

**KLONING DAN EKSPRESI
GEN *wingless-type MMTV integration site family member 4* MENCIT SEBAGAI
KANDIDAT ANTIGEN UNTUK IMUNOKONTRASEPSI SATWA LIAR**

Agung Janika Sitasiwi

INTISARI

Imunokontrasepsi merupakan proses yang menggunakan sistem imun dalam tubuh untuk menghalangi fertilitas. Konsep imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi dan mengidentifikasi protein atau gen yang berperan penting dalam salah satu tahap proses reproduksi untuk digunakan sebagai antigen. Beberapa jenis peptida telah dikembangkan sebagai sumber antigen tetapi belum memberi efek yang berkelanjutan. Protein dan gen yang terekspresi dalam uterus merupakan sumber dan sasaran antigen yang sampai saat ini belum dikembangkan. Gen *wnt4* merupakan salah satu regulator proses implantasi embrio mencit dan manusia yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber antigen baru dalam imunokontrasepsi. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menemukan kandidat antigen baru yang dapat diterapkan untuk imunokontrasepsi satwa liar.

Penelitian dilakukan dalam tiga bagian, yaitu deteksi ekspresi protein *Wnt4*, amplifikasi dan sekuensing gen *wnt4*, serta kloning dan ekspresi protein rekombinan gen *wnt4*. Protein dan mRNA diisolasi dari *implantation site* uterus mencit Swiss Webster dengan usia kebuntingan tujuh hari. Deteksi ekspresi protein *Wnt4* dilakukan dengan metode *immunoblotting* menggunakan *Kit Western Breeze* (Invitrogen) dan *antibody anti-Wnt4* (Santa Cruz Ltd.). Sintesis *cDNA* dilakukan dengan RT-PCR menggunakan primer *forward* 5'-ACGTGCGAGAACTCAAAGG-3' dan primer *reverse* 5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'. Produk PCR disekuensing menggunakan ABI *Prism Genetic Analyser* (Applied Biosystems, USA). Hasil sekuensing dianalisis dengan program BLAST. Kloning produk PCR dilakukan pada vektor *pET SUMO* dan ditransformasi pada *E.coli* BL21. Transformasi DNA plasmid pada *E.coli* BL21 dilakukan menggunakan *The Champion pET SUMO Protein Expression System* dengan teknik *heat shock*. Hasil kloning dianalisis dengan mengamati hasil DNA *insert*, dilanjutkan amplifikasi DNA rekombinan. Ekspresi protein rekombinan diinduksi dengan penambahan IPTG pada media LB cair kemudian dievaluasi menggunakan SDS-PAGE.

Hasil deteksi ekspresi protein menunjukkan protein *Wnt4* memiliki berat molekul 40 kDa, memberi reaksi positif terhadap *antibody anti-Wnt4*. Hasil produk RT-PCR menunjukkan *band* berukuran 393 bp. Klon *E.coli* pembawa DNA plasmid rekombinan yang berhasil tumbuh sebanyak 13 klon. Hasil amplifikasi dan visualisasi DNA plasmid rekombinan menunjukkan *band* dengan ukuran 393 bp berhasil *insert* pada semua klon. Protein rekombinan terekspresi dengan berat molekul 33 kDa. Keseluruhan hasil penelitian ini membuktikan bahwa kloning gen *wnt4* mencit Swiss Webster telah berhasil dilakukan sehingga membuka peluang untuk digunakan sebagai sumber antigen baru.

Keywords: kloning, *wnt4*, imunokontrasepsi, *pET SUMO*, *E.coli* BL21

**CLONING and EXPRESSION of MICE *wingless-type MMTV integration site family member 4* GENE as IMMUNOCONTRACEPTION ANTIGEN CANDIDATE
For WILDLIFE**

Agung Janika Sitasawi

ABSTRACT

Immunocontraception is a procedure to alter the conception in animal using immune system. The concept of immunocontraception can be delivered firstly by isolating and identifying protein or gene that significantly plays a role in one of the reproductive processes to be used as antigen. Some peptides have been developed as source of antigen, however, it does not give a satisfactory result. Wnt4 gene is a regulator of mammalian embryo implantation process could be develops as source of the antigen candidates immunocontraception. The aim of this study is to find de novo antigene candidate that is applicapble for wildlife immunocontraception.

The study was undergone in three stages: detection of Wnt4 protein expression, amplification and sequencing of wnt4 gene, and cloning of wnt4 gene followed by expression of recombinant proteins. Protein and RNA wnt4 was isolated from implantation site of mice uterine at seven days gestational age. The detection of Wnt4 protein expression was run by immunoblotting methode using Kit Western Breeze (Invitrogen) and antibody anti-Wnt4 (Santa Cruz Ltd.). The synthesis of cDNA used RT-PCR with forward primer 5'-ACGTGCGAGAACTCAAAGG-3' and reverse primer 5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'. Cloning of PCR products is done in vector pET SUMO and transformed into *E. coli* BL21. Insert DNA analysis was done by isolating the recombinant plasmid DNA of each clone and then amplified by PCR using the primers used for gene amplification by RT-PCR, followed by electrophoresis on 1.5% agarose gel, and visualized in ultraviolet transilluminator. Recombinant protein expression was induced by addition of IPTG in LB liquid medium and then evaluated using SDS-PAGE.

The result of the protein expression shows that protein with molecular weight 40kDa gives positive reaction to antibody anti Wnt4. The visualization of RT-PCR product shows sized band 393 bp. There were 13 clones of *E.coli* that succesfully grow in LB medium. The result of amplification and visualization of recombinant plasmid DNA shows a band with the size of 393 bp successfully inserted in all clones. The recombinant protein expressed with a molecular weight between 33 kDa. Overall the results of this study demonstrate that the cloned gene and protein expression Wnt4 Swiss Webster mice will be very beneficial as an antigen source in regulating fertility of wildlifes.

Keywords: cloning, wnt4, immunocontraception, pET SUMO, *E.coli* BL21