

Rekombinasi Gen Penyandi β -xilosidase asal *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dalam Plasmid pHis1525

(Recombinant Gen of Encoding β -Xylosidase from *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 in pHis1525 Plasmid)

Sri Sumarsih*, Ni Nyoman Tri Puspaningsih*, Ami Soewandi JS*

ABSTRACT

Plasmid pHis1525 is a shuttle vector for *E. coli*/ *B. megaterium*, which contains a signal peptide for secretion of heterologous proteins, and also equipped with a His-tag encoding sequence. The aim of this research was to recombine the β -xylosidase encoding gene from *G. thermoleovorans* IT-08 into plasmid pHis1525. The β -xylosidase encoding gene (*xyl*) was amplified by PCR method from pTP510, a recombinant plasmid containing xylanolytic enzyme encoding gene from *G. thermoleovorans* IT-08. The *xyl* gene was inserted into plasmid via MCS of pHis1525 between *SacI* and *SphI* restriction sites and propagated in *E. coli* DH10 β . The recombinant plasmids were analyzed by restriction analysis and sequencing. This research showed that the *xyl* gene was successfully amplified from pTP510 and recombined into plasmid pHis1525 in *E. coli* DH10 β . The sequence of the inserted gene contained a signal peptide and His-tag encoding sequences. The recombinant plasmid was called pSMX.

Key words: β -xylosidase, *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, pHis1525, *E. coli* DH10 β , pSMX

PENDAHULUAN

Escherichia coli sudah menjadi "workhorse" untuk produksi berbagai protein rekombinan dan telah digunakan secara luas sebagai sel inang untuk kloning berbagai gen heterologus dengan berbagai sistem ekspresi. Namun demikian, ada beberapa kendala yang seringkali terjadi pada proses produksi protein heterologus. *E. coli* tidak mempunyai mekanisme ekspor protein, sehingga protein yang diproduksi dalam jumlah besar akan diakumulasi secara intraseluler dan hampir semuanya dalam bentuk badan inklusi (Choi and Lee, 2004; Schallmeyer et al., 2004).

Bakteri Gram positif *Bacillus megaterium* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan sel inang lain untuk produksi protein rekombinan. Bakteri ini mampu mengekspresikan beberapa DNA heterologus, tidak menghasilkan protease alkalin, dikenal stabil dalam melakukan replikasi dan memelihara plasmid, serta tidak ditemukan adanya endotoksin pada dinding selnya. Beberapa vektor ekspresi dan galur *B. megaterium* telah dikembangkan dan digunakan untuk produksi berbagai protein, misalnya glukosiltransferase (Wang et al., 2005), levansucrase (Malten et al., 2006; Yang et al., 2006), dextranucrase dan penisilin

amidase (Yang et al., 2006) dan fragmen antibodi scFv (Jordan et al., 2007).

Plasmid pHis1525 merupakan shuttle vector untuk ekspresi gen heterologus di *E. coli* dan *Bacillus megaterium*, yang dikonstruksi untuk keperluan produksi, sekresi dan pemurnian satu tahap suatu protein heterologus yang mengandung penanda histidin (*His-tag*) (Malten et al., 2006; Hollman et al., 2006).

Ekspresi gen *xyI* dalam sistem pHis1525/*B. megaterium* diharapkan dapat mengoptimalkan produksi enzim β -xilosidase ekstraseluler. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan rekombinasi gen penyandi β -xilosidase asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 ke dalam plasmid pHis1525 dan dipropagasi di *E. coli* DH10 β . Untuk tahapan penelitian selanjutnya, plasmid rekombinan yang diperoleh di ekspresikan di dalam sistem pHis1525/*B. megaterium*.

MATERI DAN METODE

Sampel Penelitian

1. Plasmid rekombinan pTP510/*E. coli* DH5 α merupakan koleksi Laboratorium Biokimia Departemen Kimia Fakultas Sain dan Teknologi Unair.

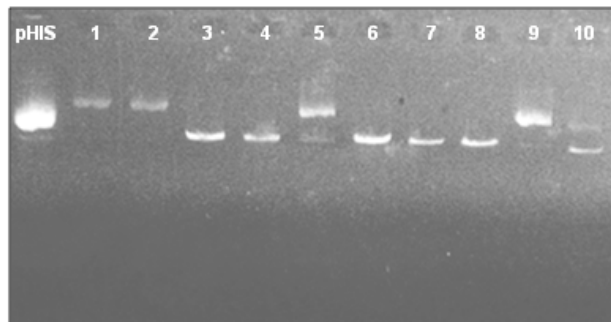
*Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

151

Rekombinasi Gen Penyandi β -Xilosidase (*xyl*) dalam Plasmid pHIS1525/*E. coli* DH10 β

Amplikon *xyl* (± 1500 pb) dan plasmid pHIS1525 (± 7000 pb) dipotong ganda dengan enzim restriksi *SacI*/*SphI* sehingga menghasilkan fragmen DNA sengan ujung lengket yang komplementer. Kemudian kedua fragmen DNA tersebut diligasikan menggunakan enzim ligase dan selanjutnya ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH10 β .

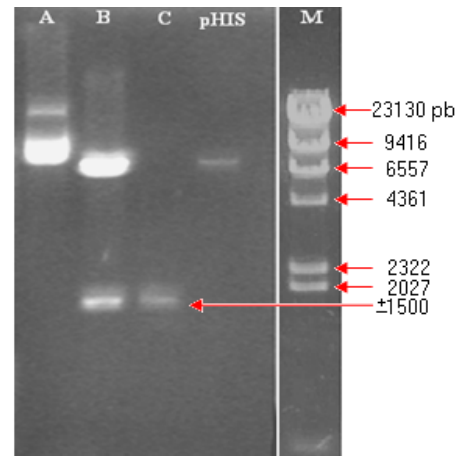
Seleksi *E. coli* DH10 β yang membawa plasmid pHIS1525 rekombinan dilakukan dengan menganalisis DNA plasmid dari 10 (sepuluh) transforman yang dipilih secara acak. terdapat 4 (empat) DNA plasmid dengan ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan DNA plasmid pHIS1525, yaitu DNA plasmid dari transforman 1, 2, 5 dan 9 (Gambar 3). Transforman yang diduga membawa DNA plasmid rekombinan tersebut berturut-turut dinamakan *E. coli* DH10 β rekombinan: **E1, E2, E3, dan E4**. Kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui ukuran DNA plasmid serta ukuran dan struktur gen yang terinsersi ke dalam plasmid pHIS1525.



Gambar 3. Analisis DNA plasmid rekombinan dengan elektroforesis gel agarosa 1% pHIS: vektor pHIS1525. Nomor 1–10: DNA plasmid dari transforman 1–10.

Pemotongan ganda (*double digest*) plasmid rekombinan **E1** menggunakan enzim restriksi *SacI*/*SphI*, dilakukan untuk mengetahui ukuran gen sisipan dalam plasmid pHIS1525.

Pemotongan ganda DNA plasmid rekombinan (**E1**) menggunakan enzim restriksi *SacI*/*SphI* menghasilkan dua fragmen DNA, yang ditunjukkan dengan adanya dua pita DNA pada elektroforegram dengan ukuran sekitar 7000 pb dan sekitar 1500 pb (Gambar 4B). Pita DNA dengan ukuran ± 1500 pb tersebut sama dengan ukuran amplikon *xyl* (Gambar 4C), yang mendekati ukuran gen penyandi β -xilosidase dalam plasmid pTP510 (1530 pb). Sedangkan



Gambar 4. Analisis plasmid rekombinan E1 dengan elektroforesis agarosa 1%. A = *Uncut plasmid*, B = hasil pemotongan ganda plasmid E1 dengan *SacI*/*SphI*, C = Amplikon *xyl*; pHIS = plasmid pHIS1525 M = DNA penanda DNA λ *HindIII* (Fermentas).

fragmen DNA yang berukuran ± 7000 pb, sama dengan ukuran plasmid pHIS1525 (Gambar 4D). Oleh karena itu, dilakukan sekuensing untuk membuktikan apakah gen sisipan dalam plasmid pHIS1525 yang mempunyai ukuran sekitar 1500 pb merupakan gen penyandi β -xilosidase.

Sekuensing

Dari hasil sekuensing plasmid rekombinan dengan *primer walking* dan peruntutan nukleotida ini, dapat diperoleh sekuen gen sisipan dalam plasmid pHIS1525 sebagai berikut.

Pada penelitian ini, amplifikasi gen penyandi β -xilosidase (gen *xyl*) dari pTP510 dilakukan dengan metode PCR menggunakan sepasang primer yang didesain dengan memperhatikan data sekuen gen penyandi asal *G. thermoleovorans* IT-08 (*GenBank* dengan nomor akses DQ345777) dan sekuen sisi restriksi di sekitar *multiple cloning site* (MCS) dari vektor plasmid pHIS1525. Gen *xyl* diinsersikan ke dalam plasmid pHIS1525 melalui MCS, secara langsung *downstream* sekuen penyandi *signal peptide* (SP_{lipA}), di antara sisi restriksi *SacI* dan *SphI*.

Strategi yang sama juga dilakukan dalam desain primer untuk kloning gen penyandi *levansucrase* (Lev Δ 773) dengan beberapa vektor ekspresi untuk *B. megaterium* yaitu : pMM1525, pHIS1525, pSTREP1525 dan pSTREPHIS1525, yang masing-masing menghasilkan protein rekombinan: Lev Δ 773, Lev Δ 773His, StrepLev Δ 773 dan StrepLev Δ 773His (Malten et al., 2006).

ATGAAAAAGTACTTATGGCATTCAATTATTTGTTTATCGCTGATTCTATCTGTTTAAAGCCGCTCCGCCG
TCTGGCGCAGGGCGCCGATTGAAGATCTCCGAGCTCTCGATATTCTAACCCAGTAATTAAGGGTTTT
 ATCCGGATCCAGTATTTGTCGAGTAGGTAGTGATTATTACTTAGTTACAAGTTCATTCCAGTACTTCC
 CTGGGGTTCCAATTTTTCATAGTACTAATTTAATTAATTGGAATAAGATAGGATATTGTTAATTAGAC
 CAAGTCAACTTATGTTAAATAATGCAACAAATAGAAGTGGTATATTTGCACCTACCCTTCGTTATCATG
 AGGGAATTTTTTATTTAATAACAACAAACGTAACACTAAAGAAGAACTTTATTGTTATGTCCGAAGATC
 TACAAGGGGAATGGTCTGAACCGATTGGATTGATGGATGGGGAGGCATTGATCCATCACTATTTTTTG
 ATAACGATGGGAAGGTTTATATTACCGGGACAAATGATAATGCTAGGGGTGAAGAATTAGGAATTTACC
 AAGCAGAAATAGATTTAAAGAAAGGAAGTATTATAGGTGAAAGAAAACCTCATATGGAAAGGTACAGGCG
 GCTCTTACCCGGAAGCCCCCATTTATATAAAGTTAATGGCTGGTATTATTTATTAATCGCAGAAGGAG
 GTACAGAGTATGGTCATATGGTGACCGTTGCAAGGAGTAAATATCCCTTCGGTCCTTTTGAAAGTTGTC
 CTTTAAATCCAATATTAACATAGAAGCACAAACCATCCTCTTCAGGCAATCGGTATGCTGATATTG
 TTCAGTATCATGACGGAAGTTGGTGGGAGTTTTTCACGGTACTCGTCCCATCTCTTATCCACCGAAAC
 ACCATTTGGGCAGAGAGACTTGTAGCTCTATCAAGTGACAGACGATGGTTGGCCTATTATTGGTT
 ACAACGGAAGAATTGATATTAATGATGCTGGTTATCTGCCTGTGAAAGAAAAAATATTGGGGATG
 AGATCATTGAAGATGATTTTAACAGTGATATTTTCTACAGATTGGAATTTTATTCAAACCCCTCGCC
 TTGAACACTATTCTTTGAAGGGACGTCCTAGTTGGTTAAAAATGCGGGGTACAGAAAAAACATTGAATG
 ATATAAATTCCTCAACGTTTATTGGGCGGCCAAGAACATTTGTTTGAATGTGTCGACATTATTAG
 AATTTAAACCGAATCAGGATAATGAGGAAGCTGGGCTAACCGTTTATGAATGAAAAGCACCACATG
 AAATTGCCCTAACAAAGAAAAATGGACGAATAAATGATGTTTGAAGAAAACGTAGGGGATATTCAGG
 TTGTTGTAATTCATTAGAGTATTTCTCTAATACGATTATTTTTCTATTCAAGCTAATCCGGAAGAAT
 ACAAGTTTTCATTTGTTGATCCTAATACAGGTCAGACTTATCTATTAGGAACAGGACTTACTACACTTT
 TATCTACGGAGGTTGCAGGAGGGTTCACAGGCGTTTACTTTGGGTTATATGCCACTGGTAATGGAAG
 TTTGTACGGCTCCCGCTTTTTTATTGGTTTAAATATATCTGAAATAT**TCATGCGCGGCTGAGAG**
GATCGATCACCATCACCATCAATA

Keterangan:

Ungu : ATG = *start codon*; TAA = *stop codon*

Hijau : sekuen Signal peptida (*SplipA*)

Merah : GAGCTC = enzim restriksi *SacI*

Hitam : sekuen β -xilosidase

GCATGC = enzim restriksi *SphI*

Orange : CATCACCATCACCATCAC = sekuen 6 $\times$ His

Amplikon gen *xyl* yang diperoleh dari amplifikasi dari plasmid pTP510 merupakan fragmen DNA ujung tumpul (*blunt end*) yang didesain mengandung sisi restriksi *SacI* (**GAGCTC**) pada ujung 5' dan sisi restriksi *SphI* (**GCATGC**) pada ujung 3'. Pemotongan ganda amplikon *xyl* dengan enzim restriksi *SacI*/*SphI* dimaksudkan untuk menghasilkan fragmen DNA dengan ujung lengket (*sticky end*). Enzim restriksi *SacI* memotong fragmen DNA pada sekuen **GAGCT**↓*C* dan komplemennya *C*↓**TCGAG**, sedangkan enzim restriksi *SphI* memotong fragmen DNA pada sekuen **GCATG**↓*C* dan komplemennya *C*↓**GTACG**. Plasmid pHIS1525 yang juga dipotong ganda dengan enzim restriksi *SacI*/*SphI* menghasilkan vektor kloning yang mempunyai ujung-ujung lengket yang komplementer dengan ujung-ujung lengket amplikon gen *xyl*. Dengan demikian, baik amplikon gen *xyl* maupun vektor kloning pHIS1525 mempunyai ujung-ujung lengket yang saling komplementer.

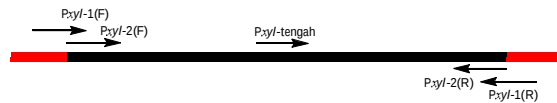
Ligasi ujung-ujung lengket yang komplementer dapat berlangsung lebih efisien dibandingkan dengan ligasi ujung-ujung tumpul. Hal ini disebabkan ujung-ujung lengket yang komplementer (cocok) dapat saling berpasangan basa

melalui pembentukan ikatan hidrogen, untuk membentuk struktur yang relatif stabil. Akibatnya, enzim ligase dapat bekerja dengan lebih baik, yang akan mempercepat terbentuknya ikatan fosfodiester yang menyambung kedua molekul DNA tersebut (**Brown**, 2001).

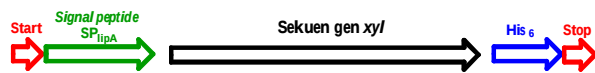
Analisis restriksi dilakukan dengan melakukan pemotongan tunggal DNA plasmid menggunakan enzim restriksi, untuk mengetahui ukuran DNA plasmid rekombinan dan DNA sisipan. Pemotongan DNA plasmid menggunakan enzim restriksi *SacI* akan membuka plasmid sehingga menjadi bentuk liniernya, yang ditunjukkan dengan adanya pita tunggal di sekitar 9000 pb pada elektroforegram gel agarosa. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid rekombinan mempunyai ukuran sekitar 9000 pb, yang lebih tinggi dibandingkan dengan ukuran vektor plasmid (7474 pb). Dengan demikian, dapat diperkirakan bahwa vektor plasmid telah terinsersi dengan DNA asing.

Untuk mengetahui struktur gen sisipan dalam plasmid pHIS1525 rekombinan dan tingkat homologinya terhadap gen penyandi β -xilosidase, maka dilakukan sekuensing dengan *primer walking*. Lima primer yang telah berhasil didesain dan digunakan untuk menentukan sekuen gen

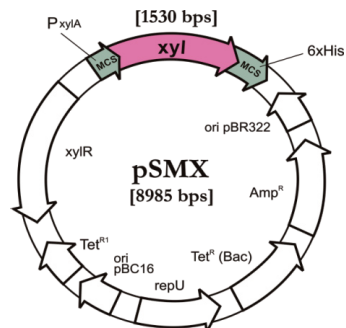
sisipan dalam plasmid pHIS1525 rekombinan adalah: P_{xyI}-1(F), P_{xyI}-1(R), P_{xyI}-2(F), P_{xyI}-2(R) dan P_{xyI}-tengah, sebagaimana digambarkan pada skema sebagai berikut.



Hasil analisis sekuen gen *xyI* yang terinsersi dalam plasmid pHIS1525, menunjukkan sekuen DNA dengan urutan sebagai berikut: **start - signal peptide (SP)_{lipA} - gen *xyI* - His₆ - stop**. Hal ini dapat dijelaskan melalui diagram berikut ini:



Hasil analisis terhadap sekuen-sekuen secara komputasi menggunakan program **Bio Edit Sequence Alignment Editor** menunjukkan bahwa gen sisipan dalam plasmid pHIS1525 mempunyai sekuen yang sama dengan sekuen gen penyandi β -xilosidase asal *G. thermoleovorans* IT-08 (*Genbank* nomor akses DQ345777), dengan tingkat homologi sebesar 99,93%. Berdasarkan peta plasmid pHIS1525 dan data-data yang diperoleh pada penelitian ini, maka dapat digambarkan peta plasmid rekombinan yang mengandung gen penyandi β -xilosidase, sebagai berikut:



Gambar 5. Peta Restriksi pSMX.

Dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa rekombinasi gen penyandi

β -xilosidase asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dalam plasmid pHIS1525 berhasil dilakukan, menghasilkan plasmid rekombinan yang dinamakan pSMX.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown TA**, 2001. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, fourth edition, Blackwell Science Ltd., USA.
- Choi JH and SB Lee**, 2004. Secretory and extracellular production of recombinant protein using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol biotechnol*, 64: 625–635.
- Hollmann R, M Malten, R Biedendieck, Y Yang, W Wang, D Jahn, and WD Deckwer**, 2006. *Bacillus megaterium* as a host for recombinant protein production, *Eng. Life Sci.*, 6(5): 470–474.
- Jordan E, M Hust, A Roth, R Biedendieck, T Schirrmann, D. Jahn, and S. Dubel**, 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell factories*, 6(2): 1–11.
- Malten M, R Biedendieck, M Gamer, A Drews, S Stammen, K Buchholz, L. Dijkhuizen, and D Jahn**, 2006. *A Bacillus megaterium Plasmid System for the Production, export and One-Step Purification of Affinity-Tagged heterologous*.
- Sambrook J, and D.W. Russel (eds)**, 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schallmeyer, M. A. Singh, and O.P. Ward**. 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can. J. Microbiol*, 50: 1–17
- Wang W, R Hollmann, T Furch, M. Nimtz, M. Malten, D Jahn, and W. Deckwer**, 2005. Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase, *Proteome science*, 3: 4.
- Yang Y, R Biedendieck, W Wang, M Gamer, M Malten, D Jahn, and W Deckwer**, 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell Factories*, 5: 36.