

Konstruksi Pustaka Genom *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 dan Penapisan Gen yang Terlibat dalam Sintesis Magnetosom

Construction of Genomic Library of Magnetospirillum magneticum AMB-1 and Screening of Genes Involved in Magnetosome Synthesis

ARIS TRI WAHYUDI

Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144
Tel./Fax. +62-251-345011, E-mail: aristri2003@yahoo.com

Magnetospirillum magneticum AMB-1 is a fresh-water magnetic bacterium capable of synthesizing membrane-bound magnetic particle, called magnetosome, under microaerobic conditions. To screen and isolate genes involved in magnetosome synthesis, genomic library of *M. magneticum* AMB-1 was constructed using pJRD215 as a cosmid vector. The genomic DNA of AMB-1 was partially digested with *Sau3AI* and ligated into *BamHI* digestion of pJRD215. The ligated DNA was packaged into bacteriophage λ particle and subsequently infected into *Escherichia coli* NM554 as a host strain. A thousand and five colonies of NM554 library carrying the recombinant cosmids were obtained that grew on luria agar supplemented with kanamycin (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and streptomycin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Screening of the library by colony hybridization revealed that the library carried all DNA sequences or genes involved in magnetosome synthesis used as probes. The average of the genome size inserted in the library was approximately 10-40 kb. These large fragments would facilitate complementation analysis of genes involved in magnetosome synthesis in this forming magnetic bacterium.

Key words: *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, Genomic library, Cloning, Colony hybridization

Bakteri magnet diketahui cenderung bermigrasi dan berenang sepanjang garis bidang magnet bumi (Blakemore 1975). Bakteri kelompok ini banyak ditemukan di perairan tawar dan laut (Matsunaga *et al.* 1991; Bazylinski 1995). Kemampuan respons terhadap magnet tersebut didasarkan pada struktur di dalam sel yang dinamakan magnetosom, komponen partikel magnet magnetit (Fe_3O_4) atau greigit (Fe_3S_4) yang diselimuti oleh membran (Gorby *et al.* 1988; Matsunaga *et al.* 1991). Magnetosom berukuran sekitar 50-100 nm disintesis oleh bakteri magnet yang dikendalikan pada taraf genetika (Nakamura *et al.* 1995; Wahyudi *et al.* 2001). Hanya tiga galur bakteri magnet yang sering digunakan sebagai model untuk telaah sintesis magnetosom, yaitu *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (Blakemore *et al.* 1979), *M. magneticum* AMB-1 (Matsunaga *et al.* 1991), dan *M. gryphiswaldens* (Schleifer *et al.* 1991). Ketiga galur bakteri tersebut mensintesis partikel magnet berjenis magnetit.

Sejak pertama kali bakteri magnet ditemukan (Blakemore 1975), hanya beberapa gen yang telah diisolasi. Beberapa di antaranya telah diusulkan terlibat dalam sintesis magnetosom, yang meliputi keterlibatannya dalam transpor besi ke dalam vesikel membran magnetosom (Nakamura *et al.* 1995), sintesis membran magnetosom (Okamura *et al.* 2001), kristalisasi besi di dalam vesikel (Arakaki *et al.* 2003), reduksi besi selama respirasi mikroaerob (Wahyudi *et al.* 2003), dan produksi siderofor (Calugay *et al.* 2004). Namun demikian, belum begitu jelas bagaimana sebenarnya magnetosom tersebut dibuat pada

taraf genetika molekuler. Hal ini karena belum adanya gen tertentu yang dilaporkan komplemen terhadap pembuatan magnetosom dari mutannya melalui telaah komplementasi. Oleh karena itu perlu pengklonan fragmen DNA genom berukuran besar yang dapat digunakan nantinya untuk menganalisis komplementasi. Jadi dalam hal ini perlu mengonstruksi pustaka genom AMB-1 yang dapat menggunakan kosmid sebagai vektor.

Pustaka genom mengandung seluruh gen dari suatu organisme dan sangat penting untuk menyimpan seluruh informasi genetika organisme. Pustaka genom sangat berguna untuk mengisolasi suatu gen atau sekelompok gen yang mungkin terorganisasi dalam suatu operon dengan menggunakan DNA pelacak yang sesuai. Gen maupun kelompok gen/operon nantinya akan dapat digunakan untuk telaah komplementasi. Jadi, konstruksi pustaka genom akan memudahkan untuk mengisolasi fragmen DNA berukuran besar yang membawa sekelompok gen dari suatu organisme yang merupakan faktor penting dalam komplementasi (Wahyudi 2001).

Pada penelitian sebelumnya telah dikonstruksi mutan-mutan *M. magneticum* AMB-1 yang tidak mensintesis magnetosom melalui mutagenesis dengan transposon (Wahyudi *et al.* 2001). Untuk telaah awal dalam kegiatan komplementasi, penelitian ini melaporkan konstruksi pustaka genom *M. magneticum* AMB-1 dan penapisan pustaka yang membawa gen yang terlibat dalam biosintesis magnetosom.

BAHAN DAN METODE

Galur Bakteri dan Kondisi Pertumbuhan. *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (ATCC 70024) secara rutin ditumbuhkan pada *magnetic spirillum growth medium* (MSGM) (Blakemore *et al.* 1979), sedangkan mutan AMB-1 yang tidak mensintesis magnetosom ditumbuhkan pada MSGM yang mengandung kanamisin ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$). *Escherichia coli* galur DH5 α dan NM554 ditumbuhkan pada media kaldu Luria (tripton 10 g l^{-1} , ekstrak khamir 5 g l^{-1} , NaCl 5 g l^{-1}) dan galur NM554 pembawa kosmid pJRD215 yang berukuran 10.2 kilo pasang basa (kb) (Davison *et al.* 1987) ditumbuhkan pada kaldu Luria yang mengandung kanamisin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) dan streptomisin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Isolasi Fragmen DNA Pengapit Transposon. DNA genom dari 10 mutan *M. magneticum* AMB-1 yang tidak mensintesis magnetosom diisolasi menggunakan metode standar (Wilson 1994). Fragmen DNA atau gen dari genom yang disisipi transposon yang terlibat dalam sintesis magnetosom (DNA pengapit transposon), diisolasi dengan teknik *inverse* PCR (Wahyudi *et al.* 2001). Primer didesain berdasarkan pada sekuen mini-Tn5Kml yang diarahkan keluar dari transposon, yaitu primer 1 (P1): 5'-ACACTGATGAATGTTCCGTTG-3' dan primer 2 (P2): 5'-ACCTGCAGGCATGCAAGCTTC-3' (Wahyudi *et al.* 2001). Fragmen-fragmen DNA genom hasil *inverse* PCR dimurnikan menggunakan *Gene Clean III Kit* (Bio 101), diklon ke dalam plasmid pGEM-T Easy (Invitrogen, USA), dan diintroduksi ke *E. coli* DH5 α . Fragmen DNA pengapit transposon selanjutnya diisolasi dari DH5 α dan dilabel dengan digoksigenin (Boehringer Mannheim, Jerman) untuk digunakan sebagai pelacak (*probe*) dalam analisis hibridisasi.

Penyiapan DNA Penyisip, DNA Vektor, dan Ligasi. DNA genom *M. magneticum* AMB-1 diisolasi, dimurnikan dengan sentrifugasi gradien CsCl (Sambrook & Russell 2001), dan dipotong parsial dengan enzim restriksi *Sau3AI* berkonsentrasi 0.1 unit selama 30 menit, setiap lima menit pemotongan DNA genom diambil $3 \mu\text{l}$ dan dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Melalui sentrifugasi gradien sukrosa (Quertermous 1994), fraksi-fraksi genom yang berukuran sekitar 40–45 kb dikumpulkan menjadi satu sebelum digunakan dalam ligasi atau penyambungan. Konsentrasi dan kemurnian DNA genom ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS 2200 PC (Shimadzu, Kyoto, Jepang). Kosmid pJRD215 (Davison *et al.* 1987) diisolasi dari *E. coli* NM554 (pJRD215) menggunakan metode standar dan dimurnikan dengan sentrifugasi gradien CsCl dipotong dengan enzim restriksi *BamHI*, dan selanjutnya didefosforilasi menggunakan *bacterial alkaline phosphatase* (BAP) (Takara, Tokyo, Jepang). Ligasi DNA genom ke dalam kosmid pJRD215 menggunakan formulasi perbandingan antara DNA penyisip dan vektor dengan nisbah molar sekitar 1:4 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 16 jam.

Pengemasan ke dalam Bakteriofage λ . DNA genom AMB-1 yang telah diligasikan ke dalam pJRD215 selanjutnya dikemas ke dalam bakteriofage λ menggunakan *Giga Pack III XL packaging extract* (Stratagen, USA). Metode pengemasan yang digunakan mengikuti metode seperti yang diterangkan oleh perusahaan pembuatnya (Stratagen, USA). DNA genom

yang telah diligasikan ke dalam kosmid pJRD215 dan dikemas ke dalam bakteriofage λ , selanjutnya diinfeksi ke dalam bakteri inangnya, *E. coli* NM554, dan kemudian disebar pada media agar-agar Luria yang ditambah kanamisin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) dan streptomisin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$). Untuk mengetahui ukuran fragmen DNA genom yang telah diklon ke dalam kosmid pJRD215, kosmid rekombinan diisolasi dari NM554 dan dipotong dengan *EcoRI* dan *SalI* (Wahyudi 2001), dan selanjutnya dilakukan verifikasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

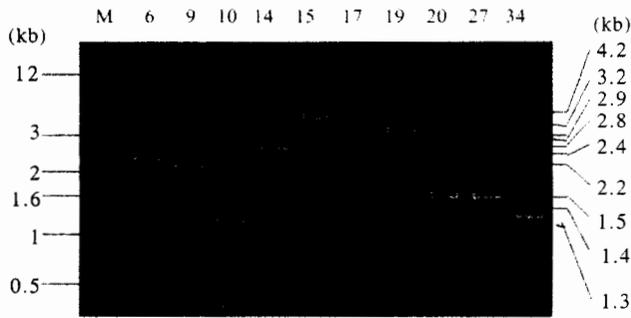
Hibridisasi Koloni dan Hibridisasi Southern. Hibridisasi koloni dilakukan terhadap semua NM554 rekombinan yang telah direplika pada media agar-agar Luria + kanamisin + streptomisin dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam (diameter koloni tidak lebih besar dari 2.0 mm). Koloni selanjutnya ditransfer pada membran nitroselulosa dan dilakukan hibridisasi koloni (GmbH, Maenheim, Jerman). DNA pelacak yang digunakan dalam hibridisasi ialah 10 fragmen DNA hasil *inverse* PCR dari fragmen-fragmen DNA yang mengapit transposon yang telah dilabel dengan digoksigenin (GmbH, Maenheim, Jerman).

Hibridisasi Southern dilakukan terhadap kosmid rekombinan yang telah dipotong dengan *EcoRI* dan *SalI* (yang menunjukkan hibridisasi koloni positif) dan dilakukan elektroforesis gel agarosa 1%. DNA dalam gel selanjutnya ditransfer ke membran nitroselulosa dengan cara *blotting*. DNA pelacak yang digunakan sama dengan pelacak yang digunakan pada hibridisasi koloni. Hibridisasi Southern dilakukan mengikuti metode seperti yang diterangkan oleh perusahaan pembuatnya (GmbH, Maenheim, Jerman). Deteksi hibridisasi dilakukan dengan menggunakan film *X-ray*.

HASIL

Isolasi Fragmen DNA Genom Pengapit Transposon. Sepuluh mutan *M. magneticum* AMB-1 yang tidak mensintesis magnetosom (*non-magnetic mutants*) dihasilkan melalui mutagenesis dengan transposon Mini-Tn5. Gen yang disisipi transposon tersebut (menjadi DNA genom pengapit transposon) merupakan gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom. Gen atau fragmen DNA tersebut dapat diisolasi dengan teknik *inverse* PCR (Wahyudi *et al.* 2001). Hasil amplifikasi kesepuluh DNA pengapit transposon setelah dilarikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% menghasilkan pita-pita tunggal fragmen DNA seperti disajikan pada Gambar 1. DNA genom pengapit transposon hingga 4.2 kb dapat diamplifikasi dengan teknik *inverse* PCR. Dengan demikian, kesepuluh produk *inverse* PCR tersebut merupakan fragmen DNA yang terlibat dalam biosintesis magnetosom dan dapat dijadikan pelacak untuk menapis gen aslinya dari pustaka genom *M. magneticum* AMB-1 melalui teknik hibridisasi koloni dan dikonfirmasi dengan hibridisasi *Southern*.

Konstruksi Pustaka Genom. Pustaka genom dari *M. magneticum* AMB-1 telah berhasil dikonstruksi dengan nisbah molar antara vektor dan DNA genom ialah 4:1. Dengan nisbah ini diperoleh 1005 koloni yang tumbuh pada agar-agar Luria yang ditambah kanamisin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) dan streptomisin



Gambar 1. Elektroforesis gel agarosa dari DNA genom *M. magneticum* AMB-1 yang disisipi transposon (DNA pengait transposon) yang terlibat dalam sintesis magnetosom, diamplifikasi dengan *inverse* PCR. Nomor di atas gambar menunjukkan nomor genom dari mutan. M: Penanda DNA 1 kb. Ukuran DNA dalam kilo pasang basa (kb).

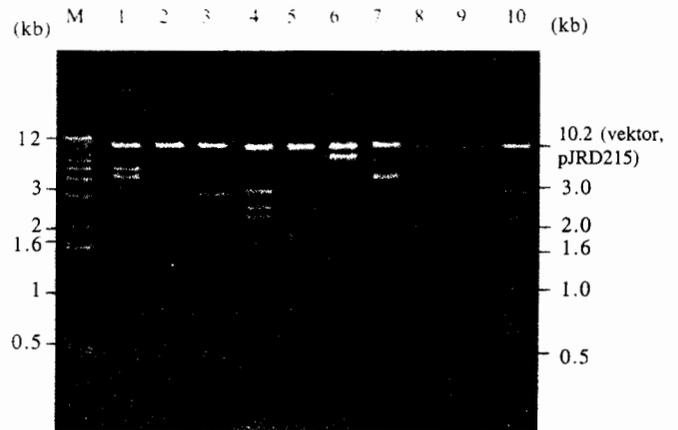
(25 µg ml⁻¹). Analisis kosmid rekombinan yang diekstrak dari beberapa koloni *E. coli* NM554 tersebut dipotong dengan *SalI* dan *EcoRI*, dan memperlihatkan ukuran DNA genom AMB-1 yang berhasil diklon ke dalam pJRD215 berukuran sekitar 10 hingga 40 kb (Gambar 2). Selanjutnya koloni *E. coli* NM554 yang membawa kosmid rekombinan tersebut disebut sebagai *E. coli* NM554 rekombinan.

Penapisan Pustaka Genom. Isolasi gen-gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom dilakukan melalui penapisan pustaka genom yang telah dikonstruksi dengan menggunakan hibridisasi koloni. *E. coli* NM554 rekombinan yang membawa kosmid rekombinan ditapis dengan menggunakan DNA pelacak yang sesuai. Hasil penapisan menunjukkan bahwa 10 DNA pelacak masing-masing berhibridisasi dengan koloni NM554 rekombinan. Hal ini menunjukkan bahwa pustaka genom yang telah dikonstruksi tersebut membawa 10 gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom. Hasil hibridisasi koloni selengkapnya disajikan pada Gambar 3a. Konfirmasi melalui hibridisasi Southern dari kosmid rekombinan yang diekstrak dari koloni yang menunjukkan hibridisasi koloni positif, juga menunjukkan hibridisasi Southern yang positif (Gambar 3b). Jumlah koloni NM554 yang membawa kosmid rekombinan, baik yang menunjukkan hibridisasi koloni maupun hibridisasi Southern positif, disajikan pada Tabel 1.

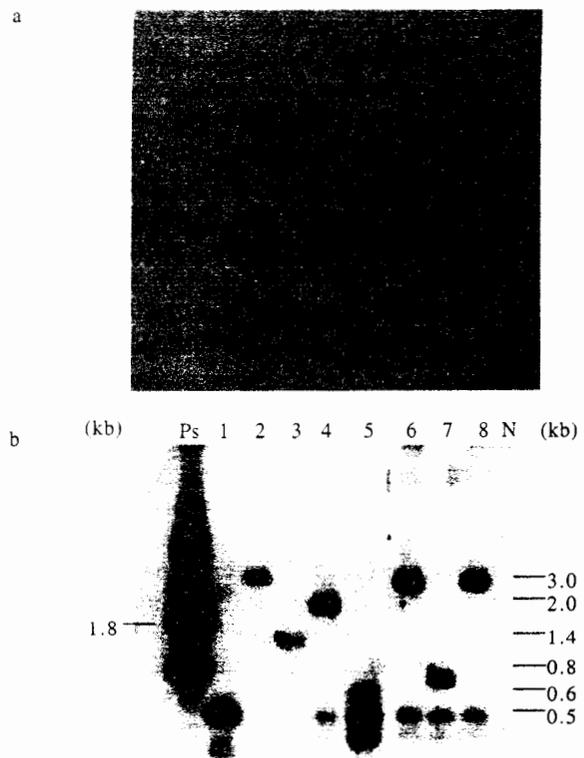
PEMBAHASAN

Dalam konstruksi pustaka genom, pemotongan DNA genom secara parsial dengan *Sau3AI* yang mengenali empat basa (GATC) merupakan cara yang baik dan efisien dalam pengklonan genom ke dalam pJRD215 yang dipotong dengan *BamHI*. Hal ini karena *Sau3AI* dan *BamHI* merupakan enzim restriksi endonuklease yang kompatibel sehingga DNA yang dipotong dengan kedua enzim tersebut dapat diligasikan, tetapi hasil ligasi ini tidak dapat dipotong dengan salah satu ataupun kedua enzim tersebut. Sebelum penyambungan plasmid vektor pJRD215 dengan genom AMB-1, pJRD215 perlu dimurnikan dengan sentrifugasi CsCl dan didefosforilasi. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari terjadinya ligasi sendiri. Dengan cara demikian, pengonstruksian pustaka genom akan menjadi lebih mudah dan efisien dilakukan.

Keberhasilan mengonstruksi pustaka genom dengan menggunakan kosmid sebagai vektor sangat ditentukan oleh kualitas genom maupun kosmid. Di samping itu, jenis enzim



Gambar 2. Elektroforesis gel agarosa dari 10 kosmid rekombinan hasil dari konstruksi genom (nomor 1-10) yang diambil secara acak dan dipotong dengan *EcoRI* dan *SalI*. Ukuran kosmid rekombinan dalam kb. M: Penanda DNA 1 kb.



Gambar 3. a. Hasil hibridisasi koloni *E. coli* NM554 yang membawa kosmid rekombinan (nomor 1-8) pustaka genom *M. magneticum* AMB-1 menggunakan pelacak produk *inverse* PCR no. 9 (DNA genom AMB-1 pengait transposon yang diamplifikasi dengan *inverse* PCR dari genom AMB-1 mutan nomor 9). b. Hibridisasi Southern dari kosmid rekombinan (1-8) yang dipotong dengan *SalI* dan *EcoRI* yang diekstrak dari *E. coli* NM554 menunjukkan hibridisasi koloni positif. P: *E. coli* DH5α yang membawa plasmid rekombinan pGEM-T yang membawa produk *inverse* PCR no. 9 yang dipotong dengan *EcoRI* dan *PstI* (kontrol positif), dan N: Genom *E. coli* DH5α yang dipotong dengan *EcoRI* dan *SalI* (kontrol negatif).

Tabel 1. Hibridisasi koloni *E. coli* NM554 pembawa kosmid rekombinan menggunakan pelacak fragmen DNA hasil *inverse* PCR

No. pelacak (produk <i>inverse</i> PCR)	Hibridisasi positif (jumlah koloni)	No. pelacak (produk IPCR)	Hibridisasi positif (jumlah koloni)
6	4	17	5
9	8	19	5
10	2	20	3
14	5	27	5
15	1	34	2

restriksi, waktu, dan suhu inkubasi juga penting diperhatikan. Kualitas DNA genom dan kosmid dapat dicapai melalui pemurnian yang dilakukan menggunakan sentrifugasi CsCl. Pemotongan parsial sekitar 3 µg genom *M. magneticum* AMB-1 dengan *Sau3AI* yang berkonsentrasi 0.1 unit selama 10 menit dapat menghasilkan fragmen DNA genom berukuran besar sekitar 40 kb. Ukuran DNA fragmen yang berukuran besar seperti ini sangat penting dalam mengonstruksi pustaka genom. Apabila waktu pemotongan diperlama atau konsentrasi enzim *Sau3AI* diperbesar kemungkinan akan dihasilkan DNA genom yang terpotong-potong menjadi ukuran yang lebih kecil dan bahkan akan terpotong-potong sempurna.

Konstruksi pustaka genom *M. magneticum* AMB-1 merupakan salah satu cara yang tepat dan langkah awal untuk melengkapi gen-gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom. Isolasi fragmen DNA genom berukuran besar, sekitar 20-40 kb yang membawa gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom, merupakan langkah penting yang nantinya dapat digunakan dalam analisis komplementasi. Hal ini dilakukan karena hingga sekarang ini belum ada satu pun studi yang melaporkan telaah komplementasi gen dalam hubungannya dengan sintesis magnetosom. Oleh karena itu konstruksi pustaka genom menjadi sangat penting. Ukuran DNA genom *M. magneticum* AMB-1 ialah 4 967 648 pb (Matsunaga *et al.* 2005) dan koloni NM554 rekombinan yang diperoleh dari pustaka genom dari telaah ini berjumlah 1005 koloni. Dengan asumsi bahwa ukuran fragmen DNA genom yang diklon ke dalam pJRD215 rata-rata sekitar 25 kb, maka hanya diperlukan sekitar 200 koloni *E. coli* NM554 rekombinan. Dengan demikian, pustaka genom yang dikonstruksi melalui studi ini diharapkan dapat mengandung seluruh total genom dari *M. magneticum* AMB-1.

Penapisan pustaka genom AMB-1 menggunakan 10 DNA pelacak, yang terlibat dalam sintesis magnetosom, menunjukkan hibridisasi koloni maupun hibridisasi *Southern* positif. Hal ini menunjukkan bahwa pustaka genom yang dikonstruksi mempunyai efisiensi yang tinggi. Dengan demikian, gen-gen yang terlibat dalam biosintesis magnetosom pada *M. magneticum* AMB-1 telah dapat ditapis dan diisolasi dari pustaka genom yang telah dikonstruksi ini. Hal ini karena pada umumnya gen yang terlibat dalam sintesis magnetosom terorganisasi dalam operon atau kelompok gen (Wahyudi 2004) sehingga pengklonan fragmen DNA genom berukuran besar sangat diperlukan.

Keuntungan penggunaan kosmid pJRD215 sebagai vektor pembawa ialah karena adanya gen *mob* (Davison *et al.* 1987). Oleh karena itu, kosmid rekombinan yang diperoleh dapat ditransfer ke bakteri lain menggunakan fungsi protein Tra yang telah disisipkan ke dalam kromosom *E. coli* S17-1 atau fungsi

Tra dari plasmid lain. Hal ini dapat dilakukan dengan cara konjugasi. Kosmid rekombinan tersebut dalam hal ini tentu saja harus pertama-tama ditransformasi ke dalam *E. coli* S-17 dengan elektroforasi. Tahap selanjutnya ialah mentransfer kosmid rekombinan yang sudah terdapat di dalam sel *E. coli* S17-1 ke dalam sel bakteri resipien menggunakan teknik konjugasi. Kestabilan kosmid rekombinan di dalam sel inangnya yang baru juga perlu diketahui.

Konstruksi pustaka genom AMB-1 berukuran besar dan penapisan serta isolasi pustaka yang membawa gen yang terlibat dalam biosintesis magnetosom diharapkan dapat memberikan landasan untuk melengkapi sintesis magnetosom pada bakteri magnet, khususnya *M. magneticum* AMB-1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pemerintah Jepang khususnya Menteri Pendidikan, Kebudayaan, Sains, Olah Raga, dan Teknologi atas dukungan dana. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Tadashi Matsunaga dan Haruko Takeyama atas segala fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung di Lab Matsunaga-Takeyama, Departemen Bioteknologi, *Tokyo University of Agriculture and Technology*, Tokyo, Jepang.

DAFTAR PUSTAKA

- Arakaki A, Webb J, Matsunaga T. 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J Biol Chem* 278:8745-8750.
- Bazylinski DA. 1995. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* 61:337-343.
- Blakemore RP. 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* 190:377-379.
- Blakemore RP, Maratea D, Wolf RS. 1979. Isolation and pure culture of a fresh water magnetic spirillum in defined medium. *J Bacteriol* 140:720-729.
- Calugay RJ, Okamura Y, Wahyudi AT, Takeyama H, Matsunaga T. 2004. Siderophore production of a periplasmic binding protein kinase gene defective mutant in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Biochem Biophys Res Commun* 323:852-857.
- Davison J, Heusterspreute M, Chevalier N, Thi-Ha V, Brunel F. 1987. Vectors with restriction site bank. V. pJRD215, a wide-host range cosmid vector with multiple cloning sites. *Gene* 51:275-280.
- Gorby YA, Beveridge TJ, Blakemore RP. 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J Bacteriol* 170:834-841.
- Matsunaga T *et al.* 2005. Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. Strain AMB-1. *DNA Res* 12:157-166.
- Matsunaga T, Sakaguchi T, Todokoro F. 1991. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:651-655.
- Nakamura C, Burgess JG, Sode K, Matsunaga T. 1995. An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. AMB-1. *J Biol Chem* 270:28392-28396.
- Okamura Y, Takeyama H, Matsunaga T. 2001. A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J Biol Chem* 276:48183-48188.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schleifer KH *et al.* 1991. The genus *Magnetospirillum*, gen. Nov., description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum*, comb. Nov. *Syst Appl Microbiol* 14:379-385.

- Wahyudi AT. 2001. Perpustakaan gen: bagaimana mengkonstruksinya?. *Hayati* 8:27-30.
- Wahyudi AT. 2004. Pembentukan magnetosom pada bakteri. *J Mikrobiol Indones* 9:39-42.
- Wahyudi AT, Takeyama H, Matsunaga T. 2001. Isolation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 mutants defective in bacterial magnetic particle synthesis by transposon mutagenesis. *Appl Biochem Biotechnol* 91:147-154.
- Wahyudi AT, Takeyama H, Okamura Y, Fukuda Y, Matsunaga T. 2003. Characterization of aldehyde ferredoxin oxidoreductase gene defective mutant in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Biochem Biophys Res Commun* 303:223-229.
- Wilson K. 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. Di dalam: Ausubel *et al.* (ed). *Current Protocol in Molecular Biology*. New York: John Wiley. hlm 2.4.1-2.4.5.
- Quertermous T. 1994. Construction of recombinant DNA library. Di dalam: Ausubel *et al.* (ed). *Current Protocol in Molecular Biology*. New York: John Wiley. hlm 5.0.1-5.4.4.