

**PENGEMBANGAN PROTOKOL PEMBUATAN
“PACKAGING EXTRACT” UNTUK SISTEM KONSTRUKSI
PUSTAKA DNA MELALUI “*IN VITRO* PACKAGING”
BAKTERIOFAG LAMBDA**

TESIS

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Magister dari
Institut Teknologi Bandung**

Oleh

EVA ERDAYANI

NIM : 20603018

Program Studi Bioteknologi



**SEKOLAH ILMU DAN TEKNOLOGI HAYATI
INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
2006**

**PENGEMBANGAN PROTOKOL PEMBUATAN
“PACKAGING EXTRACT” UNTUK SISTEM KONSTRUKSI
PUSTAKA DNA MELALUI “*IN VITRO* PACKAGING”
BAKTERIOFAG LAMBDA**

Oleh

Eva Erdayani

NIM : 20603018

Program Studi Bioteknologi
Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Institut Teknologi Bandung

Menyetujui

Pembimbing

Tanggal

(Dr. Adi Pancoro)

ABSTRAK

PENGEMBANGAN PROTOKOL PEMBUATAN

“PACKAGING EXTRACT” UNTUK SISTEM KONSTRUKSI

PUSTAKA DNA MELALUI “*IN VITRO* PACKAGING”

BAKTERIOFAG LAMBDA

Oleh

Eva Erdayani

NIM : 20603018

Sejalan dengan berkembangnya bioteknologi molekuler, penemuan gen-gen esensial terkait dengan karakter-karakter tertentu dari makhluk hidup diperkirakan akan terus menjadi objek kajian yang menarik. Pencarian gen atau yang dikenal dengan istilah “gene discovery” ini tentu tidak lepas dari upaya untuk mengkoleksi gen-gen makhluk hidup dalam suatu pustaka (“library”), baik berupa pustaka genom maupun pustaka cDNA. Dalam langkah ini, penggunaan vektor kloning adalah salah satu aspek penting yang menentukan kelengkapan dari pustaka yang dibuat.

Plasmid sebagai vektor kloning pembuatan pustaka DNA memiliki kapasitas yang terbatas untuk menampung DNA berukuran besar. Problem ini dapat teratasi dengan penggunaan vektor bakteriofag Lambda. Selain mampu menampung DNA berukuran hingga >20 kb, introduksinya ke dalam sel inang juga memiliki efisiensi yang tinggi bila dilakukan secara “*in vitro* packaging”. Dalam reaksi “packaging”, DNA rekombinan dapat dikemas ke dalam partikel fag melalui perakitan *in vitro* kepala, ekor dan protein-protein pengemasan. Proses ini dapat berlangsung melalui pencampuran ekstrak yang berasal dari bakteri terinfeksi mutan bakteriofag Lambda.

Saat ini telah banyak diproduksi ekstrak pengemasan (“packaging extract”) komersial untuk melengkapi sistem konstruksi pustaka yang menggunakan vektor bakteriofag Lambda. Beberapa perusahaan bahkan berhasil melakukan modifikasi dalam rangka meningkatkan efisiensi “*in vitro* packaging”. Namun mengingat kebutuhannya akan suhu penyimpanan yang minimum (-70°C), ekstrak komersial ini seringkali menghasilkan efisiensi “packaging” yang rendah ketika digunakan. Hal ini dapat disebabkan oleh tidak stabilnya suhu penyimpanan selama perjalanannya. Problem ini menuntut pembuatan ekstrak pengemasan sendiri oleh laboratorium-laboratorium yang sulit mengakses ekstrak komersial tersebut dalam kondisi optimumnya. Penelitian ini bertujuan untuk membuat ekstrak pengemasan (“packaging extract”) untuk sistem konstruksi pustaka DNA secara “*in vitro* packaging” menggunakan vektor bakteriofag Lambda.

“Packaging extract” dalam penelitian ini dibuat dengan menggunakan 2 lisogen *E. coli*, yakni BHB2688 dan BHB2690. BHB2688 [N205 *recA* (λ imm434 *cIts*, *b2*, *red3*, *Eam15*, *Sam7*) λ] adalah mutan untuk gen E, yakni gen penghasil

protein E yang menyusun cangkang ("shell") kepala fag. Proses ekstraksinya dilakukan melalui pelisisan dengan lisozim serta preparasi "freezing and thawing" sehingga disebut "Freeze Thaw Lysate". Adapun BHB2690 [N205 *recA*⁻ (*λimm434 cIts, b2, red3, Dam15, Sam7*) *λ*] adalah mutan untuk gen D, yakni gen penghasil protein D ("decoration") yang berperan melengkapi suatu "mature head". Proses ekstraksinya dilakukan melalui tahap sonikasi sehingga disebut "Sonic Extract". Ekstrak dari kedua strain diharapkan dapat saling berkomplementasi dalam reaksi "*in vitro* packaging", mengemas DNA Lambda yang "concatamer". Protokol yang digunakan dalam penelitian ini adalah Protokol Scalenghe, *et al.* (1981) dan Protokol Read (www.chuq.qc.ca/labomoss/Protokols) dengan sedikit modifikasi. Dalam reaksi "*in vitro* packaging", digunakan DNA vektor EMBL3 "uncut" dari Promega dengan strain NM538 sebagai "host".

Melalui penelitian ini diperoleh "packaging extract" dengan efisiensi "packaging" rata-rata $7,52 \times 10^6$ pfu/ μ g DNA untuk protokol Scalenghe *et al.* (1981) dan $8,23 \times 10^7$ pfu/ μ g DNA untuk protokol Read. Nilai efisiensi tersebut sudah berada dalam kisaran nilai standar efisiensi "packaging" oleh ekstrak komersial, yakni 5×10^7 - 5×10^8 pfu/ μ g DNA. Optimasi masih mungkin dilakukan untuk menghasilkan nilai efisiensi yang lebih baik. Kedua protokol yang telah dimodifikasi dapat direkomendasikan untuk pembuatan "packaging extract" dan "*in vitro* packaging" di laboratorium-laboratorium Biologi Molekuler yang ada di Indonesia karena pengerjaannya yang mudah dan murah.

ABSTRACT

**DEVELOPING PACKAGING EXTRACT PREPARATION
PROTOCOL FOR DNA LIBRARY CONSTRUCTION SYSTEM
VIA LAMBDA BACTERIOPHAGE *IN VITRO* PACKAGING**

Oleh

Eva Erdayani

NIM : 20603018

Searching of essential genes related to specific characters of organisms on prediction would always be an interesting topic, due to advance in molecular biotechnology. Searching gene, also known as “gene discovery”, must be depended on activity to collect genes of organisms into a library, either genomic library or cDNA library. In this way, the use of vector was one important aspect in constructing a complete library.

Plasmid as a DNA library cloning vector had less capacity for cloning large fragments. This problem could be overcome by using Lambda bacteriophage. It could clone DNA fragments >20 kb in size and its introduction into host cells gave high efficiency if performed via *in vitro* packaging. In this reaction, recombinant DNA fragments could be packaged into phage particles via *in vitro* construction using heads, tails, and packaging proteins. The process could be performed by mixing extracts prepared from bacteria infected with bacteriophage Lambda mutants.

Nowadays, it's easy to find these extracts produced commercially for the construction of DNA library using bacteriophage Lambda vectors system. Additionally, most producers had made some modifications in order to increase the efficiency. Problems in using these extracts resulted from the need of very low temperature (-70°C) storage. These extracts had very low packaging efficiencies because of difficulties to keep them stable during the delivery process. These problems required the laboratories to prepare their own extracts when they had no access to obtain extracts in optimum conditions. This research was performed in order to prepare the packaging extracts for DNA library construction system via *in vitro* packaging using bacteriophage Lambda vectors.

The two *E. coli* lysogens used were BHB2688 and BHB2690. BHB2688 [N205 *recA*⁻ (*λimm434 cIts, b2, red3, Eam15, Sam7*) *λ*] was a mutant of the *E* gene which coded for a structural protein component of the head phage shell. The extracts were named as Freeze Thaw Lysate, due to the process of lysis by lysozyme and freezing-thawing preparation. As complement, BHB2690 [N205 *recA*⁻ (*λimm434 cIts, b2, red3, Dam15, Sam7*) *λ*] was a mutant of the *D* gene, *loch*i for a structural protein, component of complete mature head. Extracts were named as Sonic Extracts, due to the process of lysis by sonication. Extracts from these two lysogens could perform complementation *in vitro* and package

concatameric Lambda DNA. The two protocols used were Scalenghe *et al.*'s protocol (1981) and Read's protocol (www.chuq.qc.ca/labomoss/Protokols). Uncut EMBL3 DNA vectors from Promega were used as DNA samples for *in vitro* packaging and *E. coli* NM538 was used as host.

The packaging extracts gave *in vitro* packaging efficiency $\sim 7,52 \times 10^6$ pfu/ μ g DNA for Scalenghe, *et al.*'s protocol and $\sim 8,23 \times 10^7$ pfu/ μ g DNA for Read's protocol. These values were within range of standard efficiency for commercial packaging extracts, 5×10^7 - 5×10^8 pfu/ μ g DNA. Optimization was still possible to increase the packaging efficiency of the extracts. Both protocols with some modifications could be recommended for preparing packaging extracts and used for *in vitro* packaging at laboratories in Indonesia, because of the simple and low cost procedures.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
BAB I Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan	4
I.3 Hipotesis	4
BAB II Tinjauan Pustaka	5
II.1 Biologi Molekuler Bakteriofag Lambda	5
II.2 Bakteriofag Lambda sebagai Vektor Kloning	14
II.3 Pengemasan DNA Bakteriofag Lambda secara <i>in vitro</i>	18
II.4 Pustaka DNA dengan Bakteriofag Lambda	20
BAB III Metode Penelitian	23
III.1 Alat dan Bahan	23
III.2 Cara Kerja	25
BAB IV Hasil dan Pembahasan	35
IV.1 Prinsip Reaksi " <i>in vitro</i> Packaging" oleh FTL dan SE	35
IV.2 Efisiensi " <i>in vitro</i> Packaging"	37
IV.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Efisiensi " <i>in vitro</i> Packaging"	38
BAB V Kesimpulan	48
V.1 Kesimpulan	48
V.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	51

BAB V KESIMPULAN

V.1 Kesimpulan

1. "Packaging extract" untuk sistem konstruksi pustaka DNA secara "*in vitro* packaging" dapat dibuat menggunakan protokol Read dan Scalenghe *et al.* (1981) dengan sedikit modifikasi. Nilai rata-rata efisiensi "*in vitro* packaging" dengan ekstrak dari protokol Scalenghe, *et al.* adalah $7,53 \times 10^6$ pfu/ μ g DNA dan dari protokol Read adalah $8,23 \times 10^7$ pfu/ μ g DNA. Nilai efisiensi tersebut sudah berada dalam kisaran nilai efisiensi "packaging" oleh ekstrak komersial, yakni 5×10^7 - 5×10^8 pfu/ μ g DNA.
2. Kedua protokol yang telah dimodifikasi dapat direkomendasikan untuk pembuatan "packaging extract" dan "*in vitro* packaging" di laboratorium-laboratorium Biologi Molekuler yang ada di Indonesia karena pengerjaannya yang mudah dan murah. Modifikasi protokol Read terbukti menghasilkan efisiensi "*in vitro* packaging" yang lebih baik.

V.2 Saran

1. Perlu dilakukan optimasi untuk meningkatkan nilai efisiensi "*in vitro* packaging" menggunakan kedua protokol yang telah dimodifikasi.
2. Protokol untuk memperbanyak DNA vektor masih perlu dikembangkan.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, *Genomic Cloning Technical Manual*, Promega, www.promega.com

Anonim, *Lambda DNA Replication and Cloning with Phage Lambda*,
www.bio.cmu.edu/Courses/03441/LambdaCloning/LambdaRepClone.html

Anonim, *Preparation of in vitro Lambda Packaging Mixes and Packaging*,
www.chuq.qc.ca/labomoss/Protocols/Protocol Bact tran-inf.html

Brown, T. A. (2001), *Gene Cloning and DNA Analysis*, 4th ed., Blackwell Science Ltd, Gosport, Hants, 14-27.

Dokland, T. & H, Murialdo (1993), Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids, *Journal of Molecular Biology*, **233**, 682-694.

Echols, H and H. Murialdo (1978), Genetic Map of Bacteriophage Lambda, *Microbiological Reviews*, American Society for Microbiology, 577-591.

Glick, B. R. and J. P. Pasternak (2003), *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, 3rd ed., American Society for Microbiology Press, Washington, DC.

Frischauf, A. (1987), Construction and Characterization of a Genomic Library, in *Guide to Molecular Cloning Techniques: Methods in Enzymology*, Vol. 152, Berger, S.L. and A.R. Kimmel, Editors, Academic Press Inc, California, 190-199.

Gottesman, M. E. and R. A. Weisberg (2004), Little Lambda, Who Made Thee?, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, American Society for Microbiology, 796-813.

Hohn, B. and T. Hohn (1974), Activity of Empty, Headlike Particles for Packaging of DNA of Bacteriophage Lambda *in vitro*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **71(6)**, 2372-2376.

Hohn, B. and K. Murray (1977), Packaging Recombinant DNA Molecules into Bacteriophage Particles *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74(8)**, 3259-3263.

Jardine, P. J. and D. W. Anderson (2003), DNA Packaging in dsDNA Phages, in *The Bacteriophages*, Calendar, R., Editor, Oxford University Press, Oxford.

Khon, A. (1959), Lysis of Frozen and Thawed Cells of *Escherichia coli* by Lysozyme, and Their Conversion into Spheroplast, *J Bacteriol*, **79(5)**, 697-706.

Lewin, B. (2004), *Genes VIII*, Pearson Education, Inc., New Jersey, 329-350.

- Lech, K. and R. Brent (1987), Vectors derived from Lambda and related Bacteriophages, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1.9.1-1.9.4
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Kriegar, M. P. Scott, L. Zipursky, and J. Darnell (2000), *Molecular Cell Biology*, 4th ed., Tenney, S., Editor, Von Hoffinan Press, New York.
- Metzenberg, S. (2002), *Temprate Bacteriophages Method*, www.escience.ws
- Miesfeld, R. (2001), *Applied Molecular Genetics*, www.biochem.arizona.edu
- McClellan, P. (1998), *Bacteriophage Lambda Vectors*, www.cc.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclellan/plsc731/cloning/cloning3.htm
- Old, R. W. and S. B. Primrose (1994), *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, 5th ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, 70-99.
- Sambrook, J, E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2.3-2.121.
- Scalenghe F, E. Turco, J. E. Edström, V. Pirrotta, and M. Melli (1981), Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes, *Chromosoma*, **82(2)**, 205–216.
- Schnaitman, C. (1981), Cell Fractination, in *Manual of Methods for General Bacteriology*, Murray R.G.E., Editor, American Society for Microbiology, Washington, DC, 52-64.
- Trun, N. and J. Trempy (2003), *Fundamental Bacterial Genetics*, Blackwell Publishing, www.blackwellpublishing.com/trun, 105-125.
- Yang, F., P. Forrer, Z. Dauter, J. F. Conway, N. Cheng, M. E. Cerritellis, A. C. Steven, A. Pluckthun, and A. Wlodawer (2000), Novel Fold and Capsid-Binding Properties of Lambda-Phage Display Platform Protein gpD, *Nature Structural Biology*, **7(3)**, 230-7.
- Weigle, J. (1966), Assembly of Phage Lambda *in vitro*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **55**, 1462-1466.