



Konstruksi Strain Haploid *Saccharomyces cerevisiae* Pembawa Kromosom XII yang Terpotong pada Sisi Kanan Lokus *rDNA*

Construction of Saccharomyces cerevisiae haploid strain carrying splitted chromosome XII at right region of rDNA locus

TRIASTUTI RAHAYU^{1,♥}, DONNY WIDIANTO^{2,3},
TRIWIBOWO YUWONO^{2,3}

¹ Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah Surakarta (UMS) Sukoharjo 57102

² Program Studi Bioteknologi Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta 55281.

³ Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta 55281.

Diterima: 15 Maret 2004. Disetujui: 17 Mei 2004.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae has a great potential for fermentation industry and molecular biology research. Many works have been conducted to increase *S. cerevisiae* growth rate. The objective of this research was to obtain a *rDNA* fragment of chromosome XII of *S. cerevisiae* with splitting at right region of *rDNA* locus. Chromosome XII was splitted by using a chromosome-splitting vector (pDW49) that carried a cloned DNA fragment of *rDNA* locus. An *E. coli* strain DH5 α was used as a host for pDW49 amplification. The pDW49 plasmid was digested with *Bam*HI to eliminate the *HIS3* DNA stuffer. The larger *Bam*HI fragment was isolated by agarose gel electrophoresis. The *Bam*HI fragment was subsequently self-ligated, resulting in the Tr ends being joined head-to-head. The recircularized DNA molecule was linearized by cleavage at the homologous sequence (at the right region of *rDNA* locus) using *Bgl*III. The linearized DNA molecule was introduced into *S. cerevisiae* strain W303-1A by lithium acetate method. Confirmation of chromosome XII splitting was analyzed by PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) for 24 h with switching interval of 45 sec followed by 6 h run with switching interval of 15 sec. The result of PFGE showed an additional chromosomal band (611 kbp), suggesting that the chromosome XII has been splitted.

♥ Alamat korespondensi:
Jl. Pabelan, Sukoharjo 57102
Tel. +62-271-717417
Fax. +62-271715448
e-mail: biology@mipa.ums.ac.id (ed.).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Chromosome XII and *rDNA*.

PENDAHULUAN

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir yang banyak digunakan dalam industri fermentasi dan sebagai jasad model dalam penelitian-penelitian biologi molekular. Oleh karena itu, banyak dilakukan usaha perbaikan strain-strain *S. cerevisiae* untuk meningkatkan produktivitas maupun kualitas produk yang

dihasilkan dengan biaya produksi yang lebih rendah. Pendekatan dalam perbaikan strain khamir tersebut dapat dicapai melalui metode-metode genetika, baik yang konvensional seperti: mutasi, hibridisasi seksual dan seleksi, maupun teknik-teknik yang baru dikembangkan seperti: fusi protoplas, transformasi, dan DNA rekombinan, atau kombinasi dari kedua kategori metode genetika tersebut (Shimizu, 1994).

Peningkatan kecepatan pertumbuhan merupakan salah satu perbaikan strain khamir yang sampai saat ini belum dapat dicapai dengan memuaskan karena banyak faktor yang terlibat dalam menentukan kecepatan pertumbuhan khamir. Widiyanto *et al.* (1996) melaporkan bahwa pemotongan kromosom XI (666 kbp) dan kromosom VIII (563 kbp) pada *S. cerevisiae* dapat meningkatkan kecepatan pertumbuhannya, tetapi mekanisme peningkatan kecepatan pertumbuhan tersebut belum jelas.

Woolford dan Warner (1991) menunjukkan bahwa transkripsi *rRNA* dan *mRNA* untuk protein ribosomal pada khamir *S. cerevisiae* meningkat dan mencapai aras tertinggi dalam waktu 30 menit setelah pemindahan ke media yang mendukung pertumbuhan yang lebih cepat. Ditunjukkan pula bahwa kecepatan biosintesis ribosom pada khamir merupakan pencerminan kecepatan pertumbuhan. Diduga karena *rDNA* terletak berulang-ulang secara tandem pada kromosom XII (Kaback dan Davidson, 1980; Petes, 1980), menyebabkan kecepatan transkripsi *rDNA* menjadi tinggi (Alberts, 1994). Walaupun kecepatan transkripsi *rDNA* berperan dalam mengatur kecepatan pertumbuhan khamir, tetapi Woolford dan Warner (1991) menyimpulkan bahwa jumlah unit *rDNA* juga berperan dalam mengatur biosintesis ribosom. Hal ini terutama terjadi setelah adanya periode inkubasi yang diperpanjang seperti yang telah ditunjukkan dalam penelitian yang dilakukan oleh Rustchenko *et al.* (1993).

Engberg dan Pearlman (1972) dan Rustchenko *et al.* (1993) melaporkan bahwa suatu jasad yang sedang mengalami pertumbuhan akan mengakumulasi *rRNA* dalam jumlah banyak. Demikian pula yang terjadi pada *Candida albicans* dan *Tetrahymena pyriformis*, yang mengakumulasi *rRNA* pada saat pertumbuhan logaritmik.

Dari uraian di atas kemudian dilakukan suatu pendekatan molekular untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan khamir, yaitu dengan memotong kromosom XII *S. cerevisiae* yang membawa *rDNA* kemudian bagian tersebut diisolasi dan dimasukkan ke sel-sel khamir yang akan ditingkatkan kecepatan pertumbuhannya. Pada penelitian ini dilakukan pemotongan kromosom XII tepat pada sisi kanan lokus *rDNA* menggunakan metode pemotongan secara *in vivo* (Widiyanto, 1997).

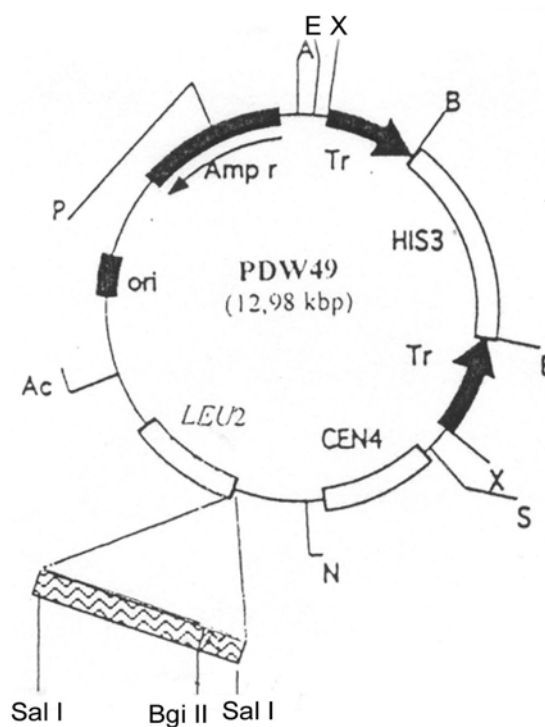
BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Khamir *S. cerevisiae* W303-1A (*MATa ade2-1 trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112*), sebagai inang khamir untuk pemotongan kromosom XII. Medium pertumbuhan khamir adalah YPAD (mengandung adenin 40 mg/l) dan *SD-LEU2*. Bakteri *Escherichia coli* DH5 α (*supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1, gyrA96 thi-1 relA1*), sebagai inang untuk amplifikasi DNA plasmid. Medium pertumbuhan bakteri *E. coli* adalah medium LB (Luria Bertani) cair dan padat.

Vektor Plasmid

Plasmid pemotong kromosom XII, yakni: pDW49, merupakan plasmid koleksi Ir. Donny Widiyanto, Ph.D. Struktur plasmid tersebut tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur plasmid pDW49.

Persiapan plasmid pDW49 sebagai vektor pemotong kromosom XII pada sisi kanan lokus *rDNA* secara *in vitro*

Plasmid pDW49 diamplifikasi dalam *E. coli* DH5 α yang ditumbuhkan dalam medium LB cair yang mengandung ampisilin 50 μ g/ml. Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan metode *mini-prep* (Sambrook *et al.*, 1989) dengan sedikit modifikasi. Setelah DNA plasmid diperoleh,

dipotong menggunakan enzim *Bam*HI untuk menghilangkan *stuffer* di antara dua telomer. Isolasi fragmen besar dari gel dilakukan dengan ekstraksi fenol dan presipitasi etanol (Sambrook *et al.*, 1989). DNA disirkularkan dengan bantuan T4 DNA ligase. DNA yang sudah sirkular, dilinearkan kembali dengan enzim *Bgl*III pada sekuen homolog dengan sisi kanan lokus *rDNA* kromosom XII *S. cerevisiae*.

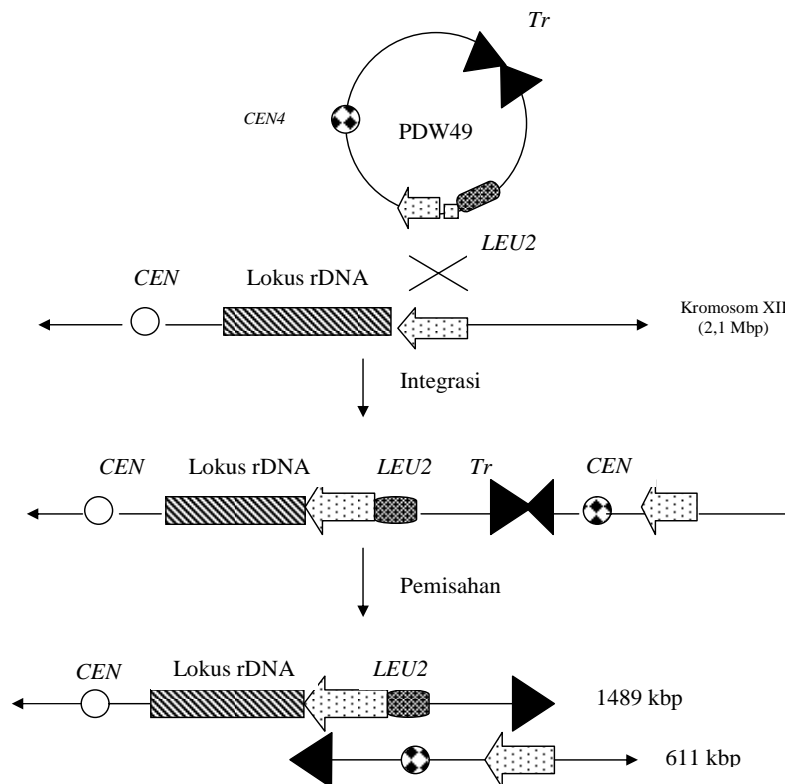
Pemotongan kromosom XII dengan plasmid pDW49

DNA plasmid yang sudah disiapkan secara *in vitro* digunakan untuk transformasi sel khamir W303-1A dengan metode litium asetat (Ito *et al.*, 1983). Konfirmasi pemotongan kromosom XII dilakukan dengan *Contour Clamped Homogeneous Field (CHEF) Electrophoresis* menggunakan sistem CHEF-DRII (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) di bawah kondisi seperti tertera pada gambar 3. Sampel DNA dimasukkan dalam bentuk *agarose plug* seperti diuraikan Carle dan Olson, 1985, dengan sedikit modifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

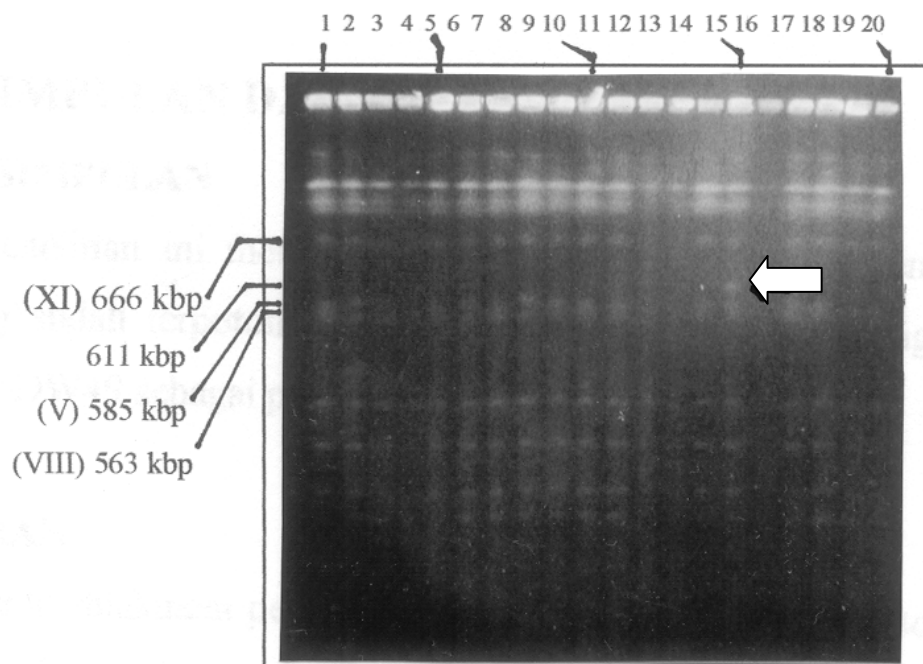
Pemotongan kromosom XII pada sisi kanan lokus rDNA

Orr-Weaver *et al.* (1983) mengatakan bahwa untuk meningkatkan frekuensi integrasi dari plasmid yang ditransformasi ke dalam sel khamir perlu dilakukan pemotongan pada sekuen homolog. Dalam hal ini pemotongan dilakukan pada sisi kanan lokus *rDNA* yang telah diklon ke dalam plasmid pDW49 (Widiyanto, 1997) dengan enzim restriksi *Bgl*III. Di tempat itulah diharapkan terjadi integrasi antara plasmid pemotong kromosom dengan kromosom XII *S. cerevisiae* melalui mekanisme rekombinasi (Widiyanto *et al.*, 1996; Widiyanto, 1997). Oleh karena hubungan antara dua ujung telomer sangat rapuh, maka kromosom akan terpisah menjadi dua kromosom yang monosentrik (Widiyanto *et al.*, 1996; Widiyanto, 1997). Proses pemotongan kromosom XII *S. cerevisiae* pada sisi kanan lokus *rDNA* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Proses pemotongan kromosom XII *S. cerevisiae* secara *in vivo* pada sisi kanan lokus *rDNA* dengan plasmid pDW49. Integrasi pDW49 ke dalam kromosom XII pada sekuen sisi kanan lokus *rDNA* melalui proses rekombinasi diikuti pemisahan kromosom menjadi dua buah kromosom monosentrik. Keterangan:

- ◀ : Klon fragmen DNA sisi kanan lokus
- ◀ : Telomer
- ▨ : Lokus *rDNA*, ◼ : *LEU2*, → : Telomer alami
- : Sentromer kromosom
- ⊙ : Sentromer pDW49



Gambar 3. Hasil penapisan transforman khamir dengan PFGE. Lajur ke-15 merupakan khamir yang membawa kromosom XII yang sudah terpotong pada sisi kanan lokus *rDNA* dengan ukuran 611 kbp. Kondisi elektroforesis: *switching interval* 45 detik selama 24 jam dilanjutkan 15 detik selama 6 jam; suhu 14°C, tegangan 200 Volt, dalam 0,5 X bufer TBE. Keterangan: Lajur 1) Strain khamir kontrol (W303-1A), lajur 2-20) strain khamir transforman pDW49, lajur 15) strain khamir transforman yang terpotong pada sisi kanan lokus *rDNA* seperti yang dikehendaki. -->: potongan kecil kromosom XII (611 kbp).

Penapisan transforman dilakukan dari 165 transforman dan didapatkan satu transforman yang membawa kromosom XII yang sudah terpotong pada sisi kanan lokus *rDNA* (gambar 3 lajur 15). Fragmen DNA yang terlihat hanya satu pita berukuran 611 kbp. Ukuran total kromosom XII ~2,1 Mbp, sehingga masih ada fragmen sisa sebesar \pm 1489 kbp. Hasil PFGE tidak dapat menunjukkan secara jelas posisi fragmen tersebut.

Potongan kromosom XII yang membawa lokus *rDNA* (1489 kbp) sulit untuk dipisahkan, karena kromosom XII mempunyai anomali saat bermigrasi dengan PFGE. Johnston (1988) mengatakan bahwa kromosom XII (\pm 2,1 Mbp) bermigrasi lebih cepat daripada kromosom IV yang mempunyai ukuran lebih kecil (\pm 1,6 Mbp), karena kromosom XII membawa unit-unit *rDNA* yang berulang-ulang dan tersusun secara *tandem*. Dengan adanya anomali ini potongan kromosom yang besar sulit dijadikan petunjuk untuk mengetahui apakah kromosom XII sudah terpotong atau belum. Dari hasil visualisasi PFGE yang menampakkan adanya tambahan pita baru berukuran 611 kbp dapat diasumsikan

bahwa kromosom XII memang sudah terpotong menjadi dua buah kromosom monosentrik dengan ukuran 1489 kbp dan 611 kbp, seperti yang dikehendaki.

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menghasilkan strain haploid khamir pembawa kromosom XII yang sudah terpotong pada sisi kanan lokus *rDNA*, dengan menggunakan plasmid pDW49 sebagai plasmid pemotong kromosom. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu dengan memotong sisi kiri lokus *rDNA* untuk mendapatkan potongan kromosom yang sebagian besar membawa unit-unit *rDNA*. Vektor pemotong kromosom XII pada sisi kiri lokus *rDNA* sudah dikonstruksi, yaitu pDW46.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., D.B.J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing Inc..

- Carle, G.F. and M.V. Olson, 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 82: 3756-3759.
- Engberg, J. and R.E. Pearlman, 1972. The Amount of Ribosomal RNA Genes in *Tetrahymena pyriformis* in Different Physiological States. *Journal of Biochemistry* 26: 393-400.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkaline cations. *Journal of Bacteriology* 153: 163-168.
- Johnston J.R., R. Contopolou, and R.K. Mortimer. 1988. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. *Yeast* 4: 191-198.
- Kaback, D.B. and N. Davidson, 1980. Organization of the ribosomal RNA genes cluster in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* 138: 745-754.
- Orr-Weaver, T., J.W. Szostak, and R.J. Rothstein, 1983. *Genetics Applications of Yeast Transformation with Linear and Gapped Plasmids*. New York: Academic Press. Inc.
- Petes, T.D. 1980. Yeast rDNA Genes are located on chromosomes XII. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 76: 410-414.
- Rustchenko, E.P., T.M. Curran, and F. Sherman. 1993. Variations in the number of rDNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 175: 7189-7199.
- Sambrook, J. E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shimizu, K. 1994. Alcoholic beverages: Genetic improvement of yeasts. In: Murooka, Y. and T. Imanaka (eds.). *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*. New York: Marcel Dekker. Inc.
- Widianto, D. 1997. *Splitting and Fusing Chromosomes in Saccharomyces cerevisiae*. [Dissertation]. Okayama: Okayama University, Japan.
- Widianto, D., K.H., Mukai, S. Harasahima, and Y. Oshima, 1996. One step splitting of a chromosomes in haploid cells of *S. cerevisiae* and its effect on the cell proliferation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82:199-204.
- Woolford J.L. and J.R. Warner. 1991. The ribosome and its synthesis. In J.R., Broach, J.R. Pringle, and E.W. Jones (eds). *The Molecular and Cellular of the Yeast Saccharomyces, Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zakian, V.A. 1989. Structure and function of telomeres, *Annual Review of Genetics* 23:579-604.