

Sintesis dan pengklonaan fragmen-fragmen DNA APOBEC3G ke dalam vektor pBluescript KS (-) = Synthesis and cloning of fragments APOBEC3G DNA Into Bluescript SK (-) Vector

Angela Fuzairi, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20341277&lokasi=lokal>

Abstrak

Latar Belakang: APOBEC3G, apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like JG, merupakan protein manusia yang dapat mengganggu replikasi HIV dengan memasukkan dirinya ke dalam partikel virus dan merusak susunan materi genetik virus. Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa APOBEC3G manusia mengatur infektivitas HIV-1 dengan mendeaminasi dC menjadi dU pada rantai minus DNA yang baru dibentuk, menyebabkan hipermutasi G menjadi A dari rantai plus DNA viral.

Induksi hipermutasi oleh APOBEC3G dapat menyebabkan pembentukan stop kodon pada ORF protein virus dan memicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil yang selanjutnya dapat menghambat replikasi HIV. Protein ini layak untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka pengembangan anti retrovirus yang berbasis pada mekanisme penghambatan replikasi HIV-1 melalui jalur APOBEC3G. Sebagai langkah awal, diperlukan sistem ekspresi gen APOBEC3G yang akan diperoleh melalui sintesis dan kloning gen APOBEC3G ke dalam vektor ekspresi DNA rekombinan.

Metode: Untuk mendapatkan mRNA APOBEC3G yang akan digunakan sebagai pola cetak dalam sintesis eDNA APOBEC3G, dilakukan ekstraksi RNA dari sel CEM-GFP menggunakan Rneasy Mini Kit. Agar DNA APOBEC3G lengkap dapat diperoleh dengan lebih mudah, sintesis DNA seret ganda APOBEC3G menggunakan reaksi RT-PCR dua tahap, dibagi atas tiga daerah pada gen APOBEC3G dengan susunan nukleotida yang bertumpang tindih (overlapping) pada bagian ujung segmen DNA yang akan berfungsi sebagai penyambung fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G utuh.

Hasil: Hasil eksperimen menunjukkan ketiga fragmen APOBEC3G yang masing-masing berukuran 452 pb, 458 pb, dan 433 pb berhasil dibentuk lewat reaksi PCR dengan menggunakan enzim Pfx dan diklona ke dalam vektor plasmid.

Kesimpulan: DNA APOBEC3G yang dibagi menjadi 3 fragmen telah berhasil didapat dan terklona ke dalam pBluescript KS (-). Pekerjaan lanjutan akan dilakukan untuk verifikasi sekuens fragmen-fragmen terklona dan menyambung ketiga fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G yang utuh yang kemudian akan diklona ke dalam vektor ekspresi.

<hr>Background: APOBEC3G, apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like JG, is a human protein that interferes with the replication of HIV by incorporating itself into virus particles and damaging the genetic material of the virus. Several recent studies revealed that human APOBEC3G regulates HIV-1 infectivity by deaminating dC to dU in the newly synthesized minus strand DNA, resulting in G to A hypermutation of the viral plus strand DNA.

Hypermutation induced by APOBEC3G may result in the introduction of stop codons in viral protein open reading frame and degradation of viral DNA by uracil-DNA glycosylase, therefore blocking HIV replication. This protein is therefore suitable for further investigation for the development of ARV (AntiRetroviral) that is based on mechanism of blocking HIV-1 replication inhibition by APOBEC3G through the pathway. In order to obtain the APOBEC3G protein, an expression system of the APOBEC3G gene is required, which will be obtained by synthesis and cloning of the APOBEC3G gene into an expression vector.

Method: To obtain the APOBEC3G mRNA that will be used as template for synthesis of APOBEC3G cDNA by RT-PCR using Omniscript enzyme, we performed RNA extraction from CEM-GFP cell line using the RNeasy Mini kit. In order to facilitate the synthesis of a complete APOBEC3G DNA, the APOBEC3G DNA double stranded was divided into three regions with overlapping nucleotide sequences at the DNA ends that function in the joining of the fragments into a full length APOBEC3G DNA.

Results: The result of the experiments showed that the three fragments of APOBEC3G gene of 452 bp, 458 bp, and 433 bp, were successfully produced by PCR reaction using Pfx enzyme, and cloned into plasmid vector.

Conclusions: APOBEC3G DNA that was divided into three fragments has been obtained and cloned into Bluescript KS (-) vector. Further study, will be performed to verify the cloned fragments, and to fuse the fragments into a complete APOBEC3G DNA that will be cloned into an expression vector.