

IDENTIFIKASI GEN MX1 (GEN RESISTEN TERHADAP VIRUS INFLUENZA) PADA pBAC PUSTAKA GENOM BABI

Sumantri, C.¹⁾, T. Morozumi ²⁾ & N. Hamashima ²⁾

¹⁾Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak, Jurusan Ilmu Produksi Ternak,
Fakultas Peternakan IPB.

²⁾STAFF-Institute, Animal Genome Research, Tsukuba, Japan.
(Diterima 05-02-2001; disetujui 10-05-2001)

ABSTRACT

The study was done to identify the pBAC (pig Bacterial Artificial Chromosome) library clone bearing the pig Mx1 locus, especially exon-3 and exon-14. In this research, a total of 22 superpools (sp) were amplified by *polymerase chain reaction* (PCR) in a thermocycler with 20 μ l volume of reactions mixture containing 1 μ l of DNA sample from superpools clone, 1 μ l of 50 ng primer, 2 μ l of 15 mM MgCl₂, 2 μ l of mM dNTPs, 2 μ l of 4 unit AmpliTaq gold and add the milique water up to 20 μ l volume.

The results show that the superpools clone no. 7, 8, 11, 13 and 19 and 21 were positive to exon-3 (193 bp). Superpools clone no. 3, 4, 7, 8, 11, 13, 19 and 20 were positive to exon-14 (594bp). Therefore, only superpool no. 21 specific to exon-3 and the superpool 3, 4 and 20 specific to exon 14. To identify the address of superpool clone no. 7, 8 and 20 were screening using for 4-Dimension. Each superpool performed in 34 PCR reactions as follow: for Dimention-1 (1-D has 7 PCR reactions); Dimention-2 (2-D has 7 PCR reactions); Dimention-3 (3-D has 12 PCR reactions) and Dimention-4 (4-D PCR reactions 8).

The results show that the superpool no. 7 is located on 313 D7, the superpool no 8 is on 361 A12 and the superpool no. 20 is on 935 G3

Key words : pBAC library, superpool, 4-Dimension screening, pig Mx1 gene and PCR.

PENDAHULUAN

Kerugian yang diakibatkan oleh virus influenza pada industri peternakan terutama unggas sangatlah besar. Salah satu cara untuk mencegah terjadinya wabah penyakit karena virus influenza adalah dengan cara menyeleksi individu ternak yang mempunyai resistensi tinggi terhadap virus influenza. Pada mencit, gen Mx1 dilaporkan Stacheli *et al.* (1988) dapat mengontrol resistensi terhadap virus influenza (*myxovirus*). Selanjutnya Stacheli *et al.* (1988) menjelaskan bahwa gen Mx1 mempunyai dua alel. Salah satu alelnya Mx1⁺ memberikan kode kepada interferon (IFN) -alpha dan beta untuk memproduksi 72 Kda Mx1 protein yang dapat mencegah masuknya virus ke dalam inti, sehingga virus tersebut gagal ber-eplikasi. Sebaliknya, Mx1⁻ tidak berkemampuan untuk memproduksi protein tersebut disebabkan terjadinya delesi besar-besaran pada exon 9, 10 dan 11. Sebagai akibatnya individu yang membawa alel Mx1⁻ akan lebih mudah terserang influenza.

Hug *et al.* (1988) melaporkan pada mencit, gen Mx1 terdiri dari 14 exon dengan panjang runutan DNA-nya sekitar 5,5 Kilo basa (Kb). Gen Mx1 pada babi juga terdiri dari 14 exon dengan total panjang runutan DNA-nya 2,54 Kb. Mx1 protein babi, sekuense asam aminonya menunjukkan homologi yang tinggi dengan mencit (Muller *et al.*, 1992). Mx1

protein pada babi juga ditemukan homolog dengan berbagai spesies lainnya seperti pada manusia (Aebi *et al.*, 1989), domba (Charleston & Stewart, 1993), itik (Bazzigher *et al.*, 1993), ayam (Bernasconi *et al.*, 1995), sapi (Ellinwood *et al.*, 1998) dan ikan (Leong *et al.*, 1998).

Dalam rangka mempercepat proses identifikasi, isolasi dan mengkarakterisasi suatu gen, sangat diperlukan berbagai macam klon dari pustaka genom. Pustaka genom dapat dibuat dengan beberapa cara di antaranya dengan menggabungkan potongan-potongan DNA dengan berbagai vektor. Burke *et al.* (1987) membuat pustaka genom dengan menggunakan ragi sebagai vektornya, sistim ini disebut *Yeast Artificial Chromosome* (YAC). Sistim YAC telah berhasil mengklon potongan DNA pada manusia lebih dari satu mega basa (Mb). Neil *et al.* (1990) dan Anderson (1993) menyatakan beberapa kelemahan sistim YAC seperti: efisiensi dalam mengklon masih rendah, insiden munculnya klon khimera masih cukup tinggi, DNA sisipan kurang stabil (masih sering lepas) dan proses purifikasi YAC-DNA-nya masih sulit. Asakawa *et al.* (1997) telah meng-konstruksi pustaka genom manusia dengan cara menggabungkan potongan DNA manusia dengan pBAC-Lac sebagai vektor, sistim ini disebut *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC). Asakawa *et al.* (1997) telah berhasil mengkloning 96.000 klon dengan rata-rata DNA sisipan sepanjang 110 Kb. Dengan cara yang

MATERI DAN METODE

sama Suzuki *et al.* (1997) telah membuat pustaka genom babi dengan jumlah klon 103488 dengan rata-rata DNA sisipan sepanjang 130 Kb, tetapi yang berhasil diidentifikasi hanya 1078 klon yang dikelompokkan ke dalam 22 superpool (sp).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen Mx1 khususnya exon-3 dan exon-14 dari pustaka genomnya Suzuki *et al.* (1997).

Materi Penelitian

Sebanyak 22 superpool dari pustaka genom Suzuki *et al.* (1997) yang masing-masing setiap superpoolnya mempunyai 49 klon telah digunakan sebagai bahan penelitian. Data tentang superpool dan jumlah klonnya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Superpool dan jumlah klon dari pustaka genom Suzuki *et al.* (1997)

No. Superpool	No. Klon	No. Superpool	No. Klon
1	1-49	12	540-588
2	50-98	13	589-637
3	99-147	14	638-686
4	148-196	15	687-735
5	197-245	16	736-784
6	246-294	17	785-833
7	295-343	18	834-882
8	344-392	19	883-931
9	393-441	20	932-980
10	442-490	21	981-1029
11	491-539	22	1030-1078

Merancang dan Mensintesis Primer

Runutan DNA pengapit untuk exon-3 dan exon-14 dari gen Mx1 dirancang sebagai primer *Forward* dan primer *Reverse*. Perancangan primer dilakukan

dengan bantuan program komputer "Oligo versi 4." Data tentang primer disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Primer *Forward* dan *Reverse* untuk Exon-3 dan Exon-14 Gen Mx1 babi

Nama Primer	Runutan DNA	Produk PCR (bp)
Mx-e3 F Mx-e3R	(5' CAG CCA GTA CGA GGA AG 3') (5' CTC TTG CCC GAA CTC TGG TC 3')	193 bp
Mx-e14 F Mx-c14 R	(5' AAG CGC ATC TCC AGC CAC ATC 3') (5' TGA CCC TTC TAT GAT GCI ATG 3')	594 bp

Amplifikasi Exon-3 dan Exon-14 gen Mx1 Babi dari Superpool Pustaka Genom Suzuki *et al.* (1997)

Analisis PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut: 1 µl (50 ng) sampel DNA klon dari setiap superpool, 1 µl (50 ng) primer *forward* dan primer

reverse masing-masing untuk exon-3 dan exon-14, 15 mM MgCl₂ 2 µl, 2 mM dNTPs 2 µl dan 4 Unit AmpliTaq gold DNA polimerase 0,2 µl dan kemudian tambahkan *milique water* steril sampai total volume 20

µl. Tabung tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan program sebagai berikut. *Tahap 1*, proses denaturasi 94°C selama 10 menit, 1 X ulangan. *Tahap 2*, proses denaturasi pada 94°C selama 30 detik, proses *annealing* (penggabungan kembali) pada suhu 55°C selama 30 detik, proses ekstensi (pemanjangan rantai DNA) pada suhu 72°C selama 1 menit. Seluruh proses pada *Tahap 2* dilakukan dengan 40 X ulangan. *Tahap 3*, ekstensi tambahan dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit dengan 1 X ulangan.

Analisis Hasil Produk PCR

Analisis hasil produk PCR dilakukan dengan cara mengelektroforesis 5 µl produk PCR-RFLP, 2 µl *loading dye*, 3 µl *milique water* dicampurkan secara homogen dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan dengan 50 Volt selama 25 menit dan pewarnaan dengan etidium bromide selama 20 menit. DNA marker yang digunakan M4 yaitu φ X 174 yang dipotong enzim Hae III. Untuk kontrol positif (c) digunakan DNA Pig 6 yaitu fragmen DNA yang telah diketahui mengandung gen M x 1 babi secara lengkap. Pemotretan gel dilakukan di atas UV transiluminator dengan kamera polaroid.

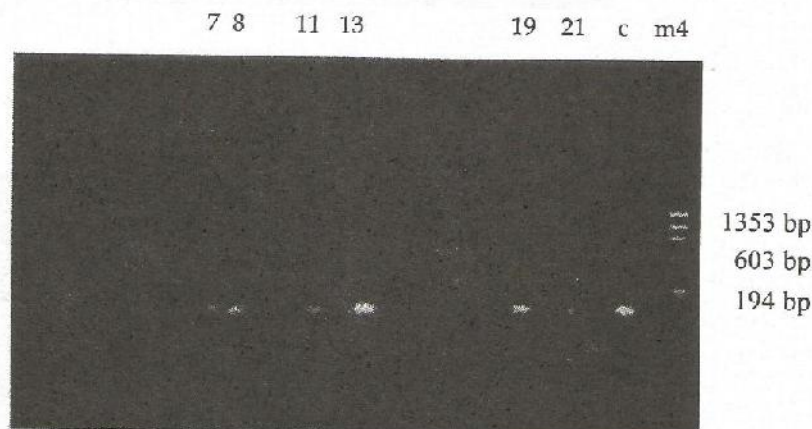
Penentuan Lokasi Klon pada Superpool

Pada penelitian ini dilakukan dua tahap skreening. Tahap 1 melakukan skreening terhadap 22 superpool dan tahap 2 melakukan skreening 4-dimensi terhadap superpool yang mengandung klon positif.

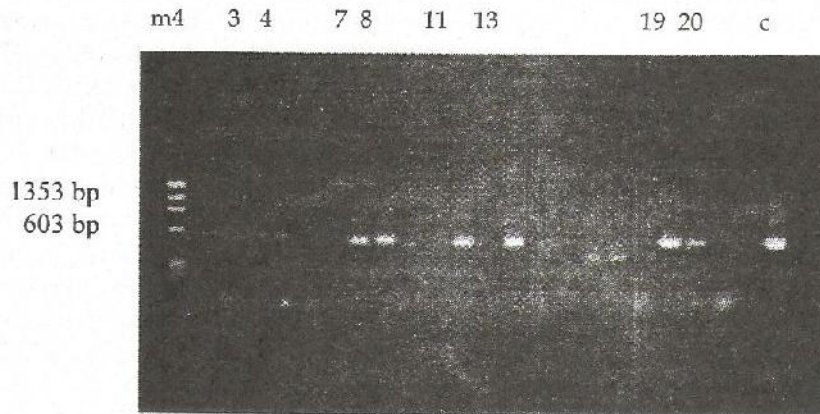
Setiap superpool mempunyai 49 klon, penentuan addres (lokasi klon pada nomor plate) dilakukan dengan cara skreening 4-Dimensi. Setiap superpool dilakukan 34 X reaksi PCR yang masing-masing sebagai berikut: untuk dimensi ke-1 (1-D) 7 X PCR, dimensi ke-2 (2-D) 7 X PCR, ke-3 (3-D) 12 X PCR dan ke-4 (4-D) 8 X PCR. Pemilihan superpool untuk skreening 4-Dimensi dilakukan berdasarkan hasil amplifikasi PCR terbaik, untuk penelitian ini maka diambil tiga superpool yaitu superpool no.7, 8 dan 20. Produk PCR dielektroforesis sama seperti teknik di atas dan marker yang digunakan M4 (φ X 174 yang dipotong oleh enzim Hae III).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis dari produk PCR menunjukkan bahwa dari 22 superpool yang dapat diamplifikasi dengan baik (positif) untuk primer exon-3 dan exon-14 ada 7 superpool masing-masing superpool no. 3, 4, 7, 8, 11, 13, 19, 20 dan 21. Pada gambar 1, terlihat bahwa superpool no. 7, 8, 11, 13, 19 dan 21 positif terhadap exon-3 dengan panjang molekul 193 pasangan basa (bp) sesuai dengan control (p6). Pada gambar 2, terlihat bahwa superpool no. 3, 4, 7, 8, 11, 13, 19 dan 20 positif terhadap exon-14 dengan panjang molekul 594 bp sesuai dengan control (p6), tetapi superpool 3 dan 4 tidak teramplifikasi dengan baik (pitanya yang kurang jelas). Superpool no. 7, 8, 11, 13 dan 19 positif terhadap exon-3 dan exon-14. Superpool no. 21 bersifat spesifik untuk exon-3 dan superpool no. 20 spesifik untuk exon-14.



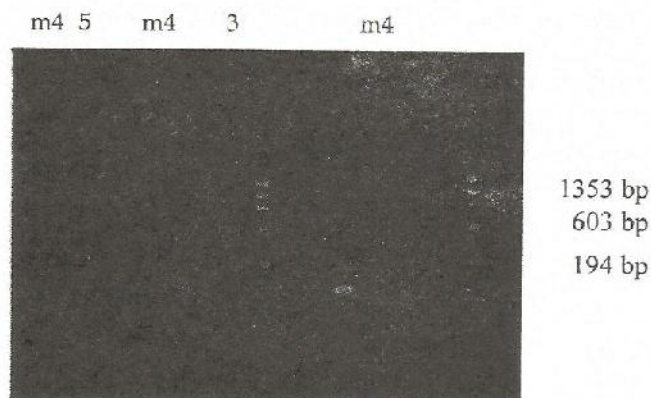
Gambar 1. Superpool no. 7, 8, 11, 13, 19 dan 21 menunjukkan positif terhadap Exon-3 Gen Mx babi dengan panjang molekul 193 bp



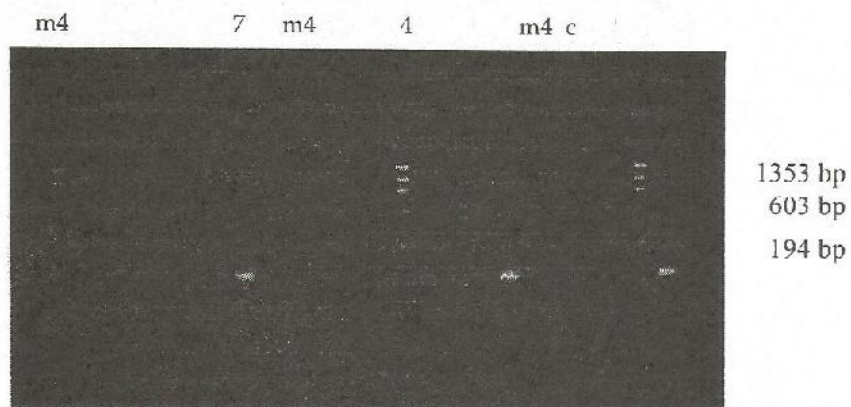
Gambar 2. Superpool no. 3, 4, 7, 8, 11, 13, 19 dan 20 menunjukkan positif terhadap Exon-14 Gen Mx 1 babi dengan panjang molekul 594 bp

Untuk menentukan klon yang mana membawa exon-3 dan exon-14 maka dilakukan skreening 4-Dimensi menurut metode Asakawa *et al.* (1997) dan Suzuki *et al.* (1997). Hasil 4-Dimensi skreening untuk

superpool no.7 disajikan pada gambar 3 dan 4, sedangkan untuk superpool no. 8 dan 20 tidak diperlihatkan dalam gambar.



Gambar 3. Superpool no. 7 menunjukkan positif pada jalur 5 untuk skreening (1-D) dan pada jalur 3 (2-D)



Gambar 4. Superpool no. 7 menunjukkan positif pada jalur 7 untuk skreening (3-D) dan pada jalur 4 (4-D)

Gambar 3 memperlihatkan hasil skreening dimensi ke-1 dan ke-2 (1-D dan 2-D). Hasil 1-D menunjukkan positif pada lajur 5 (1-D5) dan hasil dari 2-D menunjukkan positif pada lajur 3 (2-D3). Gambar 4 memperlihatkan hasil skreening untuk dimensi ke-3 dan ke-4 (3-D dan 4-D). Hasil 3-D menunjukkan positif pada lajur 7 (3-D7) dan untuk 4-D menunjukkan positif pada lajur 4(4-D4). Seperti sudah diperlihatkan pada Tabel 1, superpool 7 mempunyai 49 klon dengan no. klon 295-343. Berdasarkan hasil 4-D, maka klon yang membawa exon-3 dan exon-14 adalah klon dengan no 313 D7. Dengan cara yang sama untuk superpool 8 (no. klon 344-392) ditemukan pada klon no. 361 A12, dan untuk superpool 20 (no. klon 932-980) ditemukan pada klon 935 G3.

Berdasarkan hasil skreening dimensi ke-1 (1-D), -2 (2-D), -3 (3-D) dan -4 (4-D) menunjukkan hanya satu klon yang positif. Hal ini sudah sesuai dengan penelitian Asakawa *et al.* (1997) yang menyatakan hasil skreening 4 dimensi harus menghasilkan hanya satu klon positif, jika mempunyai lebih dari satu klon positif ($n \geq 1$) maka harus dilakukan skreening lanjutan tahap ke-3 sebanyak n^4 PCR.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan dari 22 superpool yang diuji dan berhasil teridentifikasi ada sembilan superpool (9/22; 40,9%) yang masing-masing sebagai berikut: lima superpool (5/22; 22,73 %) mengandung exon-3 dan exon-14, tiga superpool (3/22; 13,6%) mengandung exon-14, dan satu superpool mengandung exon-3 (1/22; 4,5 %).

Penentuan letak klon dapat dilakukan secara akurat dengan menggunakan teknik skreening 4-dimensi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aebi, M., J. Fah, N. Hurt, C.C. Samuel, D. Thomis, L. Bazzigher, J. Pavlovic, O. Haller & P. Staeheli. 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol.Cell.Biol.* 9(11):5062-5072.
- Anderson, C. 1993. Genome shortcut leads to problem. *Science* 259:1684-1687.
- Asakawa, S., I. Abe, Y. Kudoh, N. Kishi, Y. Wang, R. Kubota, J. Kudoh, K. Kawasaki, S. Minoshima & N. Shimizu. 1997. Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene.* 191:69-79.
- Bazzigher, L., A. Schwarz & P. Staeheli. 1993. No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *Virology.* 195(1):100-112.
- Bernasconi, D., U.Schultz & P. Staeheli. 1995. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *Virology.* 15(1):47-53.
- Burke, D.T., G.F. Carle & M.V. Olson. 1987. Cloning of large segment of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812.
- Charleston, B. & H.J. Stewart. 1993. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high level expression in the endometrium of pregnansheep. *Gene.* 137 (2):327-331.
- Ellinwood, N.M., J.M. McCue, P.W. Gordy & R.A. Bowen. 1998. Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *J. Interferon Cytokine Res.* 18 (9):745-755.
- Hug, H., M. Costas, P. Staeheli, M. Aebi & C. Weissmann. 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon and virus-inducible promotor. *Molec. Cell. Biol.* 8,3065-3079.
- Leong, J.C., G.D. Trobridge, C.H. Kim, M. Johnson & B. Shimon. 1998. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol Rev.* 166:349-363.
- Muller, M., E.L. Winnacker & G. Brem. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* 12(2):119-129.
- Neil, D.L., A. Villasante, R.B. Fisher, D. Vetrie, B. Cox & C.T. Smith. 1990. Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acids Res.* 18: 1421-1428.
- Staeheli, P., R. Grob, E. Meir, J.G. Sutcliffe & O. Haller. 1988. Influenza-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol. Cell. Biol.* 8(10):4518-4523.
- Suzuki, K. 1997. Construction of a porcine BAC library and its 4-Dimentional (4D) PCR screening system. *Report of International Workshop on Animal Genome Analysis.* 51-57.