

Pembuatan Perpustakaan Genom Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Kultivar Lumut di dalam Fag Lambda

Suharsono

*Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IPB, Jl. Kamper, Gd PAU, Kampus IPB
Darmaga, Bogor 16610
Departemen Biologi, FMIPA, IPB, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16610*

Abstract

*Genomic library of soybean cv. Lumut had been constructed in λ phage vector. Partial digestion of total DNA by 0.014 units *Sau3AI* per μg DNA at 37°C for 30 minutes gave long fragment DNA. Ligation between insert DNA and λ vector with molarity ratio of insert DNA to λ vector = 2.9 : 1 followed by phage packaging, resulted in the titer of 2.8×10^4 to 3.6×10^5 pfu for 0.5 μg insert plant DNA. Among them, 60 to 91% were recombinants depending on packaging extract protein. By using 1 μg insert plant DNA and packaging extract protein from Stratagene, we obtained 6.6×10^5 pfu recombinant. Since the length of insert DNAs in λ recombinant phages were 15 kb in average and the genome size of diploid soybean was 2.23×10^6 kb and 90% of the genome was present in 2 copies, then the genomic library constructed had contained all genome of soybean cv. Lumut.*

Key words: *genomic library, partial digestion, λ phage, soybean, Lumut cultivar*

Pendahuluan

Kedelai merupakan komoditas yang sangat penting di Indonesia baik sebagai bahan pangan maupun pakan. Meskipun berbagai usaha untuk meningkatkan produksi kedelai nasional telah banyak dilakukan, baik melalui program intensifikasi maupun ekstensifikasi, pada kenyataannya produksi nasional belum dapat mencukupi kebutuhan dalam negeri sehingga sampai dengan saat ini Indonesia masih mengimpor kedelai.

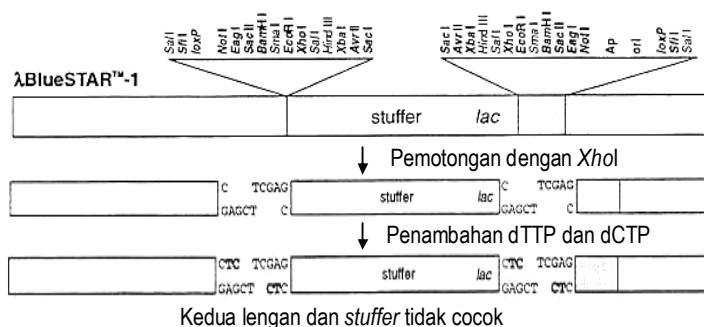
Baik usaha intensifikasi maupun ekstensifikasi memerlukan tanaman yang secara genetik berkualitas baik. Salah satu tahapan yang sangat penting bagi program perbaikan genetik adalah isolasi dan karakterisasi suatu gen yang menyandi sifat unggul tertentu.

Gen pada suatu organisme dapat diisolasi melalui penapisan terhadap perpustakaan genom menggunakan pelacak heterolog dari organisme lain. Perpustakaan genom adalah kumpulan semua gen yang dimiliki oleh suatu organisme, termasuk pula daerah bukan penyandi, sehingga sangat penting untuk mengisolasi suatu gen.

Peranan suatu gen terhadap sifat tertentu dapat diketahui dengan membandingkan struktur gen dan pengendali ekspresinya di antara dua individu yang berbeda. Untuk mengetahui peranan suatu gen dalam menentukan toleransi terhadap aluminium, diperlukan perbandingan antara gen dari kultivar yang toleran dan gen dari kultivar yang peka terhadap aluminium. Perpustakaan genom kedelai kultivar Slamet yang toleran terhadap aluminium telah dikonstruksi (Suharsono, 2002). Sementara itu, pembuatan perpustakaan genom dari kedelai yang peka terhadap aluminium sangat penting dilakukan karena dari perpustakaan genom ini dapat diisolasi dan dipelajari gen yang berhubungan dengan toleransi terhadap aluminium. Pada penelitian ini, perpustakaan genom dikonstruksi dari tanaman kedelai kultivar Lumut sebagai kultivar yang peka terhadap aluminium.

Materi dan Metode

Kedelai kultivar Lumut yang peka terhadap cekaman aluminium (Jusuf *et al.* 1999) digunakan sebagai bahan tanaman. Sebagai vektor pengklonan digunakan λ BlueSTAR-1 dari Novagen yang telah dipotong dengan *Xho*I dan disisipi dengan dCTP dan dTTP pada ujung potongannya sehingga menghasilkan ujung menggantung TC (Gambar 1). *Escherichia coli* galur ER1647, galur BM25.8, dan galur XL-1 Blue berturut-turut digunakan sebagai inang untuk mengamplifikasi fag λ rekombinan, untuk memproses eksisi fag rekombinan menjadi plasmid rekombinan, dan untuk mengamplifikasi plasmid rekombinan.



Gambar 1. Vektor pengklonan λ BlueSTAR yang telah dipotong dan mengalami penyisipan nukleotida dTTP dan dCTP pada ujung potongannya

Figure 1. λ BlueSTAR cloning vector cut and filled-in by dTTP and dCTP nucleotides at the respective end

DNA total tanaman diisolasi dari daun tanaman kedelai berumur dua bulan. Isolasi DNA tanaman dilakukan seperti Suharsono (2002). DNA hasil isolasi ini kemudian dipotong parsial dengan enzim *Sau*3AI (Takara) pada konsentrasi 0,43; 0,28; 0,23; dan 0,014 unit tiap μ g DNA pada suhu 37°C selama 30 menit.

Agar dapat disisipkan ke dalam vektor λ BlueStar-1, setelah dipotong secara parsial, ujung fragmen DNA tanaman disisipi dengan dua nukleotida dATP dan dGTP sesuai dengan prosedur Novagen (1997). Sebanyak 20 μ g fragmen DNA dicampur dengan *insert fill in buffer* yang mengandung 50 mM Tris-HCl pH 7,3; 10 mM MgCl₂; 50 μ g/ml BSA (*bovine serum albumine*); 1 mM dATP dan 1mM dGTP (Novagen); 4 μ l 100 mM DTT; dan 20 unit Klenow DNA polimerase (Takara) dalam volume total 400 μ l. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 10 menit. Fragmen dengan ukuran 7 hingga 20 kb diisolasi menggunakan kolom (Chroma Spin 1000, Clontech) sesuai dengan prosedur Clontech (1995).

Sebanyak 1 μ g fragmen DNA tanaman yang ujungnya telah disisipi nukleotida dicampur dengan 1 μ g λ Bluestar-1 (Novagen); 9 unit T4 DNA ligase (Takara); dan bufer ligasi (30 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 5% *polyethylene glycol* 8000) dalam volume total 20 μ l. Campuran diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

Setelah proses ligasi, DNA λ rekombinan dikemas di dalam protein mantel menggunakan dua macam ekstrak protein, yaitu dari Novagen dan dari Stratagene. Sebanyak 10 μ l reaksi ligasi dicampur dengan 50 μ l protein ekstrak pengemas (Novagen atau Stratagene) sesuai dengan prosedur Suharsono (2002). Campuran diinkubasi pada suhu 22°C selama dua jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 440 μ l bufer SM (5,8 g/l NaCl; 2g/l MgSO₄.7H₂O; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01% gelatin).

Jumlah titer ditentukan dengan melakukan transfeksi λ ke *E. coli* galur ER1647 dengan mencampur 100 μ l *E. coli* (OD₆₀₀=1) dengan 100 μ l fag λ . Untuk memudahkan penghitungan, fag λ hasil pengemasan diencerkan 100 kali. Campuran diinkubasi di dalam balok pemanas pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah ditambahkan 4 ml

agarosa cair permukaan (*molten top agarose*) (10 g/l *bacto-tryptone*, 5 g/l NaCl, 6 g/l agarosa) yang bersuhu 47°C, campuran disebar pada cawan petri yang mengandung media H (10 g/l *bacto-tryptone*, 8 g/l NaCl, 15 g/l *bacto-agar*) sesuai prosedur Novagen (1997). Sebelum disebar pada media H, X-gal ditambahkan ke dalam agarosa cair permukaan dengan konsentrasi akhir 500 µg/ml untuk mengidentifikasi λ rekombinan. Setelah agarosa yang di permukaan menjadi beku, cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Plak (*plaque*) yang berwarna biru adalah plak bukan rekombinan, dan plak yang jernih tidak berwarna adalah plak rekombinan.

Eksisi plasmid rekombinan dilakukan dengan mencampur 100 µl *E. coli* galur BM25.8 (OD₆₀₀=1) dengan 100 µl fag λ. Campuran diinkubasi di dalam balok pemanas pada suhu 37°C selama 30 menit dan disebar pada media LB (10 g/l *bacto-tryptone*, 5 g/l ekstrak khamir, 10 g/l NaCl pH7,5) padat (1,5% *bacto-agar*) yang mengandung antibiotika 100 mg/l ampisilin.

Untuk isolasi plasmid rekombinan, satu koloni bakteri *E. coli* ditumbuhkan di dalam 2 ml media LB yang mengandung 100 mg/l ampisilin di dalam inkubator bergoyang (250 rpm) pada suhu 37°C selama semalam. Isolasi plasmid rekombinan dari bakteri *E. coli* dilakukan dengan mengikuti prosedur Suharsono (2002).

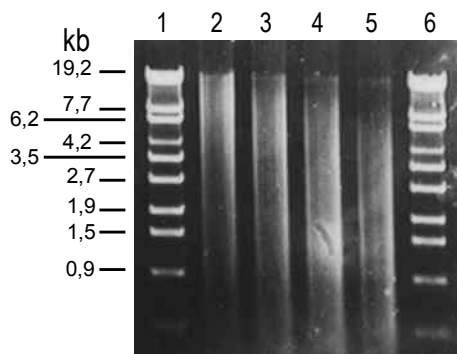
Selanjutnya, satu koloni bakteri *E. coli* galur XL1-Blue dikultur dalam 2 ml media LB cair semalam di dalam inkubator bergoyang (kecepatan 250 rpm) pada suhu 37°C, kemudian disubkultur dalam 100 ml 2 x YT cair yang telah mengalami modifikasi (20 g/l *bacto-tryptone*, 5 g/l *bacto- yeast extract*, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄.7H₂O, 10 mM MgCl₂.6H₂O) dengan kondisi yang sama hingga OD₆₀₀=0,6. Pembuatan bakteri kompeten dan transformasi genetik bakteri dengan plasmid dilakukan dengan mengikuti prosedur Suharsono (2002).

Hasil dan Pembahasan

DNA kedelai kultivar Lumut berukuran besar, yakni 7 hingga 20 kb, diperoleh dari pemotongan 1 µg DNA menggunakan 0,014 unit *Sau3AI* (Takara) pada suhu 37°C selama 30 menit. Suharsono (2002) melaporkan hasil pemotongan DNA dengan ukuran fragmen yang sama pada kedelai kultivar Slamet menggunakan jumlah enzim *Sau3AI* dan kondisi pemotongan yang sama dengan penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa pemotongan dengan enzim *Sau3AI* pada konsentrasi 0,014 unit tiap µg DNA kedelai pada kondisi 37°C selama 30 menit dapat dijadikan sebagai acuan untuk mendapatkan fragmen DNA berukuran besar walaupun hasil pemotongan sangat ditentukan oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA, spesies asal DNA, keadaan (kemurnian) enzim restriksi (*Sau3AI*), lama dan suhu inkubasi. Pemberian enzim *Sau3AI* lebih dari 0,014 unit menyebabkan DNA total tanaman kedelai terpotong menjadi fragmen-fragmen berukuran lebih kecil daripada 20 kb (Gambar 2). Ukuran fragmen DNA yang besar sangat penting dalam konstruksi perpustakaan genom.

Pemotongan DNA tanaman kedelai dengan enzim *Sau3AI* menghasilkan ujung menggantung GATC. Nukleotida dGTP dan dATP disisipkan ke dalam ujung potongan yang menjorok ke dalam sehingga ujung potongan yang menggantung menjadi GA. Adanya perubahan struktur ujung menggantung dari GATC menjadi GA menyebabkan kedua ujung GA pada satu fragmen DNA yang sama atau dua fragmen DNA yang berbeda tidak dapat saling menyambung. Dengan demikian, proses penyisipan nukleotida dapat menghindari terbentuknya sambungan antarfragmen DNA tanaman sendiri. Demikian juga, penyisipan nukleotida dCTP dan dTTP pada ujung fag λ (TCGA) menghasilkan ujung menggantung TC sehingga tidak akan terjadi penyambungan antarvektor. Ujung menggantung GA pada fragmen DNA tanaman kedelai hanya cocok dengan ujung menggantung TC pada vektor sehingga proses penyambungan akan terjadi antara DNA tanaman kedelai kultivar Lumut dan vektor λ. Spesifikasi kecocokan antara ujung DNA tanaman kedelai dan vektor λ dimaksudkan untuk mendapatkan efisiensi perakitan vektor rekombinan yang tinggi. Pada penelitian ini fag rekombinan yang terbentuk berkisar antara 60% dan 91%. Suharsono (2002) melaporkan bahwa pada

konstruksi perpustakaan genom kultivar Slamet, diperoleh fag rekombinan sebanyak 85%



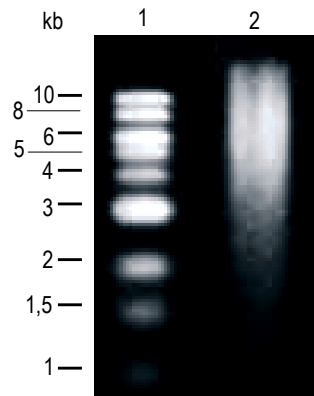
Gambar 2. DNA total kedelai kultivar Lumut yang dipotong dengan berbagai konsentrasi *Sau3AI* pada suhu 37°C selama 30 menit. Lajur 1 dan 6 = λ /*EcoT14*; lajur 2-5 = DNA total kedelai dipotong dengan *Sau3AI* masing-masing dengan konsentrasi 0,014; 0,023; 0,028; dan 0,043 unit tiap μg DNA

Figure 2. Total DNA of soybean cv. Lumut cut by different concentration of *Sau3AI* at 37°C for 30 minutes. Lane 1 and 6 = λ /*EcoT14*; lane 2-5 = total DNA of soybean cut respectively by *Sau3AI* at 0.014, 0.023, 0.028, and 0.043 unit per μg DNA

Setelah dilakukan penyisipan nukleotida pada kedua ujung fragmen DNA, fragmen DNA yang berukuran besar dimurnikan menggunakan kolom Chroma Spin 1000 (Clontech). Hasilnya, dari sekitar 20 μg DNA total kedelai didapatkan sekitar 4 μg (20%) fragmen DNA berukuran besar (Gambar 3). Suharsono (2002) juga melaporkan efisiensi pemurnian fragmen DNA berukuran besar dari pemotongan parsial yang sama pada DNA kedelai kultivar Slamet sehingga jumlah 20% dapat dijadikan sebagai acuan bagi efisiensi proses pemurnian DNA setelah DNA mengalami proses pemotongan dan penyisipan dengan nukleotida.

Pencampuran 0,5 μg fragmen DNA kedelai dan 0,5 μg DNA vektor λ atau perbandingan molaritas DNA sisipan:vektor = 2,9:1 menghasilkan titer berkisar antara 2×10^4 dan $3,6 \times 10^5$ pfu (*plaque forming unit* = unit plak yang terbentuk) tiap 0,5 μg DNA sisipan (Tabel 1). Berdasarkan atas hasil seleksi biru-putih, dari jumlah titer ini, 60 hingga 91% merupakan pfu rekombinan (Gambar 4).

Jumlah titer dan jumlah fag rekombinan yang terbentuk sangat bergantung kepada protein ekstrak yang digunakan untuk mengemas DNA fag. Ekstrak protein dari Stratagene lebih efisien dalam mengemas DNA fag daripada ekstrak protein dari Novagen. Pengemasan dengan ekstrak protein dari Novagen menghasilkan rendemen paling tinggi $3,4 \times 10^4$ pfu dengan persentase rekombinan tertinggi sebesar 71%, sedangkan pengemasan dengan ekstrak protein dari Stratagen mencapai $3,6 \times 10^5$ pfu dan 91%-nya adalah rekombinan untuk tiap 0,5 μg DNA sisipan (Tabel 1). Suharsono (2002) melaporkan bahwa pada konstruksi perpustakaan genom kultivar Slamet, didapatkan rendemen 5×10^5 pfu dan 85% di antaranya adalah rekombinan.



Gambar 3. Fragmen DNA tanaman kedelai kultivar Lumut berukuran besar hasil pemotongan parsial dengan enzim *Sau3AI* dan telah mengalami penyisipan nukleotida pada kedua ujungnya. Lajur 1= marka 1 kb; lajur 2= fragmen DNA kedelai

Figure 3. Large fragment of plant DNA resulting from partial digestion by *Sau3AI* and nucleotide filled-in. Lane 1= 1 kb ladder; lane 2= soybean DNA fragment

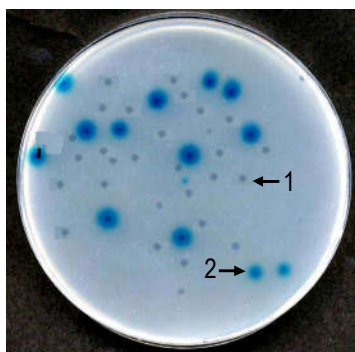
Tabel 1. Jumlah plak yang terbentuk dari ligasi DNA tanaman kedelai kultivar Lumut dengan vektor fag lambda

Table 1. The number of plaque forming unit from the ligation between DNA of soybean cv. Lumut and lambda phage vector

No.	Ekstrak protein	Jumlah DNA (μg)		Titer total (pfu)	Titer rekombinan	
		λ	Sisipan		pfu	Persentase
1	Novagen	0,5	0,5	4×10^4	$2,4 \times 10^4$	60%
2	Novagen	0,5	0,5	$5,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	61%
3	Novagen	0,5	0,5	$2,8 \times 10^4$	2×10^4	71%
4	Stratagene	0,5	0,5	$3,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	91%

Untuk mengetahui ukuran sisipan DNA tanaman di dalam fag rekombinan, plak yang jernih secara acak diambil menggunakan ujung pipet yang telah dipotong sehingga berukuran sedikit lebih besar daripada ukuran plak. Gel yang mengandung plak kemudian dielusi di dalam 500 μl bufer SM selama semalam. Fag ini kemudian ditransfeksikan ke dalam *E. coli* BM25.8. Dengan adanya *loxP* yang dimiliki oleh vektor λ dan enzim rekombinase *cre* yang disintesis oleh *E. coli* BM25.8, maka bagian tertentu fag λ dan sisipannya dapat mengalami eksisi dan membentuk plasmid rekombinan. Hal ini karena terjadi proses rekombinasi pada *loxP*. Hasil eksisi terbaik didapatkan dari suspensi fag hasil elusi yang diencerkan 100 kali dan kemudian dilakukan transfeksi pada *E. coli* galur BM25.8.

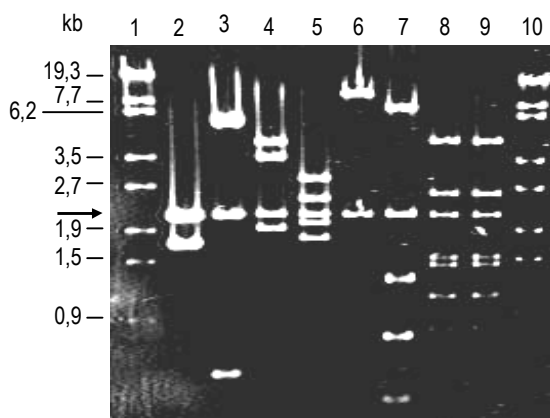
Plasmid yang berada di dalam *E. coli* galur BM25.8 tidak efisien dalam melakukan replikasi sehingga setelah diisolasi, plasmid tersebut diintroduksi ke dalam *E. coli* galur XL1-Blue. Keberadaan plasmid di dalam XL1-Blue diseleksi menggunakan ampisilin. Dengan menggunakan XL1-Blue pada media 2 x YT, rendemen yang diperoleh rata-rata adalah 1 μg DNA plasmid tiap mililiter biakan bakteri semalam.



Gambar 4. Seleksi biru-putih terhadap plak. 1= plak rekombinan (jernih), 2 = plak bukan rekombinan (biru)

Figure 4. Blue-white selection on plaques. 1= recombinant plaques (clear), 2 = non-recombinant plaques (blue)

Setelah mengalami eksisi, semua plak jernih yang diambil secara acak menghasilkan plasmid yang berukuran lebih besar daripada vektornya yang berukuran 2,139 kb. Setelah dipotong dengan enzim *Bam*HI, plasmid menghasilkan fragmen DNA berukuran 2,139 kb yang merupakan vektornya dan beberapa fragmen sisipan yang ukurannya 15 hingga 20 kb (Gambar 5).



Gambar 5. Plasmid rekombinan turunan dari λ Bluestar-1 yang dipotong dengan *Bam*HI. Lajur 1 dan 10 = λ /*Eco*T14; lajur 2-9 = plasmid rekombinan/*Bam*HI. Tanda panah (\rightarrow) menunjukkan ukuran vektor (2,139 kb)

Figure 5. Recombinant plasmid derived from λ Bluestar-1 cut by *Bam*HI. Lane 1 and 10 = λ /*Eco*T14; lane 2-9 = recombinant plasmid/*Bam*HI. Arrow (\rightarrow) indicates vector size (2.139 kb)

Ukuran yang besar ini (15 hingga 20 kb) sangat menguntungkan dalam konstruksi perpustakaan genom karena perpustakaan genom hanya membutuhkan titer yang relatif sedikit. Makin besar ukuran fragmen DNA yang menyisip ke dalam vektor, makin sedikit jumlah vektor rekombinan yang dibutuhkan untuk membawa genom organisme di dalam perpustakaan genom. Keuntungan lainnya ialah perpustakaan genom dapat digunakan untuk mengisolasi gen secara utuh dan untuk pemetaan gen secara fisik karena dapat mengandung lebih dari satu gen. Genom kedelai haploid berukuran $1,115 \times 10^6$ kb (Arumuganathan dan Earle 1991) sehingga genom kedelai kultivar Slamet diploid adalah $2,23 \times 10^6$ kb. Pada tanaman kedelai, lebih dari 90% ruas DNA yang tidak berulang dijumpai lebih dari dua kopi (Shoemaker *et al.*, 1996) sehingga ukuran genom kedelai diploid yang membawa masing-masing ruas satu kopi (tidak berulang) adalah $1,23 \times 10^6$ kb. DNA sisipan rata-rata berukuran 15 kb sehingga untuk memuat seluruh gen kedelai di

dalam suatu perpustakaan genom diperlukan $0,4125 \times 10^5$ fag rekombinan bila potongan-potongan DNA tidak saling tumpang tindih (Suharsono, 2002).

Pengemasan dengan ekstrak protein dari Stratagene dilakukan menggunakan $2 \times 0,5 \mu\text{g}$ DNA sisipan sehingga jumlah titernya adalah $2 \times (3,3 \times 10^5 \text{ pfu rekombinan}) = 6,6 \times 10^5 \text{ pfu rekombinan}$. Dengan menggunakan rumus $N = (\ln(1-P))/(\ln(1-f))$, yang dalam hal ini N = jumlah fag rekombinan, f = rasio besarnya DNA sisipan terhadap ukuran genom (Sambrook *et al.*, 1989), maka peluang (P) untuk mendapatkan satu kopi potongan DNA sembarang di dalam perpustakaan genom kultivar Lumut adalah 99%. Bila genom kedelai hanya memperhatikan genom yang tidak berulang ($2,23 \times 10^6 \text{ kb}$), maka peluang untuk mendapatkan sembarang gen di dalam perpustakaan genom lebih besar daripada 99% sehingga perpustakaan genom kultivar Lumut ini telah mengandung seluruh gen yang dimiliki oleh kedelai.

Kesimpulan

DNA total kedelai kultivar Lumut yang dipotong dengan 0,014 unit Sau3AI tiap μg DNA pada suhu 37°C selama 30 menit menghasilkan potongan DNA berukuran besar. Potongan DNA telah disisipkan ke dalam DNA fag lambda untuk membentuk perpustakaan genom yang mengandung seluruh genom dari kedelai kultivar Lumut.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek RUT 8 berjudul Isolasi dan Karakterisasi Gen-gen pada Tanaman Kedelai yang Mendapat Cekaman Aluminium. Terima kasih ditujukan kepada Ko Shimamoto, Laboratory of Plant Molecular Genetic, Nara Institut of Science and Technology, Japan, yang telah menyediakan fasilitas laboratorium untuk penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Utut Widyastuti atas bantuan teknis yang diberikan.

Daftar Pustaka

- Arumuganathan, H. and E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Clontech. 1995. Chroma Spin Columns. Product Protocol. Clontech, California.
- Jusuf, M, Suharsono, and D. Sopandie. 1999. Molecular Biology of Soybean Tolerance to Aluminium Stress. Report of Graduate Team Research Grant, Urge Project, Batch II. Directorate General of Higher Education, Jakarta.
- Novagen. 1997. λ BlueStar Vector System. Novagen, Inc., Madison.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York.
- Shoemaker, R.C., K. Polzin, J. Labate, J. Specht, E.C. Brummer, T. Olson, N. Young, V. Concibido, J. Wilcox, J.P. Tamulonis, G. Kochert, and H.R. Boerma. 1996. Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics* 144: 329-338.
- Stratagene. 1999. Gigapack III Gold Packaging Extract, Gigapack III Plus Packaging Extract, and Gigapack III XL Packaging Extract. Instruction Manual. Stratagene Cloning System, California.
- Suharsono. 2002. Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati* 9(3): 67-70.