

Transformasi dan ekspresi gen EGFRvIII menggunakan plasmid rekombinan pPICZ-EGFRvIII-bfp dengan promotor = Transformation and expression of the EGFRvIII gene using recombinant plasmid pPICZ-EGFRvIII-bfp with promoter

Amelia Dwi Intan Cahyani, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20493401&lokasi=lokal>

Abstrak

Gen Epidermal Growth Factor Receptor Varian III (EGFRvIII) merupakan mutan dari gen EGFR yang terbentuk akibat mutasi delesi ekson 2 sampai 7. Gen EGFRvIII mengkode ekspresi protein EGFRvIII yang hanya diekspresikan pada sel kanker, sehingga protein ini berpotensi untuk digunakan sebagai molekul target dalam terapi kanker yang ditargetkan dengan antibodi monoklonal. Fragmen anti-EGFRvIII untai tunggal (scFv) adalah antibodi monoklonal yang secara khusus mengenali epitop unik EGFRvIII. Antibodi ini perlu diuji aktivitasnya dengan protein EGFRvIII. Protein EGFRvIII dapat diproduksi dengan menggunakan plasmid pPICZ-EGFRvIII-bfp. pPICZ-EGFRvIII-bfp adalah plasmid rekombinan dengan promotor AOX1 yang tidak dapat digunakan, yang dirancang untuk diubah menjadi P. pastoris sehingga protein EGFRvIII dapat diekspresikan secara ekstraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan klon P. pastoris transforman yang mengandung gen EGFRvIII dan dapat mengekspresikan protein EGFRvIII. Metode transformasi yang digunakan adalah elektroporasi. Seleksi P. pastoris transforman dilakukan dengan antibiotik zeosin. Gen target pada transforman diverifikasi menggunakan PCR koloni. Ekspresi protein target dilakukan dengan menggunakan teknik induksi metanol. Ekspresi protein dilihat di bawah mikroskop fluoresensi dan dianalisis dengan SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan klon P. pastoris transforman yang mengandung gen EGFRvIII-bfp (750 bp) berhasil diperoleh, dengan efisiensi transformasi plasmid $0,003 \times 10^3$ cfu/g. Protein EGFRvIII berhasil diekspresikan berdasarkan pendaran biru protein BFP, tetapi diduga mengalami glikosilasi dan masih menyatu dengan sinyal sekresi karena ukuran protein SDS-PAGE (sekitar ~ 66,2 kDa dan ~ 116 kDa) lebih besar dari ukuran target (~ 41,9 kDa).

.....Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) gene is a mutant of the EGFR gene which is formed as a result of deletion mutations of exons 2 to 7. The EGFRvIII gene encodes the expression of the EGFRvIII protein which is only expressed in cancer cells, so that this protein has the potential to be used as a target molecule in cancer therapy. targeted. with monoclonal antibodies. The single-stranded anti-EGFRvIII (scFv) fragment is a monoclonal antibody that specifically recognizes the unique epitope of EGFRvIII. These antibodies need to be tested for their activity with the EGFRvIII protein. The EGFRvIII protein can be produced using the plasmid pPICZ-EGFRvIII-bfp. pPICZ-EGFRvIII-bfp is a recombinant plasmid with the unusable AOX1 promoter designed to be converted into P. pastoris so that the EGFRvIII protein can be expressed extracellularly. This study aims to obtain clones of P. pastoris transforman that contain the EGFRvIII gene and can express the EGFRvIII protein. The transformation method used is electroporation. P. pastoris transforman selection was carried out with zeosin antibiotics. The target genes in the transformants were verified using colony PCR. The target protein expression was carried out using methanol induction technique. Protein expression was viewed under a fluorescence microscope and analyzed by SDS-PAGE. The results showed that P. pastoris transforman clones containing the EGFRvIII-bfp (750 bp) gene were successfully obtained, with a plasmid transformation efficiency of 0.003×10^3 cfu/g.

EGFRvIII protein was successfully expressed based on the blue luminescence of BFP protein, but it was suspected to undergo glycosylation and still fuse with the secretion signal because the size of the SDS-PAGE protein (approximately ~ 66.2 kDa and ~ 116 kDa) was larger than the target size (~ 41.9 kDa) .