Penentuan Struktur Protein BmaN1 dengan SC-XRD

Program PPMI FMIPA Penelitian KK

Ihsanawati [1], Fernita P.[1], Firdaus A.[1], Shafwa F. N.[1], Ellsie V. P.[1], Fifi F. M.[1], dan Dessy Natalia[1]

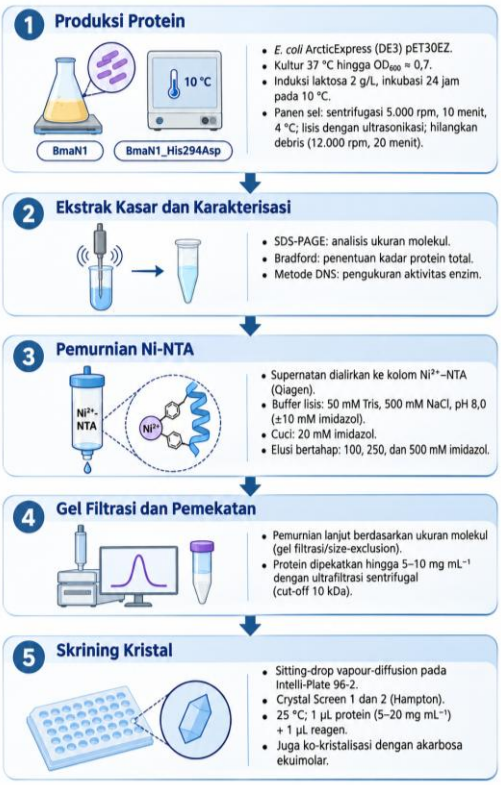
[1] Kelompok Keilmuan Biokimia dan Rekayasa Biomolekul FMIPA ITB

Abstrak

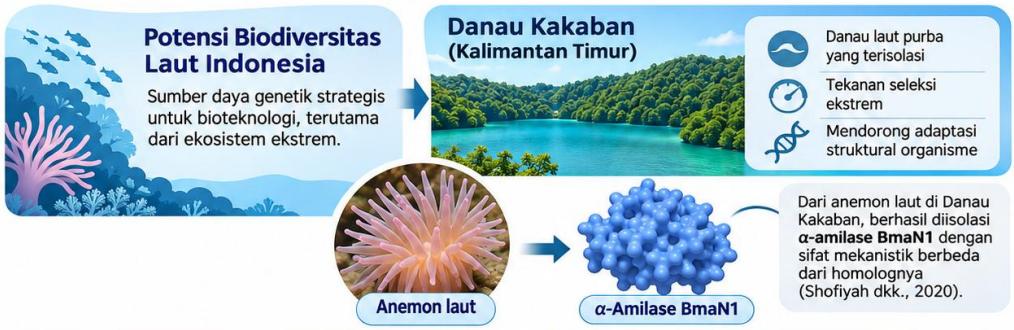
α-Amilase BmaN1 dari bakteri Bacillus megaterium NL2, simbion anemon laut di ekosistem ekstrem dan terisolasi Danau Kakaban, Kalimantan Timur, memiliki susunan residu katalitik yang menyimpang dari famili α-amilase umumnya. Residu aspartat nukleofilnya bergeser (+1) dari titik konservatif, sedangkan residu penstabil kompleks enzim-substrat digantikan oleh histidine (His294). Meskipun konfigurasi unik ini hanya dimiliki BmaN1, enzim tersebut tetap efektif menghidrolisis pati larut maupun granular seperti jagung dan singkong, yang mengindikasikan mekanisme katalisis baru namun belum terungkap akibat ketiadaan data struktur tiga dimensinya. Penelitian ini bertujuan menghasilkan kristal mutan BmaN1_His294Asp dan menentukan struktur tiga dimensinya menggunakan Single Crystal X-Ray Diffraction (SC-XRD) milik SIPA PUAPT DPMK ITB untuk mengungkap peran His294 dalam stabilitas pusat aktif. BmaN1 telah diproduksi dari sel Escherichia coli dan dimurnikan dengan teknik kromatografi afinitas menghasilkan pita dominan pada ukuran 56 kDa. Hasil pemurnian protein ini belum menghasilkan Kristal. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya pita berukuran 45 kDa. BmaN1 harus dimurnikan lebih lanjut dengan teknik kromatografi gel filtrasi sebelum dikristalkan.

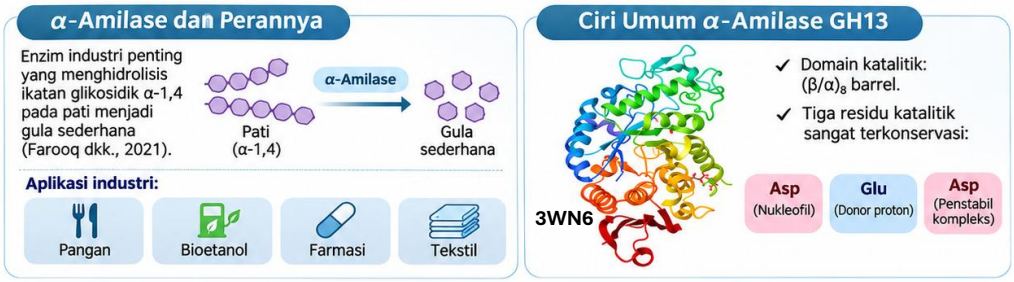
Kata kunci: α-Amilase BmaN1, Bacillus megaterium NL2, Danau Kakaban, Histidin294 BmaN1, Kristal protein

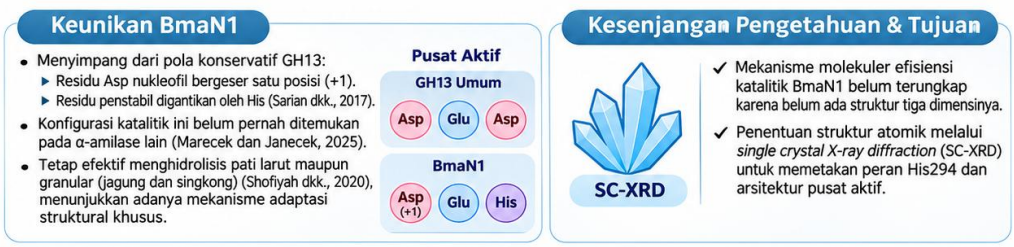
Metode Penelitian



Pendahuluan

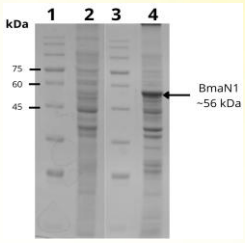






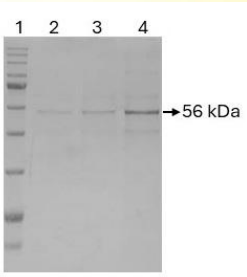
Hasil dan Pembahasan

1. Produksi protein



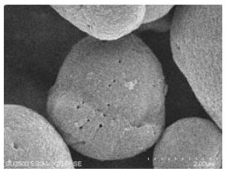
Profil ekspresi BmaN1 di *E. coli* ArcticExpress (DE3)/pET30EZ-bmaN1. Lajur 1 dan 3, penanda protein prestained PageRuler (kDa); (2) fraksi terlarut; (4), fraksi tidak terlarut.

2. Pemurnian

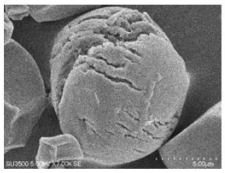


Profil pemurnian BmaN1. Lajur 1 Marker, (2) elusi 50 mM, (3) elusi100 mM; (4) elusi 250 mM Bufer HEPES pH 8, 300 mM NaCl dan elusi variasi [imidazole]

3. Karakterisasi



Jagung



Singkong

BmaN1 aktif menghidrolisis pati larut dan butir pati, yaitu jagung (butiran) dengan mode melubangi dan singkong (batang) dengan mode pengelupasan

4. Screening Kristalisasi



Larutan BmaN1 dicampurkan dengan 12 kondisi larutan pengkristal Dimana 6 kondisi pada pH 7,0 dan sisanya pada pH 8,0. Baris ke-1 menggunakan [BamN1 0,5 mg/mL dan baris ke-2 1 mg/mL.

Kesimpulan

1. Larutan BmaN1 berhasil dimurnikan secara parsial dengan kromatografi afinitas Ni-NTA (agarosa)
2. BmaN1 memiliki aktivitas memecah pati terlarut dan butir pati, khususnya jagung dengan pola melubangi dan singkong dengan pola mengelupas
3. Screening krsital protein dilakukan terhadap 12 kondisi larutan pengkristal karena terbatasnya jumlah protein.

Pustaka

1. Farooq dkk, Arch Microbiol. 2021 May;203(4):1281
2. Shofiyah dkk, Heliyon. 2020 Dec 26;6(12):e05796
3. Sarian dkk, Sci Rep. 2017 Mar 13;7:44230.

Infografis dibuat dengan ChatGPT