

**KONSTRUKSI MUTAN PROTEIN FOSFATASE *ptc2Δ Saccharomyces cerevisiae*
DENGAN METODE PENGGANTIAN GEN TARGET DENGAN *POLYMERASE
CHAIN REACTION (PCR)***

Hermansyah

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRACT

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an excellent model to study genes function of eukarotic cells such as study of gene encoding protein phosphatase *PTC2*. Novel phenotypic caused by mutated gene is an important step to study function of gene. In this study constructed mutant of *PTC2* gene encoding protein phosphatase. Method that used in this construction was replacement of target gene (*PTC2*) with auxotroph marker *Candida albicans HIS3* by Polymer Chain Reaction (PCR) or called by PCR-mediated disruption. Mutant colonies which grew in selective medium SC without histidine were confirmed by PCR amplification. By using 1% Agarose gel electrophoresis the result showed that size of *ptc2Δ::CgHIS3* transformant was 3.52 kb while wild type strain was 2.9 kb, indicated that *ptc2Δ::CgHIS3* has integrated on chromosome V replacing *PTC2* wild type.

Keywords: *PTC2, Saccharomyces cerevisiae, PCR, single disruptant*

PENDAHULUAN

Ragi *Saccaromyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) merupakan mikro organisme eukariot yang paling banyak dijadikan sebagai model penelitian dalam biologi molekuler. Hal ini karena ragi memiliki berbagai kelebihan diantaranya pertumbuhan ragi cepat, pola 'budding' yang menghasilkan sel tersebar, mudah untuk dilakukan replika *plating*, sistem genetik ragi telah diketahui dengan baik, dan transformasi DNA ke ragi sangat mudah dilakukan. Mudahnya proses transformasi ragi ini dimanfaatkan oleh para peneliti gen mamalia dengan

mentransfer gen mamalia ke ragi untuk analisis sintetik fungsi protein.

S. cerevisiae memiliki 16 kromosom yang telah terkarakterisasi dengan baik dimana masing-masing berukuran 200 hingga 2.200 kb. Total ukuran DNA kromosom ini 12.052 kb. Sebanyak 6.183 *open reading frame* (ORF) yang dimiliki ragi *S. cerevisiae*, hanya 5.773 gen yang mengkode protein dan mengandung intron 3,8% nya mengandung intron. Gen-gen ragi rata-rata berukuran 1.45 kb atau 483 kodon (Sherman, 2002). Fungsi dari gen-gen tersebut walaupun telah

banyak diketahui, namun penemuan-penemuan fenotip baru dari *single disruptant* telah mengindikasikan bahwa gen-gen ragi memiliki fungsi yang tidak sederhana, melainkan fungsi yang kompleks. Fenotipik yang terlihat dari suatu *single disruptant* ataupun transforman mengisyaratkan bahwa gen tersebut secara molekuler terlibat dalam proses seluler fenotipik yang bersangkutan.

Pendekatan yang biasa digunakan untuk mempelajari fungsi suatu gen ada dua cara. Cara pertama adalah melalui pengrusakan sebagian atau suatu gen kromosom (*disruption*) yang menyebabkan aktivitas protein yang dikode oleh gen tersebut hilang. Cara kedua adalah dengan mengover-ekspresikan suatu gen sehingga diharapkan ekspresi dan aktivitas proteinnya tinggi (Miyakawa dan Mizunuma, *et al.*, 2007). Pembuatan mutan dengan merusak gen lebih banyak dilakukan oleh para peneliti terutama yang bekerja dengan ragi *S.cerevisiae* dalam mempelajari fungsi suatu gen. Metode penggunaan *Polymerase chain reaction* (PCR) untuk merusak gen (*PCR-mediated gene disruption*) merupakan metode yang banyak digunakan untuk merusak sebagian atau keseluruhan suatu gen (Hirasaki, *et al.*, 2008).

Protein fosfatase adalah protein yang memindahkan gugus fosfat dari suatu protein atau enzim. Protein

fosfatase ini berlawanan dengan protein kinase yang menempelkan gugus fosfat pada protein. Protein fosfatase dan protein kinase mengendalikan berbagai proses seluler, misalnya pada berbagai signal transduksi. Gen *PTC2* mengkode protein fosfatase yang diidentifikasi sebagai protein serin/treonin fosfatase yang fungsinya masih terus diteliti. Fungsi *PTC2* yang telah diketahui adalah mendefosforilasi Hog1 pada osmostres yang diinduksi oleh aktivitas kinase; mendefosforilasi Ire1 pada downregulasi respon protein unfolded, mendefosforilasi Cdc28, dan meng-inaktivasi DNA checkpoint (Young *et al.*, 2002; Lorey *et al.*, 2003). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan mutan gen *PTC2* yang digantikan oleh gen *HIS3* dari *Candida glabrata*. Mutan *ptc2::CgHIS3* ini akan digunakan untuk mempelajari fungsi *PTC2* lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

Strain dan kondisi kultur yang digunakan

FY833 dengan $can^r = ura3-52$ *his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63* digunakan sebagai *wild type strain* dan *parental strain*. *Strain ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 ptc2Δ::CgHIS3*.

Medium agar YPDA diperkaya dengan suplemen adenine 0.4 mg/ml (Sigma- Aldrich Co). Medium selektif terdiri atas *yeast nitrogen base* tanpa

amino acids 0,67%, glukosa 2%, bakto agar 2% dan suplemen-suplemen auksotropi seperti L-triptopan 20 mg/L, L-histidin (HCl) 20 mg/L, L-arginin (HCl) 20mg/L, L-metionin 20 mg/L, urasil 20 mg/L, L-tirosin 30 mg/L, L-isoleusin 30 mg/L, L-lisin (HCl) 30 mg/L, L-leusin 100 mg/L, L-valin 150 mg/L, L-treonin 200 mg/L, dan adenin 400 mg/L).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Desain pasangan primer untuk PCR yang digunakan untuk konstruksi *ptc2Δ::CgHIS3* adalah *forward primer* (Kf) Kf (44 to 83)5'ACTCCGGTGC TGACTCCTTG ACCGCGTTTG GACTGTGTGC CACAGGAAAC AGCTATGACC 3' dan Kr (1155 to 1194) 5'GGGGCCGGAG GTCTTGCTCT TGGATTGGCT GGAAGGGTCA GTTG TAAAAC GACGGCCAGT 3'

Pasangan primer yang digunakan untuk mengkonfirmasi terjadinya *ppg1Δ::CgHIS3* adalah masing-masing terdiri atas 30 nukleotida yaitu Kf : 5' CTC GGATCC TAAGAAATAT AACCAATAGC AC 3' dan Kr : 5' CTC GGATCC TCTTGTCGA G GCTGTCCGGAG AA 3'

Campuran reaksi untuk reaksi PCR adalah sebagai berikut: tiap 10 µL campuran reaksi terdiri atas 0,1 µL Takara Ex TaqTM (5 units/µL), 2 µL 10x Ex TaqTM bufer, 2 µL campuran dNTP, 0,5 µL DNA *template* (74 ng/µL), 1 µL *forward primer*, 1 µL *reverse primer*, 3,4

µl air steril. Kondisi reaksi PCR adalah sebagai berikut: siklus reaksi 25X, denaturasi pada 94°C selama 0,5 menit, annealing pada 60°C selama 30 detik, ekstensi pada 72°C selama 3 menit. Hasil amplifikasi PCR diperiksa dengan gel elektroforesis agarosa 1%.

Transformasi pada ragi

Transformasi pada ragi menggunakan metode Li asetat. (Hermansyah, *et al.*, 2009). Sel ragi diinokulasi pada medium YPDA. Pindahkan 0,5 mL kultur sel ke 5 mL media kultur baru. Inkubasi dengan shaker 150 rpm selama 3 hingga 4 jam hingga meraih OD₆₆₀ = 1,0. Sel dipanen dan dikumpulkan dengan sentrifugasi 2.000 rpm selama 5 menit dan dicuci dengan 5 mL air steril. Sel di larutkan kembali dengan 1 mL Li.asetat 0,1M dan pindahkan suspensi sel ke dalam 1,5 mL tube untuk disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik dan supernatant dibuang. Dilarutkan kembali sel dengan 0,5 mL Li asetat dan inkubasi pada temperatur 30°C. Dididihkan *single strand DNA carrier (salmon sperm)* selama 5 menit dan dengan cepat dinginkan dalam es selama 5 menit. Suspensi sel divorteks, dipipet 0,1 mL sampel dan dikumpulkan sel dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik dan supernatannya dibuang. Tambahkan berturut-turut 0,24 mL PEG 4.000 50% (w/v), 0,036 mL Li Asetat 1,0 M, 0.005 mL *carrier DNA* (10 mg/mL), dan 0,070 mL DNA hasil PCR (0,1-10µg)

dan air steril. Vorteks hingga bercampur sempurna. Inkubasi selama 30 menit pada 30°C, *heat shock* selama 20 hingga 25 menit pada 42 °C. Sentrifugasi campuran pada 12.000 rpm selama satu menit dan buang supernatan secara sempurna. Tambahkan 0,1 mL suspensi sel yang dilarutkan dengan 0,1 mL air steril. Sebarkan suspensi sel yang telah ditransformasi pada medium selektif tanpa mengandung histidin. Inkubasi pada 30°C selama 2-3 hari hingga muncul koloni-koloni transforman.

Elektroforesis gel agarosa terhadap fragmen DNA

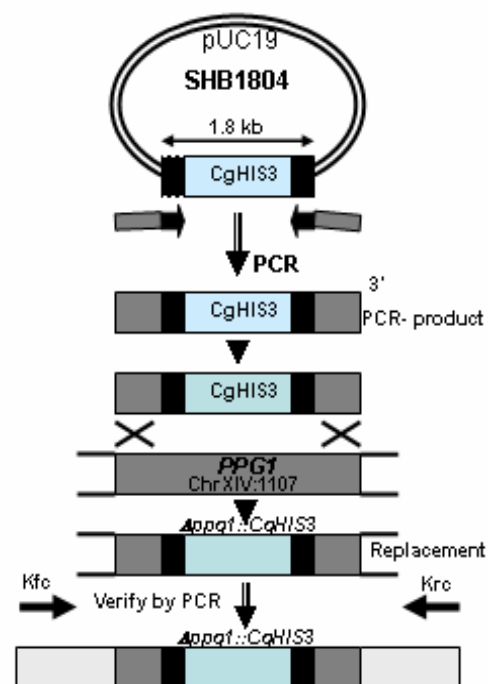
Elektroforesis gel agarosa dilakukan sesuai dengan Sambrook *et al*, 1989 dengan sedikit modifikasi.

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,4 g agarosa dalam 40 mL bufer TAE 1X (Tris-asetat 0,04 M; Na₂EDTA 0,001 M (pH 8,0), dipanaskan hingga mendidih, kemudian didinginkan hingga 40-50 °C, lalu dituang pada cetakan gel dan dibiarkan hingga memadat. Gel agarosa diletakkan dalam alat elektroforesis dan direndam dengan bufer TAE 1X. Sampel DNA dicampur dengan *loading bufer* (bromofenol biru 0,1%; sukrosa 50%; Na₂EDTA 0,1 M) dan air steril. Campuran ini dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa, lalu dielektroforesis dalam medan listrik 60 volt sampai warna biru bromofenol biru bermigrasi mendekati batas akhir gel. Gel direndam dalam larutan etidium bromida

0,5 µg/mL selama 1-5 menit. Pita-pita DNA diamati dengan sinar ultra violet (UV).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mutan $\Delta ptc2::CgHIS3$ dikonstruksi menggunakan *strain* FY833 dengan *can^r* sebagai parental strain dilakukan dengan menggunakan metode penggantian gen target dengan *PCR-mediated disruption* (Sakumoto, *et al.*, 1999; 2002). Strategi desain primer untuk merusak gen target seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Strategi penggantian gen *PTC2* oleh *CgHIS3*

Dengan metode ini kita harapkan protein *PTC2* tidak dapat melakukan aktivitasnya lagi. Masing-masing *forward primer* atau *reverse primer* terdiri atas 40

nukleotida dari gen *PTC2* dan 20 nukleotida dari gen *CgHIS3* yang terdapat pada plasmid SHB1804 yang merupakan derivat dari plasmid pUC19 (Kitada *et al.*, 1995). Urutan nukleotida

dari gen protein fosfatase *PTC2* yang terdapat di kromosom V terdiri atas 1395 nukleotida (Dietrich, *et al.*, 1997) berdasarkan *yeast genome S. cerevisiae* data base (Tabel 1).

Tabel 1: Urutan nukleotida dari gen *PPG1*

1 ATGGGACAAA TTCTATCAAA CCCGGTAATT GATAAAGAGA
GCCACTCCGG
51 TGCTGACTCC TTGACCGCGT TTGGACTGTG TGCAATGCAA
GGGTGGCGGA
101 TGTC AATGGA GGATTCACAC ATTCTAGAGC CTAATGTTTT
GACAAAGTCC
151 GATAAGGACC ATATTGCATT TTACGGTATA TTCGATGGTC
ATGGTGGCGC
201 TAAAGTAGCA GAATACTGTG GTAATAAAAT AGTGGAGATC
CTGCAAGAGC
251 AGAAATCGTT CCATGAAGGA AATTTACCAA GGGCTTTGAT
TGATACTTTC
301 ATAAACACAG ACGTGAAACT GTTACAAGAT CCTGTGATGA
AAGAAGACCA
351 TAGCGGATGT ACGGCTACAT CCATATTAGT ATCAAAGTCC
CAGAACTTGT
401 TAGTATGTGG TAACGCTGGT GACAGTAGAA CCGTACTCGC
CACCGACGGG
451 AACGCAAAGG CATTATCATA CGATCACAAG CCCACTCTAG
CAAGCGAAAA
501 ATCACGTATT GTGGCAGCTG ATGGCTTCGT AGAAATGGAT
AGGGTCAACG
551 GTA AACTTGGC GCTCTCTCGT GCCATTGGTG ATTTTGAGTT
CAAATCCAAC
601 CCCAAATTGG GCCCCGAGGA GCAAATAGTG ACATGTGTTC
CGGACATTCT
651 CGAGCATTCT CTAGATTACG ATAGGGACGA GTTTGTAATC
TTAGCCTGTG

701 ATGGTATCTG GGATTGTTTG ACTTCCCAAG ATTGTGTGGA
CTTGGTTCAT
751 CTCGGCCTTC GCGAAGGCAA GACATTGAAT GAAATTTCTT
CGCGGATCAT
801 CGATGTCTGT TGTGCTCCCA CCACAGAGGG GACGGGTATT
GGATGCGACA
851 ACATGAGTAT AGTGGTTGTC GCGCTGCTGA AAGAAGGTGA
AGACGTGCT
901 CAATGGAGCG ACCGTATGAA GTCCAAGGCC CACCGCACAT
CAGTGCGTTC
951 TTTTGCAGAC AAGAGAAGAA GGGTGTTTAG TTACTIONGAT
TTTTCCAAAT
1001 GTAACGACGA ACAGGTGTTT GCTATCACTA CGAAGAAACC
TCAGGACAAA
1051 TTCACTCGCG ACCACGAAGC CGCTGTGGCC TCGGTGACTG
CCGCCGATAA
1101 CGACGATCCA ATGGACATAG ACGACACGGA CGCTGACACA
GATGCAGAAA
1151 ATCTTGACCC TTCCAGCCAA TCCAAGAGCA AGACCTCCGG
CCCCATTGAT
1201 CTAGCATCCT TGGAGGCGCT ACTTGGTGCT ACAGGAGGAG
TGAAGACAGA
1251 CAGCAACGGG AACAAAGTCA CCTACACTCT TCCCCAGTCT
GCCTTGGCCC
1301 AACTGCTCCA AACCATGGGC CATGACCCGG CTCCTCCCA
TCCCGAGAAT
1351 GACAGTAACA CTGACCACAA GGCCGGCCGT TCCCACTTGC AATGA

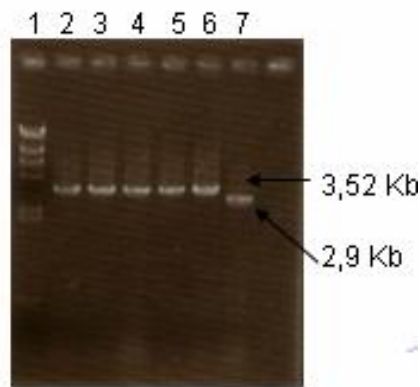
Proses transformasi selesai setelah itu, sel-sel disebar di medium selektif *plate* tanpa mengandung histidin. Dua hingga tiga hari kemudian terlihat beberapa koloni-koloni tumbuh di medium selektif tanpa histidin tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa pada transforman terjadi penggantian gen

PTC2 oleh *CgHIS3* dengan cara integrasi pada kromosom *S. cerevisiae*. *Wild type strain* FY833 yang memiliki $can^r = ura3-52 his3-\Delta 200 leu2\Delta 1 lys2\Delta 202 trp1\Delta 63$ sebagai *parental strain*, karena gen pengkode histidin yang rusak (*defect*) membuat sel tidak bisa menghasilkan histidin sebagai fenotip auksotrop dari

strain FY833, sehingga kita perlu menambahkan histidin pada medium. Pada koloni-koloni transforman histidin dapat diekspresi oleh gen *CgHIS3* yang menggantikan gen *PTC2* pada kromosom *S.cerevisiae* tersebut, sehingga sel sel dapat hidup pada medium selektif tanpa histidin.

Konfirmasi lebih lanjut untuk lebih meyakinkan bahwa transforman betul-betul membawa *ptc2::CgHIS3*, dilakukan menggunakan *PCR analysis*

(*PCR-based confirmation*). Tujuh belas koloni yang diuji DNA kromosomnya dan dianalisis dengan DNA elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 2), 9 koloni menghasilkan dengan jelas pita yang berukuran 3,52 kb yang merupakan ukuran transforman *ptc2Δ::CgHIS3* pada lajur no. 2, 4, 5, dan 6. Lajur 7 adalah *wild type PTC2* berukuran 2,9 kb (1 kb *upstream PTC2* + 1,4 kb *PTC2* + 0,5 *downstream PTC2*).



Gambar 2. Konfirmasi ukuran DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Ukuran *ptc2Δ::CgHIS3* 3,52 kb sedangkan ukuran *wild type* 2,9 kb

Adanya transforman yang menunjukkan hasil positif atau dapat tumbuh pada medium seleksi tanpa mengandung histidin tapi menghasilkan hasil negatif menggunakan PCR atau menghasilkan pita yang mirip dengan pita dari *wild type* mengindikasikan bahwa adanya kemungkinan *CgHIS3*nya terintegrasi dengann tidak menggantikan gen target *PTC2*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Mutan protein fosfatase *ppg1Δ S. cerevisiae*, dikonstruksi dengan merusak gen target *PTC2* pada kromosom menggunakan medoda *PCR-mediated disruption* yang menggunakan auksotrop marker *HIS3* yang berasal dari *C. albicans*.
2. Konfirmasi mutan *ptc2Δ::CgHIS3*

yang dilakukan menggunakan metoda *PCR-based confirmation* menghasilkan ukuran *ptc2Δ::CgHIS3* 3,52 Kb, sedangkan *PTC2* 2,9 Kb.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kerusakan gen *PTC2* yang menyebabkan sel kehilangan aktivitas protein *PTC2*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Satoshi Harashima dari *Osaka University* yang mendanai penelitian ini. Terima kasih juga kepada Dr. Yoshinobu Kaneko dan Dr. Minetaka Sugiyama yang telah memberikan banyak masukan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Dietrich FS, et al. 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V. *Nature* 387(6632 Suppl):78-81.

Hermansyah, M. Sugiyama, Y. Kaneko, S. Harashima. 2009. Yeast protein phosphatase Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, *CLN2* transcription and vacuole morphogenesis. *Arch Microbiol* 191:721-733.

Hirasaki, M., Y. Kaneko, S. Harashima. 2008. Protein phosphatase Siw14 controls intracellular localization of

Gln3 in cooperation with Npr1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 409:34-43.

Kitada, K., E. Yamaguchi, M. Arisawa. 1995. Cloning of the *Candida glabrata TRP1* and *HIS3* genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* 165:203-206.

Leroy C, et al. 2003. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell.* 11(3):827-35.

Miyakawa, T. dan M. Mizunuma. 2007. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:604951-6049513.

Sakumoto, N., I. Matsuoka, Y. Mukai, N. Ogawa, Y. Kaneko, S. Harashima. 2002. A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast* 19:587-599.

Sakumoto, N., Y. Mukai, K. Uchida, T. Kouchi, J. Kuwajima, Y. Nakagawa, S. Sugioka, E. Yamamoto, T. Furuyama, H. Mizubuchi, N. Ohsugi, T. Sakuno, K. Kikuchi, I.

Konstruksi Mutan Protein Fosfatase *Ptc2Δ Saccharomyces Cerevisiae...* (Hermansyah)

- Matsuoka, N. Ogawa, Y. Kaneko, S. Harashima. 1999. A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1669-1679.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, dan T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sherman, F.2002. Getting started with yeast, *Methods Enzymol* 350:3-41.
- Young C, et al.2002. Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot. Cell.* 1(6):1032-40.