

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN *nahC* MÃ HÓA 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase CỦA VI KHUẨN *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1

Lê Thị Hà Thanh*, Nguyễn Thị Ái Thoa, Nguyễn Thị Xuân, Trần Vũ Ngọc Thi

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Lê Thị Hà Thanh <lenthathanh@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 03-01-2024; Hoàn thành phản biện: 30-03-2024; Ngày chấp nhận đăng: 01-04-2024)

Tóm tắt. Các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp đã gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Naphthalene, hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng đơn giản nhất, được sử dụng như là hợp chất mô hình để nghiên cứu quá trình phân hủy sinh học ở vi khuẩn. Enzyme 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, enzyme phân cắt vòng benzen, chuyển hóa các hợp chất trung gian trong quá trình phân hủy naphthalene thành các hợp chất ít độc hơn. Trong nghiên cứu này, gen *nahC* mã hóa 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase từ vi khuẩn ưa nhiệt *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 được tạo dòng vào vector pGEM-T Easy. Sau khi xác nhận trình tự DNA chính xác, gen *nahC* được ghép nối vào vector biểu hiện pCold™ II và biến nạp vào vi khuẩn *Escherichia coli* BL21. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy gen *nahC* đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21 ở điều kiện cảm ứng 0,5 mM IPTG. Enzyme tái tổ hợp thu được có trọng lượng phân tử xấp xỉ 35 kDa. Kết quả này là cơ sở cho việc nghiên cứu tinh sạch và xác định các đặc tính của enzyme.

Từ khóa: tạo dòng, *nahC*, 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, *Paenibacillus*

Cloning and expression *nahC* gene encoding 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase of *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1

Le Thi Ha Thanh*, Nguyen Thi Ai Thoa, Nguyen Thi Xuan, Tran Vu Ngoc Thi

University of Science, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

* Correspondence to Le Thi Ha Thanh <lenthathanh@hueuni.edu.vn>

(Received: 03 January 2024; Revised: 30 March 2024; Accepted: 01 April 2024)

Abstract. Polycyclic aromatic hydrocarbon compounds used in many industries have caused environmental pollutions and left consequences to human health. Naphthalene, the simplest polycyclic aromatic hydrocarbon, is widely used as a model compound for biodegradation studies in bacteria. The 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, a benzene ring-cleavage enzyme, converts intermediate compounds in the naphthalene degradation pathway into less toxic compounds. In this study, the *nahC* gene encoding 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from the moderate thermophilic *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1 was cloned into pGEM-T Easy vector. Subsequently, the gene after confirming the correct DNA sequence was ligated into pCold™ II expression vector and transformed to *Escherichia coli* BL21. The SDS-PAGE results showed that the *nahC* gene was successfully expressed in *E.*

coli BL21 with 0.5 mM IPTG. The molecular weight of resulting recombinant enzyme was approximately 35 kDa. These results are the basis for enzyme purification and characterization.

Keywords: cloning, *nahC*, 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, *Paenibacillus*

1 Đặt vấn đề

Ô nhiễm môi trường do các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) ngày càng trở nên nghiêm trọng, do các hợp chất này được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau [1]. Các hợp chất PAH có khả năng hòa tan trong nước thấp, nên lắng đọng trong đất và trầm tích trong thời gian dài dẫn đến gây hại cho môi trường và sức khỏe con người [2]. Naphthalene, hợp chất thơm đa vòng đơn giản nhất, được Cơ quan Bảo vệ môi trường Mỹ phân loại là chất gây ô nhiễm độc hại [3]. Hợp chất này cũng được sử dụng như là hợp chất mô hình để nghiên cứu cơ chế phân hủy sinh học ở vi khuẩn [4].

Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để làm sáng tỏ các gen và enzyme liên quan đến quá trình phân hủy naphthalene cũng như các gen mã hóa chúng, nhưng chủ yếu được nghiên cứu rộng rãi ở các vi khuẩn ưa ấm (mesophiles). Sự phân hủy naphthalene được bắt đầu bằng việc oxy hóa naphthalene xúc tác bởi naphthalene 1,2-dioxygenase (NDO) (enzyme NahA), chuyển hóa naphthalene thành *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-naphthalene (DDNP). Tiếp theo, DDNP bị khử nước và chuyển thành 1,2-dihydroxy naphthalene (DHNP) bởi 1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-naphthalene dehydrogenase (enzyme NahB). Sau đó, DHNP bị phân cắt ở vị trí meta trên vòng benzen bởi enzyme cắt vòng, 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase (enzyme NahC), chuyển DHNP thành 2-hydroxychromene-2-carboxylic acid. Bước tiếp theo, các sản phẩm được chuyển hóa thành salicylate, và salicylate có thể bị phân hủy thông qua catechol hoặc gentisate [5-8].

Enzyme 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase (DHNDO) thuộc nhóm enzyme

dioxygenase xúc tác phản ứng phân cắt vòng thơm. Các enzyme này được chia thành hai nhóm, intradiol và extradiol, dựa vào cách phân cắt vòng của chúng. Enzyme DHNDO, thuộc nhóm extradiol, phân cắt vòng ở vị trí giữa một carbon đã được hydroxyl hóa và một carbon liền kề nó không hydroxyl hóa. Enzyme DHNDO chịu trách nhiệm cắt vòng thơm thứ nhất của 1,2-dihydroxynaphthalene [9].

Một số nghiên cứu về enzyme DHNDO đã được công bố, trong đó hầu hết là các loài thuộc chi *Pseudomonas* [10-15]. Enzyme DHNDO từ *P. putida* NCIB 9816 đã được tinh sạch và xác định hoạt tính, kết quả cho thấy enzyme này cần ion Fe²⁺ cho hoạt động. Enzyme DHNDO tinh sạch có thể xúc tác quá trình oxy hóa 1,2-hydroxynaphthalene, dẫn đến sự xuất hiện 2-hydroxychromene-2-carboxylic acid [10]. Kim và cs. đã tạo dòng gen *nahC* mã hóa DHNDO từ *P. fluorescens* SM11 để nghiên cứu cấu trúc, chức năng và cơ chế cảm ứng của enzyme. Kết quả cho thấy rằng gene *nahC* từ chủng SM11 được biểu hiện dị chủng trong *E. coli* nhưng ở mức độ yếu [11]. Enzyme DHNDO không chỉ tham gia vào quá trình chuyển hóa naphthalene mà còn xúc tác các phản ứng trung gian trong con đường phân hủy của nhiều hợp chất PAH khác; như carbaryl ở vi khuẩn *Pseudomonas* sp. C4, C5 và C6 [12], phenanthrene ở *Pseudomonas* sp. PP2 [13], naphthalenesulfonate ở *Pseudomonas* sp. BN6 [14] và *Sphingomonas xenophaga* BN6 [16], acenaphthylene ở *Stenotrophomonas* sp. RMSK [17], dibenzofuran và dibenzothiophene ở *Comamonas* sp. JB [18].

Cho đến nay đã có một vài nghiên cứu về quá trình phân hủy naphthalene cũng như enzyme DHNDO ở vi khuẩn ưa nhiệt (thermophiles), như *Geobacillus* sp. G27 chuyển hóa naphthalene thông

qua protocatechuic acid bằng con đường phân cắt *ortho*- khác với các con đường chuyển hóa đã biết ở vi khuẩn ưa ấm [19]. Enzyme DHNDO của *Geobacillus* sp. JF8 có trình tự amino acid tương đồng chỉ 20-22% với DHNDO của các vi khuẩn *P. putida* G7, *P. stutzeri* AN10, *Ralstonia* sp. U2 [20]. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã phân lập vi khuẩn ưa nhiệt *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 có khả năng phân hủy dibenzofuran và naphthalene [21], các gen liên quan đến quá trình phân hủy naphthalene ở chủng 4B1 có trình tự amino acid tương đồng 66-86% với cụm gen *nah* của chủng *Geobacillus* sp. JF8 [22]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen *nahC* mã hóa enzyme DHNDO, tạo cơ sở cho việc xác định, phân tích đặc tính của enzyme nhằm cung cấp thêm thông tin về các enzyme liên quan đến quá trình phân hủy naphthalene ở vi khuẩn ưa nhiệt.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Trình tự gen *nahC* mã hóa 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase từ genome của chủng vi khuẩn *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 (DDBJ: BJCS01000001-BJCS01000057) [18] được sử dụng để thiết kế mồi cho phản ứng PCR. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu được tổng hợp bởi công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam. Vector tạo dòng pGEM-T Easy (Promega, Mỹ), vector biểu hiện pCold™ II (Takara, Nhật Bản) và các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* TOP10, BL21 do phòng thí nghiệm Viện Nghiên cứu hoạt chất sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Tạo dòng gen *nahC* và phân tích trình tự DNA

Trên cơ sở trình tự DNA mã hóa 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase của chủng vi khuẩn 4B1, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen *nahC* từ DNA genome của vi khuẩn. DNA tổng số được tách chiết bằng CTAB theo phương pháp của Wilson có điều chỉnh [23]. Cặp mồi được bổ sung thêm trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *Bam*HI ở đầu 5' (mồi xuôi NahC_F: 5'-GGATCCTTGATTCTAAGACTGG-3') và *Sal*I ở đầu 3' (mồi ngược NahC_R: 5'-GTCGACAATCCATTGATTATTG-3') để thuận tiện cho việc ghép nối gen vào vector biểu hiện pCold™ II. Phản ứng PCR được thực hiện với thành phần: 0,5 µL Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 10 µL 5X Q5 Reaction Buffer, 10 µL 5X Q5 High GC Enhancer (New England BioLabs, Mỹ), 2,5 µL mỗi mồi (10 µM), 1 µL dNTP (10 mM), 50 ng DNA khuôn mẫu, bổ sung nước cất để đạt thể tích 50 µL. Phản ứng PCR được thực hiện với chương trình nhiệt như sau: 98°C/30 giây, 35 chu kỳ: 98°C/10 giây, 55°C/30 giây, 72°C/30 giây, hoàn chỉnh sản phẩm PCR ở 72°C/2 phút. Điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1%.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific, Mỹ). Sau đó, được gắn đuôi A bằng phản ứng gồm 25 µL sản phẩm PCR, 25 µL DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Mỹ), ủ ở 72°C trong 10 phút. Tiếp theo, tinh sạch một lần nữa bằng GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific, Mỹ) và tạo dòng vào vector pGEM-T Easy. Hỗn hợp dung dịch gắn được ủ ở nhiệt độ 24°C trong 2 tiếng, sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt [24]. Tế bào biến nạp được nuôi cấy chọn lọc trên môi trường LB rắn bổ sung 50 mg/L ampicillin trong 16 giờ ở 37°C. Sàng lọc các tế bào *E. coli* TOP10 mang plasmid tái

tổ hợp pGEM-T/*nahC* bằng phản ứng PCR khuôn lạc với cặp mồi đặc hiệu [25]. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen, Đài Loan) và kiểm tra bằng phương pháp enzyme cắt hạn chế. Trình tự DNA chính xác của gen *nahC* được xác nhận bằng phương pháp Sanger của công ty TNHH DNA Sequencing (Việt Nam) với hai mồi M13-F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' và M13-R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm SnapGene 7.1 (www.snapgene.com).

Ghép nối gen *nahC* vào vector biểu hiện

Gen *nahC* và vector pCold™ II lần lượt được cắt bằng hai enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sal*I (Thermo Scientific, Mỹ). Sản phẩm cắt được phân tách trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction kit. Tiến hành gắn gen *nahC* vào vector pCold™ II bằng T4 Ligase (Thermo Scientific, Mỹ), hỗn hợp gắn được ủ ở nhiệt độ 24°C trong 2 giờ, sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 khả biến và nuôi cấy chọn lọc thể biến nạp trên môi trường LB agar có bổ sung 50 mg/L ampicillin. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCold™ II/*nahC* bằng phản ứng PCR khuôn lạc và cắt với enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sal*I.

Biểu hiện gen *nahC*

Các plasmid tái tổ hợp pCold™ II/*nahC* sau khi tạo dòng thành công được tách chiết và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Tiếp theo, thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB rắn bổ sung 50 mg/L ampicillin, 50 mg/L streptomycin và 34 mg/L chloramphenicol. Tách chiết plasmid pCold™ II/*nahC* từ các khuẩn lạc *E. coli* BL21 bằng FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit và kiểm tra

sự hiện diện của gen *nahC* bằng phương pháp enzyme cắt hạn chế tương tự như trên.

Tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 mang vector biểu hiện pCold™ II chứa gen *nahC* được nuôi tăng sinh qua đêm trong 5 mL môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicillin, 50 mg/L streptomycin và 34 mg/L chloramphenicol ở 37°C, lắc ở tốc độ 190 vòng/phút. Sau 12-15 giờ, cấy chuyển 1 mL dịch nuôi cấy vào 50 mL môi trường LB lỏng bổ sung các loại kháng sinh tương tự. Tiếp tục nuôi cấy lắc 190 vòng/phút ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,5. Dịch nuôi cấy được làm lạnh ở 4°C trong 10 phút, sau đó được ủ ở 15°C trong 20 phút (không lắc). Bổ sung 0,5 mM IPTG và tiếp tục nuôi cảm ứng trong 24 giờ ở 15°C với tốc độ lắc 190 vòng/phút. Thu sinh khối tế bào vi khuẩn bằng cách ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút. Tái huyền phù tế bào với nước cất, bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo [26].

Điện di SDS-PAGE và phân tích Western blot

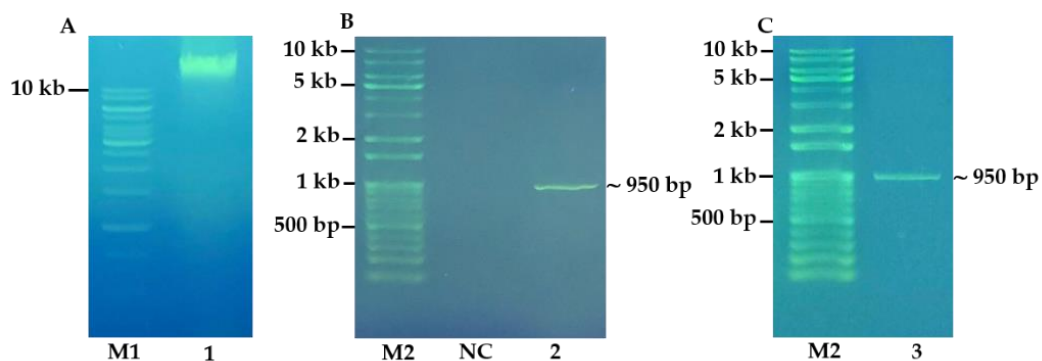
Các mẫu tế bào vi khuẩn được trộn với đệm SDS loading buffer 6X, biến tính ở 100°C trong 10 phút. Mẫu được nạp và các giếng trên gel polyacrylamide không liên tục (stacking gel 5%, separating gel 12%). Tiến hành điện di ở 60 V trong 30 phút và 80 V trong 1,5 – 2 giờ. Mẫu được phân tích trên hai gel polyacrylamide, một gel được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue R250 (Nacalai Tesque, Nhật Bản) trong 2 phút, sau đó rửa lại bằng đệm rửa. Gel còn lại được lai với màng nitrocellulose (Novex™ – Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trong đệm chuyển (50 mM Tris, 40 mM glycine, và 20% methanol) trong 3 giờ với cường độ dòng điện 145 mA bằng thiết bị Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Mỹ). Để tránh các liên kết không đặc hiệu, màng được xử lý bằng 5% skim milk (Himedia, Ấn Độ) pha trong đệm TBST (100 mM Tris pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20) trong 1 giờ

ở 37°C, có lắc nhẹ. Rửa màng bằng đệm TBST 3 lần, mỗi lần 15 phút. Sau đó, ủ màng với kháng thể thứ nhất (mouse anti-His tag antibody, BioLegend, Mỹ) được pha loãng với tỷ lệ 1:2000 trong đệm TBST chứa 5% skim milk trong 2 giờ ở 37°C, lắc nhẹ. Rửa màng với đệm TBST 3 lần, mỗi lần 15 phút. Ủ màng trong đệm TBST với 5% skim milk chứa kháng thể 2 (alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody, Enzo Life Sciences, Mỹ) tỷ lệ 1:5000 trong 2 giờ ở 37°C có lắc nhẹ. Sau khi rửa màng bằng đệm TBST 3 lần, cân bằng màng trong đệm TMN (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) trong 10 phút. Cuối cùng, phát triển màu bằng cách bổ sung cơ chất NBT/BCIP (BioFX, Mỹ), ủ trong tối 3 phút ở 37°C, lắc nhẹ [26, 27].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tạo dòng và phân tích trình tự gen *nahC*

Tạo dòng gen: Đoạn gen *nahC* được tổng hợp bằng phương pháp PCR dựa trên khuôn mẫu DNA genome (Hình 1A) của chủng *Paenibacillus naphthalene* 4B1 với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy chỉ có 1 băng DNA đặc hiệu với kích thước khoảng 950 bp phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết (Hình 1B). Sản phẩm PCR sau tinh sạch (Hình 1C) đảm bảo về nồng độ và độ sạch được gắn thêm đuôi A và sử dụng để tạo dòng vào vector pGEM-T Easy.

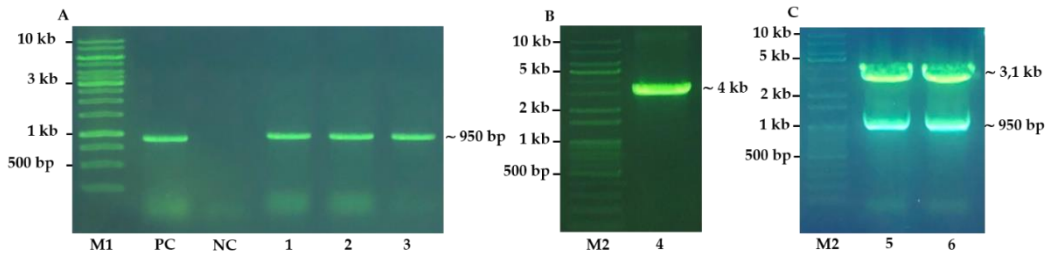


Hình 1. Khuếch đại PCR và tinh sạch gen *nahC*. M1: thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific); M2: thang chuẩn DNA (1Kbp Plus 100 bp DNA Ladder Marker, Elpis Biotech); 1: DNA tổng số dùng làm khuôn mẫu (A); 2: sản phẩm khuếch đại gen *nahC* (B); 3: gen *nahC* sau khi tinh sạch (C)

Kết quả kiểm tra sự hiện diện của gen *nahC* trong thể *E. coli* TOP10 tái tổ hợp, đã được sàng lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (Hình 2A), bằng phản ứng cắt hạn chế DNA plasmid cho thấy xuất hiện 2 băng DNA có kích thước lần lượt xấp xỉ 3,1 kb và 950 bp tương ứng với kích thước lý thuyết của vector pGEM-T Easy và gen *nahC* (Hình 2C). Kết quả này cho thấy vector tái tổ hợp đã được biến nạp vào *E. coli*.

Giải trình tự gen: Sau khi tạo dòng đoạn gen *nahC* vào vector pGEM-T Easy, trình tự DNA của

nahC được xác định bằng phương pháp Sanger. Kết quả cho thấy trình tự gen *nahC* đã tạo dòng vào *E. coli* TOP10 tương đồng 100% với trình tự gen *nahC* của vi khuẩn *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 đã công bố trên DDBJ (BJCS01000005), chứng tỏ không có lỗi sai trong quá trình PCR gen *nahC*. Trình tự gen gồm có 954 bp (bao gồm trình tự cắt hạn chế) mã hóa cho 315 amino acid.



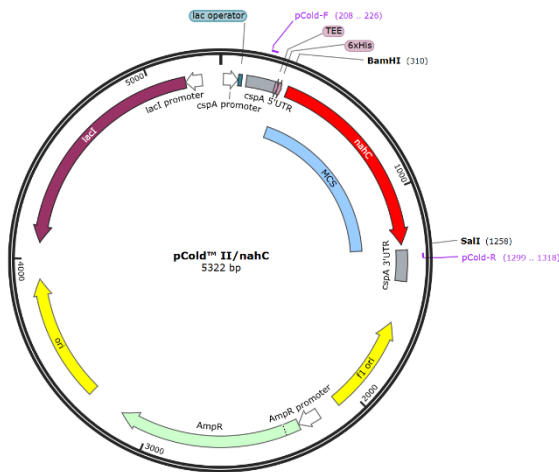
Hình 2. Kết quả tạo dòng gen *nahC* vào pGEM-T Easy. M1: thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific), M2: thang chuẩn DNA (1Kbp Plus 100 bp DNA Ladder Marker, Elpis Biotech). A: Khuếch đại PCR gen *nahC* từ khuẩn lạc *E. coli* TOP10 với cặp mồi đặc hiệu; PC: DNA genome; NC: *E. coli* không biến nạp; 1-3: các khuẩn lạc *E. coli* TOP10 biến nạp. B: Tách chiết plasmid pGEM-T Easy/*nahC* (4), C: Sản phẩm cắt hạn chế plasmid pGEM-T Easy/*nahC* bằng *Bam*HI và *Sal*I (5-6)

3.2 Ghép nối gen vào vector biểu hiện

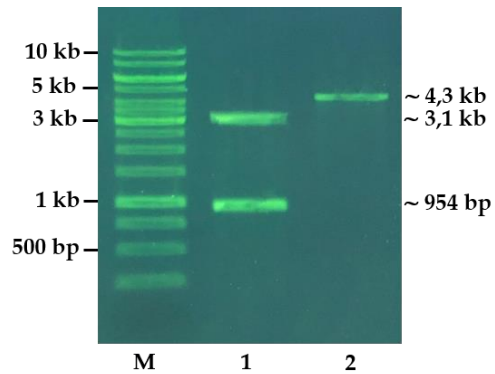
Gen *nahC* mã hóa 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase được tách dòng từ vector pGEM-T Easy/*nahC* và chèn vào vùng MCS của vector biểu hiện pCold™ II (Hình 3).

Plasmid pGEM-T Easy/*nahC* và vector pCold™ II được lần lượt cắt mở vòng đồng thời

bằng 2 enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sal*I (Hình 4). Kết quả kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm cắt gồm 2 băng DNA có kích thước phù hợp với vector pGEM-T Easy và gen *nahC* lần lượt xấp xỉ 3,1 kb và 954 bp. Phản ứng cắt vector pCold™ II cho kết quả sản phẩm 1 băng ở vị trí khoảng 4,3 kb đúng với kích thước của vector.



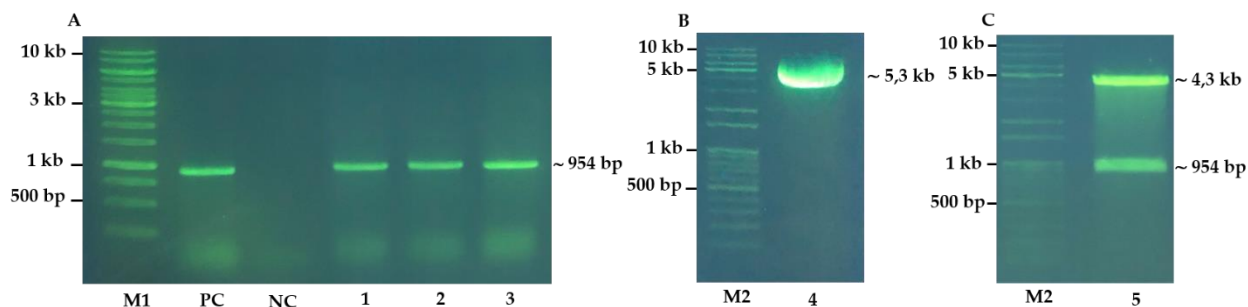
Hình 3. Vector pCold™ II mang gen *nahC* (màu đỏ). *AmpR*: gen kháng ampicilin (màu xanh lục); ori: vùng khởi đầu sao chép (màu vàng); *lacI*: lac repressor; *cspA* promoter: promoter của gene *cspA* mã hóa protein sốc lạnh; TEE: nhân tố tăng cường dịch mã của *E. coli*



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm cắt các vector pGEM-T Easy/*nahC* và pCold™ II bằng *Bam*HI và *Sal*I. M: thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific); 1: pGEM-T Easy/*nahC*; 2: pCold™ II

Gen *nahC* và vector pCold™ II sau khi tinh sạch được ghép nối tạo thành vector tái tổ hợp pCold™ II/*nahC* và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Để kiểm tra sự hiện diện của gen *nahC*

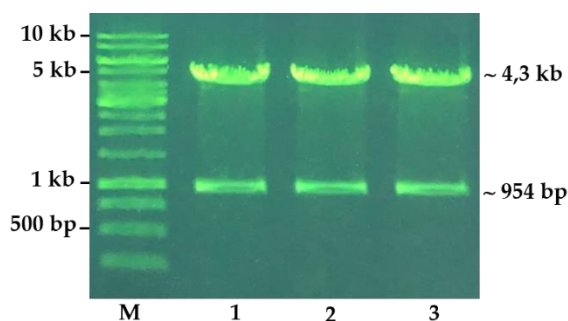
trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp, các dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để thực hiện phản ứng PCR (Hình 5A). Kết quả thu được các băng DNA với kích thước đúng như tính toán lý thuyết (954 bp).



Hình 5. Kết quả tạo dòng gen *nahC* vào pCold™ II. M1: thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific), M2: thang chuẩn DNA (1Kbp Plus 100 bp DNA Ladder Marker, Elpis Biotech). A: Khuếch đại PCR các gen *nahC* từ khuẩn lạc *E. coli* TOP10 với cặp mồi đặc hiệu, PC: pGEM-T Easy/*nahC*, NC: *E. coli* không biến nạp, 1-3: các khuẩn lạc *E. coli* TOP10 biến nạp. B: Tách chiết plasmid pCold™ II/*nahC* từ *E. coli* TOP10 (4); C: Sản phẩm cắt hạn chế plasmid pCold™ II/*nahC* bằng *Bam*HI và *Sal*I (5-6)

Để xác nhận gen *nahC* đã được ghép nối vào vector pCold™ II, điện di sản phẩm phản ứng cắt plasmid tái tổ hợp với 2 enzyme *Bam*HI và *Sal*I trên gel agarose 1% cho kết quả xuất hiện 2 băng DNA có kích thước xấp xỉ 4,3 kb và 954 bp tương ứng với kích thước của vector pCold™ II mạch thẳng và gen *nahC* (Hình 5C).

Vector biểu hiện pCold™ II mang gen *nahC* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21. Thể biến nạp được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và được chọn ngẫu nhiên để tách chiết plasmid, tiếp theo thực hiện phản ứng cắt kiểm tra với 2 enzyme hạn chế. Kết quả điện di (Hình 6) cho thấy sản phẩm cắt gồm 2 băng DNA có kích thước lần lượt là 4,3 kb và 954 bp phù hợp với kích thước của vector pCold™ II và gen *nahC*. Như vậy, vector pCold™ II/*nahC* đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* BL21, sẵn sàng cho việc biểu hiện protein NahC.

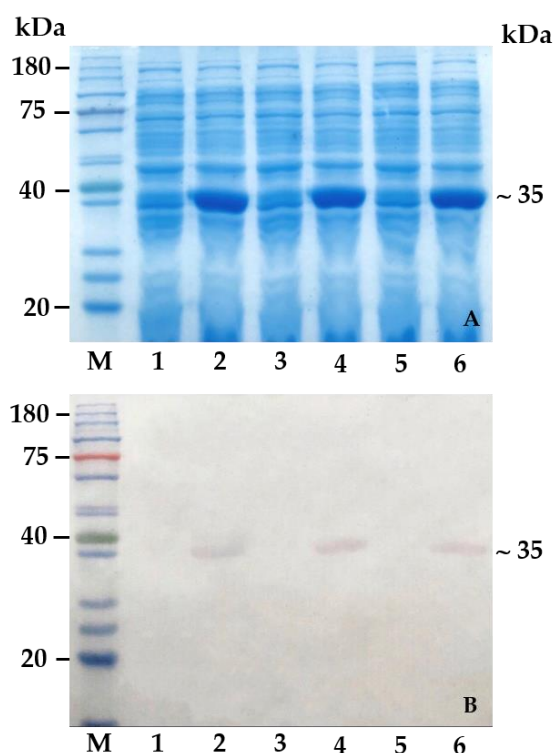


Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm cắt hạn chế plasmid pCold™ II/*nahC* từ *E. coli* BL21 bằng *Bam*HI và *Sal*I. M: thang chuẩn DNA (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific); 1-3: Sản phẩm cắt hạn chế plasmid pCold™ II/*nahC* bằng *Bam*HI và *Sal*I

3.3 Biểu hiện protein NahC trong tế bào *E. coli* BL21

Ba thể biến nạp *E. coli* BL21 được chọn ngẫu nhiên và được cảm ứng biểu hiện với 0,5 mM IPTG. Protein hòa tan tổng số được phân tích bằng điện di SDS-PAGE, kết quả cho thấy protein đích được biểu hiện mạnh (Hình 7A). Băng protein biểu hiện có khối lượng phân tử khoảng 35 kDa, hoàn toàn

phù hợp với khối lượng tính toán lý thuyết của protein NahC, tương ứng với trình tự amino acid suy diễn (315 amino acid). Phân tích Western blot với kháng thể anti-His tag cho thấy chỉ xuất hiện một băng protein đặc hiệu có khối lượng phân tử khoảng 35 kDa, tương ứng với protein NahC, mà không thấy xuất hiện tín hiệu lai ở các tế bào *E. coli* BL21 không cảm ứng (Hình 7B).



Hình 7. Kết quả phân tích biểu hiện protein NahC ở tế bào *E. coli* BL21 bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B). M: thang chuẩn protein (ExcelBand 3-color Pre-stained Protein Ladder, SMOBIO); 1,3,5: mẫu không cảm ứng; 2,4,6: mẫu cảm ứng với 0,5 mM IPTG

Một số báo cáo trước đây cho thấy gen mã hóa enzyme 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase từ các chủng vi khuẩn khác nhau đã được tạo dòng và nghiên cứu. Ví dụ, Kim và cs. đã biểu hiện gen mã hóa cho enzyme DHNDO từ chủng *P. fluorescens* SM11 trong tế bào *E. coli* NM522. Enzyme này có khối lượng phân tử 34,2 kD (308 amino acid), gồm có 8 tiểu đơn vị giống hệt nhau [11]. Theo Trivedi và cs., enzyme 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, từ

Pseudomonas sp. C5pp, gồm có 275 amino acid (khối lượng phân tử xấp xỉ 30,5 kDa), tương đồng với các enzyme extradiol dioxygenase type II [28]. Miyazawa và cs đã thu enzyme NahC (35 kDa) của *Geobacillus* sp. JF8 từ tế bào *E. coli* JM109 tái tổ hợp và xác định hoạt tính của enzyme [22].

4 Kết luận

Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy chúng tôi đã tạo dòng gen *nahC* từ vi khuẩn *P. naphthalenovorans* 4B1 vào vector pGEM-T Easy, trình tự DNA chính xác của gen cũng được xác định. Gen *nahC* tiếp tục được ghép nối vào vector biểu hiện pCold™ II. Các plasmid tái tổ hợp pCold™ II/*nahC* sau đó được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 để tiếp tục biểu hiện protein đích. Kết quả cho thấy protein NahC đã được biểu hiện thành công ở *E. coli* BL21 dựa trên phân tích SDS-PAGE và Western blot. Các protein tái tổ hợp này sẽ được tinh sạch cho các nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính và chức năng của enzyme.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Đại học Huế với mã số DHH2021-01-180.

Tài liệu tham khảo

1. Maliszewska-Kordybach B, Smreczak B. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*. 2003;28(8):719-728.
2. Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*. 1992;26(7):1278-1284.
3. US Environmental Protection Agency. Health effects support document for naphthalene. USEPA Office of Water, Health and Ecological Criteria Division, Washington DC; 2003.

4. Peng RH, Xiong AS, Xue Y, Fu XY, Gao F, Zhao W Tian YS, Yao QH. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(6):927-955.
5. Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2009;6(1):278-309.
6. Fuenmayor SL, Wild M, Boyes AL, Williams PA. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J Bacteriol.* 1998;180(9):2522-2530.
7. Mohapatra B and Phale PS. Microbial degradation of naphthalene and substituted naphthalenes: Metabolic diversity and genomic insight for bioremediation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2021;9:602445.
8. Kim J and Park W. Genome analysis of naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. AS1 harboring the megaplasmid pAS1. *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28(2):330-337.
9. Harayama S and Rekik M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzyme are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry.* 1989;264(26):15328-15333.
10. Patel TR and Barnsley EA. Naphthalene metabolism by pseudomonads: Purification and properties of 1,2-dihydroxynaphthalene oxygenase. *Journal of Bacteriology.* 1980;143(2):668-673.
11. Kim YJ, Lee NR, Choi SY, Min KH. Molecular cloning of the *nahC* gene encoding 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2002;12(1):172-175.
12. Swetha VP and Phale PS. Metabolism of carbaryl via 1,2-dihydroxynaphthalene by soil isolates *Pseudomonas* sp. strains C4, C5 and C6. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71(10):5951-5956.
13. Prabhu Y and Phale PS. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: Novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;61(4):342-351.
14. Kuhm AE, Stolz A, Ngai KL, Knackmuss HJ. Purification and characterization of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from a bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids. *Journal of Bacteriology.* 1991;173(12):3795-3802.
15. Savitha KR, Shamu TN, Junna L, Shinde M. Influence of nitrogen source on the catabolism of naphthalene by a *Pseudomonas aeruginosa* TU. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2019;8(10):947-959.
16. Keck A, Conradt D, Mahler A, Stolz A, Mattes R, Klein J. Identification and functional analysis of the genes for naphthalenesulfonate catabolism by *Sphingomonas xenophaga* BN6. *Microbiology.* 2006;152(7):1929-1940.
17. Nayak AS, Veeranagouda Y, Lee K, Karegoudar TB. Metabolism of acenaphthylene via 1,2-dihydroxynaphthalene and catechol by *Stenotrophomonas* sp. RMSK. *Biodegradation.* 2009;20(6):837-843.
18. Ji X, Xu J, Ning S, Li N, Tan L, Shi S. Cometabolic degradation of dibenzofuran and dibenzothiophene by naphthalene-degrading *Comamonas* sp. JB. *Current Microbiology.* 2017;74(12):1411-1416.
19. Bubinas A, Giedraitytė G, Kalėdienė L, Nivinskiene O, Butkiene R. Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid. *Cent Eur J Biol.* 2008;3(1):61-68.
20. Miyazawa D, Mukerjee-Dhar G, Shimura M, Hatta T, Kimbara K. Genes for Mn(ii)-dependent NahC and Fe(ii)-dependent NahH located in close proximity in the thermophilic naphthalene and PCB degrader *Bacillus* sp. JF8: Cloning and characterization. *Microbiology.* 2004;150(4):993-1004.
21. Thanh LTH, Thi TVN, Shintani M, Moriuchi R, Dohra H, Loc NH, Kimbara K. Isolation and characterization of a moderate thermophilic *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1 capable of degrading dibenzofuran from dioxin-contaminated soil in Vietnam. *J Biosci Bioeng.* 2019;128(5):571-577.
22. Miyazawa D, Thanh LTH, Tani A, Shintani M, Loc NH, Hatta T, Kimbara K. Isolation and characterization of genes responsible for naphthalene degradation from thermophilic naphthalene degrader, *Geobacillus* sp. JF8. *Microorganisms.* 2019;8:44.
23. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria, *Current Protocols in Molecular Biology.* 2001 Nov; Chapter 2: Unit 2.4.
24. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007; Aug 6:253.
25. Bergkessel M, Guthrie C. Colony PCR. *Methods Enzymol.* 2013; 529:299-309.
26. Trang NTN, Ha HTT, Thao NP, Tho DTA, Trang CT, Thanh LTH, et al. Expression of a synthetic gene encoding for the enhanced green fluorescent protein in various *Escherichia coli* strains. *Vietnam Journal of Biotechnology.* 2022;20(2):359:368.

27. Luong NN, Tien NQD, Hoa PTB, Tue NH, Hien MTT, Loc NH, et al. Optimizing the production of a functional type a recombinant endichitinase from *Trichoderma asperellum* in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2021;9(6):871-880.
28. Trivedi VD, Jangir PK, Sharma R, Phale PS. Insights into functional and evolutionary analysis of carbaryl metabolic pathway from *Pseudomonas* sp. strain C5pp. *Scientific Reports*. 2016;6:38430.