

Konstruksi gen penyandi pluripotensi oct 4 dan klf4 rekombinan di inang escherichia coli = Construction of recombinant gene coding of pluripotency oct 4 and klf4 in escherichia coli host

Annisaa Paramita Setiabudi, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20387218&lokasi=lokal>

Abstrak

Oct-4 dan Klf4 merupakan dua gen penyandi pluripotensi yang terdapat pada manusia. Kedua gen tersebut dapat dideteksi pada mRNA sel kanker manusia dengan menggunakan rancangan primer spesifik pada metode RT-PCR. Proses RT-PCR akan mengubah mRNA menjadi cDNA yang kemudian hasilnya dilakukan purifikasi dari gel agarosa. Hasil purifikasi gel agarosa diamplifikasi dengan PCR. Selanjutnya, dilakukan proses sekuensing untuk memeriksa keakuratan sekuen gen yang nantinya akan dikloning. Hasil sekuensing dianalisis dengan BLASTN untuk pencarian homologi pada database asam nukleat. Ligasi dilakukan menggunakan vektor pET101/D-TOPO®. Rancangan primer yang spesifik dan penambahan basa CACC ATG pada primer forward merupakan syarat untuk melakukan ligasi DNA ke vektor pET101/D-TOPO®, dimana proses ligasi ini tidak menggunakan enzim ligase. Selanjutnya, produk hasil ligasi ditransformasi ke inang *Escherichia coli* DH5α; yang selnya sudah dibuat kompeten dengan metode heat shock. Koloni yang tumbuh di media LB agar dengan ampisilin diisolasi untuk mendapatkan plasmid yang selanjutnya dianalisis dengan menggunakan teknik PCR. Vektor plasmid yang terdapat pada *E.coli* DH5α; kompeten mengandung sisipan gen Oct-4 dan Klf4.

<hr>

Oct-4 and Klf4 are two genes coding of pluripotency in human. Both of the genes can be detected in human cancer cell mRNA by using specifically designed primers in RT-PCR method. RT-PCR process changed the mRNA into cDNA. The result from this process was purified from agarose gel fragment and amplified by PCR method. Then, sequencing of the purified products were done and analyzed using BLASTN feature in NCBI site to search the homology of the sequence compared to the sequences in nucleic acid database. The vector used in ligation process was pET101/D-TOPO® vector. Specifically designed primers and adding CACC ATG base in the beginning of forward primer are the requirements of using this vector. The ligation process using this TOPO® vector does not require the presence of DNA ligase. The next process is transformation by using the heat shock method. Ligation product is transformed into competent *Escherichia coli* DH5α; host. Colonies that grows in LB agar media with ampicillin are treated by plasmid isolation protocol in order getting the plasmids for further analysis using PCR method. The result from PCR analysis shows that the plasmids in competent *E.coli* DH5α; contain Oct-4 and Klf4 inserts.