

TELAAH PENGKLONAN GEN PROTEASE DARI *Bacillus stearothermophilus* KE DALAM *Escherichia coli*

Study of Molecular Cloning for Protease Gene(s) of Bacillus stearothermophilus in Escherichia coli

Krishna Purnawan Candra

Laboratory of Chemistry and Biochemistry, Study Program of Agricultural Product Technology, Faculty of Agriculture, Mulawarman University, Jalan Tanah Grogot Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75123

Received 2 April 2005 Accepted 15 June 2005

ABSTRACT

Genomic fragments of *Bacillus stearothermophilus*, partially digested with EcoRI or HindIII, were cloned in *Escherichia coli* by shotgun cloning techniques employing pRK415 as vector for protease gene(s). A little bit modification of MacConkey agar was used in detection of the clone(s). Removing crystal violet, bile salt and salt give the best result for detection of the clone(s). Competent cells for cloning were prepared by miniprep method, modified from Lederberg and Cohen. Using Birnboim and Doly method, a high yield of plasmids could be achieved from 2-3 times 1.5 mL culture while the volume of solution used was doubled. Some colonies gave halo on the media containing 2 % of skim milk, but the expression of protease gene(s) was not stable. Deletion is one of the possibilities causing the unstable expression of the gene(s).

Key words: Molecular Cloning, protease, Bacillus stearothermophilus

PENDAHULUAN

Permintaan enzim protease mencapai 60 % dari pangsa pasar industri enzim. Aplikasi protease netral adalah pada industri kue, bir dan pengolahan pangan; Sedangkan aplikasi protease alkalin adalah pada industri deterjen (Steel dan Walker, 1991). *Bacillus stearothermophilus* dikenal sebagai sumber protease netral dan alkali termostabil yang potensial. Enzim termostabil ini mempunyai aktivitas dengan ketahanan yang baik bila bekerja pada suhu yang relatif tinggi, begitu juga terhadap kondisi stress seperti zat-zat kimia lain dan pH lingkungannya sehingga sangat menguntungkan bila digunakan dalam suatu proses industri yang kebanyakan melibatkan panas dan zat-zat kimia lain. Disamping itu jenis protease ini lebih murah produksinya.

Sumber enzim dapat ditingkatkan produksi dan aktivitasnya melalui peningkatan jumlah gennya dengan teknologi DNA rekombinan. Beberapa gen enzim ekstraseluler dari *Bacillus* telah berhasil diklon dan terekspresi dalam *E.coli*, antara lain gen penisilinase dari *B. licheneformis*

(Imanaka *et al.*, 1981), gen amilase dari *B. coagulans* (Cornellis *et al.*, 1982), gen selulase alkali dari *Bacillus* sp. alkalophilik (Sashihara *et al.*, 1984) dan xylanase alkali dari *Bacillus* sp. alkalophilik (Honda *et al.*, 1985; dan Honda *et al.*, 1986). Enzim-enzim ekstraseluler dari *Bacillus* sp. dapat dideteksi produksinya dalam *E.coli* pada tiga tempat yaitu ekstraseluler, periplasmik dan intraseluler.

Hal ini memberi gambaran bahwa suatu enzim ekstraseluler dari *Bacillus* dapat diproduksi oleh *E. coli* tanpa mengganggu viabilitasnya. Untuk gen protease baru gen endopeptidase dari *B.subtilis* yang berhasil diklon dan terekspresi dalam *E. coli* (Koide *et al.*, 1986), sedangkan α -amilase dari *B. stearothermophilus* yang berhasil diklon dalam *E. coli* tetapi tidak dapat disekresikan (Bergquist, 1986).

Distribusi enzim oleh suatu mikroorganisme ditentukan oleh galur dan flanking DNA gennya (Kudo *et al.*, 1983; Sashihara, 1984), sehingga masih dapat diharapkan bahwa protease *Bacillus* yang terekspresi dalam *E. coli* dapat disekresikan. Ketika makalah ini sedang disiapkan, Peek *et*

al. (1993) melaporkan bahwa gen proteinase dari *Bacillus* sp. termofil berhasil diklon dalam *E. coli*, terekspresi dan disekresikan dalam bentuk proproteinase inaktif.

Pengklonan gen dengan menggunakan *E. coli* sebagai inang, merupakan metode yang telah mumpuni (*established*), disamping itu *E. coli* dapat tumbuh sangat cepat dan telah diketahui bahwa aparatus genetik *E. coli* banyak mengenal genus lain (Barros dan Thomson, 1987; Lucas *et al.*, 1987; Odera *et al.*, 1986) sehingga menarik untuk melakukan pengklonan gen protease dari *B. stearothermophilus* ke dalam *E. coli* dan melihat ekspresinya. Gen protease netral dari *B. stearothermophilus* telah berhasil diklon ke dalam *B. subtilis* dan *B. Stearothermophilus* dan telah berhasil diidentifikasi sekuennya. Untuk *B. stearothermophilus* CU21 gen protease netralnya terletak pada 2,6 Mdal fragmen *MluI*-EcoRI dalam fragmen 4,5 Mdal fragmen *HindIII*-EcoRI (Fujii *et al.*, 1983; Takagi *et al.*, 1985; Imanaka *et al.*, 1986; dan Kubo *et al.*, 1988). Makalah ini menyajikan telaah pengklonan gen protease dari *B. stearothermophilus* ke dalam *E. coli*, dengan tujuan mendapatkan strategi yang baik untuk transfer gen tersebut ke dalam *E. coli* dan kondisi optimum untuk setiap tahap yang dilakukan, sebagai suatu bagian awal dari usaha peningkatan produksi protease melalui aplikasi teknologi DNA rekombinan.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Galur Bakteri dan Plasmid

B. stearothermophilus DSM297 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Jurusan TPG, IPB. *E. coli* DH5 α phe Cm^r, plasmid pUC19 dan pRK415 diperoleh Laboratorium Teknologi Mikroba dan Biokimia PAU Bioteknologi IPB.

Media

L-Broth terdiri dari 10 g trypton, 5 g ekstrak khamir dan 5 g NaCl dalam 1 L air bebas ion, pH diatur 7,3, dan dipadatkan dengan 15 g agar per liter untuk L-agar. Untuk seleksi transforman L-agar ditambah 5 mL 0,1 M IPTG dan 5 mL 2 % Xgal atau Bluogal untuk seleksi biru-putih dan 2 % susu skim untuk deteksi ekspresi gen protease, media ini disebut SMMLA (*Skim*

Milk Modified Luria Agar). Media seleksi transforman yang lain adalah media untuk seleksi merah-putih, modifikasi dari Jennings dan Beacham (1989), 10 g trypton, 5 g ekstrak khamir, 10 g laktose, 0,075 g *neutral red*, pH diatur 7,4, dan untuk deteksi ekspresi gen protease ditambahkan 2 % susu skim, media ini disebut SMMCA (*Skim Milk Modified MacConkey Agar*). Antibiotik yang sesuai ditambahkan dengan konsentrasi, 100 μ g/mL ampisilin, 12,5 μ g/mL tetrasiklin dan 10 μ g/mL kloramphenikol.

Preparasi plasmid dan DNA kromosom

Preparasi plasmid DNA dilakukan secara *miniprep* dengan metode lisis alkalin (Birboim dan Doly, 1979) dan preparasi DNA kromosom dilakukan sesuai metode yang disarankan oleh Marmur (1961).

Konstruksi plasmid rekombinan

DNA dipotong dengan *HindIII* atau *EcoRI* (Gibco BRL.) pada 37 °C selama 2 jam untuk DNA plasmid dan 4-14 jam untuk DNA kromosom. Setelah pemotongan DNA plasmid dan DNA kromosom oleh endonuklease restriksi, 1 μ g plasmid dan 3 μ g kromosom dicampur dan diligasikan dengan enzim T4 DNA ligase (Gibco BRL.) selama semalam pada suhu 16 °C. Campuran ligasi ini kemudian ditransformasikan ke dalam sel inang (Lederberg dan Cohen, 1974)

Gel elektroforesis

Elektroforesis dilakukan pada 0,8 % dan 1,2 % gel agarose *slab*. DNA dideteksi dengan UV transiluminator dan berat molekulnya dengan standar λ -EcoRI atau 1 kb *ladder* (Clark dan Lawrence, 1986).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA kromosom *B. stearothermophilus* DSM297 menggunakan metode Marmur (1961) mendapatkan DNA dengan kualitas yang cukup baik, dan dapat dipakai untuk keperluan kloning, walaupun tidak dilakukan pemurnian lanjutan seperti penghilangan RNA dan pemekatan. Dari 500 mL kultur fase log diperoleh lebih kurang 2 mg DNA kromosom.

Isolasi DNA plasmid dari *E. coli* menggunakan metode Birboim dan Doly (1979) relatif mudah dilakukan dan dapat

menghasilkan lebih kurang 50 µg DNA plasmid untuk pUC19 dan 10 µg untuk pRK415 dari 1,5 mL kultur 18 jam (semalam). Untuk mendapatkan DNA plasmid yang relatif lebih banyak, metode ini dapat sedikit dikembangkan dengan mensentrifusi 3-4,5 mL (2-3 x 1,5 mL) kultur 18 jam, hal ini akan mendapatkan hasil yang baik bila dilakukan penggandaan untuk setiap larutan yang digunakan.

Pembuatan sel kompeten segar dilakukan secara mikro sesuai metode Lederberg dan Cohen (1974) dengan sedikit modifikasi, dilakukan dengan cara mensentrifusi 1,5 mL kultur fase log dalam tabung mikro, pelet sel dicuci dengan 1 mL 0,1 M CaCl₂ dingin, kemudian sel disuspensikan dalam 0,5 mL 0,1 M CaCl₂ dingin dan diinkubasikan pada 0 °C selama 20 menit, sentrifusi terakhir dilakukan dan pelet sel disuspensikan dalam 0,2 mL 0,1 M CaCl₂ dingin, pada kondisi ini sel siap digunakan untuk transformasi. Prosedur ini relatif mudah dan cepat dilakukan.

SMMCA terlihat sebagai media seleksi yang cukup baik untuk sistem *lac*⁺. Warna putih biasanya agak *pink*. SMMCA merupakan media yang baik untuk seleksi (memberikan warna merah dan putih yang lebih kontras) dengan tidak digunakannya crystal violet, garam empedu dan garam. Tidak ditamhkannya garam memberikan warna yang lebih tajam, koloni merah kontras dengan koloni putih (Difco Manual, 1984).

Dari 35 kali transformasi yang dilakukan, diperoleh koloni putih yang memberikan memberikan halo pada 3 kali transformasi, tetapi setelah dilakukan subkultur ekspresi gen proteasenya hilang (tidak nampak), hal ini ditunjukkan dengan kenyataan bahwa transforman (*E. coli lac*) tersebut tetap dapat tumbuh pada medium seleksi (medium plus antibiotik yang sesuai) tetapi tidak memberikan halo. Pada suatu kejadian koloni putih tetap putih walaupun tidak lagi menampakkan halo setelah disubkultur, sedangkan pada kejadian lain koloni putih berubah menjadi merah dan tidak menampakkan halo.

Dari kenyataan tersebut untuk sementara diketahui bahwa pengklonan gen protease dengan teknik *shotgun cloning* dari

B. stearothermophilus ke dalam *E. coli* berhasil dilakukan, tetapi gen protease tersebut tidak stabil dalam inangnya, *E. coli*, atau dapat dikatakan kloning gen protease *B. stearothermophilus* ke dalam *E. coli* tidak sukses dilakukan.

Untuk kloning gen(-gen) dari bakteri termofil ke dalam bakteri mesofil (*E. coli*) yang tidak sukses, Bergquist (1986) memberikan tiga kemungkinan yang menyebabkan hal tersebut dapat terjadi: (1) tidak terdapat sekuen seperti promotor pada DNA termofil (yang dikenali oleh inang mesofil) tersebut; (2) protein (enzim) yang disintesis menyebabkan letal pada inang mesofil karena tidak dapat diekspor (sekresikan); (3) enzim yang disintesis inaktif pada suhu pertumbuhan inang mesofil.

Untuk menganalisa kemungkinan pertama (tidak adanya promotor yang cocok), dapat didekati dari laporan-laporan ilmiah yang telah ada. Diketahui bahwa beberapa enzim ekstraseluler dari *Bacillus* sp. mesofil telah berhasil dikloning dan terekspresi dalam *E. coli*, termasuk gen endopeptidase dari *B. subtilis*, sedangkan α -amilase dari *B. stearothermophilus* berhasil diklon dan terekspresi menggunakan plasmid pBR322 dalam *E. coli*, tetapi tidak dapat disekresikan (Bergquist, 1986). Adanya laporan ini menunjukkan adanya kemungkinan gen protease dari *B. stearothermophilus* dapat diklon dan terkespresi dalam *E. coli*. Untuk ekstraseluler protease, Peek *et al.* (1993) melaporkan bahwa gen ekstraseluler protease dari *Bacillus* sp. termofil berhasil diklon dan terekspresi dalam *E. coli* dan disekresikan sebagai proproteinase inaktif yang akan berubah menjadi proteinase aktif bila dipanaskan. Kenyataan ini menunjukkan bahwa tingkat pengenalan promotor untuk gen protease antara *Bacillus* sp. termofil dan *E. coli* cukup baik, sehingga kemungkinan kegagalan kloning karena masalah tidak adanya promotor yang cocok dapat diabaikan.

Untuk menganalisa kemungkinan kedua (ekspresi gen dapat menyebabkan letal pada bakteri inang), dapat didekati dari fisiologi sel inang tersebut. Bakteri gram negatif dapat menjadi letal bila membawa gen enzim ekstraseluler dari bakteri gram positif dapat disebabkan oleh: (1) Prosekuensi

enzim tidak dikenali oleh inang gram negatif sehingga enzim akan menumpuk dalam periplasmik dan intraseluler yang dapat menyebabkan terganggunya viabilitas sel inang. Untuk kasus ini Bergquist (1986) melaporkan kloning dan ekspresi α -amilase dari *B. stearothermophilus* dalam *E. coli* yang tidak dapat disekresikan. Sebaliknya, Peek *et al* (1993) menemukan sesuatu yang unik, yaitu prosekuen dari proteinase *Bacillus* sp. termofil ternyata dikenali oleh *E. coli* dan dapat membimbing proproteinase tersebut keluar sel, sehingga kemungkinan letalnya sel inang (*E. coli*) karena menumpuknya proproteinase pada periplasmik dan intraseluler tidak terjadi; (2) Supernatan dari beberapa *Bacillus* sp. dapat menyebabkan lisisnya sel *E. coli* bila diinkubasi pada 45 °C. Lebih lanjut dikatakan bahwa ekstrak-selular protease dari *Bacillus* sp. tersebut mempunyai peran yang sangat besar pada kejadian lisis sel *E. coli* (Dean dan Ward, 1991). Gen endopeptidase dari *B. subtilis* yang berada pada plasmid pNE1 juga menyebabkan sel *E. coli* yang membawanya mengalami lisis setelah inkubasi lebih dari 4 hari (Koide *et al.*, 1986).

Dari beberapa laporan di atas, sukar sekali untuk menentukan bahwa *E. coli* yang membawa gen protease dari *B. Stearothermophilus* dapat letal, karena pada dasarnya prosekuen setiap enzim ditentukan oleh sumber enzim dan jenisnya, sehingga pada kasus distribusi enzim ekstraseluler dari gram positif oleh gram negatif dapat menyebabkan masalah, atau sebaliknya tidak menimbulkan masalah terhadap fisiologis sel inang tersebut. Disamping itu, lisis inang terjadi setelah beberapa hari inkubasi, sehingga dapat dikatakan bahwa kemungkinan letalnya *E. coli* yang membawa gen protease *B. stearothermophilus* sangat kecil sekali.

Untuk memaelaiari kemungkinan ketiga (enzim inaktif pada suhu mesofil), dilakukan 2 macam pendekatan yaitu pendekatan aktifnya protease dari *B. stearothermophilus* dan pendekatan aktifnya protease yang diekspresikan oleh *E. coli* yang membawa gen protease *B. Stearothermophilus*.

Untuk pendekatan pertama, telah dicoba menginkubasikan *B. stearothermo-*

philus pada suhu 37 °C dan melihat ekspresi gen proteasnya. Diketahui bahwa *B. Stearothermophilus* dapat tumbuh pada kisaran suhu 45-65 °C (Bergquist, 1986) dan tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37 °C. Untuk hal ini dimanipulasi dengan cara menumbuhkannya pada suhu 55 °C selama satu hari (24 jam, sudah membentuk koloni) kemudian memindahkannya pada suhu 37 °C, pada keadaan ini ekspresi proteasnya dapat terlihat walaupun "lambat". Kenyataan di atas menunjukkan bahwa kemungkinan inaktifnya protease *B. stearothermophilus* (hasil ekspresi dari *B. stearothermophilus*) pada suhu mesofil tidak berlaku, artinya protease termostabil dari *B. stearothermophilus* tetap dapat aktif pada suhu mesofil, sehingga kemungkinan gagalnya kloning disebabkan inaktifnya enzim protease termostabil (yang diproduksi oleh bakteri gram positif) pada lingkungan mesofil dapat disisihkan.

Untuk pendekatan kedua, harus dilihat perbedaan perangkat genetik yang terlibat dalam ekspresi gen enzim ekstraseluler dari bakteri gram positif (*B. stearothermophilus*) dan perangkat genetik yang terlibat dalam ekspresi gen pada bakteri gram negatif (*E. coli*) Enzim ekstraseluler biasanya mempunyai prosekuen yang fungsinya membimbing enzim tersebut keluar sel, prosekuen ini juga bertindak sebagai cetakan konformasi aktif dari enzim tersebut yang nantinya dipotong oleh enzim spesifik melalui mekanisme autokatalitik. Peek *et al.* (1993) melaporkan bahwa *E. coli* yang membawa gen proteinase termostabil dari *Bacillus* sp. termofil dapat mengekspresikan dan mensekresikan enzim tersebut pada 37 °C sebagai proproteinase inaktif dan akan menjadi proteinase aktif bila dipanaskan pada suhu 60 °C atau lebih yang secara autokatalitik dapat memotong proproteinase tersebut menjadi prosekuen dan proteinase aktif. Kemungkinan aktifnya proproteinase *Bacillus* sp. yang diekspresikan oleh *E. coli* pada suhu tinggi ini telah diuji secara kualitatif dengan menginkubasikan subkultur koloni putih yang menampakkan halo (tipis) pada suhu 55 °C, setelah diekspos dengan uap khloroform selama lebih kurang 45 menit terlebih dahulu. Uap khloroform dapat dipakai untuk membantu deteksi (seleksi)

ekspresi protease dari *E. coli*, karena uap khloroform dapat melisis sel pada cawan petri sehingga dapat dilihat ekspresi gen protease dalam *E. coli* yang terdistribusi secara intraselluler atau pada periplasmik (Tang *et al.*, 1987). Hasilnya adalah, terlihat halo yang lebih jelas setelah inkubasi 1 hari (Gambar 1). Adanya kenyataan ini membuat sulit mendapatkan transforman (*E. coli* yang membawa gen protease *Bacillus* sp.) dengan teknik *shotgun cloning* karena ekspresi enzim aktifnya terjadi pada suhu yang berlainan dengan suhu pertumbuhan inang.

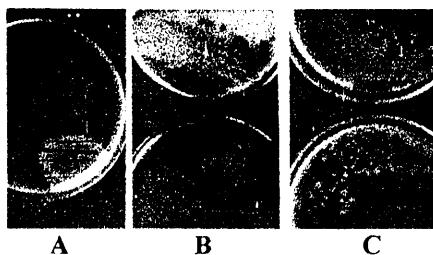


Figure 1. Qualitative assay of protease gene(s) expression of *B. stearothermophilus* and the stability of the gene(s) carried by recombinant plasmids in *E. coli*. A, incubation at 37 °C; B, incubation at 55 °C; C, white colonies changed into white colonies after 4 days incubation.

Alternatif yang paling memungkinkan adalah melakukan kloning seperti yang telah dilakukan oleh Peek *et al.* (1993), yaitu dengan membuat *copy* sebagian gen protease serin (478 bp) dan memperbanyak/mengamplifikasinya dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang kemudian digunakan sebagai pelacak (*probe*) gen protease dari fragmen DNA kromosom *Bacillus* sp. termofil (DNA donor). Pelacakan gen protease tersebut dilakukan dengan teknik *Southern Blot*, kemudian fragmen yang mengandung sekuen homolog dengan pelacak diklonkan ke dalam *E. coli*. Setelah berhasil melakukan kloning fragmen tersebut kemudian dicari teknik/metode untuk mengetahui bahwa gen protease yang berhasil diklon tersebut dapat diekspresikan oleh inang (*E. coli*) dalam bentuk konformasi aktif. Alternatif lain adalah menggunakan *replica plating* bila tetap menggunakan *shotgun cloning*. Koloni putih (koloni yang

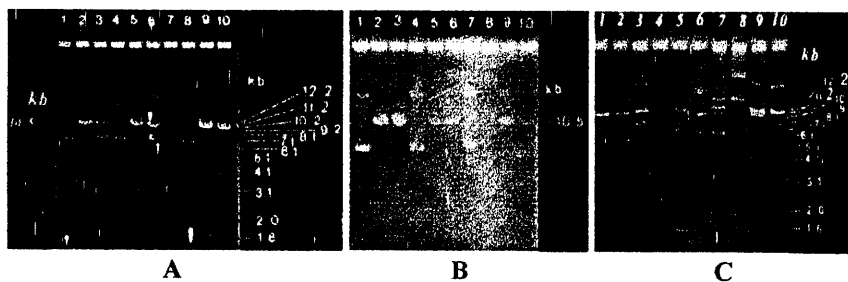
membawa plasmid rekombinan) dipindahkan secara *replica plating* untuk kemudian menginkubasikan kedua macam cawan petri tersebut pada suhu 37 °C, setelah koloni-koloni tersebut tumbuh maka salah satu dari dua macam cawan petri tersebut diinkubasikan pada suhu 55-65 °C.

Kemungkinan lain yang dapat menyebabkan inaktifnya suatu enzim adalah adanya perubahan atau pengaturan tertentu sekuen nukleotida pada gennya, disebabkan kondisi inang yang berlainan. Koide *et al.* (1986) menemukan pada transforman *E. coli* yang mengekspresikan endopeptidase dari *B. subtilis* (membawa plasmid pNE1 yang mengandung gen endopeptidase dari *B. subtilis*) bahwa pada subkultur transforman tersebut ditemukan koloni-koloni yang tidak memproduksi protease walaupun plasmid rekombinasi yang diperoleh mempunyai pola restriksi (pemotongan) yang sama dengan pNE1. Hal ini diduga karena adanya perubahan atau pengaturan kembali (*rearrangement*) sekuen nukleotida pada gen endopeptidasenya.

Kejadian di atas mirip dengan gejala seperti telah diterangkan sebelumnya bahwa koloni yang semula menampakkan halo, setelah disubkultur menjadi tidak menampakkan halo. Ditemui bahwa koloni putih yang semula menampakkan halo ternyata membawa plasmid non-rekombinan atau sama dengan pRK415 (tidak mengandung sisipan DNA donor), hal ini mungkin disebabkan oleh hilangnya sisipan DNA asing karena tidak stabil pada plasmid tersebut dalam *E. coli*. Untuk kejadian ini telah dibandingkan analisis elektroforesis plasmid dengan hasil sebar pada cawan petri. Untuk plasmid-plasmid yang "tidak stabil" ternyata koloni inangnya memberikan koloni campuran (merah dan putih) setelah diinkubasi selama 4 hari dan jumlah koloni merah akan bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi, padahal sebelumnya hanya merupakan satu jenis koloni yaitu koloni putih (1-3 hari). Koloni merah berasal dari koloni putih. Setelah koloni campuran tersebut di subkultur, maka didapatkan bahwa koloni putih tetap putih dan koloni merah tetap merah dengan warna yang sangat kontras setelah satu hari inkubasi. Hal ini membuktikan bahwa pada

waktu isolasi plasmid dari koloni awal transforman terdapat satu jenis koloni (putih), tetapi karena plasmid yang dibawanya tidak stabil maka kultur tersebut kembali menjadi koloni merah dan jenis koloni inilah yang merupakan kultur siap panen untuk isolasi plasmid, sehingga diperoleh plasmid yang sangat mirip dengan ukuran pRK415. Analisis plasmid dari koloni putih yang tidak stabil dan koloni merah (yang berasal dari koloni putih) dapat dilihat pada Gambar 2. Kejadian ini menggambarkan bahwa fragmen DNA yang mengandung gen protease dari *B. stearothermophilus* tidak stabil dalam *E. coli*, dan kejadian yang paling memungkinkan adalah terjadinya delesi dari gen tersebut karena ukuran plasmid dan pola pemotongan dengan endonuklease restriksinya sama dengan pRK415, sedangkan pengaturan kembali (*rearrangement*) pada sekuen gen protease pada fragmen dalam *E. coli* kecil kemungkinannya.

Untuk memecahkan masalah tersebut di atas maka dapat ditempuh beberapa cara seperti (i) dipakai inang yang secara fisiologis hampir sama, seperti menghasilkan ekstraseluler enzim (gram positif) dalam hal ini *B. subtilis* (Fujii *et al.*, 1983), (ii) melakukan pengklonan pustaka gen (*genes library*) *B. stearothermophilus* ke dalam *E. coli* (Koide *et al.*, 1986), (iii) membuat *copy* gen (sebagian gen) protease dari *Bacillus* sp. dan melipatgandakannya (amplifikasi) dengan teknik PCR untuk digunakan sebagai pelacak (*probe*) gen protease dari fragmen kromosom *B. stearothermophilus* (donor DNA) kemudian mengklonkan fragmen yang mengandung sekuen homolog ke dalam *E. coli* (Peek *et al.*, 1993), (iv) melakukan *replica plating* untuk mendeteksi ekspresi gen protease termostabil dengan cara menginkubasikan salah satu replika yang telah ditumbuhkan koloni pada suhu yang relatif tinggi (55-65 °C).



Picture 2. Analysis of plasmids carried by unstable white colonies and some recombinant plasmids of pRK415 inserted DNA fragment at EcoRI site. **A**, subculture of white colonies showing a thin halo; **B**, red colonies from unstable white colonies; **C**, column 1, pMTS1-EcoRI, column 2, pMT1-HindIII, column 3, pMTS2-EcoRI, column 4, pMTS2-HindIII, column 6, 1 kb ladder, column 6 pRK415-EcoRI (incomplete digested), column 7, pMTS10-EcoRI, column 8, pMTS10-HindIII (incomplete digested), column 9, pMTS31-EcoRI, column 10, pMTS31-HindIII. Electrophoresis was run on agarose of 1.2 %.

KESIMPULAN

Isolasi DNA khromosom dengan metode marmur (1961) yang tidak diikuti dengan penghilangan RNA dan pemekatan tetap menghasilkan DNA dengan kualitas yang cukup baik untuk dapat digunakan dalam keperluan pengklonan. Untuk mendapatkan jumlah plasmid yang relatif banyak, isolasi plasmid dapat dikerjakan pada 4,5 mL (2-3 x1,5 mL) kultur dengan melakukan penggandaan volume pada reagen yang digunakan.

Media agar McConkey adalah media alternatif yang cukup baik (dan murah) untuk seleksi transformasi pada sistem *E. coli* dengan plasmid *lac*. Gen protease dari *B. stearothermophilus* yang diklonkan menggunakan plasmid pUC18 dan pRK415 dapat terekspresi dalam *E. coli* tetapi sangat tidak stabil. Delesi adalah salah satu dugaan ketidakstabilan ekspresi gen tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Barros MEC, Thomson JA (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of

- a cellulase gene from *Ruminococcus flavefaciens*. J Bacteriol 169(4):1760-1762.
- Bergquist PL (1986) The genetics of thermophilic bacteria - a general review. Proc. Seventh Australian Biotechnology Conference. University of Melbourne 25-28 Agustus 1986. p 38-50.
- Birnboim HC; Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Research 7(6): 1513-1523.
- Clark MC, Lawrence, CH (1986). Characterization of plasmid in isolates of *Corynebacterium sepedonicum*. Can J Microbiol 32:617-622.
- Cornellis P, Digneffe C, Willemot K (1982) Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 186: 507-511.
- Dean CR, Ward OP (1991) Nature of *Escherichia coli* cell lysis by culture supernatants of *Bacillus* species. J Bacteriol 57(7):1893-1898.
- Difco Manual (1984) Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. Edisi ke-10. Difco Laboratories Detroit, Michigan.
- Eraso J, Kaplan S (1992). Tidak dipublikasi.
- Fujii M, Takagi M, Imanaka T, Aiba S (1983). Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *B.stearo-thermophilus* in a vector plasmid and its expression in *B.stearo-thermophilus* and *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 154(2): 831-837.
- Honda H, Kudo T, Horokoshi K (1985). Molecular cloning and expression of the xylanase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain C-125 in *Escherichia coll*. J Bacteriol 161(2): 784-785.
- Honda H, Kudo T, Horikoshi K (1986). Extracellular production of alkaline xylanase of alkalophilic *Bacillus* sp. by *Escherichia coli* carrying pCX311. J Ferment Technol 64(5): 373-377.
- Imanaka, T, Tanaka, Tsunekawa H, Aiba S (1981). Cloning of the genes for penicillinase, *penP* and *penI*, of *Bacillus licheniformis* in some vector plasmids and their expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus licheniformis*. J Bacteriol 147(3):776-787.
- Imanaka T, Shibasaki M, Takagi, M (1986) A new way of enhancing the thermostability of proteases. Nature 324: 695-697.
- Jennings MP, Beacham IR (1989) MacConkey agar as an alternatif to X-gal in the detection of recombinant plasmid. BioTechniques 7(10): 1082.
- Koide Y, Nakamura A, Uozami T, Beppu T (1986). Cloning and sequencing of the major intracellular serine protease gene of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 167(1):110-116.
- Kubo M, Imanaka T (1988). Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearo-thermophi/us*. J Gen Microbiol 134: 1883-1892.
- Kudo T, Kato C, Horikoshi K (1983). Excretion of the penicillinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. through the *Escherichia coli* outer membrane. J Bacteriol 156(2): 949-951.
- Lederberg EM, Cohen SN (1974) Transformation of *Salmonella thypimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. J Bacteriol 119(3): 1072-1074.
- Lucas RJ, Austen RA, Dunn NW (1987). Cloning of genes encoding endoglucanases from a cellulolytic *Xanthomonad*. J Biotechnol 6: 83-90.
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J Mol Biol 3: 208-218.
- Odera M, Takeuchi K, Toh-E A (1986) Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. J Ferment Technol 64(5): 363-371.

- Peek K, Veith DP, Prescott MP, Daniel RM, MacIver B, Bergquist, PL (1993) Some characteristics of a proproteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. expressed in *Escherichia coli*: comparison in *E.coli* and in vitro. *Appl Environ Microbiol* 59(4)p: 1168-1175.
- Sashihara N, Kudo T, Horikoshi, K (1984) Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 158(2): 503-506.
- Steel DM, Walker JM (1991) Thermo-stable proteins. *Life Chemistry reports* 8: 49-96.
- Takagi M, Imanaka T, Aiba S (1985) Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 163(3):824-831.
- Tang JL, Gough CL, Barber CE, Dowe JM, Daniels MJ (1987). Molecular cloning of protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*: expression in *Escherichia coli* and role pathogenicity. *Mol Gen Genet* 210: 443-448.