

Uji Stabilitas Ekspresi Gen *CryI*Ac dalam Transforman Jagung R3 dan R4

Sutrisno, Toto Hadiarto, Tri J. Santosa, Ifa Manzila, dan Bahagiawati

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Pada tahun 2000 telah diperoleh transforman R2 dan R3 yang menunjukkan reaksi tahan terhadap penggerek batang jagung Asia, sehingga diduga transforman tersebut positif mengandung protein kristal produk gen *cryI*Ac. Pada tahun 2001, gen *cryI*Ac diuji ekspresinya pada transforman R3 dan R4. Uji ekspresi dilakukan dengan mendeteksi adanya protein kristal sebagai produk dari gen *cryI*Ac. Deteksi protein kristal dilakukan dengan Dot Blot-ELISA. Untuk melakukan Dot Blot-ELISA serangkaian penelitian perlu dilakukan yang meliputi, pe-nyiapan protein kristal *cryI*Ac sebagai kontrol positif, optimasi reaksi kimia ELISA dengan protein *cryI*Ac dari isolat Bt (kontrol positif), dan reaksi kimia ELISA dengan protein *cryI*Ac dari transforman. Dari 10 isolat Bt yang diduga mengandung *cryI*Ac diamplifikasi dengan primer spesifik terhadap gen *cryI*Ac. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa 4 isolat mengandung fragmen DNA pada ukuran yang sesuai dengan harapan. Empat isolat tersebut diperbanyak dalam media Lurient Broth dan protein kristal *cryI*Ac diisolasi dari isolat tersebut untuk digunakan sebagai kontrol positif. Dot Blot-ELISA terhadap protein kristal dari keempat isolat tersebut menunjukkan reaksi positif. Dot Blot-ELISA terhadap protein dari tanaman transforman menunjukkan reaksi negatif.

Kata kunci: Ekspresi gen *cryI*Ac, Dot Blot-ELISA

ABSTRACT

In the fiscal year of 2000 we have obtained transformans R2 dan R3 that shows resistance to Asian corn borer, so it was expected that these transformans may positive to contain *cryI*Ac crystal protein. In the fiscal year of 2001, *cryI*Ac gene was tested its expression in the transformans R3 dan R4. Testing the expression was done by detecting the present of *cryI*Ac crystal protein. The crystal protein was detected using Dot Blot-ELISA. In carrying out Dot Blot-ELISA, a series of activities was carried out, namely preparation *cryI*Ac crystal protein as positive control, optimization of reaction between chemicals for ELISA with *cryI*Ac crystal protein from Bt isolat (as positive control), and reaction of chemicals for ELISA with protein from maize transformans. Bt isolat tested that was expected to contain *cryI*Ac crystal protein were amplified with primers specific for *cryI*Ac gene. The results of amplification indicate that four isolates contain a DNA fragmen with the size the same with *cryI*Ac DNA fragments. The four isolates were multiplied in the Lurient Broth Media and *cryI*Ac crystal protein was isolated from those culture and use as a positive control. Dot Blot-ELISA for crystal protein derived from the four isolates showed positive reaction. Dot Blot-ELISA using protein extracted from maize transformants showed negative reaction.

Key words: Expression *cryI*Ac genes, Dot Blot-ELISA

PENDAHULUAN

Hasil transformasi yang berupa transforman jagung diharapkan telah mengandung gen *cryIAC* yang secara stabil terintegrasi dalam genom tanaman jagung. Gen tersebut diharapkan dapat mengekspresikan protein kristal. Pada waktu gen *cryIAC* dimasukkan ke dalam sel jaringan, gen tersebut kemungkinan akan menjadi 2 macam, yaitu gen *cryIAC* akan tetap utuh yang dilengkapi dengan gen regulator dan gen *cryIAC* tidak utuh lagi karena kehilangan salah satu atau lebih bagian gen. Gen *cryIAC* yang masih utuh dan menyemat pada genom tanaman jagung, diharapkan dapat menghasilkan protein kristal. Sedangkan gen *cryIAC* yang tidak utuh, walaupun menyemat pada genom tanaman jagung, tentu tidak akan menghasilkan protein kristal. Hanya gen *cryIAC* yang utuh yang menyemat pada genom tanaman jagung yang dapat menghasilkan protein kristal.

Gen *cryIAC* yang dimasukkan ke dalam sel jaringan akan menyemat secara acak pada bagian-bagian kromosom. Gen yang menyemat pada bagian kromosom yang tepat, akan menghasilkan protein kristal secara optimal dan stabil pada generasi selanjutnya. Gen yang menyemat pada bagian kromosom yang tidak tepat, dapat menyebabkan gen itu tidak menghasilkan protein kristal. Walaupun gen itu dapat menghasilkan protein kristal, kemungkinan rendah sekali tingkat ekspresinya. Tempat penyematan gen *cryIAC* pada kromosom akan mempengaruhi ekspresi atau tingkat ekspresi protein kristal.

Uji ekspresi gen *cryIAC* dapat dilakukan dengan berbagai cara. Uji ekspresi dapat dilakukan dengan mendeteksi ada/tidak produk gen *cryIAC* (protein kristal) dalam tanaman. Deteksi protein kristal dapat dilakukan dengan mereaksikan protein contoh dengan antibodi protein kristal *cryIAC* dengan uji Dot Blot-ELISA.

Uji ekspresi secara langsung mulai dilakukan pada tahun anggaran 1999/ 2000 yang dilanjutkan pada tahun anggaran 2001. Tujuan pengujian tersebut ialah untuk mengetahui apakah gen *cry* telah masuk atau terintegrasi dengan genom jagung, maka perlu dilakukan uji secara molekuler terhadap keberadaan gen *cry* pada genom tanaman jagung. Tanaman jagung yang akan diuji merupakan hasil penelitian pada tahun anggaran 1998/1999. Apabila tanaman jagung telah positif mengandung gen *cry*, maka langkah selanjutnya adalah mengetahui apakah gen *cry* dalam tanaman jagung itu mampu mengekspresikan pembentukan protein kristal.

Kemampuan gen *cry* dalam genom jagung untuk mengekspresikan protein kristal akan menentukan kegiatan selanjutnya. Apabila gen *cry* genom jagung positif menghasilkan protein kristal, maka dapat ditentukan langkah selanjutnya, yaitu uji kemampuan protein kristal untuk mematikan serangga hama jagung. Tetapi apabila ternyata protein kristal yang dihasilkan genom jagung tidak mematikan serangga hama jagung, maka perlu dilakukan penembakan lagi terhadap kultur embrio dengan gen *cry*. Dari penelitian ini akan diperoleh tanaman jagung yang positif menghasilkan protein kristal.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Protein Kristal dari Isolat Bt

Identifikasi Isolat Bt yang Mengandung Gen *CryIAc*

Sembilan isolat Bt yang pada penelitian terdahulu menunjukkan adanya gen *cryIAc* diuji kembali menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik untuk gen *cryIAc*. Sedikit isolat diambil dan dimasukkan ke dalam plate pereaksi PCR. Setelah dilisis, DNA isolat diamplifikasi dengan primer spesifik gen *cryIAc*. Fragmen DNA diseparasi dengan elektroforesis pada gel agarose.

Perbanyakkan Bt *CryIAc* dan Isolasi Protein Kristal

Bacillus thuringiensis diperbanyak dengan metode Travers *et al.* (1987). Isolat Bt diinkubasikan pada media agar T3 pada suhu 26°C sampai sporulasi dan lisis (selama 2-3 hari). Kultur Bt dipanen, disuspensikan dalam 10 ml PBS, disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan penuh, dan dibuang supernatnya. Pelet disuspensikan dalam PBS, disentrifus, dan dibuang supernatnya. Kegiatan ter-sebut diulang 3 kali.

Pelet disuspensikan dalam 1 kali volume bufer alkalis (*carbonate buffer*) dan diinkubasikan selama 1 malam pada suhu 37°C. Larutan disentrifus, diambil supernatnya (dibuang peletnya). Supernatan ini mengandung protein kristal yang di-sebut protoksin.

Dot Blot-ELISA Kristal Protein Bt

Larutan kristal protein dari 4 isolat Bt yang positif mengandung gen *cryIAc* di-teteskan pada membran selulose. Hasil tetesan pada membran dibiarkan mengering selama 1 jam. Membran kemudian diblok dengan merendam pada larutan bufer TBS yang mengandung susu skim tanpa lemak (2%) dan Triton 100 (2%) selama 1 jam pada suhu ruang dengan dishaker. Proses hibridisasi dilakukan dengan merendam membran pada larutan antibodi *cryIAc* dan menginkubasinya selama semalam dengan dishaker. Membran dicuci 3 kali dengan bufer TTBS. Selanjutnya membran diinkubasi pada antibodi sekunder (*Goat Anti Rabbit*) selama 1 jam. Setelah itu, membran dicuci 3 kali dengan bufer TTBS dan deteksi protein dilakukan dengan pewarnaan NBT-BCIP.

Persiapan Material Tanaman

Jagung ditanam pada pot plastik di dalam Fasilitas Uji Terbatas. Setelah tanaman berdaun 5, contoh daun diambil untuk analisis protein kristal.

Isolasi Protein

Daun segar (0,8 g) dipotong kecil-kecil kemudian diekstrak dengan 1-1,2 ml bufer ekstrak (0,05 M Tris-HCl pH 7, 10% glycerol, 200 ul 100 mM PMSF dalam 20 ml bufer), kemudian dipindahkan ke tube 1,5 ml dan disimpan dalam es. Sampel di-sentrifus 2 kali (sekali 10 menit, kedua kalinya 5 menit). Setiap kali setelah disentri-fus, supernatan dipindahkan ke tube microsentrifus baru. Kuantitas protein diesti-masi dengan protein assay kit II (Promega 500-0001).

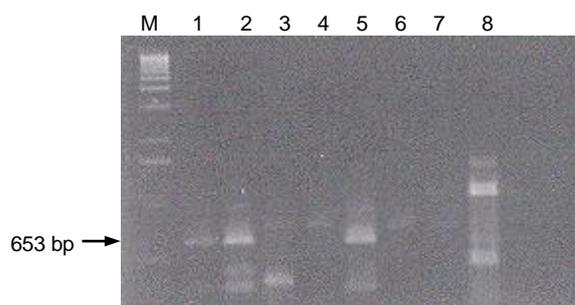
Dot Blot-ELISA Protein Tanaman

Larutan protein yang diisolasi dari contoh daun diteteskan ke atas membran selulose. Hasil tetesan pada membran dibiarkan mengering selama 1 jam. Mem-bran kemudian diblok dengan merendam pada larutan bufer TBS yang mengan-dung susu skim tanpa lemak (2%) dan Triton 100 (2%) selama 1 jam pada suhu ruang dengan dishaker. Proses hibridisasi dilakukan dengan merendam membran pada larutan antibodi *cryIAc* dan menginkubasinya selama semalam dengan dishaker. Membran dicuci dengan bufer TTBS selama 3 kali. Selanjutnya membran diinkubasi pada antibodi sekunder (*Goat Anti Rabbit*) selama 1 jam. Setelah itu, membran dicuci 3 kali dengan bufer TTBS dan deteksi protein dilakukan dengan pewarnaan NBT-BCIP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Protein Kristal dari Isolat Bt

Dari 9 isolat Bt yang diamplifikasi dengan primer spesifik untuk gen *cryIAc*, 3 isolat positif mengandung gen *cryIAc* yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA berukuran 653 bp. Hasil amplifikasi PCR dari 10 isolat Bt ditampilkan pada Gambar 1. Ketiga isolat Bt yang mengandung gen *cryIAc* diperbanyak dengan metode Travers untuk mendapatkan protein kristal standar. Isolat Bt yang diperbanyak dalam media LB cair selama 2-3 hari pada suhu kamar telah menunjukkan proses sporulasi dan lisis dari sel Bt. Hasil sporulasi dan lisis dalam erlenmeyer dapat dilihat dari adanya endapan pada dasar labu erlenmeyer. Endapan pada labu erlenmeyer tersebut kemudian



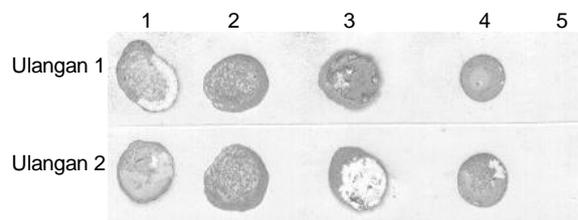
Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR 9 isolat Bt lokal Indonesia menggunakan primer spesifik gen *cryIAc*

disentrifugasi dengan kecepatan maksimum (12.000 rpm). Supernatan dibuang dan pelet digunakan sebagai sumber protein kristal.

Protein endapan tersebut adalah protein kasar yang terdiri dari berbagai macam protein. Protein endapan terdiri dari berbagai enzim, protoksin, dan toksin. Protoksin dan toksin merupakan target dari penelitian ini. Protoksin dan toksin akan dijadikan rujukan untuk menentukan ada tidaknya protoksin dan toksin pada tanaman hasil transformasi. Keberhasilan identifikasi protoksin dan toksin merupakan faktor penentu pada penelitian selanjutnya.

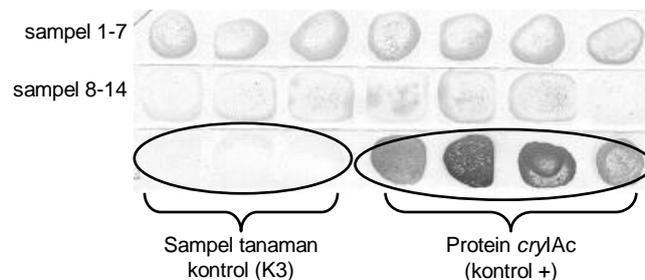
Optimasi Uji Dot Blot-ELISA

Uji Dot Blot-ELISA dioptimasi menggunakan protein kristal *cryIAC* standar. Protein kristal standar yang digunakan adalah protein kristal hasil isolasi dari isolat Bt yang positif mengandung gen *cryIAC*. Protein kristal yang berasal dari 4 isolat Bt yang mengandung gen *cryIAC* telah berhasil diisolasi. Hasil Dot Blot-ELISA menunjukkan bahwa keempat protein kristal tersebut positif bereaksi dengan antibodi *cryIAC* (Gambar 2). Hal tersebut menunjukkan bahwa protein kristal hasil isolasi dari Bt lokal Indonesia dapat digunakan sebagai standar protein kristal *cryIAC*.



1 = protein dari isolat Bt Jtm341, 2 = protein dari isolat Bt Jtm342, 3 = protein dari isolat Bt Jtm944, 4 = protein dari isolat Bt Jtg541, 5 = bufer

Gambar 2. Hasil optimasi pengujian Dot Blot protein kristal *cryIAC* dari Bt lokal Indonesia



1 = A1.1, 2 = A2.1, 3 = A3.4, 4 = A4.3, 5 = A5, 6 = A6.1, 7 = B1.2, 8 = B2.4, 9 = B3.2, 10 = B4.3, 11 = C1, 12 = D2, 13 = E3, 14 = A7.1

Gambar 3. Hasil pengujian Dot Blot-ELISA terhadap 14 sampel transforman tanaman jagung hasil penembakan dengan gen *cryIAC*

Uji Dot Blot-ELISA terhadap Protein dari Transforman

Beberapa tanaman yang secara bioasai telah terbukti efektif berpengaruh terhadap penggerek jagung Asia telah ditanam di Fasilitas Uji Terbatas. Segera setelah optimasi uji Dot Blot-ELISA selesai, maka protein kristal dari tanaman transforman digunakan untuk uji Dot Blot-ELISA. Hasil uji Dot Blot-ELISA terhadap protein dari transforman ditampilkan pada Gambar 3. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa dari 14 contoh yang diuji tidak satu pun yang menunjukkan reaksi positif terhadap antibodi gen *cryIAc* sehingga dapat disimpulkan bahwa ke-14 transforman tersebut tidak mengandung protein *cryIAc*.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Dot Blot-ELISA protein kristal *cryIAc* yang berasal dari isolat Bt menunjukkan reaksi positif dengan antibodi gen *cryIAc*.
2. Dot Blot-ELISA protein tanaman transforman menunjukkan reaksi negatif.
3. Upaya memperoleh transforman jagung perlu dilakukan lagi dengan menembak embrio muda dalam jumlah yang lebih banyak daripada sebelumnya.

DAFTAR BACAAN

- Ceron, J.L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cry* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60(1):353-356.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Part II. Clinical applications. Annals New York Academy of Sciences 121(2):404-436.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology 14:745-750.
- Rao, K.V., K.S. Rathore, T.K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D.P. Bown, K.S. Powell, J. Spence, A.M.R. Gatehouse, and J.A. Gatehouse. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. Plant Journal 15(4):469-477.
- Stewart, C.N., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W.A. Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. Plant Physiol. 112:121-129.

Travers, R.S., P.A.W. Martin, and C.F. Reichelder. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1263-126.