

KLONING DAN EKSPRESI GEN PENYANDI SAG1 *TOXOPLASMA GONDII* ISOLAT LOKAL PADA VEKTOR pGEX-2T

Sri Hartati¹⁾, Hastari Wuryastuti¹⁾, Joanes Sri Widada²⁾, Sumartono³⁾ dan Asmarani Kusumawati⁴⁾

¹⁾ Bag. Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

E-mail : toxocat2001@yahoo.com

²⁾ Lab. Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.
UMR 5098, CNRS IFREMER Universite, Universite Montpellier II, France.

³⁾ Bag. Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

⁴⁾ Lab. Biokimia, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Utara Berek, Yogyakarta 55281.

ABSTRAK

Kloning gen penyandi antigen permukaan (SAG1) *Toxoplasma gondii* isolat lokal dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan antigen rekombinan untuk pengembangan serodiagnosa toksoplasmosis. DNA yang mengkode gen SAG1 yang telah diinsersikan pada plasmid pCR @ 2.1 (pCR-SAG/mat.) diisolasi, kemudian diklon pada vektor pGEX-2T dan ditransfeksi ke dalam *E.coli DH5*. Untuk menentukan klon positif plasmid rekombinan, dianalisis dengan enzim restriksi *BamHI* dan *EcoRI* kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose. Hasil digesti ganda dengan enzim tersebut menunjukkan 2 fragmen DNA yaitu: 4900 bp (vektor pGEX-2T) dan 800 bp (gen SAG1 mature). Fragmen gen SAG1 *T.gondii* isolat lokal berhasil diekspresikan pada *E. coli DH5* dengan vektor ekspresi pGEX-2T dengan sangat efisien.

Kata kunci : *T. gondii*, SAG1, pGEX-2T, *E.coli DH5*.

ABSTRACT

SAG1 is the major surface antigen *T. gondii* whose gene may present variations between isolates. Therefore cloning and expression of cDNA encoding surface antigen (SAG1) tachyzoite of a local isolate *Toxoplasma gondii* for molecular diagnosis purpousis is the aim of this research. The research constructed a prokaryotic expression vector based on pGEX-2T for recombinan protein production in *E.coli*. The SAG1 gene was excised from pCR-SAG/mat with *BamHI* and *EcoRI* enzymes and transfected into *E.coli DH5*. The resulting plasmids were analyzed by *BamHI* *EcoRI* to establish the positive clones and the digestion products were analysed by electrophoresis on agarose gel. The results showed there were two DNA fragments of the expected size i.e. 4900bp (pGEX-2T) and 800 bp. The cloning efficiency in pGEX-2T and transfection in *E.coli DH5* was very high.

Key words : *T. gondii*, SAG1, pGEX-2T, *E.coli Dh5*

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit kosmopolit baik pada hewan maupun manusia yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii*. Parasit ini termasuk phylum Apicomplexa dan bersifat obligat intraseluler (Dubey, 1986; Sharma, 1990). Infeksi *T. gondii* biasanya tidak berbahaya/asintomatik, tetapi dampak yang berat dapat terjadi pada janin dan individu immunodefisiensi. Dalam dekade terakhir ini toksoplasmosis banyak mendapat perhatian berkaitan dengan ensefalitis toksoplasma yang seringkali menjadi penyebab kematian pada penderita AIDS (Sharma, 1990; Israelski and Remington, 1993; Hoyaranda, 1996).

Isolasi dan karakterisasi protein permukaan *T. gondii* isolat lokal untuk produksi antigen rekombinan sangat penting untuk berbagai macam studi terutama untuk pengembangan metode diagnosa molekuler, bahkan sebagai kandidat vaksin. Antigen permukaan SAG1 (P30) merupakan protein membran takizoit yang diduga berperan dalam proses perlekatan dengan sel inang yang diinfeksi (Mineo and Kasper, 1994). Antigen SAG1 merupakan protein yang *interes*an sebagai dasar deteksi imunologis karena: 1. SAG1 merupakan protein/antigen permukaan *T. gondii* yang paling dominan dan memegang peranan penting dalam proses adesi pada sel inang /infeksi. Serum binatang/manusia yang terinfeksi *T. gondii* mengandung antibodi terhadap SAG1. 2. SAG1 memiliki potensial sebagai vaksin. 3. Sequence gen SAG1 sudah ditentukan sehingga dapat dibuat primer untuk amplifikasi *invitro*. 4. Gen SAG1 tidak mengandung intron sehingga amplifikasi dapat dilaksanakan dengan menggunakan DNA genomik sebagai matriks dalam reaksi PCR. Protein SAG1 rekombinan sangat cocok untuk pengembangan diagnosa sebagai deteksi antibodi IgG dan IgM karena SAG1 dikenal oleh IgG dan IgM pada manusia yang menderita toksoplasmosis (Burg *et al.*, 1988; Couvreur *et al.*, 1988; Harning *et al.*, 1996; Tomavo, 1996).

Tujuan penelitian ini adalah membuat konstruksi kloning gen penyandi protein membran takizoit (SAG1) ke dalam vektor ekspresi prokariot [k pGEX-2T kemudian ditransfeksi ke bakteri *E. coli*, sebagai dasar untuk produksi protein rekombinan SAG1.

MATERI DAN METODE

Bahan bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah: Ampicillin (Sigma), Pure taq RTG-PCR Beads, plasmid pGEX-2T (Amersham pharmacia), Ethidium bromid (Sigma), Luria Bertani/LB (Oxoid), enzim restriksi *BamHI* dan *EcoRI*, Bakteri *E. coli* DH5 (Promega), Agarose, Marker DNA (Eurogentec).

1. Konstruksi gen SAG1 mature pada vektor

ekspresi prokariot pGEX-2T

a. Preparasi vektor

Plasmid pGEX-2T dipreparasi dari bakteri rekombinan yang mengandung pGEX-55k (Sri Widada, konstruksi dari Montpellier). Pemotongan ganda dengan *BamHI* dan *EcoRI* dilaksanakan secara bertahap yaitu: dengan *bamHI* atau *EcoRI* (40 l buffer, 15 unit enzim, 37°C, inkubasi 1 jam 30 menit), kemudian dengan *EcoRI* atau *BamHI* (ditambahkan 40 l buffer dengan 15 unit enzim dan inkubasi tambahan selama 1 jam 30 menit pada suhu 37°C. Hasil pemotongan kemudian dipurifikasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1% dan dielusi.

b. Ligasi

Ligasi dilaksanakan dengan menggunakan enzim DNA ligase, pada suhu 16°C, semalam. Digunakan 50 ng vektor yang sudah terpotong dan sekitar 50 ng fragmen DNA SAG1 yang diisolasi dari pCR-SAG/lnat. hasil penelitian sebelumnya (Sri Hartati *dkk.*, 2003). Hasil ligasi tersebut digunakan untuk transformasi atau disimpan pada 20°C sebelum digunakan.

2. Pembuatan Sel Kompeten *E. coli* DH5 dan transfeksi

E. coli DH5 kompeten dibuat sesuai dengan metode TSS (Chung *et al.*, 1989). Koloni tunggal *E. coli* dikultur semalam dalam 5 ml medium LB cair pada inkubator goyang dengan suhu 37°C., selanjutnya 500 l kultur tersebut ditanam ke dalam 25 ml medium LB yang baru dan diinkubasi pada inkubator goyang pada suhu 37°C lebih kurang 2 jam atau OD 600 mencapai 0,6. Setelah itu kultur dipindahkan ke tabung *centrifuge polypropylene* steril berukuran 50 ml, selanjutnya disentrifugasi pada 3500 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet yang diperoleh dari setiap 10 ml kultur diresuspensikan dengan 0,5 ml media LB dingin. Setelah dilarutkan dengan baik, ditambah 0,5ml TSS 2x (20% PEG 6000 (w/v), 10% DMSO (v/v), 70 mM MgCl₂). Kemudian bakteri kompeten dimasukkan kedalam ependorf steril masing-masing 0,2 ml dan ini siap digunakan atau disimpan pada suhu 70° C. Transfeksi menggunakan hasil ligasi (25 ng), ditambahkan ke dalam 0,2 ml sel kompeten dingin. Inkubasi dalam es selama 30 menit, kemudian *treatment shock thermic* pada suhu 42°C selama 90 detik dan segera inkubasi dalam es lagi 2 menit. Selanjutnya ditambah 0,5 ml TSS 1x dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sebanyak 100 l, dan 50 l campuran tersebut dikultur pada medium plat agar LB yang

mengandung ampisilin 100 g/ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (*overnight*).

3. Isolasi DNA plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menanam 1 koloni bakteri transforman berwarna putih ke dalam 15 ml media LB cair yang mengandung 100 g/ml ampisilin dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi semalam pada shaker inkubator suhu 37°C. Kultur bakteri disentrifus 5000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Pelet diresuspensi dengan 300 l solusio P1 (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA) ditambahkan kedalamnya 300 l solusio P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), campur (5 6 kali) kemudian biarkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambah solusio P3 (2,55 M potasium acetate, pH 4,8) dan dicampur (4 5 kali), lalu disentrifus 13.000 rpm 10 15 menit. Kemudian supernatan diambil (0,8 ml) dan ditambah 0,7 ml isopropanol, disentrifus lagi dengan kecepatan 13.000 rpm, 15 20 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan ethanol 75%, lalu disentrifus 5 menit 13.000 rpm. Pelet dikeringkan sebentar dan dilarutkan dalam 50 l 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (berisi 0,5 g Rnase A), diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 60 menit. Hasil positif konstruksi gen SAG1 mature dalam plasmid pGEX-2T akan dinamakan pGEX-SAG/mat. Solusi plasmid (2,5 5 l) didigesti ganda dengan *BamHI-EcoRI* (10 unit untuk masing-masing enzim) dalam 40 l buffer 1x, inkubasi pada 37°C selama 1 jam 30 menit kemudian hasil pemotongan dianalisa dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8% yang mengandung 0,5 g/ml ethidium bromid.

4. Analisa klon

Analisa untuk menentukan klon positif dilaksanakan dengan digesti ganda *BamHI-EcoRI*, kemudian dianalisa dengan elektroforesis pada agarose 1%. Klon positif akan menghasilkan 2 fragmen : 4900 bp (vektor) dan sekitar 800 bp (gen SAG1 mature).

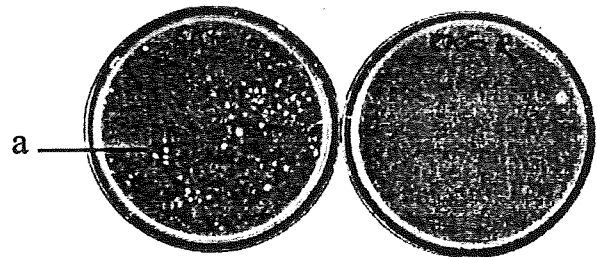
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi gen SAG1 *T. gondii* isolat lokal dengan PCR pada penelitian sebelumnya menunjukkan fragmen gen SAG1 mature = 800 bp dan gen SAG1 precursor = 1050 bp. Hasil transformasi dengan menggunakan vektor pCR 2.1 TOPO dilakukan pada sel kompeten *E.coli* DH5 dan analisis dengan enzim restriksi *BamHI / EcoRI* diperoleh 2 fragmen DNA dengan ukuran 3900 bp (vektor pCR 2.1 TOPO) dan 800 bp (gen SAG1 mature) (Sri Hartati dkk, 2003)

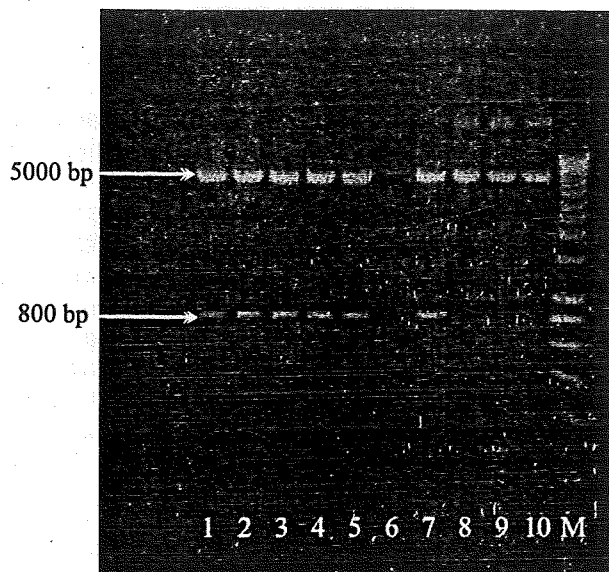
Vektor pGEX-2T memiliki 3 site kloning yaitu : *BamHI*, *Sma I*, dan *EcoRI*, untuk memungkinkan insersi gen dalam *reading frame* gen GST. Gen SAG1 mature yang *BamHI* dan *EcoRI*. Karena site *BamHI* berada dalam *coding sequence* untuk peptida signal dan *coding sequence* SAG1 tidak berisi site untuk *EcoRI*, maka *coding sequence* untuk protein mature dapat dimasukkan ke dalam site *BamHI-EcoRI* plasmid pGEX 2T. Keunggulan pemasukan gen ke dalam dua site berbeda ialah kemungkinan mengorientasi insersi. Dengan cara ini insersi dapat dilaksanakan dalam orientasi Sens sehingga klon positif akan mensintesis protein SAG1. Primer diperhitungkan sedemikian rupa sehingga gen yang diinsersikan berada dalam *reading frame* dengan gen GST. Primer 5' berisi codon ATG pertama (konstruksi protein prekursor) atau codon permulaan protein mature TCC (konstruksi protein mature) sedangkan primer 3' terletak sekitar 20 nukletida sesudah codon stop.

Kloning pada vektor ekspresi (pGEX-2T) dan transfeksi dalam *E.coli* DH5 dapat dilihat pada gambar 1. Hasil transfeksi menunjukkan > 1500 koloni resisten terhadap ampisiline dan koloni tersebut diperkirakan membawa insert (Sambrook *et al.*, 1987). Analisa dengan enzim restriksi *BamHI* dan *EcoRI* dari 6 koloni menunjukkan semuanya positif (gambar 2.). Hal ini menunjukkan bahwa efisiensi kloning sangat baik (100%). Kloning pada pGEX-2T dilaksanakan dalam site *BamHI* dan *EcoRI*. Penggunaan site berbeda memungkinkan insersi pada vektor dalam orientasi sens dengan efisiensi sangat tinggi dan digesti kedua enzim tersebut (*BamHI* dan *EcoRI*) akan menghasilkan 2 fragmen (gambar 2.), yaitu : 4900 bp (vektor) dan 800 bp (insert gen SAG1 mature). Konsepsi primer dan konstruksi dalam pGEX 2T sangat efisien, sehingga semua klon positif dalam pGEX 2T ada dalam orientasi sens (Widada, 2002).

Dari data-data yang sudah dipublikasi ternyata antigen SAG 1 merupakan protein permukaan yang paling dominan dan mempunyai potensi imunodeteksi serta merupakan antigen yang paling imunogenik (Harning *et al.*, 1996). Dengan metode kloning ini DNA target yang diperoleh lebih spesifik.



Gambar 1. Transfeksi gen SAG1 dari vector ekspresi pada *E.coli* Dh5
a : koloni resisten ampisilin



Gambar 2. Elektroforesis DNA rekombinan yang diklon pada pGEX-2T, dipotong dengan *Bam*HI dan *Eco*RI. 1,2,3,4,5,7 : Vektor dengan insert; 8,9,10 : vektor tanpa insert

Gen SAG1/mat *T. gondii* isolat lokal telah berhasil diklon pada vektor ekspresi prokariotik pGEX 2T dengan sangat efisien (100% positif). Hasil kloning dengan efisiensi yang tinggi ini dicapai karena konstruksi yang benar dan pemotongan yang cermat, sehingga gen akan diekspresikan sebagai mRNA sens dan protein rekombinan yang benar akan diekspresikan.

KESIMPULAN

Gen SAG1 rekombinan *T. gondii* isolat lokal telah berhasil diekspresikan pada *E. coli* dengan vektor ekspresi prokariotik pGEX 2T dengan sangat efisien.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Pimpinan Proyek Riset Unggulan Terpadu (RUT), KMNRT, Republik Indonesia yang telah memberikan dana melalui Proyek RUT VIII, No. 097,18/SK/RUT/2002.

DAFTAR PUSTAKA

Burg, J.L., D. Perelman, L.H. Kasper, P.L. Ware and J.C. Boothroyd., 1988. Molecular analysis of the gen encoding the major surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141 : 3584-3591.

Chung, C.T., Niembla, S.L. and Miller, R.H., 1989. One- step preparation of component *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the some solution. *Proc. Nall. Acad. Sci. USA* 86,2172 2175.

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., and Dubremetz, J.F., 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 97: 1-10.

Dubey, J. P., 1986. Toxoplasmosis. *JAVMA*. 182 (2): 166-169.

Harning, D, Spenter, J, Metsis, A, Vuust, J & Petersen, E., 1996. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin (IgM) and IgG antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3:355-357.

Hoyaranda, E., 1996. Toxoplasmosis. Prodia Diagnostic Educational Service. 4 ISSN 0845-7173.

Israelski, D. M., and Remington, J. S., 1993. Toxoplasmosis in the non AIDS immunocompromized host. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*, 13: 322-356.

Mineo, J.R., and Kasper, L.H., 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.*, 79: 11-20.

Sambrook, J., E. F. Frisch and Maniatis., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2 nd edition Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.

Sharma, S.D., 1990. Immunology of toxoplasmosis, in D. J. Wyler (ed.), Modern parasite biologymcelluler, immunological and molecular aspects. W. H. Freeman and Co., New York, N. Y. p. 184-199.

Sri Hartati, S. Widada, Sumartono and Asmarani Kusumawati., 2003. Cloning of the Gene Encoding SAG1 of Local Isolate *T. gondii* in *Escherichia coli* DH5. *Journal of Vet. Science*. XXI(2): 51-56.

Tomavo, S., 1996. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 219: 45-54.