

KLONING GEN COAT PROTEIN SMV DENGAN PENDEKATAN PCR
(CLONING OF THE COAT PROTEIN GENE OF SMV WITH THE PCR APPROACH)

Sismindari dan Sudjadi
Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM

ABSTRACT

SMV is RNA virus had to be converted to the first strand DNA using oligo (dT) and murine reverse transcriptase. Amplification of coat protein gene region was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) with two primers, 5'TACATCTTGGAACCAATGGCAAGGAGAGAAG3' and 5'AGGACAACAACATTGCCG3'. The PCR product was blunt ended by S1 nuclease, and ligated into SmaI digested pUC18 and phosphatase treatment by calf intestine phosphatase. Ligation mixture was used to transform E. coli DH5 α . Recombinant plasmid was digested with EcoRI and HindIII showed 0,8 kb fragment. Southern blot analysis at high stringency using PCR product as a probe shows that the 0,8 kb fragment produced intense signal.

Key words : SMV, coat protein

INTISARI

SMV merupakan virus RNA sehingga sebagai langkah pertama dalam penelitian ini perlu dilakukan sintesis untai pertama cDNA dengan menggunakan primer oligo-(dT) dan *murine reverse transcriptase*. Kemudian amplifikasi daerah gen *coat protein* dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan untai pertama cDNA sebagai cetak awal dan dua primer yang terdiri dari 5'-TACATCTTGGAACCAATGGCAAGGAGAGAAG-3' dan 5'-AGGACAACAACATTGCCG-3'. Hasil PCR dibuat papak dengan nuklease s1, diligasikan dengan pUC18 yang telah dipotong dengan *SmaI* dan dihilangkan ujung fosfatnya dengan *calf intestine phosphatase* (CIP). Transformasi dilakukan pada *E. coli* DH5 α . Plasmid rekombinan yang didigesti dengan *EcoRI* dan *HindIII* menunjukkan fragmen 0,8 kb. Analisis Southern blot pada suhu tinggi dengan pelacak fragmen hasil PCR menunjukkan fragmen tersebut memberikan signal kuat.

Kata kunci : SMV, coat protein

PENDAHULUAN

Soybean Mosaic Virus (SMV) merupakan suatu virus yang banyak menyerang kedelai. Untuk mengendalikan virus tersebut pada umumnya digunakan cara *cross-protection*. Pada saat ini banyak peneliti menggunakan teknik rekayasa genetik untuk mengembangkan tanaman transgenik yang tahan terhadap virus. Pendekatan dengan cara penyisipan gen *coat protein* (cp) suatu virus pada tanaman telah banyak dilaporkan dapat menyebabkan tanaman tersebut tahan atau toleran terhadap serangan virus. Virus yang telah diteliti di antaranya adalah Tobacco Mosaic Virus (TMV), Potato Virus X dan Potato Virus Y (Ling *et al.*, 1991). Sedangkan tanaman yang digunakan untuk percobaan adalah tanaman tembakau, tomat, kentang, dan alfalfa. Lebih lanjut dilaporkan bahwa tanaman transgenik menunjukkan sifat yang sama, baik pada percobaan laboratorium maupun pada sawah. Penelitian sejenis sedang dilakukan di Australia

pada tanaman kacang tanah terhadap infeksi virus Peanut Stripe Virus (PSV).

SMV berbentuk batang dengan satu macam *coat protein*. Genom potyvirus tersebut terdiri dari RNA untai tunggal dengan ukuran sekitar 10 kb dan poly A pada ujung 3'nya. Pada infeksi, tidak diperoleh subgenom RNA pada jaringan tanaman terinfeksi. SMV menyandi delapan protein yang pada awalnya merupakan satu protein besar yang kemudian mengalami pemotongan (*post-translationally processed*) menjadi protein virus (Eggenberger *et al.*, 1989). Urutan basa dari gen *cp* SMV dan daerah pengapitnya telah dilaporkan oleh Eggenberger *et al.* (1989). Dari urutan basa tersebut kemudian disusun dua primer untuk amplifikasi daerah gen *cp*. Kloning gen *cp* saja, tanpa bagian genom SMV lainnya diharapkan akan memberikan hasil yang lebih meyakinkan bahwa perubahan sifat tanaman transgenik benar-benar disebabkan oleh penyisipan gen *cp* SMV.

Virus kedelai isolat Yogyakarta telah berhasil diisolasi dan dimurnikan dengan metode bercak tunggal pada *Phaseolus vulgaris* dan kemudian diperbanyak pada tanaman kedelai c.v. Wilis (Sumardiyono *et al.*, 1994). Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk memperoleh tanaman kedelai transgenik yang toleran terhadap infeksi virus berdasarkan pada mekanisme resistensi protein pembungkus.

Penelitian ini bertujuan untuk menerapkan teknik rekayasa genetik dengan mengklon gen *cp* SMV tersebut dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan menggunakan vektor pUC18. Dari penelitian ini diperoleh dua klon (pCP18-1 dan pCP18-30) yang diduga membawa gen *cp*.

BAHAN DAN METODE

Virus kedelai yang merupakan isolat lokal (Sumardiyono *et al.*, 1994). Sebagai vektor untuk kloning digunakan pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) dan sebagai sel inang digunakan *Escherichia coli* DH α 5.

Isolasi RNA

Suspensi virus diekstraksi dengan fenol-kloroform dalam suasana basa untuk menghilangkan protein pembungkusnya. Fase air kemudian ditambah NaCl dan PEG6000 (konsentrasi akhir). Pellet RNA dilarutkan dalam buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

Sintesis untai pertama cDNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Untai pertama cDNA disintesis sesuai metode baku dengan menggunakan *murine reverse transcriptase* dan primer oligo dT. Sebelum dilakukan sintesis larutan RNA dipanaskan terlebih dahulu pada 70°C untuk menghilangkan struktur sekunder.

Kloning gen *cp*.

Daerah gen *cp* disintesis menjadi DNA untai ganda dan diamplifikasi dengan cara PCR dengan menggunakan *Taq* polimerase (Boehringer) dan dua primer pengapit 5'TACAT-CTGAACCATGGCAGGCAAGGAGAAG3' dan 5'AGGACAACAACATTGCCG3'. Denaturasi dilakukan pada suhu 94°C, *annealing* pada suhu 55°C dan sintesis pada 72°C. Amplifikasi dilakukan 30 putaran.

Produk PCR dibuat papak pada kedua ujungnya dengan nuklease S1 pada suhu 37°C, kemudian diligasikan dengan T7 DNA ligase pada pUC18 yang telah dipotong dengan *Sma*I dan kedua ujung fosfatnya telah dihilangkan dengan *calf intestinal phosphatase* (CIP). Campuran ligasi tersebut kemudian digunakan untuk mentransformasi *E. coli* DH α 5 sesuai cara yang dijelaskan Kushner (1978) dengan menggunakan campuran kalsium klorida, rubidium klorida dan MOPS. Transforman diseleksi pada medium Lauria Bertani yang mengandung ampisilin, X-gal dan IPTG.

Isolasi DNA plasmid

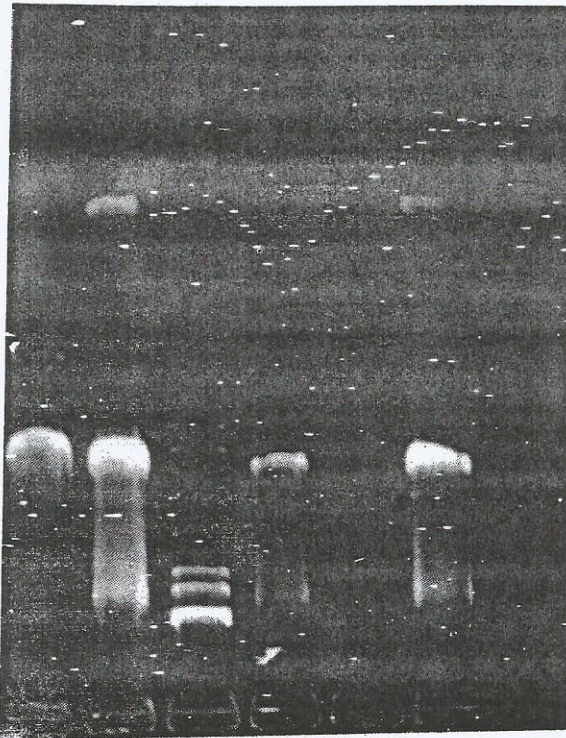
DNA plasmid diisolasi dengan lisis alkalis seperti dijelaskan oleh Sambrook *et al.* (1989).

Hibridisasi Southern

Southern blot dari gel agaros hasil elektroforesis klon 1 dan klon 30 menggunakan membran Hybon N selama semalam. Selanjutnya membran tersebut dicuci dan dikeringkan pada suhu 80°C selama 2 jam, kemudian dihibridisasi selama semalam pada temperatur 66°C dengan pelacak fragmen hasil PCR berlabel ³²P α (dATP) dan menggunakan pelarut hibridisasi seperti yang dijelaskan oleh Sambrook *et al.* (1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi. SMV merupakan virus RNA untai tunggal, sehingga tidak dapat langsung diklon pada suatu vektor. RNA tersebut harus terlebih dahulu diubah menjadi DNA untai tunggal oleh *murine reverse transcriptase* dengan menggunakan primer oligo dT 12 mer. Hasil sintesis DNA untai tunggal tersebut digunakan sebagai cetakan pada amplifikasi gen *cp*. Primer yang digunakan untuk amplifikasi dirancang dari susunan basa pengapit gen *cp* (Eggenberger *et al.*, 1989). Amplifikasi dilakukan 30 siklus. Hasil amplifikasi diperoleh fragmen sekitar 0,80 kb (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil amplifikasi
Figure 1. The result of amplification

Kloning gen *cp* SMV. Pada penelitian ini dipilih pUC18 sebagai vektor, dengan pertimbangan bahwa pUC18 mempunyai ukuran yang lebih kecil dengan jumlah kopi (*copy number*) yang besar dibanding pRT101, suatu plasmid vektor untuk tanaman. Fragmen DNA hasil amplifikasi pada umumnya mempunyai ujung tergantung, sehingga perlu dibuat papak menggunakan nuklease S1. Fragmen tersebut kemudian diligasikan pada vektor pUC18 yang telah dipotong dengan *Sma*I yang juga mempunyai ujung papak. Supaya tidak terjadi penyambungan kembali, maka kedua ujung fosfat dari pUC18 dihilangkan dengan CIP. Campuran ligasi kemudian digunakan untuk mentransformasi *E. coli* DH5 α . Transforman diseleksi pada agar Luria Bertani-ampisilin yang mengandung X-gal dan IPTG. Koloni yang membawa plasmid dengan penyisipan DNA virus dapat dilihat dari warna koloni putih, sedang koloni yang membawa pUC18 utuh berwarna biru. Pada dua kali percobaan diperoleh 36 koloni putih.

Masing-masing koloni yang diambil secara acak ditumbuhkan pada Luria Bertani-ampisilin dan plasmidnya diisolasi. Masing-masing plasmid dipotong dengan enzim restriksi *Eco*RI dan *Hind*III dan kemudian dielektroforesis pada agaros 0,8%. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa ada beberapa kemungkinan klon yang tidak membawa DNA virus. Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya dimer pUC ataupun pada tahap fosfatase DNA plasmid sedikit terpotong. Untuk klon yang membawa sisipan fragmen DNA dapat terlihat adanya dua pita pada elektroforesis. Pita dengan ukuran 2,7 kb adalah fragmen pUC18, sedangkan pita 0,8 kb adalah gen *cp*. Dari 30 klon dengan beberapa kali percobaan analisis diperoleh dua klon yang menunjukkan adanya fragmen DNA sisipan, yang kemudian diberi nama pCP18-1 dan pCP18-30.

Analisis klon. Untuk lebih meyakinkan bahwa klon tersebut betul-betul membawa fragmen hasil PCR, maka selanjutnya diuji dengan metode hibridisasi Southern. Pertama diblot untuk memindahkan fragmen DNA ke membran nilon. Selanjutnya dilakukan hibridisasi pada temperatur 55°C dengan menggunakan pelacak fragmen hasil PCR yang telah dilabel dengan [³²P- α]dATP. Hasil autoradiografi menunjukkan bahwa terjadi komplementasi antara pelacak dengan fragmen DNA sisipan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua klon tersebut membawa fragmen hasil amplifikasi.

Digesti pCP18-1 dengan berbagai enzim restriksi menunjukkan bahwa DNA sisipan mempunyai lokasi pengenalan untuk *Bam*HI, *Sma*I dan *Sal*I tetapi tidak mempunyai pengenalan untuk *Bgl*I, *Eco*RI, dan *Hind*III. Peta restriksi belum dikerjakan menunggu hasil digesti dengan enzim lainnya. Oleh karena kloning hanya digunakan satu enzim, maka ada kemungkinan diperoleh dua orientasi. Untuk ini 0,8 kb fragmen *Eco*RI-*Hind*III diisolasi dari agaros LMP dan kemudian diligasikan pada pUC19 yang telah dipotong dengan *Eco*RI-*Hind*III. Seleksi dilakukan seperti dijelaskan pada waktu kloning. Beberapa koloni putih diperbanyak dan diisolasi DNA plasmidnya yang kemudian dipotong dengan *Eco*RI-*Hind*III. Hasil menunjukkan fragmen dengan ukuran 0,8 kb. Klon pada pUC19 ini diberi nama pCP19-1.

Pada penelitian lebih lanjut gen *cp* pada pCP19-1 akan dipindahkan pada vektor pRT101 untuk memberikan promoter S35 CaMV dan poli-A. Selanjutnya gen *cp* yang telah mempunyai promoter dan poli-A ini dipindahkan pada vektor pCV002 yang mempunyai T-DNA dan marker kanamisin. Konstruk ini siap untuk transformasi protoplas tanaman tembakau ataupun transformasi eksplan dengan pertolongan *Agrobacterium*.

DAFTAR PUSTAKA

- Beachy, R.N., Loesch-Fries, and N.E. Turner. 1990. Coat Protein Mediated resistance Against Virus Infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.
- Eggenberger, A.L., D.M. Stark, and R.N. Beachy, 1989. The Nucleotide Sequence of Soybean Mosaic Virus Coat Protein Coding Region and Its Expression in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and Tobacco Callus, *J. Gen. Virol.* 70, 1853-1860.
- Hollings, M. and A.A. Brunt, 1981, Potyvirus. In: E. Kurtsak (ed.) *Plant Virus Infections*. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 733-807.
- Kushner, S.R. 1978. An Improved Method for Transformation of *Escherichia coli* with ColE1-Derived Plasmid, In: H.B. Boyer and S. Nicosia (Eds.), *Genetic Engineering*, Elsevier/ North-Holland Publishing Co, Amsterdam, 17-23.
- Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slingtom, L., Gonsalves, D. 1991. Protection Against Detrimental Effects of Potyvirus Infection in Transgenic Tobacco Plants Expressing the Papaya Ringspot Virus Coat Protein Gene, *Biotechnology* 9:752-758
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stark, D.M. and R.N. Beachy. 1989. Protection Against Potyvirus Infection in Transgenic Plants : Evidence for Broad Spectrum Resistance. *Biotechnology* 7: 1257 - 1262.
- Sumardiyono, Y.B., Sudjadi, Sismindari dan S. Sulandari, 1994. Laporan RUT Tahun I. (Tidak dipublikasikan).
- Yanisch-Perron, C., J. Viera and J. Messing, 1983. Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequence of the M13mp19 and pUC19 vectors, *Gene*, 33: 103-119.