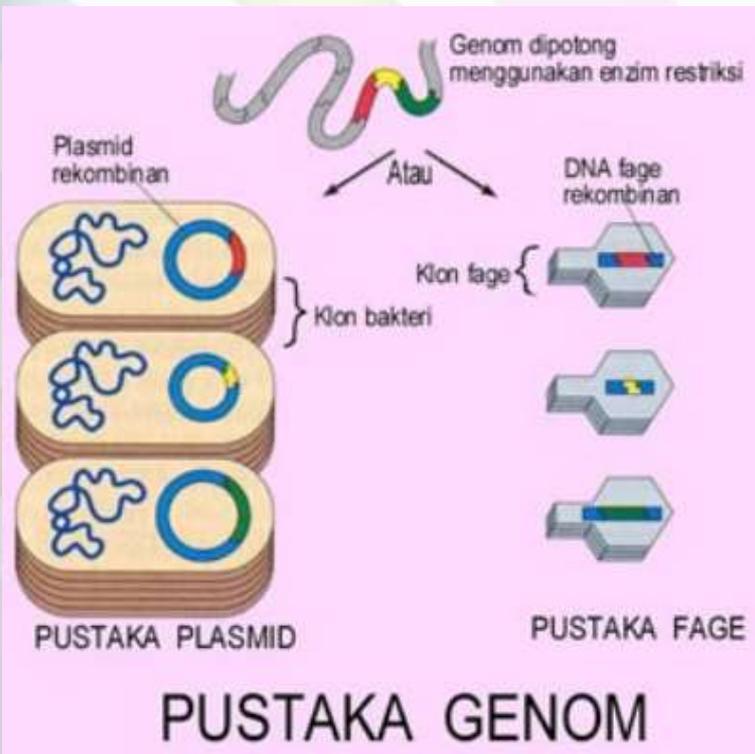


**PENYUSUNAN PUSTAKA GENOM  
PADA ORGANISME  
MENGUNAKAN METODE BAC  
(*Bacterial Artificial Chromosome*)**

# PENDAHULUAN



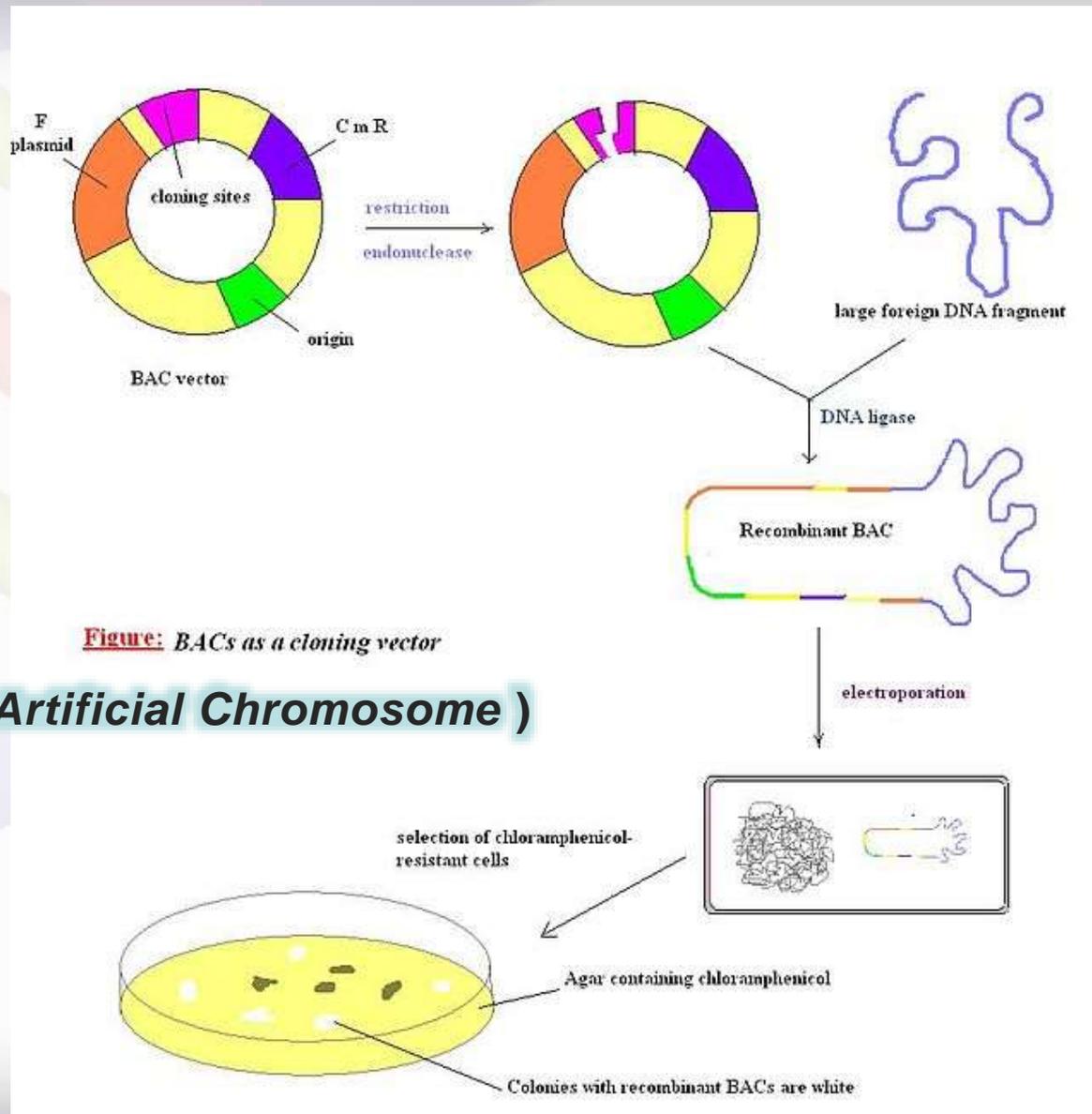
Pustaka genom merupakan koleksi berbagai klon bakteri yang berisi plasmid rekombinan maupun koleksi klon fage yang mengandung DNA rekombinan.

Di dalam pustaka genom ini, setiap plasmid rekombinan atau setiap DNA fage rekombinan membawa salah satu potongan atau fragmen DNA genom yang dipelajari.

Setiap klon bakteri membawa satu plasmid rekombinan sedangkan setiap klon fage membawa satu DNA fage rekombinan

Kumpulan klon-klon bakteri yang membawa plasmid rekombinan ini dinamakan pustaka plasmid, sedangkan kumpulan fage rekombinan dinamakan pustaka fage.

# PENDAHULUAN



**(Bacterial Artificial Chromosome)**

# POKOK BAHASAN

Construction of a BAC library and identification of Dmrt1 gene of the rice field eel

- Jang *et al.* (2006)

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

- Suzuki *et al.* (2008)

Construction and characterization of a high coverage cashmere goat BAC library containing cashmere-associated genes

- Liu *et al.* (2012)

# POKOK BAHASAN

Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monopterus albus*

- Jang *et al.* (2006)



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Biochemical and Biophysical Research Communications 348 (2006) 775–780

BBRC

[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

**Construction of a BAC library and identification of *Dmrt1* gene of the rice field eel, *Monopterus albus***

Songhun Jang <sup>1</sup>, Fang Zhou, Laixin Xia, Wei Zhao, Hanhua Cheng \*,  
Rongjia Zhou \*

# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

Penelitian ini dilakukan dengan menyusun pustaka BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) pertama yang menggunakan DNA nuklear dari belut sawah (*Monopterus albus*).

Belut sawah merupakan Teleostei yang memiliki nilai ekonomi cukup penting dan genomnya dapat dijadikan model yang baik untuk studi komparatif, evolusi dan perkembangan biologi.

Spesies ini juga memiliki karakteristik alami berupa *sex reversal* transformasi ovary menjadi testis melalui fase interseksual. Regulasi ini salah satunya ditemukan pada ekspresi hasil transkripsi gen *Dmrt1*



Dalam penelitian ini selain dilakukan pembentukan pustaka BAC genom belut sawah, dilakukan juga *skrining* pustaka genom berbasis *high-density colony hybridization* dengan menggunakan *Dmrt1* cDNA sebagai *probe* (target) sebagai bahan untuk mempelajari karakteristik *sex reversal* pada belut sawah.

# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

- **Colony hybridisation** is used to identify bacterial colonies containing the gene of interest
- Colonies are transferred to filter, lysed, DNA is denatured by high pH
- Membrane is then hybridised with labeled DNA from gene to be cloned

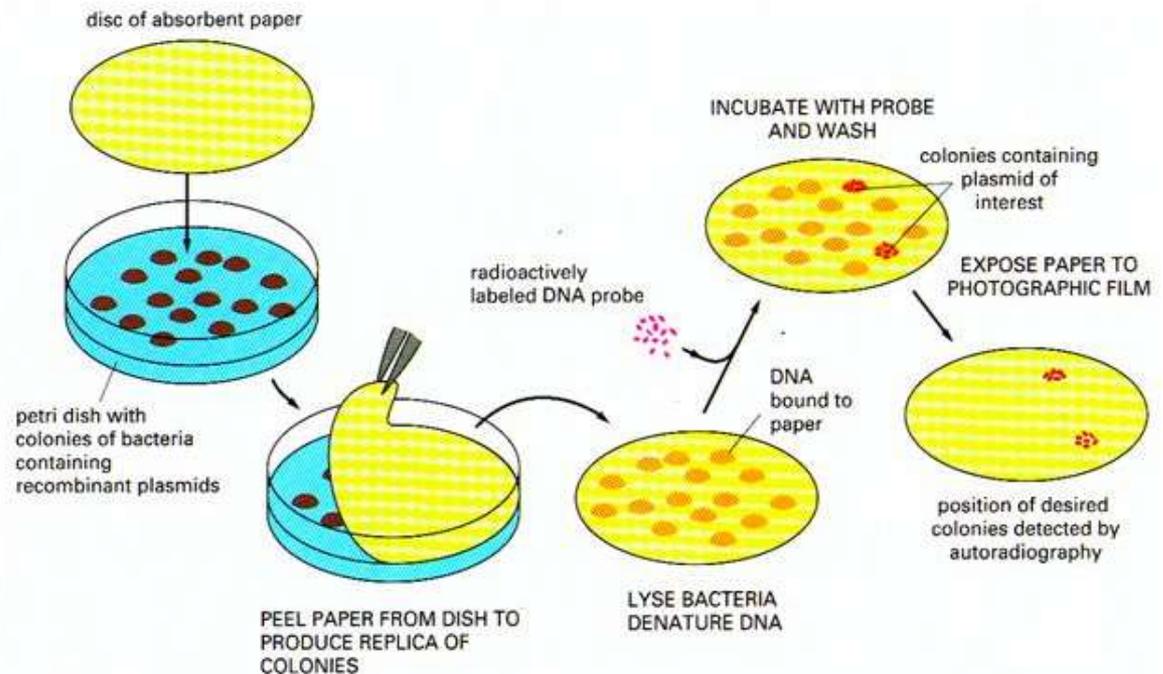


Figure 7.26 An efficient technique commonly used to detect a bacterial colony carrying a particular DNA clone  
Alberts et al.: *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition  
© 1994 Garland Publishing, Inc.

# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## METODE

### (1) Persiapan DNA dengan berat molekul tinggi dalam sumbat agarosa (*agarose plug*).

- DNA belut sawah dengan berat molekul tinggi diperoleh dari sel darah dan disiapkan untuk diperangkap (*embedding*) dalam agarosa. Pada tahap ini dilakukan serangkaian proses preparasi DNA dan sumbat agarosa, dengan konsentrasi akhir DNA sebesar 27  $\mu\text{g}$  per 75  $\mu\text{L}$  sumbat

### (2) Pra-elektroforesis dan persiapan digesti parsial DNA genom

- Sumbat agarosa di *running* dalam 1% gel agarosa menggunakan CHEF apparatus. Setelah dilakukan pra-elektroforesis, gel diwarnai dalam larutan etidium bromida untuk menentukan apakah DNA dan material lainnya telah dimigrasikan dari sumbat selama pra-elektroforesis. Setelah itu dilakukan pemotongan gel agarosa menjadi potongan kecil dan diinkubasi pada buffer *BamHI*.

# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

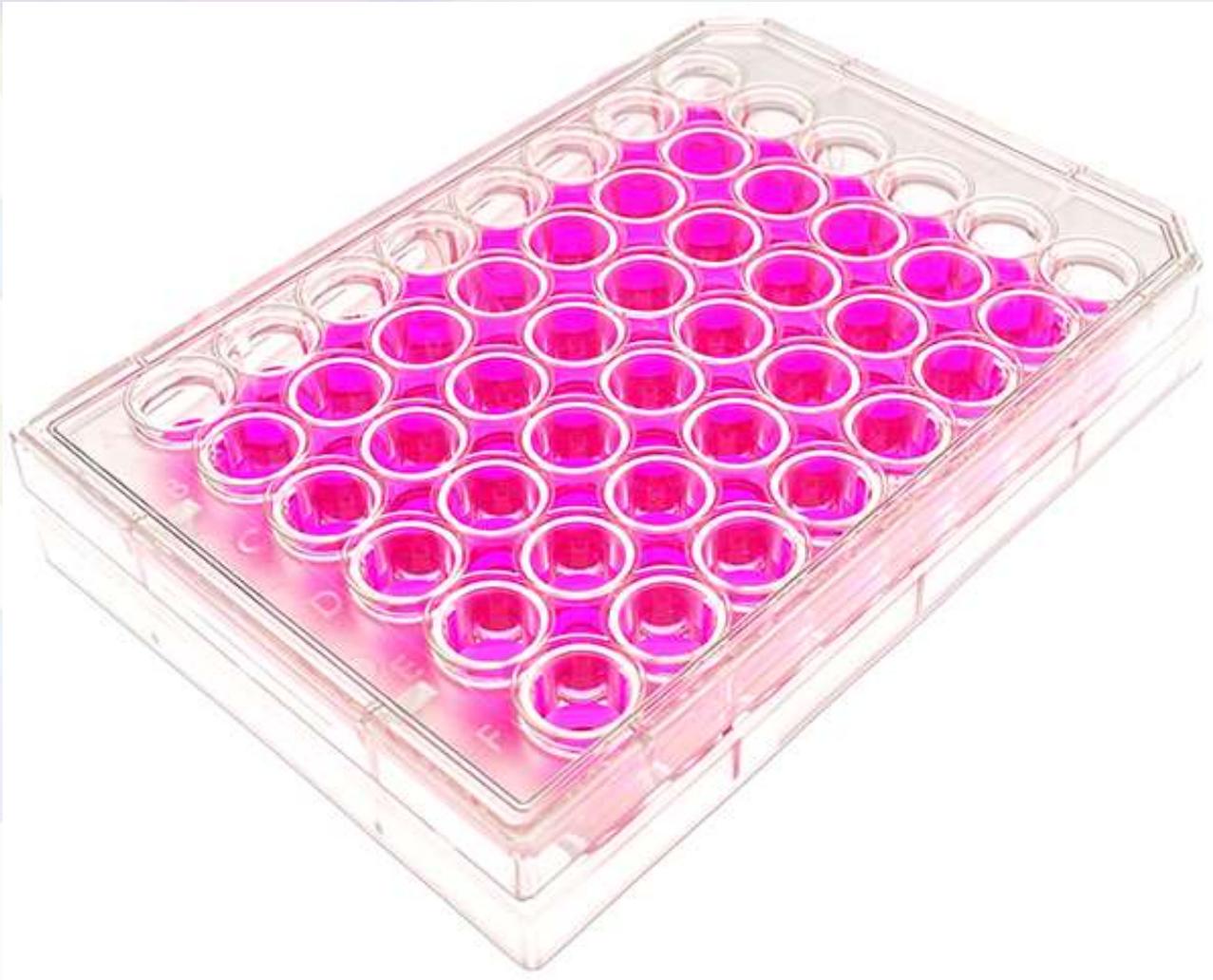
## METODE

### (3) Fraksinasi ukuran, ligasi dan transformasi

- Enzim restriksi *Bam*HI ditambahkan pada potongan agarosa agar dapat berdifusi ke dalam gel. Reaksi parsial digesti ini hanya dilakukan dalam 8 menit selanjutnya dihentikan. DNA yang telah terdigesti parsial di pisahkan ukurannya menggunakan PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Sebanyak 120-300 ng DNA yang telah terdigesti parsial diligasi menggunakan 20-40 ng vektor *pIndigoBAC-5*. Vektor rekombinan yang telah mengandung DNA belut sawah ini di transformasi ke dalam bakteri *Escherichia coli* strain DH10B dengan cara elektroporasi. Koloni rekombinan dikultur pada 384-*well plate* dan diduplikasi untuk disimpan pada -80°C.

### (4) Persiapan koloni dengan kepadatan tinggi dan skrining pustaka BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)

- Koloni bakteri disatukan pada membran nilon, dilisiskan dan dihubungkan dengan UV. Disisi lain, cDNA *Dmrt1* dari belut sawah sebagai probe (target) dilabeli dengan priming acak menggunakan [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. Selanjutnya hibridisasi dilakukan dalam buffer. Setelah hibridisasi, filter dicuci dengan sinyal pada filter membran divisualisasikan menggunakan *Imager mode Variabel* (Typhoon, Uppsala, Swedia).



# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## METODE

### (5) PCR, kloning, sekuensing dan analisis enzim restriksi

- PCR digunakan untuk memperbanyak intron pertama, kedua dan ekson terakhir dari gen *Dmrt1* dari klon yang terdeteksi positif. Produk PCR dikloning ke vektor T-easy dan diurutkan. Urutan dianalisis dengan Blast dan disejajarkan menggunakan ClustalW. DNA BAC yang telah didigesti dengan BamHI, dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Ukuran fragmen restriksi ditentukan dengan perbandingan dengan marker DNA, dan dengan hasil amplifikasi PCR dari dua intron pertama dan ekson terakhir. Dengan demikian keterkaitan antar BAC yang saling *overlapping* dapat ditentukan.

### (6) BAC *end-sequencing* dan penyusunan contig (rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih)

- DNA BAC dimurnikan menggunakan BAC<sub>96</sub> Miniprep kit. Primer untuk BAC akhir dirancang dari daerah mengapit situs kloning BamHI dari vektor pIndigoBAC-5. Untuk perakitan contig, digunakan 12 jenis primer untuk ujung klon BAC yang positif.

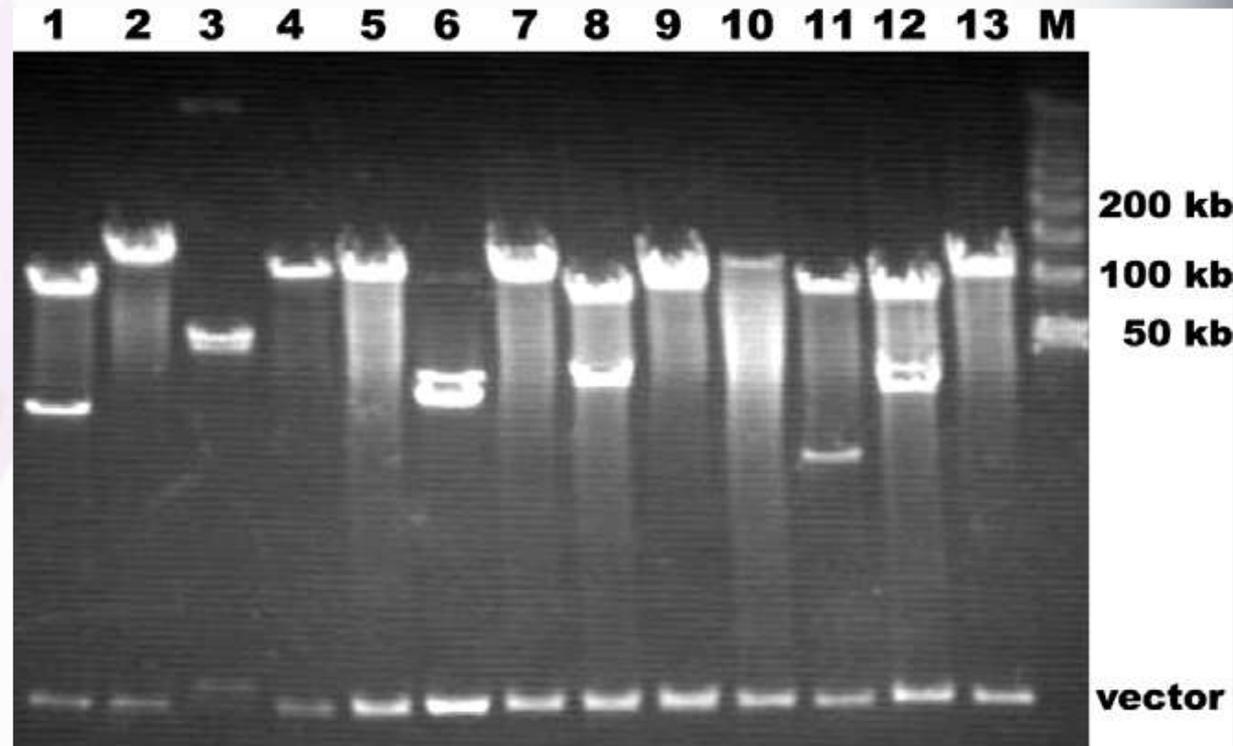
# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## HASIL

Total pustaka BAC dalam penelitian ini terdiri dari 33.000 klon.

Untuk memperkirakan rerata ukuran genom yang terinsersi dilakukan dengan menganalisis 185 koloni yang dipilih random dan di *running* dengan PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) dengan enzim restriksi *NotI*. Ukuran rata-rata genom yang terinsersi yaitu 115 kb dengan rentang 45-180 kb.

PFGE merupakan elektroforesis digunakan untuk memisahkan DNA yang berukuran besar, dengan adanya pergantian voltase di setiap elektrode, sehingga DNA yang berukuran besar dapat terpisah



Gambar ini merupakan analisis ukuran insert klon BAC acak dari pustaka BAC belut sawah menggunakan *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Pita DNA menunjukkan 13 klon BAC acak yang didigesti dengan dengan *NotI*.

Band pita 7,4 kb adalah vektor *pIndigo BAC-5*.

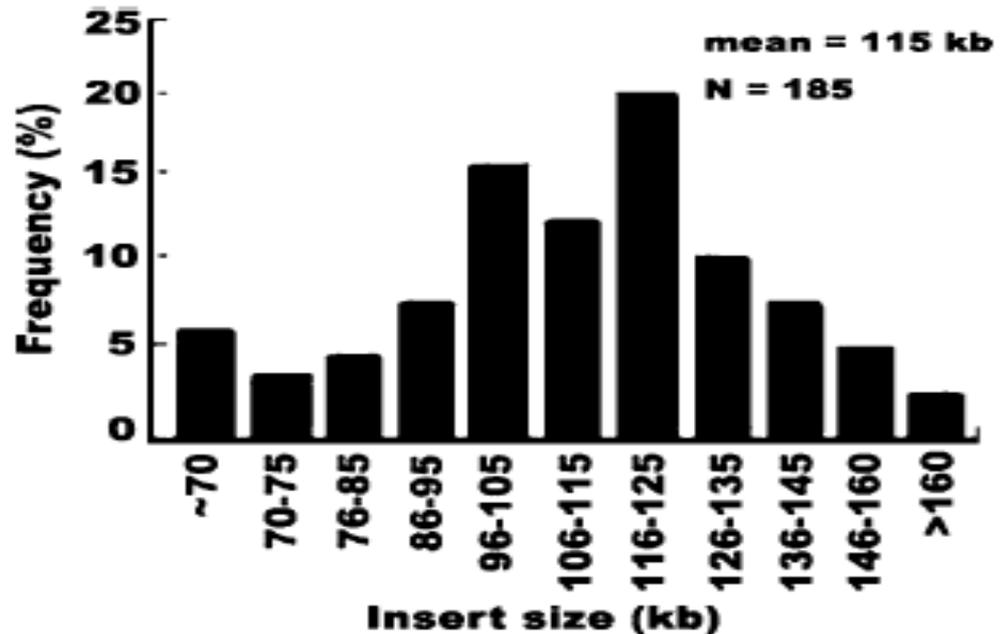
# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## HASIL

Total pustaka BAC dalam penelitian ini terdiri dari 33.000 klon.

Untuk memperkirakan rerata ukuran genom yang terinsersi dilakukan dengan menganalisis 185 koloni yang dipilih random dan di *running* dengan PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) dengan enzim restriksi *NotI*. Ukuran rata-rata genom yang terinsersi yaitu 115 kb dengan rentang 45-180 kb.

PFGE merupakan elektroforesis digunakan untuk memisahkan DNA yang berukuran besar, dengan adanya pergantian voltase di setiap elektrode, sehingga DNA yang berukuran besar dapat terpisah



Gambar merupakan distribusi ukuran insersi genom pada koloni pustaka BAC belut sawah, dari 185 klon dengan *NotI*. Ukuran fragmen ditentukan oleh elektroforesis PFGE, dan diplot terhadap frekuensi kejadian

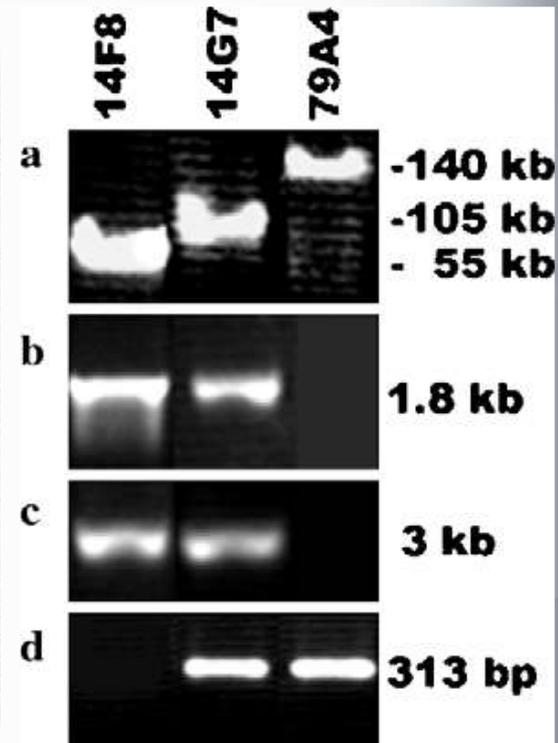
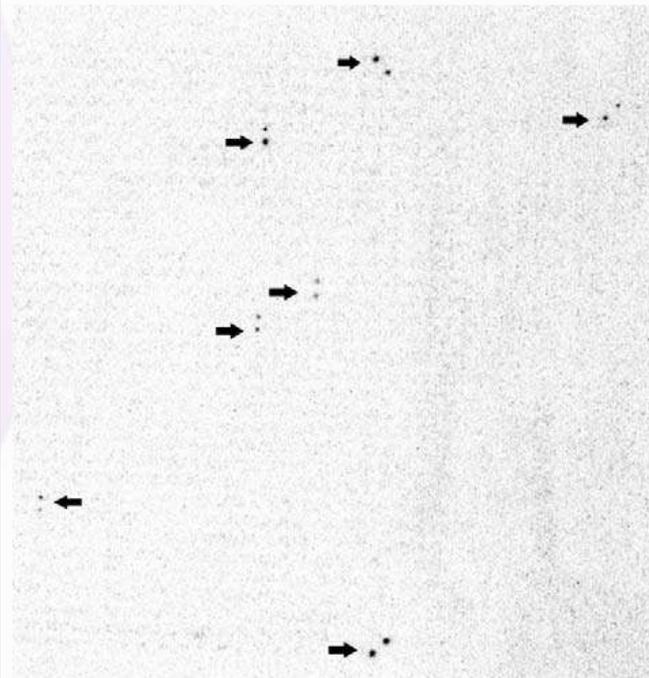
# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## HASIL

Dari 33.000 klon yang dilakukan hibridisasi gen *Dmrt1*, menunjukkan bahwa terdapat 28 klon positif yang selanjutnya diuji dengan PCR menggunakan primer yang dirancang dari urutan *Dmrt1* cDNA.

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa tiga klon BAC mencakup seluruh urutan gen *Dmrt1*.

Untuk mengkonfirmasi contig (rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih), dilakukan sekuensing pada kedua ujung setiap klon BAC positif, dan mengamplifikasi setiap klon menggunakan primer berdasarkan urutan *end-sequence*. Sejalan dengan hal tersebut, hasil sekuensing akhir BAC, menunjukkan adanya hubungan yang *overlapping*, yang membentuk contig gen *Dmrt1* (195kb).



**Gambar kiri.** Hasil hibridisasi 33.000 klon BAC dengan probe cDNA dari *Dmrt1* belut sawah pada membran nilon, klon positif ditandai dengan panah.

**Gambar kanan.** Identifikasi PCR dan enzim *NotI* dari tiga klon positif (14F8, 14G7, dan 79A4); huruf a adalah ukuran sisipan klon positif yang dipotong dengan *NotI*; huruf b adalah amplifikasi PCR dari *Dmrt1* intron 1 (primer, DMF2 dan DMF3, band 1,8 kb), huruf c intron 2 (primer, DMF4 dan DMI2E3, band 3 kb) dan huruf d exon 5 (primer, DM30U dan RF1500, band 313 bp) menggunakan klon BAC positif ini sebagai templat

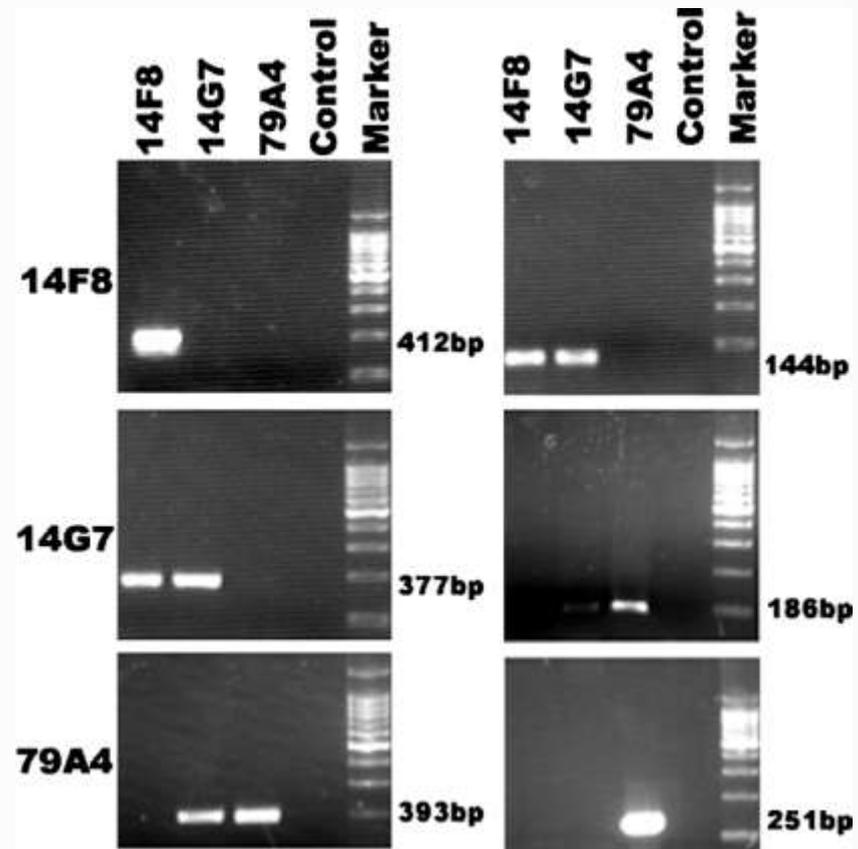
# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## HASIL

Dari 33.000 klon yang dilakukan hibridisasi gen *Dmrt1*, menunjukkan bahwa terdapat 28 klon positif yang selanjutnya diuji dengan PCR menggunakan primer yang dirancang dari urutan *Dmrt1* cDNA.

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa tiga klon BAC mencakup seluruh urutan gen *Dmrt1*.

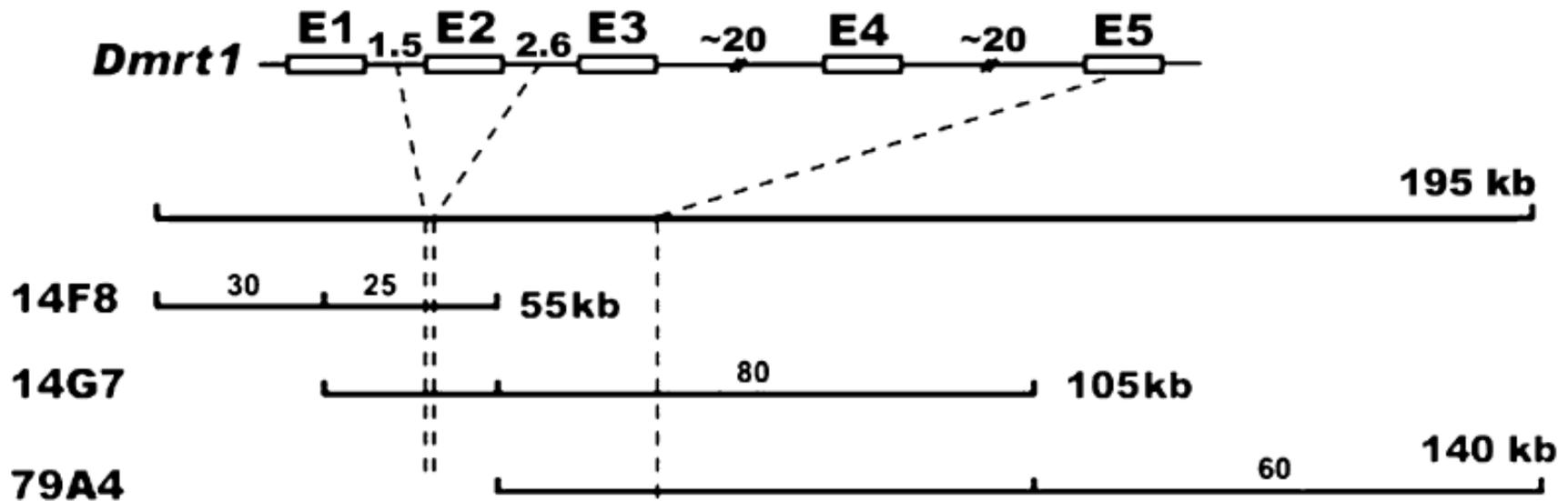
Untuk mengkonfirmasi contig (rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih), dilakukan sekuensing pada kedua ujung setiap klon BAC positif, dan mengamplifikasi setiap klon menggunakan primer berdasarkan urutan *end-sequence*. Sejalan dengan hal tersebut, hasil sekuensing akhir BAC, menunjukkan adanya hubungan yang *overlapping*, yang membentuk contig gen *Dmrt1* (195kb).



Gambar ini merupakan Identifikasi PCR dari klon BAC positif menggunakan primer yang dirancang dari kedua ujung sisipan klon. Hasil amplifikasi ujung 5' (panel kiri) dan ujung 3' (panel kanan) klon positif 14F8, 14G7, dan 79A4 masing-masing menggunakan klon BAC positif sebagai templat.

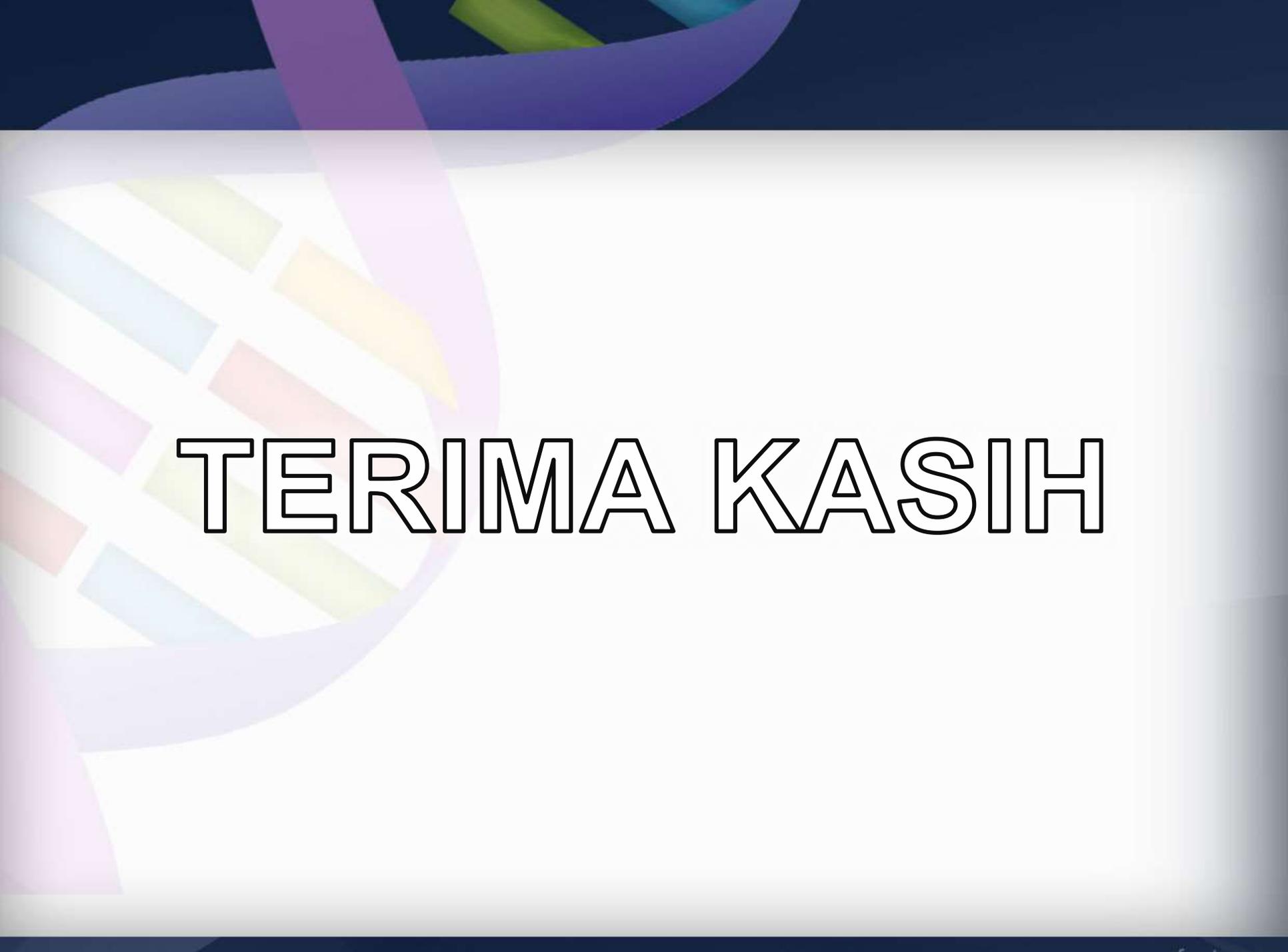
# Konstruksi pustaka BAC dan identifikasi gen *Dmrt1* pada belut sawah, *Monoptereus albus*

## HASIL



Gambar ini merupakan peta contig BAC yang meliputi wilayah gen *Dmrt1* dari belut sawah. Contig dibangun berdasarkan hasil digesti *Bam*HI, sekuensing akhir BAC dan identifikasi PCR dari kedua *end of insert*, dan intron 1, 2 dan exon terakhir (garis putus-putus menunjukkan posisi mereka) dari setiap klon BAC positif. Situs splicing intron 3 dan 4 diprediksi berdasarkan *Dmrt1* dari jenis ikan lain. Gen *Dmrt1* belut sawah diprediksi mengandung empat intron dan lima ekson. Ukuran intron pertama dan kedua masing-masing 1,5 dan 2,6 kb, dan ukuran dua intron terakhir diperkirakan sekitar 20 kb.

Pustaka BAC ini merupakan yang pertama dibangun dari spesies ini, diperkirakan mengandung sekitar 6,3 genom ekuivalen dan mewakili 99,8% dari genom belut sawah yang totalnya mencapai 600 mb. Sekuensing gen *Dmrt1* dari klon BAC dapat membantu dalam memahami evolusi genom dan mekanisme molekuler yang bertindak dalam proses *sex reversal* spesies belut sawah.

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