IDENTIFIKASI GEN BABI MELALUI RUNUTAN KLON cDNA OVARI

Jakaria[1] & K. Suzuki[2]
[1] *Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia*
[2] *Staff Institute-Tsukuba, Japan*
(Diterima 14-11-2002; disetujui 04-02-2003)

ABSTRACT

An expriment was conducted to sequence porcine ovary full-length cDNA clone. Ten clones were sequenced and randomly selected for DNA homology. It showed high similarity to human Expression Sequence Tag (ESTs). The sequence of cDNA clones mactched were known as RABLY, ARL6IP4, FBLN1, TUBA2, ATP5F1, GNAI2 and RFC5 genes. Average full-length of sequence is about 700 bp, wheares homology percentage are 73.5%, 77.9%, 85.2%, 94.5%, 85.5%, 92.4% and 87.6% repectively.
***Key words*: porcine, cDNA, sequencing**

PENDAHULUAN

Isolasi dan karakterisasi gen merupakan salah satu upaya yang diharapkan bermanfaat dalam menentukan dan mempelajari gen-gen yang mengontrol sifat-sifat ekonomis maupun penyakit genetik. Analisis DNA dilakukan tidak hanya DNA yang terdapat di dalam inti akan tetapi juga yang terdapat di sitoplasma yaitu *massenger*RNA. *Massenger*RNA merupakan produk gen yang memiliki untai tunggal (*single strand*) dan melalui proses bantuan enzim *RNaseH* dapat dibentuk menjadi *complementary*-(c)DNA yang memiliki untai ganda (Griffith, *et al.* 1991).

Informasi runutan cDNA sangat penting dilakukan yaitu untuk menentukan dan mengidentifikasi gen, juga untuk menganalisis struktur dan fungsi gen (Suzuki, *et al.* 1997). Sebagai tahap awal, maka dilakukan runutan klon cDNA yang berasal dari ovari babi yang telah dikonstruksi oleh Suzuki *et al.* (2000). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen babi melalui uji kesamaan hasil runutan cDNA yang berasal dari babi dengan runutan EST (*Expected Sequence Tag*) manusia.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laborarium *Society for Techno-innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries* (STAFF) *Institute*, Tsukuba-Japan pada bulan Agustus s/d November 2002.

Kultur Bakteri *E.coli*

Bakteri *E.coli* yang telah disisipkan cDNA yang dikonstruksi oleh Suzuki *et al.* (2000) dibiakkan di dalam cawan kultur. Sebanyak 25 ml media Luria Bertani (LB) Agar yang telah ditambahkan antibiotik dimasukkan ke dalam cawan kultur dan dibiarkan sampai mengeras, kemudian 1 ml biakan *E.coli* disebarkan ke dalam cawan yang berisi LB Agar tersebut. Cawan biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam di dalam inkubator. Bakteri *E.coli* yang tumbuh dengan baik akan menyebar rata menutupi permukaan biakan dan kemudian klon bakteri tersebut satu persatu di ambil dan dimasukkan ke dalam cawan/*plate* mikrotiter yang berisi LB Gliserol yang ditambah antibiotik. Klon bakteri *E.coli* kemudian disimpan pada suhu -80°C untuk analisis selanjutnya.

Purifikasi dan Ekstraksi Plasmid cDNA

Klon bakteri *E.coli* yang disimpan pada suhu -80°C diambil dan dibiarkan sampai mencair, kemudian di tumbuhkan kembali pada cawan kultur yang berisi 1,2 ml media LB Gliserol yang telah ditambah antibiotik dengan menggunakan sisir biakan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam di dalam inkubator bergoyang (*shaker*). Selanjutnya, bakteri *E.coli* (*plasmid*) dipurifikasi dan di ekstrasi dengan metode yang disarankan oleh Sambrook *et al.* (1989). Untuk mencek konsentrasi plasmid cDNA dilakukan *elektroforesis* dengan 1% agarose.

Perunutan Plasmid cDNA

1. **Templet dan PRC (*Polymerase Chain Reantion*)**

Templet (sampel cDNA) dan dH_2O sebanyak 12 µl dicampur dengan 8 µl larutan *reaction mix* yang terdiri atas 800 µl *big dDye terminator*, 1200 µl dH_2O, 1200 µl 5x bufer runutansing dan 14,4 µl 100 pM primer M13 untuk 400 kali larutan *reaction mix.*

Kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam *plate* PCR.

PRC dijalankan dengan kondisi awal 96ºC selama 5 menit untuk satu siklus, kemudian 30 siklus untuk tahap denaturasi pada suhu 96ºC selama 10 detik, *aneling* 50ºC selama 30 detik dan ekstensi 60ºC selama 4 menit serta perpanjangan (*elongition*) pada suhu 4ºC.

2. Purifikasi Templet dengan *Millipore Multiscreen* 4550

Untuk purifikasi templet cDNA dilakukan beberapa tahap yaitu, (1) masukkan sehadex G50 Superfine ke dalam kolum secara merata dan kemudian tuang ke dalam *Multi Screen* 4550 *plate*, (2) masukkan 300 µl dH_2O ke dalam *Multi Screen* 4550 *plate* yang berisi sehadex G50 Superfine dan kemudian inkubasi selama 3 jam, (3) sentrifugasi dengan kecepatan 2300 rpm selama 5 menit dan larutan dibuang, (4) masukkan kembali 20 µl dH_2O ke dalam *Multi Screen* 4550 *plate* dan tambahkan 20 µl sampel (*template*) dari produk PCR, (5) Sentrifugasi dengan kecepatan 2300 rpm selama 5 menit dan larutan ditampung dengan *sequencing plate*, dan (6) lakukan pengeringan di dalam *vacuum dryer* SAVANTselama 1 jam. Sampel cDNA (*template*) siap untuk dianalisis runutannya.

3. Analisis Runutan cDNA

Sebelum analisis perunutan, masukkan 20 µl *high quality dionize* (HD) ke dalam *sequencing plate* yang berisi sampel/templet dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 detik. Analisis runutan cDNA dijalankan menggunakan mesin runutan DNA ABI3730XL (*Applied Biosystems*) dengan sistem *BigDye* Ver. 3. Hasil runutan disimpan di dalam data komputer dan dapat dicetak untuk mendapatkan hasil analisis yang lebih jelas.

Uji Kesamaan Runutan cDNA

Kesamaan gen babi dengan gen manusia dilakukan dengan memasukkan runutan cDNAhasil sekuensing menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) atau FASTA (altschul *et al.*, 1990) (http://www.ncbi.nhl.nih.gov), sedangkan penentuan lokasi gen di kromosom menggunakan program NCBI locusLink (http://www.ncbi.nhl.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi/). Selanjutnya derajat kesamaan antara runutan cDNA babi dengan runutan EST (*Expression Sequence Tag*) manusia dibandingkan dengan program komputer Genetix MAX ver.11.

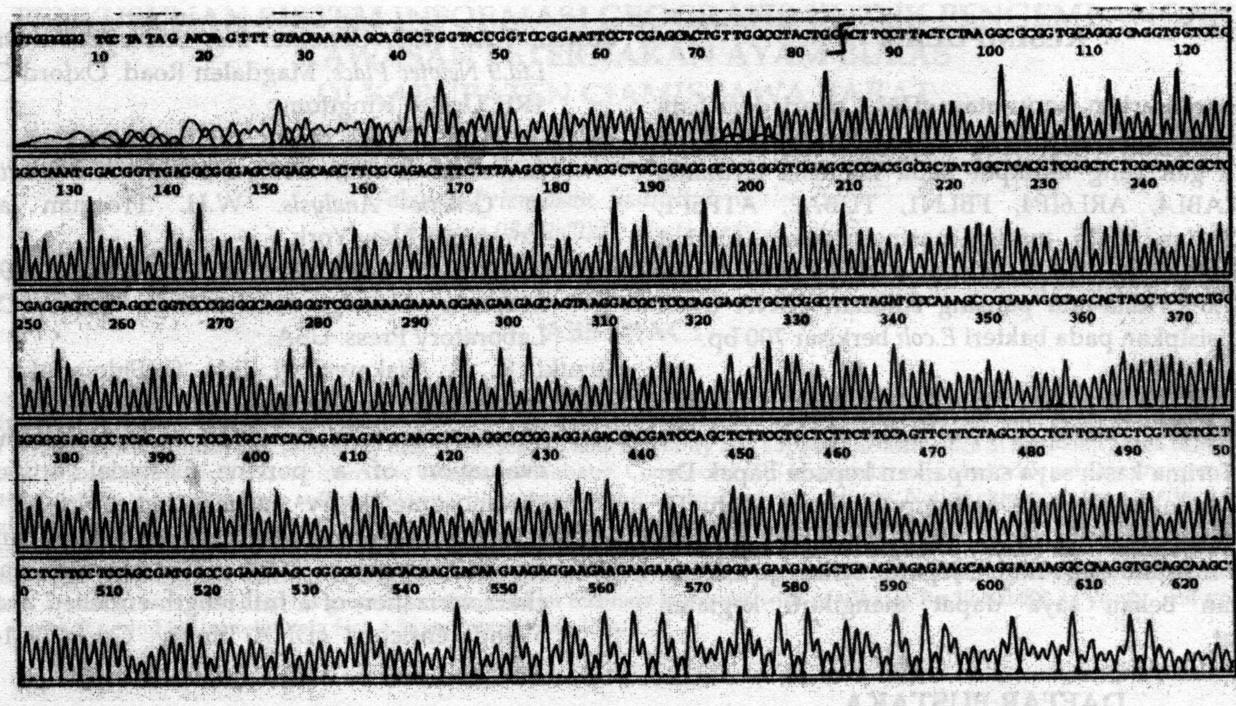
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis perunutan cDNA yang berasal dari ovari babi diperoleh rata-rata panjang fragmen cDNA adalah sekitar 700 bp. Hasil sisipan cDNA yang dimasukkan ke dalam vektor pCMCFL3 bakteri *E.coli* dapat dikenal dengan jelas (**Gambar 1**). Dari 10 klon cDNA yang dirunut, terdapat 7 klon cDNA yang memiliki gen yang mirip dengan gen manusia (**Tabel 1**) yaitu gen dengan simbol RABL4, ARL6IP4, FBLN1, TUBA2, ATP5F1, GNAI2 dan RFC5, sedangkan 3 klon tidak dikenal atau tidak ditemukan kesesuain dengan gen manusia.

Uji kesamaan runutan cDNA dengan runutan EST manusia dikatakan memiliki kesamaan tinggi apabila memiliki nilai skor homologi lebih dari 200 (Suzuki, 2002; komunikasi langsung). Berdasarkan **Tabel 1** diperoleh bahwa terdapat 7 gen yang dikenal memiliki kemiripan yang sangat tinggi antara runutan cDNA babi dengan ESTs manusia dan hanya 3 klon/runutan cDNA yang tidak dikenal gennya dan memiliki tingkat kemiripan yang rendah (skor homologi< 200). Klon nomor 20A08 memiliki skor homologi 797 (>200), akan tetapi tidak ditemukan gen yang dapat dikenal. Hal ini mungkin disebabkan karena ESTs manusia yang terlalu panjang runutannya.

Derajat kesamaan antara gen babi dengan gen yang terdapat pada manusia dari hasil uji homologi terhadap 7 gen yang diidentifikasi masing-masing adalah gen RABL4 73,5%, ARL6IP4 77,9%, FBLN1 85,2%, TUBA2 94,5%, ATP5F1 85,5%, GNAI2 92,4% dan RFC5 87,6%. Berdasarkan hasil tersebut memperlihatkan bahwa kesamaan gen babi dan gen manusia cukup tinggi yaitu dari 73,5% s/d 92,4% dari hasil perunutan cDNA yang berasal dari ovari. Semakin tinggi persentase kesamaan atau homologinya berarti gen tersebut, baik gen babi maupun gen manusia semakin memiliki kemiripan runutan DNAnya dan sebaliknya, semakin rendah persentasi homologinya berarti semakin sedikit runutan DNA yang memiliki kemiripan.

Pada manusia, lokasi gen di kromosom untuk gen RABL4 terletak di 22q13.1, ARL6IP4 terletak di 12q24.31, FBLN1 terletak di 22q13.31, TUBA2 terletak di 13q11, ATP5F1 terletak di 1p12, GNAI2 terletak di 3p21 dan RFC5 terletak di 12q24.2-q24.3 (http://www.ncbi.nhl.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi/). Lokasi gen di kromosom dapat ditentukan dengan melakukan analisis FISH (*Fluorescence In-situ Hybridization*) (Brown, 1999).



Keterangan: merah = basa timin (T), hijau = basa adenin (A), hitam = basa guanin (G), biru = basa sitosin (C)

Gambar 1. Hasil runutan cDNA ovari babi yang disisipkan di bakteri E.coli

Gen merupakan bagian atau segmen dari genom yang diterjemahkan ke dalam bentuk RNA. Bagian gen yang menyandi protein disebut daerah transkripsi atau ORF (*Open Reading Frame*) yang menentukan produk asam amino menjadi protein menurut kaidah kode genetik. Perunutan cDNA yang berasal dari mRNA merupakan salah satu upaya yang dilakukan untuk mengungkap gen-gen yang bekerja atau menyandi terhadap ekspresi tertentu. Brown (1999) menyatakan bahwa sebagian besar DNA adalah merupakan DNA bukan gen dan diperkirakan hanya sekitar 5% DNA dari total genom manusia adalah gen yang artinya dapat menyandi atau mengkode protein. Oleh karena itu, identifikasi baik pada DNA yang bersifat gen maupun bukan gen merupakan suatu hal yang sangat penting dilakukan.

Tabel 1. Gen yang dikenal berdasarkan uji kemiripan dengan gen manusia

No. Klon cDNA	Nama gen	Simbol gen	Skor homologi
20A01	RAB, anggota RAS oncogene family-like4	RABL4	450
20A02	ADP-ribosylation-likefactor6 interacting protein4	ARL6IP4	240
20A03	Fibulin 1	FBLN1	373
20A05	Tubulin alpha 2	TUBA2	1104
20A06	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F0 complex, sub-unit 6, isoform 1	ATP5F1	640
20A07	*	*	96
20A08	*	*	797
20A09	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	852
20A10	Reflication factor C1	RFC5	728
20A11	*	*	92

Keterangan: * tidak kenal runutan DNAnya terhadap suatu gen yang berasal dari EST manusia

KESIMPULAN

Berdasarkan perunutan cDNA ovari dari babi ditemukan gen-gen yang memiliki kesamaan tinggi dengan gen yang terdapat pada manusia terutama gen RABL4, ARL6IP4, FBLN1, TUBA2, ATP5F1, GNAI2 dan RFC5 masing-masing dengan tingkat kesamaan 73,5%, 77,9%, 85,2%, 94,5%, 85,5%, 92,4% dan 87,6%. Rata-rata panjang runutan cDNA ovari yang disisipkan pada bakteri *E.coli* berkisar 700 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya sampaikan kepada bapak Dr. Ir. Muladno, MSA dan Dr. Ronny R. Noor, M.Rur.Sc yang telah merintis kerja sama penelitian dengan STAFF Institute di Tsukuba, Jepang, sehingga melalui kebaikan beliau saya dapat mengikuti kegiatan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Mayers E.W., & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Mol.* Biol. 215:403-410.

Brown, T.A., 1999. Genome. *Bios Sciencific Publisiers Ltd.9 Newtec Place*. Magdalen Road. Oxford Ox4 1RE. United Kingdom.

Griffith, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R. C. Lewontin, & M.W. Gelbert, 1993. *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Company. New York.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning; a Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press. USA.

Suzuki, K., S. Asakawa, M. Iida, S. Shimanuki, N. Fujishima, H. Hiraiwa, Y. Murakami, N. Shimizu, & Y. Yasue. 2000. Contruction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Animal Genetics* 31:8-12.

Suzuki Y., K.Y. Nakagawa, K. Murayama, S. Suyama, & S. Sugano. 1997. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end- enriched cDNA library. *Gene* 200:149-156.