

ULASAN

Perpustakaan Gen: Bagaimana Mengonstruksinya?

ARIS TRI WAHYUDI

Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor,
Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144, E-mail: aris@cc.tuat.ac.jp

Diterima 5 Februari 2001/Disetujui 23 Februari 2001

Many methods can be used to construct genomic DNA library in the cosmid vector. In this system, large fragments of genomic DNA generated by randomly digestion are ligated to the cosmid vector to form concatemers that can be packaged into bacteriophage λ particles. These particles serve as vehicles by which the recombinant DNA molecules are efficiently introduced into bacteria. The method for constructing libraries of bacterial genomic DNA in cosmid is to clone genomic fragments of appropriate size (30-45 Kb) obtained by partial digestion with *Sau3AI* that recognize a 4-bp sequence compatible with that of the vector. The partially digested DNA is cloned into the *BamHI* site of pJRD215 cosmid vector. The recombinant cosmids are subsequently packaged into bacteriophage λ and infected into the *E. coli* NM554 as a host strain. Screening of the *E. coli* harboring recombinant cosmids containing gene(s) of interest is usually performed by colony hybridization.

PENDAHULUAN

Kalau kita berbicara mengenai perpustakaan, umumnya yang terbayang oleh kita ialah perpustakaan buku atau majalah yang di dalamnya terdapat berbagai informasi. Itu dalam arti secara umum. Lain halnya kalau kita berbicara dalam konteks bioteknologi, khususnya dalam hal genetika mikrob maupun rekayasa genetika, pengertian perpustakaan yang dimaksud sering diartikan sebagai perpustakaan gen (*gene library*). Dalam perpustakaan gen terdapat berbagai macam gen dari organisme tertentu. Jadi kalau kita ingin mencari gen dari bakteri tertentu misalnya, gen tersebut diseleksi dengan menggunakan pelacak (*probe*) DNA.

Sekarang apa kegunaan perpustakaan gen? Sebagai contoh kita akan mencari gen yang responsif mengendalikan ketahanan *Bradyrhizobium japonicum* (bakteri pembentuk bintil akar pada tanaman kedelai dan penambat nitrogen bebas) yang mampu tumbuh pada kondisi asam-aluminium (*acid-Al tolerant*). Untuk itu perlu membuat perpustakaan gennya yang berasal dari kromosom (karena umumnya *B. japonicum* tidak punya plasmid). Pelacak yang digunakan untuk mengambil gen yang bertanggung jawab terhadap ketahanan asam tersebut misalnya penyisipan transposon (mutagenesis dengan transposon, transposon akan membuat tidak aktifnya gen yang disisipi) sehingga bakteri tersebut akan menjadi sensitif terhadap kondisi asam-aluminium. Hal ini dapat dilakukan melalui mutagenesis dengan menggunakan transposon mini-Tn5 (Wahyudi *et al.* 1998). DNA yang disisipi transposon (menjadi DNA pengapit transposon) tersebut dapat diisolasi melalui kloning secara konvensional (Sambrook & Russell 2000) atau dengan teknik inverse PCR (Wahyudi 2000), dan dapat dijadikan sebagai pelacak untuk mengambil gen asli dari galur tipe liarnya. Jadi dalam hal ini perlu untuk membuat perpustakaan gennya.

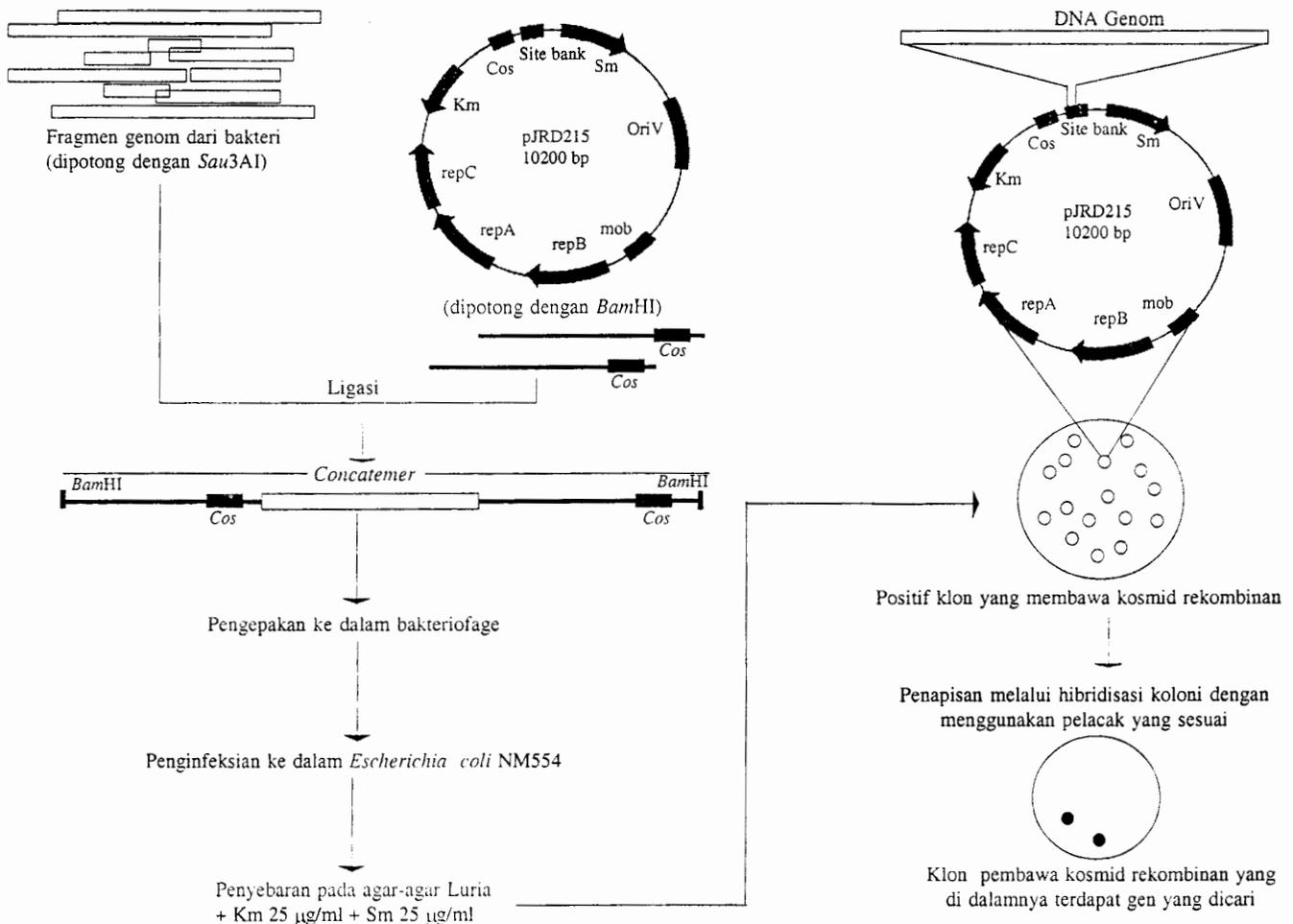
Perpustakaan gen dapat dibuat bergantung pada keperluan. Perpustakaan dapat dibuat dari jaringan tanaman atau hewan melalui sintesis cDNA (*complementary DNA*) dari mRNA, DNA genom, ataupun plasmid bakteri. Disamping itu perlu adanya pembawa atau vektor, dapat berupa bakteriofage P1, *P1 artificial chromosome* (PAC), *yeast artificial chromosome* (YAC), *bacterial artificial chromosome* (BAC), ataupun kosmid. Kosmid mampu menerima 30-45 kilo pasangan basa (kpb) fragmen genom, bakteriofage P1 dapat menerima 70-100 kpb, PAC mampu menerima 130-150 kpb, BAC mampu menerima 120-300 kpb, YAC mampu menerima 250-400 kpb (Evan 1999, Sambrook & Russell 2000). Pengintroduksian masing-masing rekombinan ke dalam sel atau inang dan cara penapisannya berbeda bergantung pada vektor yang digunakan (Tabel 1). Pemilihan vektor umumnya didasarkan pada ukuran fragmen DNA yang ingin diklon. Di dalam tulisan ini hanya akan diuraikan bagaimana mengonstruksi perpustakaan gen dari DNA genom dengan menggunakan kosmid sebagai vektor. Kosmid yaitu plasmid pembawa sekuen λ (*cos*) yang digunakan untuk pengepakan pada bakteriofage λ . Sekarang ini telah banyak dipasarkan kosmid atau bakteriofage λ dalam bentuk kit, jadi tidaklah terlalu sulit untuk mengonstruksinya. Kemurnian DNA genom yang akan diklon dan DNA vektor yang digunakan sangat menentukan dalam pembentukan *concatemer*, yang pada akhirnya akan sangat menentukan keberhasilan dalam mengonstruksi perpustakaan gen. Garis besar untuk mengonstruksi perpustakaan gen hingga didapatkan klon yang positif membawa gen yang dicari disajikan pada Gambar 1.

KOSMID SEBAGAI VEKTOR

Kosmid yang merupakan modifikasi plasmid pembawa kopi sekuen DNA (*cos sequence*) diperlukan untuk

Tabel 1. Vektor yang berkapasitas tinggi untuk pengklonan genom (Sambrook & Russell 2000).

Vektor	Kapasitas (kpb)	Replikon	Inang	Jumlah kopi	Introduksi ke dalam sel	Penapisan rekombinan	Perolehan kembali DNA yang diklon
Kosmid	30-45	ColE1	<i>Escherichia coli</i>	Tinggi	Transduksi	Tidak perlu	Ekstraksi dengan alkalin
PI	70-100	PI	<i>E. coli</i>	1 (dapat diamplifikasi)	Transduksi	<i>SacB</i>	Ekstraksi dengan alkalin
PAC	130-150	PI	<i>E. coli</i>	1	Elektroforasi	<i>SacB</i>	Ekstraksi dengan alkalin
BAC	120-300	F	<i>E. coli</i>	1	Elektroforasi	α -Komplementasi	Ekstraksi dengan alkalin
YAC	250-400	ARS	Khamir	1	Transformasi	<i>ade2</i>	Gel medan berpulsa



Gambar 1. Bagan alir dalam mengonstruksi perpustakaan gen hingga diperoleh klon pembawa kosmid rekombinan yang mengandung gen yang dicari.

pengepakan DNA ke dalam bakteriofage λ . Untuk mengklon ke dalam kosmid, fragmen DNA (sekitar 30-45 kpb) diisolasi dan diligasikan dengan vektor kosmid yang berbentuk linear secara *in vitro* dalam kondisi yang mendukung pembentukan struktur yang dinamakan *concatemer*, yaitu fragmen DNA yang diapit oleh kosmid dan dua *cos site* yang teratur dalam orientasi yang sama (Gambar 1). *Concatemer* ini akan menjadi substrat dalam pengepakan secara *in vitro* ke dalam bakteriofage λ dan *cos site* akan dipotong oleh fungsi *ter* dari bakteriofage λ dan DNA antara dua kosmid akan dipak di dalam bakteriofage λ . Dua sekuen *cos site* yang dipotong oleh fungsi *ter* dari bakteriofage λ berperan untuk menghasilkan molekul linear dengan bagian akhir ujungnya komplemen satu dengan yang lain. Setelah penginjeksian ke dalam sel bakteri, bagian ujung yang komplemen tadi akan dapat bersambung

dan direkatkan oleh DNA ligase dari inangnya sehingga akan menghasilkan molekul DNA rekombinan berbentuk sirkuler (Sambrook & Russell 2000). DNA rekombinan pembawa kopi yang lengkap dari vektor kosmid akan bereplikasi di dalam sel seperti halnya plasmid dan pembawa sifat resistensi terhadap antibiotik yang dibawa oleh kosmid tersebut. Dengan demikian bakteri yang membawa kosmid rekombinan dapat diseleksi dengan menggunakan media yang mengandung antibiotik yang sesuai (Seidman 1996). Kapasitas pengklonan pada kosmid merupakan fungsi dari ukuran DNA yang dapat dipak di dalam kepala bakteriofage λ dan ukuran dari vektor itu sendiri. Banyak kosmid dapat digunakan sebagai vektor, misalnya kosmid pLAFR1 (Friedman *et al.* 1982), pJRD215 (Davison *et al.* 1987), pWE15 (Stratagen 1993), SuperCos-1 (Stratagen 1998) dan pJB8 (Sambrook & Russell 2000).

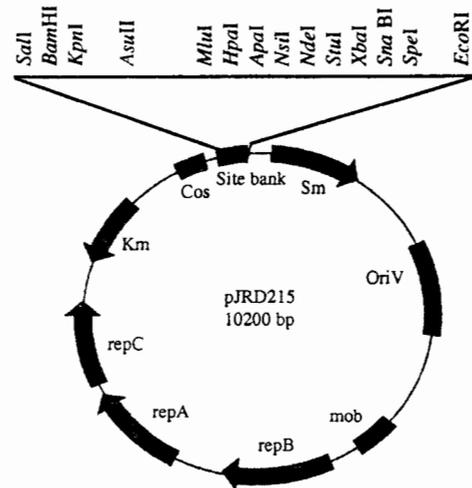
Pemilihan kosmid sebagai vektor bergantung pada keperluan atau tujuan dan juga stabilitasnya di dalam inang baru, misal selain *E. coli* sebagai inangnya. Hal ini penting untuk telaah komplementasi gen yang telah diklon ke dalam vektor. Berikut ini akan diberikan salah satu contoh penggunaan kosmid pJRD215 (Davison *et al.* 1987) sebagai vektor fragmen DNA genom bakteri (Gambar 2). Salah satu cara untuk mengonstruksi perpustakaan gen hingga didapatkan positif klon yang diinginkan diuraikan berikut ini.

PENYIAPAN DNA GENOM

Pada umumnya genom bakteri diekstrak dengan menggunakan metode standar (Wilson 1994). DNA genom yang telah diekstrak selanjutnya ditentukan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Apabila DNA genom tidak cukup murni maka perlu dipurifikasi dengan sentrifugasi cesium klorida (CsCl). Untuk keperluan konstruksi pustaka gen, DNA kira-kira 100 µg dipotong secara parsial dengan enzim restriksi tertentu, biasanya digunakan *Sau3AI* yang mengenali empat pasang basa, dalam total volume 1 ml. Jumlah enzim restriksi yang digunakan dalam waktu tertentu, di dalam pemotongan (dalam menit) dapat ditentukan melalui elektroforesis gel agarosa tiap selang waktu lima menit yang dilakukan hingga 60-90 menit. Berdasarkan uji coba ini maka dipilihlah jumlah enzim restriksi yang memotong selama waktu tertentu memberikan bobot molekul tinggi dan kira-kira hanya 20% total DNA terpotong sempurna. Setelah waktu dan konsentrasi enzim diketahui, 100 µg DNA genom dipotong kemudian difraksinasi dengan menggunakan sentrifugasi gradien sukrosa. Fraksi-fraksi yang sesuai kemudian disatukan dan dipresipitasi dengan etanol 100% dan dicuci dengan etanol 70%. Pelet DNA dikeringkan dengan evaporator dan selanjutnya dilarutkan ke dalam bufer Tris-EDTA (TE) pH 7.8 dan siap diligasi dengan kosmid vektor.

PENYIAPAN KOSMID pJRD215

Kosmid pJRD215 (10.2 kpb, Gambar 2) dapat diekstrak dari inangnya yaitu *E. coli* NM554 dengan metode lisis alkalin (Sambrook & russell 2000), namun biasanya ekstraksi dengan cara ini sering terkontaminasi dengan kromosom. Untuk itu kosmid yang telah diekstrak tersebut harus dimurnikan dengan sentrifugasi gradien CsCl yang dapat memisahkan antara kosmid dan kromosom. Kosmid selanjutnya dipisahkan dari kromosom dan dipurifikasi dengan 1-butanol dan dilakukan dialisis dalam 0.1% TE selama enam jam, kemudian dilanjutkan dialisis semalaman dengan menggunakan larutan TE baru. DNA selanjutnya dipresipitasi dengan etanol 100%, dicuci dengan etanol 70%, dan dikeringkan dengan evaporator serta kemudian dilarutkan dalam larutan TE pH 7.8. Kosmid yang telah murni kemudian dipotong dengan *Bam*HI dan difosforilasi dengan fosfatase alkalin dari bakteri (*bacterial alkaline phosphatase*) dengan mengikuti instruksi dari perusahaan pembuat (Toyobo atau Takara, Japan, atau yang lainnya). Hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya



Gambar 2. Peta kosmid pJRD215 (Davison *et al.* 1987).

ligasi sendiri (*selfligation*) antarkosmid. *Bam*HI dan *Sau3AI* merupakan enzim restriksi endonuklease yang kompatibel sehingga keduanya dapat disambungkan atau diligasikan.

LIGASI DAN PENGEPAKAN

Fragmen DNA genom bakteri (30-45 kb) yang telah dipotong secara parsial dengan *Sau3AI* diligasikan dengan kosmid pJRD215 yang telah dipotong dengan *Bam*HI. Reaksinya sebagai berikut:

Fragmen DNA genom (30-45 kpb)- <i>Sau3AI</i>	3.0 µg
pJRD215- <i>Bam</i> HI	3.0 µg
10 x bufer ligasi	2.0 µl
10 mM ATP	2.0 µl
DNA ligase T4	1-2 weiss unit
Akuades steril hingga total volume	20 µl.

Ligasi dilakukan pada suhu 15°C selama semalaman. Keberhasilan ligasi dapat diketahui dengan mengelektroforesis 2-4 µl hasil ligasi pada gel agarosa. Jika ligasi berhasil, bobot molekul DNA genom (*concatemer*) akan lebih tinggi dibandingkan sebelum ligasi. Nisbah molar sekitar 4 : 1 antara DNA vektor pJRD215 dan fragmen genom bakteri berukuran 30-45 kpb seperti di atas cukup baik untuk pembentukan *concatemer* yang akan digunakan dalam pengepakan bakteriofage λ. Nisbah molar tersebut tentunya dapat berubah bergantung pada ukuran DNA vektor yang digunakan.

Concatemer dapat dipak ke dalam bakteriofage λ dengan menggunakan *Giga pack III XL packaging extract* (dapat mengepak kosmid rekombinan berukuran 47 hingga 51 kpb) yang diproduksi oleh Stratagen (1999). Prosedur untuk pengepakan dan penginfeksi telah diterangkan oleh perusahaan pembuat. Setelah pengepakan ke dalam bakteriofage λ, selanjutnya *E. coli* NM554 diinfeksi ke dalam inangnya dan disebarkan pada agar-agar Luria yang mengandung kanamisin 25 µg/ml dan streptomisin 25 µg/ml. Koloni *E. coli* NM554 yang muncul pada media tersebut membawa kosmid rekombinan yang membawa fragmen genom bakteri. Dengan demikian, untuk mengetahui koloni

NM554 yang membawa gen atau DNA yang dicari perlu dilakukan penapisan melalui hibridisasi koloni dengan menggunakan pelacak DNA yang sesuai.

PENAPISAN PERPUSTAKAAN GEN

Koloni yang membawa kosmid rekombinan dan tumbuh pada agar-agar Luria yang mengandung kanamisin dan streptomisin dapat diseleksi menggunakan metode hibridisasi koloni dengan pelacak yang sesuai. Koloni tersebut dibuat replika pada media yang sama dan diinkubasi pada suhu 37°C semalaman (diameter koloni tidak lebih dari 2 mm), kemudian koloni ditransfer ke filter membran dan dilisis dengan NaOH. Fiksasi DNA pada membran dapat dilakukan dengan UV atau pemanasan pada suhu 120°C selama 30 menit. Prehibridisasi dilakukan selama enam jam, dan hibridisasi DNA dengan pelacak yang telah dilabel misalnya dengan digoksigenin (Boehringer Mannheim, Germany) biasanya dilakukan semalaman, serta deteksi hasil hibridisasi dapat dilakukan menggunakan film X-ray. Hasil hibridisasi yang positif menunjukkan bahwa koloni tersebut membawa kosmid rekombinan, yaitu mengandung DNA atau gen sesuai dengan pelacak yang digunakan. Untuk mengetahui ukuran fragmen genom yang terdapat pada kosmid rekombinan, kosmid tersebut diekstrak dari inangnya dan dipotong dengan enzim restriksi misalnya *SalI* dan *EcoRI*. Metode Sambrook & Russell (2000) dimodifikasi oleh penulis untuk mengekstrak kosmid rekombinan dan memperoleh hasil DNA yang cukup murni serta mudah untuk dipotong dengan enzim restriksi, tanpa melalui pemurnian dengan CsCl yang biasa digunakan. Koloni yang menunjukkan hibridisasi positif dengan pelacak yang digunakan, biasanya dikonfirmasi dengan hibridisasi *southern*. Kosmid rekombinan diekstrak dari *E. coli* dan kosmid dipotong dengan enzim restriksi *SalI* dan *EcoRI*, kemudian dilakukan hibridisasi *southern*. Dengan demikian,

koloni yang positif membawa gen yang dimaksud dapat ditelaah lebih lanjut, terutama gen yang terdapat dalam kosmid rekombinan, sesuai dengan maksud dan tujuan yang ingin dicapai, misalnya untuk analisis komplementasi atau analisis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Evan GA. 1999. Cosmids. Di dalam: Green ED, Birren B, Klapholz S, Myers RM, Hieter P (ed). *Genome Analysis. A laboratory manual*. Vol III. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr. hlm. 87-201.
- Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18:289-296.
- Sambrook J, Russell DW. 2000. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr. hlm. 1.31-4.23.
- Seidman JG. 1996. Construction of recombinant DNA library. Di dalam: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). *Current Protocol in Molecular Biology*. Vol I. New York: J Wiley. hlm. 5.0.3-5.11.2.
- Stratagen. 1993. PWE15 Cosmid Vector Kit. Instruction Manual. California: Stratagen Cloning System. hlm. 1-27.
- Stratagen. 1998. SuperCos-1 Cosmid Vector Kit. Instruction Manual. California: Stratagen Cloning System. hlm. 1-32.
- Stratagen. 1999. Gigapack III Gold packaging extract, Gigapack III Plus packaging extract, and Gigapack III XL packaging extract. Instruction Manual. California: Stratagen Cloning System. hlm. 1-14.
- Wahyudi AT, Suwanto A, Tjahjoleksono A, Imas T. 1998. Screening of acid-aluminium tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains: analysis of marker genes and competition in planta. *Asian Pacific J Mol Biol Biotechnol* 6:13-20.
- Wahyudi AT. 2000. Inverse Polymerase Chain Reaction. *Hayati* 7:121-123.
- Wilson K. 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. Di dalam: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). *Current Protocol in Molecular Biology*. Vol. I. New York: J Wiley. hlm. 2.4.1-2.4.5.