

Kontruksi dan Ekspresi Protein Rekombinan Wee1 pada *Escherichia coli* strain BL21 (DE3)

Construction and expression of Wee1 recombinant protein in Escherichia coli strain BL21 (DE3)

Ladefa Primana Oktapan¹, Ardela Alief Maulani¹, Netty Ermawati², Bambang Sugiharto^{3,4*}

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

²Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

³Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

⁴UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi CDAST, Universitas Jember

*E-mail: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

ABSTRACT

Wee1 is a gene encoding for protein kinase that is located in the nucleus and it plays an essential role in determining the timing of mitosis. Overexpression of Wee1 in rice is resulting in increased plant size. However, the increasing plant size due to the increase of Wee1 protein expression is not elucidated. Immunodiagnostic using specific antibodies against Wee1 protein should be conducted to determine the role of the protein on cell division. This experiment was directed to construct Wee1 in an expression vector for synthesis of recombinant Wee1 protein using three strategies of construction. The three strategies were construction of full length (FL), deletion of putative binding site (BS), and deletion of N-terminal domain (Δ N) of Wee1. Restriction analysis with BamH1/SalI of FL-Wee1, BS-Wee1, and Δ N-Wee1 construct resulted in the different DNA fragments with molecular size at 1239, 1176, and 960bp, respectively. This result indicated that the Wee1 fragments have been successfully inserted in the expression plasmid which was further confirmed using DNA sequencing. Colony PCR analysis showed that *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) has been transformed with the constructs. The protein analysis using SDS-PAGE revealed that the recombinant protein of Wee1 synthesized in the *E.coli* containing Δ N-Wee1 construct, but not in FL-Wee1 and BS-Wee1 constructs. The Δ N-Wee1 protein was synthesized in an insoluble fraction with a molecular size of 38.8 kDa which is the same as the size estimated using the software ExpASY. Interestingly, the level of synthesized Δ N-Wee1 protein was not induced by IPTG concentration. Collectively, the results indicated that the DNA construct of Δ N-Wee1 is suitable for recombinant protein production.

Keywords: Wee1, construction, synthesis, recombinant protein, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Wee1 merupakan protein kinase yang berperan penting sebagai negatif regulator pada regulasi pembelahan sel ((Ko *et al.*, 2018; Nurse & Thuriaux, 1980). Protein Wee1 berpengaruh pada ukuran sel dengan menghambat regulasi pembelahan sel pada saat *check point* fase mitosis. Peran Wee1 dipengaruhi oleh regulasi post-translasi yaitu protein Wee1 terfosforilasi untuk menjalankan fungsinya (Qiu *et al.*, 2017). Saat proses pembelahan sel, protein Wee1 memfosforilasi Cyclin-dependent kinase (CDKs) dalam kompleks CDKs-Cyclin B dan berdampak pada penghambatan proses pembelahan sel (Lucena *et al.*, 2017).

Protein Wee1 dilaporkan mempunyai peranan penting dalam perkembangan biji jagung (Sun *et al.*, 1999). Overekspresi gen pengkode Wee1 diketahui menyebabkan peningkatan ukuran sel meristem akar pada

Arabidopsis (Siciliano *et al.*, 2019) dan meningkatkan ekspansi sel selama proses perkembangan buah pada tanaman tomat (Gonzalez *et al.*, 2007). Pada tanaman padi dihipotesiskan bahwa overekspresi gen Wee1 dapat meningkatkan produksi, sehingga dilakukan isolasi gen Wee1 (Ermawati & Wibisono, 2017). Lebih lanjut, over ekspresi gen Wee1 menghasilkan tanaman padi transgenik dengan morfologi daun berwarna hijau pekat dan ukuran tanaman lebih besar dari pada tanaman padi non-transgenik (Prasetyo *et al.*, 2018)

Untuk mengetahui analisis dan regulasi protein Wee1 diperlukan analisa pada tingkat protein Wee1. Analisis molekuler dapat dilakukan pada tingkat transkripsi atau ekspresi gen, maupun pada tingkat translasi atau proteinnya. Analisis biokimia tingkat protein perlu dilakukan untuk menentukan hubungan antara perubahan morfologi fenotipik dengan

ekspresi pada tingkat translasi protein Wee1. Analisa tingkat translasi dapat dilakukan dengan analisis immunoblot menggunakan antibodi untuk deteksi protein Wee1. Oleh karena itu diperlukan antibodi, dengan menginjeksi protein Wee1 sebagai antigen ke dalam hewan coba untuk memicu terbentuknya antibodi poliklonal (Ishii *et al.*, 2021)

Antibodi poliklonal merupakan serum immunoglobulin yang disintesis oleh hewan sebagai respon terhadap substansi asing yang masuk dalam tubuh. Setiap antibodi memiliki afinitas spesifik terhadap materi asing yang memicu sintesis antibodi tersebut. Suatu makromolekul asing yang mampu memicu pembentukan antibodi disebut antigen (Emantoko, 2001). Bagian dari antigen menginduksi terbentuknya respon antibodi disebut dengan epitop (Akbar *et al.*, 2021). Dalam proses pembuatan antibodi poliklonal, antigen dapat diperoleh secara cepat dan dalam jumlah yang cukup banyak dengan memanfaatkan teknik protein rekombinan.

Protein rekombinan merupakan protein yang disintesis menggunakan teknik DNA rekombinan dalam sel organisme. DNA sebagai materi genetik bila dikonstruksikan pada plasmid vektor ekspresi dapat digunakan untuk sintesis protein rekombinan. Banyak sel organisme yang bisa digunakan untuk sintesis protein rekombinan, tetapi sel bakteri *E. coli* lebih banyak digunakan karena mudah dan cepat pertumbuhannya. Akan tetapi tidak semua DNA dapat diekspresikan dan sering ditemukan beberapa masalah, seperti ekspresi protein rekombinan yang fungsinya berhubungan dengan proses pembelahan sel berdampak terhadap proses pertumbuhan sel inang. Tidak ada metode universal yang dapat digunakan, tetapi ada beberapa strategi untuk memperbaiki tingkat ekspresinya (Gopal & Kumar, 2013). Diantara strategi tersebut antara lain dengan cara mengubah urutan nukleotida DNA seperti menghilangkan sisi aktif (Rosano & Ceccarelli, 2014) dan menghilangkan ujung N-terminalnya (Sawitri *et al.*, 2016).

Produksi protein rekombinan dapat dilakukan dengan menyisipkan DNA target ke vektor ekspresi dan mentransformasikannya ke sel *host* (Sumirasih, 2018). Plasmid yang digunakan dalam proses penyisipan dapat mengandung 6xHis tag (asam amino histidine sebanyak enam kali) untuk mempermudah proses purifikasi menggunakan resin kromatografi afinitas NiNTA. Namun

demikian, transformasi gen target dalam vektor ekspresi ke sel *E. coli* belum tentu dapat mengekspresikan protein rekombinan. Beberapa masalah sering muncul sehingga gen tidak bisa diekspresikan membentuk protein. Teknik rekayasa gen agar dapat diekspresikan merupakan langkah penting untuk mendapatkan protein rekombinan.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi rekombinan protein Wee1 yang akan digunakan sebagai antigen untuk pembuatan antibodi poliklonal pada hewan coba. Gen Wee1 yang berada dalam vektor kloning dapat di subkloning pada vektor ekspresi sehingga protein target dapat diekspresikan (Schumann & Ferreira, 2004). Oleh karena itu, perlu adanya strategi pembuatan konstruk Wee1 agar dapat digunakan untuk produksi rekombinan protein Wee1. Pada penelitian ini, strategi penghilangan domain N-terminal Wee1 terbukti dapat mengekspresikan protein rekombinan Wee1.

METODE

Bahan

Gen Wee1 yang diisolasi dari tanaman padi digunakan sebagai bahan konstruksi pada vektor ekspresi (Ermawati & Wibisono, 2017). Konstruksi dilakukan dengan menggunakan plasmid pET28a (Novagen, Madison, USA) yang mempunyai 6x His-Tag. Konstruk DNA yang terbentuk kemudian ditransformasikan ke sel *E. coli* strain BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA) untuk sintesis protein rekombinan. Protein rekombinan ini nantinya akan diproduksi dan digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal spesifik protein Wee1.

Strategi konstruksi Wee1 pada plasmid pET28a

Strategi konstruksi Wee1 pada vektor ekspresi pET28a dilakukan dengan tiga macam strategi, yaitu menggunakan: (1) *full length* (FL-Wee1), (2) delesi (penghilangan) domain *putative kinase binding site* (delesi BS-Wee1), (3) delesi domain N-terminal (Δ N-Wee1). Konstruksi FL-Wee1 dilakukan dengan mengamplifikasi gen Wee1 menggunakan primer F1 yang disisipi situs pemotongan untuk BamHI pada ujung 5' dan primer R1 yang disisipi situs pemotongan untuk SalI pada ujung 3' (Tabel 1). DNA hasil PCR selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan SalI, kemudian diinsersikan pada plasmid pET28a (dinamakan konstruk 1). Delesi BS-Wee1 dilakukan dengan mengamplifikasi Wee1 pada ujung 5' menggunakan primer F2 yang mengandung situs pemotongan untuk SacI pada urutan basa ke 616 dan primer R1 (Tabel 1). DNA hasil PCR dipotong dengan enzim SacI dan SalI. Hasil pemotongan kemudian diinsersikan pada konstruk 1 yang telah dihilangkan domain *binding site* dengan SacI dan SalI (dinamakan Konstruk 2). Konstruk Δ N-Wee1 dilakukan dengan mengamplifikasi konstruk 1 menggunakan primer F3

yang mengandung situs pemotongan untuk *BamHI* pada posisi urutan nukleotida ke 283 dan primer R1 (Tabel 1). DNA hasil PCR selanjutnya dipotong dengan *BamHI* dan *SalI*, selanjutnya diinsersikan pada plasmid pET28a pada situs yang sama (dinamakan Konstruk 3). Inerseri gen *Wee1* pada plasmid pET28a dilakukan menggunakan Kit Rapid DNA ligation (Roche, Germany) dengan inkubasi pada suhu 16°C selama overnight. Metode ligase dilakukan sesuai manual kit.

Transformasi *Wee1* pada plasmid pET28a ke sel *E. coli* BL21 (DE3)

Plasmid mengandung gen *Wee1* hasil ligasi ditransformasikan ke sel kompeten *E. coli* BL21 (DE3) menggunakan metode *heat shock*, (Green & Sambrook, 2012). Sel transforman ditumbuhkan ke media padat LB (Luria Bertani) yang mengandung antibiotik 50 mg/L kanamisin. Identifikasi bakteri positif transforman mengandung gen target dilakukan dengan analisis PCR koloni. Koloni transforman selanjutnya ditumbuhkan di media LB cair mengandung antibiotik selama 16 jam dan dilakukan isolasi plasmid menggunakan kit isolasi plasmid (Tianggen, China). Konfirmasi keberadaan konstruk *Wee1* pada sel *E. coli* dilakukan dengan analisis PCR, analisis pemotongan enzim restriksi dan DNA sequencing.

Analisis PCR dan restriksi enzim

Analisis PCR dilakukan untuk memperbanyak urutan DNA spesifik sesuai dengan urutan primer yang telah ditentukan. Analisa PCR pada koloni bakteri dan plasmid hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan pasangan primer F1-R1 dan F2-R1 (Tabel 1). Reaksi PCR dilakukan menggunakan Kit (Roche, Germany) dengan tahapan predenaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus reaksi denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 55°C selama 30 detik, extension 72°C selama 1 menit, dan satu siklus final extension 72°C selama 5 menit.

Plasmid hasil isolasi dari masing masing koloni bakteri positif mengandung gen *Wee1* (FL, BS, dan Δ N-*Wee1*) dipotong dengan enzim restriksi *BamHI* dan *SalI* selama 3 jam pada suhu 37°C. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi dan analisa PCR selanjutnya divisualisasi menggunakan 1% gel agarose mengandung ethidium bromide (EtBr). Elektroforesis dilakukan dengan aliran tegangan listrik sebesar 100 volt selama 30 menit. Hasil pemisahan DNA dengan elektroforesis divisualisasi menggunakan GelDoc (Major Science, USA).

Ekspresi protein rekombinan pada *E. coli* BL21 (DE3)

Pengujian ekspresi gen *Wee1* dilakukan sesuai dengan Septian *et al.*, (2021) yaitu menumbuhkan bakteri *E. coli* BL21 (DE3) transforman pada 5 mL media LB cair mengandung antibiotik kanamisin 50 mg/L, digojok selama semalam pada suhu 37°C. Bakteri yang tumbuh digunakan sebagai starter dan disubkultur ke 50 mL media LB cair mengandung

antibiotik kanamisin 50 mg/L dengan perbandingan 1:50. Bakteri ditumbuhkan dengan penggojokan sampai OD 0,5 pada suhu 37°C. Setelah mencapai OD 0,5 ditambahkan inducer 0.1 mM IPTG dan pertumbuhan dilanjutkan selama 12 jam. Panen sel bakteri dilakukan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel bakteri yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi protein.

Ekstraksi protein dilakukan dengan menambahkan dan meresuspensi pellet bakteri dengan 3x volume buffer sonikasi mengandung 50mM Na₂HPO₄ dan 300 mM NaCl. Pemecahan sel bakteri dilakukan dengan sonikasi selama 30 detik sebanyak 6 kali pada suhu 4°C. Setelah sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit, supernatan diambil sebagai protein terlarut (*soluble*) dan pellet diresuspensi kembali dengan 2x volume buffer yang mengandung 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 8M Urea. Protein tidak terlarut (*insoluble*) diekstraksi dengan cara sonikasi selama 30 detik x 6 kali dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan yang diperoleh merupakan protein tidak terlarut (*insoluble*). Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metoda *Bradford*.

Visualisasi protein dengan SDS-PAGE

Untuk melihat profil protein hasil ekspresi gen *Wee1*, ekstrak protein total, protein terlarut dan protein tidak terlarut dipisahkan dengan SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, 12,5% acrylamide). Sebanyak 15 µg protein ditambahkan loading buffer SDS-PAGE, kemudian didenaturasi dengan pemanasan pada suhu 95°C selama 3 menit. Protein dipisahkan dengan elektroforesis pada 80-volt selama 3 jam. Protein yang telah terpisah diberi pewarnaan dengan *Commasie Brilliant Blue* (CBB) untuk mengetahui profil pita protein.

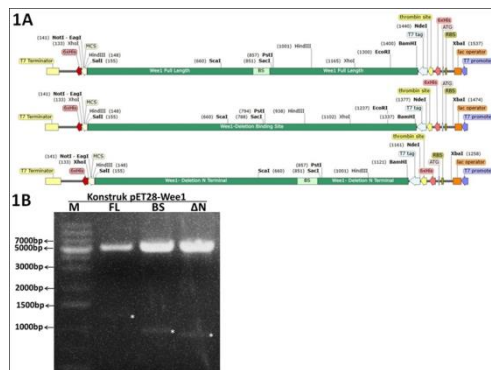
Tabel 1. Primer yang digunakan untuk konstruksi gen *Wee1* ke vektor ekspresi

F1- <i>BamHI</i>	5'-GGATCCTTATCGTGGCAAAC-3'
F2- <i>SacI</i>	5'-CAGAGCTCCTAGATGACAAC-3'
F3- <i>BamHI</i>	5'-AGTGGATCCGATCAACGTG-3'
R1- <i>SalI</i>	5'-GCTTGTCGACTTATCGTGG-3'

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi gen *Wee1* pada plasmid pET28a

Untuk sintesis rekombinan protein *Wee1* diperlukan konstruksi DNA pada vektor ekspresi menggunakan tiga jenis strategi konstruk. Strategi yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan rekombinan protein, mengingat tidak semua DNA yang diekspresikan dalam sel *E. coli* dapat membentuk protein. Pembuatan DNA konstruk 1 (FL-*Wee1*), konstruk 2 (BS-*Wee1*), dan konstruk 3 (Δ N-*Wee1*) dilakukan menggunakan rancangan sesuai peta konstruk yang diilustrasikan pada Gambar 1A.



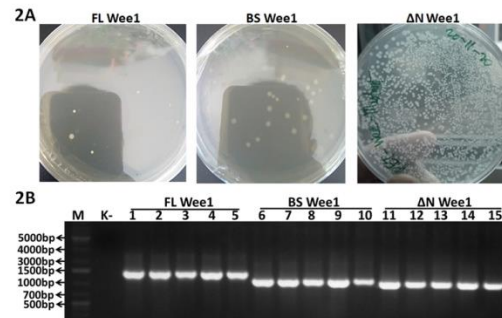
Gambar 1. Diagram peta konstruk gen Wee1 pada plasmid pET28a (A) dan visualisasi elektroforesis gel agarose (1%) hasil pemotongan enzim BamH1/Sal1 pada konstruk pET28a-Wee1 (B). Peta konstruk digambarkan menggunakan software SnapGene FL-Wee1, BS-Wee1 dan ΔN-Wee1 masing-masing adalah konstruk *full length* Wee1, delesi putative kinase binding site dan, delesi N-terminal. M, marker DNA 1 Kb Ladder, tanda panah menunjukkan posisi *fragment* DNA.

Hasil pemotongan konstruk 1,2 dan 3 menggunakan enzim BamH1/Sal1 menghasilkan fragmen DNA yang berbeda dengan ukuran masing-masing 1239 (Ermawati & Wibisono, 2017; Prasetyo *et al.*, 2018), 1176 dan 960 bp (Gambar 1B). Hal itu menunjukkan bahwa DNA Wee1 telah berhasil disisipkan pada vektor plasmid ekspresi sesuai dengan rancangannya. Untuk konfirmasi kebenaran konstruk juga telah dilakukan penentuan urutan nukleotida dengan *sequencing* yang menunjukkan ketepatan *design* konstruk 1, 2, dan 3 (data tidak disajikan).

Transformasi dan koloni PCR

Transformasi konstruk 1, 2, dan 3 pada sel *E. coli* BL21 (DE3) dilakukan dengan metode *heat shock*. Pertumbuhan koloni bakteri putative transforman pada media LB agar mengandung antibiotik kanamycin menunjukkan bahwa koloni yang paling banyak tumbuh yaitu pada *E. coli* yang ditransformasi dengan konstruk ΔN-Wee1 yaitu ± 250 koloni, disusul oleh konstruk delesi BS-Wee1 ± 25 koloni, dan paling sedikit konstruk FL-Wee1 ± 10 koloni (Gambar 2A). Analisis koloni PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi ada tidaknya gen *insert* pada *E. coli*. Hasil PCR menunjukkan bahwa semua koloni yang dianalisis memiliki pita DNA

sesuai dengan ukuran yang ditargetkan. FL-Wee1, delesi BS-Wee1, dan ΔN-Wee1 berturut-turut memiliki pita DNA berukuran 1239, 1176, dan 960bp. Hasil ini menunjukkan bahwa konstruk gen Wee1 telah berhasil tertransformasi pada sel *E. coli*. Perbedaan jumlah koloni pada masing-masing konstruk mungkin disebabkan akibat adanya ekspresi gen Wee1 yang dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* transforman utamanya pada konstruk FL-Wee1. Sedangkan konstruk 2 delesi BS jumlah koloninya juga sedikit diduga prediksi *domain putative kinase binding site* (BS) kurang tepat dan protein Wee1 masih memiliki aktivitas memphosphorilasi CDKs dan menghambat terjadinya pembelahan sel sehingga menyebabkan pertumbuhan jumlah koloni pada bakteri sedikit. Namun konstruk 3 ΔN-Wee1 melalui penghilangan N-terminal domain diduga dapat menghilangkan fungsi protein Wee1, sehingga protein Wee1 tidak dapat memphosphorilasi CDKs dan menginduksi terjadinya pembelahan sel sehingga banyak koloni *E. coli* yang tumbuh pada mutan ΔN-Wee1. N-terminal pada protein berperan sangat krusial dan berkorelasi terhadap fungsi protein.



Gambar 2. Pertumbuhan koloni bakteri *E. coli* BL21 (DE3) pada media seleksi LB padat (A) visualisasi dari elektroforesis hasil PCR koloni (B). Pertumbuhan koloni dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang muncul sesudah 24 jam inkubasi suhu 37°C sebanyak 3 ulangan. Sebanyak 20μl DNA hasil PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose (1%). Line 1 s/d 5 adalah koloni 1 s/d 5 untuk masing masing jenis konstruk Wee1. M, marker DNA 1 kb Ladder, (-) kontrol negatif koloni bukan transforman.

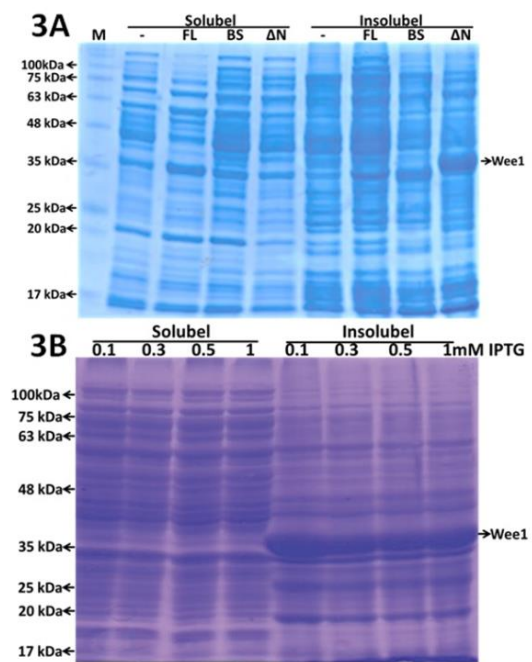
Contoh lain juga terjadi pada *coat*-protein seperti yang dilaporkan oleh Apriasti *et al.* (2018), penghilangan N-terminal pada *coat* protein mengakibatkan pengurangan efektivitas resistensi tanaman transgenik terhadap serangan virus.

Analisis ekspresi protein rekombinan Wee1 menggunakan SDS-PAGE.

Untuk melihat ekspresi rekombinan protein Wee1 yang dihasilkan oleh 3 macam konstruk Wee1, bakteri *E.coli* transforman ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung antibiotik kanamicin 50 mg/L dan diinduksi dengan 0,1mM IPTG setelah OD mencapai 0.5. Pertumbuhan bakteri dilanjutkan pada suhu 37°C selama 16 jam. Pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan *E.coli* FL dan delesi BS lambat dan hanya mencapai OD600 masing masing 0,3 dan 0,8 sesudah ditumbuhkan 16 jam. Namun *E.coli* ΔN-Wee1 menunjukkan pertumbuhan normal dengan OD600 mencapai 1.8. Perbedaan pertumbuhan bakteri disebabkan oleh adanya regulasi fosforilasi dari protein Wee1 yang diekspresikan di sel bakteri. Saat bakteri mengekspresikan protein rekombinan Wee1 *full-length* dan *deletion binding Site*, kedua protein tersebut masih memiliki aktivitas memfosforilasi CDKs pada kompleks CDKs-Cyclin (Qiu *et al.*, 2018; Lucena *et al.*, 2017). CDKs-cyclin yang terfosforilasi tersebut tidak dapat melanjutkan siklus sel ke fase mitosis sehingga menyebabkan terhambatnya proses pembelahan sel yang berdampak pada rendahnya OD pertumbuhan bakteri. Menariknya, bakteri transforman mutan ΔN-Wee1 menunjukkan pertumbuhan bakteri yang normal. Hal ini menunjukkan bahwa protein ΔN-Wee1 yang diekspresikan oleh *E.coli* telah kehilangan fungsi (kehilangan sisi aktif) yang berperan dalam proses fosforilasi CDKs, sehingga ekspresi ΔN-Wee1 tidak mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

Setelah sel bakteri dipanen, selanjutnya diekstraksi dan ditentukan pola pita (profil) proteinnya dengan SDS-PAGE. SDS PAGE bertujuan untuk membedakan ekspresi protein dari 3 konstruk DNA Wee1. Profil protein dilihat pada 3 fraksi ekstraksi yaitu total protein, protein terlarut dan protein tidak terlarut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa profil protein terlihat tidak berbeda antara bakteri kontrol mengandung plasmid pET28a tanpa *insert* dan bakteri yang mengandung plasmid pET28a dengan insersi FL-Wee1, baik pada fraksi total,

protein terlarut dan protein tidak terlarut. Hasil yang serupa juga didapatkan dari ekspresi protein konstruk BS-Wee1. Profil protein dari fraksi total, terlarut dan tidak terlarut terlihat sama antara bakteri kontrol dan bakteri transforman (Gambar 3A). Penambahan pengiduksi IPTG juga tidak mengubah pola protein yang dihasilkan. Akan tetapi, ekspresi konstruk ΔN-Wee1 terlihat jelas adanya perbedaan profil protein antara bakteri kontrol dan transforman. Satu pita protein baru berukuran sekitar 38,8 kDa, muncul pada ekstrak protein total dan protein tidak terlarut, tetapi tidak muncul pada protein terlarut.



Gambar 3. Pemisahan protein rekombinan dengan SDS -PAGE. (A) Visualisasi protein terlarut (*soluble*) dan tidak terlarut (*insoluble*) dan (B) Pengaruh induksi IPTG terhadap kandungan protein rekombinan. Protein diekstraksi dari sel bakteri *E.coli* transforman dan dipisahkan dengan SDS-PAGE (12.5% *acrylamide*), kemudian diwarnai dengan CBB. FL, BS dan ΔN berturut-turut adalah profil protein dari konstruk FL-Wee1, BS-Wee1 dan ΔN-Wee1. M, adalah marker protein, tanda (-) protein dari *E. coli* kontrol mengandung pET28a tanpa insersi gen Wee1.

Ukuran protein tersebut sama dengan prediksi ukuran protein menggunakan software ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/), yaitu 38,8 kDa. Ukuran protein Wee1 sebesar 38,8 kDa merupakan ekspresi parsial dari FL-Wee1, dimana ukuran protein FL-Wee1 yaitu sekitar 45,6 kDa pada Jagung (Sun *et al.*, 1999). Pemberian penginduksi IPTG 0,1, 0,3, 0,5 dan 1mM tidak meningkatkan ekspresi protein yang dihasilkan, tetapi jelas bahwa konstruk Δ N-Wee1 diekspresikan dan menghasilkan protein baru. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian IPTG pada konsentrasi 0,1mM mampu menginduksi ekspresi protein rekombinan dengan optimal sehingga pemberian konsentrasi yang lebih tinggi tidak memberikan perubahan ekspresi protein yang signifikan.

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa penghilangan (*sequence* nukleotida) domain N-terminal dapat mengekspresikan protein rekombinan Wee1 pada *E.coli*. Protein rekombinan ini yang akan diproduksi dan dipurifikasi untuk digunakan sebagai antigen dalam pembuatan antibodi poliklonal Wee1. Selain itu, penelitian ini dapat dikembangkan untuk mengeksplorasi dan mengkarakterisasi protein Wee1 untuk mengetahui asam amino yang berperan dalam regulasi pembelahan sel terutama pada proses fosforilasi dan dephosphorilasi CDKs.

KESIMPULAN

Konstruk plasmid Δ N-Wee1 dapat diekspresikan pada sel *E.coli* BL21 (DE3) dan menghasilkan rekombinan protein Wee1 dengan ukuran sekitar 38,8 kDa. Akan tetapi konstruk plasmid FL-Wee1 dan BS-Wee1 tidak menghasilkan protein. Walaupun rekombinan protein target diekspresikan dalam bentuk protein tidak larut, tetapi protein ini dapat dipurifikasi dan digunakan sebagai antigen untuk induksi antibodi poliklonal pada hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar R, Robert PA, Pavlović M, Jeliakzov JR, Snapkov I, Slabodkin A, Weber CR, Scheffer L, Miho E, Haff IH, Haug DTT, Lund-Johansen F, Safonova Y, Sandve GK & Greiff V. 2021. A Compact Vocabulary of Paratope-Epitope Interactions Enables Predictability of Antibody-Antigen Binding. *Cell Reports*. **34**(11): 108856.
- Apriasti R, Widyaningrum S, Hidayati WN, Sawitri WD, Darsono N, Hase T & Sugiharto B. 2018. Full Sequence of The Coat Protein Gene is Required for The Induction of Pathogen-Derived Resistance Against Sugarcane Mosaic Virus in Transgenic Sugarcane. *Molecular Biology Reports*. **45**(6): 2749-2758.
- Emantoko S. 2001. Antibodi Rekombinan: Perkembangan Terbaru dalam Teknologi Antibodi. *Unitas*. **9**(2): 29-43.
- Ermawati N & Wibisono Y. 2017. Early Isolation of Cell Cycle-Associated Protein Kinase (Oswee) Gene in Rice (*Oryza Sativa* L.). *Biotechnol*. **14**(1): 71-76.
- Gonzalez N, Gévaudant F, Hernould M, Chevalier C & Mouras A. 2007. The Cell Cycle-Associated Protein Kinase Wee1 Regulates Cell Size in Relation to Endoreduplication in Developing Tomato Fruit: Wee1 and Cell Size Control in Tomato. *The Plant Journal*. **51**(4): 642-655.
- Gopal GJ & Kumar A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*. **32**(6): 419-425.
- Green M & Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual. 4th Edition, Vol II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ishii M, Nakakido M, Caaveiro JMM, Kuroda D, Okumura CJ, Maruyama T, Entzminger K & Tsumoto K. 2021. Structural Basis for Antigen Recognition by Methylated Lysine-Specific Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. **296**: 100176.
- Ko C, Ma J, Bartnik R, Haney MH & Kang M. 2018. Ethical Leadership: An Integrative Review and Future Research Agenda. *Ethics & Behavior*. **28**(2): 104-132.
- Lucena R, Alcaide-Gavilán M, Anastasia SD & Kellogg DR. 2017. Wee1 and Cdc25 are Controlled by Conserved PP2A-dependent Mechanisms in Fission Yeast. *Cell Cycle*. **16**(5): 428-435.
- Nurse P & Thuriaux P. 1980. Regulatory Gene Controlling Mitosis In The Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. **96**(3): 627-637.
- Prasetyo FHH, Sugiharto B & Ermawati N. 2018. Cloning, Transformation and Expression of Cell Cycle-Associated Protein Kinase OsWee1 in Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. **16**(2): 573-579.
- Qiu C, Yi Y, Lucena R, Wu M, Sun J, Wang X, Jin Q & Wang Y. 2017. SCFPof3 and

- SCFPof1 Regulate Wee1 Degradation and Mitotic Entry in Fission Yeast. *Journal of Cell Science*. **jcs.202895**.
- Rosano GL & Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. **5**.
- Sawitri WD, Narita H, Ishizaka-Ikeda E, Sugiharto B, Hase T & Nakagawa A. 2016. Purification and Characterization of Recombinant Sugarcane Sucrose Phosphate Synthase Expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: An Importance of The N-terminal Domain for an Allosteric Regulatory Property. *Journal of Biochemistry*. **159**(6): 599-607.
- Schumann W & Ferreira LCS. 2004. Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*. **27**(3): 442-453.
- Septian A, Neliana IR, Kusumawardani B & Sugiharto B. 2021. Pengujian Potensi Alergenitas Coat Protein Sugarcane Mosaik Virus Pada Tanaman Tebu transgenik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, **8**(2): 2008-2019.
- Siciliano I, Lentz Grønlund A, Ševčíková H, Spadafora ND, Rafiei G, Francis D, Herbert RJ, Bitonti MB, Rogers HJ & Lipavská H. 2019. Expression of Arabidopsis Wee1 in Tobacco Induces Unexpected Morphological and Developmental Changes. *Scientific Reports*. **9**(1): 8695.
- Sumirasih T. 2018. Kajian DNA Rekombinan pada Vaksin DNA dan Vaksin Subunit Protein. *Pharma Medika*. **10**(2): 108-128.
- Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, Jung R, Gordon-Kamm WJ & Larkins BA. 1999. Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and Its Activity in Developing Endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**(7): 4180-4185.

