



www.esaunggul.ac.id

REKAYASA GENETIKA

IBD 131

By Seprianto S.Pi, M.Si

Pertemuan 11

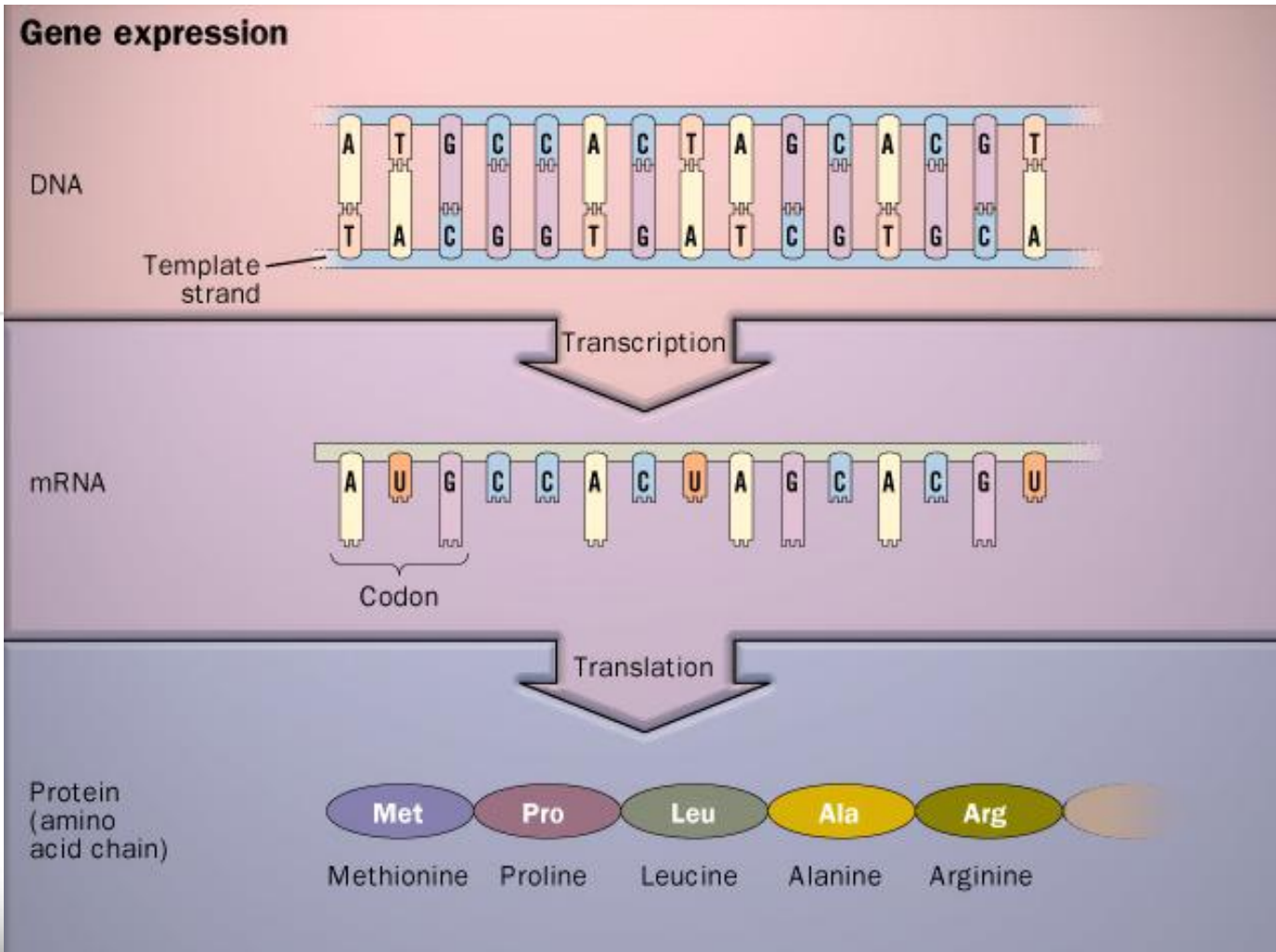
Ekspresi Gen Eukariotik



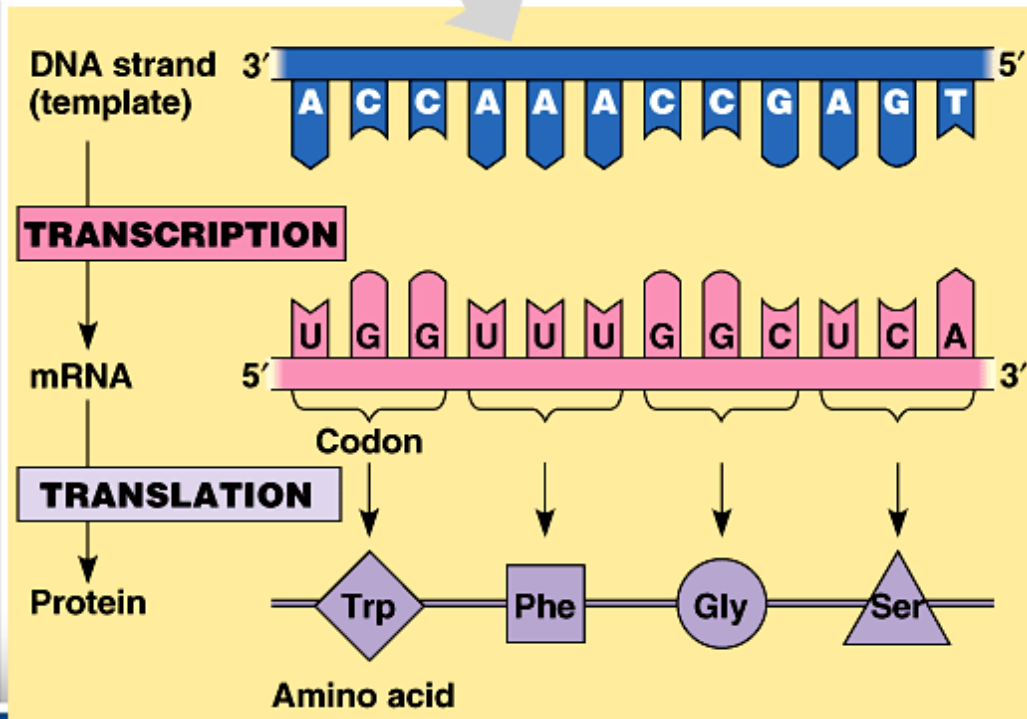
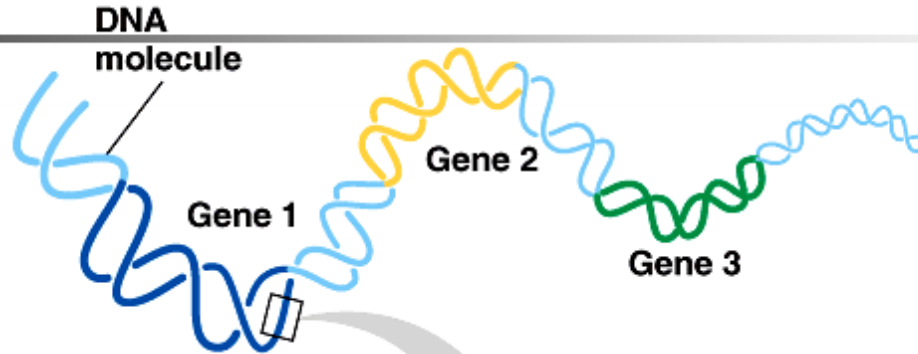
Sasaran Perkuliahan

- Mahasiswa dapat memahami dan menjelaskan tentang proses ekspresi gen pada sel Eukariotik
- Mahasiswa dapat memahami komponen yang mempengaruhi dalam proses ekspresi gen eukariot

Ekspresi Gen

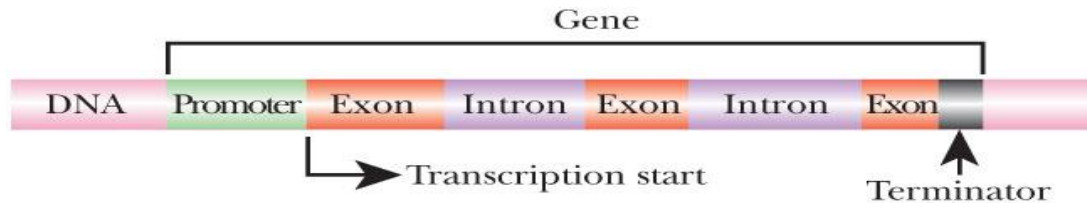


Dari Gen ke Protein



Bakteri tidak bisa menghilangkan intron

Part of
chromosome (DNA)



TRANSCRIPTION

Primary
transcript (RNA)



SPLICE OUT INTRONS

Messenger
(RNA)



TRANSLATION

Protein



Perbandingan Susunan gen pada Eukariot dan Prokariot

EUKARYOTES



PROKARYOTES



TRANSCRIPTION



Monocistronic mRNA

Polycistronic mRNA



TRANSLATION

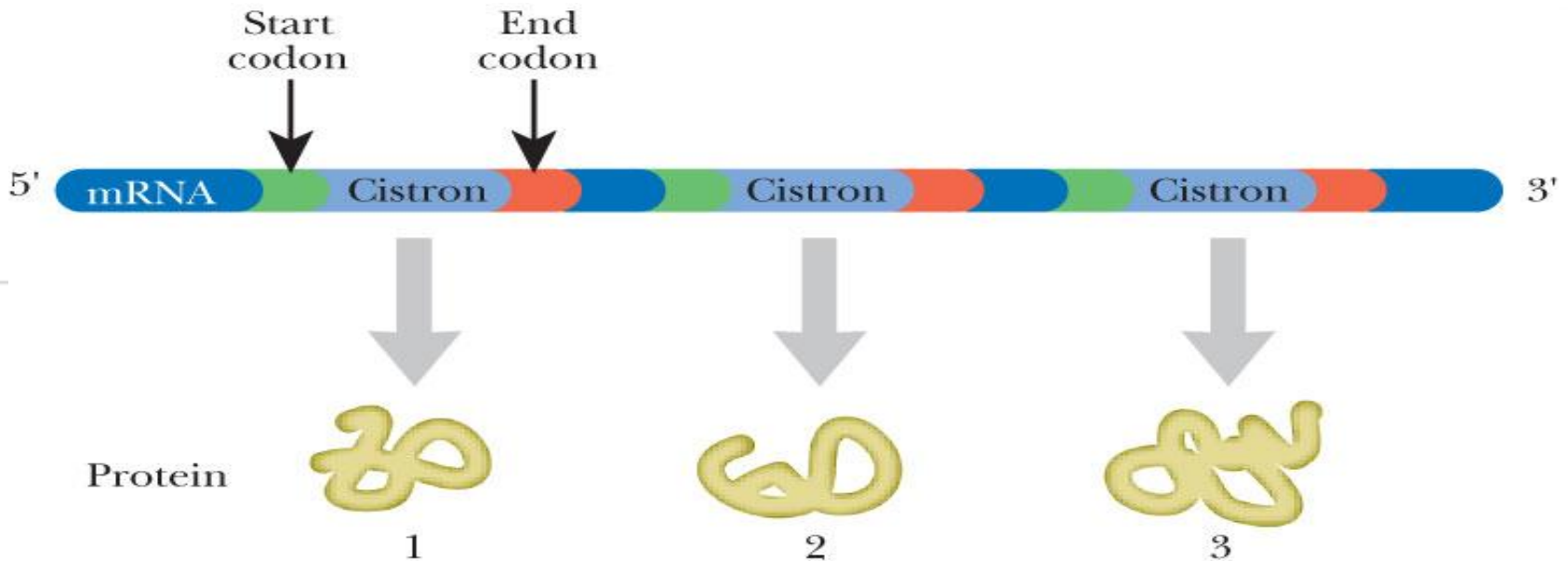


Single protein



Several proteins

mRNA *polycistronic*



Sifat ekspresi gen mRNA pada sel Prokariotik adalah polisistronik. Hal ini berarti dalam satu transkrip terkandung lebih dari satu rangkaian kodon (sistron) polipeptida yang berbeda.

mRNA *monocistronic* pada *Eukariot*

EUKARYOTES



Monocistronic
mRNA

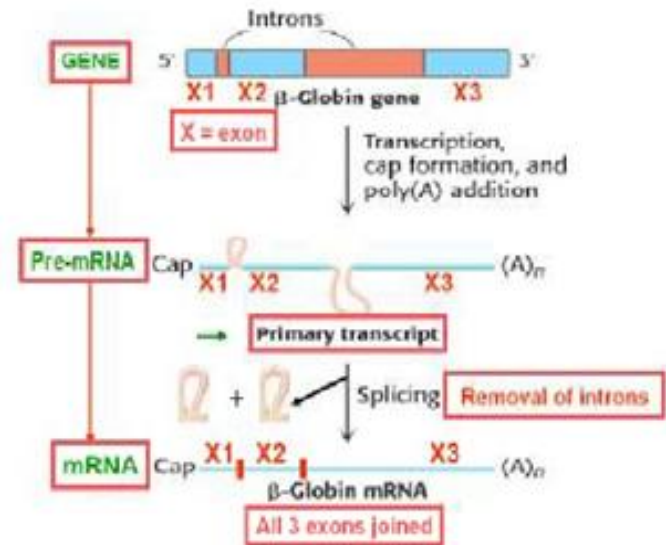
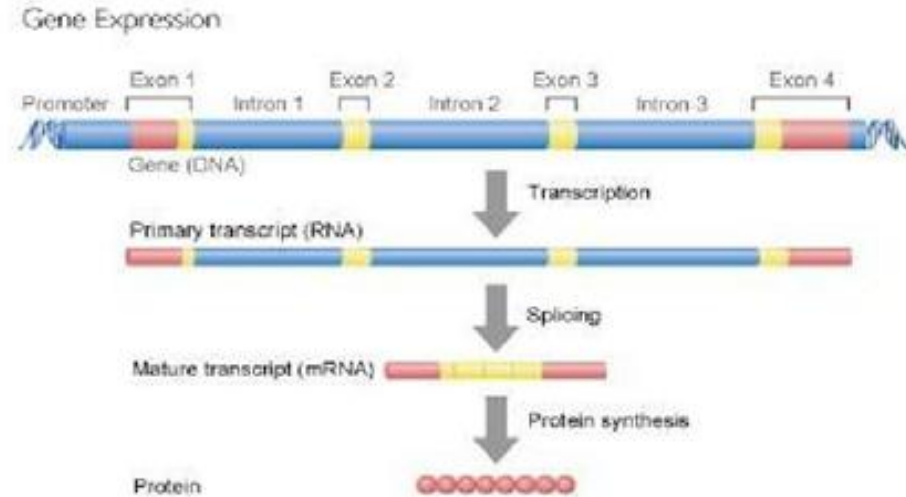


Single protein

Sifat ekspresi gen mRNA pada sel eukariotik adalah monosistronik. Hal ini berarti dalam satu transkrip yang dihasilkan hanya mengkode satu macam produk ekspresi gen. Satu mRNA membawa satu macam rangkaian kodon untuk satu macam polipeptida

Proses splicing

- Terjadinya splicing ini adalah ketika fase pasca transkripsi.
- Awalnya, gen memiliki 2 macam kode yakni ekson dan intron.
- Ekson merupakan kode yang menyandi protein sedangkan intron merupakan kode yang tidak pakai dan akan dibuang.
- Selanjutnya terjadi proses pemotongan intron dan penyambungan ekson. Sehingga akan terbentuklah mRNA yang matang dan selanjutnya akan ditransfer ke sitoplasma untuk melalui tahap selanjutnya yakni translasi di ribosom.



Gambar 4. Proses splicing

Tipe Gen Eukariotik berdasarkan kerja enzim RNA polimerase

Gen kelas I

Meliputi gen-gen yg mengkode 18S rRNA, 28S rRNA dan 5,8S rRNA (ditranskripsi oleh RNA polimerase I). Pada gen kelas I terdapat dua macam promoter yaitu promoter antara (spacer promoter) dan promoter utama.

Gen kelas II

Meliputi semua gen yang mengkode protein dan beberapa RNA berukuran kecil yang terdapat di dalam nukleus (ditranskripsi oleh RNA polimerase II). Promoter gen kelas II terdiri atas 4 elemen yaitu sekuens pemulai (initiator) yg terletak pada daerah inisiasi transkripsi, elemen hilir (downstream) yang terletak pada ujung 3', kotak TATA dan suatu elemen hulu (upstream) ujung 5'

Gen kelas III

Meliputi gen-gen yg mengkode tRNA, 5S rRNA dan beberapa RNA kecil yang ada di dalam nukleus (ditranskripsi oleh RNA polimerase III). Sebagian besar gen kelas III merupakan suatu cluster dan berulang

Manipulasi DNA

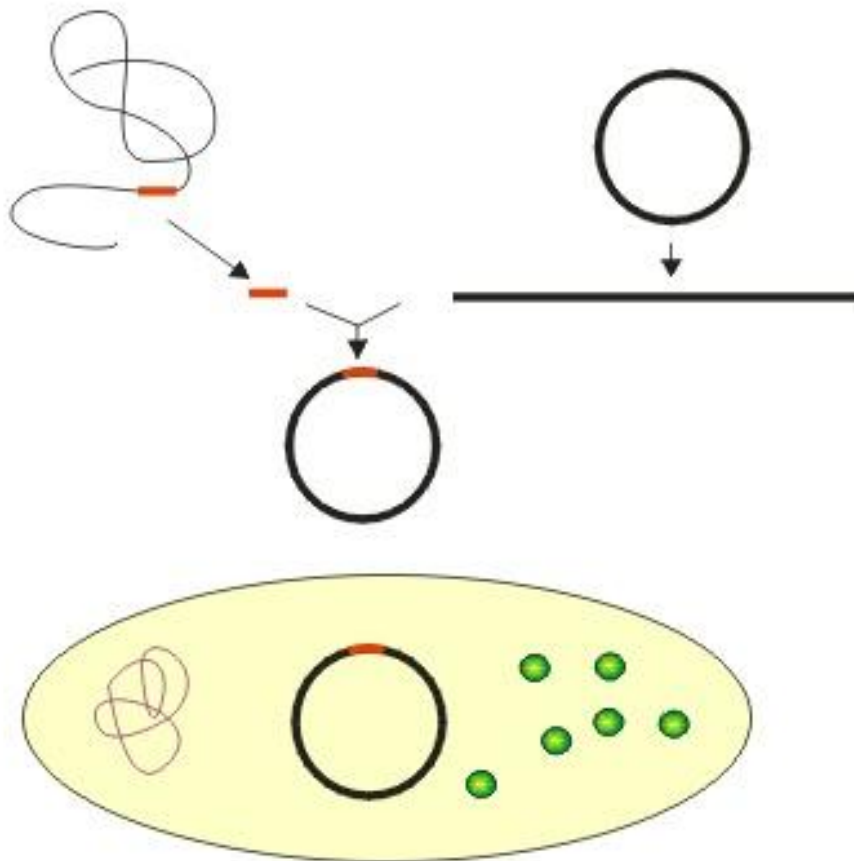
Ragam manipulasi DNA:

- pemotongan,
- penyambungan,
- pemendekan,
- pemanjangan,
- penyalinan menjadi molekul RNA,
- penggandaan DNA, serta modifikasi
- penambahan gugus tertentu
- penghilangan gugus tertentu.



Enzim

Prinsip Dasar Ekspresi Gen



Istilah penting:

- DNA, gen, genom,
- Enzim restriksi
- Situs restriksi
- Vektor, plasmid
- DNA rekombinan
- Sel kompeten
- Transformasi, transfeksi
- Sel inang
- fermentasi
- bioreaktor, fermentor

Optimasi Ekspresi Gen

Faktor yang berpengaruh terhadap tingkat ekspresi gen:

1. Promoter
2. Stabilitas mRNA
3. Pemilihan kodon
4. Jumlah salinan plasmid
5. Stabilitas plasmid
6. Fisiologi sel inang



Regulasi Transkripsi Eukariotik

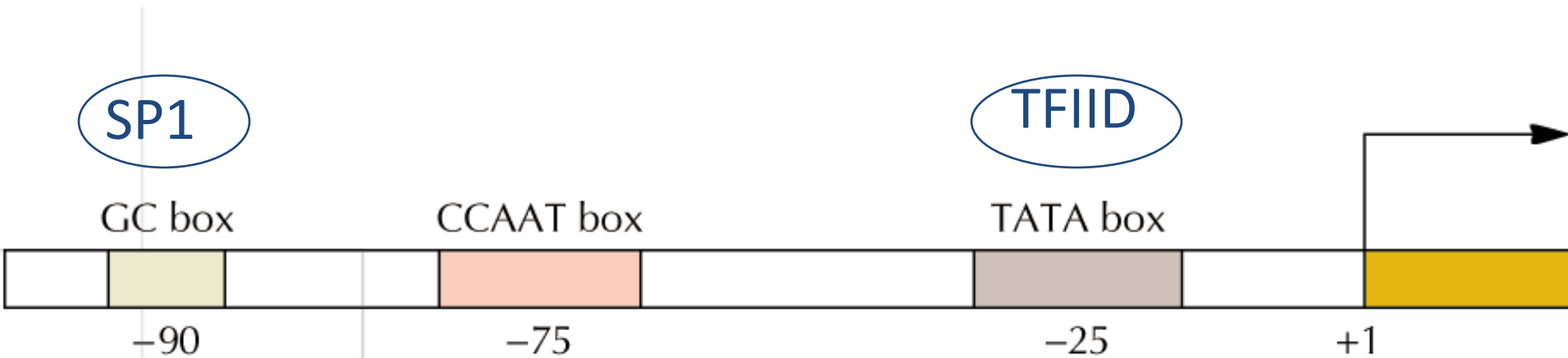
- Beberapa gen ditranskripsi pada hampir semua sel
 - “housekeeping” genes
- Sifat unik dari sel itu disebabkan oleh ekspresi gen-gen spesifik yang terkandung dalam sel tersebut
 - cell-specific expression
 - tissue-specific expression



Regulasi Transkripsi Eukariotik

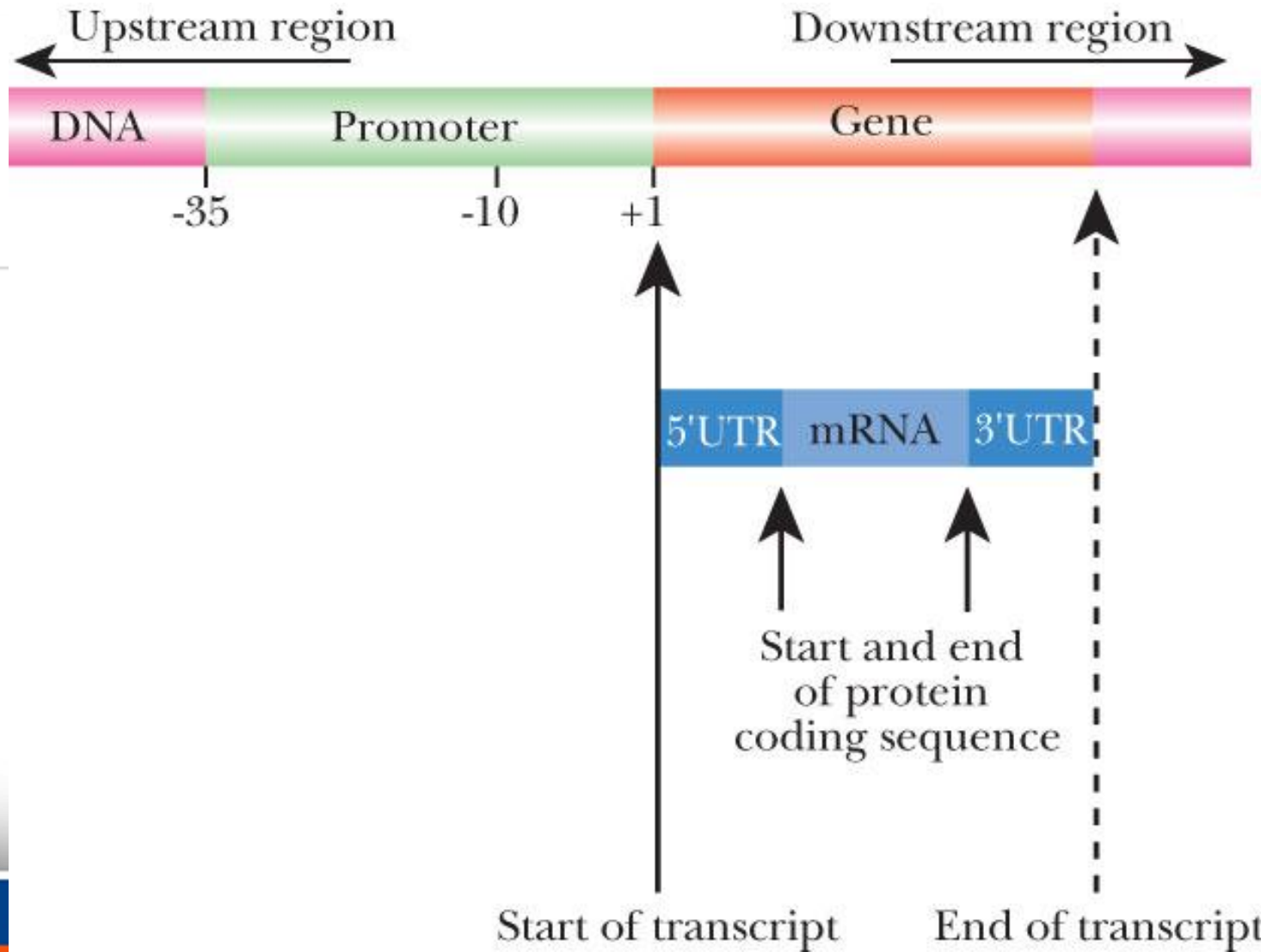
- Lebih kompleks dibanding bakteri
- Pengendalian dimediasi oleh protein-protein yang diklasifikasikan sebagai **Transcription Factors - TF** :
 - Basal TF - diperlukan oleh semua gen
 - Specific TF - menentukan spesifitas ekspresi
 - Activator - meningkatkan ekspresi
 - Repressor - menurunkan ekspresi

Skema Promoter Gen Eukariot

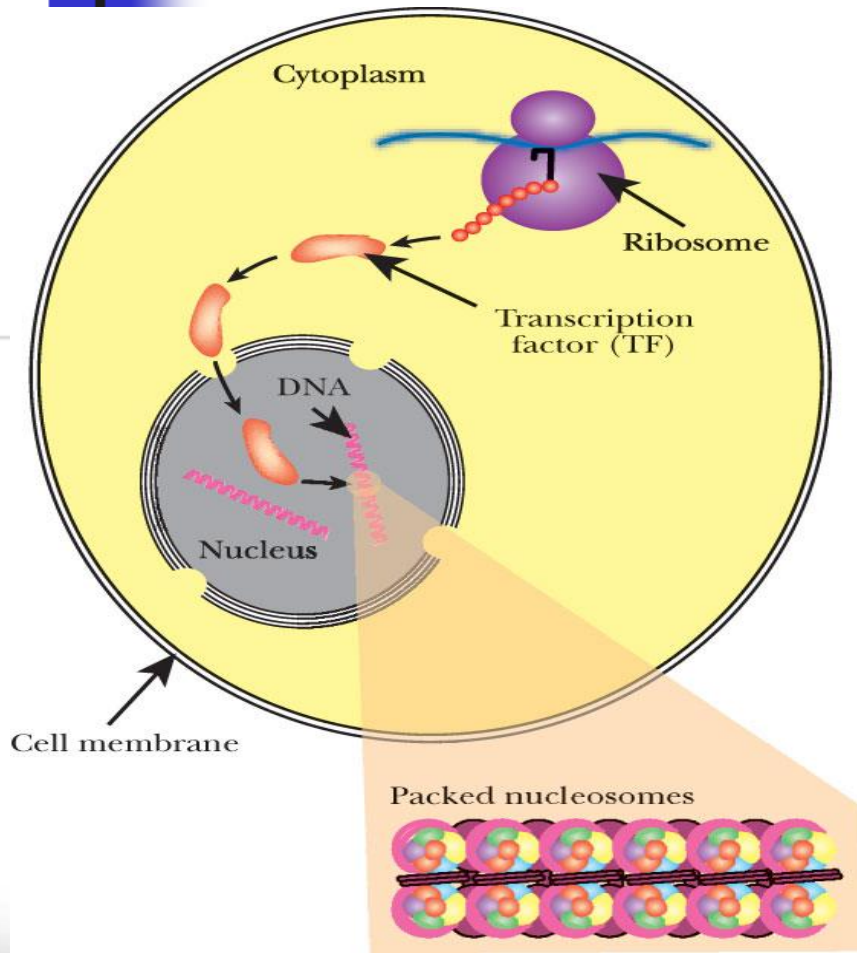


Hampir semua mempunyai TATA box pada -25
Posisi TF binding sites lebih upstream
“GC box” “CCAAT box” etc.

Gen dan Promoter



Transkripsi dan Translasi pada Eukariot



Lokasi Transkripsi

- **Sel Prokariotik**
- Proses transkripsi terjadi di dalam sitoplasma.
- **Sel Eukariotik**
- Proses transkripsi terjadi di dalam inti sel



Ekspresi Gen Eukariot pada Bakteri

Istilah/definisi:

Proses ekspresi gen yang berasal dari organisme dengan spesies berbeda juga dikenal dengan **ekspresi heterologous**

Organisme yang mengandung DNA asing disebut **organisme transgenik**

Gen asing yang dimasukkan disebut **transgen**

Keunggulan dan Kelemahan Bakteri sebagai Sel Inang

Keunggulan:

Sistem genetik paling dipahami
Tersedia berbagai pilihan vektor ekspresi
Mudah dimanipulasi
Pertumbuhan cepat, media murah
Dapat ditumbuhkan dalam skala besar

Kelemahan:

- Tidak memiliki sistem modifikasi pascatranslasi
- Berpeluang menghasilkan senyawa pirogenik

Karakteristik vektor (plasmid) ekspresi untuk bakteri

- Mengandung segmen *ori* (*origin of replication*) yang memungkinkan vektor vektor bereplikasi pada sel bakteri
- Mengandung *Multiple Cloning Sites* (MCS) sebagai tempat untuk menyisipkan gen asing yang diklon
- Mengandung gen resistensi terhadap antibiotik yang berfungsi untuk seleksi transforman pembawa plasmid
- Mengandung promoter sebagai tempat memulai proses transkripsi
- Mengandung terminator sebagai tempat akhir proses transkripsi

Vektor Ekspresi

- Vektor (umumnya plasmid) yang digunakan untuk membawa gen target dan dirancang agar setelah berada didalam sel inang protein yang disandi oleh gen target dibentuk melalui proses transkripsi dan translasi (terjadi ekspresi gen target).
- Vektor ekspresi memiliki sekuen tambahan berupa promoter dan terminator.
- Selain digunakan dalam bioteknologi untuk memproduksi protein tertentu (insulin, interferon, dsb) juga untuk riset.

Sinyal penting untuk ekspresi pada *E. coli*

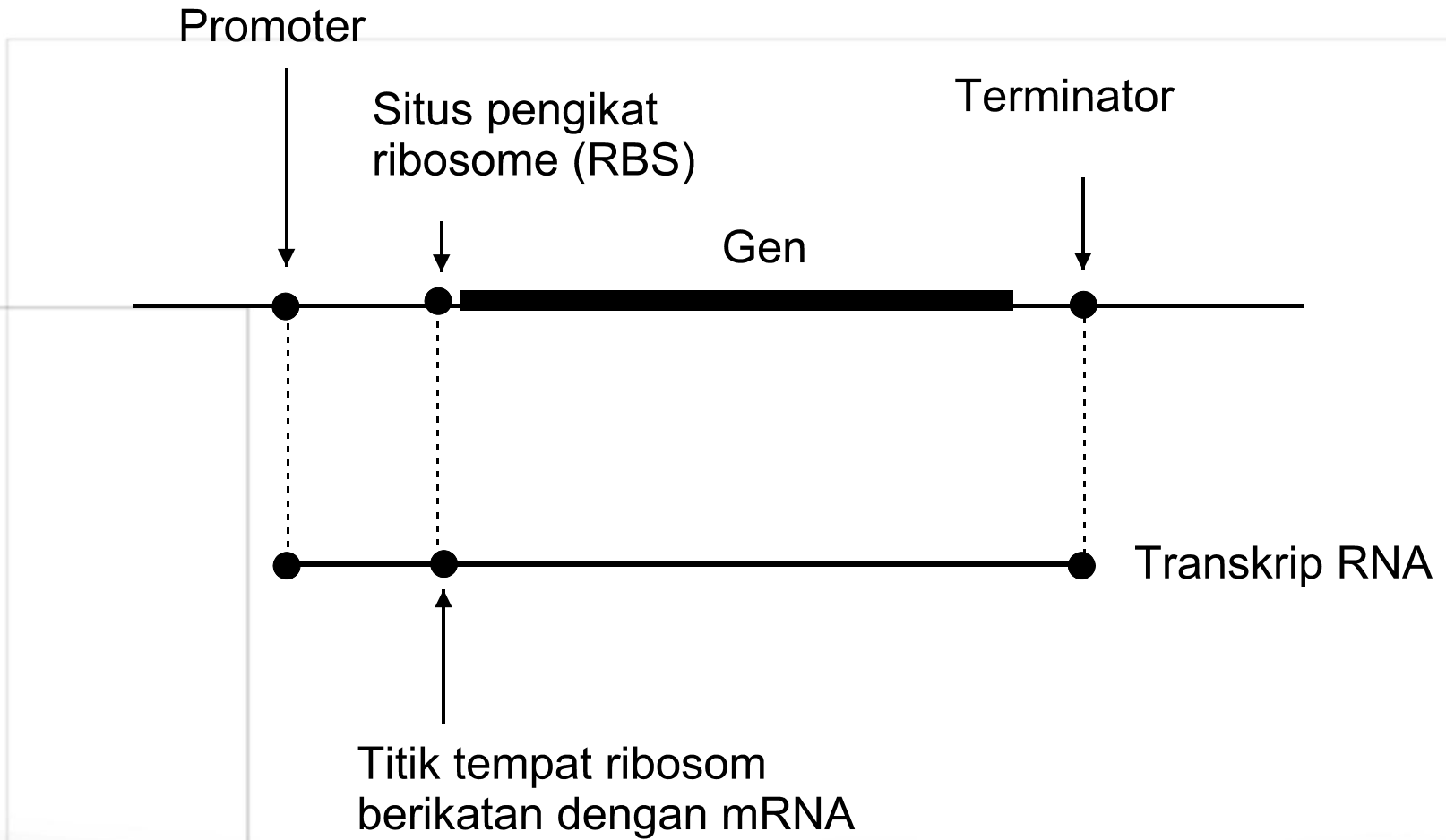
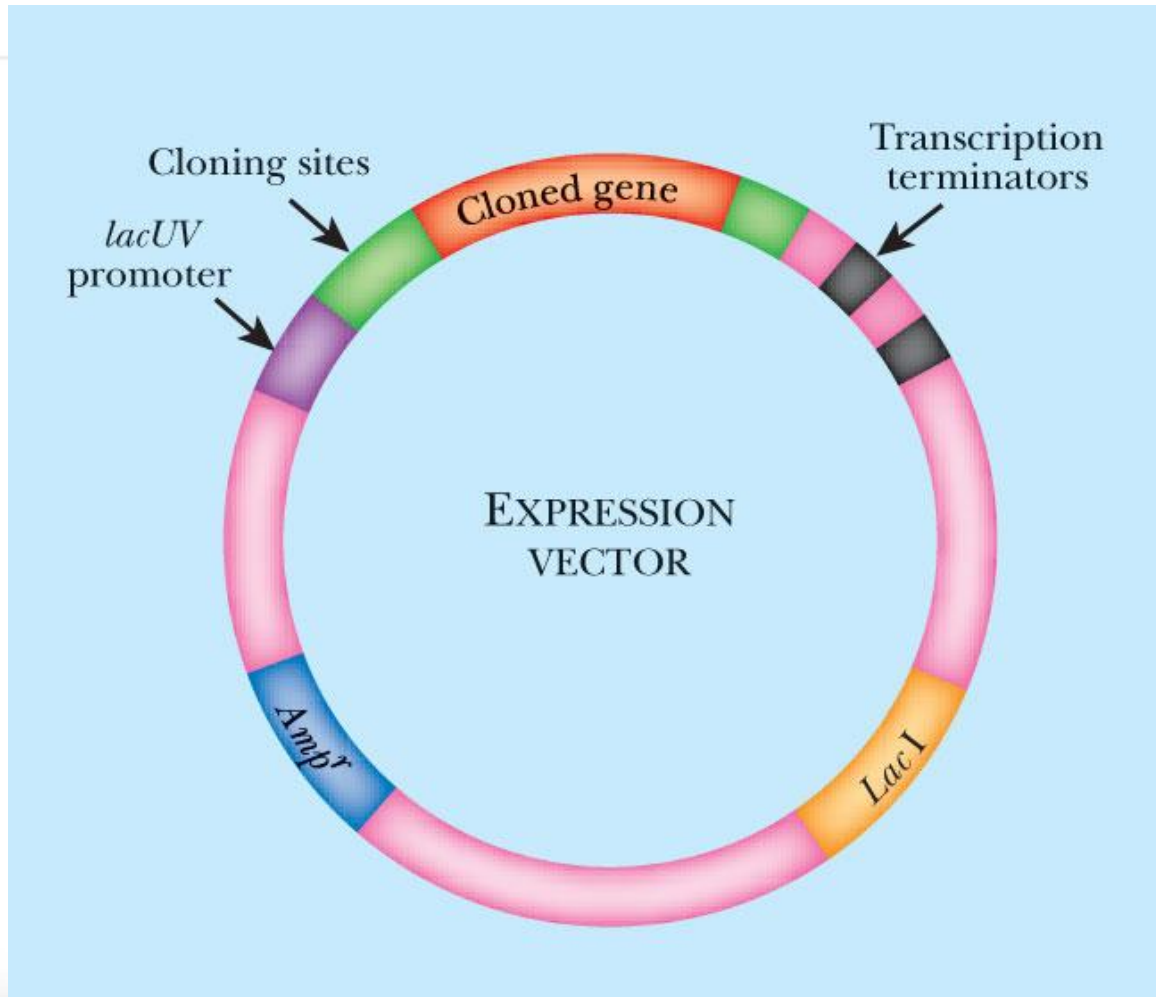
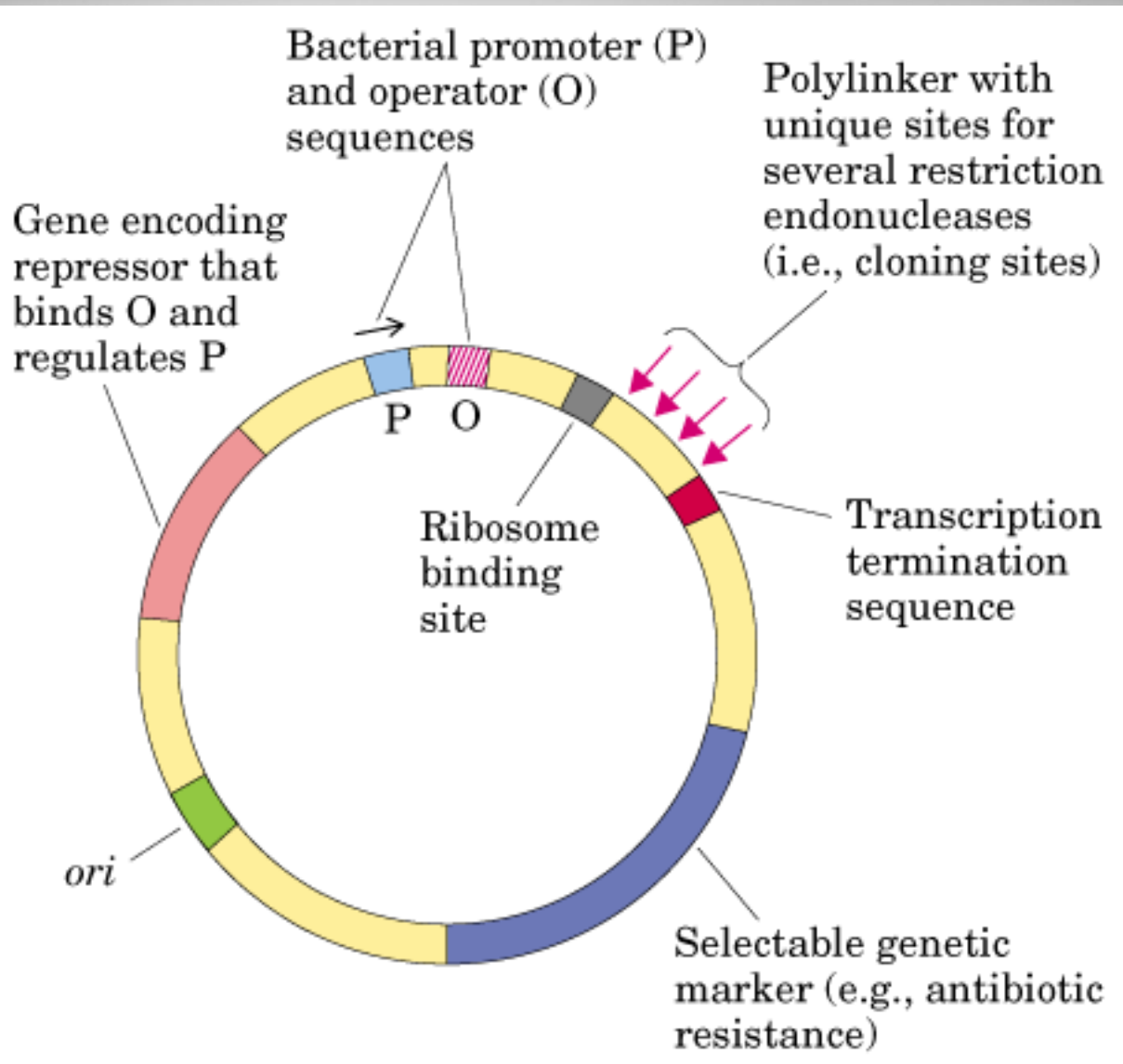


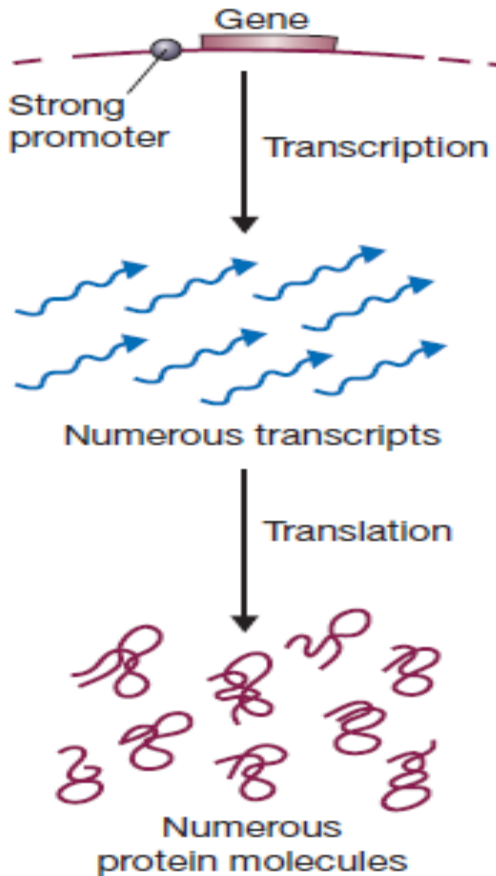
Diagram Vektor Ekspresi



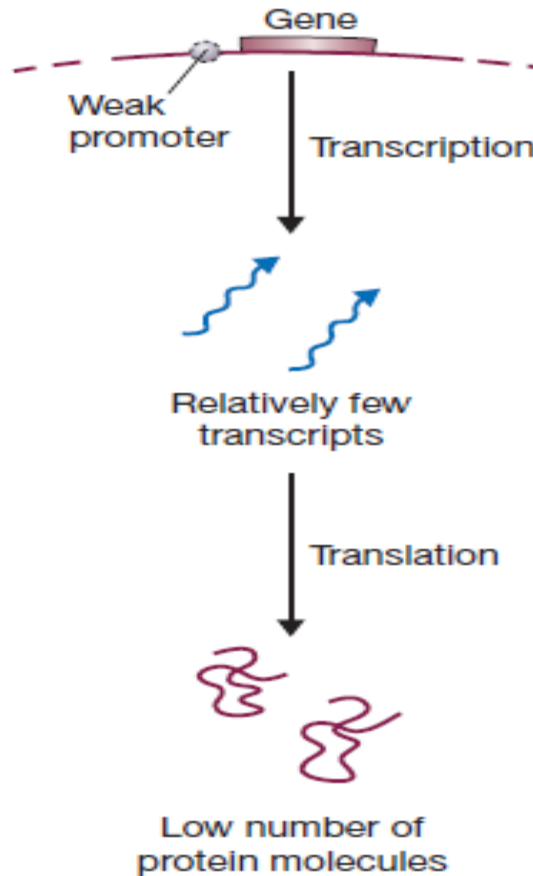


Promoter kuat dan promoter Lemah

(a) A strong promoter



(b) A weak promoter



Faktor yang mempengaruhi Ekspresi

1. Jumlah salinan per sel dari vektor ekspresi.
2. Stabilitas keseluruhan dari vektor ekspresi (di bawah seleksi untuk vektor); vektor yang lebih kecil lebih stabil daripada vektor yang lebih besar.
3. Kekuatan promotor; lebih kuat promotor, lebih tinggi adalah ekspresi.
4. Stabilitas mRNA heterolog; ini adalah salah satu faktor penentu tingkat utama.

Conventional cloning method: General Steps To expression GEN

Conventional cloning method include some general steps:

- cDNA synthesis from mRNA
- Amplification of target gene by gene specific primer (**PCR**)
- Extraction of putative DNA band from agarose gel
- Insertion into plasmid**TA-cloning**
- Transformation into *E. coli*.....***lacZ and antibiotic selection***
- Selecting the “true-transformed” colonies (**colony PCR**)
- Amplification of plasmid-contained colony ...colony culture
- Plasmid purification ...to collect plasmid from *E. coli cell*

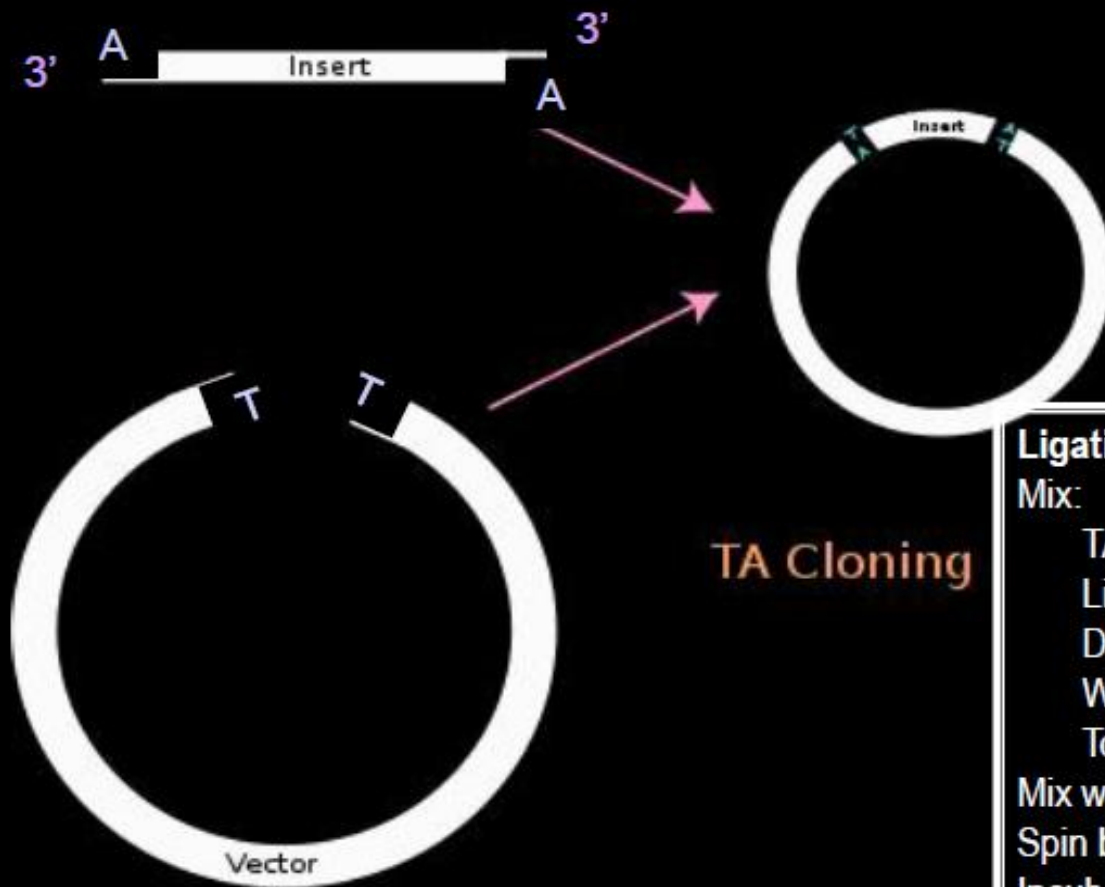
Inserting the target gene into a plasmid: TA-cloning

TA Cloning is a subcloning technique that doesn't use restriction enzymes. The technique relies on the ability of adenine (A) and thymine (T) (complementary basepairs) on different DNA fragments to hybridize and, in the presence of ligase, become ligated together.

PCR products are usually amplified using Taq DNA polymerase which preferentially adds an adenine to the 3' end of the product.

Such PCR amplified inserts are cloned into linearized plasmid/ vectors that have complementary 3' thymine overhangs.

Inserting the target gene into a plasmid: TA-cloning



Ligation Results:

Plasmid with insert
Plasmid only
Insert only

Ligation Steps:

Mix:

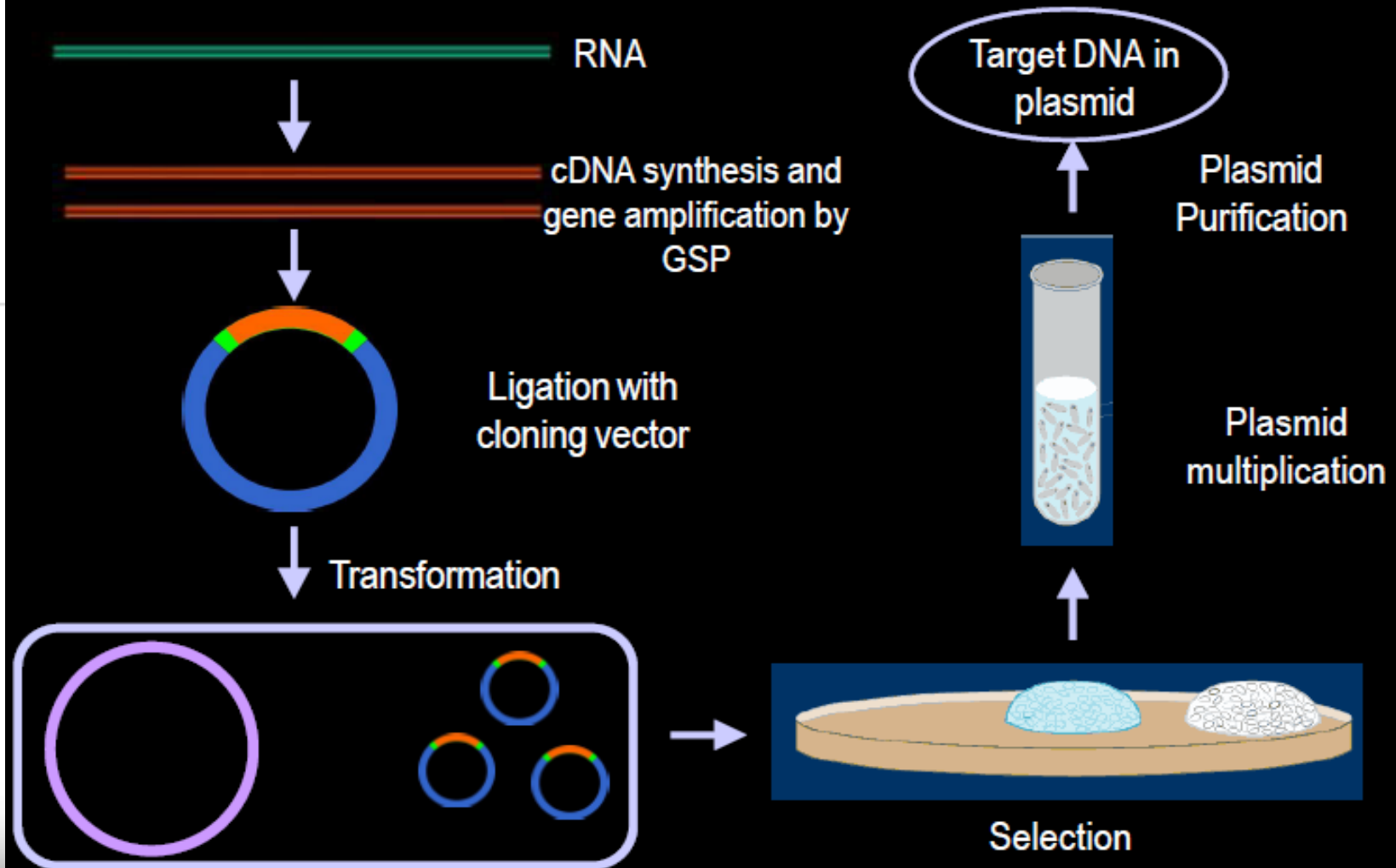
TA-vector 100 ng/ μ l	1 μ l
Ligation buffer	5 μ l
DNA fragment	1.5 μ l
Water	<u>2.5 μl</u>
Total	10 μ l

Mix well by tapping

Spin briefly

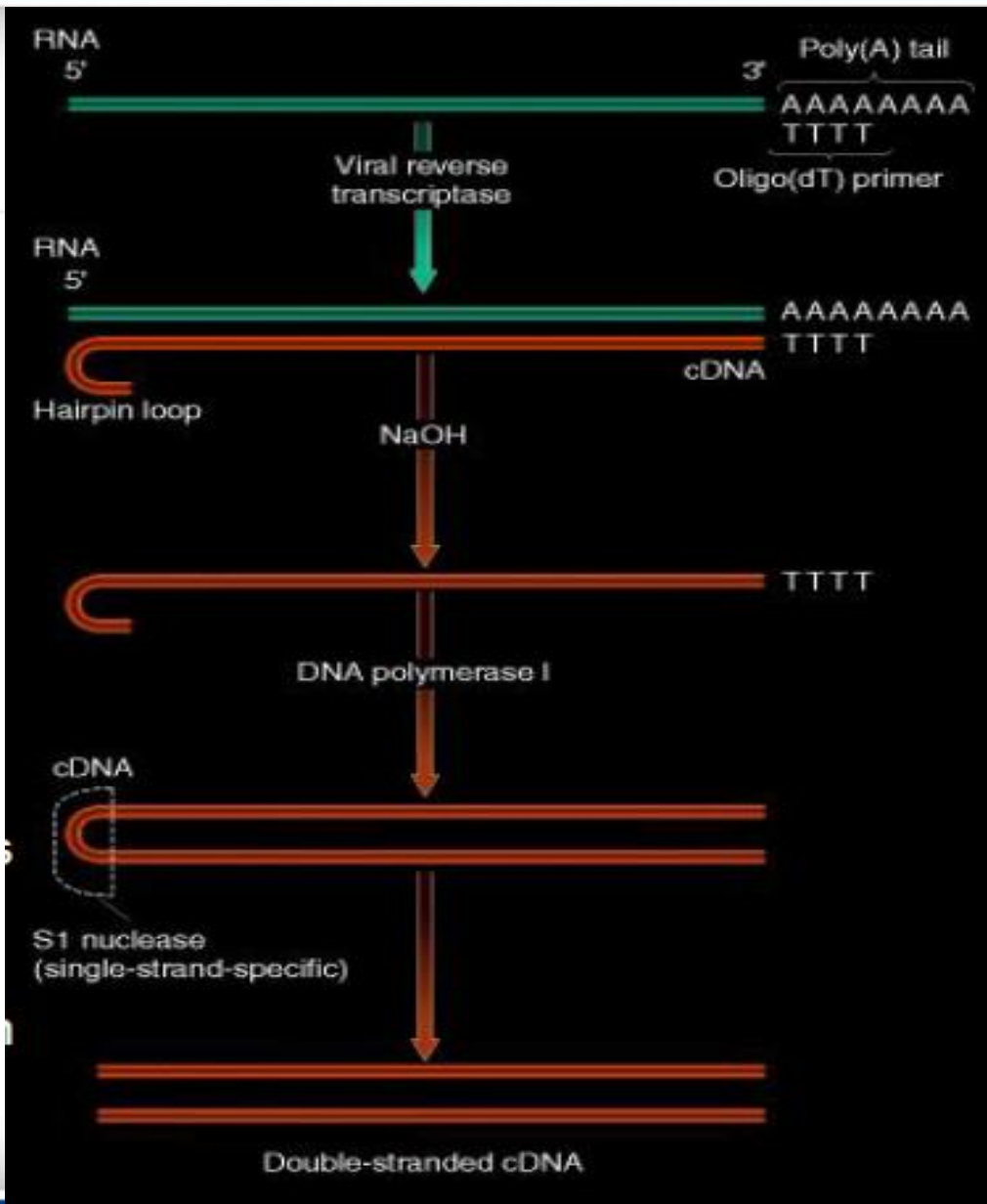
Incubate at 16°C 1h—over night.

Conventional cloning method: General Steps



cDNA synthesis from mRNA

- cDNA = complementary DNA. The classical steps of double-stranded cDNA synthesis from mRNA are:
- Eukaryotic mRNA's have a poly A tail. An oligo (dT) molecule hybridises to the poly A tail.
- the oligo dT segment serves as a primer for the action of reverse transcriptase, which uses the mRNA as a template for the synthesis of a complementary DNA strand.
- The resulting cDNA ends in a hairpin loop.
- When the mRNA strand has been degraded by treatment with NaOH, the hairpin loop becomes a primer for DNA polymerase I, which completes the paired DNA strand.
- The loop is then cleaved by S1 nuclease (which acts only on the single-stranded loop) to produce a double-stranded cDNA molecule.



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription



Oligo dT primer is bound to mRNA



Reverse transcriptase (RT) copies first cDNA strand



Reverse transcriptase digests and displaces mRNA and copies second strand of cDNA



Double strand cDNA

Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription



Oligo dT primer is bound to mRNA



Reverse transcriptase (RT) copies first cDNA strand



Reverse transcriptase digests and displaces mRNA and copies second strand of cDNA



Double strand cDNA

Example of protocol: Superscript, Takara

Steps (work on ice):

Mix:

a. Total RNA (1-2 μg)	2 μl
b. Oligo (dT) primer (100 μM)	3 μl
c. Water	<u>5 μl</u>
Total	10 μl

Heat at 65°C for 5 min → To denature primer

Stored on ice for 5 min → To prevent enzyme inactivation in the following reaction

Spin

Add the below reagent to previous microtube:

a. Water	3 μl
b. 5X RTase M-MLV Buffer	4 μl
c. dNTP-mix (10mM)	2 μl
e. RTase M-MLV	<u>1 μl</u>
Total	20 μl

} If you have many samples,
you may mix these reagents
and split into your samples.

→ Take the enzyme directly
from -20°C refrigerator

Incubate at 42°C for 1 hr → RT-reaction

Heat at 70°C for 10 min → To stop any enzymatic reaction

■ Incubation can be done using PCR, heat block, or air incubator

■ The minimum amount of total RNA is 1 μg , thus you have to calculate the RNA volume base on the RNA concentration (i.e. for RNA concentration 0.675 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 μl sample will resulted in 1.35 μg RNA).

Tugas : Buat Makalah individu Tentang

- Dessy, stevina, anita : Ekspresi Gen Pada Eukariotik
Nataniel, Lifda, tazkya : Ekspresi Gen pada Prokariotik

Dikumpulkan pada saat Pertemuan ke 14

Format makalah

Kata Pengantar, Daftar isi/ Gambar, Pendahuluan, Isi dan Pembahasan, Penutup dan Daftar Pustaka (diatas 2000an)

THANK
YOU



607132.wordpress.com

Noviani's Blog

