

Pengklonaaan gen pengekspresii protein p53 manusia ke dalam vektor plasmid pQE-80L = Cloning of human p5 gene into pQE-80L vector

Aprila Suprihendina, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20458690&lokasi=lokal>

Abstrak

Keamanan dari vaksin terapeutik untuk kanker serviks yang didasarkan pada antigen HPV E6 perlu dipastikan dengan uji interaksi antara vaksin dan protein p53. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan plasmid rekombinan untuk ekspresi protein rekombinan p53 yang akan digunakan dalam uji interaksi. Enzim RevertAid dan primer random hexamer digunakan untuk mendapatkan cDNA dari sel HeLa yang akan digunakan sebagai cetakan PCR dengan menggunakan enzim Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity dan primer p53 spesifik. Produk PCR yang dihasilkan sebesar 1204 bp yang mengandung gen p53 dengan adanya penambahan situs restriksi endonuklease SalI dan PstI. Setelah pemotongan dengan enzim SalI dan PstI, produk PCR diligasi dengan plasmid pQE-80L yang juga sudah dipotong dengan enzim yang sama. Campuran ligasi digunakan untuk transformasi ke dalam Escherichia coli TOP10. Keberadaan fragmen DNA p53 yang berhasil dimasukkan ke dalam plasmid rekombinan yang sudah berada di dalam transforman diverifikasi menggunakan PCR, pemotongan DNA rekombinan, dan sekuensing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen p53 manusia berhasil diklon ke pQE-80L dengan adanya mutasi pada urutan basa nukleotida ke-386.

In order to confirm the safety of a therapeutic vaccine for cervical cancer that is based on HPV E6 antigen, an interaction assay between the vaccine and the p53 protein is required. The aim of this study is to obtain a recombinant plasmid for expression of p53 recombinant protein that will be used in the interaction assay. The RevertAid enzyme and random hexamer primer was employed to obtain cDNA from HeLa cell that will be used as template in PCR using the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity enzyme and p53 specific primer set, to generate a 1204 bp PCR product containing the p53 gene, with flanking SalI and PstI endonuclease restriction sites. Following restriction with SalI and PstI enzyme, the PCR product was ligated with the plasmid pQE 80L that has been linearized by restriction with the same enzymes. The ligation mixture was used for transformation of Escherichia coli TOP10. The presence of the inserted p53 DNA fragment in the recombinant plasmid harboured by the transformants was verified using PCR, digestion of recombinant plasmids, and sequencing. The results showed that the human p53 gene was successfully cloned into pQE 80L with a mutation at position 386 of the p53 nucleotide base sequence.