

TẠO DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA MALONYL-COA SYNTHETASE (*matB*) VÀ MALONYL-COA DECARBOXYLASE (*matC*) từ *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362

Phạm Trần Quý Anh¹, Nguyễn Quang Đức Tiến¹, Nguyễn Hoàng Lộc¹, Nguyễn Huy Thuần^{2*}

¹Khoa Sinh học, Đại học Khoa Học, Đại học Huế

²Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: nguyenhuythuan@dtu.edu.vn

Ngày nhận bài: 14.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.04.2023

TÓM TẮT

Malonyl-CoA synthetase (MatB) và malonyl-CoA decarboxylase (MatC) là hai enzyme tham gia chuỗi trao đổi chất malonyl-CoA, một tiền chất quan trọng trong các quá trình trao đổi chất ở sinh vật prokaryote và eukaryote như cố định nitrogen, tổng hợp acid béo, các hoạt chất trao đổi thứ cấp, sự phát triển não bộ,... Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu là tạo dòng và phân tích trình tự gen mã hóa *matB* và *matC* để sử dụng làm công cụ trong nghiên cứu sinh tổng hợp hoạt chất có sử dụng tiền chất là malonyl-CoA. Gen đích được phân lập bằng kĩ thuật PCR (polymerase chain reaction) và tách dòng bằng vector pGEM®-T Easy, sau đó được giải trình tự và phân tích so sánh với cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng Gen (AF117694.1). Từ kết quả thực nghiệm, các gen *matB* và *matC* có nguồn gốc từ *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362 đã được tạo dòng thành công.

Từ khóa: *matB*, malonyl-CoA synthetase, *matC*, malonyl CoA decarboxylase, tạo dòng, *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362.

Cloning and Sequencing of Genes Encoding Malonyl-CoA Synthetase (*matB*) and Malonyl-CoA Decarboxylase (*matC*) from *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362

ABSTRACT

matB (malonyl-CoA synthetase) and *matC* (malonyl CoA decarboxylase) are two enzymes involved in the malonyl-CoA metabolism, an essential precursor in metabolic processes in prokaryotes and eukaryotes such as nitrogen fixation, fatty acid synthesis, secondary metabolites, brain development, etc. Therefore, the study's objective was to clone the genes *matB* and *matC* that can be used in the biosynthesis of the bioactive compound using malonyl-CoA as a precursor. *matB* and *matC* were isolated by PCR and ligated to cloning vector pGEM®-T Easy and sequenced. The obtained sequences were analyzed and compared to the reference sequence (AF117694.1) in the Genbank. In conclusion, *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362 - derived *matB* and *matC* genes were cloned and sequenced successfully.

Keywords: *matB*, malonyl-CoA synthetase, *matC*, malonyl CoA decarboxylase, cloning, *Rhizobium leguminosarum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

MatB là enzyme xúc tác sự hình thành malonyl-CoA trong phản ứng hai bước bao gồm adenyl hóa malonate với ATP sau đó chuyển malonyl từ malonyl-AMP thành CoA (An & cs., 1999) (Hình 1). MatB ở *R. trifolii* mã hóa polypeptide gồm 504 axit amin với khối lượng phân tử 54612 Da (Fleischmann, 1995).

MatC là enzyme xúc tác quá trình decarboxyl hóa của malonyl-CoA thành acetyl-CoA (Hình 1). Hoạt tính của enzyme này đã được nghiên cứu ở nhiều loại sinh vật từ vi khuẩn đến động vật có vú như tổng hợp axit béo trong tuyến niệu quản của ngỗng (*Branta canadensis*) và ty thể gan chuột (*Rattus norvegicus*) (Kim & cs., 1978a; 1978b). Khi malonyl-CoA được tích lũy, các enzyme ty thể

chính như methylmalonyl-CoA mutase (Bernard, 1973) và pyruvate carboxylase (Scrutton & cs., 1967) có thể bị ức chế. Do đó, rất có thể enzyme này có vai trò trong việc giảm độc tính của malonyl-CoA trong ty thể. Gần đây, gen *methylmalonyl-CoA decarboxylase* từ *Propionigenium modestum* đã được tạo dòng và giải trình tự (Bott, 1997). MatC ở các loài sinh vật rất đa dạng về khối lượng phân tử, ví dụ MatC của ngỗng có khối lượng phân tử 47kDa, tương tự như MatC của *R. trifolii* (khoảng 46kDa) và nhỏ hơn của chuột (54kDa). Đặc biệt, ở *R. trifolii*, *matC* mã hóa một protein có tính kỵ nước cao. Trình tự axit amin suy diễn của MatC cho thấy sự đồng nhất ở một mức độ nhất định với những protein vận chuyển C4-dicarboxylate từ *E. coli* (25%) và *Haemophilus influenzae* (17%) (Fleischmann, 1995).

Đặc tính xúc tác của malonyl-CoA synthetase và malonyl-CoA decarboxylase đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu và ứng dụng trên các lĩnh vực khác nhau.

Polyketide, một họ lớn các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học, được tổng hợp từ α -carboxylated CoA thioester (ví dụ như malonyl-CoA và methylmalonyl-CoA). MatB được xem là yếu tố quan trọng tham gia và quá trình tổng hợp tiền chất của polyketide (Pohl & cs., 2001). Tuy nhiên, hiệu quả của các quá trình lên men polyketide trong các vật chủ tự nhiên thường không cao; vì vậy, MatB và MatC tái tổ hợp có nguồn gốc từ *R. trifolii* với đặc tính chuyển hóa trực tiếp malonate và methylmalonate

ngoại sinh thành các CoA thioester tương ứng đã được sử dụng để sản xuất polyketide (Pohl & cs., 2001; Lombo & cs., 2001). Sự biểu hiện của *matB* và *matC* trong chủng *Streptomyces coelicolor* tái tổ hợp sinh macrolactone 6-deoxyerythronolide B với hiệu suất tăng gấp ba lần so với đối chứng (Lombo & cs., 2001). Tương tự, các gen này cũng có thể được sử dụng để tổng hợp các hoạt chất khác như: avermectin, monensin, tylosin, rifamycin, amphotericin, tetracycline, doxorubicin, lovastatin và flavonoid (Kim & cs., 1978a). Do đó, chúng tôi tiến hành tạo dòng và phân tích gen *matB* và *matC* từ *R. leguminosarum* để tạo vật liệu cho các nghiên cứu tổng hợp một số hoạt chất sinh học ở *E. coli* tái tổ hợp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu vi sinh vật: Chủng *Rhizobium leguminosarum* KTCC 2362 dạng đông khô được đặt mua từ bảo tàng KTCC (Hà Nội). Sau đó mẫu được hoạt hóa, nuôi cấy và tách chiết DNA tổng số làm vật liệu cho thí nghiệm PCR nhân bản gen. Chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

Vector và oligonucleotide: Vector tách dòng pGEM®-T Easy (Promega, Hoa Kỳ). Oligonucleotide dùng làm môi cho thí nghiệm PCR được tổng hợp bởi (Công ty Cổ phần Phù Sa genomics, Cần Thơ, Việt Nam).

Bảng 1. Trình tự các môi dùng cho PCR

Tên gen	Tên primer	Trình tự nucleotide 5'-3'	Kích thước sản phẩm PCR (kb)
<i>matB</i>	MatB-F	<u>GGATCC</u> AGGAGGGCGAAGGTGAGCAAC	1,5
	MatB-R	ACGTAAGGCGACCGCGCTCTCA <u>AAGCTT</u> TGG	
<i>matC</i>	MatC-F	<u>CATATG</u> GGGAGGGGAATCATGGGTATT	1,4
	MatC-R	GTTTGACGACGGGCTGCTCT <u>CTCGAG</u> AGC	
T7		AATACGACTCACTATAG	
SP6		ATTAGGTGACACTATAG	

Ghi chú: 5'-GGATCC-3', 5'-AAGCTT-3', 5'-CATATG-3', 5'-CTCGAG-3': Trình tự nhận biết của các enzyme giới hạn lần lượt là BamHI, HindIII, NdeI và XhoI.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khuếch đại gen bằng PCR

Phản ứng PCR để khuếch đại gen *matB* và *matC* được thực hiện trong máy luân nhiệt của hãng Phù Sa (Công ty cổ phần Phù Sa genomics, Cần Thơ, Việt Nam) với chu trình nhiệt biến tính 94°C/5 phút, 30 chu kỳ: 94°C/1 phút, 58°C/45 giây, 72°C/1 phút 35 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của các đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang chuẩn GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo scientific, Catalog number: SM1331).

2.2.2. Tách dòng và giải trình tự

Chuẩn bị tế bào khả biến: tế bào *E. coli* TOP10 được nuôi trong môi trường LB, 37°C, 180 rpm/phút, cho đến khi mật độ quang (OD) ở bước sóng 600nm là 0,6. Ủ mẫu trong đá lạnh, ly tâm lạnh ở tốc độ 3.500 rpm/phút thu sinh khối tế bào. Tiếp theo, rửa sinh khối bằng dung dịch CaCl₂ lạnh nồng độ 0,1M, lặp lại hai lần.

Tinh sạch sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng sử dụng kit (GeneJET PCR Purification Kit, Catalog number: K0701).

Tạo dòng gen vào vector pGEM®-T Easy: đoạn gen được nối vào vector tạo dòng bằng cách sử dụng enzyme nối ligase T4 (T4 DNA Ligase (5 U/μl) của hãng Thermo, Catalog number: EL0011).

Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn và tách chiết plasmid bằng phương pháp Alkaline prep lysis được thực hiện theo hướng dẫn tiêu chuẩn (Sambrook & cs., 2001). Ủ tế bào khả biến và DNA plasmid trong đá 10 phút. Cho 20μl hỗn hợp gắn vector insert hoặc 1μl DNA plasmid cho vào ống EP chứa tế bào khả biến, khuấy nhẹ, ủ trong đá 30 phút. Biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42 trong 90 giây, sau đó ủ trong đá 5 phút. Thêm 400μl môi trường LB lỏng và nuôi ở 37 trong 1 giờ. Lấy 100μl lượng dịch nuôi trên và trải trên môi trường LB agar có bổ sung kháng sinh thích hợp ở 37°C trong 12-14 giờ.

Các dòng tế bào vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR. Các thể biến nạp (khuẩn lạc trắng) được sàng lọc bằng phương pháp PCR dựa trên khuôn mẫu DNA plasmid (50ng) được tách chiết từ cả thể biến nạp. Phản ứng PCR để khuếch đại với chu trình nhiệt biến tính 94°C/5 phút, 30 chu kỳ: 94°C/1 phút, 58°C/45 giây, 72°C/1 phút 35 giây; cuối cùng là 72°C/10 phút. Các sản phẩm của phản ứng PCR được điện di cùng với thang chuẩn DNA 1 kb plus (Thermo Scientific, USA) trên gel agarose 1%. Khuôn mẫu DNA plasmid từ khuẩn lạc xanh được sử dụng làm đối chứng âm; DNA plasmid mang gen HMGR của sâm Ngọc Linh, được sử dụng khuôn mẫu làm đối chứng dương, nhằm kiểm tra phản ứng PCR có hoạt động tốt hay không (?).

Cuối cùng, DNA plasmid của các dòng khuẩn lạc *E. coli* TOP10 chứa vector pGEM®-T Easy mang gen các *matB* và *matC* được giải trình tự bởi công ty 1st Base (Singapore).

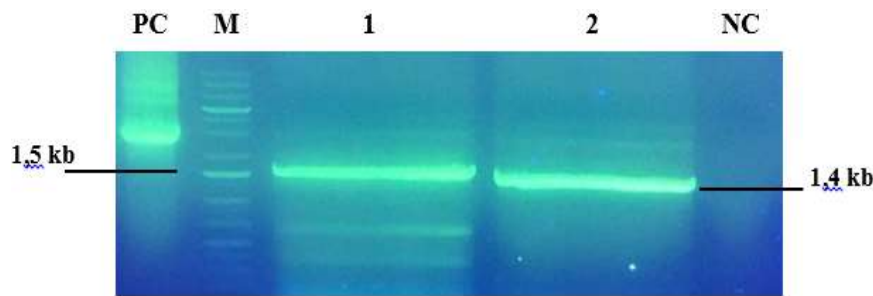
Chất lượng giải trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm FinchTV trước khi loại bỏ các trình tự của vector pGEM-T easy. Trình tự nucleotide được giải từ mỗi xuôi và mỗi ngược được lắp ráp hoàn chỉnh bằng phần mềm contig assembly CAP3 Sequence Assembly Program (<https://doua.prabi.fr/software/cap3>).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khuếch đại gen *matB* và *matC*

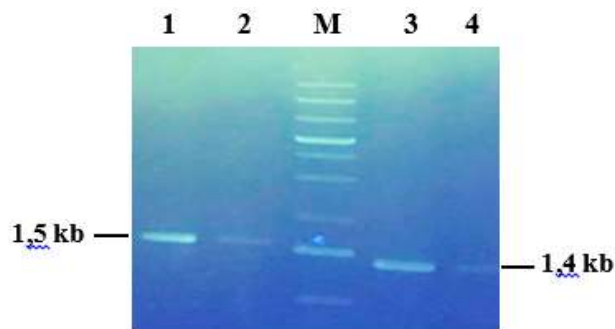
Gen *matB* và *matC* được phân lập bằng phương pháp PCR dựa trên khuôn là DNA của chủng *R. leguminosarum* KTCC 2362 với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sau khuếch đại được kiểm tra trên gel agarose 1%. Như vậy, các đoạn gen *matB* và *matC* đã được phân lập thành công bằng kỹ thuật PCR.

Kết quả điện di chỉ ra rằng sản phẩm DNA được khuếch đại đặc hiệu, có kích thước 1,5kb và 1,4kb, phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn gen *matB* và *matC* (Hình 1, giếng 1 và 2). Sản phẩm sau khi tinh sạch đạt yêu cầu về nồng độ và mức độ tinh sạch, có thể sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 2).



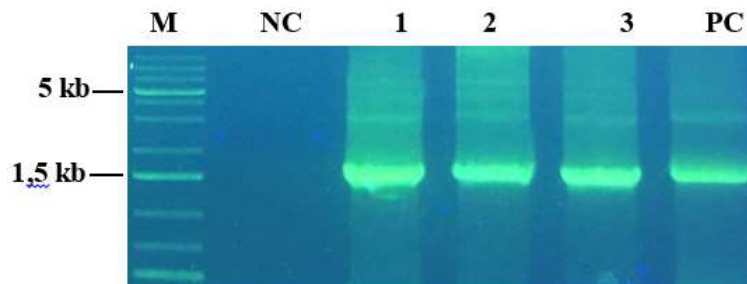
Ghi chú: M: Thang chuẩn DNA 1,0kb (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), 1: Gen *matB*, 2: Gen *matC*, PC: Đối chứng dương, NC: Đối chứng âm.

Hình 1. Khuếch đại gen *matB* và *matC* bằng PCR



Ghi chú: M: Thang chuẩn DNA 1,0kb (Thermo Scientific, Hoa Kỳ); 1 & 3: Sản phẩm tinh sạch lần thứ nhất; 2 & 4: Sản phẩm tinh sạch lần thứ hai; 1 & 2: Gen *matB*; 3 & 4: Gen *matC*.

Hình 2. Tinh sạch sản phẩm PCR nhân bản *matB* và *matC*



Ghi chú: M: Thang chuẩn DNA 1,0kb (Thermo Scientific, Mỹ), 1-3: Khuôn là DNA plasmid tách chiết từ khuẩn lạc được biến nạp *pGEM®-T/matB*, NC: Đối chứng âm, PC: Đối chứng dương.

Hình 3. Kiểm tra vector *pGEM®-T/matB* bằng PCR

3.2. Tạo dòng gen *matB* và *matC* vào vector *pGEM®-T Easy*

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được ghép nối vào vector *pGEM®-T Easy* và biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* TOP10. DNA plasmid tách chiết từ các thể biến nạp được kiểm tra bằng PCR. Kết quả PCR cho thấy sản phẩm khuếch đại có kích thước lần lượt 1,5kb (Hình 3)

và 1,4kb (Hình 3) tương ứng với kích thước tính toán của đoạn gen *matB* và *matC*. Như vậy, đoạn gen *matB* và *matC* đã tạo dòng thành công vào vector *pGEM®-T Easy*.

3.3. Phân tích trình tự gen *matB* và *matC*

Kết quả xác định trình tự nucleotide thu được từ plasmid tái tổ hợp mang gen *matB* và

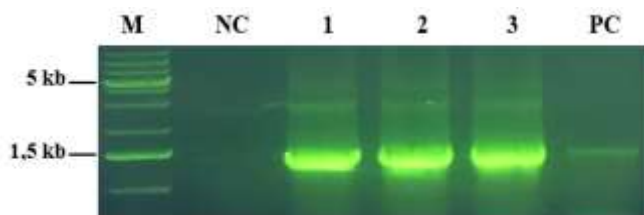
matC cũng cho thấy đoạn gen *matB* và *matC* thu được có kích thước lần lượt là 1.515bp và 1.347bp.

Kết quả giải trình tự peak của gen *matB* được trình bày ở hình 5A cho thấy chất lượng đọc tốt: đường mô tả chất lượng (base calling) có xác suất gọi bazơ đúng cao hơn 99%, các peak không chồng lên nhau và không có hiện tượng nhiều peak ở cùng một vị trí. Các nucleotide A, C, G, T được kí hiệu theo thứ tự bằng các peak màu xanh lá, xanh biển, đen và đỏ.

Trình tự nucleotide hoàn chỉnh thu được từ kết quả giải trình tự plasmid tái tổ hợp mang gen *matB* được tiến hành so sánh với trình tự nucleotide gen *matB* của chủng *R. trifolii* được công bố trên Genbank với mã số AF117694.1 bằng phần mềm CLUSTAL Omega. Gen *matB* từ kết quả giải trình tự và từ dữ liệu đã công bố trên Genbank đều có chiều dài 1.515bp và tỉ lệ nucleotide tương đồng giữa hai trình tự này là 99,93%; có sự sai khác trình tự ở vị trí

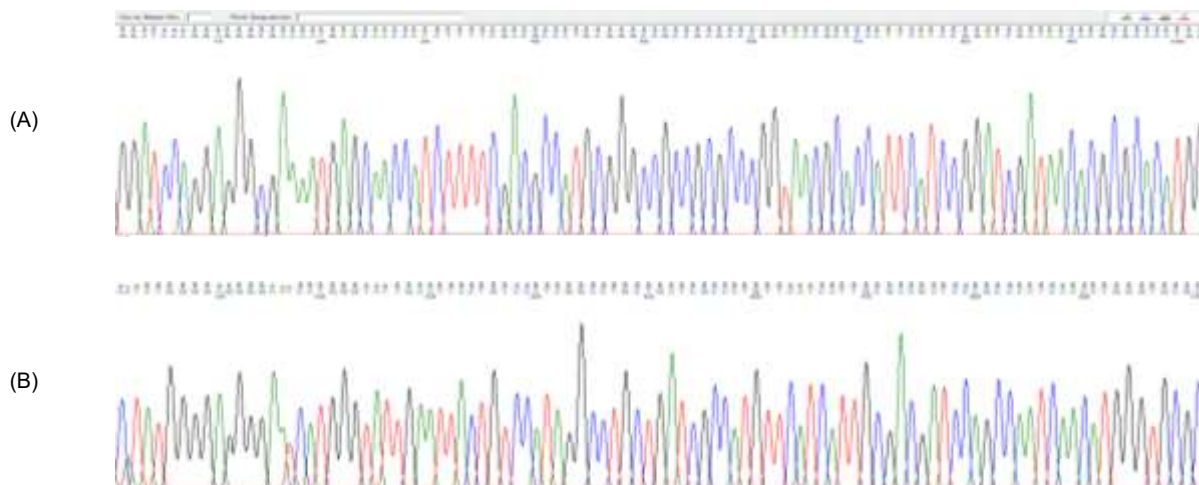
nucleotide 282, gen *matB* từ kết quả giải trình tự là C trong khi trình tự gen *matB* công bố là T. Gen *matB* phân lập từ chủng *R. leguminosarum* KTCC 2362 có sự sai khác một nucleotide (thay thế giữa C/T) so với gen *matB* ở ngân hàng gen. Tuy nhiên, sự thay đổi này không làm thay đổi khung đọc mở, do trình tự nucleotide đã không làm thay đổi trình tự axit amin (đều cùng mã hóa cho phenylalanine), cho nên không ảnh hưởng tới cấu trúc protein và chức năng của MatB.

Tương tự, trình tự nucleotide hoàn chỉnh thu được từ kết quả giải trình tự plasmid tái tổ hợp mang gen *matC* được tiến hành so sánh với trình tự nucleotide gen *matC* của chủng *R. trifolii* được công bố trên Genbank với mã số AF117694.1 bằng phần mềm CLUSTAL Omega. Gen *matC* từ kết quả giải trình tự và từ dữ liệu đã công bố trên Genbank đều có chiều dài 1.347bp, tỉ lệ nucleotide tương đồng giữa hai trình tự này là 100% (Hình 5B).



Ghi chú: M: Thang chuẩn DNA 1,0 b (Thermo Scientific, Mỹ), 1-3: Khuôn là DNA plasmid tách chiết từ khuẩn lạc được biến nạp pGEM-T/*matC*, NC: Đối chứng âm, PC: Đối chứng dương.

Hình 4. Kiểm tra vector pGEM@-T Easy/*matC* bằng PCR



Hình 5. Giải trình tự nucleotide của gen *matB* và *matC*

MatBseq	VSNHLDAMRAAAPGNAPFIRIDNTRTWYDDAFALSGRIASAMDALGIRPGDRVAVQVE	60
MatB	MSNHLFDAMRAAAPGNAPFIRIDNTRTWYDDAFALSGRIASAMDALGIRPGDRVAVQVE	60
	: *****	
MatBseq	KSAEALILYLACLRSGAVYLPINTAYTLAELDIFYIGDAEPRLVVASSARAGVETIAKPR	120
MatB	KSAEALILYLACLRSGAVYLPINTAYTLAELDIFYIGDAEPRLVVASSARAGVETIAKPR	120

MatBseq	GAIVETLDAAGSGSLDLARDEPADFVDASRSADDLAAIILYTSGTTGRSGKAMLTGHNLL	180
MatB	GAIVETLDAAGSGSLDLARDEPADFVDASRSADDLAAIILYTSGTTGRSGKAMLTGHNLL	180

MatBseq	SNALTLRDFWRVTAGDRLIHALP IFHTHGLFVATNVTLLAGASMFLLSKFDPPEEILSLMP	240
MatB	SNALTLRDFWRVTAGDRLIHALP IFHTHGLFVATNVTLLAGASMFLLSKFDPPEEILSLMP	240

MatBseq	QATMLMSVPTFYVRLQSPRLDKQAVANIRLFISGSAPLLAETHTEFQARTGHAILERYG	300
MatB	QATMLMSVPTFYVRLQSPRLDKQAVANIRLFISGSAPLLAETHTEFQARTGHAILERYG	300

MatBseq	MTEINMNTSNPFYEGKRIAGTVGFPLPDVTVRVTD PATGLALP PEQTGMIEIKGPNVFKGY	360
MatB	MTEINMNTSNPFYEGKRIAGTVGFPLPDVTVRVTD PATGLALP PEQTGMIEIKGPNVFKGY	360

MatBseq	WRMPEKTAAEFADGFFISGDLGKIDRDGYVHIVGRGKDLVISGGYNIYPKEVEGEIDQI	420
MatB	WRMPEKTAAEFADGFFISGDLGKIDRDGYVHIVGRGKDLVISGGYNIYPKEVEGEIDQI	420

MatBseq	EGVVESAVIGVPHPDFGEGVTAVVVRKPGAALDEKAIVSALQDRLARYKQPKRIIFAEDL	480
MatB	EGVVESAVIGVPHPDFGEGVTAVVVRKPGAALDEKAIVSALQDRLARYKQPKRIIFAEDL	480

MatBseq	PRNTMGKVQKNILRQQYADLYTRT	504
MatB	PRNTMGKVQKNILRQQYADLYTRT	504

MatCseq	MGIELLSIGLLIAMFI IATIQPINMGALAFAGAFVLGSMI IGMKTNE IFAGFP SDFLFTL	60
MatC	MGIELLSIGLLIAMFI IATIQPINMGALAFAGAFVLGSMI IGMKTNE IFAGFP SDFLFTL	60

MatCseq	VAVTYLFAIAQINGTIDWLVECAVRLVRGRIGLI PWVMFLVAAIITGFGALGPAAVAILA	120
MatC	VAVTYLFAIAQINGTIDWLVECAVRLVRGRIGLI PWVMFLVAAIITGFGALGPAAVAILA	120

MatCseq	PVALSFAVQYRIHPVMMGIMV IHGAQAGGFS PIS IYGGITNQIVAKAGLPFAPTS LFLSS	180
MatC	PVALSFAVQYRIHPVMMGIMV IHGAQAGGFS PIS IYGGITNQIVAKAGLPFAPTS LFLSS	180

MatCseq	FFFNLAIAVLVFFVFGGARWMKHPASLG PLPELHPEGVSAS IRGHGTPAKP IREHAYG	240
MatC	FFFNLAIAVLVFFVFGGARWMKHPASLG PLPELHPEGVSAS IRGHGTPAKP IREHAYG	240

MatCseq	TAADTATTLRLNNERTTTLIGLTALGIGALVFKFNVGLVAMTVAVVLALLS PKTQKAAID	300
MatC	TAADTATTLRLNNERTTTLIGLTALGIGALVFKFNVGLVAMTVAVVLALLS PKTQKAAID	300

MatCseq	KVSWSTVLLIAGIITVGVMEKAGTVDYVANGISSLGMPLLVALLLCFTGAIVSAFASST	360
MatC	KVSWSTVLLIAGIITVGVMEKAGTVDYVANGISSLGMPLLVALLLCFTGAIVSAFASST	360

MatCseq	ALLGAIIPLAVPFLQGHISAIGVVAAIAISTTIVDTS PFSTNGALVVANA PDDSDREQVL	420
MatC	ALLGAIIPLAVPFLQGHISAIGVVAAIAISTTIVDTS PFSTNGALVVANA PDDSDREQVL	420

MatCseq	RQLLIYSALIAIIGPIVAVLWFVVPGLV	448
MatC	RQLLIYSALIAIIGPIVAVLWFVVPGLV	448

Hình 6. So sánh trình tự axit amin suy diễn của MatB (A) và MatC (B) với trình tự tham chiếu tương ứng từ Genebank

Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh trình tự axit amin suy diễn của MatB và MatC với các trình tự MatB (AAC83455.1), MatC (AAC83457.1) tương ứng đã công bố trên Genebank (Hình 6A, 6B).

Kết quả giải trình tự gen *matB* và *matC* cho thấy trình tự nucleotide và trình tự axit amin suy diễn của hai gen này có độ tương đồng cao với dữ liệu đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế Genbank (AF117694.1). Gen *matB* có kích thước

1.515bp, mã hóa 504 axit amin; *matC* có kích thước 1.347bp, mã hóa 448 axit amin và cả hai gen đều có mã kết thúc là TAA. Như vậy, kết quả giải trình tự gen của hai gen *matB* và *matC* cho thấy chúng đạt yêu cầu về độ tin cậy và có thể dùng cho các thí nghiệm phân tích tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Hai gen *matB* và *matC* có nguồn gốc từ *R. leguminosarum* KTCC 2362 đã được dòng hóa thành công vào vector pGEM®-T Easy. Trình tự gen *matB* và *matC* giống lẫn lượt 99,93 và 100% so với trình tự tương đồng tham chiếu trên Genbank (AF117694.1). Vector tái tổ hợp có thể sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo về biểu hiện protein tái tổ hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An J.H., Lee G.Y., Jung J.W., Lee W. & Kim Y.S. (1999). Identification of residues essential for a two-step reaction by malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium trifolii*. *Biochemical Journal*. 344: 159-66.
- An J.H. & Kim Y.S. (1998). A gene cluster encoding malonyl-CoA decarboxylase (MatA), malonyl-CoA synthetase (MatB) and a putative dicarboxylate carrier protein (MatC) in *Rhizobium trifolii*: Cloning, sequencing, and expression of the enzymes in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 257: 395-402.
- Bernard M.B. (1973). Cleavage of coenzyme B12 by methylmalonyl coenzyme A mutase. *Journal of Biological Chemistry*. 248(4): 1145-50.
- Bott M. (1997). Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Propionigenium modestum*. *European Journal of Biochemistry*. 250(2): 590-9.
- Fleischmann R.D. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science*. 269: 496-512.
- Kim Y.S., Kwon S.J. & Kang S.W. (1993). Malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium trifolii*: Purification, properties, and the immunological comparison with those from *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas fluorescens*. *Korean Journal of Biochemistry*. 26: 176-83.
- Kim Y.S. (2002). Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *BMB Reports*. 35: 443-51.
- Kim Y.S. (1978a). Kolattukudy P.E. "Malonyl-CoA decarboxylase from the uropygial gland of waterfowl: Purification, properties, immunological comparison, and role in regulating the synthesis of multimethyl-branched fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 190: 585-97.
- Kim Y.S. & Kolattukudy P.E. (1978b). Purification and properties of malonyl-CoA decarboxylase from rat liver mitochondria and its immunological comparison with the enzymes from rat brain, heart, and mammary gland. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 190: 234-46.
- Lombo F., Pfeifer B., Leaf T., Ou S., Kim Y.S., Cane D.E., Licari P. & Khosla C. (2001). Enhancing the atom economy of polyketide biosynthetic processes through metabolic engineering. *Biotechnology Progress*. 17: 612-7.
- Pohl N.L., Hans M., Lee H.Y., Kim Y.S. & Khosla C. (2001). Remarkably broad substrate tolerance of malonyl-CoA synthetase, an enzyme capable of intracellular synthesis of polyketide precursors. *Journal of the American Chemical Society*. 123: 5822-23.
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scrutton M.C. & Utter M.F. (1967). Pyruvate carboxylase IX. Some properties the activation by certain acyl derivatives of coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry*. 242: 1723-35.
- Zurkowski W. (1982). Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology*. 150: 999-1007.