# TẠO DÒNG GEN *NAHB* MÃ HÓA *CIS*-DIHYDRODIOL NAPHTHALENE DEHYDROGENASE TỪ VI KHUẨN *PAENIBACILLUS NAPHTHALENOVORANS* 4B1

**Lê Thị Hà Thanh[1*], Ngô Thị Bảo Châu[1], Hoàng Dương Thu Hương[1]**

[1] Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: lethihathanh@hueuni.edu.vn

**TÓM TẮT**

Naphthalene là hợp chất đơn giản nhất trong 16 loại hydrocarbon thơm đa vòng được xếp vào nhóm các chất ô nhiễm độc hại bền vững trong môi trường. *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1 là vi khuẩn ưa nhiệt có thể sử dụng naphthalene như là nguồn carbon và năng lượng chính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng gen *nahB* mã hóa enzyme *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase tham gia xúc tác phản ứng thứ hai trong con đường chuyển hóa naphthalene. Kết quả phân tích trình tự DNA cho thấy trình tự gen *nahB* trong vector tạo dòng hoàn toàn tương đồng với trình tự gen *nahB* của chủng vi khuẩn 4B1. Sau đó, gen *nahB* được tạo dòng vào vector biểu hiện pColdII. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng cắt hạn chế vector tái tổ hợp bằng hai enzyme *BamH*I và *Sal*I chứng tỏ gen *nahB* đã được tạo dòng vào vector biểu hiện. Vector pColdII/*nahB* được tiếp tục biến nạp thành công vào vi khuẩn *Escherichia coli* BL21 để tạo cơ sở cho việc nghiên cứu biểu hiện và xác định các đặc tính của enzyme tái tổ hợp.

**Từ khóa:** *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase, *nahB*, *Paenibacillus*, tạo dòng.

## 1. MỞ ĐẦU

Trong vài thập kỷ qua, các chất ô nhiễm hydrocarbon thơm đa vòng (PAH), từ nhiều nguồn khác nhau như công nghiệp dầu mỏ, sản xuất giấy, công nghiệp dệt nhuộm, sản xuất thuốc trừ sâu…, đã phát tán lượng lớn vào môi trường trong quá trình vận chuyển hoặc lưu trữ. Naphthalene là một trong những PAH được tìm thấy phổ biến trong môi trường và đã được xem là chất độc có ảnh hưởng đối với sức khỏe con người như gây đột biến và ung thư (theo cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ, US-EPA) [1, 2, 3]. Phương pháp phân hủy sinh học bằng vi sinh vật là biện pháp xử lý ô nhiễm có tiềm năng được sử dụng để loại bỏ naphthalene vì có hiệu quả cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường [4, 5].

Sự phân hủy naphthalene và các gen liên quan đã được nghiên cứu rộng rãi ở các vi khuẩn Gram âm như *Pseudomonas* sp. [6-8] và *Ralstonia* sp. [9]. Ở chủng *Pseudomonas putida* G7, các gen mã hóa các enzyme phân hủy naphthalene được tìm thấy trên plasmid pNAH7 và pDTG1 [8]. Vi khuẩn *Pseudomonas* sp. MC1 chứa plasmid pYIC1 mang các gen phân hủy naphthalene. Các gen *nag* của chủng *Ralstonia* sp. U2 mã hóa cho tất cả các enzyme và nằm trong một operon [10, 11]. Ở các loài vi khuẩn này, enzyme *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase tham gia vào phản ứng thứ hai trong con đường phân hủy sinh học naphthalene, khử nước *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene tạo thành 1,2-dihydroxy naphthalene. Sau đó, các hợp chất tiếp theo được chuyển hóa thành salicylate. Salicylate bị loại bớt carbon để tạo thành catechol và bị chuyển hóa cắt vòng ở vị trí *meta*- hoặc *ortho*-. Salicylate cũng có thể bị chuyển hóa theo một con đường khác thành gentisate bởi enzyme salicylate-5-hydroxylase [4, 12].

Một số nghiên cứu về enzyme *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase (DDH) như nghiên cứu tinh sạch enzyme này từ *Pseudomonas putida* NP cho kết quả gồm 4 tiểu đơn vị với khối lượng phân tử 25,500 mỗi tiểu đơn vị [13]. Gen mã hóa DDH (*narB)* từ *Rhodococcus* sp. NCIMB12 đã được tạo dòng và biểu hiện ở *Escherichia coli*. Protein NarB có trình tự gồm 271 amino acid và có độ tương đồng thấp (39%) với trình tự enzyme này của *P. putida* G7 [14]. Ngoài ra, một số nghiên cứu cho thấy rằng enzyme NahB đặc hiệu với nhiều loại cơ chất và thể hiện khả năng oxy hóa các hợp chất *cis*-dihydrodiol khác nhau ngoài cơ chất tự nhiên của chúng [13, 15]. Nghiên cứu cấu trúc tinh thể của enzyme NahB từ chủng *Pseudomonas* sp. MC1 đã cho thấy vùng liên kết cơ chất linh hoạt cho phép xúc tác đa dạng các cơ chất khác nhau [16].

Vi khuẩn ưa nhiệt *Paenibacillus naphthalenovorans* 4B1, phân lập từ đất nhiễm dioxin ở A Lưới, Thừa Thiên Huế, có khả năng chuyển hóa naphthalene và một số hợp chất PAH khác [17]. Quá trình phân hủy naphthalene và các gen liên quan ở vi khuẩn ưa nhiệt (thermophile) ít được nghiên cứu. Một vài nghiên cứu rải rác cho thấy con đường phân hủy naphthalene và các enzyme liên quan có sự khác biệt so với vi khuẩn ưa ấm (mesophile). Vi khuẩn *Geobacillus* sp. SH-1 phân hủy naphthalene thông qua 1-naphthol [18]. Các hợp chất trao đổi được tìm thấy trong quá trình phân hủy naphthalene ở *Geobacillus thermoleovorans* Hamburg2 khác với các con đường chuyển hóa đã biết, như 2,3-dihydroxynaphthalene, 2-carboxycinnamic acid, phthalic acid và benzoic acid [19]. Phân tích phát sinh chủng loại trình tự amino acid cho thấy enzyme NahB từ chủng *Geobacillus* sp. JF8 không thuộc nhóm *cis*-dihydrodiol dehydrogenase của các con đường phân hủy naphthalene cổ điển [20]. Trong nghiên cứu này, gen *nahB* mã hóa enzyme *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase từ vi khuẩn 4B1 được tạo dòng vào vector pColdII, tạo nguyên liệu cho nghiên cứu biểu hiện và phân tích hoạt tính enzyme, từ đó có thể giúp ích cho kỹ thuật enzyme trong ứng dụng xử lý sinh học các hợp chất PAH.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn ưa nhiệt *P. naphthalenovorans* 4B1 [17] được sử dụng để tách chiết DNA tổng số. Gen *nahB* mã hóa *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase từ genome của chủng 4B1 (DDBJ: BJCS01000005) [17] được sử dụng để thiết kế mồi cho phản ứng khuếch đại chuỗi (PCR). Vector tạo dòng pGEM-T Easy (Promega, Mỹ), vector biểu hiện pColdII (Takara, Nhật Bản) và các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), BL21 (DE3) (Agilent) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Viện Nghiên cứu hoạt chất sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

### 2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Chủng vi khuẩn 4B1 được nuôi cấy trong môi trường Luria Broth (LB) ở 45°C; chủng *E. coli* TOP10 được nuôi cấy trên môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicillin ở 37°C; môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicillin, 50 mg/L streptomycin và 34 mg/L chloramphenicol được sử dụng cho nuôi cấy chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 với nhiệt độ nuôi cấy 37°C.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tạo dòng gen *nahB* vào vector pGEM-T Easy

Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn bằng CTAB theo phương pháp có điều chỉnh của Minas và cs [21]. Thiết kế cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen *nahB* với trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *BamH*I ở đầu 5′ (NahB_F: 5′-GGATCCTTGACAAAGCGCTTAGC-3′) và *Sal*I ở đầu 3′ (NahB_R: 5′-GTCGACAACGATCGTCAATCCTC-3′) với kích thước sản phẩm dự kiến khoảng 770 bp. Gen *nahB* được phân lập bằng phản ứng PCR sử dụng Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Mỹ). Thành phần và chương trình phản ứng PCR được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, với 35 chu kỳ và nhiệt độ gắn mồi ở 55°C.

Sản phẩm PCR được tinh sạch, gắn đuôi A, tạo dòng vào vector pGEM-T Easy và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 theo phương pháp của Trang và cs [22]. Nuôi cấy tế bào *E. coli* trên môi trường chọn lọc trong 16 giờ và kiểm tra thể biến nạp plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu [23].

2.3.2. Giải trình tự DNA

Tiến hành tách chiết plasmid pGEM-T Easy/*nahB* bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Mỹ), sau đó cắt hạn chế bằng *BamH*I và *Sal*I (Thermo Scientific, Mỹ) để xác nhận sự hiện diện của gen. Giải trình tự DNA của gen *nahB* bằng phương pháp Sanger, phân tích trình tự DNA bằng phần mềm BioEdit. Tiếp theo, trình

tự gen *nahB* được sắp gióng cột với trình tự lý thuyết để xác nhận sự chính xác bằng công cụ BLAST (NCBI).

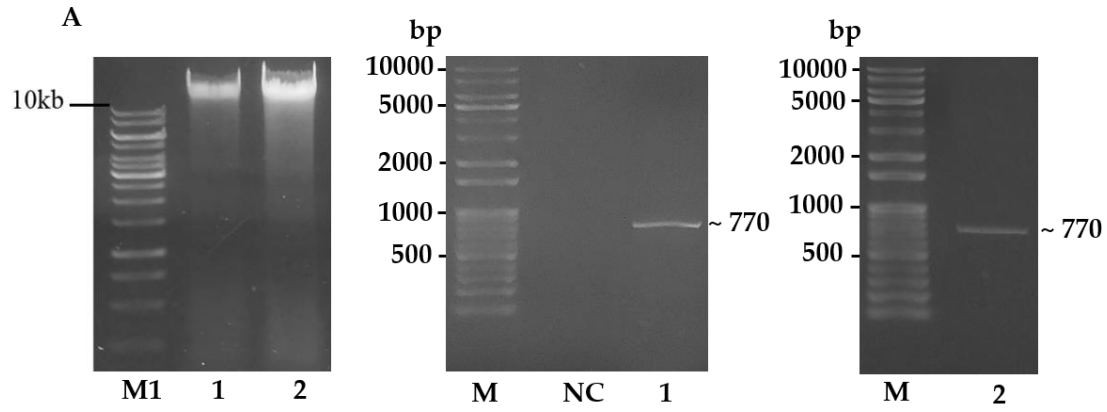
2.3.3. Tạo dòng gen *nahB* vào vector biểu hiện pColdII

Gen *nahB* được tách dòng từ vector tái tổ hợp pGEM-T Easy và được ghép nối vào vector biểu hiện pColdII theo phương pháp đã được trình bày trong nghiên cứu của Trang và cs [22]. Sàng lọc thể tái tổ hợp bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu và thực hiện phản ứng cắt hạn chế để xác nhận gen *nahB* đã được gắn vào vector pColdII. Tiếp theo, plasmid tái tổ hợp pColdII mang gen *nahB* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt [24]. Khuẩn lạc *E. coli* BL21 mang plasmid pColdII/*nahB* xuất hiện trên môi trường nuôi cấy chọn lọc được sàng lọc và kiểm tra bằng phương pháp cắt hạn chế với enzyme tương ứng như trên.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

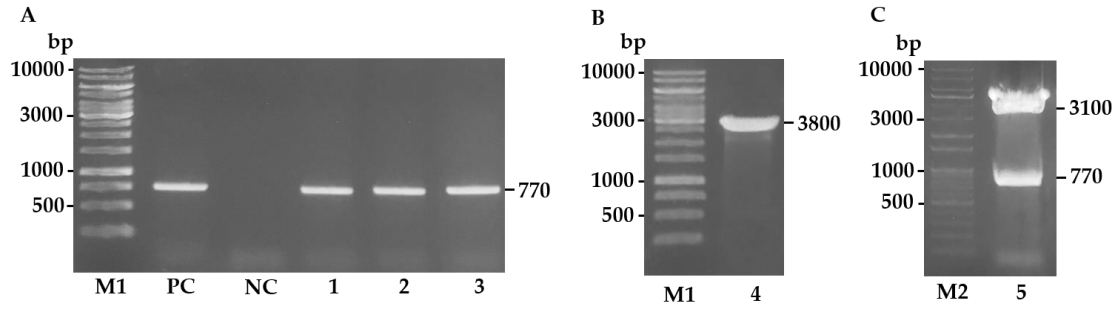
### 3.1. Tạo dòng gen *nahB* vào vector pGEM-T Easy

DNA tổng số của vi khuẩn *P. naphthalenovorans* 4B1 được kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả ở hình 1A cho thấy DNA tổng số đạt yêu cầu về nồng độ và độ sạch để sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Đoạn gen *nahB* khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu được điện di kiểm tra và kết quả thu được 1 băng DNA có kích thước 770 bp đúng kích thước lý thuyết (Hình 1B), gen *nahB* sau đó được tinh sạch (Hình 1C) để tiếp tục tạo dòng vào vector pGEM-T Easy.




***Hình 1.*** Sản phẩm khuếch đại PCR và tinh sạch gen *nahB*. M1: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ); M2: thang chuẩn kích thước DNA 1 Kbp Plus (Elpis Biotech, Hàn Quốc); 1-2: DNA tổng số (A); 3: sản phẩm khuếch đại gen *nahB* trước (B) và sau khi tinh sạch (C).

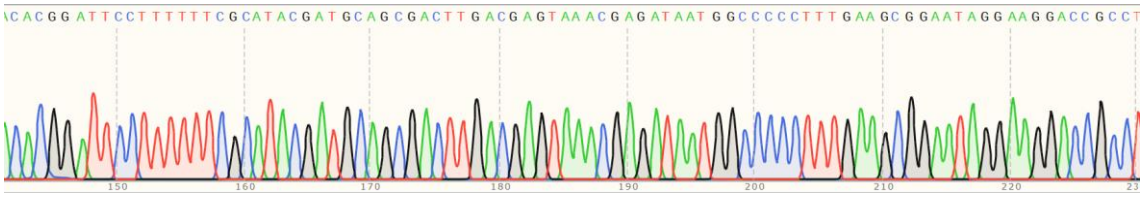
Tế bào *E. coli* TOP10 sau khi biến nạp được nuôi cấy chọn lọc trên môi trường LB bổ sung 50 mg/L ampicillin, phản ứng PCR các khuẩn lạc tái tổ hợp được tiến hành với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả ở hình 2A cho thấy xuất hiện các băng DNA đúng với kích thước dự đoán (770 bp). Plasmid tái tổ hợp được tách chiết (Hình 2B) và cắt bằng 2 enzyme hạn chế *BamH*I và *Sal*I (Hình 2C). Hình ảnh điện di sản phẩm cắt cho kết quả 2 băng DNA của vector pGEM-T Easy và gen *nahB* với kích thước lần lượt là 3,1 kb và 770 bp. Như vậy, có thể xác nhận là gen *nahB* đã được tạo dòng vào vector pGEM-T Easy trong *E. coli* TOP10.




***Hình 2.*** Tạo dòng gen *nahB* vào pGEM-T Easy. M1: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ); M2: thang chuẩn kích thước DNA 1 Kbp Plus (Elpis Biotech, Hàn Quốc). A: Sản phẩm PCR khuẩn lạc; PC: DNA tổng số; NC: *E. coli* TOP10 không biến nạp; 1-3: *E. coli* TOP10 biến nạp. B: Tách chiết plasmid tái tổ hợp; 4: plasmid pGEM-T Easy/*nahB*. C: Cắt hạn chế plasmid tái tổ hợp; 5: Sản phẩm cắt hạn chế plasmid pGEM-T Easy/*nahB* bằng *BamH*I và *Sal*I.

### 3.2. Phân tích trình tự DNA

Hình 3 thể hiện một phần biểu đồ sắc ký giải trình tự DNA của đoạn gen *nahB* trong plasmid tái tổ hợp, các peak thu được phân tách rõ ràng, kết quả giải trình tự có độ chính xác cao, trình tự đoạn gen phân lập được gồm có 777 bp. Kết quả sắp gióng cột giữa trình tự gen *nahB* tạo dòng vào *E. coli* TOP10 và trình tự gen này trong genome đã công bố của vi khuẩn 4B1 (hình 4) cho thấy hai trình tự tương đồng 100%.



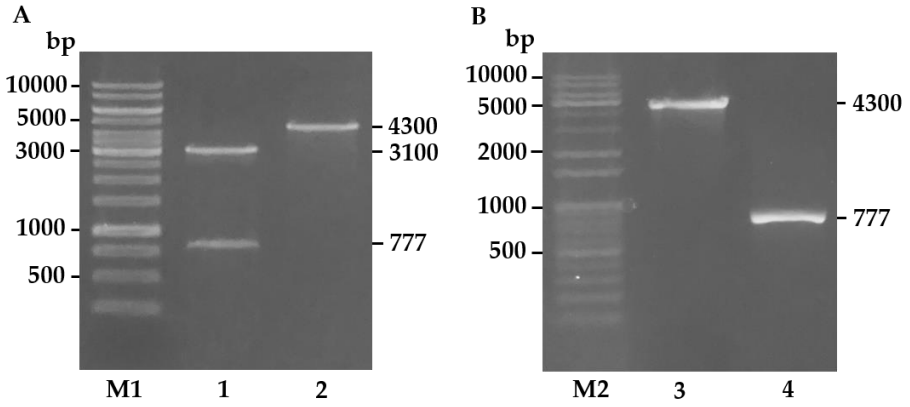
***Hình 3.*** Biểu đồ sắc ký giải trình tự gen *nahB*

```
nahB      1   GGATCCTTGACAAAGCGCTTAGCAAACAAAGTTGCGTTTATTACTGGGGCAGCAGGAGGCATGGGGAGAGCAGCTGCCGTTGTTTTTGCCCGTGAAGGAG
nahB-4B1  1   ------TTGACAAAGCGCTTAGCAAACAAAGTTGCGTTTATTACTGGGGCAGCAGGAGGCATGGGGAGAGCAGCTGCCGTTGTTTTTGCCCGTGAAGGAG

nahB      101 CGAAAGTGGCAGTCATCGATTTGGATGCAAAAGAAATCGAAAAAACCGCCAGTCTAGTGACTGAAGCAGGCGGCGAAGCCATCGCAATTCAATGCGACGT
nahB-4B1  95  CGAAAGTGGCAGTCATCGATTTGGATGCAAAAGAAATCGAAAAAACCGCCAGTCTAGTGACTGAAGCAGGCGGCGAAGCCATCGCAATTCAATGCGACGT

nahB      201 TTCCGATGAAGAGCAAGTGAAGCAAGCGATTCAAAAAACGATCGATACTTTTGGGAAGCTAACTACGGTTTATAATAATGCAGGGATTGCTCATAAGAAC
nahB-4B1  195 TTCCGATGAAGAGCAAGTGAAGCAAGCGATTCAAAAAACGATCGATACTTTTGGGAAGCTAACTACGGTTTATAATAATGCAGGGATTGCTCATAAGAAC

nahB      301 TTTATGATTGCTGTAGAAGAAATAAGTGCGGAAGAATGGGATAAAATCCAGAATATAAACACAAAAGGTATGTTCCTTGTGGTGAAGCATAGTATTCCTG
nahB-4B1  295 TTTATGATTGCTGTAGAAGAAATAAGTGCGGAAGAATGGGATAAAATCCAGAATATAAACACAAAAGGTATGTTCCTTGTGGTGAAGCATAGTATTCCTG

nahB      401 AACTTTTACGAGCCAACGGTGGAACGATTATCAATAAAGCATCGACTGCTGCCTTAATCAACAGCCCAGGCGGTCCTTCCTATTCCGCTTCAAAGGGGGC
nahB-4B1  395 AACTTTTACGAGCCAACGGTGGAACGATTATCAATAAAGCATCGACTGCTGCCTTAATCAACAGCCCAGGCGGTCCTTCCTATTCCGCTTCAAAGGGGGC

nahB      501 CATTATCTCGTTTACTCGTCAAGTCGCTGCATCGTATGCGAAAAAAGGAATCCGTGTCAATGCCATTGCTCCAGGGTATGTGATTACGCCGATGACAAAG
nahB-4B1  495 CATTATCTCGTTTACTCGTCAAGTCGCTGCATCGTATGCGAAAAAAGGAATCCGTGTCAATGCCATTGCTCCAGGGTATGTGATTACGCCGATGACAAAG

nahB      601 GCCATGGAAGAAGTGTTACCTGAGTTAGATAAAGTGGCTTCCGAAGCAACGCCCCTTGGTCGAGGAGCGCAGCCGGAAGAGATTGCGAATATTGCTCTCT
nahB-4B1  595 GCCATGGAAGAAGTGTTACCTGAGTTAGATAAAGTGGCTTCCGAAGCAACGCCCCTTGGTCGAGGAGCGCAGCCGGAAGAGATTGCGAATATTGCTCTCT

nahB      701 TTTTGGCGTCTGACGAATCATCATTTGTCACAGGCTCAGTGATTGTCGCCGACGGAGGATTGACGATCGTTGTCGAC
nahB-4B1  695 TTTTGGCGTCTGACGAATCATCATTTGTCACAGGCTCAGTGATTGTCGCCGACGGAGGATTGACGATCGTT------
```

***Hình 4.*** Kết quả sắp gióng cột trình tự gen *nahB* trong plasmid tái tổ hợp pGEM-T Easy/*nahB* với trình tự gen *nahB* trong genome của chủng 4B1.

### 3.3. Tạo dòng gen *nahB* vào vector biểu hiện

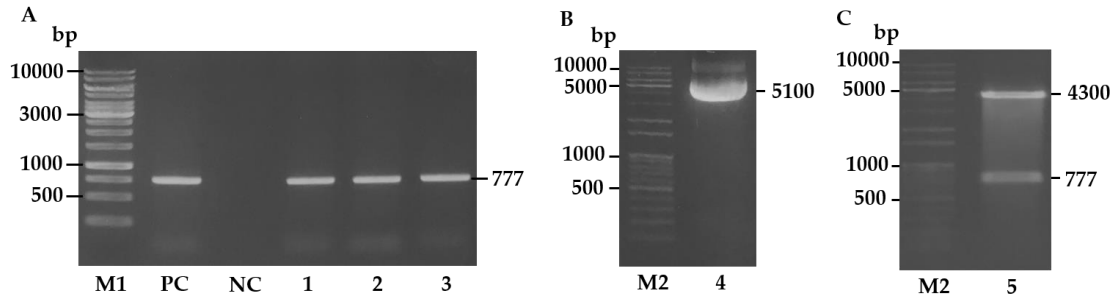
Gen *nahB* được tách dòng từ vector pGEM-T Easy bằng 2 enzyme hạn chế *BamH*I và *Sal*I, vector pColdII cũng được mở vòng với cặp enzyme tương tự. Hình 5A thể hiện hình ảnh điện di sản phẩm phản ứng cắt cho thấy xuất hiện các băng DNA có kích thước 3,1 kb; 777 bp và 4,3 kb lần lượt tương ứng với kích thước lý thuyết của vector pGEM-T Easy, gen *nahB* và vector pColdII mạch thẳng. Gen *nahB* và vector pColdII mở vòng được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit, kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy sản phẩm đảm bảo nồng độ và độ sạch để tiến hành phản ứng gắn (Hình 5B).




***Hình 5.*** Hình ảnh điện di sản phẩm cắt vector pGEM-T Easy/*nahB* và pColdII bằng *BamH*I và *Sal*I (A). M1: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ); 1: pGEM-T Easy + gen *nahB*; 2: vector pColdII. Sản phẩm tinh sạch vector pColdII mở vòng và gen *nahB* (B). M2: thang chuẩn kích thước DNA 1 Kbp (Elpis Biotech, Hàn Quốc); 3: vector pColdII; 4: gen *nahB*.

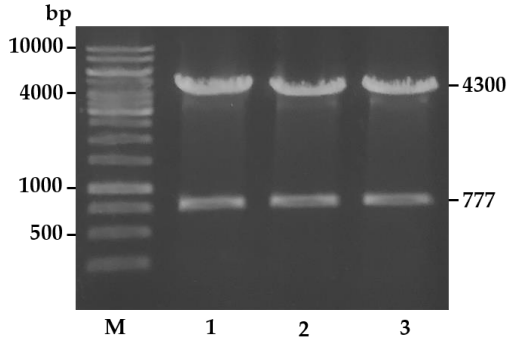
Sử dụng enzyme T4 Ligase để ghép nối gen *nahB* và vector pColdII, vector tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Sự hiện diện của gen *nahB* trong thể tái tổ hợp được kiểm tra bằng phản ứng PCR từ các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường chọn lọc (Hình 6A). Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR có kích thước 777 bp đúng với kích thước của gen *nahB*.

Plasmid tái tổ hợp pColdII/*nahB* được tách chiết và thực hiện phản ứng cắt hạn chế. Kết quả ở hình 6B cho thấy xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 5,1 kb tương ứng với kích thước của plasmid tái tổ hợp. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt hạn chế plasmid tái tổ hợp (hình 6C) cho thấy có sự xuất hiện các băng DNA có kích thước phù hợp với vector pColdII (4,3 kb) và gen *nahB* (777 bp). Kết quả này cho thấy đoạn gen *nahB* đã được tạo dòng thành công vào vector biểu hiện pColdII trong *E. coli* TOP10.




***Hình 6.*** Tạo dòng gen *nahB* vào vector biểu hiện pColdII. M1: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ); M2: thang chuẩn kích thước DNA 1 Kbp Plus (Elpis Biotech, Hàn Quốc). A: PCR khuẩn lạc *E. coli* TOP10 với cặp mồi đặc hiệu.; PC: plasmid pGEM-T Easy/*nahB*; NC: *E. coli* TOP10 không biến nạp; 1-3: *E. coli* TOP10 biến nạp. B: Tách chiết plasmid tái tổ hợp; 4: plasmid pColdII/*nahB* từ *E. coli* TOP10. C: Cắt hạn chế plasmid tái tổ hợp; 5: plasmid pColdII/*nahB* xử lý bằng *BamH*I và *Sal*I.

### 3.4. Biến nạp vector pColdII/*nahB* vào *E. coli* BL21




***Hình 7.*** Hình ảnh điện di sản phẩm cắt hạn chế plasmid pColdII/*nahB* tách từ vi khuẩn *E. coli* BL21. M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Scientific, Mỹ); 1-3: pColdII/*nahB* xử lý bằng *BamH*I và *Sal*I.

Tiếp theo, tiến hành biến nạp vector pColdII/*nahB* vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện protein tái tổ hợp. Xác nhận sự hiện diện của gen *nahB* bằng phản ứng cắt hạn chế plasmid tái tổ hợp thu được từ các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc. Hình 7 thể hiện kết quả điện di sản phẩm cắt gồm 2 băng DNA có kích thước tương ứng với đoạn gen *nahB* và vector pColdII (lần lượt là 777 bp và 4,3 kb). Kết quả này chứng tỏ vector pColdII mang gen *nahB* đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21. Các dòng tế bào vi khuẩn mang vector biểu hiện được bảo quản ở -80°C để sử dụng cho các nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch protein NahB tiếp theo.

## 4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã khuếch đại, tạo dòng thành công và xác định trình tự chính xác của gen *nahB* trong vector pGEM-T Easy. Gen *nahB* tiếp tục được tạo dòng vào vector biểu hiện pColdII. Các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pColdII/*nahB* sau khi sàng lọc sẽ là nguyên liệu cho các nghiên cứu biểu hiện, tinh sạch và đánh giá hoạt tính của enzyme NahB.

## 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. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Viện Nghiên cứu hoạt chất sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế vì đã cung cấp một số vật liệu nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSGR) (2005). "Toxicological Profile for naphthalene, 1-methylnaphthalene and 2-methynaphthalene". U.S Department and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp. 159-161.

[2]. US Environmental Protection Agency (2000). "Naphthalene, health and environmental effects". USEPA Office of Solid Waste, Washington DC.

[3]. A. N. Pawar, S. S. Ugale, M. G. More, N. F. Kokani, S. R. Khandelwal (2013). Biological degradation of naphthalene: A new era. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, Vol. 4, No. 7, pp. 1000203.

[4]. D. C. Ali, Z. Wang (2021). "Biodegradation of hydrophobic polycyclic aromatic hydrocarbons", *Microbial Biosurfactants, Environmental and Microbial Biotechnology*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp. 117-146.

[5]. B. Karimi, M. Habibi, M. Esvand (2015). Biodegradation of naphthalene using *Pseudomonas aeruginosa* by up flow anoxic-aerobic continuous flow combined bioreactor. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, Vol. 13, pp. 26.

[6]. K. M. Yen, C. M. Serdar (1988). Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 15, pp. 247-268.

[7]. T. Y. Izmalkova, O. I. Sazonova, M. O. Nagornih, S. L. Sokolov, I. A. Kosheleva, A. M. Boronin (2012). The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5. *Research in Microbiology*, Vol. 164, pp. 244-253.

[8]. M. J. Simon, T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W. C. Suen, D. L. Cruden, D. T. Gibson, G. J. Zylstra (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, Vol. 127, pp. 31–37.

[9]. N. Y. Zhou, J. Al-Dulayymi, M. S. Baird, P. A. Williams (2002). Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: A monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, pp. 1547–1555.

[10]. N. Y. Zhou, S. L. Fuenmayor, P. A. Williams (2001). *Nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *Journal of Bacteriology,* Vol. 183, pp. 700-708.

[11]. R. M. Jones, B. Britt-Compton, P. A. Williams (2003). The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology,* Vol. 185, pp. 5847-5853.

[12]. E. Grund, B. Denecke, R. Eichenlaub (1992). Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 6, pp. 1874-1877.

[13]. T. R. Patel and D. T. Gibson (1974). Purification and properties of (+)-*cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology,* Vol. 119, pp. 879-888.

[14]. L. A. Kulakov, C. C. R. Allen, D. A. Lipscomb, M. J. Larkin (2000). Cloning and characterization of a novel *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (*narB*) from *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 182, pp. 327-331.

[15]. D. Barriault, M. Vedadi, J. Powlowski, M. Sylvestre (1999). *Cis*-2,3-dihydro-2,3 dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy naphathalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 260, pp. 181-187.

[16]. A. K. Park, H. Kim, I. S. Kim, S. J. Roh, S. C. Shin, J. H. Lee, H. Park, H. W. Kim (2017). Crystal structure of *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase (NahB) from *Pseudomonas* sp. MC1: Insights into the early binding process of the substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 491, No. 2, pp. 403-408.

[17]. L. T. H. Thanh, T. V. N. Thi, M. Shintani, R. Moriuchi, H. Dohra, N. H. Loc, K. Kimbara (2019). Isolation and characterization of a moderate thermophilic *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1 capable of degrading dibenzofuran from dioxin-contaminated soil in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* Vol. 128, No.5, pp.571-577.

[18]. J. Zhang, X. Zhang, J. Liu, R. Li, B. Shen (2012). Isolation of a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. SH-1, capable of degrading aliphatic hydrocarbons and naphthalene

simultaneously, and identification of its naphthalene degrading pathway. *Bioresource Technology*, Vol. 124, pp. 83–89.

[19]. E. Annweiler, H.H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, W. Francke, W. Michaelis (2000). Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 66, pp. 518–523.

[20]. D. Miyazawa, L. T. H. Thanh, A. Tani, M. Shintani, N. H. Loc, T. Hatta, K. Kimbara (2019). Isolation and characterization of genes responsible for naphthalene degradation from thermophilic naphthalene degrader, *Geobacillus* sp. JF8. *Microorganisms*, Vol. 8, pp. 44.

[21]. K. Minas, N.R. McEwan, C.J. Newbold, K.P. Scott (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 325, pp. 162-169.

[22]. N. T. N. Trang, H. T. T. Ha, N. P. Thao, D. T. A. Tho, C. T. Trang, L. T. H. Thanh, N. H. Tue, N. H. Loc, N. N. Luong (2022). Expression of a synthetic gene encoding for the enhanced green fluorescent protein in various *Escherichia coli* strains. *Vietnam Journal of Biotechnology*, Vol. 20, pp. 359-368.

[23]. M. E. Woodman, C. R. Savage, W. K. Arnold, B. Stevenson (2018). Direct PCR of intact bacteria (Colony PCR). *Current Protocols in Microbiology*, Vol. 42, pp. A.3D.1-A.3D.7.

[24]. J. F. Sambrook and D. W. Russell (2011). *Molecular cloning: A laboratory mannual*, *3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

## CLONING *NAHB* GENE ENCODING *CIS*-DIHYDRODIOL NAPHTHALENE DEHYDROGENASE FROM *PAENIBACILLUS NAPHTHALENOVORAN*S 4B1

**Le Thi Ha Thanh[1*], Ngo Thi Bao Chau[1], Hoang Duong Thu Huong[1]**

[1] Biology Department, University of Sciences, Hue University

*Email: lethihathanh@hueuni.edu.vn

**ABSTRACT**

Naphthalene, the simplest polycyclic aromatic hydrocarbon, is considered as persistent toxic pollutant in the environment. *Paenibacillus naphthalenovorans* strain 4B1, a moderate thermophilic bacterium, can utilize naphthalene as its sole carbon and energy source. The *nahB* gene encoding *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase, catalyses the second step in the naphthalene degrading pathway, was cloned. The DNA sequence of cloned *nahB* gene showed 100% similarity with *nahB* gene from genome of strain 4B1. The gene was subsequently ligated into pColdII expression vector. The restriction reaction by two enzyme *BamH*I and *Sal*I indicated that *nahB* gene was cloned into the expression vector. The pColdII/*nahB* vector was successfully transformed to *Escherichia coli* BL21 for the expression and characterization of recombinant enzyme.

**Keywords:** *cis*-dihydrodiol naphthalene dehydrogenase, *nahB*, *Paenibacillus*, cloning.