

## ULASAN

### *Inverse Polymerase Chain Reaction*

ARIS TRI WAHYUDI

*Jurusan Biologi, FMIPA Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*

Diterima 3 Juli 2000/Disetujui 3 Agustus 2000

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu teknik untuk mengamplifikasi sekuens *deoxyribonucleic acid* (DNA) tertentu secara enzimatik tanpa menggunakan prosedur-prosedur kloning yang dilakukan secara konvensional. Keterbatasan utama dari PCR secara praktis yaitu sekuens DNA yang diamplifikasi berada di antara dua primer yang konvergen. Primer adalah suatu oligonukleotida (biasanya antara 16 hingga 30 nukleotida) yang dapat digunakan untuk mengawali dalam mengamplifikasi sekuens DNA. Namun demikian, teknik ini mendasari pengembangan teknik lain yang memungkinkan untuk mengamplifikasi sekuens DNA yang mengapit sekuens DNA lain yang telah diketahui sekuennya. Beberapa metode untuk mengamplifikasi sekuens DNA yang mengapit segmen DNA yang telah diketahui sekuennya akan mempunyai beberapa kegunaan dalam aplikasi genetiknya (Ochman *et al.* 1988). Sebagai contoh aplikasi yang mencakup identifikasi yang relatif mudah dari sekuens DNA yang diakibatkan oleh penyisipan dari elemen loncat (*transposable element*). Elemen loncat adalah suatu fragmen DNA yang dapat meloncat dan menyisip pada genom organisme, contohnya antara lain transposon. Transposon, yang umumnya telah diketahui sekuennya, memungkinkan untuk mengamplifikasi sekuens DNA yang mengapitnya. Untuk hal ini teknik *inverse polymerase chain reaction* (IPCR) dapat digunakan untuk mengamplifikasinya secara *in vitro* secara relatif cepat dan mudah untuk mengisolasi sekuens DNA yang mengapit transposon tersebut (Martin & Mohn 1999).

Amplifikasi sekuens DNA dengan PCR pada dasarnya menggunakan primer-primer yang berhibridisasi pada utas DNA yang berlawanan. Orientasi arah pemanjangan dari primer mengarah ke dalam melewati daerah sekuens DNA di antara dua primer yang digunakan. Produk DNA yang disintesis dari satu primer berfungsi sebagai DNA templat (cetakan) bagi primer yang lain dan prosedur (siklus) PCR akan berulang-ulang dari mulai denaturasi DNA, penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan (*extension*) oleh DNA polimerase, sehingga akan dihasilkan produk dengan jumlah kopi yang eksponensial dari daerah sekuens DNA

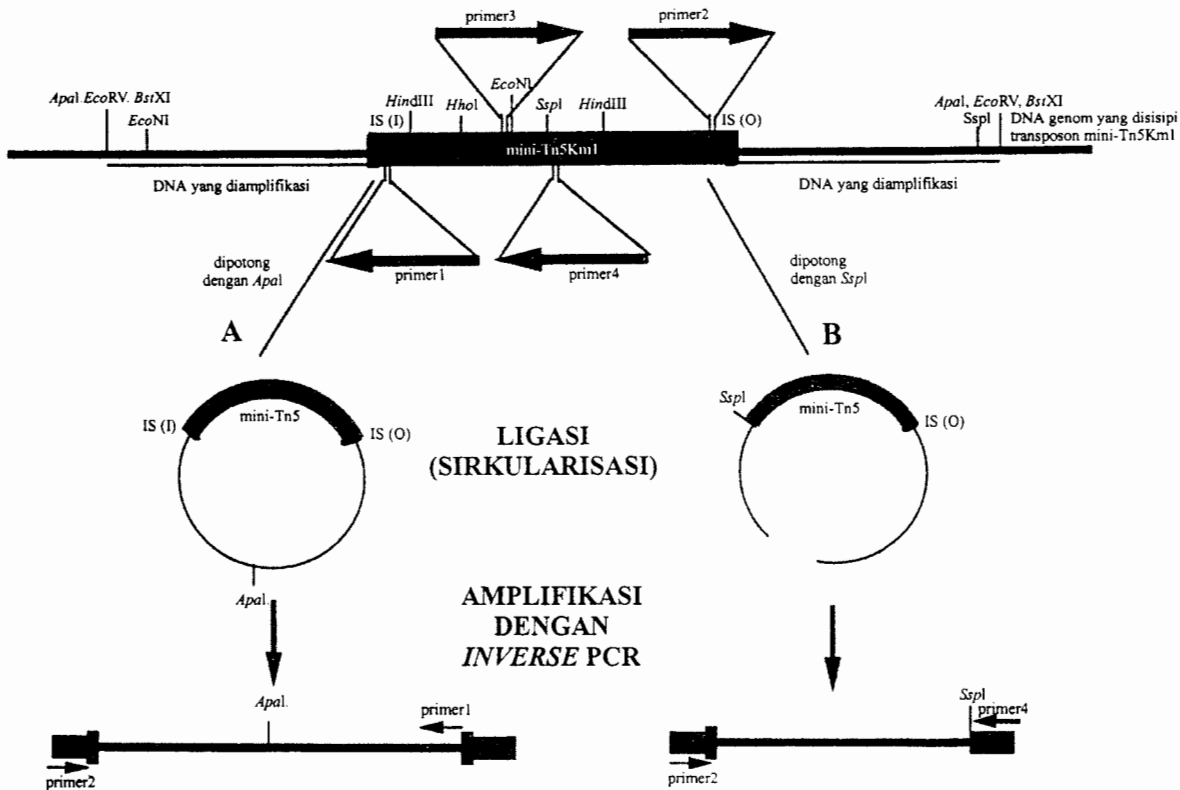
yang diamplifikasi yang berada di antara dua primer yang digunakan. Pengembangan teknik PCR akan memungkinkan amplifikasi sekuens DNA yang mengapit segmen DNA yang telah diketahui sekuennya, baik bagian hulu (*upstream*), hilir (*downstream*), atau sekaligus bagian hulu dan hilir (Rich & Willis 1990). Konsep ini merupakan teknik yang sederhana yang dinamakan *inverse PCR*. Sintesis DNA akan memanjang ke arah luar dari DNA yang telah diketahui sekuennya tanpa melalui prosedur kloning secara konvensional. Metode ini mempunyai aplikasi secara genetik dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi secara cepat situs penyisipan dari elemen loncat (*transposable element*) atau transposon, atau dapat juga untuk menganalisis daerah (*region*) tertentu yang berdekatan dengan sekuens yang spesifik. Namun, dalam tulisan ini hanya akan diberikan sebuah contoh mengenai aplikasi penggunaan *inverse PCR* untuk mengamplifikasi DNA sekuens yang mengapit transposon, khususnya transposon mini-Tn5Kml sebagai model dan juga sekuennya telah diketahui (deLorenzo *et al.* 1990, Herrero *et al.* 1990).

Metode *inverse PCR* ini dikembangkan terutama untuk memperoleh informasi yang cepat dan mudah tentang sekuens DNA atau gen yang disisipi transposon setelah dianalisis melalui pengurutan basa-basanya melalui sekuensing DNA. Dari informasi yang diperoleh produk *inverse PCR* dapat digunakan sebagai pelacak (*probe*) untuk mengambil gen aslinya dari galur tipe liarnya. Di samping itu, *inverse PCR* dapat digunakan untuk mengantisipasi prosedur kloning secara konvensional yang terkadang DNA yang diklon sulit dilakukan, terutama fragmen-fragmen DNA yang berukuran besar (> 12 kpb= kilo pasang basa) terkadang sulit diklon, atau fragmen DNA berukuran besar sering akan terpotong-potong menjadi beberapa fragmen oleh enzim restriksi yang digunakan dalam pengklonan. Hal ini akan memakan waktu yang cukup lama untuk mengamplifikasinya dengan prosedur kloning secara konvensional. Dengan demikian, metode *inverse PCR* akan menjadi alternatif solusi yang baik untuk mengatasi masalah tersebut.

#### PEMOTONGAN DNA

Metode yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA dengan *inverse PCR* sedikit berbeda dengan PCR secara umum. Pada prinsipnya metode *inverse PCR* dapat

† Alamat kini: Tokyo University of Agriculture and Technology, Department of Biotechnology, Japan, Tel. +81-42-3887021, Fax. +81-42-3857713, E-mail: aris@cc.tuat.ac.jp



Gambar 1. Strategi untuk melakukan *inverse PCR*. DNA genom yang disisipi transposon dipotong dengan enzim restriksi yang tidak memotong transposon (A), atau yang memotong transposon pada satu situs (B). IS = *Insertion Sequence* (elemen sisipan) dari transposon (19 pb).

dilakukan seperti terlihat pada Gambar 1. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi pemilihan enzim restriksi endonuklease untuk digunakan dalam *inverse PCR*, termasuk dalam hal ini peta dari sekuens transposon dan DNA pengapit transposon yang akan diamplifikasi serta ukuran DNA fragmen yang dihasilkan untuk digunakan dalam sirkularisasi. Namun demikian, pemilihan enzim restriksi tersebut dapat secara mudah diketahui melalui pengujian sekuens dari transposon atau penentuan melalui situs pemotongan dan panjang fragmen yang dapat ditentukan melalui *southern blot*. Untuk mengamplifikasi DNA yang mengapit transposon pada bagian hulu dan hilir sekaligus misalnya, DNA genom yang disisipi transposon dapat dipotong dengan menggunakan enzim restriksi yang tidak memotong transposon mini-Tn5, yaitu *Apal*, *SpeI*, *EcoRV*, atau *BstXI* dan primer yang digunakan untuk *inverse PCR* yaitu primer 1 dan 2 (Wahyudi *et al.* 2000). Untuk mengamplifikasi pada bagian hulu saja, DNA genom dapat dipotong dengan enzim restriksi yang memotong pada satu situs, yaitu *EcoNI* dan primer yang digunakan yaitu primer 1 dan 3. Sedangkan untuk mengamplifikasi pada bagian hilir saja, DNA genom dipotong dengan enzim restriksi yang juga memotong pada satu situs, yaitu *SspI* dan primer yang digunakan yaitu primer 2 dan 4. DNA genom yang dipotong umumnya kurang lebih 1  $\mu$ g. Setelah dipotong semalaman dengan kondisi yang sesuai dengan enzim restriksi yang digunakan, DNA diekstrak dengan

fenol-kloroform dan kemudian DNA dipresipitasi dengan etanol 100% dan dicuci dengan etanol 70% serta dikeringkan dengan evaporator. DNA pelet yang dihasilkan disuspensikan kembali ke dalam 10  $\mu$ l akuades steril.

### SIRKULARISASI DNA

DNA yang telah dipotong dengan cara seperti di atas kemudian disirkularisasi atau diligasasi dengan menggunakan enzim ligase (DNA ligase T4, *ligation kit ver.2 solution I*, *ligation kit version 1 sol A and B*, atau versi lainnya). Ligasi biasanya dilakukan semalaman pada suhu 15°C. Sampel DNA yang telah disirkularisasi ini kemudian dipresipitasi menggunakan etanol 100%, pelet DNA dikeringkan dan kemudian disuspensikan kembali ke dalam 10  $\mu$ l akuades steril.

### INVERSE PCR

DNA yang telah disirkularisasi ini sudah siap sebagai cetakan untuk *inverse PCR* menggunakan primer yang sesuai. DNA dapat diamplifikasi dengan menggunakan *Gene Amp System 2400*, *Ericomp thermocycler* (Perkin Elmer), atau jenis yang lain. Volume reaksi dapat bervariasi bergantung pada keperluan dan metode yang digunakan. Dengan menggunakan volume reaksi 50  $\mu$ l untuk mengamplifikasi

DNA mempunyai kandungan G-C tinggi diperoleh hasil yang baik. Amplifikasi ini menggunakan *LA Taq polymerase* dengan bufer G-C khusus. Denaturasi awal umumnya lima menit pada suhu 94°C, diikuti denaturasi untuk siklus pada 94°C selama satu menit. Penempelan primer pada cetakan DNA yang sesuai dilakukan pada suhu antara 55-65°C (bergantung pada primer yang digunakan, terutama karakteristiknya) selama satu menit, dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama satu menit dan di akhir siklus pemanjangan dilakukan selama 7 hingga 10 menit. *Inverse PCR* umumnya dilakukan selama 25 hingga 30 siklus. Kondisi tersebut tentunya dapat bervariasi bergantung pada DNA yang diamplifikasi serta kondisi primer yang digunakan. Hasil *inverse PCR* dapat diketahui melalui pelarian sampel (produk dari *inverse PCR*) dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Pita DNA akan terlihat setelah gel direndam dalam larutan etidium bromid beberapa detik dan visualisasi menggunakan sinar ultraviolet. Ukuran dari pita DNA yang dihasilkan dari *inverse PCR* dikonfirmasi dengan analisis *southern blot* dari genom yang disisipi transposon tersebut yang dipotong menggunakan enzim restriksi endonuklease yang sama seperti yang digunakan dalam *inverse PCR*, dan pelacak yang digunakan yaitu transposon mini-Tn5Km1. Jika hasil yang diperoleh dari *inverse PCR* mempunyai ukuran yang sama dengan ukuran yang diperoleh dari hasil *southern blot* maka produk *inverse PCR* tersebut kemungkinan besar benar. Namun demikian, untuk mengetahui secara pasti, sekuensing DNA hasil dari *inverse PCR* tersebut perlu dilakukan.

#### ANALISIS HASIL *INVERSE PCR*

Untuk mengetahui informasi sekuens DNA atau gen yang disisipi transposon, produk *inverse PCR* tersebut di-

klon ke dalam plasmid vektor pGEM-T (Promega) atau pCR2.1 (*TA cloning*, Invitrogen). Pekerjaan ini sangat mudah dilakukan. Sekuensing DNA menggunakan primer universal dilakukan atau produk *inverse PCR* tersebut secara cepat dapat langsung disekuensing. Dari informasi data sekuensing diperoleh gen produk utama dan fungsi menggunakan program *DNASTAR/LASERGENE* dan program *BLASTX*. Informasi yang lebih terperinci dapat diketahui melalui *database*. Dari informasi yang diperoleh dapat dilakukan alternatif tindakan berikutnya sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai.

#### DAFTAR PUSTAKA

- deLorenzo, V., M. Herrero, J.M. Martinko & J. Parker. 1990. Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promotor probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.
- Herrero, M., V. deLorenzo & K.N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.
- Martin, V.J.J. & W.W. Mohn. 1999. An alternative *inverse PCR* (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertion. *J. Microbiol. Met.* **35**:163-166.
- Ochman, H., A.S. Gerber & D.L. Hartl. 1988. Genetic applications of an *inverse polymerase chain reaction*. *Genetics.* **120**:621-623.
- Rich, J.J. & D.K. Willis. 1990. A single oligonucleotide can be used to rapidly isolate DNA sequences flanking a transposon Tn5 insertion by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6673-6676.
- Wahyudi, A.T., H. Takeyama & T. Matsunaga. 2000. Isolation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 mutants defective in bacterial magnetic particles synthesis by transposon mutagenesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (in press).