

Pengklonaan fragmen DNA gen PD-1 N-terminal pada sistem ekspresi TOP10 E. coli = Cloning of DNA fragment encoding N-terminal region of PD-1 gene from E. coli Top10 expression system

Kresanti Dewi Ngadimin, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20510823&lokasi=lokal>

Abstrak

Protein PD-1 biasanya diekspresikan berlebihan pada pasien kanker dan menghambat sistem imun. Antibodi monoklonal dari PD-1 dapat digunakan untuk menghambat jalur tersebut. Namun, urutan nukleotida dari epitop dengan afinitas yang kuat masih belum diketahui. Oleh karena itu, plasmid yang mengandung epitop kecil dari PD-1 dibuat untuk proses epitope mapping. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan plasmid yang mengandung daerah N-terminal dari gen PD-1. DNA insert sintetik dibuat dari metode PCR dan dipurifikasi. Kedua DNA insert dan plasmid pQE80L didigesti dengan enzim restriksi BamH1 dan HindIII, dipurifikasi dan diligasi. Plasmid tersebut dimasukkan ke dalam sel kompeten TOP10 dengan transformasi heat shock. Koloni positif diseleksi menggunakan metode PCR koloni dan verifikasi dengan menggunakan digesti dan sanger sequencing. Produk PCR dari EP1PD1 didapat dengan menggunakan suhu annealing sebesar 57°C dan berhasil diligasi ke plasmid pQE80L and ditransformasikan. Hasil dari sequencing menunjukkan urutan yang sama namun terdapat insersi diawal. Beberapa modifikasi perlu dilakukan untuk mengekspresi protein EP1PD1. Konklusi dari penelitian ini adalah plasmid yang mengandung epitop 1 PD-1 berhasil diperoleh dengan insersi.

.....PD-1 protein tends to be overexpressed in cancer patient and inhibits immune system. Monoclonal antibody of PD-1 can be used to inhibit this pathway. However, the sequence of epitope with strong affinity is currently unknown. Thus, plasmid containing small epitope of PD-1 was made for PD-1 epitope mapping process. The objective of this research is to obtain plasmid containing N-terminal region of PD-1 gene. Synthetic insert DNA was made using PCR method and purified. Both insert DNA and pQE80L plasmid were digested using BamH1 and HindIII enzyme, purified and ligated. It was then inserted into TOP10 competent cell using heat shock transformation method. Positive colonies are selected using PCR colony and verified using digestion and Sanger sequencing. PCR product of EP1PD1 are obtained using annealing temperature of 57°C and able to be ligated to pQE80L plasmid and transformed. Sequencing result shows EP1PD1 result with insertion in the beginning. Modifications are required to express EP1PD1 protein. In conclusion, the plasmid containing Epitope 1 of PD-1 are able to be obtained with insertion.