



www.esaunggul.ac.id

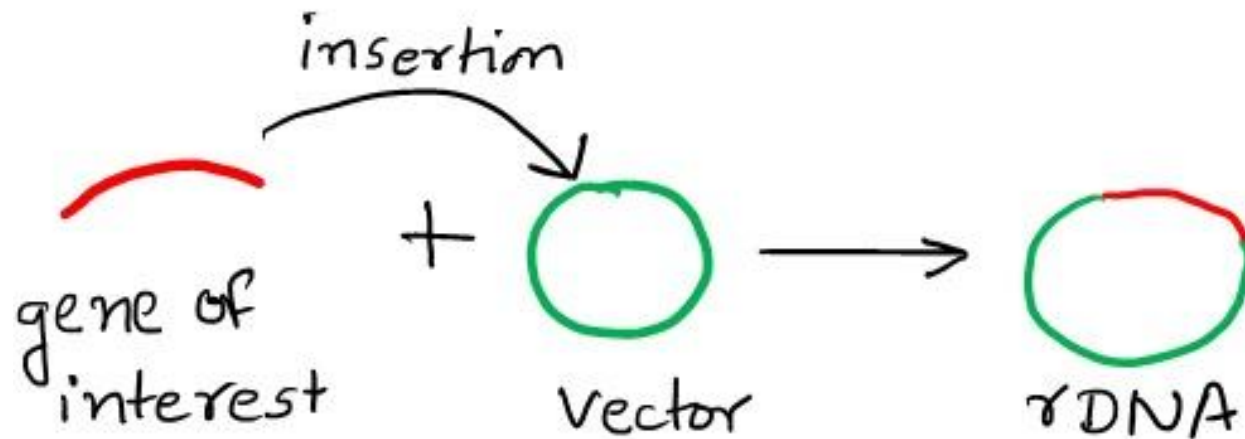
Teknologi DNA Rekombinan

Kemampuan Akhir yang Diharapkan

- Mahasiswa dapat menjelaskan teknik DNA rekombinan
- Mahasiswa dapat menjelaskan tahapan-tahapan dalam teknik DNA rekombinan
- Mahasiswa dapat menjelaskan tujuan dan hasil dari rekombinasi DNA



DNA Rekombinan??



*rDNA = *recombinant DNA* (DNA rekombinan)

DNA Rekombinan??

- Molekul DNA baru yang terbentuk dengan cara memasukkan sekuen DNA dari suatu organisme ke dalam vektor
- Teknologi yang digunakan untuk menghasilkan DNA rekombinan disebut **teknologi DNA rekombinan**
- Contohnya **adalah kloning gen**

HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



human insulin gene
(DNA)



plasmid (loop of bacterial DNA)



bacterium



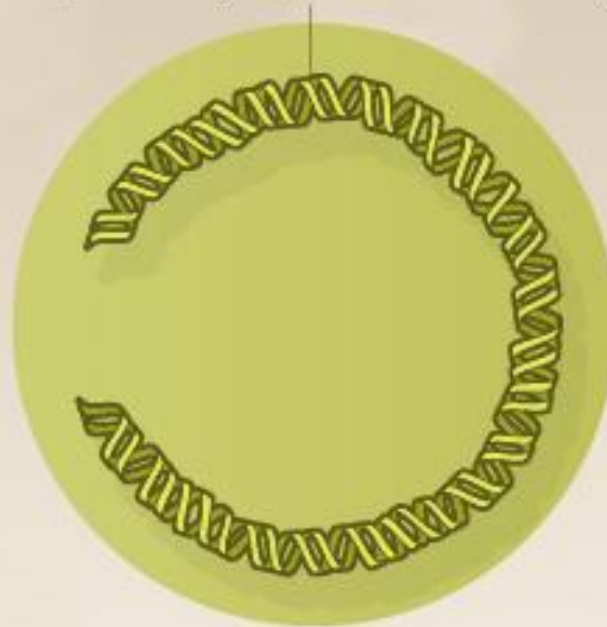
HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



human insulin gene
(DNA)



plasmid (loop of bacterial DNA)



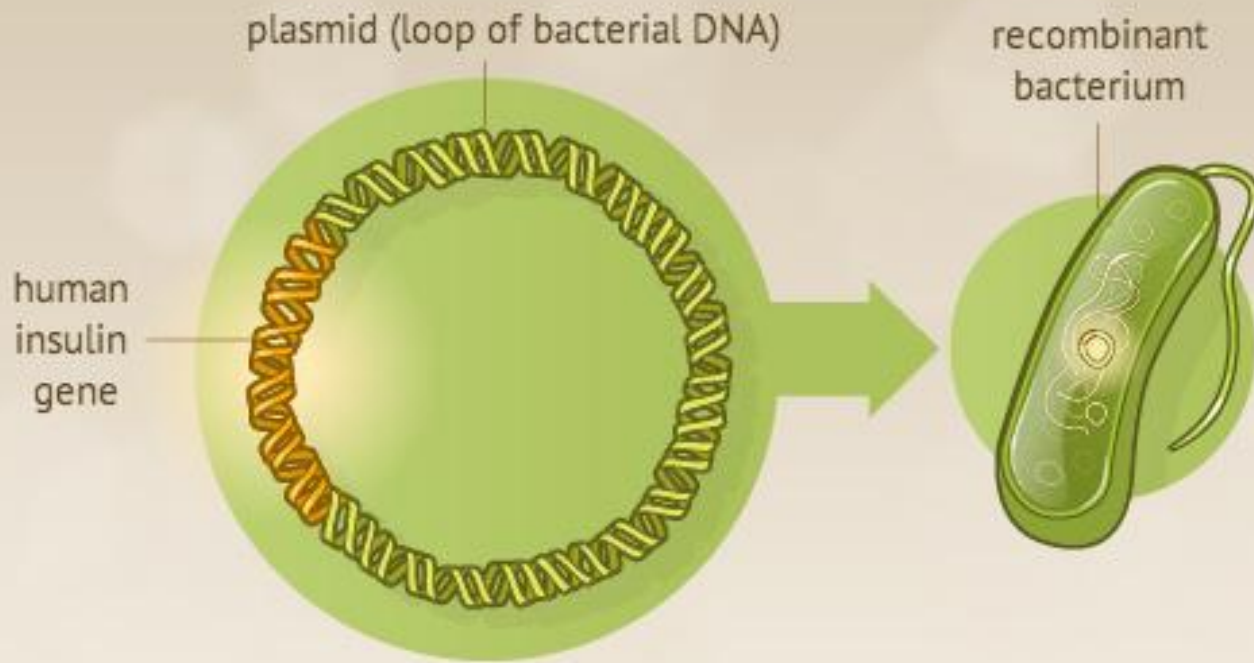
HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



plasmid (loop of bacterial DNA)



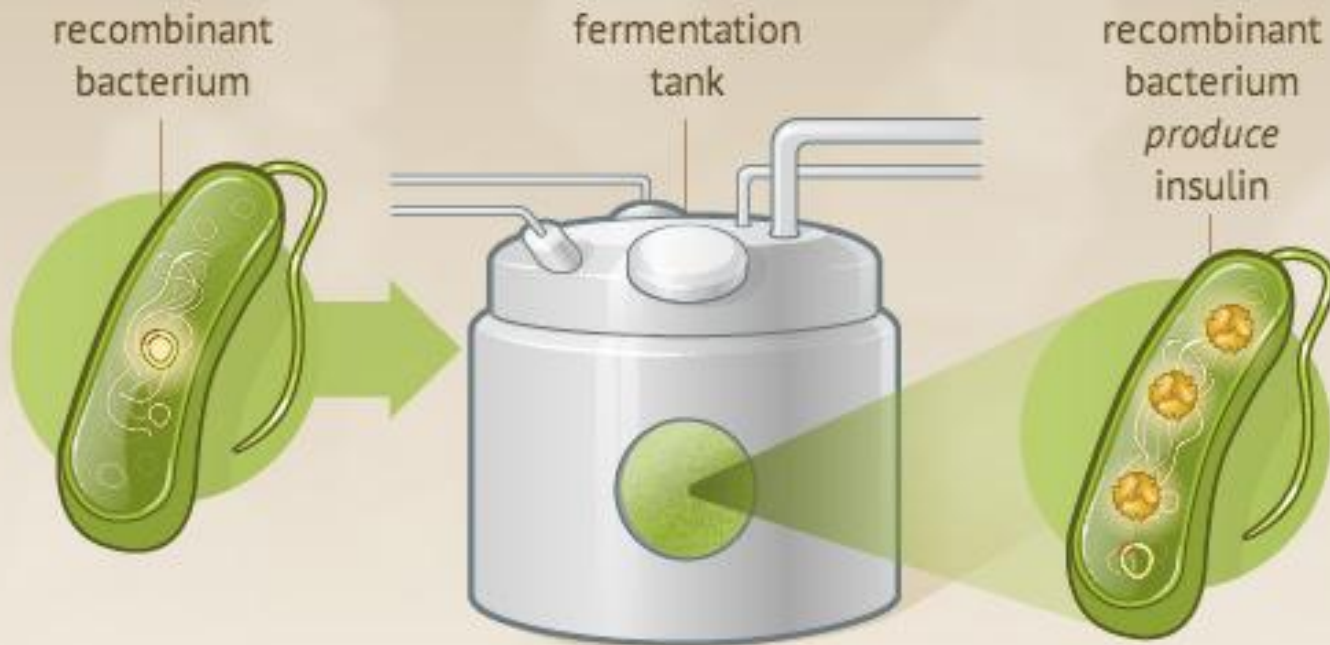
HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



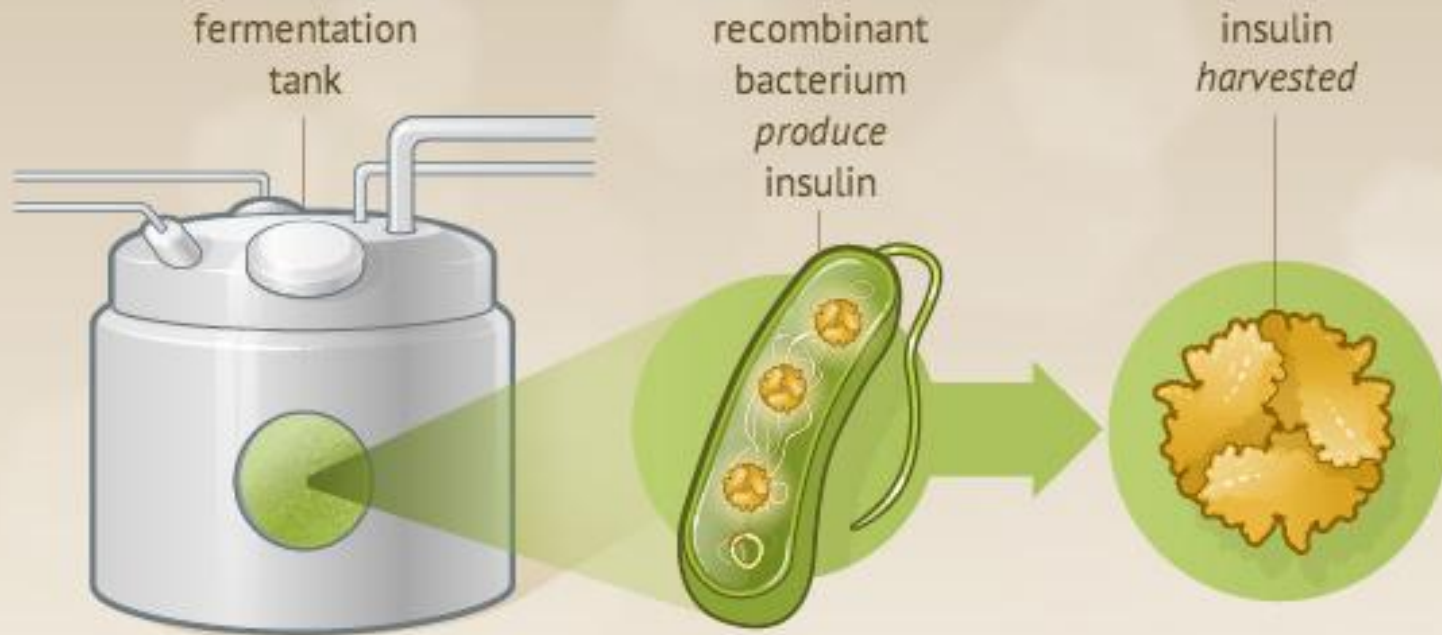
HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



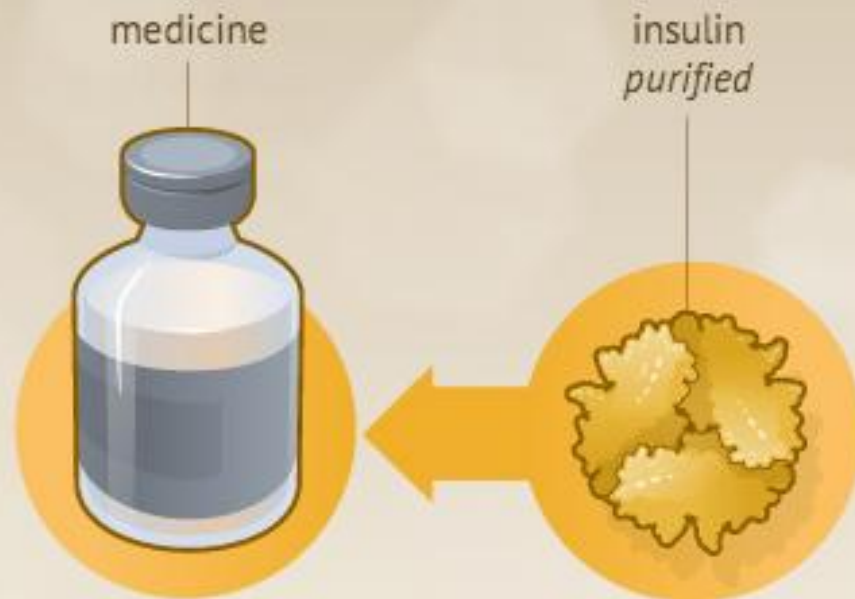
HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



HOW DID THEY MAKE INSULIN FROM RECOMBINANT DNA?



Aplikasi Teknologi DNA Rekombinan pada Bioteknologi

- Produksi protein rekombinan
- Produksi obat-obatan melalui kloning gen
- Identifikasi gen-gen yang berperan dalam kejadian penyakit
- Terapi gen
- Produksi bibit tanaman unggul
- Bidang forensik : identifikasi pelaku kejahatan

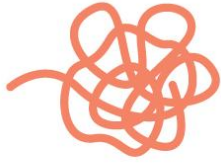


Tahapan Pembuatan DNA Rekombinan

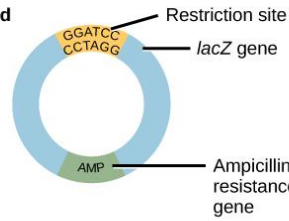
1. Mempersiapkan gen yang akan dimasukkan ke dalam vektor (*gen insert*)
2. Mempersiapkan vektor
3. Pemotongan DNA *insert* dan vektor dengan enzim restriksi
4. Penggabungan DNA *insert* dan vektor dengan enzim ligasi
5. Memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel bakteri (transformasi)
6. Ekspresi gen rekombinan

Molecular Cloning

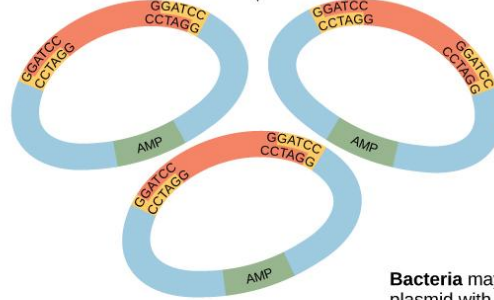
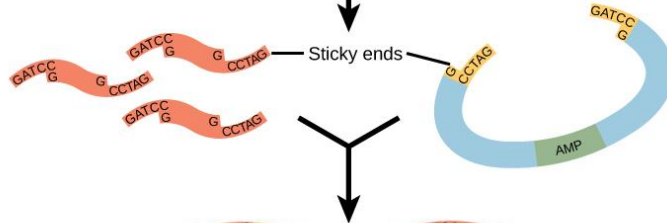
Foreign DNA



Plasmid

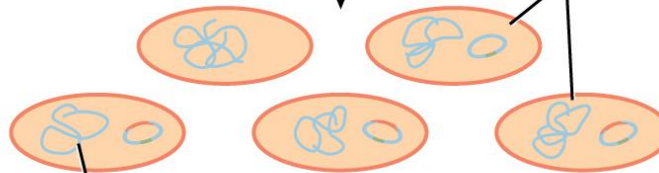


Both foreign DNA and a plasmid are cut with the same restriction enzyme. The restriction site occurs only once in the plasmid in the middle of a gene for an enzyme (*lacZ*).



The restriction enzyme leaves complementary sticky ends on the foreign DNA fragment and the plasmid. This allows the foreign DNA to be inserted into the plasmid when the sticky ends anneal. Adding DNA ligase reattaches the DNA backbones. These are recombinant plasmids.

Bacteria may take up plasmid with or without the insert, or may not take up plasmid at all.

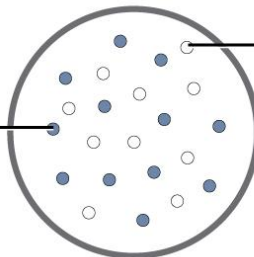


The bacteria that take up the recombinant plasmid cannot make the enzyme from the gene that the fragment was inserted into (*lacZ*). They also carry a gene for resistance to the antibiotic ampicillin, which was on the original plasmid.

Bacterial genome is missing the *lacZ* gene.

Blue colonies have plasmids without insert.

White colonies have plasmids with the foreign insert.



To find the bacteria with the recombinant plasmid, the bacteria are grown on a plate with the antibiotic ampicillin and a substance that changes color when exposed to the enzyme produced by the *lacZ* gene. The ampicillin will kill any bacteria that did not take up a plasmid. The color of the substance will not change when the gene for *lacZ* contains the foreign DNA insert. These are the bacteria with the recombinant plasmid that we want to grow.

Persiapan Gen *Insert* dan Vektor

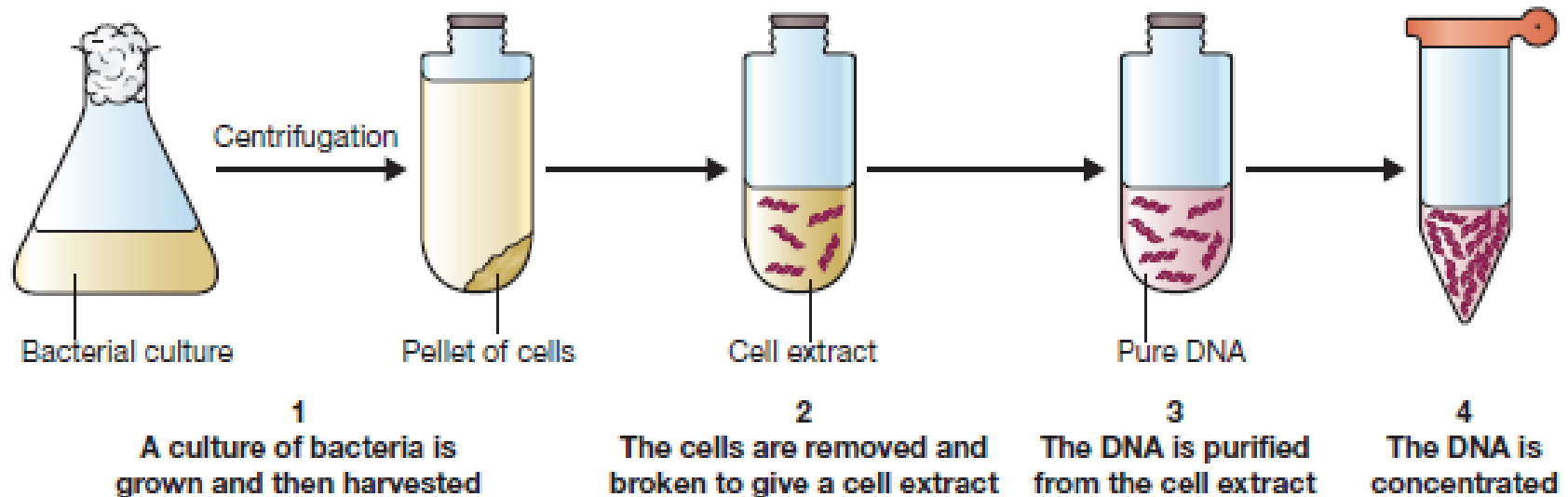
- Gen *insert* bisa berasal dari total DNA murni suatu organisme atau dari hasil PCR
- Vektor bisa berupa plasmid, bakteriofaga atau virus lain (adenovirus, baculovirus)



Pengambilan total DNA murni dari Bakteri

1. Bakteri diperbanyak dalam medium kultur yang sesuai
 - *Macam-macam medium kultur : LB (Luria Bertani), M9*
2. Perusakan sel bakteri sehingga DNA bisa keluar dari sel
 - *Secara kimiawi → lisozim (lysozyme)*
 - *Secara fisika → sonikator*
3. Pemurnian DNA sehingga didapatkan DNA murni

Perbanyak Bakteri dalam Medium Kultur



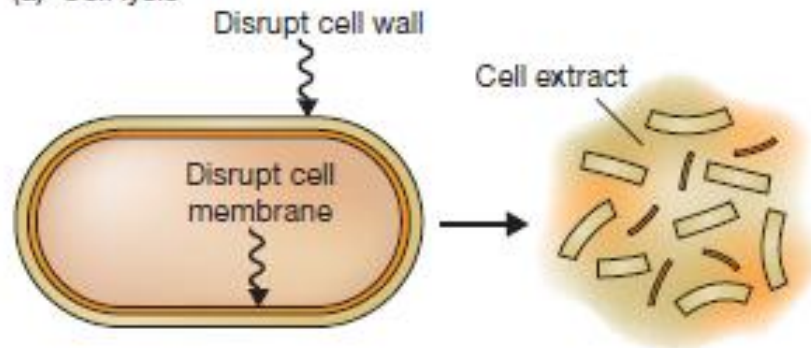
Macam-macam Medium Kultur Bakteri

MEDIUM	COMPONENT	g/l OF MEDIUM
M9 medium	Na_2HPO_4	6.0
	KH_2PO_4	3.0
	NaCl	0.5
	NH_4Cl	1.0
	MgSO_4	0.5
	Glucose	2.0
	CaCl_2	0.015
LB (Luria-Bertani medium)	Tryptone	10.0
	Yeast extract	5.0
	NaCl	10.0

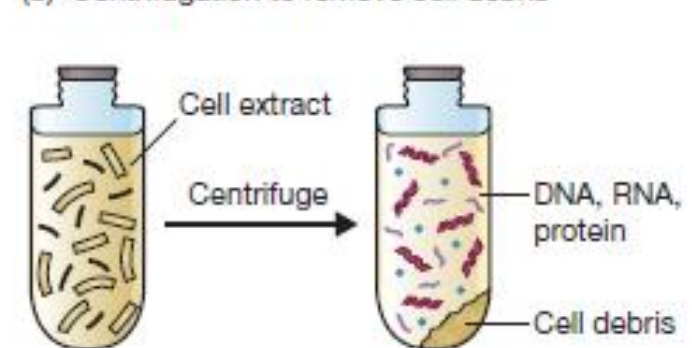
Perusakan Membran Sel Bakteri



(a) Cell lysis

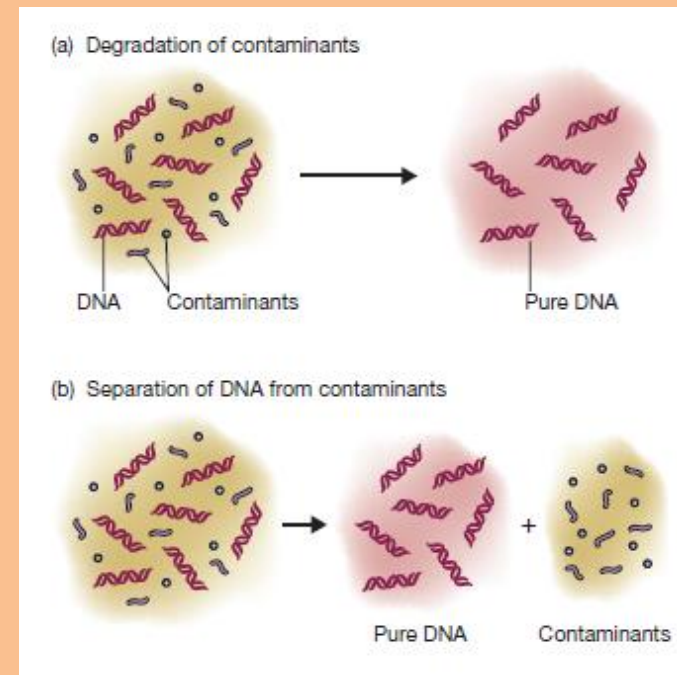


(b) Centrifugation to remove cell debris



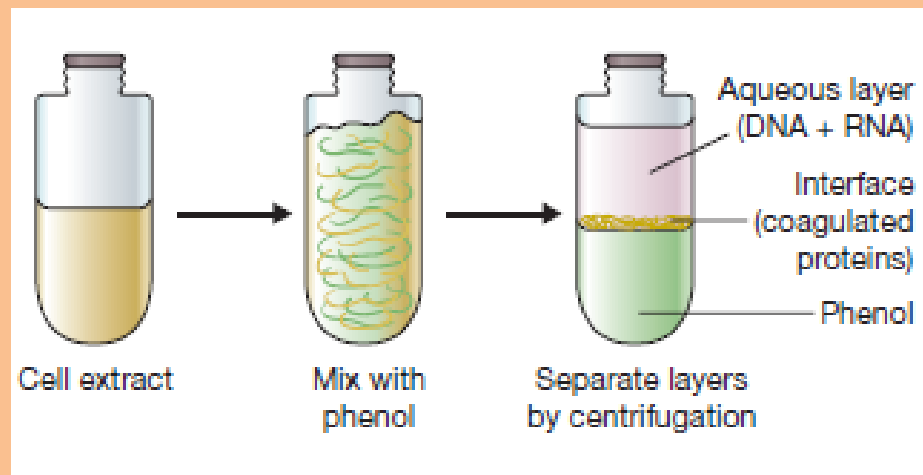
Pemurnian DNA

- Bertujuan untuk memisahkan DNA dari kontaminan (protein dan RNA)
- Kontaminan dapat mengganggu proses rekombinasi DNA selanjutnya
- Bisa dilakukan dengan 2 cara :
 - a. Menghancurkan kontaminan (dengan protease dan RNase)
 - b. Memisahkan DNA dari kontaminan



Pemurnian DNA

- Secara konvensional menggunakan **fenol** : **Kloroform** dengan perbandingan 1 : 1
- Fenol dan kloroform dapat mengendapkan protein → **memisahkan DNA dengan protein**
- Akan tetapi limbah fenol harus diolah lebih lanjut supaya tidak merusak lingkungan



Pemurnian DNA

- Sekarang ini telah digunakan kit (perangkat) pemurnian DNA
- Keunggulan dari perangkat ini adalah lebih praktis digunakan



Pemurnian DNA

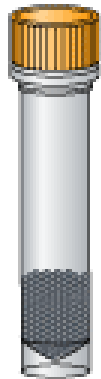
- Tingkat kemurnian DNA yang didapatkan dari bakteri bisa dilihat kemurniannya dengan **spektrofotometer**
- Melihat rasio absorbansi DNA pada panjang gelombang 260/280 → nilai 1,8
 - Apabila nilai < 1,8 → banyak kontaminan protein
 - Apabila nilai > 1,8 → banyak kontaminan RNA
- Spektrofotometer juga dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi DNA

Spektrofotometer untuk Mengukur Konsentrasi dan Kemurnian DNA



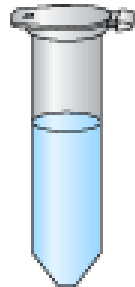
Pemurnian DNA dengan Kit

Homogenization and Lysis

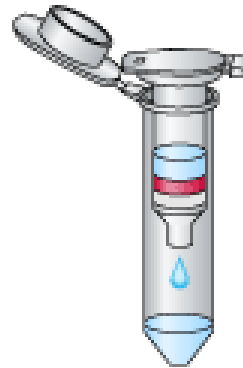


Add sample and lysis buffer to NucleoSpin Bead Tube, vortex or use homogenizer

Removal of Contaminants

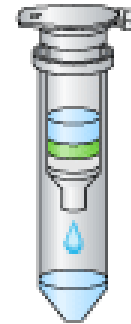


Precipitate contaminants

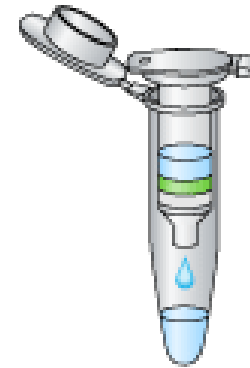


Load supernatant onto NucleoSpin Inhibitor Removal Columns

Bind – Wash – Elute



Bind DNA to NucleoSpin Soil Column, apply efficient wash steps, dry the membrane



Elute pure DNA ready to use in downstream PCR

Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

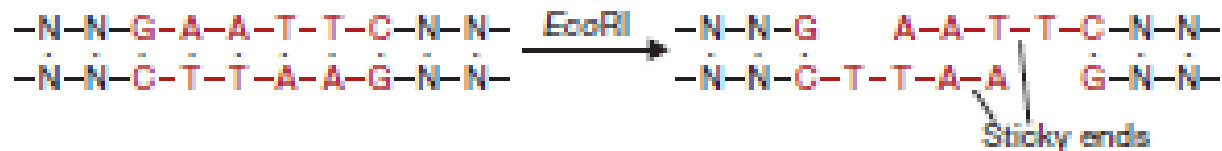
- Pemotongan DNA bisa dilakukan dengan **enzim Restriksi Endonuklease**
- Enzim ini dapat memotong ikatan fosfodiester antara basa-basa nitrogen
- Setiap enzim restriksi memiliki target sekuen yang khas
- Hasil restriksi bisa berupa ujung yang **tumpul (blunt end)** atau ujung menggantung (*sticky end*)

Blunt end dan sticky end

(a) Production of blunt ends



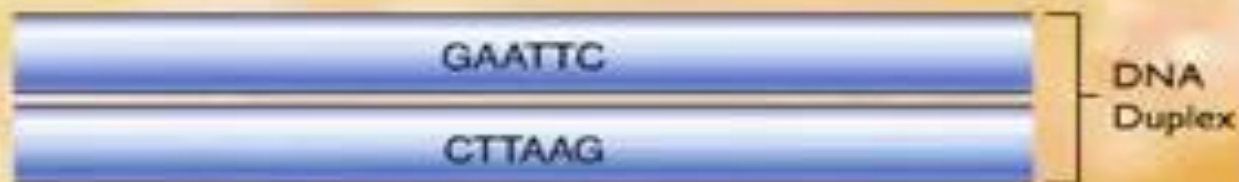
(b) Production of sticky ends



(c) The same sticky ends produced by different restriction endonucleases



Restriction Endonucleases

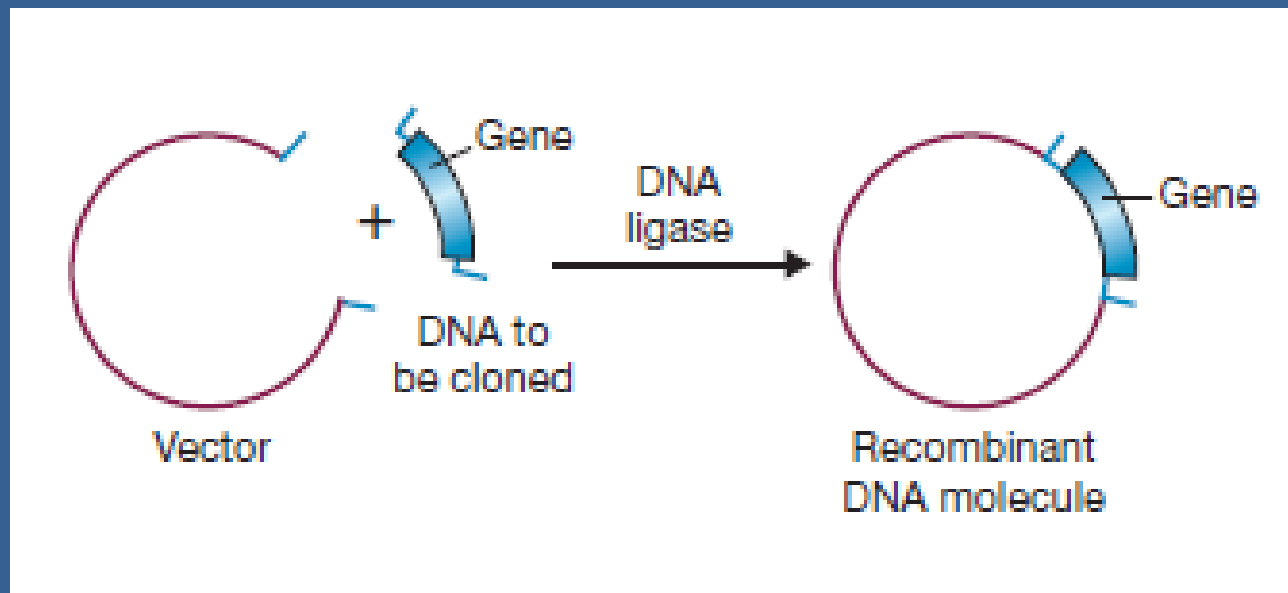


Restriction endonucleases are enzymes that cleave DNA at specific nucleotide sequences. The sequence recognized is often four to six nucleotides long. For example, the restriction endonuclease EcoRI recognizes the sequence, GAATTC.

Penggabungan DNA *insert* dengan vektor

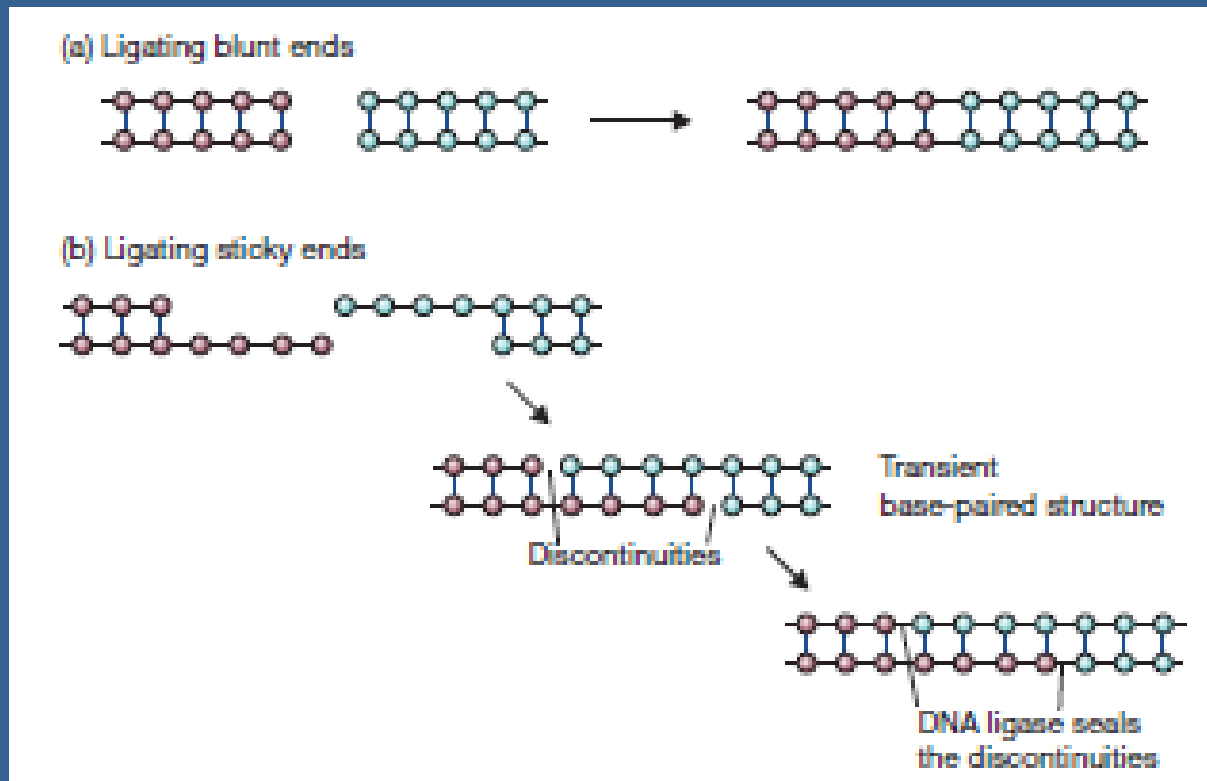
- Proses penggabungan ini dilakukan dengan enzim **DNA ligase**
- Sekuen DNA *insert* dan vektor yang akan digabungkan harus sesuai
- Enzim ligase akan membentuk ikatan fosfodiester antara satu basa nitrogen dengan basa nitrogen lain

Penggabungan DNA *insert* dengan vektor



Penggabungan DNA *insert* dengan vektor

- Ligasi bisa dilakukan pada *blunt end* maupun *sticky end*



Transformasi DNA Rekombinan

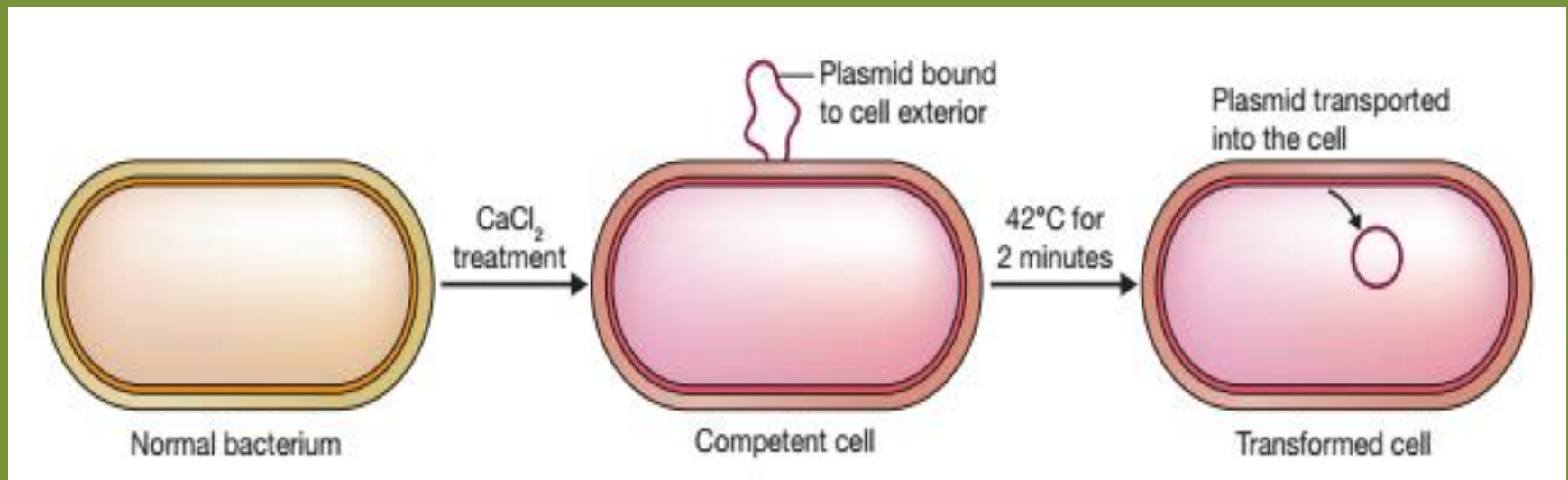
- Proses memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel bakteri
- Secara alami bakteri dapat mengalami proses transformasi
- Di dalam laboratorium, proses transformasi dilakukan **secara kimiawi dan secara fisika**
- Hanya beberapa jenis bakteri yang dapat dilakukan proses transformasi secara mudah
→ *Bacillus dan Streptococcus*

Transformasi DNA Rekombinan

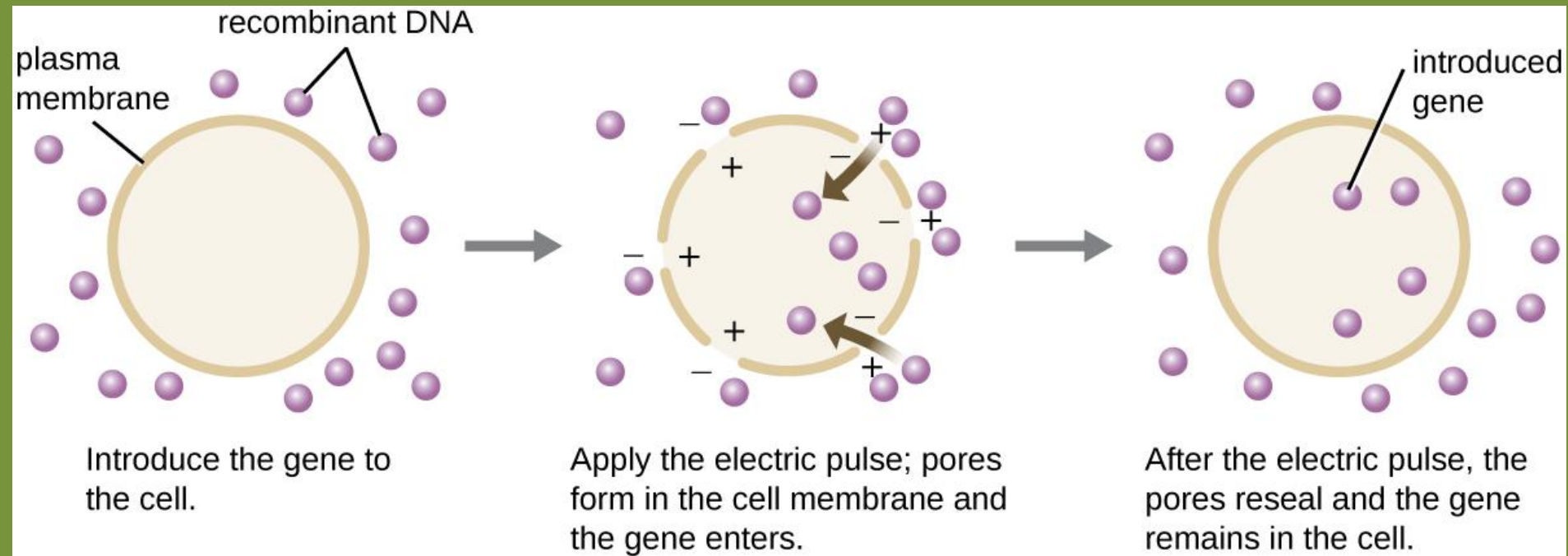
- Bakteri yang biasa digunakan adalah *Escherichia coli*
- Proses transformasi secara kimiawi bisa dilakukan dengan CaCl_2 (kalsium klorida)
- Proses transformasi secara fisika dengan menggunakan **elektroporasi** → menggunakan **arus listrik**
- Sel bakteri yang siap untuk menerima DNA rekombinan disebut **sel yang kompeten**

Transformasi DNA Rekombinan dengan CaCl_2

- Sel bakteri diletakkan pada larutan CaCl_2 dingin
- Kemudian suhu tinggi diberikan untuk memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel kompeten → **heat-shock**



Transformasi DNA Rekombinan dengan Elektroporasi

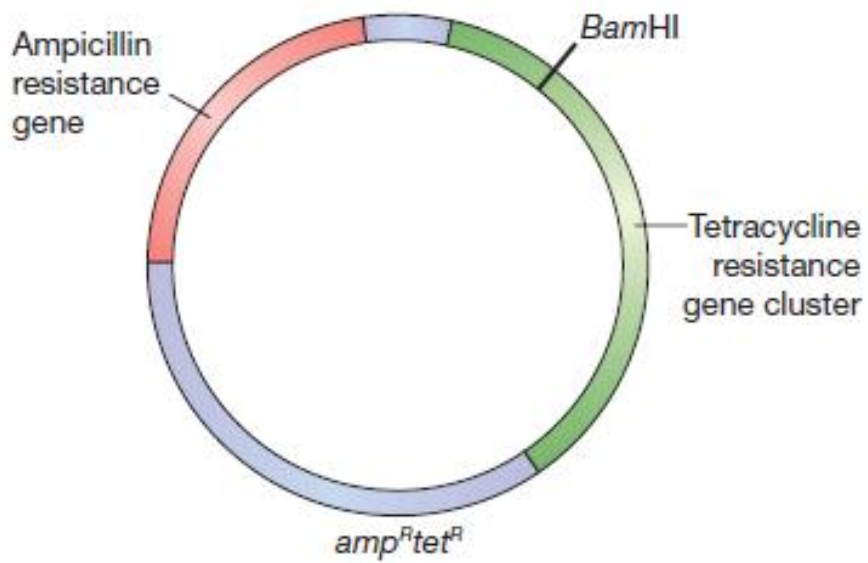


Electroporator

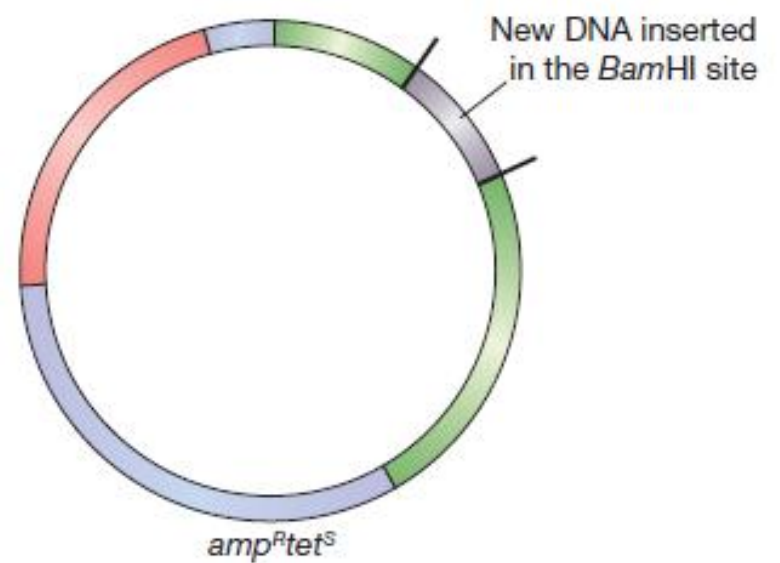


Identifikasi Rekombinan

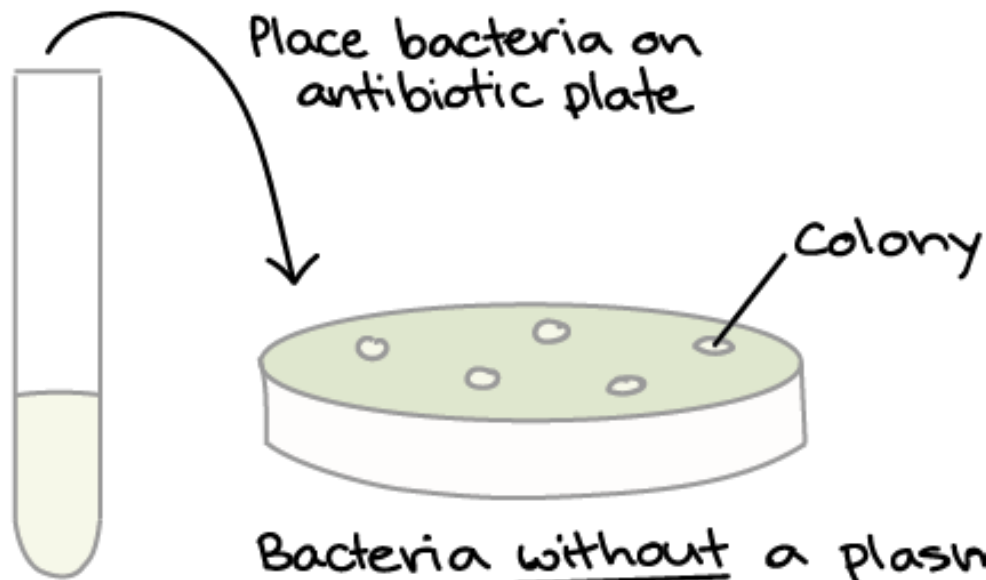
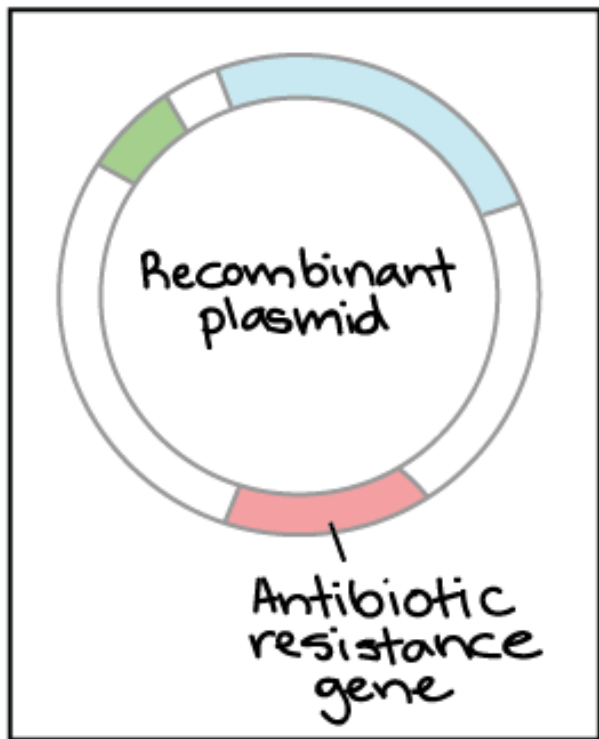
- Seleksi antibiotik
 - Plasmid rekombinan memiliki resistensi terhadap antibiotik tertentu, mis.ampisilin
 - Bakteri yang mendapatkan plasmid rekombinan dapat tumbuh pada medium dengan ampisilin
 - Bakteri yang tidak memiliki plasmid rekombinan akan mati pada medium dengan ampisilin



(a) The normal vector molecule



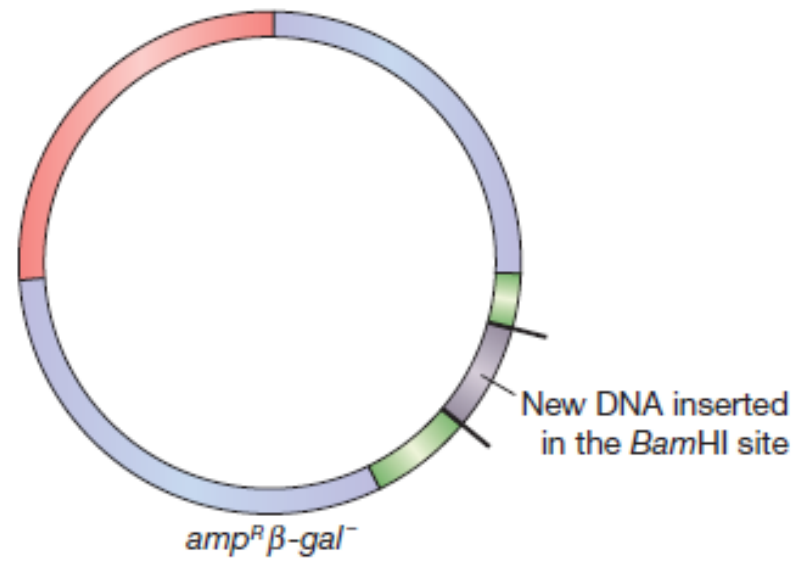
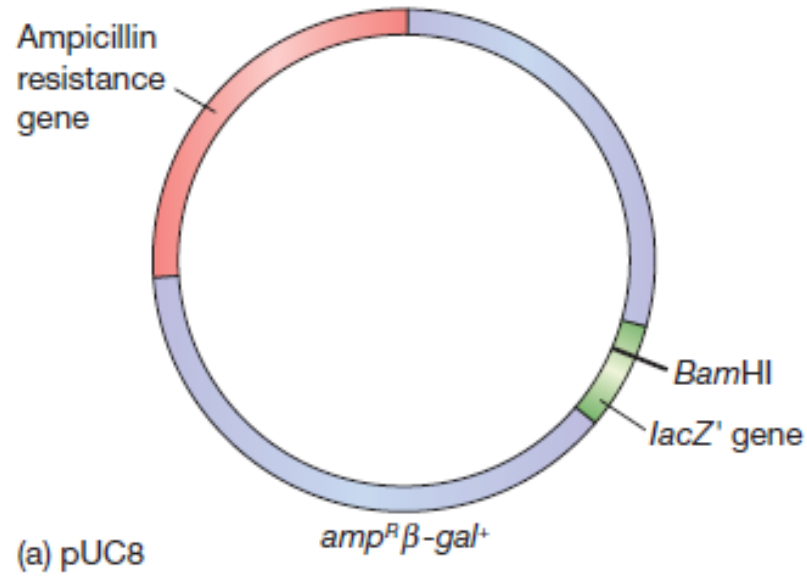
(b) A recombinant pBR322 molecule



Bacteria without a plasmid die.
Each bacterium with a plasmid makes a colony.

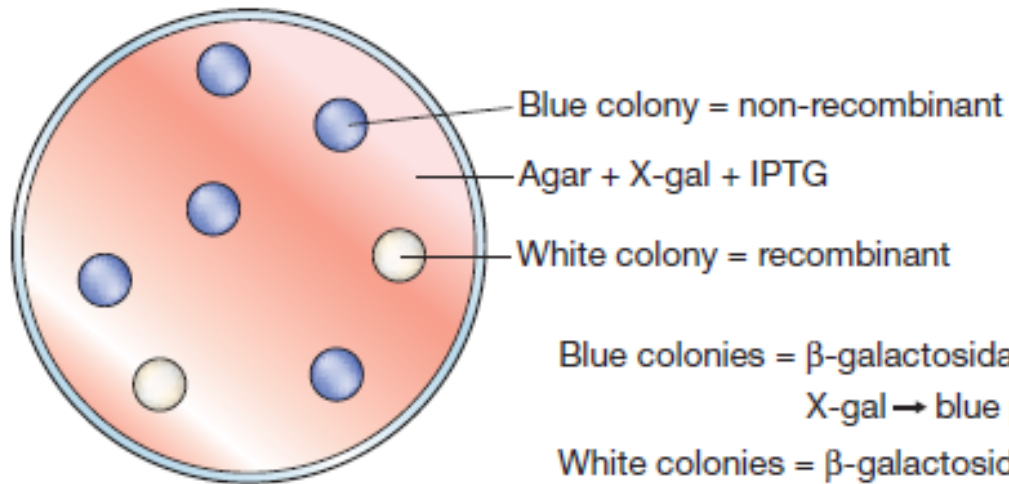
Identifikasi Rekombinan

- *Blue-white screening*
 - Menggunakan gen pengkode β -galaktosidase → *lacZ*
 - Ekspresi *lacZ* dapat terganggu dengan adanya insersi DNA
 - Enzim ini dapat memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa
 - Pada medium dengan X-gal (analog laktosa) :
 - Bakteri dengan plasmid rekombinan → warna putih
 - Bakteri tanpa plasmid rekombinan → warna biru



(b) A recombinant pUC8 molecule

(b) Screening for pUC8 recombinants



Blue colonies = β -galactosidase synthesized
X-gal \rightarrow blue product

White colonies = β -galactosidase not synthesized
X-gal \rightarrow no blue product

