

TẠO DÒNG TẾ BÀO CẢM BIẾN SINH HỌC VỚI CÁC CHẤT DIOXIN TỪ TẾ BÀO H4IIE

Nguyễn Minh Phương^{1,*}, Đỗ Minh Trung²

TÓM TẮT: Các chất Dioxin tác dụng lên tế bào thông qua hoạt động của protein đặc hiệu aryl hydrocarbon receptor (AhR) có trong bào tương và vùng DRE trên DNA trong nhân có nhiệm vụ đóng mở hoạt động của nhiều gen liên quan. Dựa trên cơ chế này, chúng tôi đã sử dụng dòng tế bào H4IIE có biểu hiện AhR trong bào tương để tạo dòng tế bào cảm biến sinh học với các chất Dioxin bằng cách biến nạp plasmid pGudluc1.1 vào tế bào. Plasmid pGudluc1.1 có chứa đoạn DRE là nơi gắn đặc hiệu với AhR khi có mặt Dioxin và nằm trên vùng khởi động tổng hợp protein luciferase. Bằng cách đo hoạt độ luciferase chúng tôi sẽ đánh giá được nồng độ các chất Dioxin khi tiếp xúc với tế bào cảm biến sinh học này. Kết quả nghiên cứu cho thấy đã tạo được dòng tế bào cảm biến sinh học từ tế bào H4IIE có độ nhạy cao với các chất Dioxin và có thể được ứng dụng để nghiên cứu phát hiện các chất Dioxin trong các mẫu khác nhau.

Từ khóa: Dioxin, Tế bào H4IIE, Luciferase, Plasmid pGudluc1.1.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các chất Dioxin bao gồm rất nhiều đồng đẳng khác nhau, tuy nhiên đều có cơ chế chung khi tác dụng lên tế bào đó là thông qua một protein đặc hiệu là AhR. Khi có mặt của các chất Dioxin, AhR sẽ gắn đặc hiệu với Dioxin và tạo ra phức hợp Dioxin/AhR, phức hợp này sẽ di chuyển vào nhân tế bào, trong nhân tế bào AhR sẽ được gắn với protein chuyển nhân Arnt sau đó gắn với đoạn DNA đặc hiệu (DRE) tạo thành phức bộ AhR/Arnt/DRE. Do DRE nằm trong vùng khởi động của nhiều gen khác nhau nên khi hình thành phức bộ AhR/Arnt/DRE một loạt các gen khác nhau sẽ được kích hoạt tăng biểu hiện và gây nên những biến đổi sinh học trong tế bào [3], [4].

Ứng dụng cơ chế này, plasmid pGudluc1.1 được thiết kế có đoạn DRE nằm trên vùng khởi động của gen tổng hợp luciferase, sau đó sẽ được biến nạp vào trong một dòng tế bào có protein AhR.

Khi đó, sự có mặt Dioxin sẽ kích hoạt tổng hợp luciferase và hoạt độ của luciferase sẽ tỷ lệ thuận với nồng độ của các chất Dioxin, qua đó chúng ta có thể tính toán được nồng độ các chất Dioxin mà tế bào tiếp xúc. Dòng tế bào có chứa plasmid này được gọi là tế bào cảm biến sinh học với các chất Dioxin và có thể được ứng dụng trong phát hiện sàng lọc sự có mặt của Dioxin trong các mẫu khác nhau.

Nhằm mục tiêu tạo được dòng cảm biến sinh học phát hiện Dioxin, chúng tôi đã sử dụng một dòng tế bào H4IIE có nguồn gốc từ gan chuột cống để biến nạp plasmid pGudluc1.1.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Dòng tế bào H4 II EC3 (hãng ATCC, Mỹ cung cấp), plasmid pGudluc1.1 - 7397bp (Dr. Denison - UC Davis, Mỹ) được sử dụng để tạo mô hình thí nghiệm.

Hóa chất, dụng cụ, thiết bị và vật tư tiêu hao: Môi trường EMEM (Eagle Minimal Essential Medium), FBS (Fetal Bovine Serum) (ATCC, Mỹ), Penicillin-Streptomycin, D-PBS, Trypsin/EDTA 0,25,

¹Bộ môn Y học Quân binh chủng, Học viện Quân y

²Trung tâm Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Minh Phương

Email: phuongk21@yahoo.com

Glutamine, G418 (Sigma, Mỹ), TCDD chuẩn (Waters, Mỹ) - được cung cấp kèm theo hợp đồng mua máy GC-MS), Aceton, N-Hexan (loại dùng cho GC-MS), dimethyl sulfoxide (DMSO), Tris, HCl, EDTA, NaOH, SDS, CH₃COOH, Ethanol. Chai nuôi cấy T75, pipet nhựa (Corning, Mỹ) và các hóa chất vật tư khác được cung cấp từ các hãng có uy tín trên thế giới.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Giải đông và tăng sinh tế bào

Tế bào H4IIE có nguồn gốc từ tế bào gan chuột cống H4 II EC3 (hãng ATCC, Mỹ cung cấp) được lấy ra bình bảo quản -196°C rồi đặt vào bể ổn nhiệt, nhiệt độ 37°C, thời gian khoảng 2 phút. Vô trùng tube tế bào bằng Ethanol 70%, hút dịch tế bào chuyển vào ống lâm. Cặn tế bào thu được sau khi ly tâm thu cho vào môi trường nuôi cấy EMEM bổ sung 10% FBS, 1 % kháng sinh, nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂. Tế bào tăng sinh che phủ khoảng 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành hút loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, rửa sạch lớp tế bào, thêm 2,0-3,0 ml trypsin-EDTA để ở 37°C và quan sát các tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược cho đến khi lớp tế bào được phân tách (thường là trong vòng 5-15 phút). Thêm 6,0-8,0 ml môi trường nuôi cấy và hút tế bào nhẹ nhàng bằng pipet. Ly tâm và rửa 3 lần bằng D-PBS, hoàn nguyên tế bào bằng môi trường nuôi cấy, chia tế bào ra làm nhiều đĩa nuôi cấy mới, để ở 37°C, 5% CO₂ [1].

2.2.2. Biến nạp Plasmid vào tế bào H4IIE

Qui trình biến nạp DNA vào tế bào H4IIE được thực hiện theo phương pháp Lipofectamine: Plasmid pGudLuc 1.1, plasmid pSVneo sau khi được biến nạp vào E.coli DH 5α, nuôi cấy E.coli DH 5α và tách plasmid. Plasmid sau khi tách chiết được chuẩn bị ở nồng độ 4μg sử dụng cho biến nạp vào tế bào H4IIE. Tế bào H4IIE được nuôi cấy trong môi trường EMEM có

10% FBS, 1% kháng sinh, tế bào phát triển đạt mật độ từ 60-80% diện tích bề mặt nuôi cấy thì tiến hành thí nghiệm. Thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường Opti-MEM, cho DNA plasmid và lipofectamine vào Opti-MEM, rồi trộn hỗn hợp DNA plasmid và lipofectamine, ủ ở nhiệt độ phòng, để tạo ra tủa DNA-lipofectamine. Nhỏ dung dịch chứa kết tủa DNA-lipofectamine vào đĩa nuôi cấy tế bào tới khi kết thúc và nuôi cấy tiếp ở 37°C, 5% CO₂. Sau 4-6 giờ thay môi trường không có kháng sinh và tiếp tục nuôi tế bào. Sau 2-3 ngày có thể đem tế bào đi phân tích sự biểu hiện luciferase bằng phản ứng đo hoạt độ enzym luciferase sau khi tiếp xúc với chất chuẩn TCDD [7].

2.2.3. Phản ứng đo hoạt độ enzym luciferase sau khi cho tế bào tiếp xúc TCDD hoặc DMSO để chọn dòng tế bào chứa pGudLuc1.1.

Tế bào sau khi được chuyển gen được nuôi cấy trong đĩa nuôi 24 giếng. Khi tế bào tăng sinh chiếm khoảng 60 -80 % diện tích bề mặt, TCDD (nồng độ 1nM) hoặc DMSO được đưa vào môi trường nuôi cấy (với mỗi dòng tế bào 3 giếng được cho TCDD và 3 giếng được cho DMSO). Sau 24 giờ, môi trường nuôi cấy chứa TCDD hoặc DMSO được loại bỏ, rửa tế bào bằng PBS 3 lần, sau đó tế bào sẽ được phá vỡ bằng 150μl mammalian cell lysis buffer (Sigma). 20 μl dịch tế bào sẽ được làm phản ứng luciferase bằng cách hòa loãng với 100 μl luciferase assay reagent (Sigma). Cường độ ánh sáng sẽ được đo trên máy lucinometer LB 960 Centro. Hoạt độ luciferase sẽ được chuẩn hóa theo nồng độ protein, đơn vị là RLU/μg protein (reactive light unit/μg protein). Nồng độ protein được xác định theo phương pháp BCA assay sử dụng BCA assay reagents với chất chuẩn là BSA.

2.2.4. Xác định khoảng thời gian tối ưu thu tế bào sau khi tiếp xúc với chất chuẩn để thực hiện phản ứng đo hoạt độ enzym luciferase

Tế bào cảm biến H4Ile tạo được sẽ được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng. Khi đạt độ che phủ 80% cho tế bào tiếp xúc với chất chuẩn TCDD nồng độ 1nM hoặc DMSO làm nhóm chứng.

Tế bào được thu hoạch tại các thời điểm khác nhau sau khi cho tiếp xúc với TCDD hoặc DMSO. Các thời điểm thu hoạch tế bào là sau 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 24h và 32h. Sau khi thu hoạch, tế bào được phá vỡ thu protein và thực hiện phản ứng luciferase như nêu tại mục 2.2.3. Tính số lần tăng hoạt độ luciferase ở tế bào tiếp xúc với TCDD so với DMSO tại mỗi thời điểm.

Tại mỗi thời điểm thu tế bào sau tiếp xúc với TCDD hoặc DMSO đều được thực hiện trong 3 giếng khác nhau (ví dụ: tại thời điểm thu tế bào lúc 2h sau tiếp xúc có 3 giếng TCDD và 3 giếng DMSO).

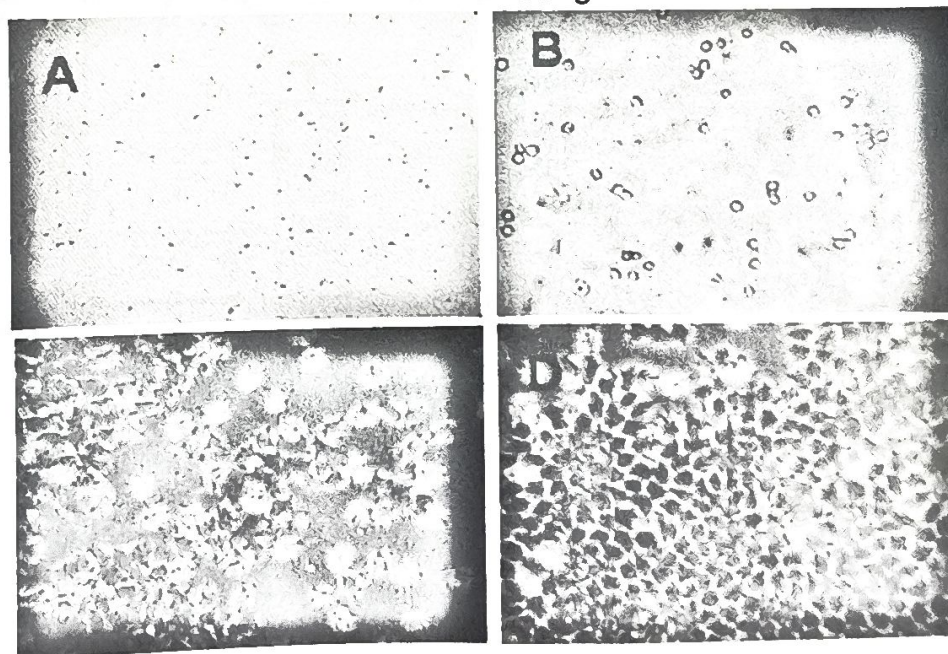
2.2.5. Xác định ngưỡng phát hiện TCDD của dòng tế bào cảm biến tạo được

Nuôi cấy tế bào cảm biến có chứa plasmid pGudluc1.1 tạo được trong đĩa nuôi cấy 24 giếng. Khi tế bào đạt đến mật độ 80%, cho tế bào tiếp xúc với TCDD ở nhiều nồng độ khác nhau: 0,1pM, 1pM, 10pM, 100pM, 1nM, 5nM, 10nM và 20nM. Tại mỗi nồng độ thực hiện ở 3 giếng khác nhau. Sau 24 giờ, thu tế bào và thực hiện phản ứng đo hoạt độ enzym luciferase như đã mô tả ở mục 2.2.3.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào H4Ile

Sau khi tế bào ở dạng đông lạnh, tiến hành giải đông và hoàn nguyên nuôi cấy phục hồi tế bào. Với dòng tế bào H4Ile sử dụng môi trường nuôi cấy là DMEM và cũng được bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh, 1% L-glutamin, nuôi cấy ở 37°C và 5% CO₂. Một số hình ảnh nuôi cấy phục hồi sau ra đông của dòng tế bào thể hiện trong hình sau:



Hình 1: Hình ảnh về nuôi cấy tế bào H4Ile.

(A: tế bào H4Ile lúc bắt đầu nuôi cấy; B: tế bào sau 24 giờ; C: tế bào H4Ile 6 ngày nuôi cấy; D: tế bào H4Ile sau 8 ngày nuôi cấy)

Kết quả sau khi giải đông nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào H4Ile: quan sát dưới kính hiển vi kết quả cho thấy sau 24 giờ tế bào

bắt đầu bám dính trên bề mặt đĩa nuôi cấy, cho đến ngày thứ 3 trở đi tế bào bắt đầu tăng sinh, kết quả đến ngày thứ 8 tế

bào che phủ khoảng 60-80% diện tích bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển và bảo quản tế bào để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Về hình thái, đặc điểm dòng tế bào này khi nuôi cấy có dạng điển hình là hình đa diện và khả năng bám dính tốt trên bề mặt đĩa nuôi cấy.

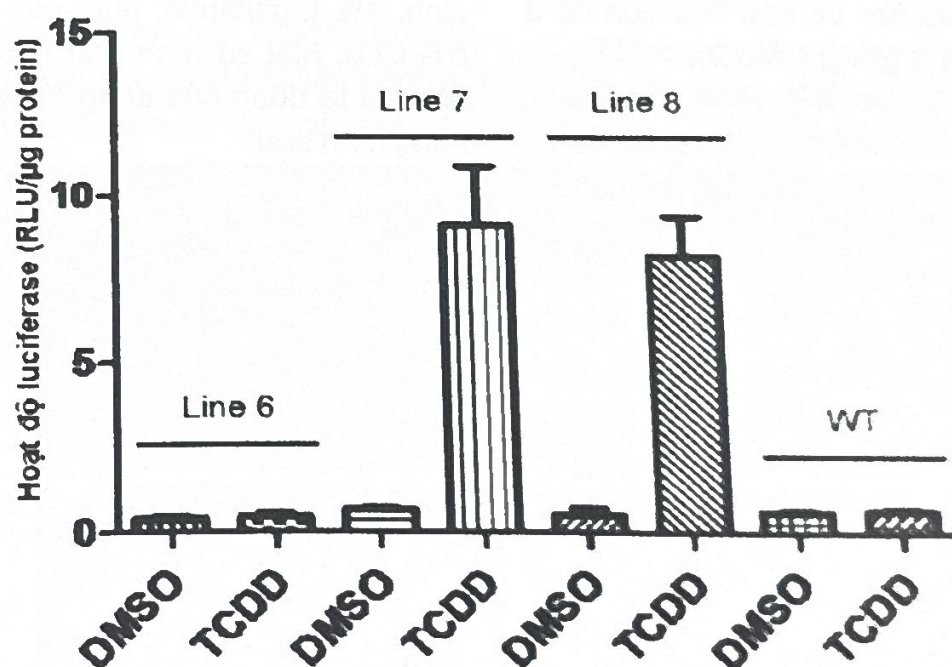
Sau khi tế bào đạt mật độ khoảng 80%, tế bào bắt đầu được chia ra thành 3 bình nuôi cấy mới. Tế bào được duy trì ổn định bằng cách thay môi trường mới, trung bình 3 ngày một lần. Sau khi cấy chuyển 2 – 4 thế hệ một nửa số tế bào đã được giữ dòng, bảo quản trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% DMSO, giữ ở -196°C bảo quản trong nitơ lỏng.

Để đánh giá việc bảo quản tế bào tốt, mỗi dòng một ống tế bào được bảo quản trong nitơ lỏng ra và tiến hành rã đông, nuôi cấy phục hồi. Kết quả là tế bào phát

triển trở lại bình thường chỉ sau 3 ngày nuôi phục hồi. Như vậy, việc nuôi cấy ổn định và lưu giữ bảo quản dòng tế bào H4Ile đã được thực hiện thành công. Các tế bào này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả chọn các dòng tế bào H4Ile có chứa pGudluc1.1

Sau khi biến nạp plasmid pGudluc1.1 vào tế bào H4Ile, chúng tôi đã tiến hành chọn được 3 dòng tế bào H4Ile có ký hiệu là line 6, line 7, line 8 để nuôi cấy tăng sinh và tiếp tục tiến hành thực hiện phản ứng đo hoạt độ enzym luciferase sau khi cho các dòng tế bào tiếp xúc với chất chuẩn TCDD. Kết quả được thể hiện trên hình sau:



Hình 2. Hoạt độ luciferase của 3 dòng tế bào H4Ile được biến nạp plasmid pGudluc1.1 (line 6, line 7, line 8) và tế bào H4Ile không được biến nạp plasmid (WT)

Kết quả trên hình 3.2 cho thấy, hoạt độ enzym luciferase tăng cao (12-13 lần) ở hai dòng tế bào H4Ile-line 7 và -line 8 sau khi cho tế bào tiếp xúc với TCDD (nồng độ 1nM trong 24 giờ) so với tiếp xúc DMSO. Đối với dòng tế bào H4Ile-line 6 và dòng tế bào H4Ile không được biến nạp plasmid

(WT) không thấy có sự thay đổi hoạt độ enzym luciferase sau khi cho tế bào tiếp xúc với TCDD. Như vậy, chỉ có hai dòng tế bào H4Ile-line 7 và -line 8 được biến nạp thành công plasmid pGudluc1.1. Hai dòng tế bào này có sự tăng mạnh biểu hiện luciferase sau khi cho tế bào tiếp xúc

với TCDD và được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm ứng dụng trong phát hiện sàng lọc các chất Dioxin.

Các nghiên cứu trước đây đã tiến hành biến nạp thành công plasmid pGudluc1.1 vào trong nhiều loại dòng tế bào động vật khác nhau như dòng tế bào HepG2, MCF7, LS180, GPC16. Các tác giả cũng cho thấy sau khi biến nạp, hoạt độ enzym luciferase tăng cao từ 7,6 – 66 lần khi cho tế bào tiếp xúc với TCDD (nồng độ 1nM trong 24 giờ) so với khi tiếp xúc với DMSO.

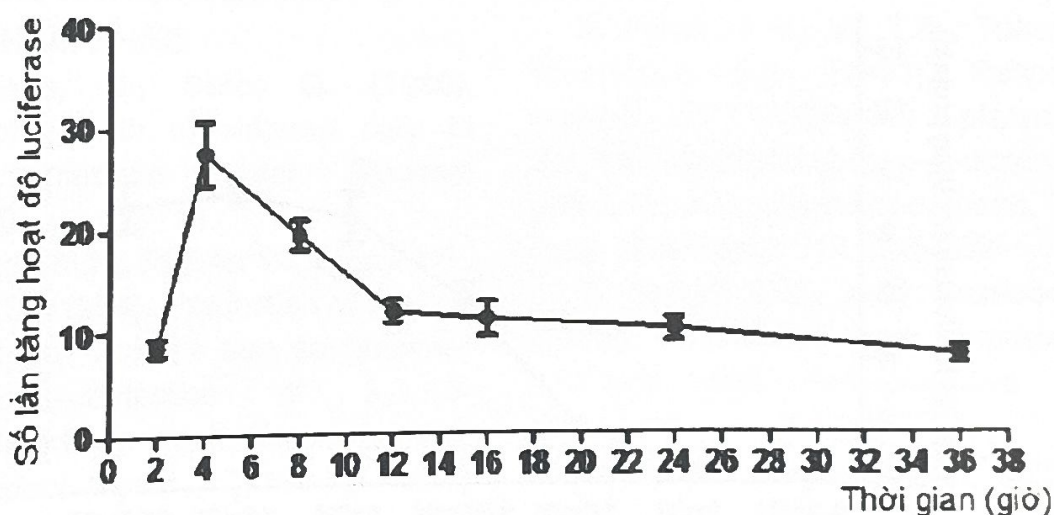
Trong nghiên cứu này của chúng tôi, số lần tăng hoạt độ luciferase của dòng tế bào H4Ile sau khi biến nạp pGudluc1.1 và chọn dòng vào khoảng 12 – 14 lần, sự tăng biểu hiện của luciferase sau khi tiếp xúc với TCDD như vậy là rất rõ rệt nên có thể được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Chúng tôi đã sử dụng hai dòng tế bào H4Ile-line 7 cho nghiên cứu tiếp theo là tìm khoảng thời gian tối ưu và ngưỡng phát hiện các chất Dioxin.

3.2. Kết quả xác định khoảng thời gian tối ưu thu tế bào sau khi cho tiếp xúc với chất chuẩn TCDD

Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy tế bào Helle-line7 trong đĩa nuôi cấy 24 giếng. Khi tế bào phát triển che phủ 80% bề mặt, chúng tôi đã cho tế bào tiếp xúc với TCDD ở nồng độ 1nM hoặc DMSO sau đó thu tế bào tại các thời điểm khác nhau từ 2h đến 36h. Mỗi thời gian thu tế bào đều được thực hiện trong 3 giếng nuôi cấy.

Kết quả độ tăng hoạt độ luciferase ở tế bào tiếp xúc với TCDD so với DMSO tại những thời điểm khác nhau được thể hiện trong hình sau:



Hình 3.3. Số lần tăng hoạt độ luciferase theo thời gian ở dòng tế bào H4Ile-line7

Kết quả nghiên cứu trên hình 3.3 cho thấy, với dòng tế bào H4Ile-line7, sự tăng hoạt độ luciferase sau tiếp xúc TCDD đã có thể được xác định rõ sau 2h, hoạt độ luciferase tăng cao nhất vào khoảng thời gian 4h, sau đó giảm dần và ổn định sau 12 giờ tiếp xúc với TCDD.

Theo chúng tôi, sau khi tế bào tiếp xúc với TCDD, con đường tín hiệu AhR sẽ được kích hoạt, phức bộ AhR/Arnt/DRE hình thành và kích hoạt mạnh sự tổng hợp luciferase. Sự tổng hợp này tăng dần và

đạt mức độ cao nhất vào thời điểm 4h sau tiếp xúc với TCDD. Tuy nhiên, cùng với quá trình này, thì luciferase cũng bị phân hủy bởi các protein trong tế bào, sự tăng tổng hợp luciferase cũng kích hoạt sự hoạt động các quá trình phân hủy protein luciferase. Do vậy, sau khi đạt đến nồng độ cao nhất, nồng độ luciferase bắt đầu giảm dần, cho đến khi có sự cân bằng giữa quá trình tổng hợp và phân hủy lúc đó nồng độ luciferase đạt mức độ ổn định. Đối với dòng tế bào chúng tôi tạo được thì

khoảng thời gian nồng độ luciferase đạt mức độ ổn định là khoảng 12 – 24 giờ sau tiếp xúc với TCDD.

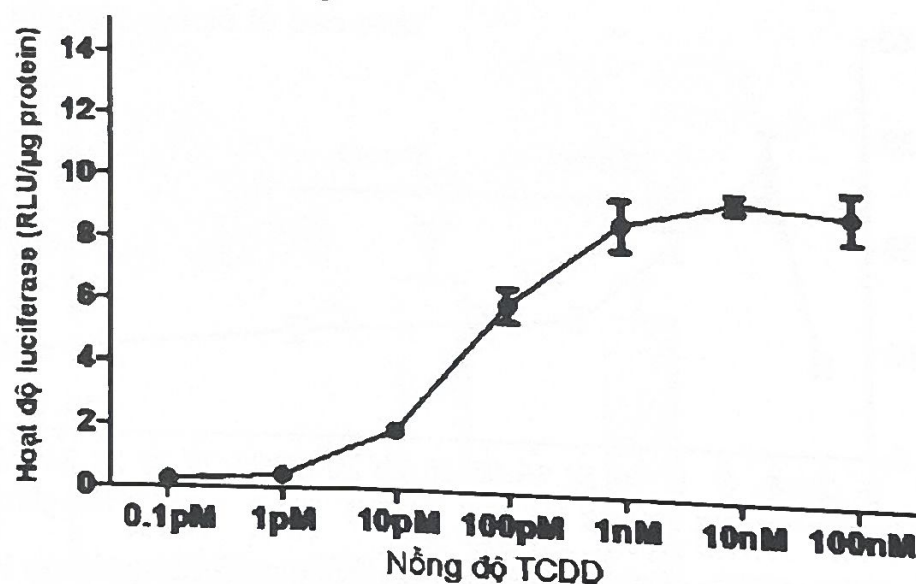
Nghiên cứu này của chúng tôi có khác so với nghiên cứu của tác giả Poslind và cs [6], theo nghiên cứu này tác giả đã tạo dòng tế bào có chứa pGudluc1.1 từ dòng tế bào ung thư gan). Tuy nhiên, khi nghiên cứu về sự tăng hoạt độ luciferase theo thời gian, tác giả không thấy có sự giảm nhanh hoạt độ luciferase sau khi đạt đỉnh. Theo chúng tôi, đây là dòng tế bào ung thư nên có lẽ nhiều chức năng của tế bào đã bị thay đổi trong đó có chức năng phân hủy protein luciferase.

Thời gian thu tế bào để đo hoạt độ luciferase khi xét nghiệm phát hiện Dioxin tốt nhất là khi sự tổng hợp và phân hủy đạt ở mức cân bằng, nồng độ luciferase trong tế bào ổn định nhất. Vì vậy, với hai dòng tế bào

chúng tôi tạo được, thời gian thu tế bào cho xét nghiệm Dioxin trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi lựa chọn là sau 24 giờ.

3.4. Kết quả nghiên cứu khoảng nồng độ phát hiện TCDD của dòng tế bào H4Ile-line7

Chúng tôi nuôi cấy dòng tế bào cảm biến tạo được H4Ile-line7 trong đĩa nuôi 24 giếng, sau đó cho tế bào tiếp xúc với TCDD ở những nồng độ khác nhau từ 0,1pM đến 100 nM trong thời gian 24 giờ. Hoạt độ luciferase ở mỗi nồng độ được thực hiện trong 3 giếng khác nhau. Hoạt độ luciferase được tính bằng giá trị đo được trừ đi giá trị nền (khi cho tế bào tiếp xúc DMSO). Kết quả được thể hiện trên hình 3.4.



Hình 3.4. Hoạt độ luciferase ở những nồng độ TCDD khác nhau khi ở tế bào H4Ile-line7

bào HepG2 và protein biểu hiện là luciferase, kết quả cũng cho thấy ngưỡng phát hiện tối thiểu là 1nM.

Kết quả nghiên cứu thể hiện trên hình 3.4 cho thấy, giới hạn phát hiện tối thiểu của dòng tế bào tạo được là khoảng 1pM, tại nồng độ này đã đo được sự thay đổi hoạt độ luciferase. Giới hạn phát hiện tối đa đối với 2 dòng tế bào là 1nM vì khi tăng nồng độ lên cao hơn thì hoạt độ luciferase cũng không thay đổi.

Một số tác giả khi nghiên cứu sử dụng protein biểu hiện khác không phải là luciferase đã cho kết quả ngưỡng phát hiện tối thiểu cao hơn. Nghiên cứu của Kennedy và cs. [5] khi sử dụng tế bào H4Ile và protein biểu hiện đo hoạt độ là CYP1A1 (EROD assay) cho thấy ngưỡng phát hiện tối thiểu là 10pM, nghiên cứu của El-Fouly và cs. [2] đã sử dụng tế bào

Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Poslind và cs. [6] khi nghiên cứu tạo dòng tế bào bằng tế

T13 với protein biểu hiện đo hoạt độ là alkaline phosphatase cho thấy ngưỡng phát hiện tối thiểu là 100pM. Như vậy, theo chúng tôi ngưỡng phát hiện tối thiểu phụ thuộc nhiều vào protein biểu hiện để đo hoạt độ trong phương pháp phát hiện được sử dụng. Khi sử dụng protein luciferase thì ngưỡng phát hiện tối thiểu khá thấp khoảng 1pM.

4. KẾT LUẬN

- Tạo dòng và nuôi cấy thành công dòng tế bào cảm biến sinh học với các chất Dioxin H4Ile-line7 trong môi trường EMEM có bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh, nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂.

- Ngưỡng phát hiện TCDD tối thiểu của dòng tế bào cảm biến sinh học H4Ile-line7 có là 1pM và có thể ứng dụng để nghiên cứu phát hiện sàng lọc các chất Dioxin có trong các mẫu sinh học khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnes, D., Sato, G. (1980), Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 102:255-270.
2. El-Fouly M.H., Richter C., Giesy J.P., Denison M.S. (1994), Production of a novel recombinant cell line for use as bioassay system for detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin like chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1581 – 1588.
3. Ma Q, Whitlock Jr JP. (1997), A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272:8878–84.
4. Nguyen, P. M., Wang, D., Wang, Y., Li, Y., Uchizono, J. A. and Chan, W. K. (2012), p23 co-chaperone protects the aryl hydrocarbon receptor from degradation in mouse and human cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 84, 838-50.
5. Kennedy S.W., Lorenzen A., James C.A., Collin B.T. (1993), Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader, *Anal. Biochem.*, 211, 102-112.
6. Postlind H., Vu T.P., Tukey R.H., Quattrochi L.C. (1993), Response of human CYP1-luciferase plasmids to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118, 255-262
7. Seidel D.S. and Denison M.S. (1999), Differential gene expression in wild-type and Arnt-Defective Mouse Hepatoma (Hepa1c1c7) Cells. *Toxicological Sciences* 52, 217-225.

SUMMARY

PRODUCTION OF DIOXIN BIOSENSOR CELL LINE BY USING H4IIE CELL LINE

Nguyen Minh Phuong¹, Do Minh Trung²

¹Department of Medicine of Arms, Vietnam Military Medical University

²Biomedical & Pharmaceutical Applied Research Centre, Vietnam Military Medical University

The dioxin compounds impact on the cell through a specific protein - aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cytoplasm and DRE domain of DNA, they regulate many different genes. Upon this mechanism we have done transferred plasmid pGudluc1.1 into H4Ile cell line expressed AhR protein in order to generate dioxin biosensor cell line. Plasmid pGudluc1.1 contains DRE domain that is located in the region of luciferase synthesis. We detect dioxin compounds by luciferase assay reaction right after biosensor cell line exposed to samples. The results showed that, a dioxin biosensor cell line was generated from H4Ile cell line and that can be applied in detection of dioxin compounds.

Keywords: Dioxin, H4Ile, Luciferase, pGudluc1.1 Plasmid.