

Konstruksi vektor untuk ekspresi gen penyandi enzim N - asetil neuraminat liase (nana liase) dari escherichia coli

Uswatun Hasanah, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20179879&lokasi=lokal>

Abstrak

ABSTRAK

NANA liase adalah enzim yang mengkatalisis proses reversibel N-acetyl neuraminic acid (NeuSAc) atau asam sialat menjadi N-acetyl mannosamin (ManNAc) dan piruvat. Enzim NANA liase dihasilkan oleh bakteri patogen dan non patogen, antara lain dari Clostridium perfringens, Escherichia coli dan Haemophilus influenzae. Untuk mendapatkan enzim NANA liase dalam jumlah yang besar perlu dilakukan studi tentang rekayasa genetika. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan kloning teitidap gen nanA dari Lactobacillus plantarum. Tujuan jangka panjang dari penelitian sebelumnya adalah rekayasa protein dengan mutasi pada segmen DNA. Rekayasa protein dengan mutasi pada segmen DNA dibutuhkan sedikitnya dua gen yang berbeda. Oleh karenanya dibutuhkan gen lain, sebagai pasangan dari gen nanA-Lplantarum. Penelitian ini terfokus untuk mengkonstruksi vektor gen penyandi enzim NANA liase dari bakteri Escherichia coli. Gen nanA dari E.coli//dipilih sebagai pasangan gen nanA-Lplantarum karena gen nanA dari E.coli telah terkarakterisasi dengan baik. Penelitian ini menggunakan metode Isolasi DNA dengan CTAB, amplifikasi PGR dan teknik kloning. Isolasi DNA dengan CTAB dilakukan untuk mendapatkan DNA dari E.coli. Teknik PGR dilakukan untuk mengamplifikasi gen yang menyandi enzim NANA liase, dimana menggunakan primer forward yang memiliki situs pemotongan terhadap EcoRI dan primer reverse yang memiliki situs pemotongan terhadap HindIII. Sedangkan teknik kloning, yang terdiri dari ligasi, transformasi dan seleksi bertujuan untuk mendapatkan vektor ekspresi yang tersisipi gen penyandi enzim NANA liase. Teknik amplifikasi PGR yang dilakukan berhasil mengamplifikasi gen penyandi enzim NANA liase, nan A (0,9 kb) yang memiliki situs pemotongan EcoRI dan HindIII. Gen yang didapat disisipkan ke dalam vektor ekspresi pTrcSSA (4,1 kb), selanjutnya ditransformasi ke dalam E.coli DH5a dan menghasilkan 35 transforman. Transforman yang dihasilkan diambil 7 koloni untuk dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa, dan ternyata terdapat tiga koloni yang tersisipi pTrc99A-nanA E.coli (E/H) (5,0 kb). Selanjutnya dari tiga koloni tersebut diambil satu koloni dan diuji kembali dengan teknik PGR. Pada penelitian ini dilakukan uji sekuen yang bertujuan untuk memastikan tidak terjadinya mutasi selama pengerjaan. Sekuen gen yang didapat telah dikonfirmasi dan ternyata tidak berbeda dengan sekuen gen yang dipublikasikan. Hal ini membuktikan bahwa tidak terjadinya mutasi selama pengerjaan. Vektor yang dihasilkan dapat digunakan untuk eksperimen berikutnya yaitu (a) produksi enzim rekombinan NANA liase, dan (b) sebagai pasangan gen nanA dari Lactobacillus plantarum untuk rekayasa protein dengan mutasi segmen DNA.