

MODUL BAKTERIOFAG

METODE REKAYASA GENETIKA PADA BAKTERIOFAG

Penyusun:

Erlia Narulita, S.Pd., M.Si., Ph.D.



FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021



UNIVERSITAS JEMBER

MODUL BAKTERIOFAG

Metode Rekayasa Genetika pada Bakteriofag

SITE SPESIFIC MUTATION

A. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu Memahami metode biologi molekuler yang digunakan untuk menghasilkan perubahan pada sekuens DNA dan SDM (Site-directed mutagenesis)

B. Uraian Konsep dan Teori

Metode SDM (Site-directed mutagenesis) berawal dari konsep mutagenesis yaitu perubahan informasi genetik pada suatu organisme yang terjadi secara random atau spontan di alam (Papp et al., 2002). Faktor yang dapat menginduksi terjadinya mutasi adalah karena adanya paparan radiasi sinar xray dan senyawa kimia yang bersifat mutagenik. Berdasarkan analogi, maka dikembangkan metode agar dapat menghasilkan poin mutasi yang terlokalisasi. Contoh senyawa kimia yang digunakan diantaranya adalah aminopurine, nitrosoguanidine dan bisulfite. Pertama kali SDM diperkenalkan tahun 1974 oleh Charless Weissman (Bachman, 2013). Tahun 1978 Clyde Hutchison dan Michael Smith menyempurnakan metode SDM sehingga lebih fleksibel dengan menggunakan DNA polimerase dan penambahan oligonukleotida pada primer. Penemuan ini membawa Michael Smith menjadi peraih Nobel Prize di bidang kimia tahun 1993 bersama Kary Mullis, seorang inventor mesin polymerase chain reaction (PCR). Teknik SDM berkembang secara signifikan setelah ditemukannya teknik perbanyakan (amplifikasi) untai DNA melalui metode PCR (Huang et al., 2014; Liu et al., 2016).

APLIKASI DASAR SDM

Tahap awal yang dibutuhkan untuk melakukan teknik SDM adalah mendesain dan mensintesis pasang nukleotida (primer DNA). Primer tersebut harus mengandung target nukleotida yang akan dimutasi dan dapat diamplifikasi dalam untai ganda (double stranded) DNA target. Mutasi melalui SDM dapat dilakukan dengan satu atau beberapa poin mutasi berupa delesi (penghilangan nukleotida), substitusi (penggantian nukleotida), ataupun insersi (memasukkan nukleotida). Gen hasil dimutasi dimasukkan (transformasi) ke dalam host cell seperti sel *E. coli*, selanjutnya dilakukan seleksi mutan dan konfirmasi melalui DNA sekuensing (Podevin et al., 2013; Jenkins, 2014; Sattarzadeh et al., 2015).

SDM UNTUK KARAKTERISASI PROTEIN DAN FISILOGIS TANAMAN

Dalam proses metabolismenya, fungsi protein bermacam-macam diantaranya sebagai katalis (enzim), transport, imunitas (antibodi), serta komunikasi (reseptor). Di bidang pertanian, metode SDM juga sering digunakan untuk mengkaji fungsi protein yang terlibat dalam proses metabolisme dan fisiologi tanaman (Kovacks et al., 2015). Informasi mengenai karakter protein akan berguna untuk memunculkan ide dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman. Banyak penelitian yang menerapkan teknik SDM untuk merakit tanaman mutan, selanjutnya dianalisis keberadaan protein mutan tersebut melalui immunoblotting dan pengamatan menggunakan green fluorescent protein (GFP) (Sawitri et al., 2016; Sawitri et al., 2018). Dalam hal ini, tanaman *Arabidopsis thaliana* sering dijadikan tanaman model untuk mengamati ekspresi protein mutan. Salah satu kajian penting dalam fisiologi tanaman adalah mempelajari fungsi protein yang berperan sebagai reseptor cahaya, yaitu UV Resistance Locus 8 (UVR8). Protein UVR8 terlibat dalam proses pertumbuhan dan adaptasi tanaman terhadap sinar ultraviolet-B (UV-B) dimana struktur proteinnya telah diketahui melalui metode x-ray kristalografi. Akan tetapi, adanya struktur protein saja tidak dapat menjawab mekanisme kerja protein UVR8 secara presisi. Oleh karenanya SDM digunakan untuk mengetahui fungsi vital asam amino pada proses fotomorfogenesis ketika diinduksi oleh UV-B melalui mutasi triptofan dan arginin.

SDM UNTUK REKONSTRUKSI MODEL METABOLIK PADA METABOLIT SEKUNDER TANAMAN

Eksplorasi enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder telah banyak dilakukan, baik menggunakan metode gene mining maupun *co-expression analysis*. Urutan asam amino dari enzim sejenis dibandingkan antar spesies sehingga menunjukkan adanya urutan asam amino yang sama (conserve) dan beragam (Chen et al., 2016a; Chen et al., 2016b). Keragaman urutan asam amino memiliki peran penting dalam fungsi enzimatis dan keragaman metabolit sekunder. Salah satu metode yang memungkinkan untuk menghasilkan metabolit sekunder baru adalah rekayasa enzim yang terlibat dalam sintesis metabolit sekunder menggunakan SDM.

SDM UNTUK PENGEMBANGAN DAN PENCARIAN OBAT (*DRUG DESIGN DEVELOPMENT*)

Teknik SDM ini berguna untuk mengidentifikasi situs penempelan obat tersebut pada proteinnya. Pada tahap pengembangan dan pencarian senyawa baru dari alam yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, dipelajari juga kemungkinan jalur mekanisme kerja senyawa tersebut. Untuk mempelajari jalur ini, teknik mutasi pada situs kunci suatu protein adalah

tahap awal dan fundamental untuk memahami interaksi antara protein target dan mekanisme dari kandidat senyawa aktif. Selain itu, pemodelan molekular berdasarkan SDM juga dapat memberikan gambaran tentang kemungkinan adanya variasi resistensi obat tertentu.

C. Metode Praktikum

Alat dan bahan

- a). Bahan PCR
 - forward primer 2.5 pmoles/ μ l
 - reverse primer 2.5 pmoles/ μ l
 - 40 mM dNTP mix, (10 mM each)
 - 10x PfuUltra Buffer (contains Mg^{++})
 - Template DNA, 2 ng/ μ l
 - PfuUltra Hotstart (Stratagene)
 - 8,75 μ l sterile H_2O
- b). PCR program dan Elektroforesis
 - TAE Buffer
 - Aquades
 - Gel Agarrose
 - Mikropipet
 - Elektroforesis dan PCR

Langkah kerja

Mix Bahan PCR

- 0.5 μ l forward primer 2.5 pmoles/ μ l
 - 0.5 μ l reverse primer 2.5 pmoles/ μ l
 - 0.25 μ l 40 mM dNTP mix, (10 mM each)
 - 1.25 μ l 10x PfuUltra Buffer (contains Mg^{++})
 - 1 μ l Template DNA, 2 ng/ μ l
 - 0.25 μ l PfuUltra Hotstart (Stratagene)
 - 8.75 μ l sterile H_2O
-
- 12.5 μ l total

PCR Program

1. 5 menit @95°C
2. Repeat 18x
 - (a) 50 detik @95°C
 - (b) 50 detik @60°C
 - (c) 1 menit+1 menit/1kb template @68°C
3. 7 menit @68°C

Elektroforesis

1. Buat 250 ml larutan buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 5 ml TAE 50x ke dalam 245ml akuades.
2. Buat gel aragose 1% dengan cara menimbang aragose 0,2% untuk dilarutkan ke dalam buffer TAE 1x hingga volume 20 ml. larutan aragose dididihkan hingga larut sempurna.
3. Siapkan baki gel agarose. Lekatkan selotip di tiap ujung baki gel agarose (pastikan bahwa selotip melekat kuat dan tidak ada lubang pada masing-masing ujung baki)
4. Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki gel agarose dengan posisi hampir menyentuh dasar baki
5. periksalah suhu larutan agarose dengan cara menempelkan Erlenmeyer ketahanan jika suhunya sudah turun hingga sekitar 50 - 60 derajat Celcius tambahkan 2- 5 µl etidium bromid (PERINGATAN KERAS!!, gunakan sarung tangan karena bersifat karsinogenik)
6. Larutan agarose dihomogenkan sebentar kemudian tuangkan larutan ke dalam baki gel agarose, taruh sisiran pada cetakan gel, Biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
7. Ambil sisir dengan hati-hati.
8. Yang telah berisi gel agarose ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan larutan buferMasukkan baki TAE 1x (pastikan bahwa gel terendam seluruhnya salam TAE)
9. Masukkan sampel DNA ke dalam sumuran gel agarose dangan menggunakan mikropipet.

10. Buatlah catatan mengenai nomor sumuran dan jenis sampel DNA yang dimasukkan.
11. Hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran, Jika tidak demikian ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).
12. Nyalakan sumber arus, aturlah voltase dan waktu running hingga diperoleh angka 100 V dan 25 menit dengan cara menekan tombol yang sesuai pada sumber arus.
13. Jalankan elektroforesis (lakukan running) dengan cara menekan tombol run pada sumber arus.
14. Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai oleh adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus dan angkatlah baki dari tangki elektroforesis.
15. Keluarkan gel dan letakkan di atas UV transluminator (letakkan selubung kaca hitam di atas UV transluminator)
16. Nyalakan UV transluminator, amati pita-pita DNA yang tervisualisasi.

Digest dengan Enzim Restriksi

1. Meletakkan semua reagen di atas es.
2. Memasukkan 10 μ l amplified DNA sampel ke microtube baru kemudian menambahkan 1 μ l enzim restriksi
3. Homogenkan perlahan dengan mengetuk-ngetuk tabung.
4. Sentrifugasi singkat untuk mengendapkan isi tabung.
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (waktu dan suhu disesuaikan dengan enzim restriksi yang digunakan)
6. Menonaktifkan enzim restriksi dengan inkubasi pada suhu tinggi yaitu dengan suhu 65°C selama 20 menit (waktu dan suhu disesuaikan dengan enzim restriksi yang digunakan)
7. Hasil reaksi dapat diketahui dengan elektroforesis

Transformasi ke Kompeten Sel

1. Pembuatan Medium Luria Bertani (LB) Cair dan Agar

2. Pembuatan Sel Kompeten
3. Transformasi Plasmid ke Sel Kompeten *E.coli* TOP'10
4. Isolasi Plasmid
5. Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi UV

D. Daftar Pustaka

- Bachman, J. 2013. Site-Directed Mutagenesis. *Methods in Enzymology*. Vol. 529: hal. 241-248.
- Chen, X., Li, J., Wang, L., Ma, G., dan Zhang, W. 2016a. A mutagenic study identifying critical residues for the structure and function of rice manganese transporter OsMTP8.1. *Scientific Reports*. Vol. 6: hal. 32073
- Chen, X., Song, W., Gao, C., dkk. 2016b. Fumarate production by *Torulopsis glabrata*: engineering heterologous fumarase expression and improving acid tolerance. *PLoS One*. Vol. 11: hal. e0164141
- Huang, X., Yang, P., Ouyang, X., Chen, L., dan Deng, X.W. 2014. Photoactivated UVR8-COP1 module determines photomorphogenic UV-B signaling output in *Arabidopsis*. *PLoS Genetic*. Vol. 10: hal. e1004218.
- Jenkins, G. I. 2014. The UV-B Photoreceptor UVR8: from structure to physiology. *The Plant Cell*. Vol. 26: hal. 21-37
- Koch, B., Buchholz, M., Wermann, M., dkk. 2012. Probing secondary glutaminyl cyclase (QC) inhibitor interactions applying an in silico-modeling/site-directed mutagenesis approach: implications for drug development. *Chemical Biology & Drug Design*. Vol. 80, No. 6: hal. 937–946
- Kovacs, K.A., Steinmann, M., Halfon, O., Magistretti, P.J., Cardinaux, J.R. 2015. Complex regulation of CREB-binding protein by homeodomain-interacting protein kinase 2. *Cellular Signaling*. Vol. 27, No. 11: hal. 2252–2260
- Liu, C.L., Hung, H.C., Lo, S.C. 2016. Using mutagenesis to explore conserved residues in the RNA-binding groove of influenza virus nucleoprotein for antiviral drug development. *Scientific Reports*, Vol. 6: hal. 21662
- Podevin, N., Davies, H.V., Hartung, F., Nogue, F., dan Casacuverta, J.M. 2013. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*. Vol. 31: hal. 375-383.

- Sattarzadeh, A., Saberianfar, R., Zipfel, W.R., Menassa, R., dan Hanson, M.R. 2015. Green to red photoconversion of GFP for protein tracking in vivo. *Scientific Reports*. Vol. 5: hal. 11771.
- Sawitri, W.D., Narita, H., Ishizaka-Ikeda, E., Sugiharto, B., Hase, T., dan Nakagawa, A. 2016. Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: an importance of the N-terminal domain for an allosteric regulatory property. *The Journal of biochemistry* Vol. 159: hal. 599-607.
- Sawitri, W.D., Afidah, S.N., Nakagawa, A., Hase, T., dan Sugiharto, B. 2018. Identification of UDP-glucose binding site in glycosyltransferase domain of sucrose phosphate synthase from sugarcane (*Saccharum officinarum*) by structure-based site-directed mutagenesis. *Biophysical Reviews*. Vol. 10: hal. 293-298.

CRISPR-Cas

A. Tujuan Praktikum

Mahasiswa mampu memahami metode biologi molekuler yang digunakan untuk menghasilkan perubahan pada sekuens DNA dan memahami metode CRISPR-Cas

B. Uraian Konsep dan Teori

Genome editing adalah metode perakitan genetik dimana sebuah sekuens DNA bisa disisipkan, diganti dihapus, dan atau dipindahkan dari genom suatu organisme ke organisme lain dengan bantuan suatu enzim nuklease yang berfungsi seperti gunting molekuler (Schinkel & Schillberg, 2016; Shan et al., 2014; Sprink et al., 2015). Tujuan dari metode ini adalah mengedit susunan basa DNA pada genom sehingga ketika diterjemahkan dalam bahasa asam amino bisa merubah sifat dari organisme tersebut.

Beberapa teknik genome editing yang telah digunakan diantaranya Zinc Finger Nucleases (ZFNs) dan Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) (Ledford 2015; Ledford, 2016). Teknik ini berbeda dengan teknik transgenesis klasik karena tidak melibatkan pengambilan gen dari spesies lain melainkan mempercepat terjadinya pros mutasi genetik yang secara alami terjadi saat proses pemuliaan. Teknologi ini memungkinkan para peneliti untuk menciptakan mutasi secara permanen, namun demikian, teknik ini sangat mahal dan membutuhkan waktu yang lama serta terbatas untuk digunakan dalam skala luas (Lusser et al., 2013; Pennisi, 2013; Puchta and Fauser 2013) para peneliti berusaha untuk menciptakan modul terbaru genome editing yang lebih murah dan memiliki presisi tinggi. CRISPR merupakan sebuah teknologi pengubah gen dipandu RNA yang akan mengubah gen sesuai harapan penggunanya. CRISPR telah dimanfaatkan dalam dunia medis sebagai bagian dari diagnostik dan upaya terapeutik, terutama terapi gen (Waltz, 2016; Balhaj et al., 2013; Hartung and Schlemann, 2014; Todaka et al., 2015) CRISPR masih terkait dengan masalah implikasi sosial dan etik dalam aplikasinya. Di samping semua kontroversi tersebut, sampai saat ini CRISPR masih menjadi satu-satunya teknik pengubahan gen di masa yang akan datang dengan kemudahannya, harga yang lebih murah dan efisiensinya.

C. Metode Praktikum

Alat dan bahan

- gRNA
- Plasmid replikasi
- Plasmid biner

Langkah kerja

1. Identifikasi sekuen gen target : exon, promoter pada gene database
2. Desain sgRNA
 - Guide RNA (gRNA) : terdiri dari 20 nt dari sekuen target dan 3 nt of PAM (Protospacer-adjacent motif)
 - Sekuen PAM : 5'-NGG dan 5'-NGG
 - Untuk KO gen: menggunakan exon ke 1
 - Sekuen exon 1 diinput ke website CRISPR-P (<https://cbi.hznau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)
3. Seleksi kandidat gRNAs dari CRISPR-P
4. Pesan gRNA ke perusahaan penyedia
5. Cloning sgRNA ke plasmid replikasi
6. Cloning sgRNA ke plasmid biner
7. PCR colony

D. Daftar Pustaka

Ledford, H. 2015: CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522(7554), 20-24.

Ledford, H. 2016: Riding the CRISPR Wave. *Nature*, 531(7593), 156-159.

Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E. 2012: Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotech* 30, 231-239.

Pennisi, E. 2013: The CRISPR craze. *Science*, 341(6148), 833-836.

Puchta H, Fauser F. 2013: Gene targeting in plants: 25 years later. *The International Journal of Developmental Biology* 57, 629-637. Qaim, M, & Zilberman, D. (2003): Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, 299(5608), 900-902.

Jiang, W, Bikard, D, Cox, D, Zhang, F, & Marraffini, LA. (2013): RNA-guided

editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233-239.

Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C. 2014: Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protocols* 9, 2395-2410.

Sprink T, Metje J, Hartung F. 2015: Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 47-53.



FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021