

**PENYUSUNAN PUSTAKA GENOM
PADA ORGANISME
MENGUNAKAN METODE BAC
(*Bacterial Artificial Chromosome*)**

POKOK BAHASAN

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisenia fetida*

- Suzuki *et al.* (2008)

EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY 44 (2008) 202–206

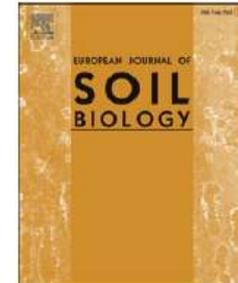


ELSEVIER

available at www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejsobi>



Original article

Construction of a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library and the genomic analysis of valosine-containing proteins in the earthworm *Eisenia fetida*

Kohei Suzuki^{a,b}, Tomoharu Suzuki^a, Stephen Stürzenbaum^c, Shinobu Gamou^{a,*}

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

Cacing tanah merupakan invertebrata yang bersifat hermafrodit yang pertama kali digunakan untuk mempelajari spermatogenesis. Gen yang terkait dengan gonad dan kandidat yang kemungkinan terlibat dalam tahap akhir spermatogenesis cacing tanah *Eisena fetida* yaitu *evcp-2*, anggota gen VCP (*Valosine-containing protein*; *evcp-1* dan *evcp-2*).

Anggota gen VCP / P97 / Cdc48 terdapat pada organisme prokariotik hingga mamalia dan dapat dijadikan gambaran konservasi evolusi. Untuk memahami asal-usul dan evolusi gen VCP cacing tanah dan juga untuk menyediakan alat untuk analisis genetik dan fisiologis lebih lanjut, dilakukan perakitan pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) yang dapat membawa fragmen genomik besar



Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

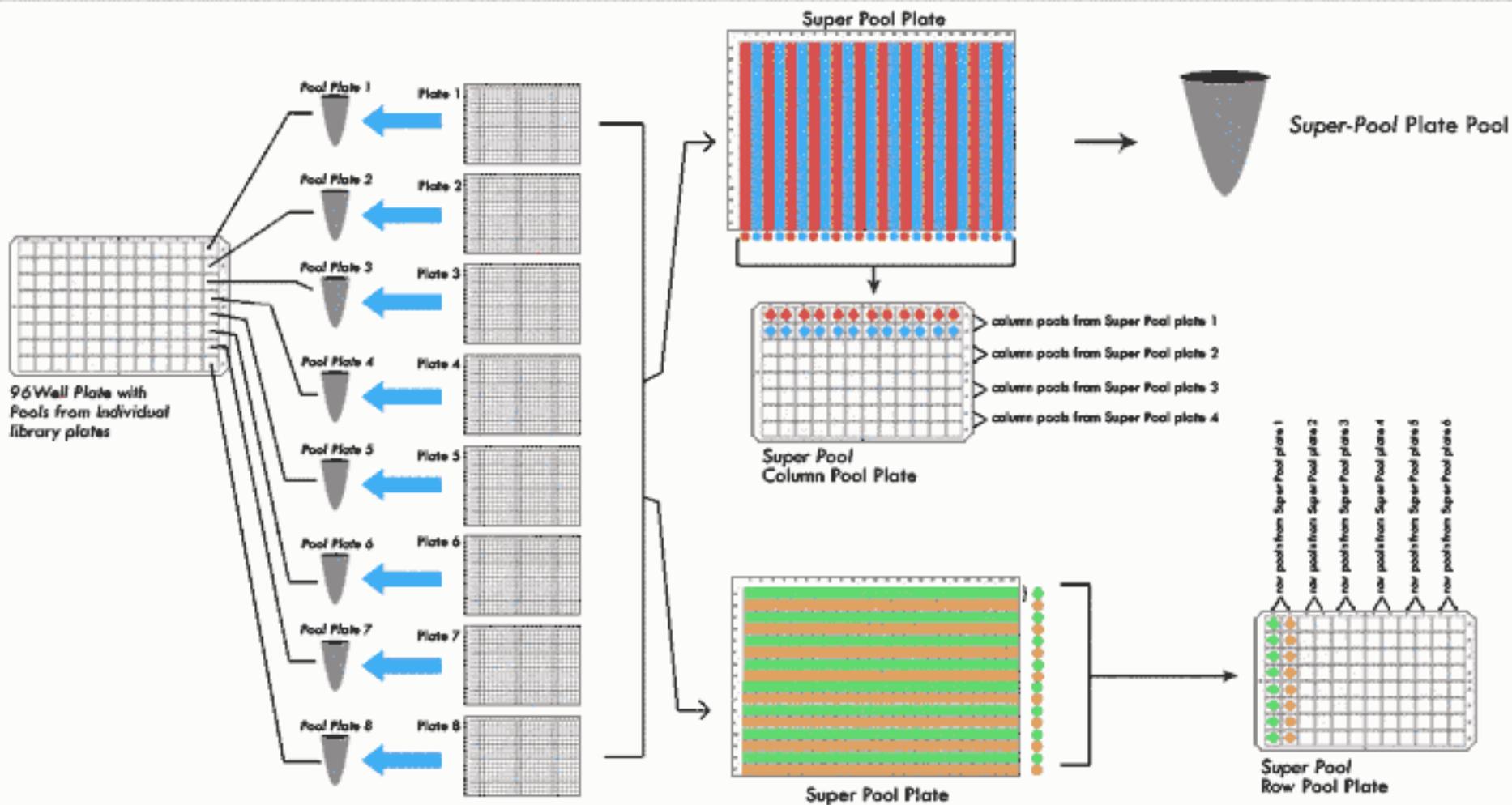
METODE

(1) Perakitan pustaka BAC

- Vesikula seminalis *E. fetida* di isolasi dan sel-selnya ditripsinisasi (dilepaskan dari koloni sel). Sel yang telah terdisosiasi diperangkap dalam agarosa dan dilakukan digesti dengan proteinase K, sebagian didigesti dengan *HindIII* dan fragmen akhir diligasi pada vektor pCC1BAC. Rata-rata ukuran fragmen genom yang terinsersi kurang lebih 100 kb. Lebih dari 50.000 klon BAC dimasukkan dalam 530 x 90-*well plate*. Pustaka BAC diperkirakan mengandung lebih dari 5 milyar pasang basa, dimana jumlah tersebut beberapa kali lipat keseluruhan genom (ukuran genom 0,6 mb).

(2) Skrining PCR dari fragmen genomik evcp

- Primer PCR dipilih dari bagian 5' dan 3' dari masing-masing gen berdasarkan estimasi perbatasan ekson-intron. Pustaka BAC dibagi menjadi 44 *super-pools*, masing-masing 12 x 96 *well plate*. Skrining PCR pertama mengidentifikasi *super-pool* positif, yang selanjutnya pada skrining kedua dibagi menjadi masing-masing 12 *plate-pools*. Klon yang mengandung evcp diidentifikasi dari plate yang positif pada skrining ketiga yang berisi *coloumn-pool* (A-H) dan *row-pool* (1-12).



Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

METODE

(3) Sekuensing dan analisis genom

- Klon BAC digunakan untuk memperbanyak 2–3 kb fragmen DNA genom evcp menggunakan primer yang sesuai pada sekuens cDNA evcp. Reaksi sekuensing dilakukan menggunakan terminator sequencing DYE Kit dan penganalisa genetik ABI PRIZM 310. Analisis filogenik dan homologi dilakukan dengan menggunakan sumber DDBJ dan Pipmaker.

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

HASIL

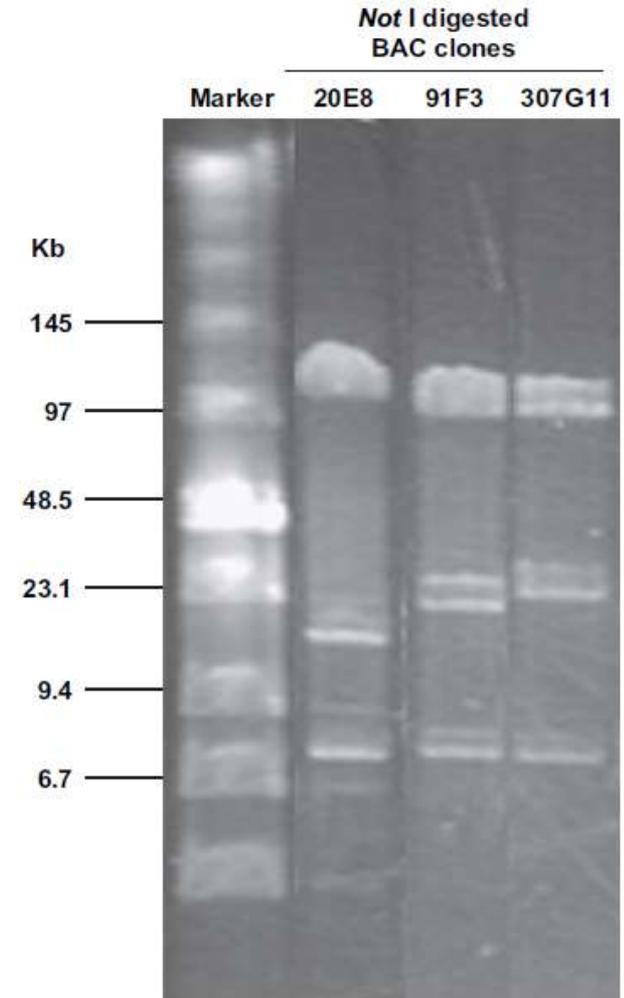
Lebih dari 50.000 klon BAC diidentifikasi terkait kandungan *evcp-1* dan *evcp-2* melalui metode skrining.

Isolat yang terdeteksi positif adalah klon 20E8 dan 91F3 untuk gen *evcp-1* dan 307G11 untuk gen *evcp-2*. Gambar disamping merupakan hasil PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) dari 3 isolat klon BAC positif *evcp* dengan tambahan enzim restriksi *NotI*.

Hasil ini menunjukkan bahwa ukuran genom yang terinsersi sekitar 120 kb, 115 kb dan 120 kb, masing-masing untuk 20E8, 91F3 dan 307G11.

Analisis PCR lebih lanjut menggunakan primer berbasis cDNA termasuk primer untuk daerah terminal 5' dan 3' mengkonfirmasi bahwa klon-klon ini mengandung seluruh wilayah genomik *evcps*.

Analisis ini menggarisbawahi bahwa kedua gen *evcp-1* dan *evcp-2* memiliki panjang lebih dari 10 kb dan berbeda dengan ortolognya pada jenis *Caenorhabditis elegans* (C41C4.8 dan C06A1.1), yang terdiri dari panjang total masing-masing 2,9 kb dan 3,4 kb.



Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

HASIL

Hasil sekuensing pada genom mengungkapkan gen *evcp-1* memiliki panjang sekitar 16 kb (AB284052) dan mengandung dari 14 intron dan 15 ekson.

Batas intron-exon mirip dengan VCP pada mamalia termasuk *vcp* manusia. *Evcp-2* berukuran sekitar 18 kb (AB284053) dan juga mengandung 14 intron dan 15 ekson.

Patut dicatat bahwa pengulangan trinukleotida GAA / TTC ditemukan di intron *evcp-2*, menunjukkan kemungkinan terjadinya mikrosatelit (basa yang berulang). Persimpangan intron – ekson digambarkan dalam penelitian ini. Kebanyakan intron mengikuti aturan AG/gt-cag/.

	Exon			Intron	
	5' end	Size (bp)	3' end	5' donor	3' acceptor
<i><evcp-1></i>					
1	GAAAAAGCG	132	AGACCAGAA	<i>gtaagtctc</i>	- <i>tttttgcag</i>
2	CAGTGATGA	106	GTCTCTCAG	<i>gtaactgcc</i>	- <i>ctttattag</i>
3	AACAAGATG	173	CATCGTCAG	<i>gtcagttca</i>	- <i>ctgtttcag</i>
4	CATCCAGCC	81	TCTTACTGG	<i>gtgaggaag</i>	- <i>gctttctag</i>
5	TAACCTTTT	193	AAGCGTGAA	<i>gtatgctaa</i>	- <i>ttattatag</i>
6	<i>GAAGAGGAG</i>	132	GGTGTCAAG	<i>gtcagtcac</i>	- <i>tggtttcag</i>
7	CCACCTCGC	237	AGAGAGAAG	<i>gtaagtaag</i>	- <i>aatgcctag</i>
8	ACCCATGGA	136	GAAGATTCCG	<i>gttagtata</i>	- <i>ttcctttag</i>
9	<i>GCGGTTTCG</i>	113	TTGGAACAG	<i>gcaagtaca</i>	- <i>ttgtttcag</i>
10	ATTGCTTCA	165	AATTCAGA	<i>gtaagtaat</i>	- <i>tttttgcag</i>
11	TGGGCACTC	336	TTTGATAAG	<i>gtaagtcac</i>	- <i>cttctgtag</i>
12	<i>GCGGTTTCT</i>	179	CACGAACAG	<i>gtaccagtt</i>	- <i>atcttcaag</i>
13	ACCTGACAT	292	GCAGAGATG	<i>gtaggttca</i>	- <i>ttgtaccag</i>
14	<i>GAGGATGAC</i>	155	AAACTTCAG	<i>gttagccta</i>	- <i>tcgtttgtag</i>
15	ATTCCAGG	482	GCTTCAGTT		
			2,912	approx. 15,800	

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

HASIL

Hasil sekuensing pada genom mengungkapkan gen *evcp-1* memiliki panjang sekitar 16 kb (AB284052) dan mengandung dari 14 intron dan 15 ekson.

Batas intron-exon mirip dengan VCP pada mamalia termasuk *vcp* manusia. *Evcp-2* berukuran sekitar 18 kb (AB284053) dan juga mengandung 14 intron dan 15 ekson.

Patut dicatat bahwa pengulangan tri-nukleotida GAA / TTC ditemukan di intron *evcp-2*, menunjukkan kemungkinan terjadinya mikrosatelit (basa yang berulang).

Persimpangan intron – exon digambarkan dalam penelitian ini. Kebanyakan intron mengikuti aturan AG/gt-cag/.

	Exon		Intron		
	5' end	Size (bp)	3' end	5' donor	3' acceptor
<i><evcp-2></i>					
1	AACATTTTG	254	TGACTCTGG	<i>gtaggcaga</i>	- <i>ctgattcag</i>
2	<i>GGAAAAGGA</i>	258	TGTCATCAG	<i>gtcagctgc</i>	- <i>tgtctgcag</i>
3	TGTGAGAAT	81	CTTCACAGG	<i>gtaagtgg</i>	- <i>ccattgtag</i>
4	AAACCTGTT	205	GCGGCCAG	<i>gtacatgta</i>	- <i>tgcgtttag</i>
5	ACGGAGGAA	132	GCGTCAAG	<i>gttaaacct</i>	- <i>gtgtttcag</i>
6	CCACCAAAG	237	CGCGATAAG	<i>gtctgcctg</i>	- <i>atgatgcag</i>
7	TGTTCTCA	133	GAAGATGTG	<i>gtaagtgcc</i>	- <i>ttgcaaaag</i>
8	<i>GTCGTTTCG</i>	113	CTACAGACA	<i>gtaaacacg</i>	- <i>ctgctgcag</i>
9	ATTTCTAAC	165	AACTTCATG	<i>gtcagtagg</i>	- <i>ctgatacag</i>
10	<i>GCTGCTCTG</i>	336	TTCGCCAAG	<i>gtcagccat</i>	- <i>ttactatag</i>
11	<i>GCACGGICT</i>	82	AATTGACAT	<i>gtaggtata</i>	- <i>ggtatgaag</i>
12	<i>GTCTGCGG</i>	94	CACGAACAG	<i>gtgtgtgtt</i>	- <i>attttctag</i>
13	<i>GCCGGACGT</i>	289	TCCGAAATG	<i>gtaggaaatg</i>	- <i>gcatttcag</i>
14	CGAGATGTC	131	AAAGGCAG	<i>gttagaagg</i>	- <i>tgtgctcag</i>
15	CTCCGCACC	206	GTTTTATTC		
			2, 716		approx. 18, 000

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

HASIL

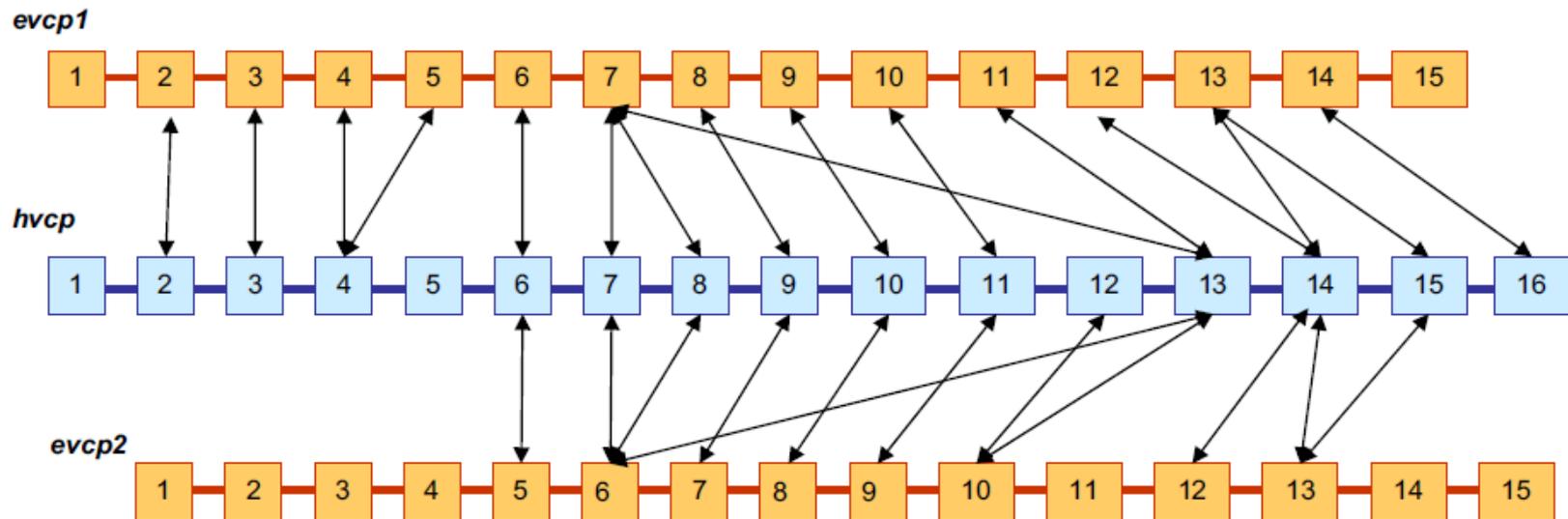


Fig. 3 - Scheme of exon relationship. Genomic sequences of *evcp-1* and *evcp-2* were compared with human *vcv* genomic sequence using the PipMaker software (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>). Note: for reasons of simplicity, all exons were shown to be equal in length.

Analisis homologi menggunakan PipMaker mengungkapkan bahwa urutan *evcp-1* exon 7 ditemukan homolog dengan tiga ekson dalam *vcv* manusia (*hvcp*).

Konstruksi pustaka *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) dan analisis genomik *valosine*-yang mengandung protein pada cacing tanah *Eisena fetida*

HASIL

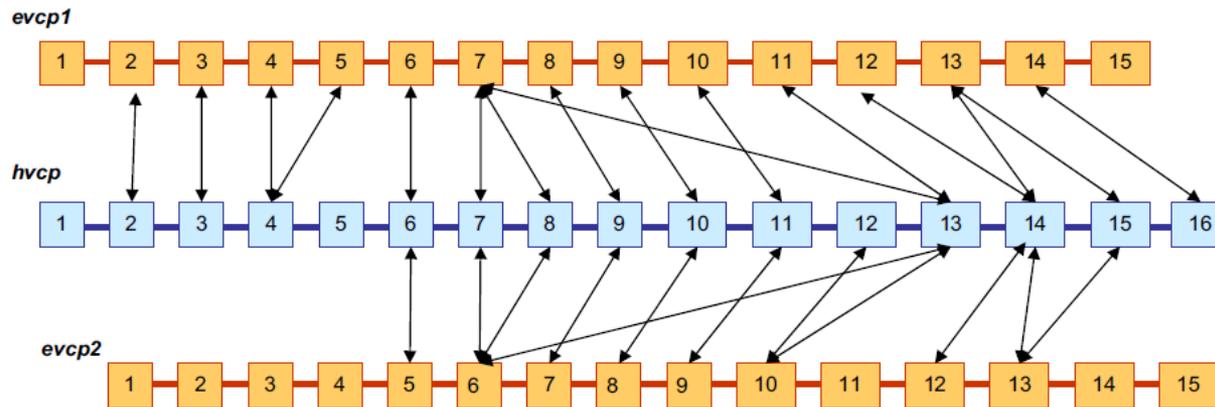
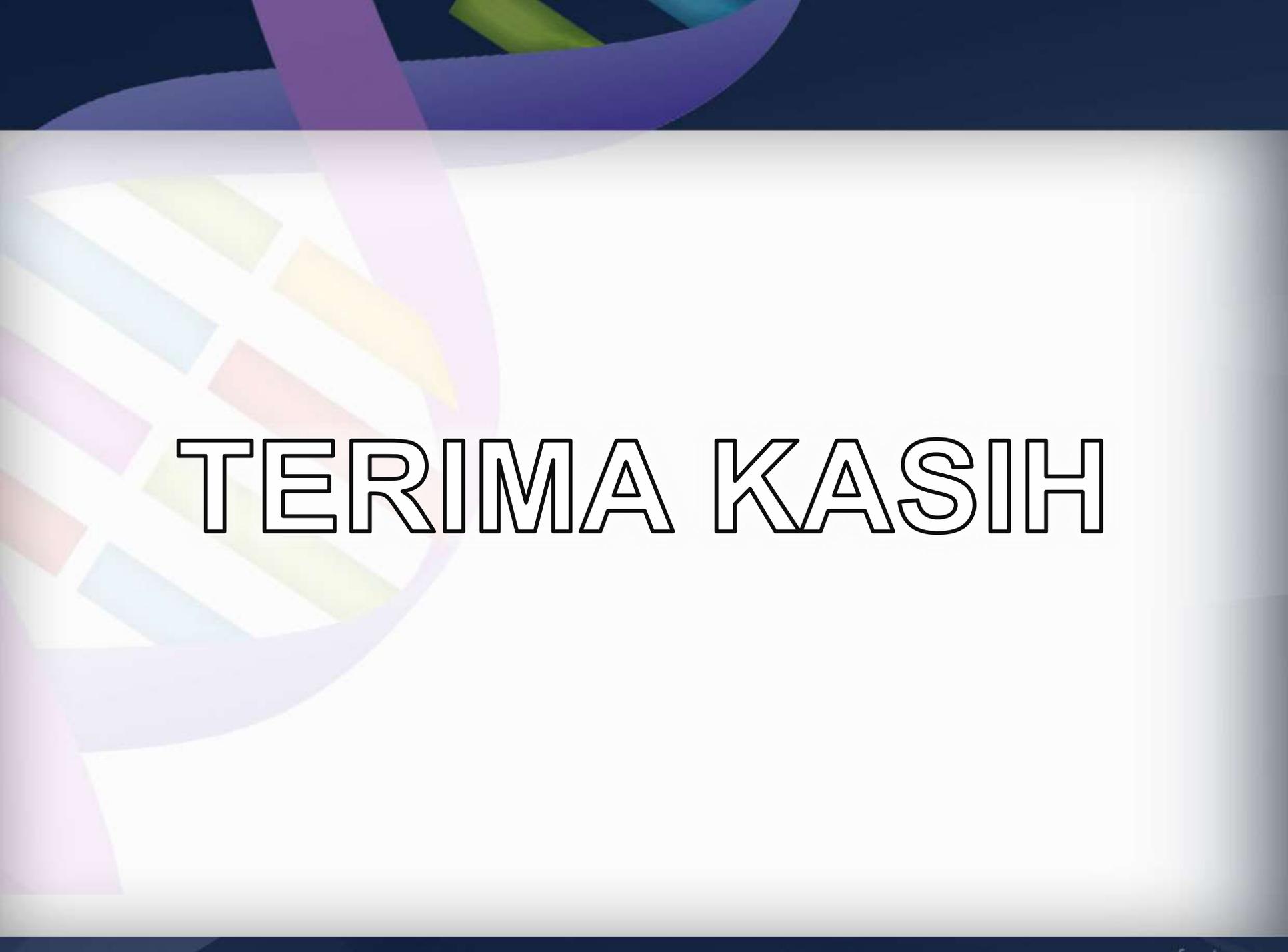


Fig. 3 – Scheme of exon relationship. Genomic sequences of *evcp-1* and *evcp-2* were compared with human *vcp* genomic sequence using the PipMaker software (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>). Note: for reasons of simplicity, all exons were shown to be equal in length.

Evcp-1 diekspresikan di mana-mana selama semua tahap perkembangan, sedangkan *evcp-2* secara khusus diekspresikan dalam vesikula seminalis. Analisis ClustalW menyarankan konservasi struktural antara *vcps* mamalia dan cacing tanah, khususnya di dalam ekson. Menariknya, ditemukan bahwa ekson tertentu dari *E. fetida* digandakan dalam gen manusia, dan beberapa intron digandakan secara terbalik pada gen cacing tanah. Informasi ini dapat memberikan isyarat pertama tentang evolusi gen cacing tanah.

Urutan genomik yang diperoleh mengarah pada gagasan bahwa genom cacing tanah tidak berbeda dengan genom mamalia, setidaknya dalam hal ukuran dan struktur intron-ekson. Konstruksi pustaka BAC yang komprehensif dan sistem skrining PCR, dapat menjadi sumber penyelidikan terperinci ke dalam struktur genom gen cacing tanah selanjutnya.

The background features a white-to-light-blue gradient on the right side. On the left, there are several overlapping, semi-transparent geometric shapes in shades of purple, blue, green, yellow, and pink. The text 'TERIMA KASIH' is centered in the white area.

TERIMA KASIH