



PERHIMPUNAN MIKROBIOLOGI INDONESIA
(Indonesian Society for Microbiology)

PERTEMUAN
ILMIAH
TAHUNAN
2003

PROSIDING

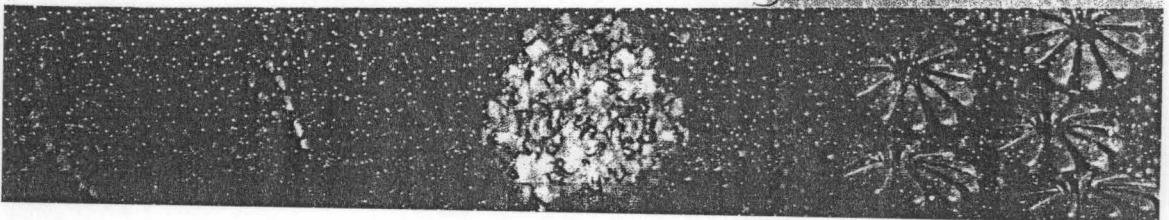
Volume II

BIDANG

KESEHATAN, INDUSTRI DAN LINGKUNGAN

*“Peran Mikrobiologi dalam Pemanfaatan
Biodiversitas Tropis bagi Pengembangan
Industri, Pertanian, Lingkungan
dan Pengendalian Penyakit”*

Bandung, 28-29 Agustus 2003



KONSTRUKSI MUTAN D802N PADA GEN DNA POL I *Bacillus thermoleovorans* ISOLAT LOKAL DENGAN PCR MEGAPRIMER

Laksmi Ambarsari, Maelita R. Moeis, Kosasih Padmawinata, dan Akhmaloka

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam – ITB

ABSTRAK

Gen yang mengkode DNA Pol I dari *Bacillus thermoleovorans* isolat lokal telah diklon dan ditentukan urutan nukleotidanya. Gen tersebut diekspresikan di *E. coli* dan mempunyai panjang 2631 bp yang mengkode 876 asam amino dengan berat molekul 97 KDa. Analisis homologi menunjukkan homologi yang tinggi dengan gen DNA polimerase pada bakteri dari kelompok *Bacillus caldotenax* (99%). Struktur-fungsi gen ini masih belum diketahui. Oleh sebab itu perlu dilakukan studi mutagenesis. Pada penelitian ini telah dilakukan mutasi terhadap salah satu asam amino yang lestari dengan menggunakan PCR megaprimer. Asam amino aspartat pada posisi 802 dimutasi menjadi asparagin. DNA Pol I mutan diperoleh setelah melalui dua kali proses PCR. Sedangkan untuk mengetahui keberhasilan mutasi dilakukan ligasi fragmen DNA hasil PCR ke dalam vector pGEM[®]-T, selanjutnya ditentukan urutan nukleotidanya. Dari penelitian ini diperoleh fragmen DNA dengan ukuran 2631 bp yang merupakan hasil amplifikasi PCR megaprimer. Sedangkan keberhasilan proses ligasi pada vector pGEM[®]-T ditunjukkan dengan hasil-hasil analisis restriksi dan hasil pengurutan nukleotida menunjukkan terjadinya mutasi.

PENDAHULUAN

Penelitian mengenai bakteri termofilik dan enzim yang dihasilkan telah mendapat perhatian pada beberapa tahun terakhir ini, karena merupakan topik yang menarik dalam mempelajari filogenetik, struktur-fungsi, serta sifat-sifat protein/enzim terutama termostabilitas dan termoaktivitasnya. Enzim termostabil umumnya diperoleh dari mikroorganisme termofilik. Enzim ini banyak digunakan di berbagai industri karena mempunyai sifat-sifat yang lebih menguntungkan dibandingkan enzim termolabil, antara lain: dapat bekerja pada suhu tinggi, dapat mencegah terjadinya kontaminasi serta mempunyai sifat ketahanan yang cukup tinggi terhadap peiarut organik (Zeikus *et al.*, 1998).

Enzim termostabil yang banyak digunakan dalam teknik biologi molekuler adalah DNA polimerase. Enzim ini digunakan dalam proses PCR (*Polimerase Chain Reaction*) yaitu suatu metode perbanyakkan (amplifikasi)

fragmen DNA secara *in vitro*. Pemanfaatan enzim ini sangat menguntungkan karena pada setiap siklus amplifikasi tidak diperlukan penggantian enzim (Adam dan Kelly, 1998).

Di dalam sel hidup, DNA polimerase mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses replikasi dan perbaikan kesalahan DNA (*repair*). Fungsi utama aktivitas enzim tersebut adalah mengkatalisis penambahan unit mononukleotida dari deoksiribonukleosida 5'-trifosfat (dNTP) pada ujung 3'-OH bebas suatu untai primer, dan dalam reaksi tersebut diperlukan satu untai DNA yang digunakan sebagai cetakan (*template*) yang mengarahkan enzim dalam menyeleksi nukleotida yang masuk. Enzim ini dicirikan sebagai enzim multifungsi yang umumnya terdiri atas tiga domain dan setiap domain mempunyai aktivitas katalitik, yaitu: aktivitas polimerase 5' → 3', aktivitas eksonuklease 3' → 5' dan aktivitas eksonuklease 5' → 3' (Joyce dan Steitz, 1994).

Semua polimerase yang sudah diketahui strukturnya mempunyai folding yang mirip

yaitu menyerupai tangan kanan yang terdiri atas tiga subdomain, yaitu: subdomain *palm*, *fingers*, dan *thumb*. Sisi aktif enzim ini tersusun dari 3 residu asam amino dengan gugus karboksilat (Asp pada motif A serta Asp dan Glu pada motif C) yang terletak pada subdomain *palm*. Residu asam-asam amino yang *conserved* pada motif A terdiri dari asam-asam amino DYSQIELR. Data struktural menunjukkan bahwa pada posisi tersebut residu asam-asam amino berinteraksi dengan dNTP yang masuk, berikatan dengan dua ion logam divalen, dan berinteraksi dengan subdomain *fingers* selama perubahan konformasi setelah terikatnya dNTP (Patel dan Loeb, 2000). Sedangkan residu asam-asam amino pada motif C terdiri dari asam-asam amino QVHDEL. Atom-atom oksigen dan nitrogen pada rantai samping dari residu tersebut sedikitnya akan membentuk satu ikatan hidrogen atau pasangan ion untuk menstabilkan konformasi β (Kiefer *et al.*, 1997).

Dalam penelitian ini akan dilakukan studi struktur-fungsi DNA polimerase I yang berasal dari bakteri termofilik isolat lokal. Bakteri tersebut diisolasi dari kawah Cimanggu, dan diidentifikasi sebagai *Bacillus thermoleovorans*. Gen DNA polimerase yang berasal dari bakteri ini telah berhasil diklon dan diekspresikan dalam sel *E. coli* (Pramono, komunikasi pribadi) yang terdiri dari 876 residu asam-asam amino dengan massa molekul sekitar 90 kDa serta mempunyai homologi yang tinggi dengan DNA polimerase dari *Bacillus caldotenax*. Dengan membandingkan urutan asam aminonya dengan struktur DNA polimerase yang sudah diketahui (DNA polimerase dari *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus*, dan *Klenow Fragment* dari *E. coli*), DNA polimerase dari bakteri termofilik lokal termasuk di dalam kelompok DNA polimerase I (Poi I) atau famili A. Residu asam-asam amino dengan gugus karboksilat yang lestari

pada sisi aktif polimerase, ditunjukkan pada residu Asp 653 pada motif A (homolog dengan Asp 705 pada *E. coli* dan Asp 653 pada *B. stearothermophilus*), serta residu Asp 830 dan Glu 831 pada motif C (homolog dengan Asp 882 dan Glu 883 pada *E. coli* serta Asp 830 dan Glu 831 pada *B. stearothermophilus*). Residu asam amino lainnya yang juga lestari adalah Glu 658 dan Asp 802.

Studi struktur-fungsi DNA polimerase merupakan dasar untuk memahami mekanisme polimerisasi serta mengetahui sifat-sifat biokimia enzim, terutama untuk DNA polimerase yang baru ditemukan/diisolasi. Hingga saat ini informasi mengenai asam-asam amino yang bertanggung jawab dalam pembentukan struktur atau fungsi katalitik pada DNA polimerase dari bakteri termofilik lokal belum banyak diteliti. Oleh sebab itu studi mengenai struktur-fungsi DNA polimerase masih perlu dilakukan. Untuk mengetahui fungsi dari asam-asam amino tersebut maka dilakukan mutasi melalui mutagenesis terarah dengan metode PCR.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengkonstruksi gen DNA polimerase mutan pada residu asam amino yang lestari terutama pada domain polimerase. Penelitian ini dilakukan berdasarkan hipotesis bahwa mutasi pada asam amino lestari dapat mengakibatkan perubahan terhadap aktivitas enzim.

Gen mutan DNA polimerase diperoleh setelah melalui dua kali proses PCR dengan menggunakan tiga primer yang terdiri dari 1 primer mutan dan sepasang primer yang mempunyai sisi pemotongan enzim yang masing-masing terletak pada ujung - N dan ujung - C gen DNA polimerase. Fragmen DNA mutan yang diperoleh selanjutnya disisipkan pada vektor kloning pGEM[®]-T kemudian dilakukan karakterisasi dan ditentukan urutan nukleotidanya untuk memastikan bahwa gen tersebut telah termutasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan

Semua bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas pro-analisis, kecuali disebutkan lain. *Escherichia coli* JM109 digunakan sebagai sel inang untuk memperbanyak DNA plasmid. Plasmid pGEM[®]-T digunakan untuk mengklon fragmen DNA hasil PCR. Plasmid pITB₉ merupakan plasmid ekspresi (pTrxFus) yang membawa gen DNA polimerase *wild type* (WT). Enzim restriksi yang terdiri dari BamHI, KpnI, EcoRI.

Cara Kerja

Peremajaan *E.coli*

E.coli GI724 yang membawa gen DNA polimerase WT digoreskan dalam medium RMG-A (1 X M9 salts, 2% *casamino acid*, 0,5% glukosa, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml ampicilin, dan 1,5% *bacto-agar*) langsung dari stok gliserol kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 12-16 jam.

Studi Homologi Gen DNA Polimerase

Gen yang mengkode DNA polimerase telah ditentukan urutan nukleotidanya. Analisis lebih lanjut adalah urutan nukleotida tersebut dihomologikan dengan urutan nukleotida gen lain yang terdapat di GENBANK. Kesesuaian urutan dapat dibandingkan pada tingkat urutan nukleotida maupun urutan asam-asam aminonya. Selanjutnya dengan membandingkan asam-asam amino atau struktur sekunder yang sama pada struktur yang telah diketahuian diperoleh residu asam-asam amino yang lestari terutama pada sisi aktif polimerase.

Mutasi D802N

Mutasi dilakukan pada gen DNA polimerase yang telah di klon pada vektor ekspresi pTRxFus dengan cara mutasi terarah menggunakan PCR. Untuk mendapatkan satu urutan gen DNA mutan diperlukan 3 buah primer dengan melalui 2 kali proses PCR. Primer mutan dirancang sesuai dengan urutan cetakan DNA dan letak basa yang akan dimutasi dengan menggunakan program komputer *Primer Detective*, sedangkan untuk

menentukan spesifitas primer digunakan program Genmon versi 4.1 Urutan primer yang digunakan untuk mutasi dengan PCR megaprimer adalah:

FPK:5'GGTACCAATGAAAAAAAAAGCTT
GTTTTAATC-3'

RPB:5'GGATCCTTTATGTCGCGTCATAC
C-3'

FM-802:5'-CAAGGGAGCGCCGCTAAC
ATT ATT-3'

Untuk memastikan bahwa mutasi terjadi pada tempat yang diharapkan, maka ditentukan urutan nukleotidanya dengan menggunakan *Automatic DNA Sequencer* (ABI Prisma).

Isolasi DNA plasmid, elektroforesis gel agarosa, pemotongan DNA dengan enzim restriksi, pemurnian DNA, serta ligasi dilakukan dengan menggunakan metode standar (Sambrook & Russell, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Asam amino yang Lestari

Untuk menentukan residu asam amino yang akan dimutasi, maka terlebih dahulu perlu dilakukan studi homologi dan identifikasi residu asam amino yang potensial. Umumnya asam amino yang dimutasi merupakan asam-asam amino yang lestari (*conserved*). Pada penelitian ini identifikasi asam amino dilakukan pada domain polimerase, yang diperoleh dengan cara membandingkan urutan asam-asam amino yang sama dengan DNA polimerase yang sudah diketahui strukturnya. Residu asam-asam amino yang lestari merupakan sasaran untuk studi mutasi. Studi homologi ini dilakukan dengan bantuan program PREDICTPROTEIN melalui situs internet dengan alamat www.embl-heidelberg.de/predictprotein/submit_def.html. Hasil peninjauan menunjukkan bahwa gen DNA polimerase *wild-type* (dari *Bacillus thermoleovorans* isolat lokal) mempunyai homologi tertinggi dengan DNA polimerase dari *Bacillus caldotenax* (99%) (data tidak ditampilkan) dan residu asam-asam amino yang lestari ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Residu asam – asam amino yang lestari (*conserved*) pada Domain Polimerase dari *Bacillus thermoleovorans* isolat lokal

<i>E.coli</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	DNA pol WT
R 668	R 615	R 615
R 682	R 629	R 629
D 705	D 653	D 653
E 710	E 658	E 658
Y 766	Y 714	Y 714
N 854	N 793	N 793
Q 849	Q 797	Q 797
D 854	D 802	*D 802
H 881	H 829	H 829
D 882	D 830	D 830
E 883	E 831	E 831

Keterangan : - Asam amino yang dicetak dengan huruf tebal merupakan sisi aktif dari DNA polimerase
 - *D 802, asam amino yang dimutasi

Dari Tabel 1 terlihat residu asam – asam amino yang mengandung gugus karboksilat antara lain: Asp 653, Glu 658, Asp 830, Glu 831, dan Asp 802. Sedangkan gugus karboksilat yang dicetak dengan huruf tebal merupakan sisi aktif DNA polimerase yang merupakan daerah yang lestari untuk semua DNA polimerase yang sudah diketahui struktur kristalnya (Patel & Loeb, 2000).

Mutagenesis terarah dengan PCR Megaprimer

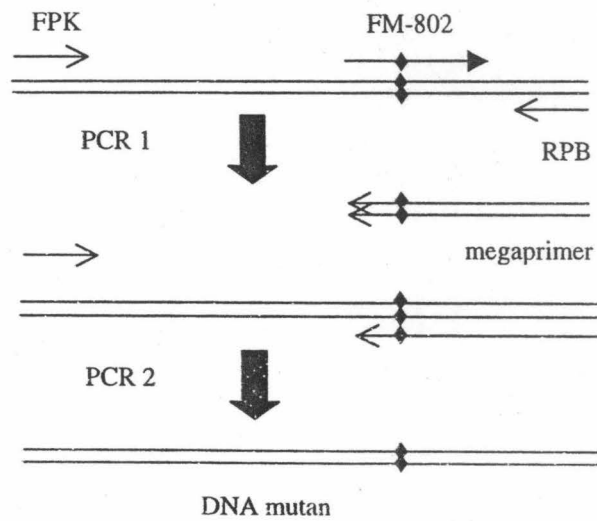
Gen DNA polimerase mutan diperoleh setelah melalui dua kali proses PCR. PCR pertama dilakukan amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan primer mutan FM-802 dan primer RPB sehingga akan dihasilkan amplicon dengan ukuran sekitar 200 pb (Gambar 2). Amplicon ini disebut sebagai megaprimer dan digunakan dalam proses PCR berikutnya. PCR kedua, amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan primer FPK dan hasil PCR pertama (megaprimer) sehingga dihasilkan amplicon dengan ukuran sekitar 2600 pb (Gambar 2). Amplicon ini merupakan gen pengkode DNA polimerase yang telah termutasi. Dalam penelitian ini tidak dilakukan perancangan terhadap primer FPK dan RPB, karena kedua primer tersebut telah tersedia dan merupakan hasil perancangan dari kelompok peneliti lainnya (Pramono,

komunikasi pribadi). Pada primer FPK terdapat sisi pemotongan *KpnI* sedangkan primer RPB *BamHI*. Perancangan primer hanya dilakukan pada primer mutan FM-802. Hasil analisis tidak menunjukkan adanya *cross homology* dan *misspriming* dengan urutan gen DNA polimerase, *self homology* terjadi dengan posisi tumpang tindih pada ujung 5' dan posisi lainnya terjadi tumpang tindih ditengah-tengah urutan primer. Strategi untuk mendapatkan gen mutan seperti terlihat pada Gambar.1.

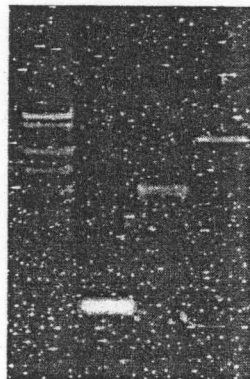
PCR 2 (gen pengkode DNA polimerase mutan) selanjutnya dimurnikan dan diligasikan dengan vektor pGEM[®]-T sehingga diperoleh plasmid rekombinan dan plasmid tersebut digunakan untuk mentransformasi *E.coli* JM109. Transforman yang diduga mengandung plasmid pGEM[®]-T rekombinan dikarakterisasi dengan melakukan analisis restriksi terhadap DNA plasmidnya. Restriksi dengan enzim *EcoRI* menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 4973 pb dan 627 pb, pemotongan dengan *KpnI* maupun *BamHI* akan menghasilkan plasmid yang linier masing-masing dengan ukuran 5600 pb, dan pemotongan dengan dua enzim restriksi *KpnI* dan *BamHI* menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 3000 pb dan 2600pb (Gambar 3).

Berdasarkan analisis restriksi hanya ada satu klon saja yang sesuai dengan pola pemotongan enzim. menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 4973 pb dan 627 pb, pemotongan dengan *KpnI* maupun *BamHI* akan menghasilkan plasmid yang linier dengan ukuran 5600 pb, dan pemotongan dengan dua enzim restriksi *KpnI* dan *BamHI* menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran

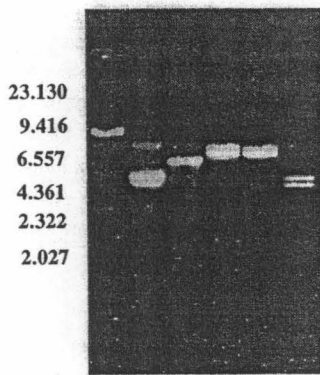
3000 pb dan 2600pb. Untuk memastikan bahwa gen pengkode DNA polimerase telah termutasi maka setelah diisolasi plasmidnya, ditentukan kembali urutan nukleotidanya. Dalam penentuan ini DNA plasmid dari gen pengkode DNA polimerase *wild-type* digunakan sebagai templat/cetakan. Hasilnya asam amino Aspartat pada posisi 802 telah termutasi menjadi Asparagin (Gambar 4).



Gambar 1. Strategi PCR megaprimer. Primer FM-802 merupakan primer yang mengandung asam amino yang sudah dimutasi. Amplifikasi dengan menggunakan primer FM-802 dan Primer RPB akan menghasilkan amplicon megaprimer. Amplifikasi primer FPK dengan megaprimer akan menghasilkan gen pengkode DNA polimerase mutan.



Gambar 2. Elektroforegram hasil PCR.
 1. DNA λ Hind III,
 2. Hasil PCR 1 (± 200 bp),
 3. Hasil PCR 2 (± 2630 bp),
 4. Templat/plTB₉ (± 6230 bp)



Gambar 3. Elektroforegram hasil analisis restriksi plasmid pGEM-T rekombinan yang termutasi.

1. Marker DNA λ /HindIII,
2. DNA plasmid termutasi uncut,
3. DNA plasmid termutasi/EcoRI,
4. DNA plasmid termutasi/KpnI
5. DNA plasmid termutasi/BamHI
6. DNA plasmid termutasi/KpnI dan BamHI.

1)GAACACGCCGATTCAAGGGAGCGCCGCTGACATTATTA AAAAGGCGATGATCGATCTGAACGCCAGACT
GAAGGAAGAGC

2)GAANACGCCGATTCAAGGGAGCGCNGCTAA CATTATTA AAAAGGCGATGATNGATNTGAACGCCAGAC
TGAAGGAAGAGC

1)GGCTGCAAGCGCGCCTTTTGCTACAGGTGCATGACGAGCTCATTTTGGAGGCGCCGAAAGAAGAGATGG
AGCGGCTGTGC

2)GGCTGCAAGCGCGCCTTTTGCTACAGGTGCATGANGAGCTCATTTTGGAGGCGCCGAAAGAAGAGATGG
AGCGGCTGTGC

1)CGGCTCGTTCGGGAAGTGATGGAGCAAGCGGTCACACTTCGCGTGCCGCTCAAAGTCGATTACCATTAT
CGCTCGACGTG

2)CGGCTNGTTCGGGAAGTGATGGAGCAAGCGGTCACANTTCGCGTGCCGCTCAAAGTCGATTACCATTAT
CGCTCGACGTG

Gambar 4. Urutan nukleotida gen pengkode DNA polimerase mutan.

- 1). Urutan nukleotida yang berasal dari gen DNA polimerase *Wild type*.
- 2). Urutan nukleotida yang berasal dari gen DNA polimerase mutan.
Yang dicetak dengan huruf tebal adalah residu asam amino aspartat (GAC) yang dimutasi menjadi asparagin (AAC).

KESIMPULAN

Mutasi D802N pada gen DNA polimerase *Bacillus thermoleovorans* dengan PCR megaprimers telah berhasil dikonstruksi.

Berdasarkan penentuan urutan nukleotidanya terjadi mutasi titik pada residu asam amino aspartat (GAC) menjadi asparagin (AAC).

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.W.W., dan R.M. Kelly. (1998). Finding and Using Hyperthermophilic Enzymes. *Tibtech*. **16**: 329 –332.
- Gangurde, R., N. Kaushik, K. Singh, dan M.J. Modak .(2000). A Carboxylate Triad Is Essential for the Polymerase Activity of *Escherichia coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment). *J. Biol. Chem.* **275**:19685 – 19692.
- Joyce, C.M. dan T.A. Steitz. (1994). Function And Structure Relationships In DNA Polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:773 – 822.
- Kiefer, J.R., C. Mao, C.J. Hansen, S.L. Basehore, H.H. Hogrefe, J.C. Braman, dan L.S. Beese. (1997). Crystal Structure of a Thermostable *Bacillus* DNA Polymerase I Large Fragment at 2.1 Å Resolution. *Structure* **5**:95-108.
- Kiefer, J.R., C. Mao, J.C. Braman, dan L.S. Beese. (1998). Visualizing DNA Replication in a Catalytically Active *Bacillus* DNA polymerase Crystal. *Nature* **39**:304-307.
- Kornberg, A., dan T.A. Baker. (1992). DNA Replication. Edisi 2. W.H. Freeman and Company. New York.
- Polymerase Active Site of *Escherichia coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment). *J. Biol. Chem.* **274**:3067 – 3075.
- Newton, C.R. dan A. Graham . (199). *introduction to Biotechniques*. Scientific Publisher Limited, Oxford.
- Patel, P.H. dan L.A. Loeb. (2000). DNA Polymerase Active Sites is Highly Mutable: Evolutionary Consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5095 – 5100.
- Steitz, T.A. (1999). DNA Polymerase: Structural Diversity and Common Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**: 17395 – 17398.
- Uemori, T., Y. Ishino, H. Doi, dan I. Kato. (1995). The Hyperthermophilic Archaeon *Pyrodictium occultum* Has Two α -Like DNA Polymerase. *J. Bacteriol.* **177**:2164-2177.
- Uemori, T., Y. Ishino, K. Fujita, K. Asada, dan I. Kato. (1993). Cloning of the DNA Polymerase Gene of *Bacillus caldotenax* and Characterization of the Gene product. *J. Biochem.* **113**:401 – 410.
- White, B.A. (1997). “ PCR Cloning Protocols”. Human Press. New jersey. P:3-15
- Zeikus, J.G., C. Vieille, A. Savchenko. (1998). Thermozyms: Biotechnology and Structure-Function Relationships, *Extremophiles*, **2**:79-183.