

# DETEKSI DELESI DAN MUTASI PADA GEN MX1 (GEN RESISTEN TERHADAP VIRUS INFLUENZA) PADA BABI DENGAN PCR-RFLP NAR I RESTRIKSI

CECE SUMANTRI<sup>1</sup>, T. MOROZUMI<sup>2</sup>, dan N. HAMASHIMA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Ternak,  
Jurusan Ilmu Produksi Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Bogor, Indonesia  
<sup>2</sup> Animal Genome Research Team of STAFF Institute, Tsukuba, Japan

(Diterima dewan redaksi 21 Nopember 2000)

## ABSTRACT

SUMANTRI, C., T. MOROZUMI, and N. HAMASHIMA. 2001. Detection of deletion and mutation on pig Mx1 gene (gene resistance to influenza virus) with PCR-RFLP Nar I restriction. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1):34-37.

The study was done to detect the incident of deletion and mutation in exon 14th of Mx1 gene in pig. Six hundred base pairs at the position (1937 to 2537) of the 14th exon of the pig Mx1 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from 15 breed of pig DNA sample. The amplified PCR products were digested by Nar I enzyme that called restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The results show genetic polymorphism at the 14th exon of pig Mx1 gene. The Nar I digested revealed three phenotypic variation (C/C, C/N and N/N, designated for Nar I cut homozygote, heterozygote and for Nar I no cut homozygote, respectively). The Nar I (N/N or C/N) type is corresponding to (1) the deletion 11 bp at the position 2064 to 2075. This type was observed in Landrace breed. (2) the incidence of two point mutation at the position 2065 Guanine (G) change to Thymine (T) and at the position 2124 Guanine (G) change to Adenine (A). This type was observed in Chinese native pig (Meishan) and Vietnamese native pig.

**Key words:** Deletion, mutation, pig Mx1 gene and PCR-RFLP

## ABSTRAK

SUMANTRI, C., T. MOROZUMI, dan N. HAMASHIMA. 2001. Deteksi Delesi dan Mutasi pada Gen Mx1 (Gen Resisten terhadap Virus Influenza) pada Babi dengan PCR-RFLP Nar I Restriksi. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(1):34-37.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya kejadian delesi dan mutasi pada gen Mx1 babi. Enam ratus "base pair" pada posisi 1937 to 2537 telah berhasil diamplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dari sampel DNA 15 bangsa babi. Pemotongan hasil produk PCR dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi Nar I yang disebut *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) teknik. Hasil dari PCR-RFLP menunjukkan adanya polimorfisme dengan tiga variasi fenotipik dengan simbol (C/C dapat dipotong homozigot, C/N dapat dipotong heterozigot dan N/N tidak dapat dipotong homozigot). Produk PCR yang tidak bisa dipotong (N/N atau C/N) oleh Nar I diakibatkan oleh adanya (1) delesi 11 bp pada 2064 s/d 2075. Tipe ini ditemukan pada bangsa babi Landrace dan (2) oleh adanya dua mutasi pada posisi 2065 Guanin (G) berubah menjadi Timin (T) dan pada posisi 2124 Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A), tipe ini ditemukan pada bangsa babi asli dari China (Meishan) dan babi asli dari Vietnam.

**Kata kunci:** Delesi, mutasi, gen Mx1 babi dan PCR-RFLP

## PENDAHULUAN

Gen Mx1 pada industri peternakan mempunyai nilai ekonomis tinggi, karena gen ini dapat mengontrol resistensi terhadap virus influenza (*mycovirus*). STAEHELI *et al.* (1988) melaporkan pada mencit gen Mx1 dikontrol oleh dua alel yaitu Mx1<sup>+</sup> dan Mx1<sup>-</sup>. Alel Mx1<sup>+</sup> sangat resisten terhadap influenza dan ditemukan umumnya pada mencit liar, sebaliknya alel Mx1<sup>-</sup> sangat rentan ditemukan umumnya pada mencit laboratorium. Lebih lanjut dilaporkan oleh HUG *et al.* (1988) gen Mx1 mencit terdiri dari 14 exon dengan runutan

DNAnyanya sekitar 5,5 Kilo basa (Kb). Gen Mx1 pada babi juga terdiri dari 14 exon dengan total panjang runutan DNAnyanya 2,54 Kb. Mx1 protein babi, sekuense asam aminonya menunjukkan homologi yang tinggi dengan mencit (MULLER *et al.*, 1992). Mx1 protein pada babi juga ditemukan homolog dengan berbagai spesies lainnya seperti pada manusia (AEBI *et al.*, 1989), domba (CHARLESTON dan STEWART, 1993), itik (BAZZIGHER *et al.*, 1993), ayam (BERNASCONI *et al.*, 1995), sapi (ELLINWOOD *et al.*, 1998), dan ikan (LEONG *et al.*, 1998).

Penelitian Mx1 gen pada hewan besar terutama untuk mendeteksi adanya delesi atau mutasi gen dan yang ada hubungannya dengan resistensi genetik terhadap virus influenza masih dirasakan sangat kurang. Atas dasar itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan informasi-informasi dasar tentang Mx1 gen pada babi. Pada tahap pertama difokuskan pada exon-14 dan selanjutnya akan diteruskan pada exon-exon yang lainnya.

## MATERI DAN METODE

### Analisis PCR-RFLP

Ekstraksi DNA dilakukan menurut SAMBROOK *et al.* (1989) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 63 sampel kulit telinga lebih kurang seluas (5 mm<sup>2</sup>) dari 15 bangsa babi diekstraksi untuk diambil DNANYA. Setiap sampel kulit telinga dimasukkan kedalam tabung *epENDORF* 1,5 ml yang berisi 70 µl NP-40 buffer, 500 µl SDS buffer, dan 10 µl proteinase-K (10 mg/ml). Larutan dalam tabung dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 55°C dalam *waterbath* selama 24 jam. Setelah itu, tambahkan 4 µl Rnase (0,1µg /ml) dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah proses inkubasi selesai, kedalam larutan ditambahkan 30 µl 3M Na-asetat dan 300 µl phenol. Tabung disentrifugasi 15000 rpm selama 5 menit, supernatan dipindahkan kedalam tabung baru, ditambahkan 1,2 ml etanol dan sentrifugasi 15000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan putih dalam tabung dikeringkan. Setelah pengeringan selesai ditambahkan 500 µl *milique water steril* atau *TE buffer steril*.

Analisis PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut: 50 ng sampel DNA, 50 ng primer *forward* (F) dengan runutan DNA (5' AAG CGC ATC TCC AGC CAC ATC), 50 ng primer *reverse* dengan runutan DNA (5' TGA CCC TTC TAT GAT GCT ATG), 2 µl 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 2 mM dNTPs dan 0,2 µl 4 Unit *AmpliTaQ gold* DNA polimerase dan tambahkan *milique water steril* sampai total volume 20 µl. Tabung tersebut dimasukkan kedalam mesin PCR dengan program sebagai berikut: Tahap 1, proses denaturasi 94°C selama 10 menit, 1 X ulangan. Tahap 2, proses denaturasi pada 94°C selama 30 detik, diikuti dengan proses *annealing* (penggabungan kembali) pada suhu 55°C selama 30 detik dan proses ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Seluruh proses pada Tahap 2 dilakukan dengan 40 X ulangan. Tahap 3, ekstensi tambahan pada suhu 72°C selama 5 menit, 1 X ulangan.

Analisis PCR-RFLP dilakukan dengan cara produk PCR, dipotong dengan enzim restriksi Nar I. Sebanyak 5 µl DNA produk PCR, 0,2 µl 5 Unit Nar I, 1 µl 10x *low* buffer dimasukkan kedalam 0,5 ml *epENDORF*, tambahkan *milique water steril* sampai total volume 10 µl, dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

Elektroforesis dilakukan sebagai berikut: 5 µl produk PCR-RFLP, 2 µl loading dye, 3 µl milique water dicampurkan secara homogen dan kemudian dimasukkan kedalam sumur gel agarose 1%. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 Volt, selama 25 menit dan dengan pewarnaan *etidium bromide* selama 20 menit. Pemotretan gel dilakukan diatas UV transiluminator dengan kamera polaroid.

### Sekuensing DNA

Total sebanyak 63 produk PCR masing-masing 10 µl dicampurkan dengan pre-sekuensing kit (1 µl alkaline phosphatase, 1 µl exonuclease) diinkubasi pada 37°C selama 15 menit dan pada suhu 80°C selama 15 menit. Sebanyak 5 µl dari larutan ini, kemudian ditambahkan kedalam 15 µl sekuensing buffer kit (2 µl *big dye terminator*, 9 µl milique water steril, 3 µl sequencing buffer dan 1 µl masing-masing primer). *Big dye terminator* program dilakukan dengan cara dipanaskan pada suhu 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik dan 60°C selama 4 detik. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan mesin ABI Model 377 sekuenser otomatis (Perkin- Elmer-Cetus, CA).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Produk PCR exon-14 gen Mx1 sepanjang 600 bp pada posisi (1937 sampai dengan 2537) dari 15 bangsa babi teramplifikasi diperlihatkan pada Gambar 1.

**Gambar 1.** Hasil amplifikasi PCR exon-14 gen Mx1 babi yang dielektroforesis pada 1% agarose. (M4) DNA marker  $\phi$  X174/Hae III digest dan M6)  $\lambda$ /Sty I digest

Hasil pemotongan produk PCR (600 bp) oleh enzim restriksi Nar I (PCR-RFLP) diperlihatkan pada Gambar 2. Terdapat tiga variasi fenotipe yang dapat digambarkan sebagai berikut: (1) Satu garis menunjukkan bahwa kedua rantai DNA tidak bisa dipotong oleh enzim Nar I, diberi kode N/N

(homozigot); (2) Dua garis menunjukkan bahwa kedua rantai bisa dipotong oleh enzim Nar I, diberi kode C/C (homozigot); dan (3) Tiga garis menunjukkan bahwa ada satu rantai DNA yang bisa dipotong, sedangkan pasangannya tidak bisa dipotong dan diberi kode C/N (heterozigot).

bisa dipotong (Tipe N/N) disebabkan oleh adanya faktor delesi dan dua mutasi. Delesi sepanjang 11 bp (GGCGCCGGCTC) dari posisi 2064 sampai dengan 2075 ditemukan pada babi Landrace dengan nomor individu (L5-39). Mutasi pada posisi 2065 Guanin (G) berubah menjadi Timin (T) dan pada posisi 2124 Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A), type ini ditemukan pada bangsa babi asli dari China (Meishan) dan babi asli dari Vietnam.

Enzim restriksi Nar I pada gen Mx1 mempunyai satu daerah runutan DNA pengkode (*Recognition sequence*) yang spesifik dengan runutan basa DNA GGCGCC. Pada kasus delesi yaitu hilangnya rantai DNA sepanjang 11 bp (2064 sd 2075) dan mutasi gen, enzim restriksi Nar I tidak bisa memotong rantai DNA disebabkan oleh runutan DNA pengkodennya hilang atau berubah.

Hubungan antara delesi dan mutasi pada Mx1 gen dengan resistensi terhadap influenza dapat dijelaskan berdasarkan hasil penelitian STAEHELI *et al.* (1988). Alel Mx1<sup>+</sup> memberikan kode kepada interferon (IFN) – alpha dan beta untuk memproduksi 72 Kda Mx1 protein yang berfungsi untuk memblokir replikasi virus didalam inti. Alel Mx1<sup>-</sup>, tidak mampu memproduksi protein Mx1 disebabkan oleh dua hal (1) adanya delesi pada exon 9, 10, dan 11, kasus ini ditemukan pada strain mencit C57BL/6J, C3H/HeJ dan BALB/cJ. Dan (2) adanya mutasi pada exon 10, kasus ini ditemukan pada strain mencit CBA/J.

**Gambar 2.** Hasil Nar I (PCR-RFLP) exon-14 gen Mx1 babi yang dielektroforesis pada 1% agarose. No. 3,15, 20 (C/C). No. 4,5, 10,11,19 (N/N) dan No. 1,2,6,7,8,9,12,13,14,16,17,18 (C/N). (M4) DNA marker  $\phi$  X174/Hae III digest dan (M6)  $\lambda$  /Sty I digest

Tabel 1, memperlihatkan sebagian hasil runutan DNA exon-14 gen Mx1 sepanjang 80 bp dari posisi 2051 bp sampai dengan 2131 bp. Rantai DNA tidak

**Tabel 1.** Sekuensing exon-14 gen Mx1 pada berbagai bangsa babi

Bangsa babi	Type Nar I	Pola sekuen gen Mx I pada posisi 2051 s/d 2131 bp
	C: bisa dipotong N: Tidak bisa dipotong (No identitas)	
Large white	CC (W3-288)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Yucatan mini	CC (Y6-60)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Duroc	CC(D5-757)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Berkshire	CC(B-2303)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Goetingen	CC(G2-101)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Homong	CC(HL4)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Mongkai	CC(Mc-57)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
I pig	NN(IL-31)	CTGACCCAGG CTCIGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AAGGCACGT
Meishan	NN(M6-27)	CTGACCCAGG CTCIGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AAGGCACGT
Meishan	CC(M6-88)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Landrace	CC(L-133)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Landrace	NN(L5-39)	CTGACCCAGG CTC ----- GCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT
Babi liar (Jepang)	CC(WI-2104)	CTGACCCAGG CTCGGCGCCG GCTCGCCAAG TTCCCAGGCT GAACCGGACT CTCCAGGCGGCC CGGGGTCTCC AGGGCACGT

Perubahan struktur Mx1 protein pada kasus delesi dan mutasi juga dijelaskan oleh STAEHELI *et al.* (1993). Struktur Mx1 protein mempunyai dua fungsi domain yaitu: (1) Domain terminal-N sebagai regulator GTP (guanosine-5'-triphosphate) *binding protein* yang berkemampuan mengikat dan menghidrolisa GTP. (2) Domain terminal-C yang berperan penting sebagai regulator *protein binding protein* terutama dalam interaksi protein dengan protein, karena domain ini kaya akan *leucine zipper motif*. GTP *binding protein* dan regulator *protein binding protein* ini merupakan faktor penting dalam menghambat aktivitas virus. Terjadinya delesi dan mutasi pada kedua domain ini, akan mengakibatkan individu tersebut menjadi rentan terhadap influenza.

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa PCR-RFLP Nar I restriksi dapat dipakai untuk mendeteksi adanya delesi dan mutasi pada exon-14 gen Mx1 babi. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui apakah delesi dan mutasi pada exon ini ada hubungannya dengan resistensi terhadap influenza.

#### DAFTAR PUSTAKA

- AEBI, M., J. FAH, N. HURT, C.C. SAMUEL, D. THOMIS, L. BAZZIGHER, J. PAVLOVIC, O. HALLER, and P. STAEHELI. 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol. Cell. Biol.* 9(11):5062-5072.
- BAZZIGHER, L., A. SCHWARZ, and P. STAEHELI. 1993. No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein. *Virology* 195(1):100-112.
- BERNASCONI, D., U. SCHULTZ, and P. STAEHELI. 1995. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *Virology* 15(1):47-53.
- CHARLESTON, B. and H.J. STEWART. 1993. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high level expression in the endometrium of pregnansheep. *Gene* 137 (2):327-331.
- ELLINWOOD, N.M., J.M. MCCUE, P.W. GORDY, and R.A. BOWEN. 1998. Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *J. Interferon Cytokine Res.* 18(9):745-755.
- HUG, H., M. COSTAS, P. STAEHELI, M. AEBI, and C. WEISSMANN. 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon and virus-inducible promotor. *Molec. Cell. Biol.* 8:3065-3079.
- LEONG, J.C., G.D. TROBRIDGE, C.H. KIM, M. JOHNSON, and B. SHIMON. 1998. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol Rev.* 166:349-363.
- MULLER, M., E.L. WINNACKER, and G. BREM. 1992. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* 12(2):119-129.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbour Lab. Press. New York.
- STAEHELI, P., R. GROB, E. MEIR, J.G. SUTCLIFFE, and O. HALLER. 1988. Influenza-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol. Cell. Biol.* 8(10):4518-4523.
- STAEHELI, P., F. PITOSI, and J. PAVLOVIC. 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol.* 3:268-272.