

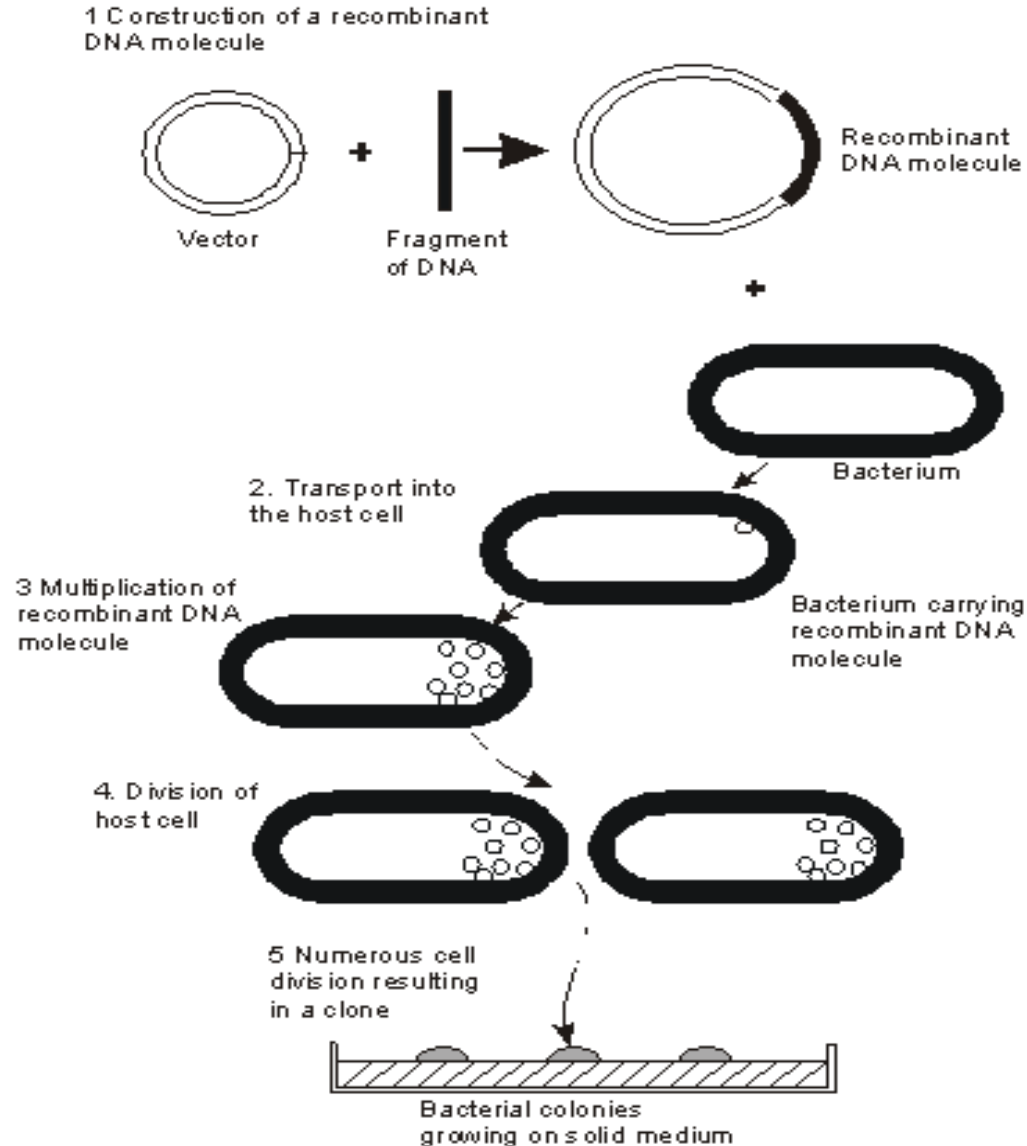
# **DNA Rekombinan**

**Dr. Widodo, M.Sc**

# DNA Rekombinan

- Teknik Isolasi DNA
- Enzim restriksi endonuklease
- Vektor kloning
- Sistem transformasi DNA
- Inang (*host*)

# DNA Rekombinan



# DNA Rekombinan

- Teknik pertama yang menentukan proses kloning gen adalah isolasi DNA plasmid atau kromosom dilanjutkan dengan melokalisasi gen yang diharapkan dengan cara memotong untai DNA dengan enzim endonuklease restriksi
- Enzim endonuklease restriksi (khususnya endonuklease restriksi tipe II) mempunyai lokasi pemotongan yang spesifik, maka potongan DNA yang dihasilkan akan mempunyai bentuk potongan yang sama (Brown, 1995).

# Construction of pNZ-orf3.4

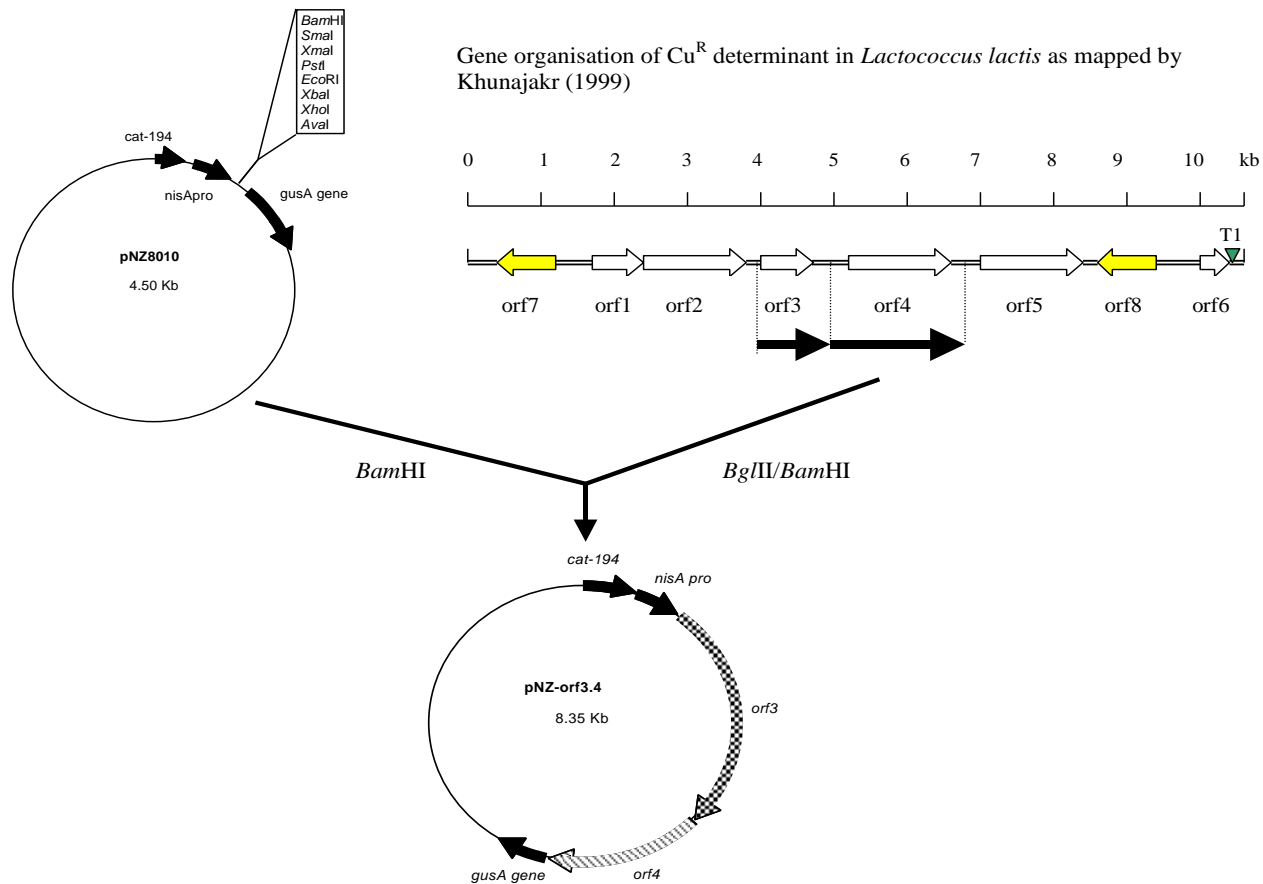
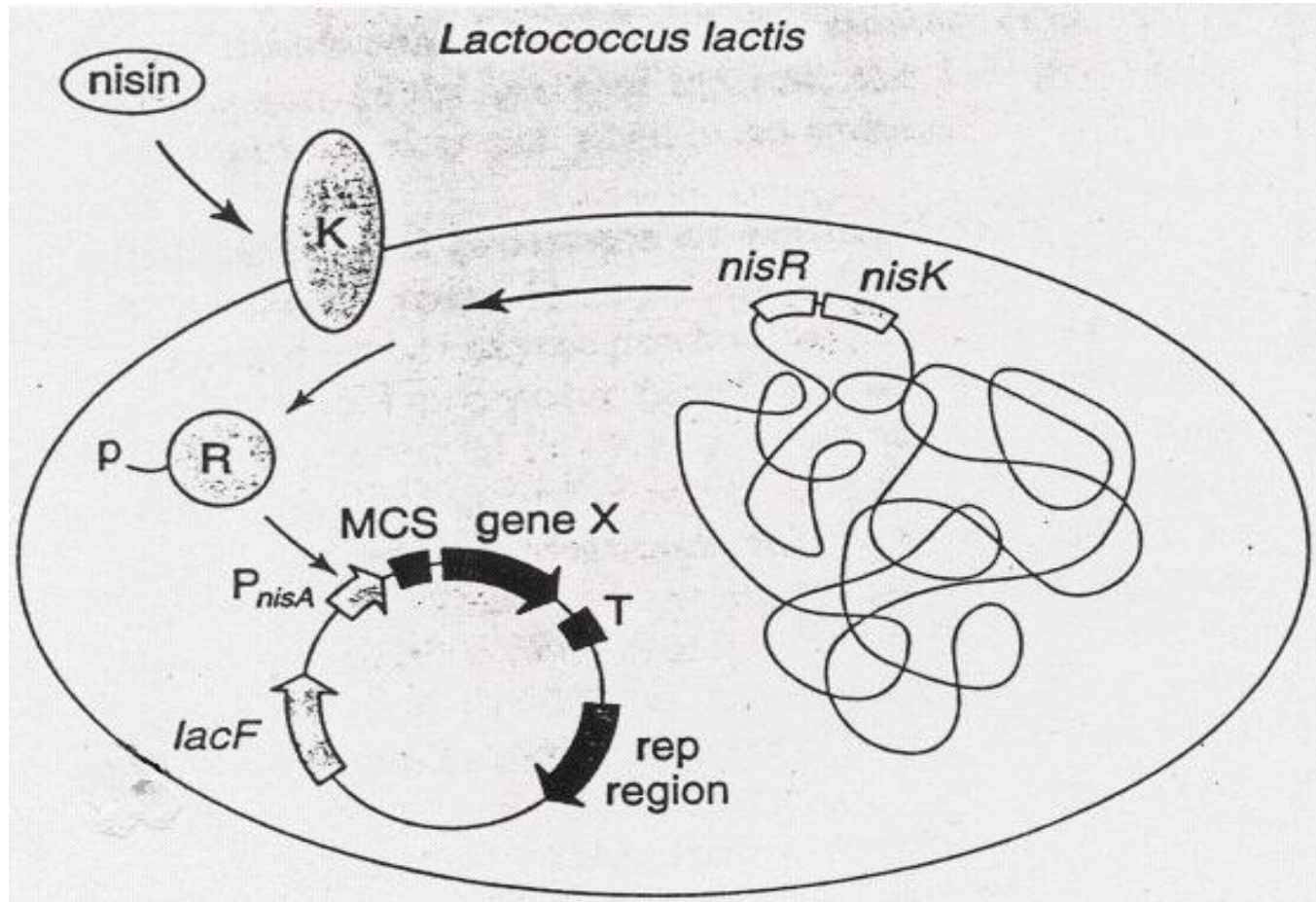


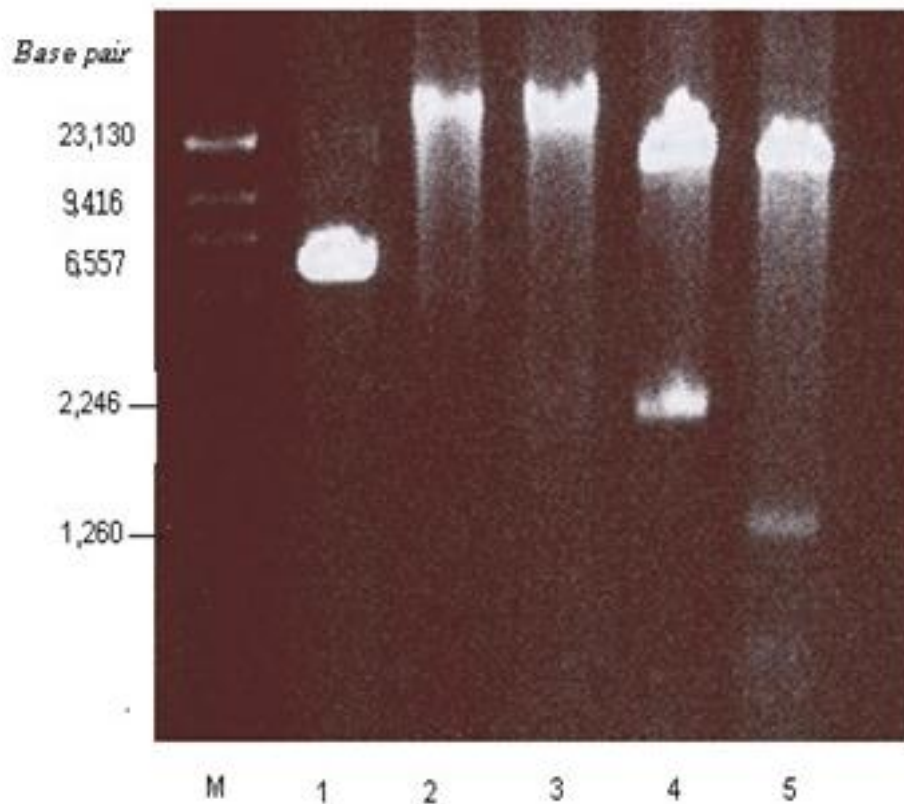
Figure 9. Plasmid pNZ-orf3.4 construction by ligation of *Bam*HI digested pNZ8010 with *Bam*HI/*Bgl*II digested pND951

# Nisin-induced Expression System



# Endonuklease Restriksi

- Potongan DNA hasil pemotongan enzim endonuklease restriksi dapat disisipkan pada plasmid vektor yang telah dipotong dengan enzim yang sama
- Penggabungan fragmen DNA dengan plasmid vektor ini dalam bahasa bioteknologi sering disebut dengan ligasi (*ligation*)
- Enzim yang digunakan dalam proses ligasi adalah enzim ligase. Proses ligasi akan menghasilkan DNA rekombinan dimana fragmen DNA pembawa suatu karakter genetik tersisip (ter-insersi) di dalam plasmid. Hasil ligasi dapat dilihat dengan elektrophoresis pada gel agarose



Keterangan gambar:

M. DNA penanda,  $\lambda$  DNA dipotong dengan enzim *Hind*III

1. Vektor kloning pNZ8010 yang dipotong dengan enzim *Bam*HI/*Pst*I

2. Hasil ligasi antara no 1 dan no 5

3. Hasil ligasi antara no 1 dan no 4

4. Plasmid pND954 (gen *cop*) yang dipotong dengan *Bam*HI/*Nsi*I

5. Plasmid pND954 (gen *cop*) yang dipotong dengan *Bgl*II/*Nsi*I

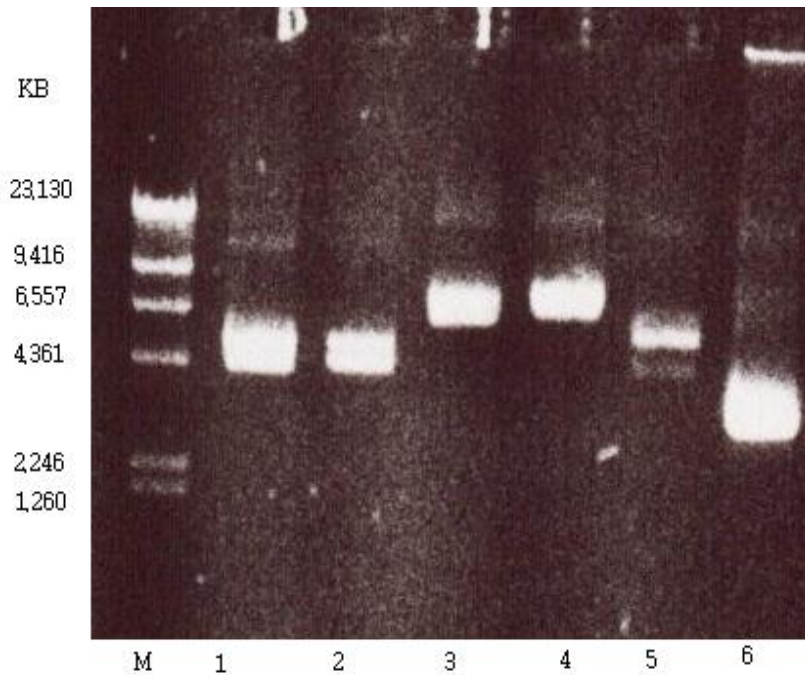
Gambar 5.2.2. Hasil ligasi dari plasmid vektor pNZ8010 dan fragmen dari plasmid pND954 selama 12 jam pada suhu 22<sup>0</sup>C setelah elektrophoresis pada gel agarose 1% selama 70 menit dengan tegangan 80 Volt



## *Double digestion* (pemotongan dengan 2 enzim)

- penggunaan dua enzim restriksi berbeda (*double digestion*) memberikan hasil ligasi yang sempurna
- Hal ini karena adanya hasil pemotongan yang kompatibel (*compatible cohesive ends*), yang dapat digabungkan kembali selama proses ligasi
- Enzim *Bam*HI misalnya mempunyai hasil pemotongan yang sama dengan enzim *Bg*III. Sedangkan enzim *Pst*I mempunyai hasil pemotongan yang sama dengan enzim *Nsi*I.

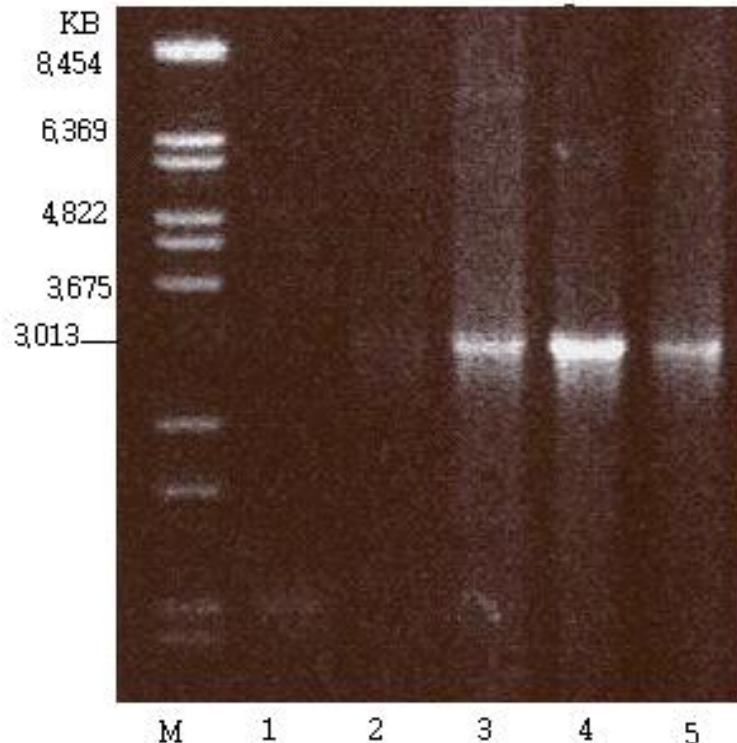
# Selection of Recombinant Plasmids



## *M.* HindIII-digested $\lambda$ DNA

1. Plasmid recombinant from transformant 1;
2. Plasmid recombinant from transformant 2;
3. Plasmid recombinant from transformant 3;
4. Plasmid recombinant from transformant 4;
5. Plasmid recombinant from transformant 5 and
6. Plasmid vector pNZ8010 (positive control).

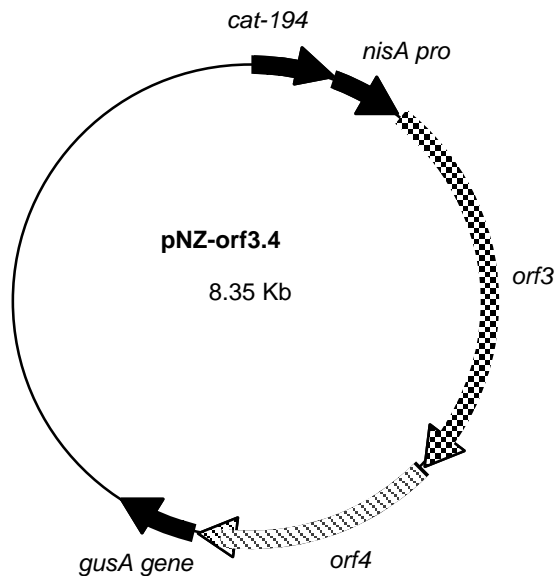
# Confirmation of Inserts



## M. *BstEII*-digested $\lambda$ DNA

1. unamplified 3.013 kb of *orf3+orf4* from pNN8010 (negative control);
2. unamplified 3.013 kb of *orf3+orf4* from transformant 1;
3. Amplified 3.013 kb of *orf3+orf4* from transformant 3;
4. Amplified *orf3+orf4* from transformant 4;
5. Amplified 3.013 kb of *orf3+orf4* from pND951 (positive control).

# Conclusion



- A plasmid recombinant bearing *orf3+orf4* has been constructed
- The presence of *cop* genes could be possible used as selection marker
- Most likely that *orf4* has a determinant effect on copper resistance

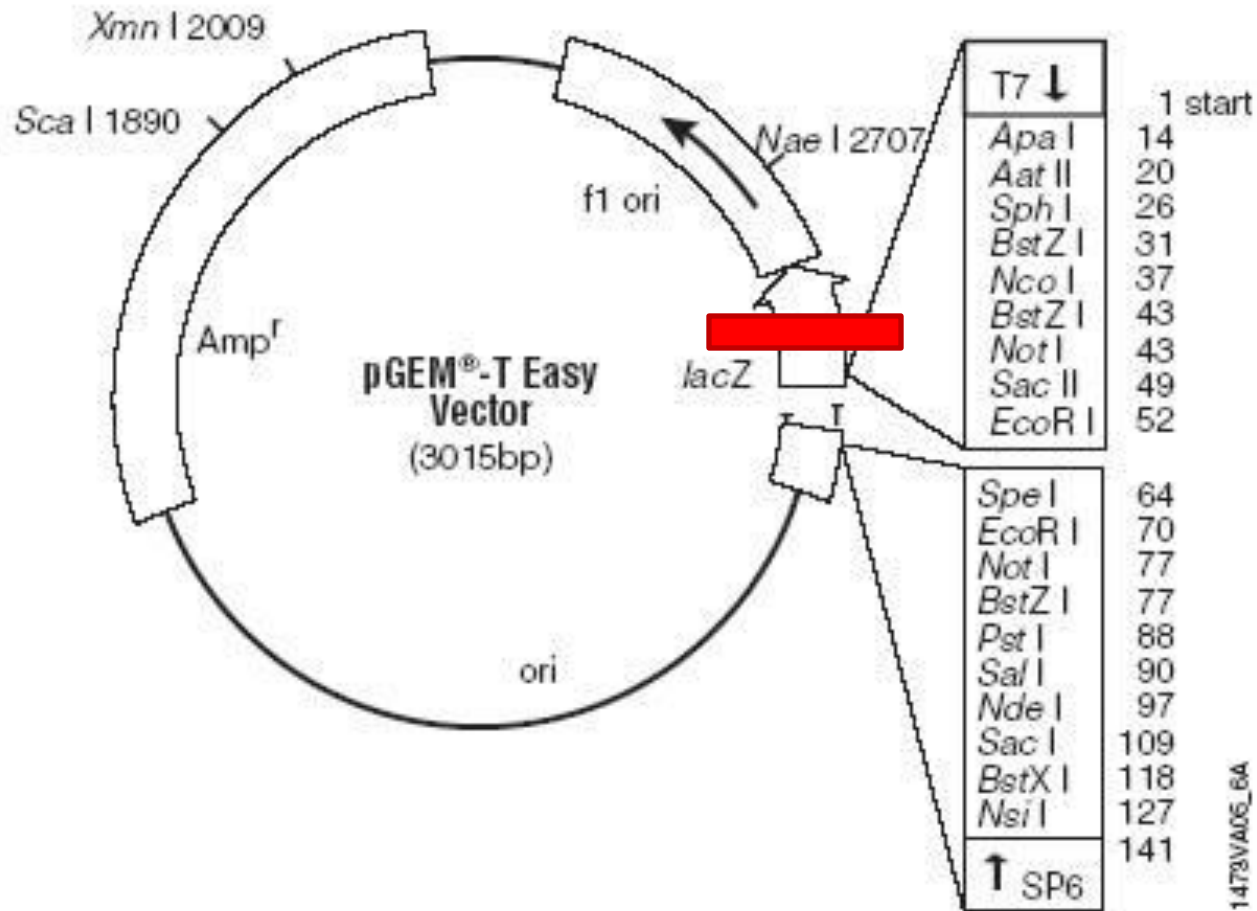
# Transformasi

- Transfer DNA sangat menentukan apakah DNA atau fragmen DNA yang bersangkutan akan ikut dalam sistem genetik inang, bereplikasi sendiri dengan vektor kloning pembawanya atau akan hilang selama proses replikasi genetik inang
- Suatu potongan DNA atau fragmen DNA (dengan karakter genetik yang penting hasil pemotongan dengan enzim endonuklease restriksi) yang ditransformasikan tidak akan berarti apa apa tanpa dapat digandakan melalui suatu tahapan replikasi, transkripsi dan translasi.

# Transformasi

- Proses dimana sel bakteri menerima DNA asing dari luar disebut transformasi, sedangkan bakterinya sendiri dengan DNA baru yang ada didalamnya disebut transforman

# Seleksi Transforman: white/blue colony



# Seleksi Transforman: white/blue colony





# Transformasi

- Transformasi secara alami, biasanya terjadi pada sebagian siklus hidup setiap mikroorganisme khususnya bakteri.
- Terjadinya transformasi DNA biasanya berkaitan dengan kondisi kompeten sel selama sel tumbuh.
- Kondisi ini biasanya terjadi menjelang fase stasioner (*stationery fase*) dimana sel mencapai densitas tertinggi sepanjang pertumbuhannya

# Transformasi

- Transformasi DNA secara alami, frekuensinya jauh lebih rendah karena persyaratan tertentu seperti kontak antar sel, homologi dari DNA yang bersangkutan, tidak adanya proses modifikasi genetik dari inang, kondisi morfologi (kemampuan membentuk rambut / *phili*) dan perlunya gen khusus seperti gen *tra* untuk proses konjugasi (Brown, 1995).

# Konjugasi

- Pada proses konjugasi, dua sel bakteri mengadakan kontak sel karena adanya plasmid yang *self transmissible* yang membawa gen *tra* (berperan mengawali kontak sel).
- Setelah kontak sel melalui rambut-rambut sel (*pili*) terjadilah proses perpindahan genetik antara kedua bakteri yang bersangkutan (Brown, 1995; Old dan primrose, 1989).

# Transduksi

- Transduksi melibatkan virus bakteri (*bakteriophage*) untuk memindahkan DNA ke dalam sel bakteri lain.
- Ketika bakteriphage baru ini menyerang sel bakteri lain, beberapa DNA, dengan rekombinasi homolog akan tersisip dalam DNA kromosom inang.

# Transformasi Alami

- Kelemahan mendasar dari transformasi DNA secara alami adalah bahwa DNA yang dapat dipindahkan dengan metode alami ini hanyalah DNA yang berbentuk linier atau DNA kromosom, sedangkan DNA plasmid yang berbentuk sirkuler jarang dapat dipindahkan.

# Transformasi Buatan

- Melibatkan beberapa teknik:
  1. transformasi dengan  $\text{CaCl}_2$ ,
  2. transformasi dengan induksi PEG (*Polyethylene Glycol*),
  3. fusi protoplas dan
  4. elektroporasi.

# *Heat shock transformation*

- Transformasi dengan  $\text{CaCl}_2$  mensyaratkan adanya sel kompeten yaitu suatu kondisi dimana sel bakteri telah siap untuk menerima DNA dari luar sel masuk ke dalam sel
- Perlakuan sel bakteri pada larutan  $\text{CaCl}_2$  dingin dan kemudian secara mendadak dipindahkan pada *waterbath* suhu  $42^\circ \text{C}$  dapat mengakibatkan kompeten sel dan masuknya DNA ke dalam sel yang bersangkutan

# *Elektroporation*

- Sel kompeten bakteri dicampur dengan DNA dalam kuvet elektroporasi dan selanjutnya dihubungkan dengan medan listrik.
- Goncangan karena medan listrik secara singkat akan membuka dinding sel bakteri dan diikuti dengan masuknya DNA ke dalam sel.
- Elektroporasi dapat digunakan untuk transfer DNA berbagai sel baik yang prokariotik maupun DNA sel eukariotik, baik yang sirkuler maupun yang linier



# *Elektroporation*

- Berbagai faktor menentukan tingkat efisiensi elektroporasi. Di antara faktor-faktor tersebut adalah konsentrasi DNA, medan listrik (tegangan, hambatan listrik dan kapasitor) yang digunakan serta lamanya ekposisi medan listrik (Sambrook *et al.*, 1989).
- Tingkat efisiensi  $10^9$  -  $10^{10}$  transforman per ug DNA dapat dicapai dengan kombinasi ketiga faktor tersebut.

# *Elektroporation*

- Dower *et al* (1988) seperti disitasi Sambrook *et al* (1989) melaporkan tingkat efisiensi  $10^{10}$  transforman per ug DNA diperoleh ketika melakukan transformasi plasmid pUC18 ke dalam sel *E. coli* strain LE392 atau MC1061.
- Secara umum, efisiensi transformasi dengan elektroporasi dapat mencapai 10 - 20 kalinya dibandingkan dengan transformasi dengan kompeten sel yang disiapkan dengan bahan kimia.

# *Elektroporation*

- Widodo (2001) melakukan elektroporasi plasmid pND968 ke *E. coli* HB101 dengan tegangan listrik berbeda. Penelitian ini untuk mendapatkan tegangan listrik optimum selama proses elektroporasi
- Diperoleh efisiensi transformasi optimum pada tegangan 2500 Volt, 200 Ohm dan 25 uF