

Konstruksi *Single Disruptant* Penggantian Gen Target dari Ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

HERMANSYAH

Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Konstruksi suatu *single disruptant* merupakan langkah penting dalam mempelajari fungsi suatu gen dari *S. cerevisiae*. Dalam studi ini kami mengkonstruksi transforman dengan menghilangkan gen PPG1 pengkode protein fosfatase non essential untuk pertumbuhan, tapi terlibat dalam pengendalian akumulasi glikogen dan diduga berperan dalam proses meiosis pada pertumbuhan sel. Konstruksi ppg1Δ::CgHIS3 *single disruptant* ini menggunakan metode penggantian gen target (PPG1) dengan suatu marker auksotrop *Candida albicans* HIS3 yang diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau disebut *PCR mediated disruption*. Transforman yang tumbuh di media selektif tanpa histidin dilakukan konfirmasi dengan menggunakan amplifikasi PCR. Hasil elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan bahwa transforman ppg1Δ::CgHIS3 memiliki pita berukuran 3,3 kb, sedangkan *wild type* strain memiliki pita berukuran 2,6 kb jika diamplifikasi menggunakan *forward* primer dan *reverse* primer yang masing-masing terletak –1000 hingga –979 *downstream* dan +480 hingga +500 *upstream* dari urutan PPG1.

KATA KUNCI: gen PPG1, *Saccharomyces cerevisiae*, metode PCR, *single disruptant*

ABSTRACT: Construction of single disruptant is an important step to study a functional of *S. cerevisiae* gene. In this study we constructed single disruption of PPG1 gene encoding non essential protein phosphatase for growing, but involved in regulatory of glycogen accumulation and played a role in meiosis process. Method that used in this construction was replacement of target gene (PPG1) with auxotroph marker *Candida albicans* HIS3 by Polymerase Chain Reaction (PCR) or called by PCR-mediated disruption. Transformant colonies which grew in selective medium without histidine were confirmed by PCR amplification. By using 1% Agarose gel electrophoresis the result showed that size of ppg1Δ::CgHIS3 transformant was 3.28 kb while wild type strain was 2.6 kb when amplified by PCR using forward and reverse primers located in –1000 to –979 downstream and 480 to 500 upstream of PPG1 gene sequence, respectively.

KEYWORDS: PPG1 gene, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR method, single disruptant

E-MAIL: hermansyah@unsri.ac.id

September 2009

1 PENDAHULUAN

Ragi *S. cerevisiae* merupakan mikro organisme eukariot yang paling banyak dijadikan sebagai model penelitian dalam biologi molekuler. Hal ini karena ragi memiliki berbagai kelebihan diantaranya pertumbuhan ragi cepat, pola “*budding*” yang menghasilkan sel tersebar, mudah untuk dilakukan replika *plating*, sistem genetik ragi telah diketahui dengan baik, dan transformasi DNA ke ragi sangat mudah dilakukan. Mudahnya proses transformasi ragi ini dimanfaatkan oleh para peneliti gen mamalia dengan mentransfer gen mamalia ke ragi untuk analisis sintetik fungsi protein.

S. cerevisiae memiliki 16 kromosom yang telah

terkarakterisasi dengan baik dimana masing-masing berukuran 200 hingga 2.200 kb. Total ukuran DNA kromosom ini 12.052 kb. Dari sekitar 6.183 *open reading frame* (ORF) yang dimiliki ragi *S. cerevisiae*, hanya 5.773 gen yang mengkode protein. Dari jumlah ORF ini, 3,8% nya mengandung intron. Gen-gen ragi rata-rata berukuran 1,45 kb atau 483 kodon^[1]. Dari jumlah total gen yang telah diidentifikasi dan diketahui urutan DNA-nya. Walaupun fungsi dari gen-gen tersebut banyak diketahui, namun penemuan-penemuan fenotip baru dari *single disruptant* telah mengindikasikan bahwa gen-gen ragi memiliki fungsi yang tidak sederhana, melainkan fungsi yang kompleks. Fenotipik yang terlihat dari suatu *single disruptant* ataupun transforman mengisyaratkan bahwa gen

tersebut secara molekuler terlibat dalam proses seluler fenotipik yang bersangkutan.

Dua pendekatan yang biasa digunakan untuk mempelajari fungsi suatu gen. Cara pertama adalah melalui pengrusakan sebagian atau suatu gen kromosom (*disruption*) yang menyebabkan aktifitas protein yang dikode oleh gen tersebut hilang. Cara kedua adalah dengan mengover-ekspresikan suatu gen sehingga diharapkan ekspresi dan aktivitas proteinnya tinggi^[2]. Pembuatan *single disruptant* dengan merusak gen lebih banyak dilakukan oleh para peneliti terutama yang bekerja dengan ragi *S.cerevisiae* dalam mempelajari fungsi suatu gen. Metoda penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk merusak gen (*PCR-mediated gene disruption*) merupakan metoda yang banyak digunakan untuk merusak sebagian atau keseluruhan suatu gen^[3]. Gen PPG1 mengkode protein fosfatase yang diidentifikasi sebagai protein serin/treonin fosfatase yang fungsinya banyak belum diketahui. Protein fosfatase Ppg1p adalah tidak esensial untuk pertumbuhan sel, namun demikian Ppg1p diperlukan untuk akumulasi glikogen dan membantu terjadinya proses meiosis dalam pertumbuhan sel^[4]. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan *single disruptant* dari gen PPG1 yang digantikan oleh gen HIS3 dari *Candida glabrata*. *Single disruptant* ppg1Δ::CgHIS3 ini akan digunakan untuk mempelajari fungsi PPG1 lebih lanjut.

2 METODA PENELITIAN

2.1 Strain dan kondisi kultur yang digunakan

FY833 dengan *can^r* = *ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63* digunakan sebagai *wild type strain* dan *parental strain*. *Strain* *ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 ppg1Δ::CgHIS3*. Media agar YPDA diperkaya dengan suplemen adenine 0.4 mg/ml (Sigma-Aldrich Co). Media selektif terdiri atas *yeast nitrogen base* tanpa asam amino 0,67%, glukosa 2%, bakto agar 2% dan suplemen-suplemen auksotropi seperti L-triptopan 20 mg/L, L-histidin (HCl) 20 mg/L, L-arginin (HCl) 20mg/L, L-metionin 20 mg/L, urasil 20 mg/L, L-tirosin 30 mg/L, L-isoleusin 30 mg/L, L-lisin (HCl) 30 mg/L, L-leusin 100 mg/L, L-valin 150 mg/L, L-treonin 200 mg/L, dan adenin 400 mg/L). Jika tidak dijelaskan lebih lanjut pertumbuhan sel di lakukan pada temperatur 30°C.

2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Desain pasangan primer untuk PCR yang digunakan untuk konstruksi ppg1Δ::CgHIS3 adalah masing-masing terdiri atas 80 nukleotida, yaitu *forward* primer

Kf: 5'AGTTA CTACCTGAAGTGAAGT-
TAAGGGCACTCTGCTTTAAGCTGAAGGAAAT-
GCTAGTGACACAGGAACAGCTATGA CC 3'

dan

Kr: 5' CTACAAGAAGTAA
TCAACATGTCTGTGTAGAAGCAGATC T
GGCTTGGTATACATCTGAAAAGTT
GTAAAACGACGGCCAGT 3'.

Sedangkan pasangan primer yang digunakan untuk mengkonfirmasi terjadinya ppg1Δ::CgHIS3 adalah masing-masing terdiri atas 30 nukleotida yaitu

Kf: 5' GGGGGATCCCAGGA
ACAGGTTGAGTAGACA 3'

dan

Kr: 5' GGGGGATCC AAATCTCGAAAGGTC
ATCGTG 3'

Campuran reaksi untuk reaksi PCR adalah sebagai berikut: tiap 10 μL campuran reaksi terdiri atas 0,1 μL Takara Ex Taq™ (5 units/μL), 2 μL 10× Ex Taq™ bufer, 2 μL campuran dNTP, 0,5 μL DNA *template* (74 ng/μL), 1 μL *forward* primer, 1 μL *reverse* primer, 3,4 μL air steril. Sedangkan kondisi reaksi PCR adalah sebagai berikut: siklus reaksi 25×, denaturasi pada 94°C selama 0,5 menit, annealing pada 60°C selama 30 detik, ekstensi pada 72°C selama 3 menit. Hasil amplifikasi PCR diperiksa dengan gel elektroforesis agarosa 1%.

2.3 Transformasi pada Ragi

Transformasi pada ragi menggunakan metode Li asetat^[5]. Sel ragi diinokulasi pada media YPDA. Pindahkan 0,5 mL kultur sel ke 5 mL media kultur baru. Inkubasi dengan shaker 150 rpm selama 3 hingga 4 jam hingga meraih OD₆₆₀ = 1,0. Sel dipanen dan dikumpulkan dengan sentrifugasi 2.000 rpm selama 5 menit dan dicuci dengan 5 mL air steril. Sel di larutkan kembali dengan 1 mL Li.asetat 0,1M dan pindahkan suspensi sel ke dalam 1,5 mL tube untuk disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik dan buang supernatant. Larutan kembali sel dengan 0,5 mL Li asetat dan inkubasi pada temperature 30°C. Didihkan *single strand* DNA *carrier* (*salmon sperm*) selama 5 menit dan dengan cepat dinginkan dalam es selama 5 menit. Vorteks suspensi sel, pipet 0.1 mL sample dan kumpulkan sel dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik dan buang supernatannya. Tambahkan berturut-turut 0.24 mL PEG 4.000 50% (w/v), 0.036 mL Li Asetat 1,0 M, 0.005 ml carrier DNA (10 mg/mL), dan 0.070 mL DNA hasil PCR (0.1-10 g) dan air steril. Vorteks hingga bercampur sempurna. Inkubasi selama 30 menit pada 30°C, *heat*

shock selama 20 hingga 25 menit pada 42°C. Sentrifugasi campuran pada 12.000 rpm selama satu menit dan buang supernatan secara sempurna. Tambahkan 0,1 mL suspensi sel yang dilarutkan dengan 0,1 mL air steril. Sebarkan suspensi sel yang telah ditransformasi pada media selektif tanpa mengandung histidin. Inkubasi pada 30°C selama 2-3 hari hingga muncul koloni-koloni transforman.

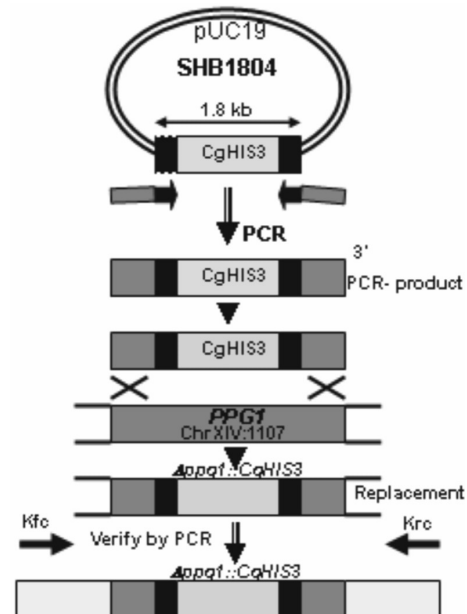
2.4 Elektroforesis Gel Agarosa terhadap Fragmen DNA

Elektroforesis gel agarosa dilakukan sesuai dengan Sambrook et al, 1989 dengan sedikit modifikasi. Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,4 g agarosa dalam 40 mL bufer TAE 1X (Tris-asetat 0,04 M; Na₂EDTA 0,001 M (pH 8,0), dipanaskan hingga mendidih, kemudian didinginkan hingga 40-50°C, lalu dituang pada cetakan gel dan dibiarkan hingga memadat. Gel agarosa diletakkan dalam alat elektroforesis dan direndam dengan bufer TAE 1X. Sampel DNA dicampur dengan loading bufer (bromofenol biru 0,1%; sukrosa 50%; Na₂EDTA 0,1 M) dan air steril. Campuran ini dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa, lalu dielektroforesis dalam medan listrik 60 volt sampai warna biru bromofenol biru bermigrasi mendekati batas akhir gel. Gel direndam dalam larutan etidium bromida 0,5 µg/mL selama 1-5 menit. Pita-pita DNA diamati dengan sinar ultra violet (UV).

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi *single disruptant* *ppg1Δ::CgHIS3* menggunakan *strain* FY833 dengan *can^r* sebagai parental *strain* dilakukan dengan menggunakan metoda penggantian gen target dengan *PCR-mediated disruption*^[7,8]. Strategi desain primer untuk merusak gen target seperti pada Gambar 1. Dengan metoda ini kita harapkan protein Ppg1p tidak dapat melakukan aktivitasnya lagi. Masing-masing *forward* primer atau *reverse* primer memiliki 80 nukleotida yang terdiri atas 60 nukleotida dari gen PPG1 dan 20 nukleotida dari gen CgHIS3 yang terdapat pada plasmid SHB1804 yang merupakan derivat dari plasmid pUC19^[9]. Urutan nukleotida dari gen protein fosfatase PPG1 yang terdapat di kromosom XV terdiri atas 1107 nukleotida^[10] berdasarkan *yeast genome S. cerevisiae data base* (Tabel 1). Masing-masing 60 basa yang digunakan dalam konstruksi disruptan ini adalah sebagai berikut: *forward* primer menggunakan urutan nukleotida ke 41 hingga 100, sedangkan *reverse* primer menggunakan urutan nukleotida ke 1048 hingga 1107 dari urutan gen PPG1.

Setelah proses transformasi selesai, sel-sel disebar di media selektif plate tanpa mengandung histidin. Dua hingga tiga hari kemudian terlihat beberapa koloni-



GAMBAR 1: Strategi penggantian gen PPG1 oleh CgHIS3

koloni tumbuh di media selektif tanpa histidin tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa pada transformasi terjadi penggantian gen PPG1 oleh CgHIS3 dengan cara integrasi pada kromosom *S. cerevisiae*. Sedangkan *wild type strain* FY833 yang memiliki *can^r* = *ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63* sebagai *parental strain*, karena gen pengkode histidin yang rusak (*defect*) membuat sel tidak bisa menghasilkan histidin sebagai fenotip auksotrop dari *strain* FY833, sehingga kita perlu menambahkan histidin pada media. Pada koloni-koloni transforman histidin dapat diekspresi oleh gen CgHIS3 yang menggantikan gen PPG1 pada kromosom *S. cerevisiae* tersebut, sehingga sel-sel dapat hidup pada media selektif tanpa histidin.

Untuk lebih meyakinkan bahwa transformasi betul-betul membawa *ppg1Δ::CgHIS3*, dilakukan konfirmasi lebih lanjut menggunakan *PCR analysis* (*PCR-based confirmation*). Dari 17 koloni yang kami uji DNA kromosomnya dan dianalisis dengan DNA elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 2), 9 koloni menghasilkan dengan jelas pita yang berukuran 3,3 kb yang merupakan ukuran transforman *ppg1Δ::CgHIS3* dengan rincian sebagai berikut: 1 kb *upstream* gen PPG1 + 1,8 kb CgHIS3 + 0,5 *downstream* gen PPG1. Koloni-koloni tersebut terletak pada lajur no. 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17 dan 18. Sedangkan lajur 2, 5, dan 13 menghasilkan pita 3,3 kb yang tak terlalu jelas karena konsentrasinya kecil. Sedangkan koloni-koloni yang lain yang terletak pada lajur 3, 4, 7, dan 8 menunjukkan pita yang sama dengan ukuran *wild type* (lajur 19) yaitu 2,6 kb (1 kb *upstream* PPG1 + 1,1 kb PPG1 + 0,5 *downstream* PPG1).

TABEL 1: Urutan nukleotida dari gen PPG1

1	ATGGAATTGG	ACGAATGTTT	AGAAAGGCTA	TACAAGGCC	AGTTACTACC
51	TGAAGTGACT	GTAAGGGCAC	TCTGCTTTAA	GCTGAAGGAA	ATGCTAGTGA
101	AGGAGTCAAA	CGTGATTCAC	ATTCAGACCC	CTGTCACAGT	CGTGGGGGAT
151	ATGCATGGAC	AGTTTCACGA	TATGCTGGAG	ATCTTCCAAA	TAGGCGGCCC
201	TGTTCTTGAT	ACGAATTATC	TGTTCTTGGG	CGACTATGTA	GACAGGGGGT
251	TGTACAGTGT	GGAAACAATT	ATGCTATTGA	TTGTGCTTAA	GCTTCGATAT
301	CCTAGTAGAA	TTCATCTTTT	GAGGGGAAAC	CACGAGTCAC	GTCAAATCAC
351	GCAGAGCTAT	GGTTTCTACA	CGGAGTGCTT	GAACAAGTAC	GGTGGCAATT
401	CAAGAGTTTG	GCAATATTTG	ACAGATATAT	TTGACTATCT	AGTGTATATG
451	TGTATTATCG	ACGACGAAAT	TTTTTGTGTT	CATGGTGGGC	TCTCGCCCAA
501	TGTTCAAACC	ATAGATCAGA	TCAAGATTAT	TGATAGATTT	CGAGAAATTC
551	CACACGATGG	CGCCATGGCA	GACTTGGTTT	GGTCTGATCC	GGAAGAAAAC
601	AATAACCCCA	CGTTAGATCA	TCCAGATAAC	TCTGGACAAC	ATTTCAGGT
651	GTCACCTCGT	GGAGCAGGTT	ATACTTTCGG	AAGAAGCGTG	GTGGAGAAAT
701	TCTTACGTAT	GAACGATATG	AACAGAATAT	ACAGAGCCCA	TCAGTTATGT
751	AACGAAGGTT	ACCAGATATA	TTTTGATGGA	TTGGTTACTA	CTGTATGGTC
801	GGCGCCAAAC	TATTGTTATC	GGTGCGGCAA	TAAAGCATCT	ATTCTGGAGC
851	TGTATAGTAA	AGATCAATTC	TACTTCAACG	TTTTCGAAGA	GGCACCTGAA
901	AATAAACTGT	TGAAAGAGAA	CAGTATGAAC	GACAATGCCT	TAGAAGATAG
951	CATATCTAAT	CCGGTAGCCA	ACAGGAAATT	GATTGCAGAT	TATTTCAAG
1001	ACGACTCTGC	CTCCGCAGAT	GGCTCCACGG	ACCCTGAAAT	GTACATATTT
1051	TCAGATGTAT	ACCAAGCCAG	ATCTGCTTCT	AACAGACATG	TTGATTACTT
1101	CTTGTAG				



GAMBAR 2: Konfirmasi ukuran DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran *ppg1Δ::CgHIS3* 3,3 kb sedangkan ukuran *wild type* 2,6 kb (Lihat teks)

Adanya transforman yang menunjukkan hasil positif atau dapat tumbuh pada media seleksi tanpa mengandung histidin tapi menghasilkan hasil negatif menggunakan PCR atau menghasilkan pita yang mirip dengan pita dari *wild type* mengindikasikan bahwa adanya kemungkinan *CgHIS3*-nya terintegrasi dengan tidak menggantikan gen target PPG1.

4 KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Dalam mengkonstruksi suatu *single disruptant* *ppg1Δ* pada *S. cerevisiae*, gen target PPG1 dirusak (*disrupted*) pada kromosom menggunakan metoda PCR-mediated disruption yang menggunakan auktotrop marker *HIS3* yang berasal dari *C. albicans*;
2. Konfirmasi disruptant untuk mendapatkan *S. cerevisiae* transforman yang betul-betul membawa *ppg1Δ::CgHIS3* juga dilakukan menggunakan metoda PCR-based confirmation.

4.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukan apakah kerusakan gen PPG1 yang menyebabkan sel kehilangan aktivitas protein Ppg1p akan mempengaruhi ekspresi gen dan aktivitas protein lainnya terutama yang berfungsi dalam siklus sel dan akumulasi glikogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Satoshi Hara-shima dari Osaka University yang mendanai penelitian ini. Terima kasih juga kepada Dr. Yoshinobu Kaneko dan Dr. Minetaka Sugiyama yang telah memberikan banyak masukan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sherman, F., 2002, Getting started with yeast, *Methods Enzymol*, 350:3-41
- [2] Miyakawa, T. dan M. Mizunuma, 2007, Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation, *Biosci Biotechnol Biochem*, 71:604951-6049513
- [3] Hirasaki, M., Y. Kaneko, dan S. Harashima, 2008, Protein phosphatase Siw14 controls intracellular localization of Gln3 in cooperation with Npr1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* 409:34-43
- [4] Posas, F. dan H. Saito, 1998, Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two component response regulator, *EMBO J.* 17:1385-1394
- [5] Hermansyah, M. Sugiyama, Y. Kaneko, dan S. Harashima, 2009, Yeast protein phosphatase Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, CLN2 transcription and vacuole morphogenesis, *Arch Microbiol*, 191:721-733
- [6] Sambrook, J., E.F. Fritsch, dan T. Maniatis, 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- [7] Sakumoto, N., Y. Mukai, K. Uchida, T. Kouchi, J. Kuwajima, Y. Nakagawa, S. Sugioka, E. Yamamoto, T. Furuyama, H. Mizubuchi, N. Ohsugi, T. Sakuno, K. Kikuchi, I. Matsuoka, N. Ogawa, Y. Kaneko, dan S. Harashima, 1999, A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 15:1669-1679
- [8] Sakumoto, N., I. Matsuoka, Y. Mukai, N. Ogawa, Y. Kaneko, dan S. Harashima, 2002, A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis, *Yeast*, 19:587-599
- [9] Kitada, K., E. Yamaguchi, dan M. Arisawa, 1995, Cloning of the *Candida glabrata* TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation, *Gene*, 165:203-206
- [10] Philippsen, P., K. Kleic, Pohlmann, Dusterhoft, K. Hamberg, J.H. Hagemann, B. Obermaler, L.A. Urrestarazu, R. Aert, K. Albermann, R. Altmann, B. Andre, V. Baladron, J.P. Ballesta, A.M. Becam, J. Beinhaver, J. Boskovic, M.J. Butrago, F. Bussereau, F. Costei, M. Croutzet, M. Dangelo, K. Dalpero, A. De Antoni, dan J. Han, 1997, The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XIV and its evolutionary implications, *Nature* 387:93-8