

AMPLIFIKASI GEN *BLA* DAN *ORI* UNTUK KONSTRUKSI VEKTOR EKSPRESI VAKSIN REKOMBINAN DENGAN METODE PCR

I Wayan Martadi Santika, Putu Eka Arimbawa

Udayana University¹, Bali International²

Email: wayanmartadi@gmail.com, eka_apoteker@yahoo.co.id

Abstrak

Vaksin rekombinan subunit protein memiliki tingkat keamanan yang lebih baik dibandingkan vaksin yang dilemahkan atau dimatikan sehingga terdapat peningkatan kebutuhan vaksin tersebut. Peningkatan kebutuhan ini harus diantisipasi dengan peningkatan kapasitas produksi. Vektor ekspresi yang memiliki efisiensi transkripsi yang tinggi dan membawa *ori* dengan jumlah salinan rendah-sedang dapat meningkatkan kapasitas produksi vaksin rekombinan subunit protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen *bla* dan *ori* dari plasmid pBR322 dengan jumlah salinan rendah-sedang dengan metode PCR. Gen *bla* dan fragmen *ori* pBR322 diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan pasangan primer *Fbla*, *Rbla*, *Fori* dan *Rori*. Ukuran masing-masing pita atau fragmen DNA dikonfirmasi dengan analisa migrasi menggunakan metode elektroforesis gel untuk memastikan ukuran gen *bla* dan *ori* yang telah teramplifikasi memiliki ukuran yang tepat. fragmen *bla* dan *ori* telah diamplifikasi dengan metode PCR. Konfirmasi ukuran produk PCR dengan metode elektroforesis gel telah menunjukkan terbentuknya pita atau fragmen DNA dengan ukuran eksperimental yang mendekati ukuran gen *bla* sebesar 1013 bp dan fragmen *ori* sebesar 1380 bp. Penelitian menunjukan bahwa gen *bla* dan fragmen *ori* dari plasmid pBR322 telah berhasil diamplifikasi dengan metode PCR. Kedua fragmen DNA ini dapat dikonstruksi menjadi plasmid baru dengan jumlah salinan sedang-rendah sebagai vektor ekspresi untuk produksi vaksin rekombinan subunit protein

Kata Kunci: *bla*; *ori*; pBR322; vaksin rekombinan

Abstract

Recombinant protein subunit vaccines have a better safety level than attenuated or killed vaccines, so there is an increased need for these vaccines. This increase in demand must be anticipated by increasing production capacity. Expression vectors that have high transcriptional efficiency and carry ori with low-moderate copy number can increase the production capacity of protein subunit recombinant vaccines. The aim of this study was to amplify the bla and ori genes from the low-medium copy number plasmid pBR322 by PCR method. The bla gene and the ori pBR322 fragment were amplified by PCR method using primer pairs Fbla, Rbla, Fori and Rori. The size of each DNA band or fragment was confirmed by migration analysis using the gel electrophoresis method to ensure that the amplified bla and

ori gene sizes were of the right size. Bla and ori fragments have been amplified by PCR method. Confirmation of the size of the PCR product by the gel electrophoresis method has shown the formation of DNA bands or fragments with experimental sizes close to the size of the bla gene of 1013 bp and the original fragment of 1380 bp. The study showed that the bla gene and the ori fragment of the pBR322 plasmid had been successfully amplified by the PCR method. These two DNA fragments can be constructed into new plasmids with medium-low copy number as expression vectors for protein subunit recombinant vaccine production.

Keywords: *bla; ori; pBR322; recombinant vaccine*

Received: 2021-12-20; Accepted: 2022-01-05; Published: 2022-01-15

Pendahuluan

Kebutuhan protein rekombinan dimasa depan diperkirakan akan terus meningkat. Sekitar 200 protein terapeutik tersedia secara komersial untuk terapi kanker, autoimunitas, peradangan, penyakit menular, dan penyakit genetic (LagasséLagassé, H. A. Daniel, Alexaki, Aikaterini, Simhadri, 2017). Vaksin konvensional baik vaksin generasi pertama dan vaksin generasi kedua dalam penggunaannya masih memiliki beberapa kelemahan. Untuk mengatasi berbagai kelemahan tersebut telah dikembangkan vaksin generasi yang ketiga yaitu vaksin rekombinan yang juga dikenal dengan vaksin subunit (Radji, 2009). Peningkatan kebutuhan ini harus diikuti dengan peningkatan kapasitas produksi protein rekombinan. Salah satu tantangan yang muncul adalah mengoptimalkan sistem ekspresi yang digunakan untuk produksi protein skala industri.

Optimasi sistem ekspresi melibatkan pemilihan kombinasi yang tepat dari sel inang dan vektor ekspresi (Huang, Lin, & Yang, 2012). Untuk sel inang, bakteri *Escherichia coli* merupakan pilihan utama karena beberapa kelebihan seperti sistem genetiknya yang telah dipelajari secara mendalam dan ketersediaan berbagai metode molekular untuk kloning dan ekspresi (Rosano & Ceccarelli, 2014). Plasmid merupakan vektor ekspresi yang sering digunakan untuk produksi protein terapeutik rekombinan dalam skala industri di sel inang *E. coli*.

Pemilihan plasmid yang tepat sangat tergantung pada efisiensi transkripsi dan efisiensi translasi yang dimiliki oleh plasmid tersebut. Efisiensi transkripsi bergantung pada jumlah salinan gen dan karakteristik promotor (Huang et al., 2012). Jumlah salinan gen ditentukan oleh jumlah salinan plasmid dimana semakin banyak jumlah salinan plasmid maka semakin banyak juga gen yang tersedia untuk proses transkripsi. Penggunaan plasmid dengan jumlah salinan tinggi menyebabkan peningkatan beban energi yang dibutuhkan oleh sel untuk pemeliharaan jumlah salinan plasmid (Ningsih et al., 2021). Hal ini akhirnya meningkatkan beban metabolisme sel dan pada akhirnya dapat menurunkan produksi protein (Jana & Deb, 2005). Ukuran plasmid juga dapat meningkatkan beban metabolisme sel. Semakin besar ukuran plasmid maka semakin besar juga energi yang dikeluarkan sel untuk mereplikasi plasmid tersebut. Plasmid

dengan ukuran kecil (<3 kb) biasanya lebih sering digunakan untuk ekspresi protein rekombinan (Huang et al., 2012).

Diperlukan rancangan plasmid ekspresi baru yang memiliki jumlah salinan rendah-sedang yang sangat ditentukan oleh *Origin of Replication (ori)* yang dimiliki oleh plasmid tersebut (Dao et al., 2019). Salah satu plasmid yang memiliki jumlah salinan rendah-sedang adalah plasmid pBR322 dengan jumlah salinan 15-20 salinan/sel. Plasmid pBR322 membawa *ori* pMB1 dan memiliki 2 gen resistensi antibiotik yaitu gen *bla* dan *tetR*. Plasmid ini dapat digunakan sebagai tulang punggung untuk merekonstruksi plasmid baru yang membawa jumlah salinan rendah-sedang dan memiliki ukuran yang lebih kecil. Strategi yang digunakan adalah dengan merekonstruksi plasmid yang membawa *ori* pMB1 dari plasmid pBR322 dan membawa hanya satu gen resistensi antibiotik *bla* sehingga ukuran plasmid menjadi lebih kecil.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen *bla* dan *ori* pMB1 dari plasmid pBR322 dengan metode PCR. Hasil amplifikasi ini nantinya dapat dimanfaatkan untuk merekonstruksi plasmid ekspresi baru dengan ukuran dibawah 3 kb dan membawa *ori* dengan jumlah salinan rendah-sedang.

Metode Penelitian

Desain Primer Untuk Amplifikasi gen *bla* dan *ori*: Gen (*bla*) di amplifikasi dengan PCR menggunakan primer F_{PsiI} *bla* yang membawa situs restriksi PsiI dan R_{HpaI} *bla* yang membawa situs restriksi HpaI dan NotI. Fragmen DNA yang membawa *ori* pBR322 akan di amplifikasi menggunakan primer F_{HpaI} *ori* yang membawa situs restriksi HpaI dan NotI serta R_{PsiI} *ori* yang membawa situs restriksi PsiI. Semua primer dirancang dengan software Primer Select agar memenuhi syarat syarat primer yang spesifik dengan mempertimbangkan beberapa parameter seperti panjang primer, %GC, melting temperature, suhu annealing, GC clamp, secondary structure seperti hairpin, selfdimer dan pair dimer, serta runs dan repeat basa.

Karakterisasi templat PCR Plasmid pBR322: Analisa migrasi dilakukan untuk mengetahui profil dari plasmid pBR322. Sebanyak 5 µL plasmid pBR322 hasil isolasi dicampur dengan 1 µL DNA loading dye. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa 1% dalam dapar TAE 1X pada tegangan 80 volt, kekuatan arus 400 mA selama 60 menit. Sedangkan analisa pemotongan dilakukan untuk mengkonfirmasi ukuran plasmid pBR322 (4361 bp). Komposisi reaksi pada analisa pemotongan yaitu plasmid pBR322 500 ng, enzim restriksi BamHI 10 U, Dapar BamHI 10X dan ddH₂O steril sampai volume akhir 20 µL. Reaksi dilakukan pada suhu 37 °C semalam. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa 1% dalam dapar TAE 1X pada tegangan 80 volt, kekuatan arus 400 mA selama 60 menit dan ladder 1 kb.

Amplifikasi gen *bla* dan *ori* dengan metode PCR: Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan komposisi dan kondisi PCR untuk amplifikasi gen *bla* dan *ori*. Templat yang digunakan adalah plasmid pBR322 dengan komposisi PCR dengan total volume 25 µL dibuat dengan mereaksikan 3 µL plasmid pBR322 (60 ng), 5 µL dapar PCR 5X yang sudah mengandung MgCl₂ dengan konsentrasi 1X sebesar 2 mM, masing-masing

Amplifikasi Gen Bla dan Ori untuk Konstruksi Vektor Ekspresi Vaksin Rekombinan dengan Metode PCR

sebanyak 0,15 µL pasangan primer (0,6 µM), 0,5 µL MyFi DNA Polymerase 5U/µL, 1 µL dNTPs 10 mM dan digenapkan sampai 25 µL dengan ddH₂O steril. PCR dilakukan pada kondisi: tahap denaturasi awal 95 °C, 2 menit; tahap amplifikasi 30 siklus dimana setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 92 °C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 63 °C selama 30 detik dan pemanjangan fragmen DNA pada suhu 72 °C selama 3 menit; tahap pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

Karakterisasi produk PCR: Karakterisasi dilakukan dengan analisa migrasi untuk mengetahui ukuran dari masing-masing produk PCR gen bla dan ori. Sebanyak masing-masing 5 µL produk hasil isolasi dicampur dengan 1 µL DNA loading dye. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa 1% dalam dapar TAE 1X pada tegangan 80 volt, kekuatan arus 400 mA selama 60 menit dan ladder 1 kb. Setelah selesai fragmen ori dan bla dimurnikan dengan menggunakan Gel/PCR purification kit dan disimpan pada freezer.

Hasil Dan Pembahasan

A. Hasil

Desain pasangan primer dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa karakteristik primer seperti panjang primer, %GC, melting temperature (T_m), GC clamp, struktur seperti hairpin, *self dimer* dan pair dimer, serta runs basa dan repeat basa. Hasil ditampilkan dalam tabel 1.

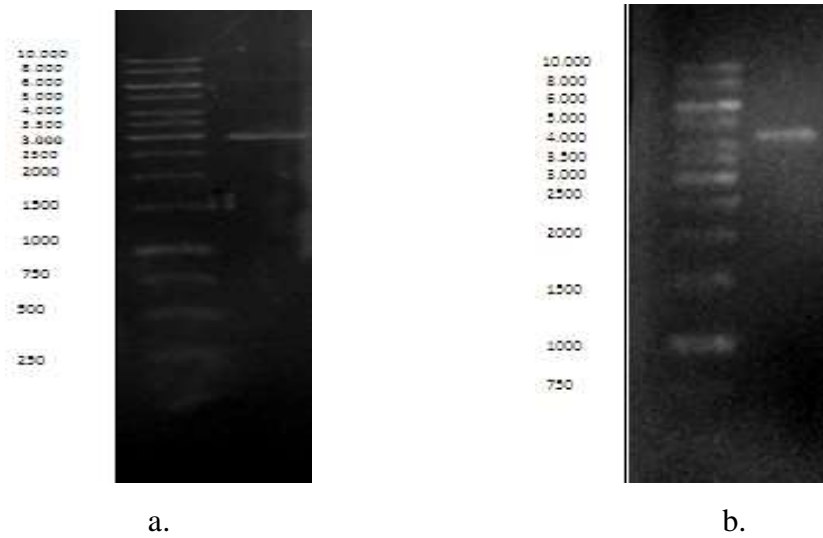
Tabel 1

Karakteristik pasangan primer untuk amplifikasi gen bla dan ori plasmid pBR322

Karakteristik	Primer				Keterangan
	<i>Fbla</i>	<i>Rbla</i>	<i>Fori</i>	<i>Rori</i>	
Panjang Primer	32	36	32	37	Primer merupakan overhang primer dimana Panjang primer yang berikatan langsung dengan templat sudah dibawah 30 bp
%GC	46%	49%	49%	40%	Persen GC memenuhi rentang 40-60%
T_m	58 ⁰ C	61.7 ⁰ C	59.3 ⁰ C	58.3 ⁰ C	T_m memenuhi rentang 50-65 ⁰ C
GC Clamp	-	-	-	-	Tidak ditemui GC clamp pada ujung 3'
Hairpin	1.1	1	-2.4	-1.2	Memenuhi syarat hairpin ($dG \leq -3$ kcal/mol)
Dimer					Memenuhi syarat ($dG 3' \leq -5$ kcal/mol dan $dG \text{ internal} \leq -6$ kcal/mol)
Runs	3	2	2	3	Run ≤ 3 basa pada ujung 3'
Repeat	-	-	-	-	Tidak ditemukan Repeat ≤ 3 basa pada ujung 3'

Karakterisasi templat pBR322 dilakukan dengan analisa migrasi dan analisa pemotongan. Analisa migrasi dilakukan untuk mengetahui profil dari plasmid pBR322 Sedangkan analisa pemotongan dilakukan untuk mengkonfirmasi ukuran

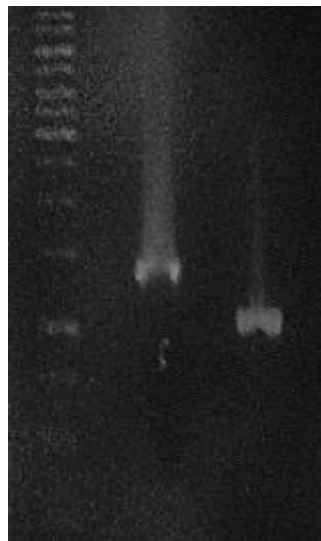
plasmid pBR322 (4361 bp). Hasil Analisa migrasi dan Analisa pemotongan dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1

aAnalisa migrasi plasmid pBR322; anak panah menunjukkan pita DNA plasmid pBR322 berbentuk supercoil. **b.** Analisa pemotongan dengan BamHI; anak panah menunjukkan plasmid dalam bentuk linear dengan ukuran diantara marka 4000 bp dan 5000 bp.

Templat pBR322 digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen *bla* dan fragmen *ori*. Produk PCR selanjut dianalisa migrasi dengan metode elektroforesis gel. Hasilnya ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2

Analisa migrasi produk PCR menunjukkan terbentuknya pita band fragmen *ori* (1380 bp) dan gen *bla* (1013 bp)

B. Pembahasan

Hasil analisis primer maka urutan primer yang akan digunakan untuk amplifikasi fragmen gen *bla* adalah primer *Fbla* (5'-GGCCGCGGT TATAATCTTCACCTAGATCCTTT-3') dan primer *Rbla* (5'-TAATTTGCG GCCGCGTTAACCCGCTCATGAGACAAT-3'). Sedangkan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi *ori* pMB1 adalah primer *Fori* (5'-GAAAATCCGCGGCCGCTTCATCGGTATCATTA-3') dan primer *Rori* (5'-CCCCGCTTATAATTGATAATCTCATGACCAAATCCC-3'). Seluruh primer yang digunakan telah memiliki karakteristik primer yang sesuai dan mampu memberikan efisiensi dan spesifisitas primer yang baik. Efisiensi dan spesifisitas primer menentukan keberhasilan dari proses amplifikasi dengan metode PCR (Jana and Deb, 2005).

Kondisi templat PCR sangat menentukan keberhasilan proses PCR. Hasil analisa migrasi plasmid pBR322 menunjukkan bahwa terdapat pita DNA dengan ukuran sekitar 3000 bp. Pita ini menunjukkan keberadaan plasmid pBR322 dalam bentuk supercoiled. Analisa migrasi menunjukkan plasmid berada dalam struktur yang utuh tanpa terpotong atau mengalami nick. Plasmid dalam bentuk supercoiled berukuran lebih mampat sehingga akan bermigrasi lebih cepat pada gel agarose (Bo et al., 2013). Analisa pemotongan dilakukan dengan memotong plasmid menggunakan enzim restriksi BamHI. Enzim ini akan memotong plasmid pBR322 pada situs restriksi BamHI yang terletak pada *gen tetR* (gambar 1). Pemotongan ini kan menyebabkan plasmid pBR322 mengalami relaksasi dari bentuk supercoiled ke bentuk linear. Hasil Analisa pemotongan menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan ukuran diantara 4000 bp dan 5000 bp. Hasil mengkonfirmasi bahwa pita DNA tersebut merupakan plasmid pBR322 dalam bentuk linear yang memiliki ukuran 4361 bp.

Fragmen *ori* dan gen *bla* dari plasmid pBR322 selanjutnya diamplifikasi dengan primer dengan metode PCR. Produk hasil amplifikasi ini dianalisa dengan analisis migrasi. Hasil analisa migrasi menunjukkan bahwa fragmen *ori* telah berhasil diamplifikasi dengan metode PCR yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA dibawah marka 1500 bp yang berukuran 1380 bp. Hasil analisa migrasi juga menunjukkan bahwa gen *bla* telah berhasil diamplifikasi yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA disekitar marka 1000 bp yang berukuran 1013 bp. Kedua pita DNA tampak dengan jelas namun smear yang menunjukkan bahwa proses amplifikasi telah berjalan dengan efisien namun belum berjalan dengan spesifik. Hal ini menunjukkan bahwa masih diperlukan proses optimasi metode amplifikasi fragmen *ori* dan gen *bla* dari plasmid pBR322. Optimasi cara meliputi amplifikasi jumlah templat pBR322, optimasi kadar primer dan optimasi suhu annealing untuk mencegah terbentuknya pita yang smear yang menunjukkan terbentuknya produk nonspesifik.

Fragmen *ori* nantinya akan menentukan jumlah salinan dari plasmid. Sistem replikasi pada plasmid pBR322 tergantung pada situs *ori* yang berisi elemen yang

mengontrol *copy number* seperti RNAI, RNAII, dan *rop* (*repression of primer*). Replikasi pada plasmid biasanya diinisiasi oleh RNAII, sedangkan RNAI menekan replikasi plasmid. Plasmid dengan *copy number* tinggi akan memperlambat replikasi. *ori* juga mengkodekan *protein rop* yang mengatur *copy number* pada plasmid. Bekerja dengan menstabilkan interaksi antara RNAI dan RNAII. *rop* memiliki peran penting untuk mencegah terjadinya replikasi yang tidak terkendali dengan meningkatkan afinitas RNAI untuk menekan RNAII sehingga menekan laju inisiasi dari RNAII (Klumpp, 2011). Penelitian ini telah menghasilkan gen *bla* yang membawa marka seleksi antibiotik dan fragmen *ori* yang menentukan jumlah salinan rendah-sedang dari plasmid. Pada tahap selanjutnya gen *bla* dan fragmen *ori* digunakan sebagai tulang punggung untuk mengkonstruksi plasmid sebagai vector ekspresi untuk produksi vaksin rekombinan.

Kesimpulan

Gen *bla* telah berhasil diamplifikasi dengan metode PCR yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA berukuran 1013 pb (bp). Fragmen *ori* telah berhasil diamplifikasi dengan metode PCR yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA berukuran 1380 pb (bp).

BIBLIOGRAFI

- Bo, Huaben, Wang, Jinquan, Chen, Qizhu, Shen, Han, Wu, Fenglin, Shao, Hongwei, & Huang, Shulin. (2013). Using a single hydrophobic-interaction chromatography to purify pharmaceutical-grade supercoiled plasmid DNA from other isoforms. *Pharmaceutical Biology*, 51(1), 42–48. [Google Scholar](#)
- Dao, Fu Ying, Lv, Hao, Wang, Fang, Feng, Chao Qin, Ding, Hui, Chen, Wei, & Lin, Hao. (2019). Identify origin of replication in *Saccharomyces cerevisiae* using two-step feature selection technique. *Bioinformatics*, 35(12), 2075–2083. [Google Scholar](#)
- Huang, Chung Jr, Lin, Henry, & Yang, Xiaoming. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 383–399. [Google Scholar](#)
- Jana, S., & Deb, J. K. (2005). Retracted Article: strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 289–298. [Google Scholar](#)
- Klumpp, Stefan. (2011). Growth-rate dependence reveals design principles of plasmid copy number control. *PLoS One*, 6(5), e20403. [Google Scholar](#)
- LagasséLagassé, H. A. Daniel, Alexaki, Aikaterini, Simhadri, Vijaya L. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*, 6. [Google Scholar](#)
- Ningsih, Hardian, Ramdan, Evan Purnama, Septariani, Dwiyiyati Nurul, Sari, Miranda Ferwita, Fajarfika, Resti, Lestari, Widya, Junaedi, Abdus Salam, Putri, Ria, & Joeniarti, Elika. (2021). *Pengantar Bioteknologi*. Yayasan Kita Menulis. [Google Scholar](#)
- Radji, Maksum. (2009). Vaksin DNA: Vaksin generasi keempat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 6(1), 4. [Google Scholar](#)
- Rosano, Germán L., & Ceccarelli, Eduardo A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. [Google Scholar](#)

Copyright holder:

I Wayan Martadi Santika, Putu Eka Arimbawa (2022)

First publication right:

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

This article is licensed under:

