên 13×10^5 RLU ở nồng độ TCDD 10^{-9} M [54].

3.2. Tạo tế bào chuyển gen HepG2-eGFP và HEK293-eGFP

3.2.1. Kết quả tạo vector biểu hiện mang cấu trúc DRE và gen phát huỳnh quang GFP

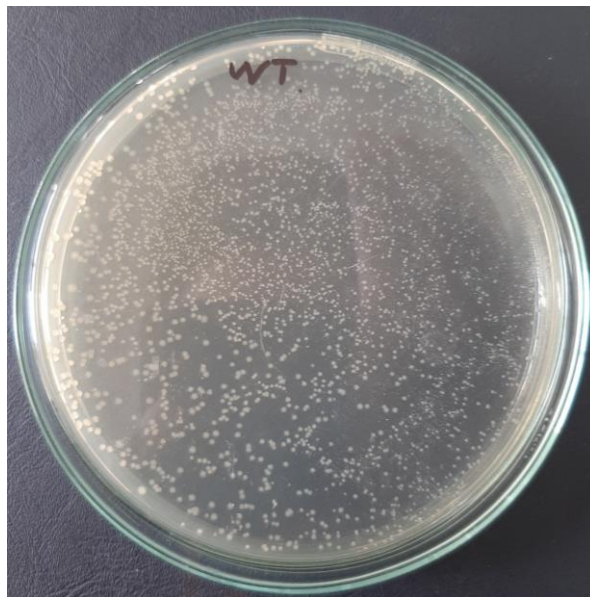
Gen *DRE* được khuếch đại bằng phản ứng PCR như đã mô tả ở phần phương pháp. Vector pcDNA3.1(+) eGFP được cắt mở vòng bằng 2 enzyme *Bgl*III và *Sac*I. Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả thể hiện trên Hình 3.11.



Hình 3.11. Kết quả khuếch đại gen DRE và sản phẩm cắt mở vòng plasmid pcDNA3.1(+) eGFP. (A) Kết quả khuếch đại gen DRE. Đường chạy (ĐC) M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); ĐC 1: Sản phẩm nhân gen DRE. (B) Kết quả cắt mở vòng plasmid pcDNA3.1(+) eGFP. ĐC M:

Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); DC 2: sản phẩm cắt bằng BglIII và SacI

Kết quả nhân gen thu được 1 băng có kích thước khoảng 1700 bp, tương ứng với kích thước của gen *DRE* theo lý thuyết là 1679 bp. Như vậy, chúng tôi đã nhân bản thành công gen *DRE*. Vector pcDNA3.1(+) eGFP sau cắt thu được 2 băng kích thước khoảng 800 bp và 5300 bp, tương ứng với kích thước 2 đoạn cắt theo lý thuyết là 806 bp và 5312 bp chứng tỏ chúng tôi đã cắt thành công. Sau đó, đoạn *DRE* cũng được xử lý với 2 enzyme *BglIII* và *SacI*, tinh sạch và gắn vào vector pcDNA3.1(+) eGFP bằng enzyme T4 ligase. Sau đó, sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào khả biến vi khuẩn *E.coli* DH5 α . Gen kháng kháng sinh được chọn làm dấu hiệu chọn lọc để phân biệt những tế bào có tiếp nhận DNA plasmid trong số những tế bào không tiếp nhận (Hình 3.12).



Hình 3.12. Kết quả biến nạp plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào tế bào *E.coli* DH5 α .

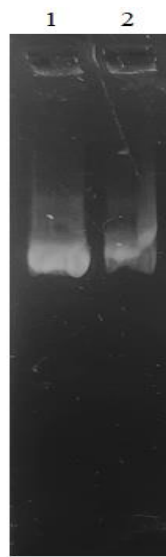
Để chọn dòng, tiến hành PCR khuẩn lạc từ khuẩn lạc và chọn được 6 khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp. Các khuẩn lạc chọn được sau đó được nuôi và tách plasmid chuẩn bị cho việc xác định trình tự

Để khẳng định chắc chắn gen được gắn vào là *DRE*, chúng tôi tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger. So sánh trình tự đoạn gen thu được với

trình tự *DRE* gốc và kiểm tra các cấu trúc hỗ trợ biểu hiện gen eGFP đã khớp, như vậy chúng tôi có thể khẳng định đã gắn thành công gen *DRE* vào vector pcDNA3.1(+) eGFP thay thế cho vùng promoter CMV.

3.2.2. **Kết quả tách lượng lớn plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP**

Để quá trình chuyển plasmid tái tổ hợp vào tế bào HepG2 thành công, vi khuẩn *E. coli* DH5 α chứa plasmid tái tổ hợp được nhân nuôi ở thể tích 100 mL. Sau đó, tiến hành tách plasmid sử dụng QIAgen plasmid midi kit. Kết quả tách plasmid lượng lớn như Hình 3.13



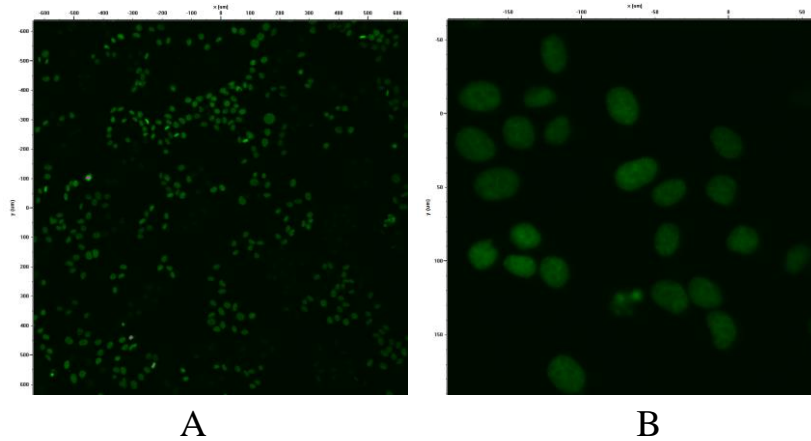
Hình 3.13. Kết quả tách lượng lớn plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP. ĐC 1: plasmid tách mini; ĐC 2: plasmid tách midi pha loãng 10 lần

Kết quả thu được cho thấy cả 2 đường chạy đều xuất hiện băng đậm, sáng rõ và có kích thước ngang bằng nhau, chứng tỏ đã tách được lượng lớn plasmid tái tổ hợp. Ở đường chạy số 2 băng thu được mờ hơn đường chạy 1 là do nồng độ plasmid đã pha loãng 10 lần. Đo nồng độ plasmid thu được bằng máy đo Nano Drop cho nồng độ 3118 ng/ μ L.

3.2.3. **Kết quả chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP vào dòng tế bào HepG2 và HEK293**

3.2.3.1 **Dòng tế bào HepG2**

Plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP được chuyển vào tế bào HepG2 bằng môi trường optiMEM và lipofectamin 3000, dòng tế bào thu được sau khi cảm ứng bằng dioxin cho kết quả như Hình 3.14

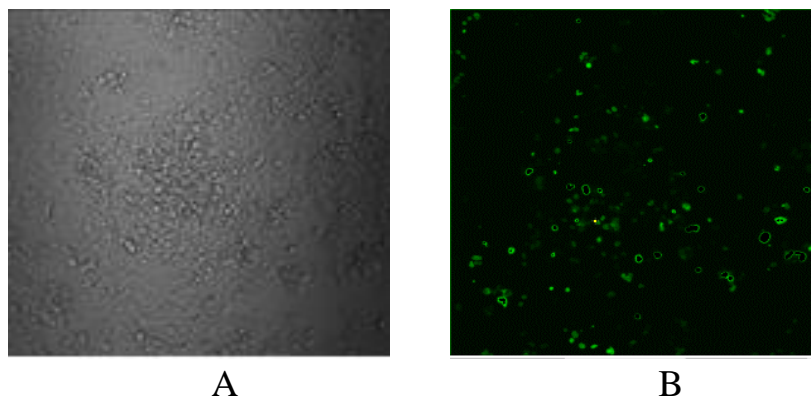


Hình 3.14. Hình ảnh tế bào HepG2 sau khi chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+)*eGFP* ở các độ phóng đại khác nhau. A. Độ phóng đại 100X; B. Độ phóng đại 500X

Kết quả thu được cho thấy ở bước sóng thu 485nm và bước sóng phát 515nm, xuất hiện các tế bào phát sáng màu xanh và các tế bào không phát sáng. Các tế bào phát sáng xanh là các tế bào có biểu hiện protein GFP. Điều này chứng tỏ đã plasmid pDRE-cDNA3.1(+)*eGFP* đã được chuyển vào tế bào HepG2-*eGFP* và tế bào đã biểu hiện thành công protein GFP. Dòng tế bào chuyển gen được phân tích, đánh giá hiệu suất chuyển gen thông qua sự biểu hiện của GFP, kết quả cho thấy dòng chuyển gen HepG2-*eGFP* có hiệu suất biểu hiện từ 70-80% tùy vị trí.

3.2.3.2 Dòng tế bào HEK293

Tương tự như dòng tế bào HepG2, tế bào HEK293 sau khi được chuyển gen và cảm ứng dioxin thu được kết quả như Hình 3.16



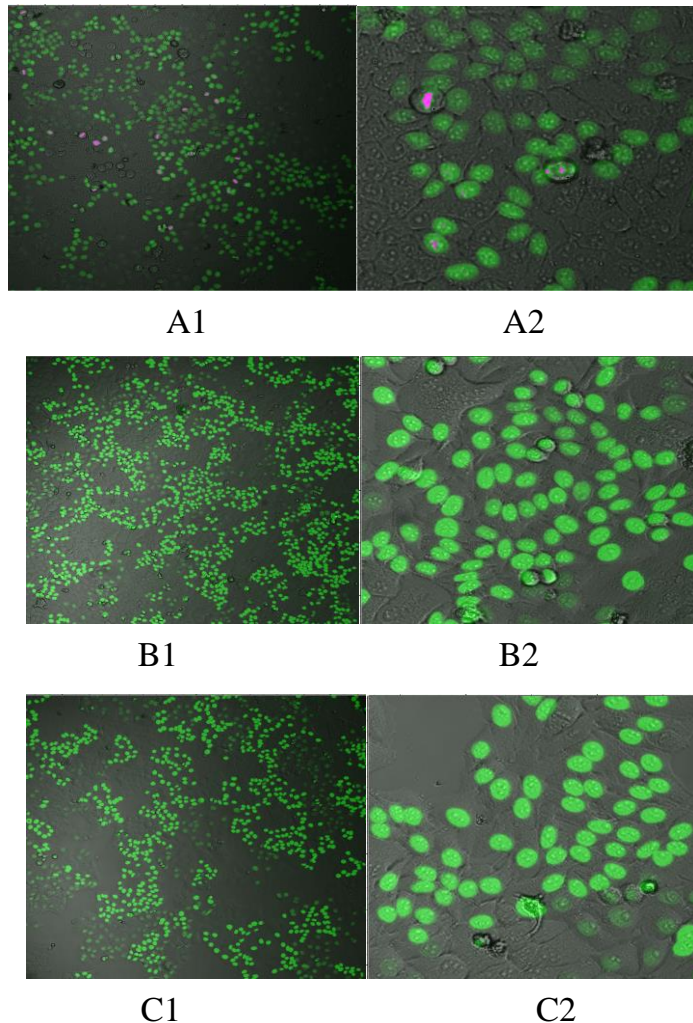
Hình 3.15. Kết quả chụp ảnh tế bào HEK293 sau khi chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+)*eGFP*. A: Ảnh chụp tế bào không chuyển gen. B: Ảnh chụp tế bào sau khi chuyển gen

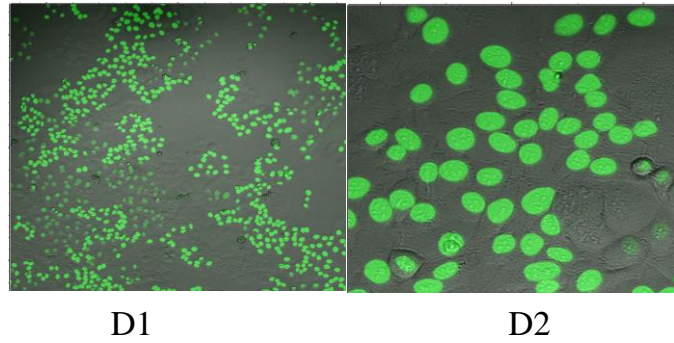
Kết quả thu được cho thấy ở dòng tế bào HEK293 cũng xuất hiện các tế bào phát sáng xanh và không phát sáng. Điều này chứng tỏ đã plasmid DRE-pcDNA3.1(+) eGFP đã được chuyển vào tế bào HEK293 và tế bào đã biểu hiện thành công protein GFP. Dòng tế bào chuyển gen được phân tích, đánh giá hiệu suất chuyển gen thông qua sự biểu hiện của GFP, kết quả cho thấy dòng chuyển gen HEK293-eGFP có hiệu suất biểu hiện từ 40-50% tùy vị trí.

3.2.4. Kết quả chọn lọc các dòng tế bào chuyển gen

3.2.4.1 Dòng tế bào HepG2-eGFP

Kháng sinh G418 theo hướng dẫn của hãng Gibco có nồng độ dùng cho tế bào động vật 200-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Do đó, em chọn nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ làm kháng sinh chọn lọc khi chuyển gen. Với mong muốn thu được dòng tế bào có tỷ lệ phát quang GFP cao hơn nữa, các nồng độ kháng sinh 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đã được sử dụng để chọn lọc dòng tế bào. Kết quả phân tích bằng phương pháp kính hiển vi huỳnh quang như Hình 3.16.





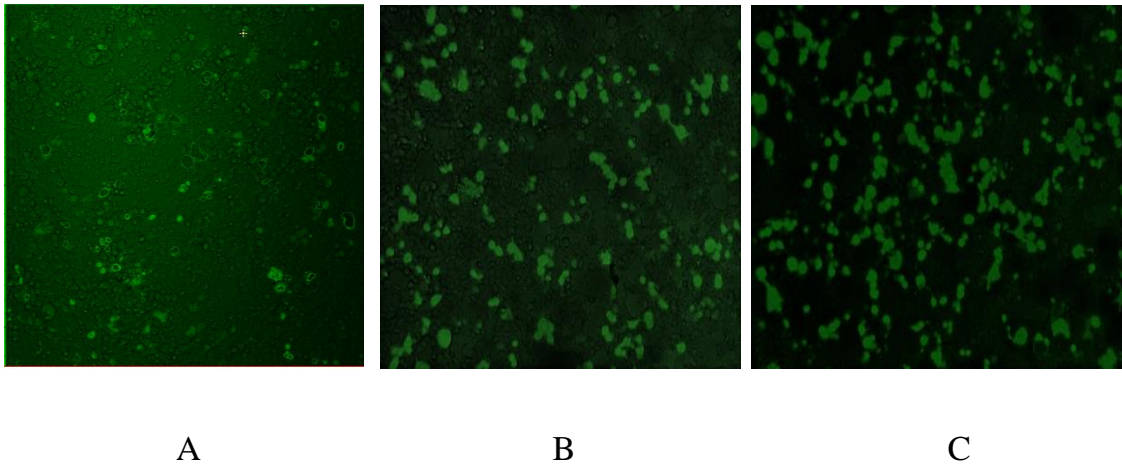
Hình 3.16. Hình ảnh tế bào chuyển gen HepG2-eGFP ở các nồng độ kháng sinh G418 khác nhau và độ phóng đại khác nhau. A1,2: Tế bào ở nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với độ phóng đại 100x và 500x; B1,2: Tế bào ở nồng độ G418 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với độ phóng đại 100x và 500x; C1,2: Tế bào ở nồng độ G418 70000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với độ phóng đại 100x và 500x; D1,2: Tế bào ở nồng độ G418 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với độ phóng đại 100x và 500x

Kết quả phân tích, đánh giá hiệu suất chọn dòng thông qua sự biểu hiện của GFP cho thấy với nồng độ kháng sinh tăng dần, số lượng tế bào biểu hiện EGFP tăng dần dần. Ở nồng độ 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418, tỷ lệ tế bào phát quang đã tăng lên đáng kể và cường độ phát quang cao. Các tế bào chuyển gen HepG2-eGFP vẫn giữ được hình dạng và tốc độ sinh trưởng. Với nồng độ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ thì các tế bào không mang gen đều chết, chỉ còn lại các tế bào eGFP và biểu hiện cho ánh sáng phát quang màu xanh, tuy nhiên ở nồng độ này các tế bào có sự thay đổi hình dạng và giảm khả năng sinh trưởng. Từ đó, dòng tế bào nuôi ở nồng độ G418 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được lựa chọn để duy trì và tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.4.2 Dòng tế bào HEK293-eGFP

Migone và cộng sự (2002) đã tạo tế bào chuyển gen trên dòng tế bào HEK293F sử dụng vector pcDNA3.1 với nồng độ G418 ở 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [73]. Wen và cộng sự (2003) cũng lựa chọn nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho dòng tế bào chuyển gen HEK293F với vector pcDNA3.1 [74]. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ làm nồng độ kháng sinh chọn lọc khi chuyển gen. Với mong muốn thu được tỷ lệ phát quang GFP cao hơn, chúng tôi tiến hành tăng nồng độ kháng sinh lên 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ để chọn

lọc dòng tế bào. Kết quả phân tích bằng phương pháp kính hiển vi huỳnh quang như Hình 3.17

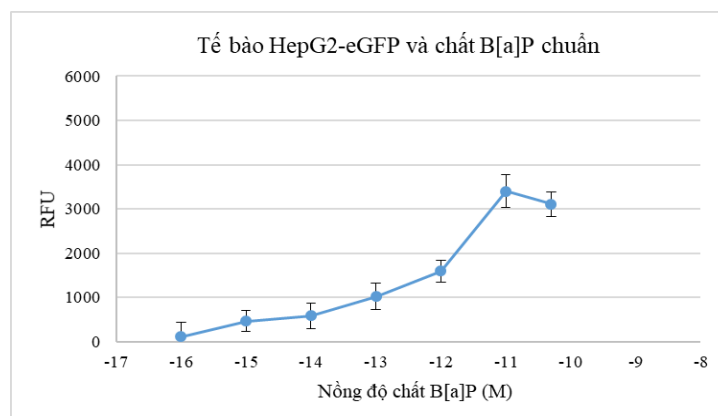


Hình 3.17. Hình ảnh tế bào HEK293-eGFP sau khi chọn dòng bằng tăng cường nồng độ kháng sinh G418 khác nhau. (A) Nồng độ G418 500 µg/mL; (B) Nồng độ G418 600 µg/mL; (C) Nồng độ G418 700 µg/mL

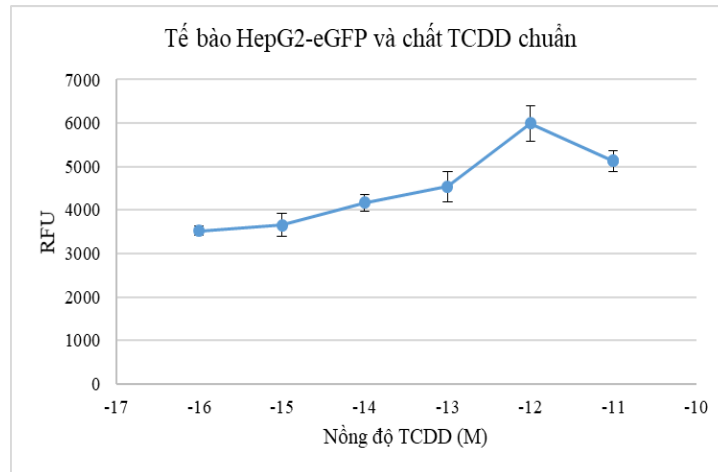
Kết quả ảnh chụp và phân tích bằng phần mềm imageJ cho thấy tỷ lệ phát quang GFP tỷ lệ thuận với nồng độ kháng sinh và đạt 80-90% ở nồng độ 700 µg/mL. Do đó, nồng độ kháng sinh G418 700 µg/mL được lựa chọn để duy trì và nuôi dòng tế bào HEK293-eGFP cho các thí nghiệm tiếp theo

3.2.5. Kết quả bước đầu thử nghiệm dòng tế bào HepG2-eGFP với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn

Khi thử nghiệm dòng tế bào HepG2 với chất B[a]P chuẩn ở các nồng độ 10^{-16} ; 10^{-15} ; 10^{-14} ; 10^{-13} ; 10^{-12} ; 10^{-11} ; 10^{-10} M và chất TCDD chuẩn ở các nồng độ; 10^{-16} ; 10^{-15} ; 10^{-14} ; 10^{-13} ; 10^{-11} M thu được kết quả như Hình 3.17



A



B

Hình 3.18. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HepG2-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn B[a]P và TCDD sau 24 giờ. (A) Tín hiệu huỳnh quang của tế bào HepG2-eGFP và B[a]P chuẩn; (B) Tín hiệu huỳnh quang của tế bào HepG2-eGFP và TCDD. (Giá trị nồng độ trên biểu đồ được biểu diễn ở dạng LogX: X là nồng độ của các chất)

Kết quả thu được cho thấy ở các nồng độ của chất B[a]P nghiên cứu, tín hiệu huỳnh quang tăng tuyến tính trong khoảng (10^{-16} M đến 10^{-11} M) và giảm độ phát quang ở nồng độ 10^{-10} M. Có sự giảm tín hiệu huỳnh quang có thể do nồng độ 10^{-10} M đã ảnh hưởng đến tế bào, gây ức chế sự biểu hiện của GFP. Ngoài ra, tín hiệu huỳnh quang khi thử với chất TCDD chuẩn cao hơn nhiều chất B[a]P là do TCDD có độc tính cao hơn và có ái lực mạnh hơn với thụ thể AhR trong tế bào nên khi thử cùng nồng độ thì TCDD đã kích thích tế bào cảm ứng, biểu hiện protein GFP mạnh hơn.

Từ đường cong tín hiệu huỳnh quang Hình 3.18 A cho thấy ở nồng độ B[a]P 10^{-16} M, dòng tế bào cho tín hiệu huỳnh quang thu được thấp nhất. Vì vậy, nồng độ B[a]P 10^{-16} M được dự đoán là nồng độ thấp nhất để dòng tế bào chuyển gen được cảm ứng phát tín hiệu huỳnh quang. Để xác định giới hạn phát hiện, tiến hành lặp lại thí nghiệm 10 lần tại nồng độ B[a]P 10^{-16} M. Kết quả như Bảng 3.2 dưới đây:

Bảng 3.2. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở các nồng độ B[a]P chuẩn

STT	Nồng độ B[a]P chuẩn (M)	Tín hiệu huỳnh quang (RFU)	Nồng độ B[a]P chuẩn (M)	Tín hiệu huỳnh quang (RFU)
1	10^{-16}	115	10^{-15}	487
2	10^{-16}	80	10^{-15}	470
3	10^{-16}	-20	10^{-15}	450
4	10^{-16}	125	10^{-15}	480
5	10^{-16}	98	10^{-15}	422
6	10^{-16}	209	10^{-15}	470
7	10^{-16}	113	10^{-15}	438
8	10^{-16}	-5	10^{-15}	491
9	10^{-16}	70	10^{-15}	430
10	10^{-16}	125	10^{-15}	496

Từ số liệu bảng 3.2 cho thấy, ở nồng độ B[a]P 10^{-16} M, có 2 thí nghiệm dòng tế bào không phát tín hiệu huỳnh quang nên không đạt tỷ lệ $\geq 90\%$. Do đó, tiếp tục thử nghiệm với nồng độ B[a]P 10^{-15} M. Kết quả thể hiện trong Bảng 3.2 cho thấy ở cả 10 lần lặp lại, dòng tế bào đều phát tín hiệu huỳnh quang, như vậy đạt tỷ lệ 100%. Do đó, giới hạn phát hiện (LOD) đối với chất B[a]P chuẩn là 10^{-15} M.

Tương tự với chất chuẩn TCDD, ở các nồng độ nghiên cứu, tín hiệu tăng tuyến tính trong khoảng nồng độ (10^{-16} M đến 10^{-12} M). Ở nồng độ TCDD 10^{-16} M, dòng tế bào chuyển gen cho tín hiệu huỳnh quang thấp nhất. Để xác định giới hạn phát hiện, tiến hành lặp lại thí nghiệm 10 lần ở nồng độ 10^{-16} M. Kết quả thu được như Bảng 3.3 dưới đây:

Bảng 3.3. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ TCDD 10^{-16} M

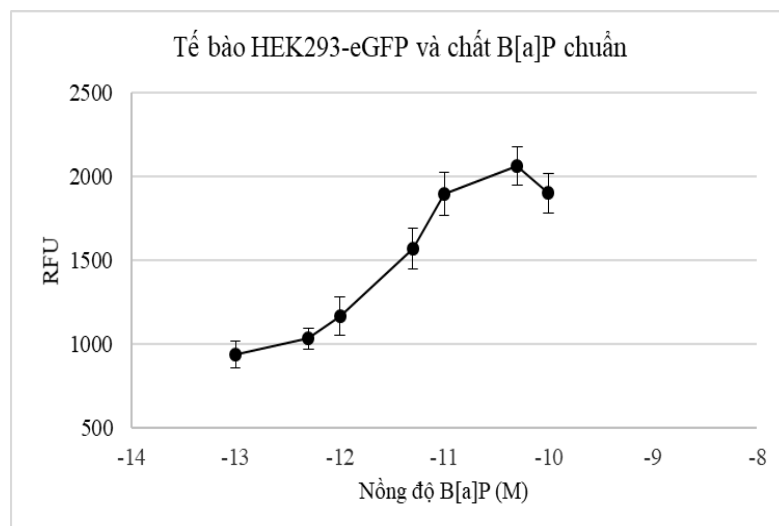
STT	Nồng độ TCDD chuẩn (M)	Tín hiệu huỳnh quang (RFU)
1	10^{-16}	3453
2	10^{-16}	3653
3	10^{-16}	3537

4	10^{-16}	3442
5	10^{-16}	3590
6	10^{-16}	3610
7	10^{-16}	3320
8	10^{-16}	3480
9	10^{-16}	3520
10	10^{-16}	3580

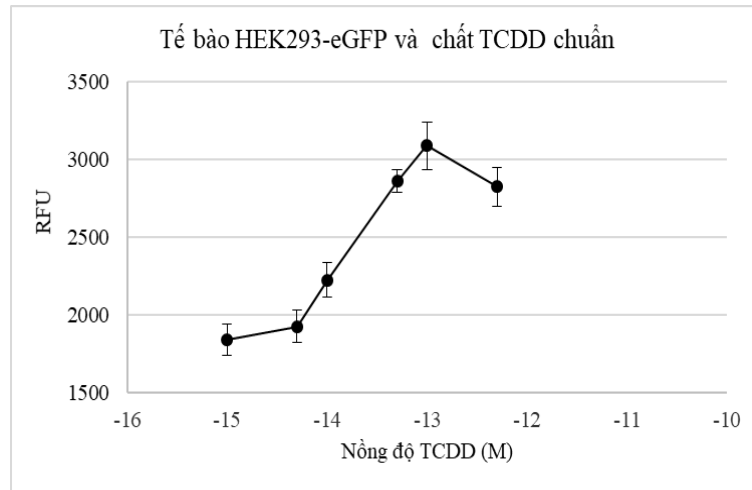
Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy ở cả 10 lần lặp lại ở nồng độ TCDD 10^{-16} M, dòng tín tế bào đều cho tín hiệu huỳnh quang, đạt tỷ lệ 100% thí nghiệm dương tính. Từ đó, giới hạn phát hiện (LOD) đối với chất TCDD chuẩn của dòng tế bào HepG2-eGFP là 10^{-16} M.

3.2.6. Kết quả bước đầu thử nghiệm dòng tế bào HEK293-eGFP với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn

Khi thử nghiệm dòng tế bào HEK293-eGFP với chất B[a]P chuẩn ở các nồng độ 10^{-13} ; 5×10^{-13} ; 10^{-12} ; 5×10^{-12} ; 10^{-11} ; 5×10^{-11} ; 10^{-10} M và chất TCDD chuẩn ở các nồng độ 10^{-15} ; 5×10^{-14} ; 10^{-14} ; 5×10^{-13} ; 10^{-13} ; 5×10^{-12} M thu được kết quả như Hình 3.19 và Hình 3.20 dưới đây.



Hình 3.19. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HEK293-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn B[a]P sau 24 giờ. (Giá trị nồng độ trên biểu đồ được biểu diễn ở dạng $\text{Log}X$: X là nồng độ của các chất)



Hình 3.20. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HEK293-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn TCDD sau 24 giờ. (Giá trị nồng độ trên biểu đồ được biểu diễn ở dạng $\text{Log}X$: X là nồng độ của các chất)

Kết quả thu được cho thấy ở các nồng độ của chất B[a]P nghiên cứu, tín hiệu huỳnh quang tăng tuyến tính trong khoảng nồng độ (10^{-13} M đến 5×10^{-11} M) và giảm độ phát quang ở nồng độ 10^{-10} M. Có sự giảm tín hiệu huỳnh quang có thể do ở nồng độ 10^{-10} M đã ảnh hưởng đến tế bào, gây ức chế sự biểu hiện của GFP.

Từ đường cong tín hiệu huỳnh quang Hình 3.19, tín hiệu huỳnh quang thấp nhất ở nồng độ B[a]P 10^{-13} M. Để xác định giới hạn phát hiện, tiến hành lặp lại thí nghiệm 10 lần ở nồng độ 10^{-13} M, thu được kết quả như Bảng 3.4:

Bảng 3.4. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ B[a]P 10^{-13} M

STT	Nồng độ TCDD chuẩn (M)	Tín hiệu huỳnh quang (RFU)
1	10^{-13}	1022
2	10^{-13}	904
3	10^{-13}	897
4	10^{-13}	970
5	10^{-13}	950
6	10^{-13}	905
7	10^{-13}	687
8	10^{-13}	945
9	10^{-13}	990

10	10^{-13}	1009
----	------------	------

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy ở cả 10 lần lặp lại ở nồng độ TCDD 10^{-16} M, dòng tín tế bào đều cho tín hiệu huỳnh quang, đạt tỷ lệ 100% thí nghiệm dương tính. Từ đó, giới hạn phát hiện (LOD) đối với chất B[a]P chuẩn của dòng tế bào HEK-eGFP là 10^{-15} M.

Khi thử với chất TCDD, ở các nồng độ nghiên cứu, tín hiệu huỳnh quang tăng dần từ (10^{-15} M đến 10^{-13} M) và bắt đầu giảm ở 5×10^{-13} M. Ở nồng độ TCDD 10^{-15} M dòng tế bào HEK239-eGFP phát tín hiệu huỳnh quang thấp nhất. Từ đó, lặp lại thí nghiệm 10 lần ở nồng độ 10^{-15} M để xác định giới hạn phát hiện. Kết quả thu được thể hiện như Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Tín hiệu huỳnh quang thu được ở nồng độ TCDD 10^{-15} M

STT	Nồng độ TCDD chuẩn (M)	Tín hiệu huỳnh quang (RFU)
1	10^{-15}	1803
2	10^{-15}	1925
3	10^{-15}	1907
4	10^{-15}	1794
5	10^{-15}	1756
6	10^{-15}	1865
7	10^{-15}	1842
8	10^{-15}	1853
9	10^{-15}	1915
10	10^{-15}	1802

Kết quả ở Bảng 3.5 cho thấy ở cả 10 lần lặp lại ở nồng độ TCDD 10^{-16} M, dòng tín tế bào đều cho tín hiệu huỳnh quang >1800 RFU, đạt tỷ lệ 100% thí nghiệm dương tính. Từ đó, giới hạn phát hiện (LOD) đối với chất TCDD chuẩn của dòng tế bào HEK239-eGFP là 10^{-15} M. Pieterse và đồng tác giả (2013) đã tạo dòng tế bào ổn định H4IIE-pDREtataLuc ở chuột có ngưỡng phát hiện $5,2 \times 10^{-11}$ M B[a]P [75]. Theo Han và đồng tác giả (2004) đã công bố dòng tế bào luciferase H1L1.c2 và dòng tế bào phát quang GFP H1G1.c3 ở chuột có ngưỡng phát hiện nằm trong khoảng 10^{-13} M đến 10^{-12} M TCDD [76]. So với các nghiên cứu trước đây, ngưỡng phát hiện của dòng tế bào HEK239-eGFP đối với chất B[a]P và TCDD thấp hơn. Ngoài ra,

ngưỡng phát hiện ở chất TCDD thấp hơn B[a]P là do TCDD có độc tính cao hơn và có ái lực mạnh hơn với thụ thể AhR trong tế bào nên chỉ cần ở nồng độ rất thấp TCDD đã kích thích tế bào cảm ứng, biểu hiện *GFP*. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Han và cộng sự công bố năm 2004 [76].

Khi thử nghiệm với chất chuẩn TCDD hoặc B[a]P thấy rằng tín hiệu huỳnh quang phát ra ở dòng tế bào HepG2-eGFP cao hơn hẳn so với dòng tế bào HEK293-eGFP. Chẳng hạn, đối với chất B[a]P, tín hiệu huỳnh quang của dòng HEK293-eGFP đạt cao nhất 2067 RFU ở nồng độ 5×10^{-11} M, còn tín hiệu huỳnh quang của dòng HepG2-eGFP cao nhất 3403RFU ở nồng độ 10^{-11} M. Tương tự, khi thử với TCDD, dòng HEK293-eGFP phát tín hiệu huỳnh quang cao nhất 3092 RFU ở nồng độ 10^{-13} M, trong khi ở nồng độ 10^{-12} M dòng HepG2-eGFP cho tín hiệu huỳnh quang 5353 RFU. Như vậy, khi so sánh giữa 2 dòng tế bào chuyển gen cho thấy dòng tế bào HepG2-eGFP có cường độ tín hiệu huỳnh quang cao hơn và ngưỡng phát hiện thấp hơn dòng tế bào HEK-eGFP khi thử nghiệm với chất TCDD và B[a]P chuẩn. Kết quả thu được phù hợp với công bố của Budin và cộng sự (2021) đã nghiên cứu tạo dòng DR_{human} CALUX trên các dòng tế bào người: U2OS, HepG2, C2Bbe1, HT-29 và HEK293 sử dụng vector pGudluc1.1. Khi thử nghiệm các dòng tế bào tạo ra với 2,3,7,8-TCDD ở cùng nồng độ, dòng tế bào chuyển gen HepG2 cho tín hiệu phát quang cao nhất trong các dòng tế bào [77]. Do đó, dòng tế bào HepG2-eGFP được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã tạo thành công dòng tế bào HepG2-Luc mang cấu trúc DREs và gen phát quang *luciferase*. Dòng tế bào được chọn lọc có nồng độ plasmid p4xDRE-Luc cao, có khả năng phát hiện chất chuẩn B[a]P- là dẫn xuất của dioxin

2. Thiết kế và tạo thành công 2 dòng tế bào:

- Dòng HEK293-eGFP mang plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP chứa trình tự DRE và gen phát quang GFP, có khả năng phát tín hiệu huỳnh quang khi tiếp xúc với chất TCDD chuẩn có ngưỡng phát hiện 10^{-15} M và chất B[a]P chuẩn với ngưỡng phát hiện 10^{-13} M.

- Dòng tế bào HepG2-eGFP mang cấu trúc DREs và gen phát huỳnh quang eGFP, có khả năng phân tích chất chuẩn B[a]P với ngưỡng phát hiện 10^{-15} M; khoảng phát hiện (10^{-16} M – 10^{-11} M) và chất chuẩn 2,3,7,8-TCDD với ngưỡng phát hiện 10^{-16} M.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục đánh giá độ ổn định, độ tái lập, độ không đảm bảo đo của dòng tế bào thu được, xác định khoảng phát hiện của dòng tế bào HepG2-eGFP với dioxin, thử nghiệm dòng tế bào chuyển gen HepG2-eGFP với các mẫu thực tế nghi nhiễm dioxin hoặc các chất dẫn xuất.

- Tiến hành làm nghiên cứu so sánh khả năng phát hiện dioxin và các chất dẫn xuất của dòng tế bào tạo ra với dòng tế bào thương mại trên thị trường.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Nguyen Thu Trang**, Tran Manh Hai, Le Thi Minh Phuc, Nguyen Trong Linh, Nguyen Thi Da, Nguyen Thuy Linh, Nguyen Thi Minh Huyen, Nguyen Tien Dat, La Thi Huyen (2023). Development of CALUX cell lines for screening dioxin and its derivatives. *4th international science conference “Toxic Contaminants in Food and Environment: Quality Assessment and Treatment Technologies”*. Viet Nam Academy of Science and Technology, Ha Noi, pp. 3.
2. **Nguyễn Thu Trang**, Trần Mạnh Hải, Lê Thị Minh Phúc, Nguyễn Trọng Linh, Nguyễn Thị Đà, Lã Thị Huyền (2023). Nghiên cứu tạo dòng tế bào chuyển gen định hướng phát hiện, sàng lọc dioxin và các chất dẫn xuất dioxin. *Tuyển tập Báo cáo khoa học của Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023* tại Trung tâm Hội nghị Quốc gia, Hà Nội, tr. 1344-1350

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen W.Y., Wu J.H., Lin S.C., Chang J.E., 2016, Bioremediation of polychlorinated-p-dioxins/dibenzofurans contaminated soil using simulated compost-amended landfill reactors under hypoxic conditions, *Journal of Hazardous Materials*, 312, pp.159–168.
2. Sorg O., Saurat J.H., 2023, Development of skin diseases following systemic exposure: example of dioxins, *Frontiers in Toxicology*, 5.
3. Consonni D., Sindaco R., Bertazzi P.A., 2012, Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: a review, 1989-2010. *Environ Int*, 44, pp. 151–162.
4. Kulkarni P.S., Crespo J.G., Afonso C.A.M., 2008, Dioxins sources and current remediation technologies — A review, *Environment International*, 34(1), pp. 139–153.
5. Hites R.A., 2011, Dioxins: an overview and history, *Environ Sci Technol*, 45(1), pp.16–20.
6. Cao Z., Fiedler H., Wang B., Zhang T.m Yu G., Huang J., Deng S., 2013, Economic status as a determinant of national PCDD/PCDF releases and implications for PCDD/PCDF reduction, *Chemosphere*, 91(3), pp.328–335.
7. Mahfouz S., Mansour G., Murphy D.J., Hanano A., 2020, Dioxin impacts on lipid metabolism of soil microbes: towards effective detection and bioassessment strategies, *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), pp. 59.
8. Hanano A., Ammouneh H., Almously I., 2014, Traceability of polychlorinated dibenzo-dioxins/furans pollutants in soil and their ecotoxicological effects on genetics, functions and composition of bacterial community, *Chemosphere*, 108, pp. 326–333.
9. Hanano A., Almously I., Shaban M., Moursel N., Shahadeh A., Alhajji E., 2015, Differential tissue accumulation of 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin in *Arabidopsis thaliana* affects plant chronology, lipid metabolism and seed yield, *BMC Plant Biol*, 15, pp. 193.

10. Schechter A., Quynh H.T., Pavuk M., Pöpke O., Malisch R., Constable J.D., 2003, Food as a source of dioxin exposure in the residents of Bien Hoa City, Vietnam, *J Occup Environ Med*, 45(8), pp. 781–788.
11. Diliberto J.J., Jackson J.A., and Birnbaum L.S., 1996, Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) disposition following pulmonary, oral, dermal, and parenteral exposures to rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 138(1), pp. 158–168.
12. International Agency for Research on Cancer, ed. (2007), *Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005*, IARC, Lyon.
13. Olson J.R., 1994, Pharmacokinetics of Dioxins and Related Chemicals, *Dioxins and Health*, pp. 163–197..
14. National Academies of Sciences, 2018, *Veterans and Agent Orange: Update 11 (2018)*, National Academies Press (US), Washington (DC).
15. Kim H.A., Kim E.M., Park Y.C., 2003, Immunotoxicological effects of Agent Orange exposure to the Vietnam War Korean veterans, *Ind Health*, 41(3), pp.158–166.
16. Centre international de recherche sur le cancer, ed., 2012, *A review of human carcinogens*, International agency for research on cancer, Lyon.
17. Kogevinas M., 2001, Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects, *Hum Reprod Update*, 7(3), pp. 331–339.
18. Li M.C., Chen P.C., Tsai P.C., Furue M., Onozuka D., Hagihara A., Uchi H., Yoshimura T., Guo Y.L., 2015, Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: A meta-analysis of two highly exposed cohorts, *International Journal of Cancer*, 137(6), pp. 1427–1432.
19. Schwarz M.A., Lindtner O., Blume K., Heinemeyer G., Schneider K., 2014, Dioxin and dl-PCB exposure from food: the German LExUKon project, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 31(4), pp. 688–702.

20. Malisch R., 2017, Incidents with Dioxins and PCBs in Food and Feed- Investigative Work, Risk Management and Economic Consequences, *Journal of Environmental Protection*, 8(6), pp. 744–785.
21. Weber R., Gaus C., Tysklind M., et al., 2008, Dioxin- and POP-contaminated sites--contemporary and future relevance and challenges: overview on background, aims and scope of the series, *Environ Sci Pollut Res Int*, 15(5), pp. 363–393.
22. Balzer W., Gaus M., Gaus C., Urban U., Weber R., 2011, PCDD/F emission from Leblanc Soda factories in Great Britain, France and Germany during the 18th to early 20th century, *Organohalogen Compounds*, 70(2008), pp.809-812.
23. Camenzuli L., Scheringer M., Gaus C., Grant S., Zennegg M., Hungerbühler K., 2015, Historical emissions of octachlorodibenzodioxin in a watershed in Queensland, Australia: estimation from field data and an environmental fate model, *Sci total environ*, 502, pp. 680–687.
24. Götz R., Sokollek V., and Weber R., 2013, The dioxin/POPs legacy of pesticide production in Hamburg: part 2--waste deposits and remediation of Georgswerder landfill, *Environ Sci Pollut Res Int*, 20(4), pp. 1925–1936.
25. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: Ausschreibung des 27. Forschungspreises zur Förderung methodischer Arbeiten mit dem Ziel der Einschränkung und des Ersatzes von Tierversuchen vom 6. September 2007. *Bundesgesundheitsbl*, 50(11), pp. 1453–1453.
26. European Commission, 2006, Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off J Eur Union L 364/5.
27. Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffsText with EEA relevance. .

28. <https://www.informea.org/en/results-global-survey-concentrations-human-milk-persistent-organic-pollutants-united-nations>
29. van Larebeke N., Hens L., Schepens P., et al., 2001, The Belgian PCB and dioxin incident of January-June 1999: exposure data and potential impact on health, *Environ Health Perspect*, 109(3), pp. 265–273
30. Malisch R., 2000, Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp, *Chemosphere*, 40 (9–11), pp. 1041–1053.
31. Marnane I., 2012, Comprehensive environmental review following the pork PCB/dioxin contamination incident in Ireland, *J Environ Monit*, 14(10), pp. 2551–2556.
32. Kim M., Kim D.-G., Choi S.W., Guerrero P., Norambuena J., Chung GS., 2011, Formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans (PCDD/Fs) from a refinery process for zinc oxide used in feed additives: a source of dioxin contamination in Chilean pork, *Chemosphere*, 82(9), pp. 1225–1229.
33. Weber, 2011, A Assessment of the PCDD/PCDF fingerprint of the dioxin food scandal from biodiesel in Germany and possible PCDD/F sources, *Organohalogen Compd*, 73, pp. 400–403.
34. Malisch R., Kotz A., 2014, Dioxins and PCBs in feed and food: Review from European perspective. *Science of The Total Environment*, 491–492, pp. 2–10.
35. Tlustos C., Anderson W., Evans R., 2013, 5 - Responding to food contamination incidents: principles and examples from cases involving dioxins. *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*, pp. 110–128.
36. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2297>
37. Weber R., Albrecht M., Ballschmiter K., 2014, Safe food production from free range beef—minimizing TEQ-levels in meat by tracking PCB-sources, *Organo halogen Compd* 76, pp. 815–818.

38. Weber R., Hollert H., Kamphues J., Ballschmiter K., Blepp M., Herold C., (2015), Analyse und Trendabschätzung der Belastung der Umwelt und von Lebensmitteln mit ausgewählten POPs und Erweiterung des Datenbestandes der POP-Dioxin-Datenbank des Bundes und der Länder mit dem Ziel pfadbezogener Ursachenaufklärung.
39. Hoogenboom R.L.A.P., Ten Dam G., van Bruggen M., et al., 2016, Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) and biphenyls (PCBs) in home-produced eggs, *Chemosphere*, 150, 311–319.
40. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2832>
41. Schechter A., Papke O., Lis A., Ball M., Ryan J.J., Olson J.R., Li L., Kesler H., (1996). Decrease in milk and blood dioxin levels over two years in a mother nursing twins: estimates of decreased maternal and increased infant dioxin body burden from nursing. *Chemosphere*, **32**(3).
42. Trần Thị Tuyết Hạnh, Lê Vũ Anh., Nguyễn Ngọc Bích, Nguyễn Việt Hùng, 2013. Đánh giá nguy cơ sức khỏe môi trường do phơi nhiễm với dioxin trong thực phẩm tại điểm nóng dioxin ở Đà Nẵng, *Tạp chí Y học dự phòng*, 4(140), tr. 48-58.
43. Đào Văn Tùng, 2021, *Nghiên cứu sự thay đổi nồng độ hormon steroid trong nước bọt, sữa và huyết thanh trên những người sống tại vùng phơi nhiễm chất Da cam/dioxin ở Việt Nam*, Luận án tiến sỹ, Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
44. <http://foodsafety.gov.vn/vn/tin-tuc/bao-ve-moi-truong/tinh-trang-o-nhiem-dioxin-trong-moi-truong-viet-nam>
45. Du X.Y., Liu X.Y., Shang Z.Y., Han W.S., Zhang H., 2021, Detection techniques for monitoring dioxin-like compounds: latest techniques and the comparison, *J Phys: Conf Ser*, 2045(1), pp. 012024.
46. Tian W., Xie H.Q., Fu H., Pei X., Zhao B., 2012, Immunoanalysis methods for the detection of dioxins and related chemicals, *Sensors (Basel)*, 12(12), pp. 16710–16731.
47. Denison M.S., Fisher J.M., Whitlock J.P., 1988, Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional

- enhancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), pp. 2528–2532
48. Denison M.S., Zhao B., Baston D.S., Clark G.C., Murata H., Han D., 2004, Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals, *Talanta*, 63(5), pp. 1123–1133.
49. Denison M.S., Zhao B., Baston D.S., Clark G.C., Murata H., Han D., 2004, Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals, *Talanta*, 63(5), pp. 1123–1133.
50. Murk A.J., Legler J., Denison M.S., Giesy J.P., van de Guchte C., Brouwer A., 1996, Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water, *Fundam Appl Toxicol*, 33(1), pp. 149–160.
51. Denison M.S., Nagy S.R., 2003, Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, pp. 309–334.
52. Sany S.B.T., Narimani L., Soltanian F.K., et al., 2016, An overview of detection techniques for monitoring dioxin-like compounds: latest technique trends and their applications. *RSC Adv*, 6(60), pp. 55415–55429.
53. Brennan J.C., He G., Tsutsumi T., et al., 2015, Development of Species-Specific Ah Receptor-Responsive Third Generation CALUX Cell Lines with Increased Sensitivity and Responsiveness, *Environ Sci Technol*, 49(19), pp. 11903–11912.
54. Brennan J.C., He G., Tsutsumi T., et al., 2015, Development of Species-Specific Ah Receptor-Responsive Third Generation CALUX Cell Lines with Increased Sensitivity and Responsiveness, *Environ Sci Technol*, 49(19), pp. 11903–11912.
55. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/designing-a-bioluminescent-reporter-assay/>
56. Nagy S.R., Sanborn J.R., Hammock B.D., Denison M.S., 2002, Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the

- rapid and inexpensive detection and characterization of ah receptor agonists, *Toxicol Sci*, 65(2), pp. 200–210.
57. Mandal P.K., 2005, Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology, *J Comp Physiol B*, 175(4), pp. 221–230.
58. Zhu K., Meng Q., Zhang Z., et al., 2019, Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy (Review), *Molecular Medicine Reports*, 20(6), pp. 4763–4773.
59. Ng G.H.B., Gong Z., 2013, GFP transgenic medaka (*Oryzias latipes*) under the inducible *cyp1a* promoter provide a sensitive and convenient biological indicator for the presence of TCDD and other persistent organic chemicals, *PLoS One*, 8(5), pp. 64334.
60. Xu T., Close D., Smartt A., Ripp S., Sayler G., 2014, Detection of Organic Compounds with Whole-Cell Bioluminescent Bioassays, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 144, pp. 111–151.
61. Vromman V., Baert K., Vanderperren H., et al., 2012, Evaluation of the use of CALUX results for dioxins and dioxin-like PCBs analysis for quantitative human exposure assessments, *Food Control*, 27(2), pp. 314–321.
62. Husain A., Gevao B., Dashti B., et al., 2014, Screening for PCDD/Fs and dl-PCBs in local and imported food and feed products available across the State of Kuwait and assessment of dietary intake, *Ecotoxicol Environ Saf*, 100, pp. 27–31.
63. Petrlik J., Adu-Kumi S., Hogarth J., et al., 2019, Persistent Organic Pollutants (POPS) in Eggs, *Persistent Organic Pollutants*, 25.
64. Lê Thị Kim Dung, 2017, *Nghiên cứu sự thay đổi của gen AHR và AIP ở các nạn nhân nhiễm dioxin*, Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
65. Nguyễn Ngọc Toàn, 2016, *Nghiên cứu phát hiện các hợp chất dioxin ở người phơi nhiễm chất da cam/ dioxin bằng kỹ thuật DR CALUX*, Luận văn Thạc sỹ, Viện Đại học Mở Hà Nội, Hà Nội.

66. Nguyễn Thị Mơ, 2014, *Nghiên Cứu Ứng Dụng Phương Pháp Phân Tích Sàng Lọc Calux Trong Đánh Giá Mức Độ Ô Nhiễm Dioxin*, Luận Văn Thạc Sĩ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
67. Lã Thị Hương Giang, Phạm Thế Tài, Đinh Hồng Dương, 2021, Nghiên cứu nồng độ dioxin trong máu của quân nhân làm việc tại 3 sân bay ô nhiễm dioxin ở Việt Nam, *Tạp chí Y - Dược học quân sự*, 1, tr. 17-24.
68. Russell D.W., Sambrook J., 2006, *The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
69. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), pp. 5463–5467.
70. Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25(4), pp. 402–408.
71. Baston D.S., Denison M.S., 2011, Considerations for potency equivalent calculations in the Ah receptor-based CALUX bioassay: Normalization of superinduction results for improved sample potency estimation, *Talanta*, 83(5), pp. 1415–1421.
72. He G., Tsutsumi T., Zhao B., et al., 2011, Third-Generation Ah Receptor-Responsive Luciferase Reporter Plasmids: Amplification of Dioxin-Responsive Elements Dramatically Increases CALUX Bioassay Sensitivity and Responsiveness, *Toxicological Sciences*, 123(2), pp. 511–522.
73. Migone TS., Zhang J., Luo X., Zhuang L., Chen C., Hu B., Hong JS., Perry JW., Chen SF., Zhou JXH., Cho YH., Ullrich S., Kanakaraj P.,..., Wei P., 2002, TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator, *Immunity*, **16**(3), pp. 479-492.
74. Wen L., Zhuang L., Luo X., Wei P., 2003, TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells, *J Biol Chem*, 278(40), pp. 39251–39258.
75. Pieterse B., Felzel E., Winter R., van der Burg B., Brouwer A., 2013, PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard

identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures, *Environ Sci Technol*, 47(20), pp. 11651–11659.

76. Han D., Nagy S.R., Denison M.S., 2004, Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists, *BioFactors*, 20(1), pp. 11–22.
77. Budin C., Besselink H., van Vugt-Lussenburg B.M.A., Man H.Y., van der Burg B., Brouwer A., 2021, Induction of AhR transactivation by PBDD/Fs and PCDD/Fs using a novel human-relevant, high-throughput DRhuman CALUX reporter gene assay, *Chemosphere*, 263(2021), pp. 1-9.



VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
CENTER FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY TRANSFER

4TH INTERNATIONAL
SCIENCE CONFERENCE

APRIL 12, 2023
HA NOI

**“TOXIC CONTAMINANTS IN FOOD AND ENVIRONMENT
QUALITY ASSESSMENT AND TREATMENT TECHNOLOGIES”**

ABSTRACT BOOK

Website: <http://www.cretech.vast.vn>

DEVELOPMENT OF CALUX CELL LINES FOR SCREENING DIOXIN AND ITS DERIVATIVES

Nguyen Thu Trang^{1,2}, Tran Manh Hai¹, Le Thi Minh Phuc¹, Nguyen Trong Linh¹,
Nguyen Thi Da¹, Nguyen Thuy Linh¹, Nguyen Thi Minh Huyen¹, Nguyen Tien Dat^{2,3},
La Thi Huyen^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam*

²*Graduate University of Sciences and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
Hanoi, Vietnam*

³*Center for Research and Technology Transfer, Vietnam Academy of Science and Technology,
Hanoi, Vietnam*

Abstract

For the analysis and quantification of Dioxin and its derivatives, Gas Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (GC/HRMS) is the leading method. However, for the periodic screening, DR CALUX (Dioxin Response Chemically Activated Luciferase gene eXpression) cell-based bioanalytical methods are highly effective, easy to implement and low cost. At present, the DR CARLUX technique is well-established in several laboratories in Europe and around the world. The CALUX or DR CALUX assay is a ready-to-use analytical assay based on transgenic cells carrying the DREs (Dioxin response elements) construct and *luciferase* reporter genes. Thus, in the presence of dioxin and its derivatives, they can induce the expression of the *luciferase* gene, which degrades the substrate to produce measurable light. To actively generate cell lines using CALUX in screening analysis of dioxin and the derivatives as well as application in our molecular mechanism analysis, the p4XDRE-LUC vector carrying the DREs construct, and the transgenic *luciferase* gene was inserted into HepG2 cells. Through multiple cycles of culturing and cloning, we obtained the HepG2 cell line adapts Dioxin screening analysis requirement. Besides, a new structure containing the EGFP gene was designed by replacing the original *luciferase* gene by *EGFP* gene in the p4XDRE-LUC vector. The vector carrying the *EGFP* gene was cloned and transferred into HepG2 cells, and transgenic cells were selected through the expression of the *EGFP* gene. We have successful design the HepG2 cell line carrying DREs-EGFP structure which is ready for screening dioxins and the derivatives as well as the drugs competitive receptors with dioxin.

**Coresponding:* lthuyen@ibt.ac.vn; lahuyenibt@gmail.com

NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG TẾ BÀO CHUYỂN GEN ĐỊNH HƯỚNG PHÁT HIỆN, SÀNG LỌC DIOXIN VÀ CÁC CHẤT DẪN XUẤT DIOXIN

Nguyễn Thu Trang^{1,2}, Trần Mạnh Hải¹, Lê Thị Minh Phúc¹, Nguyễn Trọng Linh¹, Nguyễn Thị Đà¹,
Lã Thị Huyền^{1,2,*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, dioxin) và các hợp chất tương tự dioxin là những chất gây ô nhiễm môi trường phổ biến và tồn tại lâu dài. Các chất này gây ảnh hưởng đến cơ thể sống và tạo ra các tác động sinh học thông qua khả năng liên kết và kích hoạt thụ thể Aryl hydrocarbon receptor (AhR) trong tế bào. Trong những năm gần đây, xét nghiệm chứa reporter gen đã được sử dụng rộng rãi trong phân tích dioxin và các chất dẫn xuất có trong các mẫu sinh học, môi trường, thực phẩm và thức ăn chăn nuôi do phương pháp này phát hiện tương đối nhanh, chi phí thấp. Các hệ thống xét nghiệm sinh học tế bào dựa trên reporter gene đã được phát triển bao gồm hệ thống tế bào CALUX (Chemical Activated LUciferase gene eXpression) và hệ thống tế bào CAFLUX (Chemical Activated Fluorescent eXpression) dựa trên cơ chế sử dụng các dòng tế bào tái tổ hợp chứa gen báo cáo *luciferase* (CALUX) hoặc gen báo cáo *GFP* (CAFLUX) đáp ứng với thụ thể AhR. Trong nghiên cứu này, dựa trên nguyên lý của phương pháp CAFLUX, chúng tôi đã nhân bản gen mã hóa trình tự promoter *CYP1A1* đáp ứng với dioxin (DRE) từ plasmid DRE-pNL1.3 [secNLuc] và gắn vào vector biểu hiện pcDNA3.1(+) eGFP để tạo thành vector tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP mang trình tự gen phát quang GFP. Sau đó, vector tái tổ hợp được chuyển vào dòng tế bào HEK293 tạo dòng tế bào chuyển gen HEK293-eGFP. Dòng tế bào chuyển gen thu được, khi kích thích bằng TCDD và B[a]P chuẩn sẽ biểu hiện protein GFP. Ngưỡng phát hiện của dòng tế bào thu được đối với chất TCDD là 10^{-15} M và chất B[a]P là 10^{-13} M.

Từ khóa: CALUX, CAFLUX, dioxin, gen báo cáo, tế bào chuyển gen.

MỞ ĐẦU

Dioxin thuộc nhóm các hợp chất thơm đa halogen khó phân hủy (Polyhalogenated aromatic compounds - PHAHs) là các chất gây ô nhiễm môi trường phổ biến, bao gồm dibenzo-p-dioxin polychlorin hóa (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCB) và ete diphenyl (PCDEs). Trong đó, 2,3,7,8-TCDD/TCDFs được biết đến là các hợp chất độc hại nhất. PCB đã được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghiệp đa dạng như chất hóa dẻo, chất chống cháy, phụ gia sơn, chất kết dính, dầu ngâm, chất bịt kín và sáp. PCBs tích lũy trong môi trường chủ yếu do tính chất hóa lý, tính ổn định sinh học và bản chất kỵ nước của chúng. Mặt khác, PCDD, PCDF và PCDE chủ yếu được hình thành dưới dạng sản phẩm phụ trong quá trình công nghiệp hoặc quá trình đốt cháy bao gồm các lò đốt rác đô thị. Dư lượng dioxin đã được phát hiện trong nhiều loại chất nền bao gồm đất, trầm tích, nước, cá, động vật hoang dã, mô mỡ của con người, huyết thanh và sữa.

Dioxin là tác nhân đe dọa nguy hiểm, dù ở nồng độ thấp (một phần tỷ) cũng đủ tàn phá sức khỏe con người và môi trường. Ở người, phơi nhiễm dioxin ở người ảnh hưởng đến các tuyến nội tiết và chức năng sinh sản, gây ra các bệnh ở vùng trung tâm và ngoại vi của hệ thần kinh, cản trở sự phát triển của thai nhi, đặc biệt là ở hệ thần kinh và khớp (Ahn *et al.*, 2008). Các báo cáo của Cơ quan Bảo vệ môi trường Mỹ (EPA) đã công nhận dioxin là một chất gây ung thư cho con người. Năm 1997, Tổ chức quốc tế về Nghiên cứu ung thư (IARC) thuộc WHO đã công bố 2,3,7,8-TCDD là chất gây ung thư nhóm 1 (nghĩa là nhóm đã được công nhận là gây ung thư). Đồng thời, tháng 01 năm 2001, Chương trình Độc học Quốc gia Hoa Kỳ đã chuyển dioxin vào nhóm "các chất gây ung thư cho người". Năm 2012, trong tập bản đồ về các tác nhân hóa học và mối liên quan do IARC xuất bản, TCDD được làm rõ là chất gây ung thư có liên quan đến sarcoma mô mềm, ung thư phổi và ung thư hạch không Hodgkin. Các nghiên cứu được tiến hành sau Thảm kịch sinh thái Seveso (Ý) đã cho thấy sự gia tăng số ca mắc ung thư và tử vong liên quan đến ung thư (Li *et al.*, 2015). Các bệnh ung thư thường thấy nhất là: ung thư hạch, đa u tủy, sarcoma mô mềm, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung và tinh hoàn.

Độc tính của dioxin và các chất dẫn xuất có liên quan với thụ thể AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) có trong tế bào chất của tế bào. AhR là một thành viên của siêu họ các nhân tố phiên mã dạng helix-loop-helix (bHLH)/PER-ARNT-SIM (PAS) (Kewley *et al.*, 2004). AhR là một loại protein ổn định, có mặt khắp nơi trong các mô của động vật có vú và có mức độ biểu hiện khác nhau giữa các mô và trong suốt cuộc đời (Yi *et al.*, 2018). Ở trạng thái không hoạt động, AhR hiện diện trong tế bào chất dưới dạng phức hợp dị thể với hai phân tử protein sốc nhiệt 90 kDa (hsp90) và một phân tử của mỗi phân tử protein-9 liên kết với AhR và p23. Khi có mặt của các phối tử, sự

liên kết của các phối tử với AhR bắt đầu một loạt các sự kiện dẫn đến sự phân ly của hsp90, chuyển vị trí vào nhân và phản ứng dị hóa ARNT. Sau đó, phức hợp AhR-ARNT liên kết với các trình tự DNA cụ thể, được gọi là các yếu tố đáp ứng ngoại sinh (XRE - xenobiotic response element) nằm ở vùng khởi động của gen. Bằng cách này, phức hợp AhR/ARNT điều khiển quá trình phiên mã các gen mục tiêu thuộc thành viên của họ 1 cytochrom P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1). AhR có liên quan đến nhiều quá trình sinh học như chuyển hóa xenobiotic, phản ứng miễn dịch và tăng sinh tế bào, biệt hóa và chết theo chu trình của tế bào (Larigot *et al.*, 2018). Cho đến nay, hoạt động phiên mã qua trung gian AhR thường được thử nghiệm bằng cách sử dụng xét nghiệm luciferase (Luc) dựa trên chuyển plasmid tạm thời trong tế bào người hoặc chuột hoặc các dòng tế bào chuyển gen ổn định như tế bào ung thư gan HepG2 (Satsu *et al.*, 2015), tế bào HEK293 (Bystriakova *et al.*, 2019), hoặc tế bào chuột H1L7.5c3/H4L7.5c2 (Brennan *et al.*, 2015). Tuy nhiên, ở các phương pháp xét nghiệm này, các tế bào phải được ly giải để đo biểu hiện của protein Luc. Ngoài ra, một xét nghiệm dùng để đánh giá hoạt động của AhR đang được nghiên cứu và phát triển dựa trên sự phát huỳnh quang của GFP. Bằng cách này, tế bào không cần ly giải, có thể quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang và đo tín hiệu bằng máy multiplate reader giúp tiết kiệm thời gian khi phân tích. Ở Việt Nam, từ năm 1970 đến nay đã có nhiều nghiên cứu về dioxin như nhóm nghiên cứu của PGS. Đặng Thị Cẩm Hà với nhiều đề tài dự án về phát hiện và xử lý ô nhiễm dioxin, các nghiên cứu về đa hình gen mã hóa cho thụ thể AHR, vai trò thụ thể AHR trong ung thư của nhóm GS.TS. Nông Văn Hải. Bên cạnh đó, đến nay đã có các nghiên cứu sử dụng kit CALUX thương mại trong phát hiện các hợp chất dioxin ở mẫu máu của 58 đối tượng phơi nhiễm dioxin (Nguyễn Ngọc Toàn, 2016); đánh giá mức độ ô nhiễm dioxin trong môi trường tại một số khu vực ô nhiễm nặng ở Việt Nam (Nguyễn Thị Mơ, 2014). Hiện chưa có nghiên cứu nào về việc tạo ra tế bào chuyển gen nhằm chủ động chủ động trong việc sàng lọc phát hiện các chất độc hại đã biết cũng như góp phần phát hiện ra các chất chưa biết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo tế bào chuyển gen HEK-eGFP nhằm mục đích phát hiện, sàng lọc dioxin và các chất dẫn xuất.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector pcDNA3.1(+) eGFP đặt mua từ Genscript (Mỹ), vector DRE-pNL1.3 [secNLuc] được đặt mua từ Addgene (Mỹ). Tế bào HEK293, vi khuẩn *E. coli* DH5 α từ Phòng Công nghệ tế bào động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kit tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Mỹ), Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), Kit Plasmid Midi Extraction (Qiagen, Mỹ), enzyme T4 ligase (Biolab, Mỹ).

Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Invitrogen, Mỹ), FBS (PAN-Biotech, Đức), kháng sinh Penicillin/Streptomycin (Gibco, Mỹ), kháng sinh Geneticin G418 (Gibco, Mỹ), kháng sinh Ampicillin (Việt Nam). Các chất Benzo[a]pyrene (Sigma, Mỹ), 2,3,7,8-TCDD (Sigma, Mỹ) được sử dụng làm chất chuẩn trong thử nghiệm. Các hóa chất Lipofectamin 3000 (Invitrogen, Mỹ), môi trường Optimem (PAN-Biotech, Đức) dùng để chuyển gen.

Phương pháp

Thiết kế tạo vector biểu hiện tạm thời mang cấu trúc DRE và gen phát quang GFP

Gen mã hóa cho trình tự promoter *CYP1A1* đáp ứng với dioxin (DRE-dioxin response element) từ plasmid XRE-pNL1.3 [secNLuc] được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm vị trí của 2 enzyme *Bgl*II và *Sac*I có trình tự mồi xuôi (DRE-F): 5'-CTCACAAGATCTAGATTTGGGGCAT-3'; mồi ngược (DRE-R): 5'-AAGGCAGAGCTCTGCTTATAGGC-3'. Chu trình nhiệt như sau: 94 °C - 3 phút; 94 °C - 1 phút; 54 °C - 45 giây; 72 °C - 1 phút; lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72 °C - 8 phút. Sản phẩm PCR được gắn vào vector pcDNA3.1(+) eGFP đã được cắt mở vòng bằng 2 enzyme tương ứng tạo ra vector biểu hiện DRE-pcDNA3.1(+) eGFP và được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α theo phương pháp sốc nhiệt. Tế bào *E. coli* DH5 α sau khi biến nạp được cấy trên đĩa môi trường LB/agar có bổ sung Ampicillin (Amp) nồng độ 100 μ g/mL và ủ qua đêm ở 37 °C. Các plasmid tái tổ hợp được chọn dòng bằng PCR khuẩn lạc, sau đó chúng được tách chiết từ tế bào DH5 α theo phương pháp mini-prep của Sambrook. Plasmid tái tổ hợp sau khi chọn được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự (Sanger *et al.*, 1977) và phân tích khung đọc mở và các cấu trúc biểu hiện.

Sau khi kiểm tra, vi khuẩn *E. coli* DH5 α được nhân nuôi ở 100 mL môi trường LB lỏng có bổ sung Amp 50 μ g/mL, ở 37 °C. Thu lượng lớn plasmid bằng phương pháp tách sử dụng Kit Plasmid Midi Extraction của hãng QIAGEN. Xác định nồng độ plasmid thu được bằng máy đo Nano Drop.

Nhân nuôi, chuyển gen và kiểm tra khả năng chuyển gen vào dòng tế bào

Dòng tế bào HEK293 được giữ đông và nuôi trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10 % FBS, 1 % kháng sinh Penicillin/Streptomycin trong tủ ẩm CO₂ 5 %, ở 37 °C. Quy trình chuyển gen vào tế bào HEK293 sử dụng Lipofectamin 3000 được thực hiện theo hướng dẫn của hãng Thermo Fisher (Mỹ). Tế bào được chia vào đĩa 6 giếng với mật độ 7,5x10⁵ tế bào/giếng. Sau 24 giờ, tế bào được chuyển 4 μ g plasmid DRE-pcDNA3.1(+) eGFP

sử dụng Lipofectamin 3000. Sang ngày thứ hai, loại bỏ hoàn toàn môi trường nhiễm và hoà lại các tế bào trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10 % FBS, 1 % kháng sinh P/S. Sang ngày thứ ba, loại bỏ môi trường RPMI cũ và thay bằng môi trường RPMI chọn lọc có chứa kháng sinh G418 500 µg/mL. Sau khoảng 10-14 ngày, thu được dòng tế bào sau chuyển gen HEK293-eGFP và đem kiểm tra khả năng chuyển gen vào tế bào bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng thu 485 nm và bước sóng phát 515 nm. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi huỳnh quang được phân tích bằng phần mềm imageJ, 3 điểm trong mỗi giếng tế bào được chụp và phân tích.

Chọn lọc dòng tế bào chuyển gen

Dòng tế bào chuyển gen HEK293-eGFP được chọn dòng bằng cách sử dụng kháng sinh G418 ở các nồng độ khác nhau. Tế bào được chia vào đĩa 96 giếng (SPL, Hàn Quốc) với mật độ 10⁴ tế bào/giếng 100 µL môi trường RPMI bổ sung 10 % FBS, 1 % kháng sinh Penicillin/Streptomycin và kháng sinh G418 ở các nồng độ 500 µg/mL, 600 µg/mL; 700 µg/mL, các giếng lập lại 3 lần. Sau 24 giờ, tế bào được kích thích bằng dioxin. Sau 72 giờ, đem tế bào kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Bước đầu thử nghiệm dòng tế bào chuyển gen với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn

Ngưỡng phát hiện là nồng độ tối thiểu (bậc pha loãng tối đa) của chất phân tích mà tại đó dòng tế bào phát hiện được. Để xác định ngưỡng phát hiện của dòng tế bào chuyển gen HEK293-eGFP, chất chuẩn B[a]P và TCDD được pha loãng trong dải nồng độ xác định. Dòng tế bào HEK293-eGFP được chia vào đĩa 96 giếng (SPL, Hàn Quốc) với mật độ 5x10⁴ tế bào/giếng 100 µL môi trường RPMI bổ sung 10 % FBS, 1 % kháng sinh Penicillin/Streptomycin, các giếng lập lại 3 lần. Sau 24 giờ, cho tế bào tiếp xúc với TCDD và B[a]P chuẩn ở các nồng độ đã pha loãng. Ủ tế bào với các chất trong 24 giờ. Mức độ phát huỳnh quang GFP được đo ở máy Synergy HT Microplate Reader.

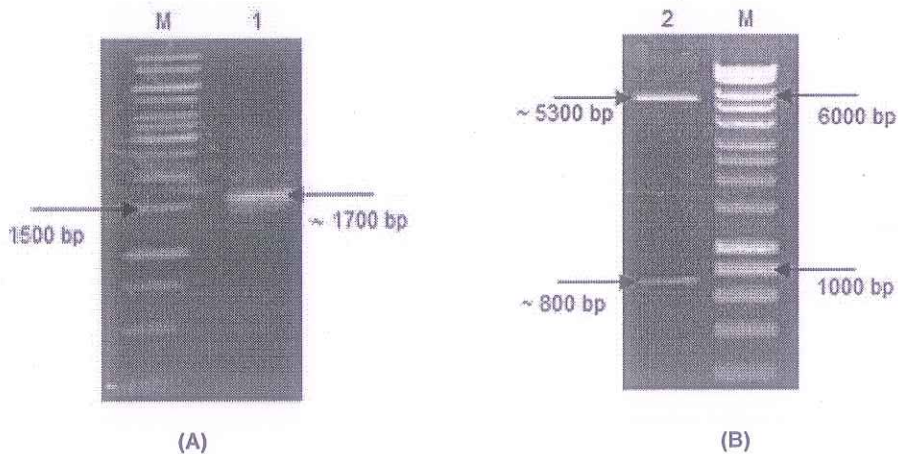
Xử lý số liệu

Các số liệu thống kê và hình ảnh thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, imageJ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo vector biểu hiện tạm thời mang cấu trúc DRE và gen phát quang GFP

Gen DRE được khuếch đại bằng PCR như đã mô tả ở phần phương pháp. Vector pcDNA3.1(+) eGFP được cắt mở vòng bằng 2 enzyme BglII và SacI. Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 %. Kết quả thể hiện trên Hình 1.



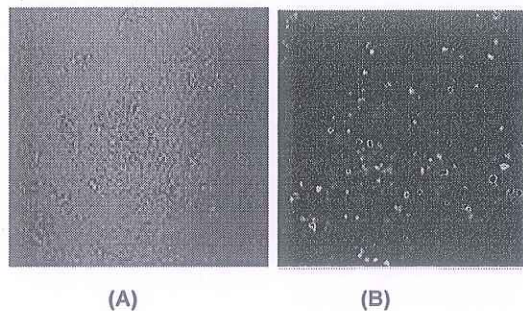
Hình 1. Kết quả khuếch đại gen DRE và sản phẩm cắt mở vòng plasmid pcDNA3.1(+) eGFP
 (A) Kết quả khuếch đại gen DRE. Đường chạy (ĐC) M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); ĐC 1: Sản phẩm nhân gen DRE; (B) Kết quả cắt mở vòng plasmid pcDNA3.1(+) eGFP. ĐC M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Fisher Scientific); ĐC 2: sản phẩm cắt bằng BglII và SacI

Kết quả nhân gen thu được 1 băng có kích thước khoảng 1700 bp, tương ứng với kích thước của gen DRE theo lý thuyết là 1679 bp. Như vậy, chúng tôi đã nhân bản thành công gen DRE. Vector pcDNA3.1(+) eGFP sau cắt thu được 2 băng kích thước khoảng 800 bp và 5300 bp, tương ứng với kích thước 2 đoạn cắt theo lý thuyết là 806 bp của promoter CMV và 5312 bp của đoạn cắt còn lại chứng tỏ chúng tôi đã cắt thành công. Để khẳng định chắc chắn gen được gắn vào là DRE, chúng tôi tiến hành giải trình tự theo phương pháp Sanger. So sánh trình

tự đoạn gen thu được với trình tự *DRE* gốc và kiểm tra các cấu trúc hỗ trợ biểu hiện gen eGFP đã khớp (dữ liệu không trình bày ở đây), như vậy chúng tôi có thể khẳng định đã gắn thành công gen *DRE* vào vector pcDNA3.1(+)-eGFP thay thế cho vùng promoter CMV.

Kết quả chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+)-eGFP vào dòng tế bào HEK293

Các tế bào HEK293 được chuyển plasmid tái tổ hợp DRE-pcDNA3.1(+)-eGFP bằng môi trường OptiMEM, sử dụng Lipofectamin 3000 tạo thành tế bào chuyển gen HEK293-eGFP. Sau khi chuyển gen, kích thích với dioxin, các tế bào được soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

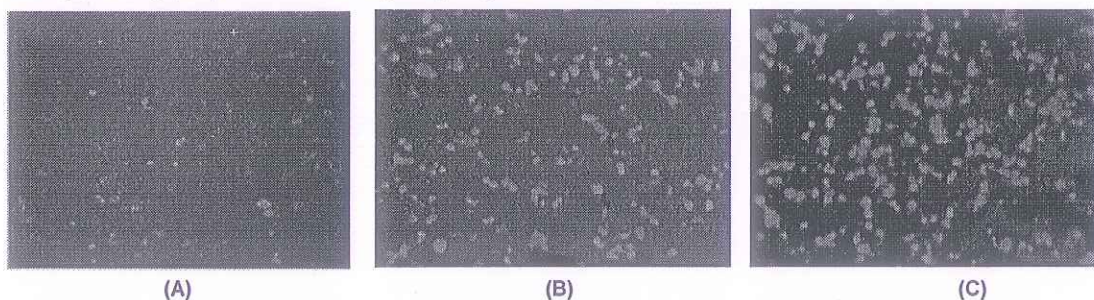


Hình 2. Kết quả chụp ảnh tế bào HEK 293 sau khi chuyển plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+)-eGFP. (A) Tế bào chuyển gen dưới kính hiển vi thường; (B) Tế bào chuyển gen dưới kính hiển vi huỳnh quang

Kết quả thu được cho thấy ở bước sóng thu 485 nm và bước sóng phát 515 nm, xuất hiện các tế bào phát sáng màu xanh và các tế bào không phát sáng. Các tế bào phát sáng xanh là các tế bào có biểu hiện protein GFP. Điều này chứng tỏ đã plasmid DRE-pcDNA3.1(+)-eGFP đã được chuyển vào tế bào HEK293 và tế bào đã biểu hiện thành công protein GFP. Dòng tế bào chuyển gen được phân tích, đánh giá hiệu suất chuyển gen thông qua sự biểu hiện của GFP, kết quả cho thấy dòng chuyển gen HEK293-eGFP có hiệu suất biểu hiện từ 40-50 % tùy vị trí.

Kết quả chọn lọc các dòng tế bào chuyển gen

Kháng sinh G418 theo hướng dẫn của hãng Gibco có nồng độ dùng cho tế bào động vật 200-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Migone và cộng sự đã tạo tế bào chuyển gen trên dòng tế bào HEK293F sử dụng vector pcDNA3.1 với nồng độ G418 ở 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Migone *et al.*, 2002). Wen và cộng sự cũng lựa chọn nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho dòng tế bào chuyển gen HEK293F với vector pcDNA3.1 (Wen *et al.*, 2003). Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ làm nồng độ kháng sinh chọn lọc khi chuyển gen. Với mong muốn thu được tỷ lệ phát quang GFP cao hơn, chúng tôi tiến hành tăng nồng độ kháng sinh lên 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ để chọn lọc dòng tế bào. Kết quả phân tích bằng phương pháp kính hiển vi huỳnh quang như Hình 3.



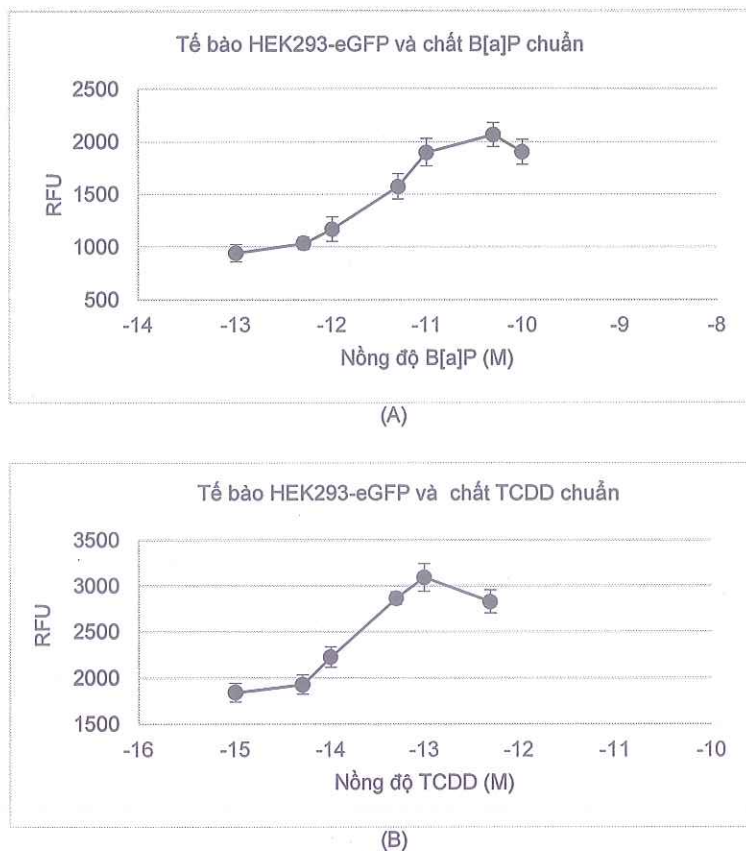
Hình 3. Hình ảnh tế bào HEK293-eGFP sau khi chọn dòng bằng tăng cường nồng độ kháng sinh G418 khác nhau.

(A) Nồng độ G418 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (B) Nồng độ G418 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (C) Nồng độ G418 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Kết quả ảnh chụp và phân tích bằng phần mềm imageJ cho thấy tỷ lệ phát quang GFP tỷ lệ thuận với nồng độ kháng sinh và đạt 80-90 % ở nồng độ 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Do đó, nồng độ kháng sinh G418 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được lựa chọn để duy trì và nuôi dòng tế bào HEK293-eGFP cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả bước đầu thử nghiệm dòng tế bào HEK293-eGFP với chất 2,3,7,8-TCDD và B[a]P chuẩn

Khi thử nghiệm dòng tế bào HEK293-eGFP với chất B[a]P chuẩn ở các nồng độ 10^{-13} , 5×10^{-13} , 10^{-12} , 5×10^{-12} , 10^{-11} , 5×10^{-11} , 10^{-10} M và chất TCDD chuẩn ở các nồng độ 10^{-15} , 5×10^{-14} , 10^{-14} , 5×10^{-13} , 10^{-13} , 5×10^{-12} M thu được kết quả như Hình 4.



Hình 4. Biểu đồ thể hiện kết quả đo tín hiệu huỳnh quang khi dòng tế bào HEK293-eGFP tiếp xúc với các chất chuẩn B[a]P và TCDD sau 24 giờ. (A) Tín hiệu huỳnh quang của tế bào HEK293-eGFP và B[a]P chuẩn; (B) Tín hiệu huỳnh quang của tế bào HEK293-eGFP và BaP. (Giá trị nồng độ trên biểu đồ được biểu diễn ở dạng LogX: X là nồng độ của các chất)

Kết quả thu được cho thấy ở các nồng độ của chất B[a]P nghiên cứu, tín hiệu huỳnh quang tăng tuyến tính trong khoảng nồng độ (10^{-13} M đến 5×10^{-11} M) và giảm độ phát quang ở nồng độ 10^{-10} M. Có sự giảm tín hiệu huỳnh quang có thể do ở nồng độ 10^{-10} M đã ảnh hưởng đến tế bào, gây ức chế sự biểu hiện của GFP. Từ đường cong tín hiệu huỳnh quang, ngưỡng phát hiện của dòng tế bào với chất B[a]P ở nồng độ khoảng 10^{-13} M. Pieterse và cộng sự đã tạo dòng tế bào ổn định H411e-pDREtataLuc ở chuột có ngưỡng phát hiện $5,2 \times 10^{-11}$ M B[a]P (Pieterse *et al.*, 2013). Đối với chất TCDD, ở các nồng độ nghiên cứu, tín hiệu huỳnh quang tăng dần từ (10^{-15} - 10^{-13} M) và ở 5×10^{-13} M. Ngưỡng phát hiện TCDD đối với dòng tế bào ở nồng độ 10^{-15} M. Theo Han và cộng sự (2004) đã công bố dòng tế bào luciferase H1L1.1c2 và dòng tế bào phát quang GFP H1G1.1c3 ở chuột có ngưỡng phát hiện nằm trong khoảng 10^{-13} - 10^{-12} M TCDD (Han *et al.*, 2004). So với các nghiên cứu trước đây, ngưỡng phát hiện của dòng tế bào HEK293-eGFP thấp hơn. Ngoài ra, ngưỡng phát hiện ở chất TCDD thấp hơn B[a]P là do TCDD có độc tính cao hơn và có ái lực mạnh hơn với thụ thể AhR trong tế bào nên chỉ cần ở nồng độ rất thấp TCDD đã kích thích tế bào cảm ứng, biểu hiện GFP. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Han và cộng sự công bố năm 2004 (Han *et al.*, 2004).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP chứa trình tự DRE và gen phát quang GFP. Tạo thành công dòng tế bào có chứa plasmid tái tổ hợp pDRE-cDNA3.1(+) eGFP, phát tín hiệu huỳnh quang khi tiếp xúc với chất TCDD và BaP chuẩn. Ngưỡng phát hiện của dòng tế bào chuyển gen đối với chất TCDD là 10^{-15} M và chất B[a]P là 10^{-13} M.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện từ Hợp phần 4 “Nghiên cứu tạo tế bào chuyển gen để ứng dụng phân tích sàng lọc dioxin”, mã số TDDIOX.04/22-24 thuộc Dự án Khoa học công nghệ trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu nguy cơ tích lũy dioxin trong chuỗi sản xuất thực phẩm phát sinh từ một số hoạt động kinh tế - xã hội”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn YB, Liu F, Fennell DE, Häggblom MM (2008) Biostimulation and bioaugmentation to enhance dechlorination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in contaminated sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 66(2): 271-281.
- Brennan JC, He G, Tsutsumi T, Zhao J, Wirth E, Fulton MH, Denison MS (2015) Development of Species-Specific Ah Receptor-Responsive Third Generation CALUX Cell Lines with Enhanced Responsiveness and Improved Detection Limits. *Environmental Science & Technology* 49(19): 11903-11912.
- Bystriakova M, Koshkin S, Tolkunova E (2019) Measurement of AhR Ligands in the Tissues of Colon Cancer Patients with XRE Luciferase Reporter. *Journal of Oncology Research* 1.
- Han D, Nagy SR, Denison MS (2004) Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists. *BioFactors* 20(1): 11-22.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(2): 189-204.
- Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7: 1-9.
- Li MC, Chen PC, Tsai PC, Furue M, Onozuka D, Hagihara A, Uchi H, Yoshimura T, Guo YL (2015) Mortality after exposure to polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans: A meta-analysis of two highly exposed cohorts. *International Journal of Cancer* 137(6).
- Nguyễn Ngọc Toàn (2016) Nghiên cứu phát hiện các hợp chất dioxin ở người phơi nhiễm chất da cam/ dioxin bằng kỹ thuật DR CALUX. *Luận văn Thạc sỹ. Viện Đại học Mở Hà Nội.*
- Nguyễn Thị Mơ (2014). Nghiên cứu ứng dụng phương pháp phân tích sàng lọc Calux trong đánh giá mức độ nhiễm dioxin trong môi trường tại một số khu vực ô nhiễm nặng ở Việt Nam và đề xuất giải pháp xử lý ô nhiễm tại khu vực này. *Luận văn Thạc sỹ. Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.*
- Pieterse B, Felzel E, Winter R, van der Burg B, Brouwer A (2013) PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environmental Science & Technology* 47(20): 11651-11659.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463-5467.
- Satsu H, Yoshida K, Mikubo A, Ogiwara H, Inakuma T, Shimizu M (2015) Establishment of a stable aryl hydrocarbon receptor-responsive HepG2 cell line. *Cytotechnology* 67(4): 621-632.
- Migone TS, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, Hong JS, Perry JW, Chen SF, Zhou JXH, Cho YH, Ullrich S, Kanakaraj P, Wei P (2002) TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*, 16(3).
- Wen L, Zhuang L, Luo X, Wei P (2003) TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(40): 39251-39258.
- Yi T, Wang J, Zhu K, Tang Y, Huang S, Shui X, Ding Y, Chen C, Lei W (2018) Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International* 2018: 6058784.

CONSTRUCTION OF TRANSFECTED CELL TO DETECTING AND ANALYZING DIOXIN OR DIOXIN-LIKE COMPOUNDS

Nguyen Thu Trang^{1,2}, Tran Manh Hai¹, Le Thi Minh Phuc¹, Nguyen Trong Linh¹, Nguyen Thi Da¹, La Thi Huyen^{1,2,*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology.

²Graduate University of Sciences and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology.

SUMMARY

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, dioxin) and dioxin-like compounds are common and long-lived pollutants in environment. These substances affect living organisms and biological effects through their ability to bind to and activate Aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cells. In recent years, reporter gene assays have been widely used for analyzing dioxin and dioxin-like compounds in biological, environmental, food, and feed samples, given that fast detection and low cost. The cell-based reporter gene bioassay system has been developed including the CALUX (Chemical Activated Luciferase gene eXpression) and the CAFLUX (Chemical Activated Fluorescent eXpression) bioassays, which utilize recombinant cell lines containing the firefly luciferase reporter gene (CALUX) or the GFP reporter gene (CAFLUX) that respond to the AhR receptor. In this report, based on the principle of CAFLUX assays, we cloned the *CYP1A1* promoter which is dioxin response

element (DRE) from the plasmid XRE-pNL1.3 [secNLuc] and attached it to the expression vector pcDNA3.1(+) eGFP to construct the recombinant vector pDRE-cDNA3.1(+) eGFP carrying the *GFP* gene sequence. Then, the recombinant vector was transferred into the HEK293 cell line to generate the HEK293-eGFP cell line. The successfully transfected cell line was incubated with standard TCDD and B[a]P, result to express GFP protein. The limit of detection of the obtained cell line was 10^{-15} M for TCDD and 10^{-13} M for B[a]P.

Keywords: CALUX, CAFLUX, dioxin, reporter gene, transfected cell line.

*Author for correspondence: Tel: +84-9-82141298; Email: lthuyen@ibt.ac.vn