



UNIVERSITAS INDONESIA

**Konstruksi Plasmid Overekspresi Gen *sgfpS65T* Berbasis Vektor
Binary pCAMBIA1305.1 untuk Studi Aktivitas Promoter**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

DWI WIDYAJAYANTIE

0806365223

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM S1 EKSTENSI KIMIA

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

JULI 2011

i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Dwi Widyajyantie

NPM : 0806365223

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Dwi Widyajyantie
NPM : 0806365223
Program Studi : Ekstensi Kimia
Judul Skripsi : Konstruksi Plasmid Overekspresi Gen *sgfpS65T*
Berbasis Vektor Binary pCAMBIA1305.1 untuk
Studi Aktivitas Promoter

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains, Program Studi Ekstensi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Dra. Siswati Setiasih, Apt, Msi. (.....)

Pembimbing 2 : Dr. Satya Nugroho (.....)

Penguji : Dr. Endang Saepudin (.....)

Penguji : Dra. Sri Handayani, M.BioMed. (.....)

Penguji : Dr. A. Hery Cahyana (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT, karena atas segala rahmat, anugerah serta karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini. Shalawat dan salam tak lupa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Skripsi yang berjudul “Konstruksi Plasmid Overekspresi Gen *sgfpS65T* Berbasis Vektor Binary pCAMBIA1305.1 untuk Studi Aktivitas Promoter” ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains, Departemen Kimia Universitas Indonesia. Penelitian ini dilakukan sepenuhnya di Laboratorium Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Cibinong,.

Pada kesempatan ini, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra.Siswati Setiasih, Apt, M.Si selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Satya Nugroho selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Cibinong atas dana yang diberikan serta alat, bahan dan fasilitas penunjang lainnya bagi penulis selama melakukan penelitian.
3. Bapak Dr. Endang Saepudin selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Kimia.
4. Bapak Drs. Riswiyanto, M.Si dan Asep Saefumillah, PhD selaku Ketua Program Ekstensi Kimia FMIPA UI.
5. Bapak Dr. Ridla Bakrie selaku Ketua Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

6. Seluruh staff pengajar Departemen Kimia FMIPA UI.
7. Ibu Dr. Inez Hortense Slamet Loedin, Dr. Amy Setiati, Ir. Syamsidah Rahmawati, M.Si , Dr. Enung Sri Mulyaningsih, Dra. Puspita Deswina, M.Sc , Bapak Agus Rahmat, M.Si , dan Dr. Asrul M Fuad atas saran, masukan, literatur dan fasilitas yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.
8. Seluruh staff Kelompok Penelitian Padi di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong atas keceriaan, semangat, dukungan dan kerjasamanya.
9. Seluruh pegawai Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong.
10. Keluargaku tercinta, Bapak, Mama, dan Kakak atas semua dukungan, kasih sayang, perhatian, kesabaran, dorongan semangat dan do'a yang tidak henti-hentinya.
11. Seluruh rekan-rekan perjuangan Kimia Ekstensi 2008 sekaligus sahabat, Yenny, Atin, Retno, Puput, Asri, Mba Sofi, Temmy, dan Budi atas keceriaan, dukungan dan semangatnya kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, baik dari segi ilmiah maupun penyajiannya. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi rekan-rekan Kimia khususnya dan para pengembang ilmu pengetahuan pada umumnya.

Penulis,

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dwi Widyajyantie
NPM : 0806365223
Program Studi : Ekstensi Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

*Konstruksi Plasmid Overekspresi Gen *sgfpS65T* Berbasis Vektor Binary pCAMBIA1305.1 untuk Studi Aktivitas Promoter*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia bebas menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan



(Dwi Widyajyantie)

ABSTRAK

Nama : Dwi Widyajyantie
Program Studi : Ekstensi Kimia
Judul : Konstruksi Plasmid Overekspresi Gen *sgfpS65T* Berbasis Vektor Binary pCAMBIA1305.1 untuk Studi Aktivitas Promoter.

Keberhasilan suatu transformasi dalam kloning molekular untuk mengetahui apakah suatu gen telah tersisipi atau terekspresi dalam populasi sel atau organisme dapat diketahui melalui gen pelapor. Salah satu gen pelapor adalah *sgfpS65T* yang menyandi kemampuan menghasilkan warna/perpendaran cahaya lebih baik dengan bantuan sinar biru di antara varian *gfp* lainnya dan efisien karena tidak membutuhkan substrat untuk mengetahui ekspresinya, sehingga tidak bersifat toksik dan mempercepat proses seleksi transforman. Vektor kloning yang akan digunakan untuk membawa gen *sgfpS65T* ini adalah vektor binary pCAMBIA1305.1 yaitu vektor pembawa gen *gusPlus* sebagai gen pelapornya dan vektor yang umum digunakan untuk transformasi ke tanaman. Karena untuk mengetahui ekspresi dari gen *gusPlus* membutuhkan substrat yang dapat bersifat toksik terhadap sel transforman, maka dilakukan substitusi gen pelapor *gusPlus* pada pCAMBIA1305.1 dengan *sgfpS65T* dari pNU400 melalui konstruksi plasmid. Dari hasil penelitian ini diperoleh konstruksi plasmid pCAMBIA1305.1 pembawa fragmen *sgfpS65T* (pDWJ3) dengan panjang 720 bp, namun pada fragmen tersebut terdapat mutasi (substitusi basa) pada posisi 294 bp dan 710 bp. Pada posisi 294 bp menyandi asam amino yang sama dengan *sequence* acuan yaitu threonine dan pada posisi 710 bp menyandi asam amino yang berbeda yaitu phenylalanin, yang seharusnya menyandi asam amino leusin. Jadi, kemungkinan pDWJ3 tidak dapat mengekspresikan gen *sgfpS65T* dan diperlukan analisis lebih lanjut dan memastikan kembali mutasi yang terjadi pada fragmen tersebut.

Kata kunci : *gfp* (*green fluorescence protein*), *gusPlus*, plasmid rekombinan, gen pelapor.
xvii + 126 halaman : 29 gambar; 7 tabel
Bibliografi : 47 (1962 – 2010)

ABSTRACT

Name : Dwi Widyajyantie
Study Program : Chemistry, Extension Program
Title : The Construction of Overexpressed *sgfpS65T* Reporter Gene Using Binary Vector pCAMBIA1305.1 to Study Promoter Activity

The success of a clone transformation can be identified by reporter gene. This gene can detect whether a particular gene has been inserted and expressed in cells or organisms, one of which is *sgfpS65T* that encode the ability to produce color better than other *gfp* variants and efficient because it does not require a substrate to determine the expression, non toxic and accelerate the selection process transformant. pCAMBIA1305.1 is cloning vectors that will be used to carry *sgfpS65T*. pCAMBIA1305.1 binary vector carrying reporter gene *gusPlus* and commonly used for plant transformation. Due to determine the expression of *gusPlus* requires a substrate that can be toxic to the cell transformant, then performed reporter gene substitution *gusPlus* contained in pCAMBIA1305.1 with *sgfpS65T* from pNU400 through the construction of plasmid. This study has obtained pCAMBIA1305.1 containing 720 bp *sgfpS65T* (pDWJ3), but these fragments contained mutation (base substitution) at position 294 bp and 710 bp. At position 294 bp encode the same amino acid sequence of reference threonine, at position 710 bp encode a different amino acid that is phenylalanin, which should encode the amino acid leucine. Thus, the possibility can not express *sgfpS65T* (pDWJ3) and required further analysis and ensure that mutations occur in these fragments.

Keywords : *gfp* (*green fluorescence protein*), *gusPlus*, recombinant plasmid, reporter gene.

xvii + 126 pages : 29 pictures; 7 tables

Bibliography : 47 (1962 – 2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Manfaat dan Aplikasi Penelitian	5
1.6. Kerangka Konsep	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Organisasi Gen dalam Genom Prokaryot	7
2.2 Plasmid	8
2.2.1 Plasmid pCAMBIA 1305.1	11
2.2.2 Plasmid pNU400	12
2.2.3 Plasmid pGEM T-Easy	13
2.3 Gen Pelapor (<i>Reporter Gene</i>)	14
2.3.1 <i>gus</i> (β -Glucuronidase)	15

2.3.2 <i>gfp</i> (<i>green fluorescent protein</i>)	15
2.4 Kloning Gen	16
2.5 Teknik yang digunakan	16
2.5.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
2.5.2 Isolasi DNA plasmid	18
2.5.3 Enzim restriksi	19
2.5.4 Enzim Ligasi	20
2.5.5 Transformasi Gen	21
2.5.6 Elektroforesis gel agarose	22
2.5.7 <i>Sequencing</i>	23
2.6 <i>GeneBank</i>	24
2.7 <i>Sequence Alignment</i>	25
2.8 Membaca Kode Genetik	25
BAB 3 METODE PENELITIAN	28
3.1. Lokasi penelitian	28
3.2. Alat dan Bahan	
3.2.1. Alat	28
3.2.2. Bahan	28
3.3. Cara Kerja	29
3.3.1. Pencarian <i>sequence</i> pNU400, pCAMBIA1305.1 dan analisis restriksi plasmid	29
3.3.2 Perbanyak plasmid pCAMBIA1305.1 dan plasmid pNU400 dalam <i>E.coli</i>	30
3.3.3. Konfirmasi plasmid hasil isolasi dengan teknik elektroforesis	32
3.3.4. Konfirmasi pNU400 melalui <i>digest</i> dengan enzim <i>BglII</i> , <i>NcoI</i> , dan <i>SacI</i>	33
3.3.5. Penyiapan fragmen <i>backbone</i> pCAMBIA1305.1 dengan pemotongan fragmen gen <i>gusPlus</i>	34
3.3.6. Amplifikasi fragmen <i>sgfpS65T</i> dari pNU400 dengan teknik PCR	35

3.3.7. Ligasi fragmen <i>sgfpS65T</i> hasil PCR dengan vektor linier pGEM T-Easy	36
3.3.8 Transformasi hasil ligasi ke dalam Sel <i>E.coli</i> DH5 α kompeten & seleksi biru putih	37
3.3.9 Isolasi Plasmid pGEM-T Easy pembawa insert (<i>sgfpS65T</i>) & konfirmasi hasil isolasi melalui <i>digest</i> dengan enzim <i>EcoRI</i>	37
3.3.10. <i>Sequencing</i> plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> dan analisis hasil <i>sequencing</i>	38
3.3.11 <i>Double digest</i> pGEM-T Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> dengan <i>BstEII</i> dan <i>NcoI</i> serta ligasi fragmen <i>backbone</i> pCAMBIA1305.1 dengan fragmen <i>sgfpS65T</i>	38
3.3.12 Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> dengan teknik <i>heat-shock</i> dan seleksi hasil rekombinan dengan seleksi media padat LB mengandung antibiotik kanamycin	39
3.3.13 Isolasi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa dan konfirmasi hasil isolasi melalui <i>digest</i> dan teknik PCR	39
3.3.14 <i>Sequencing</i> plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa <i>sgfpS65T</i> dan analisis hasil <i>sequencing</i>	40

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pencarian <i>sequence</i> pNU400, pCAMBIA1305.1 dan analisis restriksi plasmid	41
4.2. Perbanyak plasmid pCAMBIA1305.1 dan plasmid pNU400 dalam <i>E.coli</i>	41
4.3. Konfirmasi plasmid hasil isolasi dengan teknik elektroforesis	43
4.4. Konfirmasi pNU400 melalui <i>digest</i> dengan enzim <i>BglII</i> , <i>NcoI</i> , dan <i>SacI</i>	44
4.5. Penyiapan fragmen <i>backbone</i> pCAMBIA1305.1 dengan pemotongan fragmen gen <i>gusPlus</i>	46
4.6. Amplifikasi fragmen <i>sgfpS65T</i> dari pNU400 dengan teknik PCR	47

4.7. Ligasi fragmen <i>sgfpS65T</i> hasil PCR dengan vektor linier pGEM T-Easy	49
4.8. Transformasi hasil ligasi ke dalam sel <i>E. Coli</i> DH5 α kompeten & seleksi biru putih	50
4.9. Isolasi plasmid pGEM-T Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> & konfirmasi hasil isolasi melalui <i>digest</i> dengan enzim <i>EcoRI</i>	51
4.10. <i>Sequencing</i> plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa insert (<i>sgfpS65T</i>) dan analisis hasil <i>sequencing</i>	52
4.11. <i>Double digest</i> pDWJ1 dan pDWJ2 dengan <i>BstEII</i> dan <i>NcoI</i> serta ligasi fragmen <i>backbone</i> pCAMBIA1305.1 dengan fragmen <i>sgfpS65T</i>	53
4.12. Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> dengan teknik <i>heat-shock</i> dan seleksi hasil rekombinan dengan seleksi media padat LB mengandung antibiotik kanamycin	55
4.13. Isolasi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa dan konfirmasi hasil isolasi melalui <i>double digest</i> dan PCR	56
4.14. <i>Sequencing</i> plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa <i>sgfpS65T</i> (pDWJ3) dan analisis hasil <i>sequencing</i>	57
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1. Kesimpulan	60
5.2. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	66

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur gen	8
Gambar 2.2 Plasmid di dalam sel bakteri	9
Gambar 2.3 Peta plasmid pCAMBIA1305.1	12
Gambar 2.4 Peta plasmid pNU400	13
Gambar 2.5 Peta plasmid pGEM-T Easy	14
Gambar 2.6 Tahap-tahap PCR	17
Gambar 2.7 Contoh mekanisme pemotongan untai DNA dengan enzim restriksi	20
Gambar 2.8 Mekanisme ligasi	21
Gambar 2.9 Contoh <i>sequence alignment</i>	25
Gambar 4.1 Hasil transformasi plasmid pNU400 dan pCAMBIA1305.1 kedalam <i>E. coli</i> DH5 α dengan seleksi antibiotik kanamycin	42
Gambar 4.2 Hasil isolasi plasmid pCAMBIA1305.1	43
Gambar 4.3 Hasil isolasi plasmid pNU400	43
Gambar 4.4 Peta restriksi pNU400 dengan enzim <i>Bgl</i> III, <i>Nco</i> I dan <i>Sac</i> I	44
Gambar 4.5 Hasil elektroforesis pNU400 yang dipotong dengan enzim <i>Bgl</i> III, <i>Nco</i> I dan <i>Sac</i> I	45
Gambar 4.6 pCAMBIA1305.1 sirkular dengan situs pemotongan <i>Nco</i> I dan <i>Bst</i> EII	46
Gambar 4.7 Hasil elektroforesis digest pCAMBIA 1305.1 dengan <i>Nco</i> I dan <i>Bst</i> EII	46
Gambar 4.8 Hasil purifikasi <i>backbone</i> pCAMBIA1305.1	47
Gambar 4.9 Skema penempelan primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> serta enzim restriksi <i>Nco</i> I dan <i>Bst</i> EII pada gen <i>sgfpS65T</i>	48
Gambar 4.10 Hasil amplifikasi <i>sgfpS65T</i> dengan PCR	49
Gambar 4.11 Hasil purifikasi fragmen <i>sgfpS65T</i> dari amplifikasi PCR	49
Gambar 4.12 Proses ligasi gen target (produk PCR) yang memiliki “A” <i>overhang</i> dengan vektor linier yang memiliki “T” <i>overhang</i>	50
Gambar 4.13 Hasil skrining sel transforman dengan seleksi biru putih	51

Gambar 4.14	Hasil elektroforesis <i>digest</i> pGEM-T Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> dengan <i>EcoRI</i>	52
Gambar 4.15	Hasil <i>digest</i> pDWJ1 dan PDWJ2 dengan <i>BstEII</i> dan <i>NcoI</i>	54
Gambar 4.16	Hasil purifikasi <i>sgfpS65T</i> dari <i>digest</i> pDWJ1 dan PDWJ2 dengan enzim <i>NcoI</i> dan <i>BstEII</i>	54
Gambar 4.17	Hasil transformasi plasmid rekombinan pada media seleksi antibiotik kanamycin	55
Gambar 4.18	Hasil <i>double digest</i> plasmid rekombinan dengan enzim <i>NcoI</i> dan <i>BstEII</i>	56
Gambar 4.19	Hasil amplifikasi PCR plasmid rekombinan pDWJ3 - pDWJ6	57
Gambar 4.20	Hasil <i>sequence alignment</i> asam amino pDWJ3 dengan acuan <i>sgfpS65T</i> (pDWJ1)	58

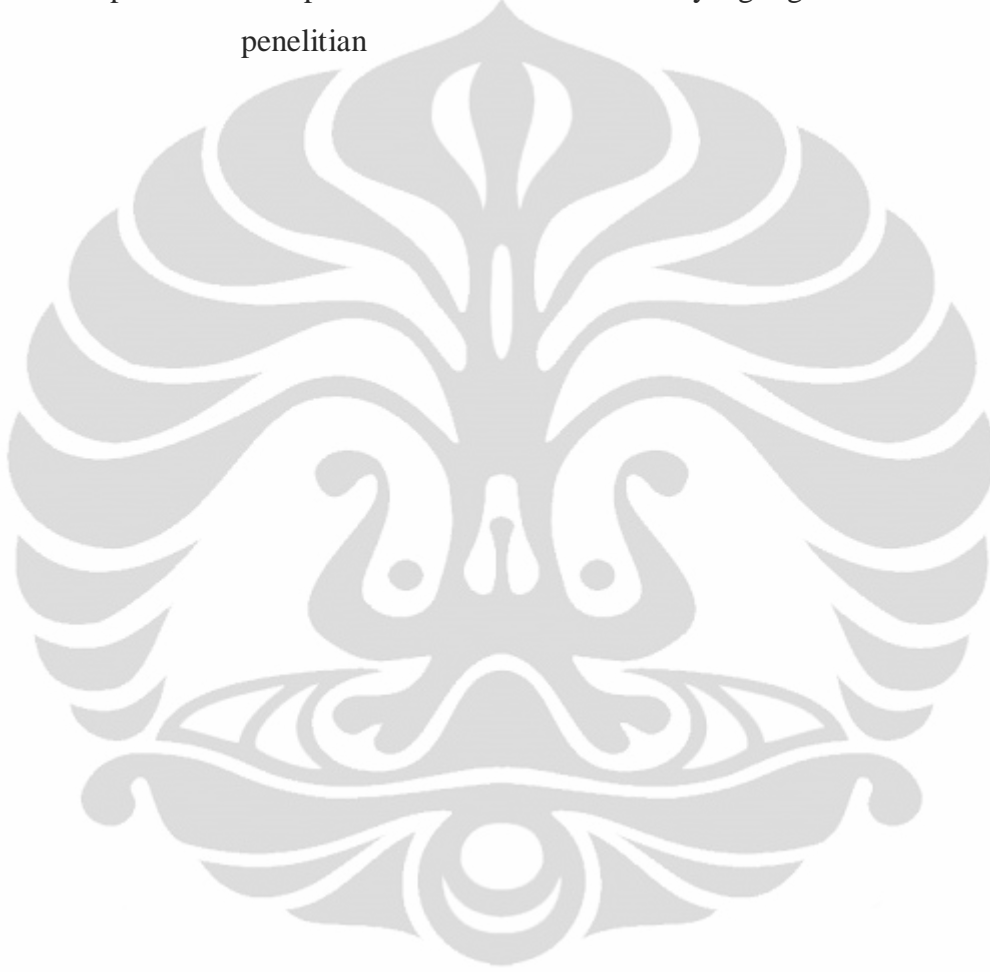
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Komposisi <i>digest</i> dengan enzim <i>Bgl</i> II untuk satu kali reaksi	33
Tabel 3.2 Komposisi <i>digest</i> dengan enzim <i>Nco</i> I untuk satu kali reaksi	33
Tabel 3.3 Komposisi <i>digest</i> dengan enzim <i>Sac</i> I untuk satu kali reaksi	34
Tabel 3.4 Program PCR untuk amplifikasi fragmen <i>sgfpS65T</i> dari pNU400	36
Tabel 3.5 Komposisi reaksi ligasi <i>sgfpS65T</i> hasil PCR dengan pGEM-T Easy	37
Tabel 4.1 Jumlah koloni pada tahap perbanyakan plasmid pNU400 dan pCAMBIA 1305.1	41
Tabel 4.2 Jumlah koloni biru putih sel transforman	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema konstruksi plasmid overekspresi gen <i>sgfpS65T</i> berbasis vektor binary pCAMBIA 1305.1	66
Lampiran 2. Skema tahapan penelitian	67
Lampiran 3. <i>Marker λ DNA/HindIII</i> dan <i>DNA ladder</i> 200 bp	78
Lampiran 4. <i>GeneBank Flat File Format</i> pNU400	69
Lampiran 5. <i>GeneBank Flat File Format</i> pCAMBIA1305.1	75
Lampiran 6. Hasil analisis restriksi pNU400 dengan 117 enzim restriksi (DNA MAN)	80
Lampiran 7. Hasil <i>sequencing</i> fragmen <i>sgfpS65T</i> yang terdapat pada pGEM T-Easy	96
Lampiran 8. Hasil <i>multiple sequence alignment</i> tiga <i>sequence</i> penyandi <i>sgfpS65T</i> 1, 2, dan 3 menggunakan Clustal W	97
Lampiran 9. Hasil <i>multiple sequence alignment</i> dua <i>sequence</i> penyandi <i>sgfpS65T</i> 1 dan 2 menggunakan Clustal W	98
Lampiran 10. Hasil <i>multiple sequence alignment</i> asam amino penyandi <i>sgfpS65T</i> 1 dan 2 menggunakan Clustal W	99
Lampiran 11. Elektroferogram <i>sequence</i> satu (seq 1) penyandi <i>sgfpS65T</i> menggunakan <i>Sequence Scanner</i>	100
Lampiran 12. Elektroferogram <i>sequence</i> dua (seq 2) penyandi <i>sgfpS65T</i> menggunakan <i>Sequence Scanner</i>	104
Lampiran 13. Elektroferogram <i>sequence</i> tiga (seq 3) penyandi <i>sgfpS65T</i> menggunakan <i>Sequence Scanner</i>	108
Lampiran 14. Elektroferogram <i>sequence</i> penyandi <i>sgfpS65T</i> dengan primer F <i>sgfpS65T</i>	111
Lampiran 15. Elektroferogram <i>sequence</i> penyandi <i>sgfpS65T</i> dengan primer R <i>sgfpS65T</i>	115
Lampiran 16. Hasil <i>sequencing</i> pDWJ3 dengan primer F <i>sgfpS65T</i> dan R <i>sgfpS65T</i>	119

Lampiran 17. Hasil <i>sequence alignment</i> pDWJ3_Forward_sgfpS65T dengan <i>reverse complement</i> pDWJ3_Reverse_sgfpS65T	120
Lampiran 18. Hasil <i>sequence alignment</i> pDWJ3_edit dengan <i>sequence</i> acuan <i>sgfpS65T</i> dari pDWJ1	122
Lampiran 19. Kode genetik	123
Lampiran 20. Komposisi bahan kimia dan media yang digunakan dalam penelitian	125



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Transformasi merupakan proses pemasukan gen asing ke dalam sel hidup makhluk lainnya melalui dinding sel, seperti sel bakteri, ragi, tumbuhan ataupun mamalia. Keberhasilan transformasi dalam kloning molekular merupakan salah satu hal yang sangat penting untuk dapat diketahui dengan cepat, apakah suatu gen target berhasil tersisipi atau terekspresi dalam sel transforman atau apakah suatu promoter mempunyai aktifitas seperti yang diprediksi. Di dalam biologi molekular, yang berfungsi untuk melaporkan apakah suatu transformasi dapat berjalan atau tidaknya disebut sebagai gen pelapor.

Alam beserta isinya, termasuk binatang dan mikroba dengan kelengkapannya, menyediakan kemudahan dalam analisis bioteknologi. Kemudahan tersebut digunakan manusia dengan memanfaatkan beberapa binatang dan mikroba yang memiliki kemampuan menghasilkan warna atau dapat memancarkan cahaya (berpendar) dengan warna tertentu. Istilah *bioluminescence* sering digunakan untuk mendefinisikan kemampuan berpendar ini. Beberapa dari gen pelapor ada yang dapat menyandi kemampuan menghasilkan warna atau bersifat *bioluminescence*. Gen pelapor tersebut antara lain *gus* (*beta-glucuronidase*) pada *E.coli*, *LUC* (*luciferase*) pada kunang-kunang, dan *gfp* (*green fluorescent protein*) pada ubur-ubur.

β-glucuronidase adalah enzim yang dihasilkan oleh gen *gus* dari *E. coli* yang mengkatalisis pemecahan berbagai senyawa glukuronat. Substrat dari enzim ini telah dibuat secara komersial untuk analisis menggunakan spektrofotometer, fluorometer, dan histokimia. Dengan adanya enzim *β-glucuronidase*, X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-asam glukuronat) yang dipakai sebagai substrat analisis histokimia, akan memberikan reaksi warna biru yang dapat dilihat dengan mudah di bawah mikroskop. Dalam perkembangannya, *gus* banyak digunakan

sebagai pelapor ekspresi suatu gen melalui teknik fusi promoter dengan gen *gus* pada tanaman. Tujuan dari teknik ini adalah untuk menganalisis fungsi atau promoter suatu gen pada organ atau jaringan yang berbeda, karena ekspresi suatu gen tergantung pada promoternya.

Berbeda dengan gen *gus* dan *LUC*, *gfp fusion system* memiliki keunggulan tersendiri yaitu tidak memerlukan suatu substrat sehingga deteksinya cukup menggunakan lampu UV ataupun cahaya biru yang jauh lebih ramah. Gen *gfp* bila dipaparkan di bawah cahaya biru dapat tereksitasi menghasilkan pendaran berwarna hijau kekuningan. Gen *gfp* yang diisolasi dari *A.victoria* memiliki *excitation peak* pada panjang gelombang 395 nm dan 475 nm. Selain itu *gfp* juga tidak bersifat toksik sehingga *bioassay* atau uji biologis dapat dilakukan secara *in vivo* dan pengambilan gambar bisa menggunakan sel hidup (*in vivo imaging*).

Sesuai dengan namanya, *gfp* merupakan gen reporter yang memiliki sifat luminescence dengan menghasilkan pendaran yang berwarna hijau. Pemurnian dan karakterisasi *gfp* dari ubur-ubur (*Aequorea victoria*) dilakukan pertama kali oleh ilmuwan Jepang Osamu Shimomura pada tahun 1960-an (Shimomura O dkk., 1962). Douglas Prasher melaporkan keberhasilannya dalam mengkloning dan mendapatkan *sequence* nukleotida *gfp*. Keberhasilan kloning tersebut dilanjutkan dengan aplikasi *gfp* pada 2 sistem organisme prokariotik dan eukariotik. Organisme prokariotik yang digunakan adalah *E. coli*, sedangkan organisme eukariotiknya adalah cacing dari filum nematoda yaitu *Caenorhabditis elegans*. Dari hasil penelitiannya tersebut diperoleh hasil yang memuaskan, ekspresi *gfp* cukup stabil pada kedua sistem tersebut.

Ekspresi dari *gfp* dapat dengan mudah divisualisasikan di bawah sinar ultraviolet atau sinar biru tanpa memerlukan substrat sehingga tidak bersifat toksik terhadap sel hidup dan stabil dalam berbagai varietas tanaman, sehingga aplikasinya telah banyak digunakan untuk memonitor *transient expression* suatu gen. Sejak adanya laporan pertama yang menyatakan kesesuaian *gfp* sebagai penanda selektif (*selectable marker*) untuk tanaman (Niedz dkk., 1995), berbagai aplikasi *gfp* terhadap berbagai tanaman telah dilakukan. Gen *gfp* telah berhasil

digunakan sebagai *selectable marker* untuk menghasilkan tanaman transgenik seperti padi (Vain P dkk., 1997), tebu (Elliot dkk., 1999), barley (Ahlandsberg dkk., 1999; Holme dkk., 2006), gandum (Jordan, 2000), oat (Kaeppler dkk., 2002), rumput brome (Nakamura & Ishikawa, 2006), American chestnut (Polin dkk., 2006), dan persik (Padilla dkk., 2006).

Hasil dari konstruksi plasmid pCAMBIA1305.1 rekombinan pembawa *sgfpS65T* selanjutnya akan digunakan untuk mempelajari aktivitas suatu promoter di dalam tanaman. Plasmid rekombinan tersebut akan ditransformasi ke dalam tanaman melalui perantara bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, sehingga memungkinkan T-DNA yaitu untaian DNA pada pCAMBIA1305.1 masuk atau ditransfer ke dalam sel tanaman. Pada untaian DNA tersebut terdapat fragmen *sgfpS65T*, jadi apabila suatu tanaman transgenik dipaparkan di bawah sinar biru maka akan terlihat pendaran cahaya hijau pada jaringan tanaman transgenik tersebut yang menyatakan bahwa transformasi gen telah berhasil.

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekspresi gen *gfp* dan regenerasi tanaman transgenik melalui seleksi marker *gfp* dapat ditingkatkan dengan memodifikasi *sequence* gen *wild-type GFP* (*wt-gfp*) (Chiu dkk., 1996). Dengan adanya modifikasi ini, mengakibatkan adanya pengembangan variant baru *gfp* melalui pengubahan kromofor, stabilitas, dan kelarutan. Dalam usaha untuk menjaga agar sifat atau karakter gen *gfp* mirip dengan *wt-gfp*, dibuat varian baru bernama *mgfp4* (Haseloff dkk., 1997). Setelah itu muncul varian baru dari *gfp* melalui optimasi kodon untuk meningkatkan fluorescence protein, *sgfp* misalnya, yaitu gen sintesis yang dapat meningkatkan ekspresi *gfp* hingga 100 kali lipat dalam sel tanaman jagung. Selanjutnya, diproduksi varian *sgfpS65T* dengan cara menghapus *cryptic intron* di *sgfp* dan mengubah penggunaan kodon (Haseloff dkk., 1997) dengan kromofor S65T. Varian ini mampu meningkatkan batas deteksi sebesar 19 kali lipat (Reichel dkk., 1996). Varian *sgfpS65T* pertama

kali pengembangannya dilaporkan oleh Roger Tsien di *Nature* pada tahun 1995. Mutasi ini dapat meningkatkan karakteristik spektral *gfp* dan menyebabkan peningkatan fluoresensi dan fotosabilitas.

Plasmid pCAMBIA1305.1 (Cambia, Australia) merupakan plasmid biner dan umum digunakan untuk transformasi di tanaman. Vektor pCAMBIA memiliki beberapa varian yang juga menggunakan *gfp* sebagai gen pelapor, seperti pCAMBIA1302, pCAMBIA1303, dan pCAMBIA1304. Namun, karena gen *gfp* yang digunakan adalah varian *mgfp*, maka sifat fluoresensi dan fotostabilitasnya masih rendah bila dibandingkan dengan varian *sgfpS65T*, sehingga hasil pengamatannya tidak optimal untuk studi ekspresi tanaman.

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan substitusi *gusPlus* pada pCAMBIA1305.1 dengan *sgfpS65T* dari pNU400 sehingga diperoleh konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa gen *sgfpS65T* untuk studi aktivitas promoter pada tanaman.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- Memperoleh fragmen gen *sgfpS65T* dengan panjang 720 bp dari pNU400 melalui teknik PCR.
- Mendapatkan konstruksi pCAMBIA1305.1 yang memiliki gen *sgfpS65T* dengan cara melakukan substitusi gen *gusPlus* pada plasmid pCAMBIA1305.1 dengan gen *sgfpS65T* dari plasmid pNU400.

1.4 Hipotesis

Diperolehnya konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* sebagai gen pelapornya, yang memiliki panjang fragmen *sgfpS65T* 720 bp dengan urutan basa nukleotida dan asam amino yang sama dengan *sequence sgfpS65T* acuan.

1.5 Manfaat dan Aplikasi Penelitian

- Untuk mendeteksi aktivitas promotor pada tanaman.
- Melalui fusi gen, protein yang ditargetkan ke inti sel (nukleus) atau plastida tanaman dapat divisualisasikan.
- Menganalisis jalur signal transduksi pada tanaman transgenik atau sel hidup.
- Sebagai alternatif *selectable marker* untuk transformasi tanaman.

1.6 Kerangka Konsep

Dalam konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 yang menyandi gen *sgfpS65T* diperlukan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 tanpa gen *gusPlus* dan fragmen gen *sgfpS65T* dari pNU400. Untuk memperoleh fragmen *backbone*, gen *gusPlus* pada pCAMBIA1305.1 dipotong dengan enzim restriksi *NcoI* dan *BstEII*, sehingga dihasilkan fragmen pCAMBIA1305.1 tanpa gen *gusPlus* dengan ukuran 9788 bp. Sedangkan, untuk memperoleh fragmen gen *sgfpS65T* dari plasmid pNU400 dilakukan melalui teknik PCR dengan primer spesifik yang sudah di desain terlebih dahulu. Pada posisi 5' dari primer *forward* telah ditambahkan situs restriksi *NcoI* sedangkan posisi 5' dari primer *reverse sgfpS65T* telah ditambahkan situs restriksi *BstEII*. Situs *NcoI* dan *BstEII* ditambahkan pada primer *sgfpS65T* untuk memudahkan orientasi penempelan pada vektor pCAMBIA 1305.1 yang juga direstriksi dengan enzim tersebut.

Fragmen *sgfpS65T* dengan panjang 720 bp yang diperoleh disubklon ke dalam kloning vektor pGEM-T Easy. Hal ini dilakukan untuk menyimpan fragmen *sgfpS65T* sehingga memudahkan proses manipulasi gen selanjutnya. Selain itu juga karena pada proses PCR ada kemungkinan terjadi mutasi (substitusi, delesi, maupun penambahan basa) pada fragmen gen hasil amplifikasi, yang disebabkan oleh kesalahan dalam proses polimerisasi DNA atau sintesis DNA (Triwibowo Y, 2006). Plasmid pGEM-T Easy pembawa gen *sgfpS65T*

dengan urutan basa yang benar akan diperbanyak dan dipotong kembali dengan enzim restriksi *NcoI* dan *BstEII* sehingga diperoleh fragmen *sgfpS65T* yang dapat diligasi ke *backbone* plasmid pCAMBIA1305.1.

Pada penelitian ini digunakan *E. coli* DH5 α sebagai sel inangnya, menurut Sambrook & Russel (2001: A3.6-A3.10), *E. coli* DH5 α merupakan strain umum yang digunakan untuk tujuan kloning karena menghasilkan efisiensi transformasi yang cukup tinggi dan stabil. Selain itu pada strain tersebut juga memungkinkan dilakukannya seleksi koloni biru-putih (*blue-white colony*) karena kemampuannya melakukan α -*complementation*, yaitu subunit α dari enzim β -galaktosidase yang disandi oleh gen *lac-Z* yang mengalami transkripsi.

Plasmid pCAMBIA 1305.1 rekombinan yang telah memiliki gen *sgfpS65T* akan ditransformasi dengan metode kejutan panas (*heat shock*) CaCl₂ lalu ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat yang mengandung antibiotik kanamisin. Dari koloni yang tumbuh dilakukan isolasi plasmid rekombinan dengan metode *alkaline lysis solution*. Hasil dari isolasi dikonfirmasi lebih lanjut dengan melakukan *double digest* dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*, teknik PCR, dan *sequencing*.

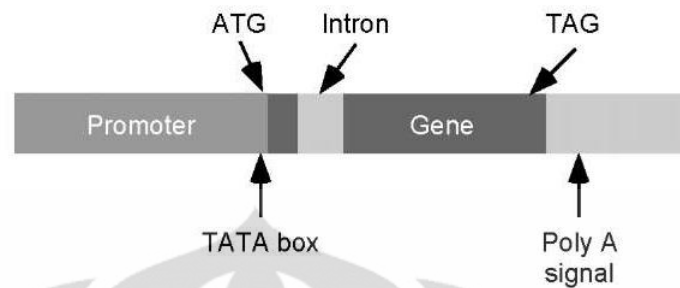
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Organisasi Gen dalam Genom Prokaryot

Bahan genetik utama jasad prokaryot pada umumnya terdiri atas satu unit molekul DNA untai ganda (*double stranded*) dengan struktur lingkaran (*circular*). Oleh karena itu, jasad prokaryot bersifat monoploid karena hanya ada satu bahan genetik utama. Pada bakteri *E.coli*, bahan genetik utamanya terdiri atas 4600 kb ($4,6 \times 10^6$ bp). Bahan genetik utama jasad prokaryot diketahui terikat pada membran sel sebelah dalam yang diduga berperan dalam proses pemisahan DNA pada waktu terjadi pembelahan sel. Selain bahan genetik utama, jasad prokaryot seringkali juga mempunyai bahan genetik tambahan yang disebut sebagai plasmid (Yuwono T, 2005).

Genom jasad prokaryot tersusun atas banyak unit gen. Secara umum struktur lengkap gen pada bakteri terdiri atas 3 bagian utama yaitu, promoter, bagian struktural (*coding region*) dan terminator. Promoter adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik (transkripsi) bagian struktural. Bagian ini adalah bagian yang akan dikenali pertama kali oleh RNA polimerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi (sintesis RNA) dimulai. Bagian struktural adalah bagian gen yang terletak di sebelah hilir (*downstream*) dari promoter serta membawa kode-kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi atau hanya ditranskripsi saja. Bagian terminator adalah bagian gen yang terletak di sebelah hilir dari bagian struktural dan berperan dalam proses penghentian transkripsi (Yuwono T, 2005). Ciri utama gen struktural pada jasad prokaryot, khususnya gen struktural yang mengkode suatu polipeptida, mulai dari *sequence* inisiasi translasi atau *start codon* (ATG) sampai kodon terakhir sebelum *stop kodon* yaitu TAA, TAG, atau TGA akan diterjemahkan menjadi rangkaian asam-asam amino.

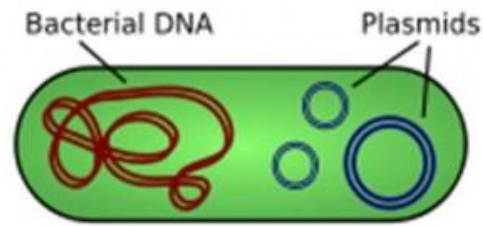


Gambar 2.1 Struktur Gen

Salah satu perbedaan utama antara organisasi gen pada prokaryot dengan eukaryot adalah bahwa gen prokaryot (bakteri) tidak mengandung intron. Intron adalah *sequence* nukleotida yang tidak akan diterjemahkan di dalam rangkaian asam amino protein yang disandi oleh suatu gen. *Sequence* nukleotida yang akan diterjemahkan disebut sebagai ekson. Salah satu ciri khas organisasi gen pada prokaryot dan tidak ditemukan di dalam organisasi gen eukaryot adalah sistem operon, yaitu sekelompok gen struktural yang terletak berdekatan dan ekspresinya dikendalikan oleh satu promoter yang sama. (Yuwono T, 2005).

2.2 Plasmid

Setiap organisme memiliki DNA yang terletak dalam inti sel atau nukleus yang disebut sebagai DNA kromosomal, begitu pula bakteri. Selain DNA kromosomal, bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal. Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang berbeda karakternya dengan DNA kromosomal. DNA ekstrakromosomal seperti plasmid dapat bereplikasi secara autonom dan dapat ditemukan pada sel hidup. Di dalam satu sel, dapat ditemukan lebih dari satu plasmid dengan ukuran yang sangat bervariasi namun semua plasmid tidak menyandikan fungsi yang penting untuk pertumbuhan sel tersebut. Umumnya, plasmid menyandikan gen-gen yang diperlukan agar dapat bertahan pada keadaan yang kurang menguntungkan sehingga bila lingkungan kembali normal, DNA plasmid dapat dibuang (Royston C. Clowes, 1972).



Gambar 2.2 Plasmid di dalam sel bakteri (<http://www.thefullwiki.org/Plasmid>)

Bentuk plasmid adalah sirkuler *double helix* dengan ukuran 1 kb sampai lebih dari 200 kb. Ukuran plasmid sangat bervariasi tetapi pada umumnya lebih kecil dari ukuran bahan genetik utama sel prokariotik. Sebagai contoh plasmid CoIV-K30 yang ada di dalam sel *E.coli* hanya berukuran sekitar 2 kb (Triwibowo Y, 2008). Pada bakteri jumlah plasmid yang dimiliki bervariasi bahkan sampai ribuan ataupun tidak memiliki plasmid.

Berdasarkan jumlah plasmid di dalam sel, plasmid dapat dibedakan menjadi:

1. *Low copy number* plasmid, dimana plasmid memiliki kemampuan replikasi rendah sehingga dalam satu sel hanya mengandung satu atau beberapa plasmid yang sama saja.
2. *High copy number* plasmid, dimana plasmid memiliki kemampuan replikasi tinggi sehingga dalam satu sel mengandung banyak plasmid yang sama, hingga ribuan. Contohnya plasmid pada bakteri *E.coli*.

Plasmid juga memiliki bentuk yang beragam, antara lain:

1. *Supercoiled (covalently closed-circular)*
DNA plasmid berbentuk sirkular dengan bentuk rantai yang terpilin.
2. *Relaxed circular*
Kedua ujung DNA menyatu dan berbentuk sirkuler
3. *Supercoiled denature*
Kedua ujung DNA menyatu tapi pasangan basanya tidak sempurna.
4. *Nicked open circular*
Rantai DNA yang terpotong pada salah satu sisi saja.

5. Linier

Rantai DNA lurus yang terpotong pada kedua sisinya.

Sebagian besar plasmid memiliki struktur sirkuler, namun ada juga plasmid linear yang dapat ditemukan pada mikroorganisme tertentu, seperti *Borrelia burgdorferi* dan *Streptomyces* (Hinnebusch J, Barbour AG, 1991). Berbagai macam bentuk plasmid itu akan mempengaruhi kecepatan migrasi plasmid dalam elektroforesis. Urutan migrasi bentuk-bentuk plasmid tersebut dari yang paling cepat adalah *supercoiled*, *supercoiled denaturated*, *relaxed circular*, dan *nicked open circular*. Bentuk plasmid yang semakin kecil atau ramping akan lebih mudah bergerak melalui pori gel agarose sehingga akan mencapai bagian bawah terlebih dahulu.

Plasmid biasanya digunakan dalam teknologi DNA rekombinan menggunakan *E. coli* sebagai *host*, sehingga dalam rekayasa genetika plasmid sering digunakan sebagai vektor untuk membawa gen-gen tertentu yang diinginkan ke dalam suatu sel inang. Gen-gen tersebut selanjutnya akan mengekspresikan produk komersial tertentu seperti insulin, interferon, dan berbagai enzim (Stanfield 1996). Penggunaan plasmid dalam DNA rekombinan dilakukan karena plasmid memiliki tiga region yang berperan penting untuk DNA kloning, yaitu, *replication origin*, *marker* yang memungkinkan adanya seleksi (biasanya gen resisten antibiotik) dan *region* yang mampu disisipi oleh fragmen DNA dari luar (Lodish *dkk*, 2000). Plasmid hanya memberikan sifat istimewa yang dimiliki oleh bakteri tersebut misalnya resistensi terhadap antibiotik. Beberapa karakteristik dari plasmid yang patut diketahui antara lain: dapat ditransfer ke bakteri lain dan memiliki *ori* (*Origin of replication*) sehingga mampu mereplikasi diri tanpa pengaturan dari DNA kromosom. Replikasi dimulai dari titik *ori* hingga semua plasmid tereplikasi.

Dalam rekayasa genetika, plasmid digunakan sebagai vektor untuk kloning DNA. DNA vector yang sering digunakan adalah plasmid yang berukuran antara 1-250 kb (Brown, 1991). Selain itu plasmid juga banyak digunakan untuk perbanyak jumlah DNA tertentu sehingga bisa mengekspresikan gen tertentu. Alasan utama penggunaan plasmid adalah karena plasmid memiliki peta restriksi,

Universitas Indonesia

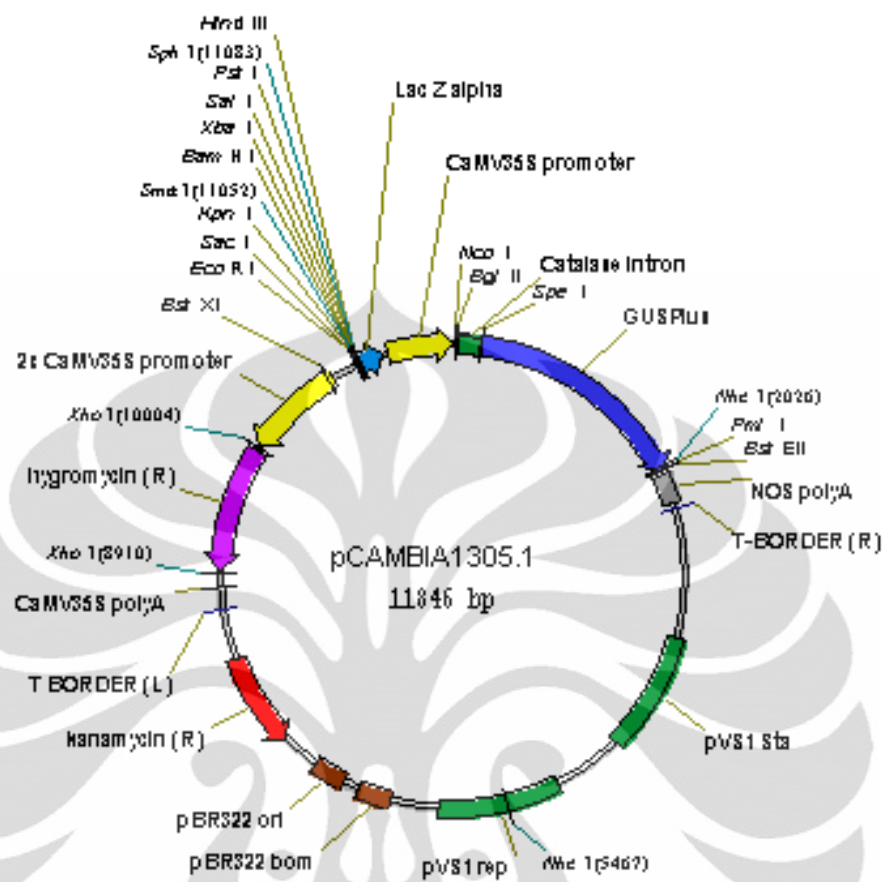
adanya marker sehingga dapat diketahui apakah gen insert masuk atau tidak, memiliki *copy number* yang besar, dan mudah dimodifikasi sesuai dengan tujuan tertentu.

2.2.1 Plasmid pCAMBIA 1305.1

Tulang belakang atau *backbone* vektor pCAMBIA berasal dari vektor pPZP (dikonstruksi oleh Hajdukiewicz, Svab & Maliga, 1994). Vektor pCAMBIA memiliki beberapa versi, salah satunya adalah pCAMBIA1305. Plasmid pCAMBIA merupakan vektor binary, yaitu vektor kloning yang dapat melakukan replikasi baik di dalam *E.coli* maupun *Agrobacterium tumefaciens*, yaitu dua bakteri yang sering digunakan dalam bioteknologi. Vektor pCAMBIA mengandung T-DNA yaitu untai DNA yang akan ditransfer ke sel tanaman, sehingga biasa dipakai untuk transformasi ke tanaman dengan berbagai tujuan seperti mempelajari gen, promoter, mengoverekspresikan gen target, dan lain-lain.

Plasmid ini memiliki MCS (*Multiple Cloning Site*) yaitu segmen plasmid sebagai tempat disisipkannya fragmen DNA, panjangnya beberapa puluhan hingga ratusan pasang basa, urutan basa ini merupakan urutan pengenal enzim enzim restriksi tertentu. Berdasarkan sistem digit penomoran atau nomenklatur vektor pCAMBIA, plasmid pCAMBIA1305 menerangkan bahwa:

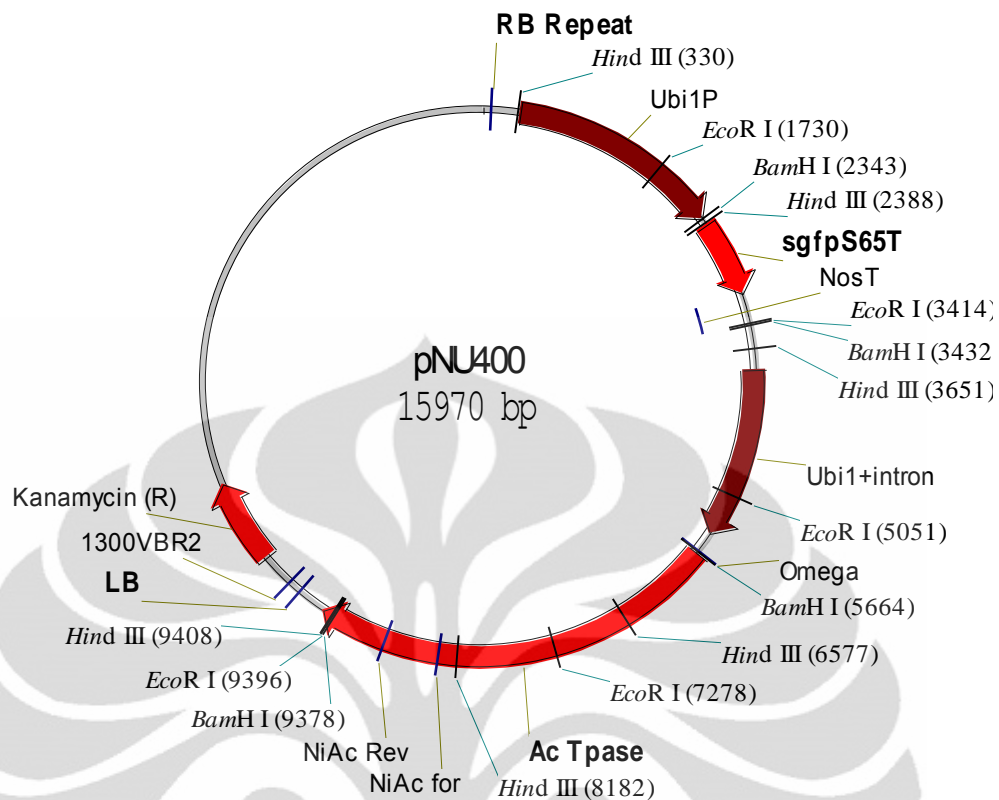
- Digit kesatu : **1** menunjukkan "*plant selection*" untuk resistensi terhadap antibiotik Hygromycin.
- Digit kedua : **3** menunjukkan "*bacterial selection*" untuk resistensi terhadap antibiotik kanamycin.
- Digit ketiga : **0** menunjukkan "*polylinker*" yang dipakai, yaitu pUC18.
- Digit keempat : **5** menunjukkan "*reporter gene*" yang dipakai, yaitu *Staphylococcus sp. gusA (GusPlus)*.



Gambar 2.3 Peta plasmid pCAMBIA1305.1

2.2.2 Plasmid pNU400

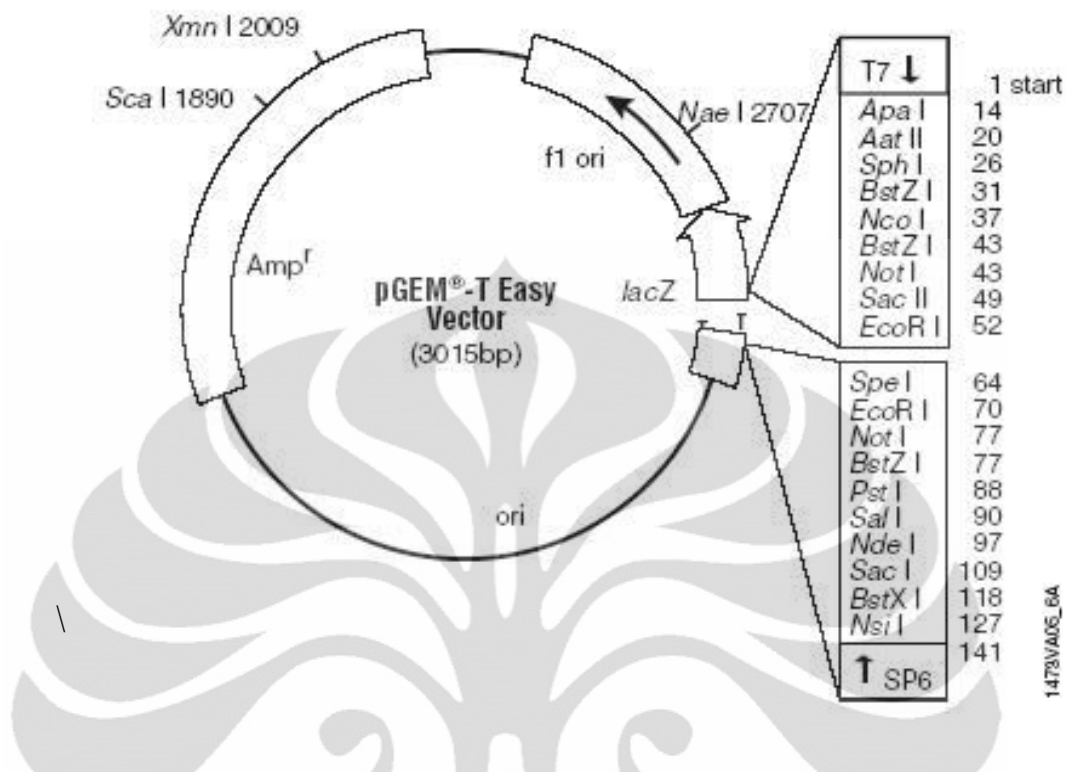
Plasmid pNU400 memiliki ukuran 15970 bp dengan gen pelapor *gfp* (*green fluorescent protein*), yaitu variant *sgfpS65T*. Plasmid ini didesain untuk tujuan penelitian functional genomics pada tanaman dan berperan sebagai pembawa gen Ac transposase yang dapat mengaktifkan transposon Ds. Plasmid ini dipakai dalam penelitian ini karena juga membawa gen *sgfpS65T* yang memiliki aktifitas tinggi untuk disubklon ke plasmid binary pCAMBIA1305.1. Plasmid pNU400 juga memiliki resistensi terhadap antibiotik kanamycin. Dimana, hal ini penting untuk diketahui dalam seleksi DNA rekombinan pada medium agar.



Gambar 2.4 Peta plasmid pNU400

2.2.3. Plasmid pGEM-T Easy

Plasmid pGEM-T Easy merupakan suatu vektor linear yang memiliki tambahan nukleotida T pada kedua ujung 3' atau ujung "T" *overhang*. Plasmid ini memiliki ukuran 3015 bp dengan dua promoter yaitu SP6 RNA polymerase promoter dan T7 RNA polymerase promoter. Plasmid pGEM-T Easy memiliki gen *lac-Z* yang dapat menyandi enzim β -galaktosidase yang dapat merubah Isopropil- β -galaktopiranosida (IPTG) dan 5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -galaktopiranosida (X-gal) yang ditambahkan menjadi berwarna biru. MCS (*Multiple Cloning Site*) pada plasmid merupakan bagian dari *lac-Z*. Apabila gen *lac-Z* tersisipi oleh fragmen DNA lain, maka akan merusak susunan basa gen *lac-Z* sehingga tidak dapat diekspresikan dan menyebabkan koloni berwarna putih (Sambrook, 1989). Plasmid ini juga memiliki resistensi terhadap antibiotik ampisillin.



Gambar 2.5 Peta plasmid pGEM-T Easy (Promega, 2009)

Pada Gambar 3. terlihat bahwa vektor linier pGEM-T Easy memiliki beberapa situs enzim restriksi yang spesifik dapat melepas insert yang masuk, baik dengan menggunakan 1 enzim (*single digest*) maupun 2 enzim (*double digest*). Untuk *single digest* dapat digunakan enzim *BstZI*, *EcoRI*, atau *NotI*. Insert dapat dilakukan *sequencing* menggunakan SP6 Promoter Primer, T7 Promoter Primer, pUC/M13 *Forward Primer* atau pUC/M13 *Reverse Primer*.

2.3 Gen Pelapor (*Reporter Gene*)

Tujuan dari pembuatan organisme transgenik yang dapat berpendar pada dasarnya adalah untuk pemantauan suatu proses eksperimen atau biokimia di dalam sel tubuh makhluk hidup. Untuk proses eksperimen rekayasa genetika misalnya, konfirmasi transformasi dan ekspresi suatu gen asing ke dalam sel inang sangatlah penting. Transformasi adalah proses memasukkan atau mencangkokkan gen asing ke dalam sel makhluk hidup lain, dapat berupa sel bakteri, ragi, tumbuhan, ataupun mamalia. Bagi para peneliti, sangatlah penting untuk dapat

mengetahui dengan cepat, apakah proses transformasi itu telah berlangsung baik atau tidak, dan apakah gen target dapat diekspresikan tanpa masalah. Dari itu, di dalam molekuler biologi dikenal gen pelapor, yaitu gen yang dapat berperan sebagai indikasi keberhasilan upaya kloning molekular, apakah suatu gen tertentu telah tersisipi atau terekspresi dalam populasi sel atau organisme.

2.3.1 *gus* (β – *glucuronidase*)

Gen pelapor ini biasa digunakan untuk uji histokimia atau lebih dikenal dengan uji *gus* dalam biologi molekular. Gen ini banyak dipergunakan sebagai penanda pada sistem transformasi tanaman dan seringkali digunakan untuk mempelajari fungsi promoter. Uji histokimia pewarnaan *gus* ini memerlukan substrat X-Gluc (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-asam glukuronat*), yang kemudian dengan enzim β -*glucuronidase* yang dihasilkan oleh gen *gus* akan membentuk senyawa yang berwarna biru . Warna biru inilah yang menandakan telah terekspresinya gen *gus* (Stomp, 1992).

2.3.2 *gfp* (*green fluorescent protein*)

Protein berpendar hijau, *green fluorescent proteins*, *gfp* adalah sekelompok protein dengan struktur mirip satu sama lain yang berpendar hijau apabila disorot/dipapar dengan cahaya biru. Protein ini pertama kali diisolasi dari ubur-ubur *Aequorea victoria* yang mampu memancarkan cahaya hijau pada tahun 1962 oleh Osamu Shimomura. Gen *gfp* dapat digunakan sebagai reporter ekspresi gen sebagaimana *gus* dan LUC. Tidak seperti *gus* dan LUC, *gfp fusion system* memiliki keunggulan tersendiri yaitu tidak memerlukan suatu substrat sehingga tidak bersifat toksik, maka pengambilan gambar bisa menggunakan sel hidup (*in vivo imaging*). Pada umumnya promoter yang dipakai untuk *gfp fusion* adalah 35S sehingga konstruk akhir menjadi p35S : gen/cDNA : *GFP*. Ekspresi yang muncul tersebut sering disebut dengan *transient expression* dari suatu gen.

2.4 Kloning Gen

Kloning merupakan proses pembuatan salinan dari suatu gen dengan prinsip teknologi DNA rekombinan (Brooker 2005: 490). Molekul DNA rekombinan dibuat dengan menyisipkan fragmen DNA yang mengandung gen target ke dalam vektor. Vektor berperan sebagai pembawa gen yang akan dikloning ke dalam sel inang. Vektor rekombinan yang ditransformasi ke dalam sel inang ikut membelah setiap sel inang melakukan pembelahan sehingga koloni sel inang yang membawa vektor dengan gen target akan menghasilkan salinan identik gen target yang banyak (Wong 1997: 4).

Vektor dalam proses kloning harus memiliki beberapa elemen struktural, yaitu penanda awal replikasi, *sequence* pengenalan untuk enzim-enzim restriksi, *Multiple Cloning Site* (MCS), penanda seleksi (biasanya berupa gen resistensi antibiotik), dan daerah promoter yang memungkinkan berjalannya proses transkripsi DNA yang disisipkan. Dua tipe dasar dari vektor adalah plasmid dan faga. Vektor lain yang dapat digunakan dalam kloning adalah kosmid, fagemid, *bacterial artificial chromosome* (BAC), dan *yeast artificial chromosome* (YAC) (Wong 1997: 98; Snustads & Simmons 2003: 486).

2.5 Teknik yang digunakan

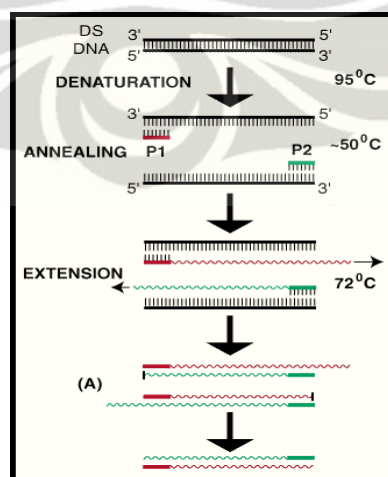
2.5.1 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) ialah metode enzimatik untuk melipatgandakan suatu *sequence* nukleotida secara eksponensial dengan cara *in vitro* (Yuwono 2006: 1). Prinsip teknik PCR yaitu enzim DNA polimerase memperbanyak bagian spesifik yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven & Johnson 2002: 67--68). Teknik PCR memerlukan beberapa komponen yaitu DNA polimerase yang mampu mengkatalisis proses sintesis DNA dari cetakan DNA, dua oligonukleotida sebagai primer, dNTP sebagai sumber nukleotida, kation divalen (biasanya berupa $MgCl_2$) untuk mengaktifkan enzim polimerase, buffer PCR untuk mengaktifkan kestabilan pH, kation monovalen

(biasanya berupa KCl) dalam dapar PCR, dan cetakan DNA yang mengandung sekuen target untuk diamplifikasi (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.6).

Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), primer memengaruhi spesifisitas dan sensitivitas reaksi PCR. Rancangan primer merupakan parameter yang menentukan kesuksesan reaksi PCR. Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan baik sehingga menyebabkan produk PCR yang tidak spesifik atau terbentuknya primer dimer. *Sequence* primer yang baik ditentukan oleh beberapa hal, antara lain panjang primer (18-30 basa), nilai *melting temperature* (T_m) dari sepasang primer tidak lebih dari 5°C dengan kisaran suhu optimal $52\text{--}58^\circ\text{C}$, dan komposisi basa GC sebesar 40-65%.

Terdapat tiga tahapan dalam PCR, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. Denaturasi merupakan tahap pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal melalui pemutusan ikatan hidrogen antara basa-basa nitrogen yang terjadi pada suhu 92°C - 94°C . *Annealing* merupakan tahap penempelan primer pada kedua untai tunggal DNA pada suhu antara 25°C dan 65°C (biasanya pada suhu 50°C). Polimerisasi merupakan proses sintesis untai DNA target dengan pemanjangan primer oleh *Taq DNA polymerase* dari arah $5'$ ke $3'$ dengan menambahkan basa-basa nukleotida pada suhu 72°C (Klug & Cummings 1994: 402; Fairbanks & Andersen 1999: 277).



Gambar 2.6 Tahap-tahap PCR [www.flmnh.ufl.edu]

2.5.2 Isolasi DNA Plasmid

Karena plasmid memiliki fungsi yang bisa dimanfaatkan keuntungannya, maka ada banyak cara yang digunakan untuk mengisolasi plasmid tersebut. Plasmid yang diisolasi berasal dari bakteri. Proses ini dikenal sebagai proses *mini preparation* karena jumlahnya hanya sekitar 1-20 μ g. Sedangkan untuk jumlah yang lebih besar (100-200 μ g) digunakan *mid preparation* dan *maxi preparation* untuk jumlah yang lebih besar dari 200 μ g.

Inti dari isolasi plasmid bakteri adalah menghancurkan membran sel sehingga semua organel sel dapat keluar. Sehingga didapatkan DNA kromosomal serta DNA ekstrakromosomal (plasmid). Untuk memperoleh plasmid saja harus dilakukan pemurnian dari debris membran sel, organel sel, dan pengotor lainnya. Metode yang dapat digunakan untuk isolasi plasmid antara lain yaitu *boiling lysis*, *lysis with detergent*, *mechanical lysis*, *alkaline lysis*, dan *enzimatic digestion*.

Dalam proses mengisolasi suatu plasmid dari bakteri, terdapat 3 tahap penting yang dilakukan, yaitu melisis membran sel bakteri, ekstraksi DNA, dan pengendapan. Dalam isolasi plasmid dengan metode *alkaline lysis solution* digunakan larutan I, larutan II, dan larutan III. Pada tahap pertama larutan I yang mengandung Tris Cl, EDTA dan glukosa untuk meresuspensi membran sel bakteri. Pada tahap ini EDTA akan mengikat ion logam dan glukosa akan membuat larutan menjadi hipertonic, maka yang terjadi adalah sel mulai mengembang, integritas membrane mulai terganggu. Proses lisis diawali dengan pemberian larutan II yaitu SDS + NaOH dimana SDS (sodium dodesil sulphate) merupakan deterjen yang berperan untuk melisis dinding atau membran sel yang terdiri dari lipid (fosfolipid) dan NaOH sebagai larutan basa berfungsi untuk denaturasi protein atau DNA (DNA *double strain* menjadi *single strain*). Terjadinya proses lisis ditandai dengan terbentuknya lendir. Tahap selanjutnya penambahan larutan III yang terdiri dari CH₃COOK dan asam asetat glasial yaitu untuk menciptakan kondisi netral yang sebelumnya basa. Maka dilakukan pemisahan dengan PCI (fenol-kloroform-isoamil alkohol) yang berfungsi sebagai pelarut dari senyawa organik dan komponen lipid. Proses ekstraksi dengan PCI

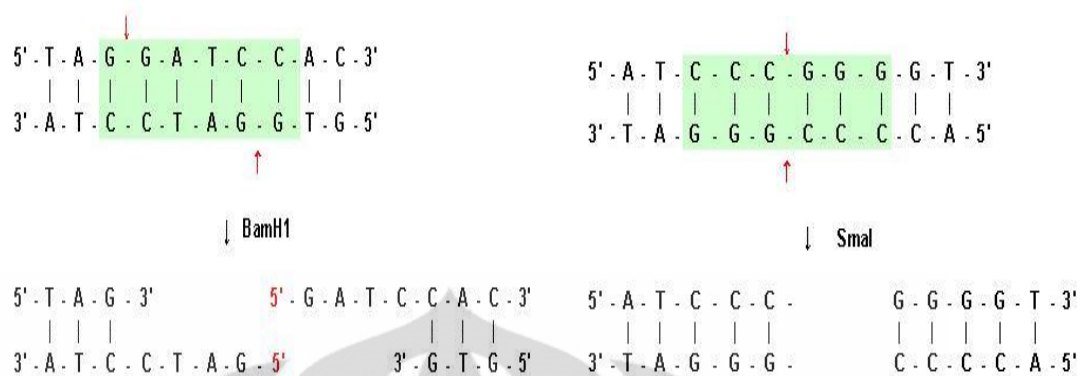
(25 : 24 : 1) akan memberikan hasil terbentuknya 3 fase, yaitu fase atas (DNA dan RNA), fase tengah (protein) dan fase bawah (fenol-kloroform). Ekstraksi dilakukan karena terdapat senyawa-senyawa selain DNA plasmid, diantaranya RNA, protein, senyawa organik dan beberapa komponen lipid. Penambahan etanol 70% untuk mengikat air. Selanjutnya ditambahkan RNAse bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa fragmen RNA.

2.5.3 Enzim Restriksi

Enzim restriksi merupakan endonuklease yang memecah ikatan fosfodiester pada situs pengenalan spesifik (Wong 1997: 69). Enzim restriksi yang dihasilkan bakteri merupakan mekanisme pertahanan terhadap virus faga. Enzim tersebut memotong dan menonaktifkan DNA faga. Enzim restriksi tidak memotong secara acak tetapi memotong pada sekuen spesifik dari DNA, yang dinamakan situs pengenalan spesifik (Griffiths *dkk.* 1998: 301--302).

Situs pengenalan spesifik enzim restriksi berjumlah 6 - 8 bp, disebut palindrom, yaitu sekuen yang identik dengan untai komplemennya ketika dibaca pada arah yang berlawanan (Paolella 1998: 177). Terdapat 3 tipe enzim restriksi dalam sel bakteri, yaitu tipe I, tipe II, dan tipe III. Hanya enzim restriksi tipe II yang digunakan dalam pengerjaan manipulasi DNA, karena mampu mengenali dan memotong untai DNA pada situs yang sama dan spesifik, serta tidak membutuhkan ATP sebagai sumber energi (Fairbanks & Andersen 1999: 256).

Enzim restriksi juga dibedakan berdasarkan hasil pemotongan. Beberapa enzim seperti *HaeIII* memotong kedua untai DNA pada posisi yang sama dan menghasilkan ujung potongan sejajar, disebut *blunt end*. Contoh enzim lain yang menghasilkan potongan *blunt end* adalah *HindII* dan *SmaI*. Beberapa enzim memotong untai DNA pada posisi yang berbeda dan menghasilkan ujung potongan kohesif, disebut *sticky end*. Contoh enzim yang menghasilkan potongan *sticky end* adalah *EcoRI*, *BglII*, *HindIII*, *SauI*, dan *PstI* (Wong 1997: 70; Griffiths *dkk.* 1998: 304).



Gambar 2.7 Contoh mekanisme pemotongan untai DNA dengan enzim restriksi
 [<http://id.wikipedia.org>]

2.5.4 Enzim Ligasi

Enzim ligase adalah enzim yang berfungsi menggabungkan fragmen DNA yang telah dipotong dengan enzim restriksi dengan fragmen DNA vektor. DNA sisipan (fragmen DNA asing) dipotong pada bagian yang sesuai dengan bagian pemotongan DNA vector, sehingga keduanya dapat saling berkomplemen.

Terdapat dua jenis enzim ligase yang dihasilkan oleh *Escherichia coli*, diantaranya T4 DNA Ligase yaitu enzim ligase yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi virus T4 dan *E.coli* DNA Ligase yaitu enzim ligase yang dihasilkan oleh *E.coli* sendiri. Kedua enzim tersebut mempunyai fungsi mengkatalisis reaksi pembentukan kembali ikatan phosphodiester yang menghubungkan nukleotida yang satu dengan nukleotida di sebelahnya.

Perbedaan dari kedua enzim tersebut hanya terletak pada kofaktornya, pada T4 DNA Ligase adalah ATP sedangkan pada *E.coli* DNA Ligase adalah NAD^+ (Muladno, 2010).

2.5.6 Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis gel adalah teknik untuk memisahkan molekul seperti DNA, RNA, atau protein berdasarkan tingkat migrasi molekul bermuatan pada gel poliakrilamida atau gel agarosa yang dialiri arus listrik (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Gel yang umum digunakan pada proses elektroforesis ada 2 jenis, yaitu gel poliakrilamida dan gel agarosa. Gel poliakrilamida efektif untuk pemisahan fragmen DNA yang berukuran kecil (5-500 bp). Gel agarosa memiliki kemampuan pemisahan yang lebih rendah dengan kisaran pemisahan yang lebih luas (200 - 50000 bp) daripada gel poliakrilamida (Sambrook & Russell 2001: 5.2). Molekul DNA yang bermuatan negatif di dalam medan listrik akan bergerak melalui gel pada kecepatan yang berbeda tergantung ukurannya, molekul DNA yang kecil dapat dengan mudah dan cepat melewati gel dibandingkan molekul yang lebih besar (Old R.W & Primrose S.B, 2003). Laju pergerakan molekul DNA berbanding terbalik dengan harga logaritma berat molekulnya (Aaij & Borst, 1972). Kecepatan migrasi DNA ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, konformasi DNA, voltase yang digunakan, adanya ethidium bromide di dalam gel, dan komposisi larutan buffer (Muladno, 2010).

DNA penanda standar (*marker*) digunakan untuk mengetahui ukuran fragmen DNA yang dipisahkan. *Marker* terdiri dari beberapa fragmen yang telah diketahui ukurannya. *Marker* dibuat dari plasmid yang telah direkayasa dan dipotong dengan enzim restriksi tertentu menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang telah diketahui ukurannya. Pada saat dilakukan elektroforesis, *marker* bersama-sama dengan fragmen DNA yang ingin diketahui ukurannya terpisah membentuk pita. Pita DNA yang ingin diketahui ukurannya dibandingkan dengan pita-pita DNA yang terbentuk dari *marker*, sehingga ukuran fragmen DNA tersebut dapat diperkirakan ukurannya (Sambrook *et al*, 1989). *Marker* yang biasa digunakan adalah *marker* λ *HindIII*, λ *BstEII*, dan λ *BstNI* (Ausubel *dkk.* 1998: 2.5A.7).

Pita DNA yang terbentuk pada gel dapat dilihat dengan melalui pewarnaan dengan etidium bromida. Etidium bromida merupakan pewarna mutagenik yang

dapat berinterkalasi di antara basa-basa DNA dan akan memendarkan terang di bawah sinar ultraviolet (Fairbanks & Andersen 1999: 280). Jumlah DNA yang dapat dideteksi dengan cara ini mencapai 10 ng per satu pita (Sambrook *et al*, 1989).

2.5.7 Sequencing

Sequencing merupakan proses penentuan urutan basa nukleotida molekul materi genetik seperti fragmen DNA atau RNA (Russel 1994: 304). Metode *sequencing* yang telah dikembangkan sejak tahun 1970 adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer dari DNA target (Sambrook *dkk.* 1989: 13.7 & 13.11).

Metode Maxam-Gilbert sering disebut metode kimia. Metode Maxam-Gilbert melibatkan bahan radioaktif seperti fosfat, sejumlah senyawa kimia, fragmen DNA, dan autoradiografi (Paolella 1998: 193). Metode Maxam-Gilbert pertama kali dilakukan dengan menandai fragmen DNA pada ujung 5'-nya melalui penempelan enzimatik radioaktif fosfat. Kelompok fragmen tersebut diberi reagen yang akan memodifikasi dan merusak ikatan DNA pada titik tempat basa tertentu berada (Wolfe 1995: 423--424).

Metode Sanger dinamakan juga metode *chain termination*. Metode tersebut menggunakan sintesis primer untuk memperpanjang sekuen DNA. Tahap awal metode Sanger adalah dengan membuat campuran reaksi pada empat tabung yang berbeda. Setiap tabung berisi *template* DNA, primer, DNA polimerase, label radioaktif ^{32}P , dan *dideoxynucleoside triphosphate* (ddNTP) keempat basa DNA. Setiap tabung memiliki satu jenis ddNTP.

Dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP) tidak memiliki gugus -OH pada ujung 3', hal tersebut berguna untuk menghentikan sintesis primer pada *sequence* yang tidak memiliki gugus -OH (Paolella 1998: 193).

Sebagian besar pengerjaan DNA *sequencing* telah diautomatisasi dan dikomputerisasi sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Metode tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger. Metode tersebut menggunakan pewarna berfluoresens yang berbeda untuk memberikan label pada ddNTP. Pewarna berfluoresens menggantikan peran radioaktif fosfat. Pembacaan sekuen dilakukan oleh sistem komputer dengan membedakan panjang gelombang yang berbeda dari perpendaran flouresens yang berbeda (Paoella 1998: 193).

2.6 *GeneBank*

GeneBank merupakan suatu institusi yang mencatat dan mengelola sekuen DNA suatu gen dan ekspresi asam aminonya. *Sequence* DNA dicatat dari berbagai penemu yang secara sukarela memberikan hasil temuannya baik yang belum atau telah duplikasikan. Terdapat tiga *GeneBank* di dunia, yaitu *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) pada situs <http://www.ddbj.nig.ac.jp>, dan *European Bioinformatics Institute* (EBI) pada situs <http://www.ebi.ac.uk> (Baxevanis & Ouellete, 2001).

Format penulisan data sekuen DNA pada *GeneBank* disebut sebagai GBFF (*GeneBank Flatfile Format*), yang terdiri dari dua bagian besar yaitu *header* dan *feature table*. *Header* merupakan bagian GBFF yang menyajikan identitas dari organisme asal *sequence* DNA atau asam amino seperti nama gen penyandi, publikasi, nomor akses, produk eskpresi, dan nama penemu *sequence* DNA tersebut (Baxevanis & Ouellete, 2001). Sedangkan *feature table* terdiri atas *source feature*, *CDS (Coding Sequence) feature*, dan *gene feature*. *Source feature* memuat nama genus, spesies, jaringan, kromosom, strain, organisme tempat *sequence* DNA berasal. *CDS feature* merupakan segmen DNA yang terekspresi menjadi protein yang disandikan oleh gen tersebut (gen struktural). *Gene feature* merupakan bagian terakhir dari *feature table* yang meyajikan *sequence* DNA secara lengkap (Baxevanis & Ouellete, 2001).

2.7 Sequence Alignment

Sequence alignment merupakan metode penyusunan kembali dua atau lebih *sequence* DNA atau asam amino, sehingga diperoleh *areal sequence* yang sama urutannya relatif antara satu dengan yang lain, dengan mempergunakan algoritma tertentu dengan bantuan program komputer. Metode ini digunakan untuk mencari kesamaan (konservatifitas) dan homologi antar *sequence* nukleotida. Konservatifitas menunjukkan adanya kesamaan secara kuantitas antar *sequence* nukleotida, sedangkan homologi menunjukkan adanya hubungan evolusi antara dua atau lebih *sequence* nukleotida suatu gen yang mengalami perubahan, seperti substitusi, insersi, dan delesi (Baxevanis & Ouellete, 2001).

Suatu *areal* nukleotida atau asam amino yang tidak memiliki kesamaan dengan *sequence* nukleotida yang lain menunjukkan adanya substitusi. *Areal* yang ditandai dengan garis putus-putus mewakili *sequence* yang mengalami delesi, sedangkan *areal* nukleotida yang dibandingkan dengan garis putus-putus pada *sequence* yang lain menunjukkan bahwa *sequence* tersebut mengalami sisipan. Sedangkan *areal* yang sama yang ditunjukkan dengan tanda bintang (*) menandakan adanya konservatifitas.

```

seqacuan      ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq1          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq2          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq3          ATGG-----GATCAAATCGAAT 17
              ****                               * * * * *

```

Gambar 2.9 Contoh *Sequence Alignment*

2.8 Membaca Kode Genetik (*Reading Frame*)

Gen adalah serangkaian molekul DNA yang berfungsi sebagai penyandi genetik dalam pembentukan protein (polipeptida) melalui serangkaian proses yang meliputi transkripsi dari DNA menjadi mRNA dan proses translasi dari mRNA menjadi asam amino. Rangkaian asam amino ini disebut protein yang merupakan produk akhir dari sebuah gen. Jadi, apabila ada perubahan *sequence* DNA dalam suatu gen akan membuat perubahan asam amino yang dihasilkan dan perubahan struktur dan fungsi protein (Muladno, 2010). Di alam telah diketahui

ada 20 macam asam amino yang umum terdapat di dalam struktur polipeptida makhluk hidup. Kode genetik pembentukan asam amino terdiri dari rangkaian mRNA sudah dibakukan, setiap kode pembentukan asam amino terdiri atas tiga nukleotida yang disebut sebagai kodon. Masing-masing asam amino mempunyai kodon yang spesifik sedangkan nukleotida hanya ada 4 macam yaitu A, U, G, dan C. Karena kodon disusun oleh 3 nukleotida, sehingga akan diperoleh $4^3 = 64$ asam amino seperti pada **Lampiran 8**, sedangkan jumlah asam amino yang umum diketahui pada makhluk hidup hanya 20 macam. Namun, beberapa kodon diketahui mengkode asam amino yang sama. Fenomena ini dikenal sebagai *genetic code redundancy (de-generacy)*. Oleh karena ada beberapa kodon yang berbeda untuk satu asam amino yang sama, maka dikenal ada 64 macam kodon, tiga di antaranya yaitu TAA (UAA pada mRNA), TAG (UAG pada mRNA), dan TGA (UGA pada mRNA) tidak mengkode asam amino apa pun karena ketiga kodon ini merupakan kodon untuk mengakhiri (terminasi) proses translasi. Kodon ATG (AUG pada mRNA) sebagai penyandi asam amino methionin merupakan kodon memulai transkripsi (*start codon*).

Ada 3 alternatif pembacaan dari untai DNA, misalnya pada urutan basa DNA berikut :

ATGTATTCTTACGGAATCCCTGAT

Sesuai dengan kode genetik, urutan basa diatas dapat diterjemahkan menjadi :

ATG	TAT	TCT	TAC	GGA	ATC	CCT	GAT	(DNA)
M	Y	S	Y	G	I	P	D	(Asam amino)

Namun, penerjemahannya juga bisa seperti ini:

A TGT ATT CTT ACG GAA TCC CTG AT

Atau seperti ini:

AT GTA TTC TTA CGG AAT CCC TG

Dan kalau diterjemahkan hasilnya pun akan berbeda:

A	TGT	ATT	CTT	ACG	GAA	TCC	CTG	AT
	C	I	L	T	E	S	L	
AT	GTA	TTC	TTA	CGG	AAT	CCC	TGA	T
	V	F	L	R	N	P	*	

Karena DNA merupakan pasangan 2 untai yang saling berkomplemen, berarti terjemahan di atas bisa juga dibaca pada untai pasangannya, jadi totalnya ada 6 cara pembacaan DNA, atau istilah disebut sebagai *Reading Frame*. Dari 6 *Reading Frame*, biasanya hanya salah satu frame saja yang merupakan terjemahan suatu gen, frame ini dinamakan *Open Reading Frame (ORF)*.



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekular, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), Cibinong.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah mikropipet (Gilson) berukuran 2 μ L - 1 mL dan tips, tabung mikro ukuran 500 μ L dan 1,5 mL (ExtraGene), *hotplate* [Thermocline CIMAREC No. 25X], oven [GFL 1601], autoklaf [All American No. 25X], elektroforesis [Midicell EC 350 & MiniRun GE-100], UV Transilluminator, *laminar flow cabinet*, pH meter [Corning 430], sentrifuge [Sorvall & Hettich], timbangan digital [Precise 202], *microwave* [Panasonic], oven [GFL 7601 & Heraeus], *incubator shaker* [ROSI 1000], inkubator tabung mikro (Bioer), vorteks (Super-Mixer), Capsulefuge [Tomy PMC 860 & 60], PCR [BIOMETRA T-GRADIENT], *waterbath* (VWR Scientific), lemari pendingin suhu 4°C dan 20°C, freezer (GEA), mesin *sequencing*, cawan petri, tabung reaksi & rak, gelas ukur, labu ukur, pipet ukur, gelas piala, erlenmeyer berbagai ukuran [Duran, Iwaki, dan Pyrex].

3.2.2 Bahan

Vektor kloning (plasmid) yang digunakan

- a) pCAMBIA1305.1 diperoleh dari Cambia, Australia.
- b) pNU400 diperoleh dari CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*), Australia.
- c) pGEM-T Easy Vector System (Promega).

Enzim yang digunakan

*Nco*I (10 u/ μ L), *Bst*EII (10 u/ μ L), *Bgl*II (10 u/ μ L), *Sac*I (10 u/ μ L), *Eco*RI (10 u/ μ L), T4 DNA Ligase (3 u/ μ L), DNA polimerase (DreamTaq DNA Polymerase)

Bahan-bahan kimia yang digunakan

Media LB (Luria Bertani) cair dan padat (Yeast Extract, Bacto Tryptone, Bacto Agar, NaCl), etanol [Merck], Na₂EDTA.2H₂O [Sigma], *loading dye*, bubuk agarosa [Sigma], EtBr 10 mg/mL (etidium bromida) [Sigma], tris base [Sigma], H₃BO₃, SDS 10% (sodium dodesil sulfat) [Promega], HCl [Merck], NaOH, Buffer Orange, Tango, dan Red [Fermentas], *marker* λ HindIII, *nuclease free water* [USB Corporation], GeneJET Gel Extraction Kit [Fermentas], RNase (10 mg/mL), Tris Cl 1 M pH 8, TE pH 8, TBE 5x, Phenol : Kloroform : Isoamil alkohol (25 : 24 : 1), CaCl₂ 0.1 M, MgCl₂ 2M, KCl 25mM, gliserol, nitrogen cair, CH₃COOK 5M, asam asetat glasial, glukosa 1M, CH₃COONa 3M pH 7, kanamycin (50 mg/mL), ampicillin, IPTG, X-gal [Fermentas].

3.3 Cara Kerja

Proses cara kerja yang dilakukan selama penelitian terdiri atas beberapa tahap yaitu pencarian *sequence* pNU400 dan pCAMBIA1305.1, PCR (*polymerase chain reaction*), isolasi plasmid, pembuatan sel kompeten *E.coli* DH5 α , transformasi plasmid ke *E. coli* DH5 α dengan metode *heat shock* CaCl₂, *digest* (pemotongan dengan enzim restriksi), ligasi (penyambungan dengan enzim ligasi), purifikasi gel hasil elektroforesis yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan, dan *sequencing* (**Lampiran 1**).

3.3.1 Pencarian *sequence* pNU400, pCAMBIA1305.1, dan analisis restriksi plasmid.

Pencarian sekuen dilakukan secara *online* internet pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, nomor *GeneBank* : DQ225752.1 untuk pNU400 dan nomor *GeneBank* : AF354045.1 untuk pCAMBIA1305.1. Dari *sequence* pNU400 akan diketahui urutan basa dari fragmen *sgfpS65T*. Program DNA MAN digunakan untuk mengetahui situs pemotongan enzim restriksi dan panjang

fragmen yang dihasilkan dari hasil *digest* (pemotongan dengan enzim restriksi) yang terdapat pada vektor pNU400 dan pCAMBIA1305.1.

3.3.2 Perbanyakan plasmid pCAMBIA1305.1 dan plasmid pNU400 dalam *E.coli*.

a) Pembuatan sel kompeten *E.coli DH5α*

Sel kompeten dibuat menurut Sambrook *dkk.* (1989: 1.8.1). Bakteri *E. coli DH5α* ditumbuhkan pada media LB cair, kemudian diinkubasi semalaman (\pm 16-20 jam) dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm. *E. coli DH5α* yang tumbuh disubkultur pada media LB (1% kultur diinokulasi pada 25 mL LB) kemudian diinkubasi kembali selama \pm 3 jam pada *shaker incubator* pada suhu 37°C dan kecepatan 200 rpm. Pertumbuhan sel dapat dipantau melalui pembacaan densitas optik (*Optical Density/OD*) pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) hingga mencapai 0,4 - 0,6 dengan menggunakan spektrofotometer.

Sebanyak 1,5 mL hasil subkultur dipindahkan pada tabung mikro ukuran 1,5 mL. Tabung kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi dengan 1 mL larutan $CaCl_2$ 0,1 M dingin, kemudian diinkubasi dalam *icebath* selama 20 menit. Suspensi sel kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Pelet kemudian diresuspensi kembali dalam 200 μ L larutan $CaCl_2$ 0,1 M dingin, lalu diinkubasi dalam es selama 10 menit. Sel kompeten tersebut dapat disimpan dengan penambahan gliserol lalu disimpan dalam lemari es pada suhu -70°C untuk dipergunakan lebih lanjut.

b) Transformasi plasmid ke dalam sel kompeten *E.coli DH5α* dengan metode *heat shock* dan seleksi hasil transforman dengan media padat LB yang mengandung antibiotik kanamycin.

Proses transformasi dilakukan berdasarkan Sambrook *dkk.* (1989: 1.8.1). Sebanyak 2-5 μ L DNA plasmid dan DNA hasil ligasi dicampur ke dalam 50 μ L sel kompeten dan diinkubasi dalam *icebath* selama 30 menit (setiap 15 menit tabung dijentik). Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 45-50 detik

di dalam *waterbath* dan tabung langsung dimasukkan ke dalam es selama 2 menit. Sel kemudian dipulihkan dengan menambahkan 950 μ L medium SOC atau LB cair dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 1.5 jam pada suhu 37° C dengan kecepatan 200 rpm.

Seluruh campuran kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Pelet yang terbentuk kemudian diresuspensi dalam 100 μ L medium SOC atau LB cair dan ditumbuhkan pada media LB padat yang telah ditambahkan antibiotik kanamisin (50 mg/mL), kemudian diinkubasi semalaman (\pm 16-20 jam) pada suhu 37° C. Vektor pNU400 dan pCAMBIA1305.1 memiliki gen resistensi antibiotik kanamycin, sehingga untuk seleksi hasil transforman di dalam media LB ditambahkan antibiotik kanamycin, jadi koloni yang tumbuh merupakan koloni sel *E.coli* yang di dalamnya terdapat vektor pNU400 dan pCAMBIA1305.1.

c) Isolasi plasmid metode *alkaline lysis solution*

Isolasi plasmid dilakukan dengan metode *alkaline lysis solution* menurut Sambrook *dkk.* (1989: 1.38). Tahap pertama dalam isolasi plasmid adalah menumbuhkan 1 koloni bakteri yang mengandung target plasmid pada 5 mL medium LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin (50 mg/mL) pada *shaker incubator* dengan suhu 37°C. Kultur bakteri diinkubasi 16-20 jam kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL. Kultur bakteri tersebut disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya tersisa pelet. Pelet kemudian ditambahkan 100 μ L larutan I dan dihomogenkan dengan vorteks. Sebanyak 200 μ L larutan II ditambahkan dan dikocok perlahan hingga menjadi sedikit kental. Sebanyak 150 μ L larutan III (dalam keadaan dingin) ditambahkan, lalu dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasi dalam *icebath* selama 15 menit.

Tabung kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke tabung baru. Larutan kemudian ditambahkan larutan campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol sebanyak 1 kali volume supernatan dengan perbandingan 25 : 24 : 1. Tabung yang berisi campuran tersebut dikocok kemudian disentrifugasi selama 15

menit dengan kecepatan 9.000 rpm. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan dipindahkan ke tabung baru.

Supernatan yang telah dipindahkan kemudian ditambahkan etanol absolut sebanyak 2 kali volume supernatan dan CH₃COONa 3 M pH 7 sebanyak 1/10 kali volume supernatan ditambahkan dan kemudian diinkubasi dalam *icebath* selama 30 menit. Tabung kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 9000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya tersisa pelet. Tabung berisi pelet kemudian ditambahkan 500 µL etanol 70%. Tabung tersebut disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 9000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang kembali sehingga hanya tersisa pelet, kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan selama ±15 menit. Sebanyak 20 µL Tris EDTA pH 8 ditambahkan ke dalam tabung, hasil isolasi plasmid dapat disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20° C.

3.3.3 Konfirmasi plasmid hasil isolasi dengan teknik elektroforesis.

a) Pembuatan gel agarose 0,8%

Ditimbang 0,8 gram *agarose powder* dan dilarutkan dalam 100 mL TBE 0,5 kali. Gel agarose tersebut kemudian dipanaskan di dalam *microwave*, lalu gel didinginkan sampai ± 60°C. Dituang gel ke dalam tangki pencetak gel yang sudah diletakkan pencetak untuk sumur (*comb*, dibiarkan gel memadat (± 20 menit). Apabila gel sudah memadat, *comb* ditarik kembali dan gel siap untuk digunakan.

b) *Running* gel agarose

Gel diletakkan pada alat elektroforesis dengan posisi yang tepat, *well* harus berada dekat dengan arus elektrik bermuatan negatif (-), kemudian larutan buffer TBE dituang ke dalam *tank* sampai kira-kira 2 mm di atas permukaan gel. Dipipet 2-3 µL plasmid hasil isolasi, ditambah dengan *loading dye* (sebagai pewarna). *Tank* elektroforesis ditutup dan diatur voltase yang sesuai, 50 – 100 volt selama ± 1 jam.

- c) Melihat hasil *running gel*

Gel di *staining* di dalam larutan EtBr selama ± 15 menit, kemudian di rendam di dalam air ± 15 menit. Gel tersebut diletakkan pada UV transilluminator.

3.3.4 Konfirmasi pNU400 melalui *digest* dengan enzim *BglII*, *NcoI*, dan *SacI*.

Enzim restriksi yang digunakan untuk konfirmasi adalah enzim yang terdapat di dalam situs pemotongan pNU400. Berdasarkan analisis restriksi dengan DNA MAN, pemotongan dengan enzim *BglII* akan dihasilkan 2 fragmen, dengan enzim *NcoI* akan dihasilkan 3 fragmen, dan dengan enzim *SacI* akan dihasilkan 2 fragmen. Komposisi reaksi pemotongan atau *digest* untuk setiap enzim dapat dilihat pada Tabel 3.1 – 3.3.

Tabel 3.1 Komposisi *digest* dengan enzim *BglII* untuk 1 kali reaksi

DNA plasmid	2 μL
Buffer Orange	2 μL
Enzim <i>BglII</i>	1 μL
<i>Nuclease Free Water</i>	15 μL

Total volume = 20 μL

Tabel 3.2 Komposisi *digest* dengan enzim *NcoI* untuk 1 kali reaksi

DNA plasmid	2 μL
Buffer Tango	2 μL
Enzim <i>NcoI</i>	1 μL
<i>Nuclease Free Water</i>	15 μL

Total volume = 20 μL

Tabel 3.3 Komposisi *digest* dengan enzim *SacI* untuk 1 kali reaksi

DNA plasmid	2 μL
Buffer Tango	2 μL
Enzim <i>SacI</i>	1 μL
<i>Nuclease Free Water</i>	15 μL

Total volume = 20 μL

Dibuat komposisi reaksi seperti tabel di atas, campuran reaksi tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil reaksi dapat diketahui menggunakan teknik elektroforesis seperti pada tahap No.3.3.3 dengan menyertakan kontrol plasmid yang tidak dipotong dengan enzim restriksi tersebut.

3.3.5 Penyiapan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 dengan pemotongan fragmen gen *gusPlus*.

a) *Double digest* pCAMBIA1305.1 dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*

Komposisi reaksi *digest* yang digunakan untuk 1 kali reaksi adalah 3 μL DNA plasmid, 4 μL buffer Tango, 1 μL enzim *BstEII*, 1 μL enzim *NcoI* dan 11 μL *Nuclease Free Water*. Total reaksi *digest* adalah 20 μL . Reaksi restriksi dibuat dua kali ulangan dengan total reaksi 40 μL . Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil reaksi dapat diketahui menggunakan teknik elektroforesis seperti pada tahap 3.3.3 dengan menyertakan kontrol plasmid yang tidak dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*.

b) Purifikasi DNA hasil elektroforesis

Purifikasi DNA hasil elektroforesis gel agarosa menggunakan GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas). Tahap pertama ialah pemotongan gel agarosa yang mengandung fragmen DNA target dengan pisau pemotong (*razor blade*), kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL. Fragmen DNA target atau fragmen *backbone* yang akan dipotong adalah fragmen yang memiliki

panjang 9788 bp. Larutan *binding buffer* ditambahkan sebanyak 100 μL untuk setiap 100 mg gel, kemudian diinkubasi selama ± 10 menit pada suhu $55^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$ hingga potongan gel larut secara keseluruhan.

Gel yang telah larut kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan tersebut kemudian dilewatkan melalui kolom purifikasi GeneJET yang telah dipasang pada tabung koleksi. Tabung yang dipasang kolom purifikasi tersebut kemudiannya disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terdapat pada tabung koleksi kemudian dibuang. Sebanyak 700 μL *wash buffer* ditambahkan pada kolom. Tabung kemudian disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

Kolom purifikasi GeneJET dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL kemudian sebanyak 20-50 μL *elution buffer* ditambahkan ke dalam kolom purifikasi. Tabung berisi kolom purifikasi tersebut diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang agar matriks kolom dapat menyerap *elution buffer*. Tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk pada tabung mikro 1,5 mL merupakan DNA murni hasil restriksi.

- c) Konfirmasi hasil purifikasi fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 tanpa *gusPlus* dengan elektroforesis.

Prosedur kerja yang dilakukan sama seperti pada tahap.3.3.3.

3.3.6 Amplifikasi fragmen *sgfpS65T* dari pNU400 dengan teknik PCR.

Teknik PCR digunakan untuk memperoleh fragmen *sgfpS65T* sepanjang 720 bp dari pNU400. Reaksi PCR menggunakan *PCR kit DreamTaq DNA Polymerase* dengan total volume reaksi sebanyak 12,5 μL . Komposisi reaksi PCR yang digunakan adalah 2,25 μL *nuclease free water*, 6,25 μL *Dream Taq DNA Polymerase*, 1 μL untuk masing-masing primer *forward* dan *reverse sgfpS65T*, serta 2 μL *template* DNA (pNU400).

Reaksi amplifikasi PCR menggunakan primer:

Forward sgfpS65T: 5' TGATCCCATGGTGAGCAAGG 3'

Reverse sgfpS65T: 5' TAGGTCACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC3'

Program PCR yang dipakai adalah seperti yang terdapat pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Program PCR untuk amplifikasi fragmen *sgfpS65T* dari pNU400

Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah siklus
Denaturasi awal	95	2 menit	1
Denaturasi	95	30 detik	35
Penempelan (<i>Annealing</i>)	55	30 detik	
<i>Extension</i>	72	1 menit	
<i>Final Extension</i>	72	10 menit	1

Untuk mengetahui hasil PCR dilakukan elektroforesis seperti pada tahap 3.3.3.

Pita fragmen hasil PCR yang diinginkan dipotong dengan pisau pemotong (*razor blade*) dan kemudian dilakukan purifikasi gel dengan menggunakan *GeneJET Gel Extraction Kit* (Fermentas) seperti pada tahap 3.3.5.b. Hasil purifikasi lalu dikonfirmasi kembali dengan elektroforesis.

3.3.7 Ligasi fragmen *sgfpS65T* hasil PCR dengan vektor linier pGEM T-Easy

Reaksi ligasi dibuat dalam mikrotube 1,5 mL. Komposisi reaksi yang digunakan seperti pada tabel 3.5

Tabel 3.5 Komposisi reaksi ligasi *sgfpS65T* hasil PCR dengan pGEM T-Easy

Komponen reaksi	Reaksi Standar	Kontrol Positif
2× Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	5 µL	5 µL
pGEM-T Easy Vector (50 ng)	1 µL	1 µL
Produk PCR	2 µL	-
Control Insert DNA	-	2 µL
T4 DNA Ligase	1 µL	1 µL
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	1 µL	1 µL

Tabung yang telah berisi campuran reaksi tersebut diinkubasi semalaman (16-20 jam) pada suhu 4°C.

3.3.8 Transformasi hasil ligasi ke dalam sel *E.coli* DH5α kompeten & seleksi biru putih.

Tahap pertama yang dilakukan adalah pembuatan sel kompeten *E.coli* DH5α dan transformasi plasmid hasil ligasi ke dalam sel kompeten dengan metode *heat shock* seperti yang dilakukan pada tahap 3.3.2., hanya saja hasil transformasi ditumbuhkan pada media media padat LB ditambah dengan antibiotik ampicillin 50 mg/mL, IPTG 100mM, dan X-Gal 20 mg/mL untuk seleksi biru putih. Koloni yang berwarna putih yang akan diambil untuk selanjutnya ditumbuhkan dalam media cair LB yang mengandung ampicillin dan kemudian diisolasi.

3.3.9 Isolasi Plasmid pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* & konfirmasi hasil isolasi melalui *digest* dengan enzim *EcoRI*

Isolasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa insert (*sgfpS65T*) dilakukan dengan metode *alkaline lysis solution* seperti pada tahap 3.3.2 c. Hasil isolasi plasmid kemudian dikonfirmasi melalui digesti dengan enzim *EcoRI*.

Komposisi reaksinya adalah 2 μ L DNA plasmid hasil isolasi, 2 μ L buffer Orange, 1 μ L enzim *EcoRI*, dan 15 μ L *nuclease free water* dengan volume total reaksi sebanyak 20 μ L. *Digest* dengan enzim *EcoRI* akan melepaskan *insert (sgfpS65T)* dari vektor pGEM-T Easy. Hasil *digest* kemudian dilakukan elektroforesis untuk melihat visual fragmen yang dihasilkan.

3.3.10 Sequencing plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* dan analisis hasil sequencing.

Sekuensing dilakukan untuk memastikan urutan basa dari *sgfpS65T* yang tersisipi di dalam pGEM-T Easy dengan primer universal M13forward, yang kemudian urutan basanya dibandingkan dengan urutan basa *sgfpS65T* dari pNU400 yang diperoleh dari NCBI. Elektroferogram dilihat menggunakan program *sequence scanner*. Analisis hasil sekuensing dilakukan secara *online* melalui internet pada situs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, *sequence* fragmen acuan adalah *sequence sgfpS65T* dari pNU400 yang disejajarkan (*alignment*) dengan *sequence sgfpS65T* yang diperoleh untuk melihat kesamaan dari *sequence* yang diperoleh.

3.3.11 Double digest pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* dengan *BstEII* dan *NcoI* serta ligasi fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 dengan fragmen *sgfpS65T*.

Apabila fragmen yang tersisipi ke dalam pGEM-T Easy merupakan *sgfpS65T* yang diharapkan maka tahap selanjutnya adalah dilakukan *digest* plasmid rekombinan tersebut menggunakan enzim *BstEII* dan *NcoI* dengan komposisi reaksi untuk 1 kali reaksi adalah 3 μ L DNA plasmid rekombinan tersebut, 4 μ L buffer Tango, 1 μ L enzim *BstEII*, 1 μ L enzim *NcoI* dan 11 μ L *Nuclease Free Water*. Total reaksi *digest* adalah 20 μ L. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil reaksi dapat diketahui menggunakan teknik elektroforesis seperti pada tahap 3.3.3 dengan menyertakan kontrol plasmid rekombinan tersebut yang tidak dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Dari hasil elektroforesis fragmen *sgfpS65T* yang memiliki ukuran 720 bp dipotong dengan pisau pemotong

untuk kemudian dilakukan purifikasi gel dengan *GeneJET Gel Extraction Kit* (Fermentas). Hasil dari purifikasi dikonfirmasi kembali dengan melakukan elektroforesis.

Fragmen *sgfpS65T* yang diperoleh kemudian diligasi dengan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 yang sudah dipotong dengan enzim yang sama yaitu *NcoI* dan *BstEII*. Komposisi reaksi ligasinya adalah 1 μL *Nuclease Free Water*, 5 μL 2 \times Rapid Ligation Buffer, 1 μL T4 DNA Ligase, 1 μL vektor linier pCAMBIA1305.1 (*backbone*), dan 2 μL *sgfpS65T*. Campuran reaksi tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 mL, lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama semalaman $\pm 16-20$ jam.

3.3.12 Transformasi ke dalam *E.coli* dengan teknik *heat-shock* dan seleksi hasil rekombinan dengan media padat LB mengandung antibiotik kanamycin.

Hasil fragmen *sgfpS65T* yang diligasi dengan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 ditransformasi ke dalam sel kompeten *E.coli* DH5 α dengan teknik *heat shock* seperti pada tahap 3.3.2 a-b. Sel-sel transforman tersebut kemudian ditumbuhkan pada media padat LB yang mengandung antibiotik 50 mg/mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam.

3.3.13 Isolasi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* & konfirmasi hasil isolasi melalui *digest* dan teknik PCR.

Koloni yang tumbuh pada media padat LB yang mengandung antibiotik kanamycin diambil lalu ditumbuhkan pada media cair LB yang mengandung antibiotik yang sama yaitu kanamycin 50 mg/mL. Kultur bakteri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-20 jam dan dilakukan isolasi plasmid dengan metode *alkaline lysis solution*. Hasil isolasi plasmid dikonfirmasi melalui *double digest* dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Komposisi reaksi untuk 1 kali reaksi adalah 2 μL DNA plasmid, 4 μL buffer Tango, 1 μL enzim *BstEII*, 1 μL enzim *NcoI* dan 12 μL *Nuclease Free Water*. Total reaksi *digest* adalah 20 μL . Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil reaksi dapat diketahui menggunakan teknik

elektroforesis seperti pada tahap 3.3.3 dengan menyertakan kontrol plasmid yang tidak dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*.

Konfirmasi dengan teknik PCR dilakukan untuk mengetahui apakah fragmen sisipan yang terdapat pada plasmid rekombinan tersebut mengandung gen *sgfpS65T* yang diinginkan. Tahapan prosedurnya sama seperti pada tahap 3.3.6.

3.3.14 Sequencing plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* dan analisis hasil *sequencing*.

Sequencing dilakukan untuk memastikan urutan basa dari *sgfpS65T* yang tersisipi di dalam pGEM-T Easy dengan primer F *sgfpS65T* dan R *sgfpS65T*. Elektroferogram dilihat menggunakan program *sequence scanner*. Analisis hasil *sequencing* dilakukan secara *online* melalui internet pada situs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, *sequence* fragmen acuan adalah *sequence sgfpS65T* yang disubklon ke pGEM T-Easy dan disejajarkan (*alignment*) dengan *sequence sgfpS65T* yang diperoleh untuk melihat kesamaan dari *sequence* yang diperoleh.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pencarian *sequence* pNU400, pCAMBIA1305.1, dan analisis restriksi plasmid.

Sequence vektor pNU400 dan pCAMBIA1305.1 dari *GeneBank* dalam bentuk GBFF (*GeneBank Flatfile Format*) dapat dilihat pada **Lampiran 4.** dan **Lampiran 5.** Hasil analisis restriksi pNU400 terhadap 117 enzim restriksi (**Lampiran 6.**) diperoleh 98 enzim restriksi yang dapat memotong dan 19 enzim restriksi yang tidak dapat memotong (*non cut enzyme*).

4.2 Perbanyak plasmid pCAMBIA1305.1 dan plasmid pNU400 dalam *E.coli*.

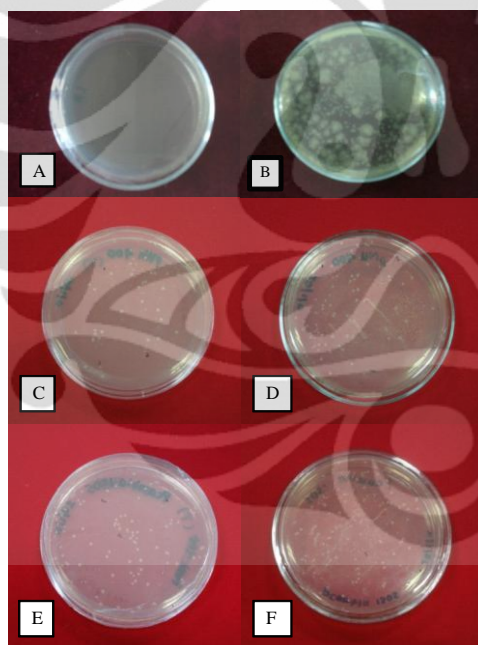
Transformasi vektor pNU400 dan pCAMBIA1305.1 ke dalam sel kompeten *E.coli DH5 α* pada media padat LB dengan antibiotik kanamycin diperoleh sebanyak 39 koloni pada ulangan pertama dan 85 koloni pada ulangan kedua untuk pNU400, dan 109 koloni pada ulangan pertama dan 122 koloni pada ulangan kedua untuk perbanyak vektor pCAMBIA1305.1 seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Jumlah koloni pada tahap perbanyak plasmid pNU400 dan pCAMBIA1305.1

Plate	Media	Jumlah koloni
Kontrol <i>E.coli DH5α</i> tanpa plasmid	LB + kanamycin	0
Kontrol <i>E.coli DH5α</i> tanpa plasmid	LB	TBUD*
<i>E.coli DH5α</i> mengandung pNU400 (1)	LB + kanamycin	39
<i>E.coli DH5α</i> mengandung pNU400 (2)	LB + kanamycin	85
<i>E.coli DH5α</i> mengandung pCAMBIA1305.1 (1)	LB + kanamycin	109
<i>E.coli DH5α</i> mengandung pCAMBIA1305.1 (2)	LB + kanamycin	122

*) TBUD : Tidak Bisa Untuk Dihitung

Hal ini dikarenakan pNU400 dan pCAMBIA1305.1 memiliki gen penyandi resisten antibiotik kanamycin, sehingga bakteri *E.coli* DH5 α menjadi tahan di media yang mengandung antibiotik, sedangkan bakteri yang tidak tersisipi oleh plasmid pNU400 maupun pCAMBIA1305.1 akan mati atau tidak tumbuh pada media yang mengandung antibiotik tersebut. Untuk kontrol *E.coli* DH5 α tanpa plasmid yang ditumbuhkan pada media padat LB tanpa kanamycin diperoleh jumlah sel koloni yang sulit untuk dihitung atau TBUD (Tidak Bisa Untuk Dihitung), sedangkan *E.coli* DH5 α tanpa plasmid yang ditumbuhkan pada media padat LB tanpa Kanamycin tidak ditemukan adanya koloni. Hal ini dapat menjelaskan bahwa kontrol untuk seleksi antibiotik Kanamycin berjalan dengan baik, dimana telah diketahui umumnya bakteri tidak dapat hidup pada media yang mengandung antibiotik.



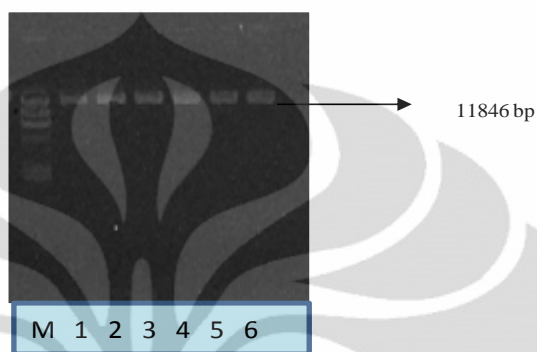
Keterangan :

- A. Kontrol *E.coli* DH5 α tanpa plasmid (media LB + kanamycin)
- B. Kontrol *E.coli* DH5 α tanpa plasmid (media LB)
- C. *E.coli* DH5 α yang mengandung pNU400 (1) (media LB + kanamycin)
- D. *E.coli* DH5 α yang mengandung pNU400 (2) (media LB + kanamycin)
- E. *E.coli* DH5 α yang mengandung pCAMBIA1305.1 (1) (media LB + kanamycin)
- F. *E.coli* DH5 α yang mengandung pCAMBIA1305.1 (2) (media LB + kanamycin)

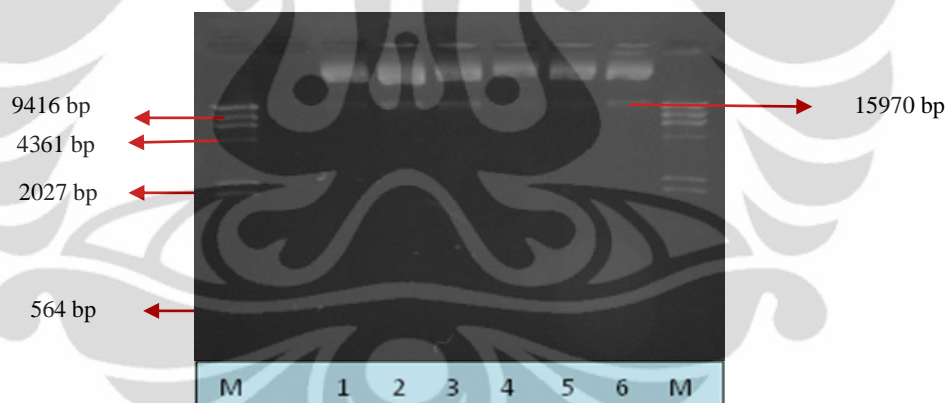
Gambar 4.1. Hasil transformasi plasmid pNU400 dan pCAMBIA1305.1 ke dalam *E.coli* DH5 α dengan seleksi antibiotik kanamycin.

4.3 Konfirmasi plasmid hasil isolasi dengan teknik elektroforesis.

Masing-masing ulangan dari setiap cawan petri diambil 3 koloni untuk diisolasi dengan metode *alkaline lysis solution* (Sambrook *dkk.* 1989: 1.38), hasil isolasi lalu dikonfirmasi dengan elektroforesis.



Gambar 4.2 Hasil isolasi plasmid pCAMBIA1305.1

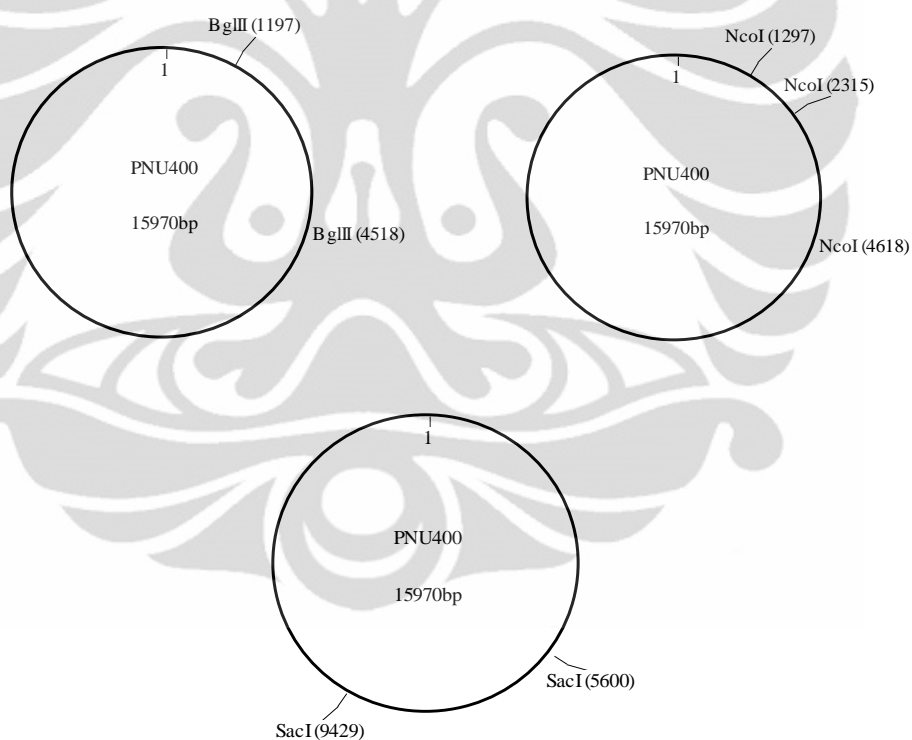


Gambar 4.3 Hasil isolasi plasmid pNU400

Gambar 4.2 Dan Gambar 4.3 menunjukkan bahwa dari hasil isolasi plasmid yang dielektroforesis terdapat suatu pita yang memiliki ukuran sekitar 11846 bp untuk pCAMBIA1305.1 dan sekitar 15970 bp untuk pNU400. Dikarenakan plasmid yang diperoleh memiliki ukuran lebih dari 1 kbp maka penanda atau *marker* yang digunakan adalah λ *HindIII* yaitu suatu λ DNA yang dipotong dengan enzim *HindIII* seperti terlihat pada **Lampiran 3**.

4.4 Konfirmasi pNU400 melalui *digest* dengan enzim *Bgl*III, *Nco*I, dan *Sac*I.

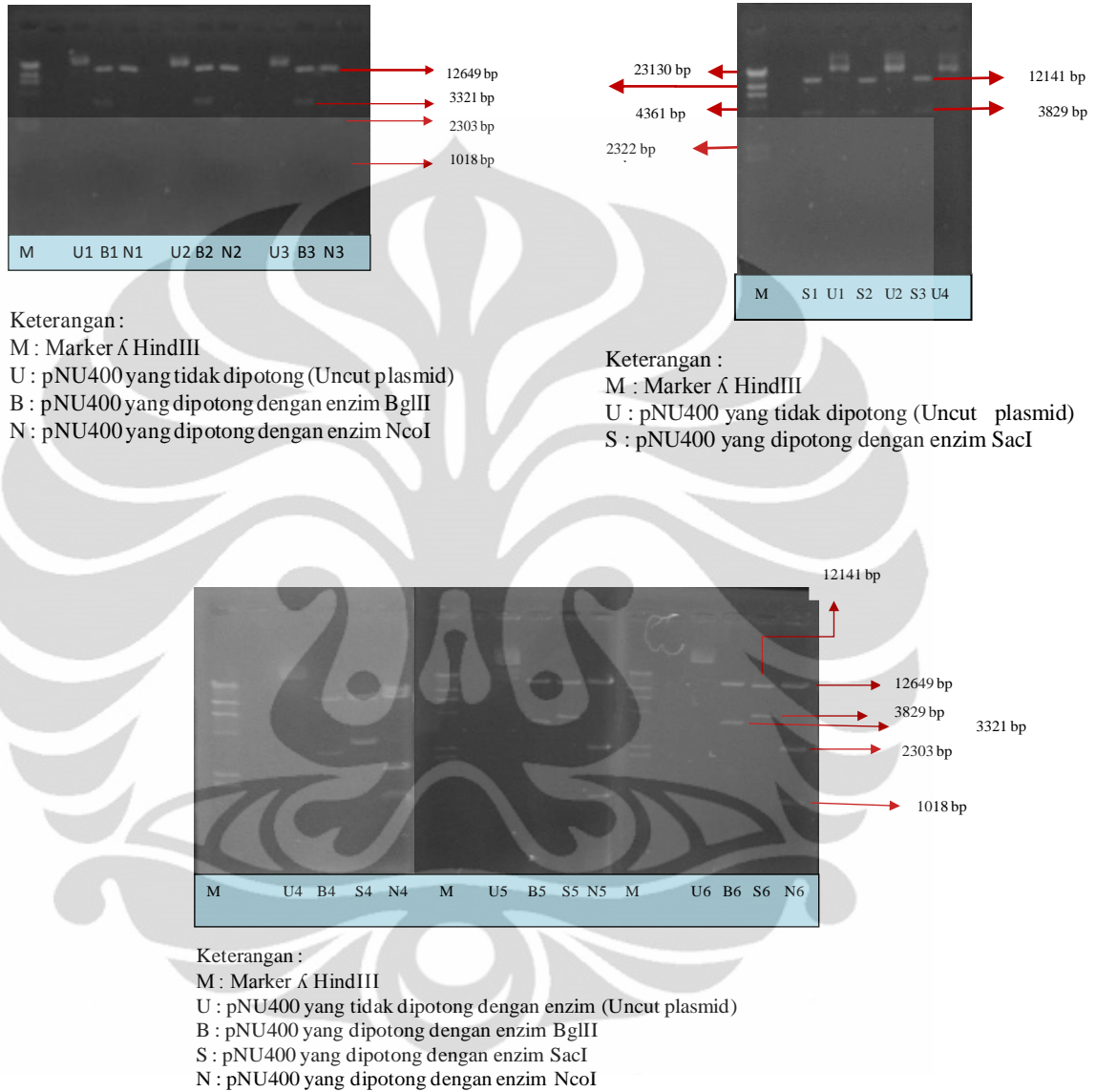
Untuk memastikan lebih lanjut hasil plasmid yang diperoleh, maka dilakukan *digest* dengan enzim-enzim restriksi yang spesifik memotong pada situs-situs pemotongan yang terdapat pada vektor pNU400. Dari 98 enzim restriksi yang dapat memotong pNU400 (**Lampiran 6**) dipilih 3 enzim restriksi yaitu enzim *Bgl*III, *Nco*I, dan *Sac*I. Enzim *Bgl*III yang dapat memotong pNU400 pada posisi A/GATCT, sehingga dihasilkan 2 fragmen (3.321 bp dan 12.649 bp), enzim *Nco*I memotong pada posisi C/CATGG menghasilkan 3 fragmen (1.018 bp, 2.303 dan 12649 bp), enzim *Sac*I memotong pada posisi GAGCT/C yang menghasilkan 2 fragmen (3829 bp dan 12141 bp).



Gambar 4.4 Peta restriksi pNU400 dengan enzim *Bgl*III, *Nco*I, dan *Sac*I

Hasil *digest* pNU400 dengan ketiga enzim tersebut setelah dikonfirmasi dengan elektroforesis menghasilkan fragmen yang sesuai dengan analisis restriksi melalui program DNA MAN, yaitu dihasilkannya masing-masing 2 fragmen dari

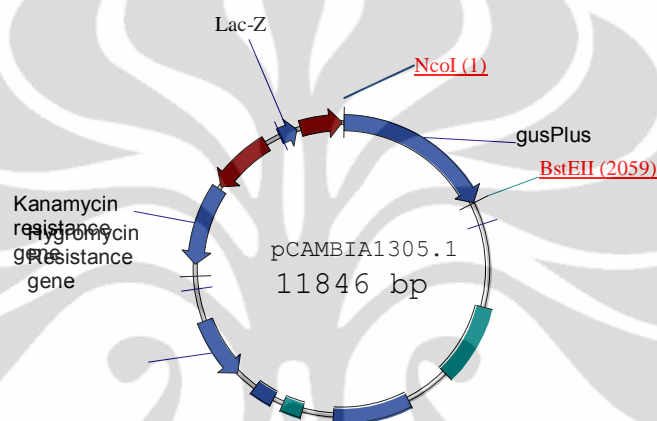
pemotongan dengan enzim *Bgl*III dan *Sac*I, 3 fragmen dari pemotongan dengan enzim *Nco*I.



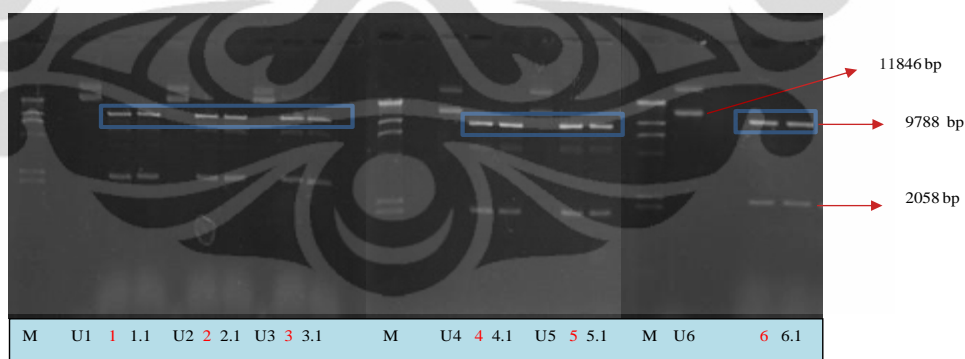
Gambar 4.5 Hasil elektroforesis pNU400 yang dipotong dengan enzim *Bgl*III, *Nco*I, dan *Sac*I

4.5 Penyiapan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 dengan pemotongan fragmen gen *gusPlus*.

Penghilangan fragmen gen *gusPlus* dari pCAMBIA1305.1 dilakukan pemotongan dengan menggunakan 2 enzim restriksi yaitu enzim *NcoI* dan enzim *BstEII*. Enzim *NcoI* memotong vektor binary pCAMBIA1305.1 pada posisi C/CATGG dan *BstEII* memotong pada posisi G/GTGACC, seperti yang diperlihatkan pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6 pCAMBIA1305.1 sirkular dengan situs pemotongan *NcoI* dan *BstEII*



Keterangan :

M : Marker λ HindIII

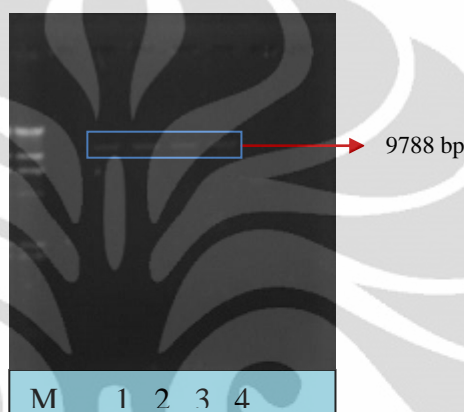
U : pCAMBIA1305.1 yang tidak dipotong dengan enzim (Uncut plasmid)

1 - 6 : pCAMBIA 1305.1 yang dipotong dengan enzim *BstEII* dan *NcoI* ulangan ke-1

1.1 – 1.6 : pCAMBIA1305.1 yang dipotong dengan enzim *BstEII* dan *NcoI* ulangan ke-2

Gambar 4.7 Hasil elektroforesis *digest* pCAMBIA1305.1 dengan *NcoI* dan *BstEII*

Hasil *pemotongan* dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* menghasilkan dua fragmen, yaitu fragmen *gusPlus* yang berukuran sekitar 2.058 bp dan fragmen *backbone* yang berukuran sekitar 9.788 bp (Gambar 4.7). Fragmen yang berukuran 9.788 bp kemudian diisolasi untuk selanjutnya dilakukan purifikasi gel dengan *GeneJET Gel Extraction Kit* (Promega) untuk memisahkan DNA dari makromolekul lainnya dan mendapatkan fragmen DNA murni. Hasil dari purifikasi menunjukkan ukuran fragmen yang sama yaitu sekitar 9.788 bp (**Gambar 4.8**).



Gambar 4.8. Hasil purifikasi *backbone* pCAMBIA1305.1

4.6 Amplifikasi fragmen *sgfpS65T* dari pNU400 dengan teknik PCR.

Amplifikasi *sgfpS65T* dengan PCR menggunakan dua primer yaitu primer F *sgfpS65T* dan R *sgfpS65T*.

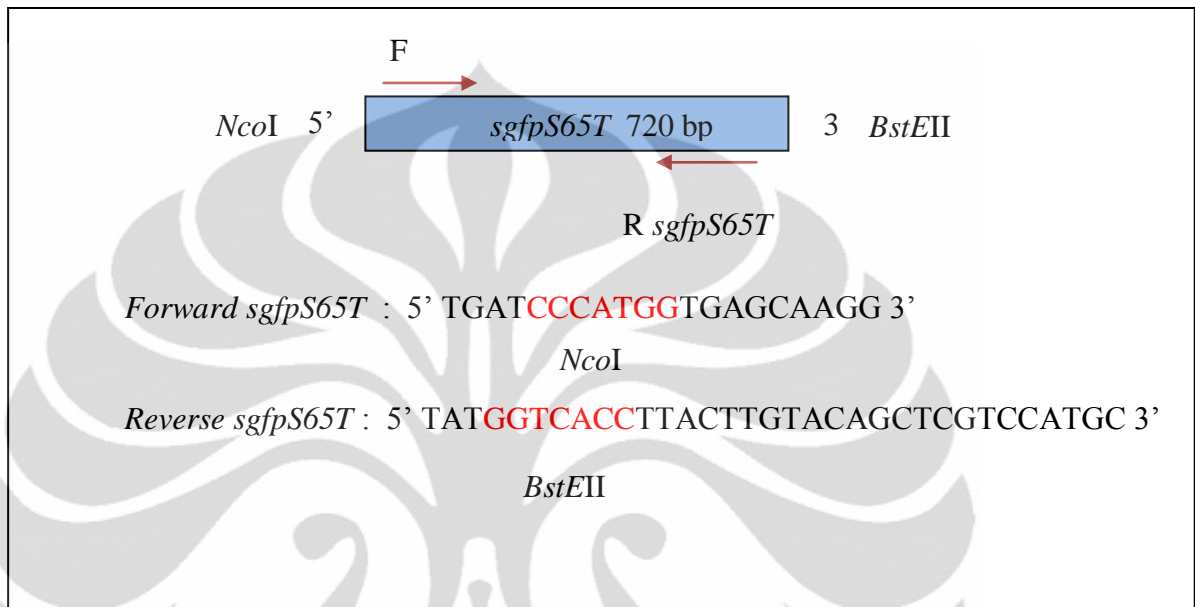
Primer forward *sgfpS65T*: 5'-TGATCCCATGGTGAGCAAGG-3'

Primer reverse *sgfpS65T*: 5'-

TATGGTCACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

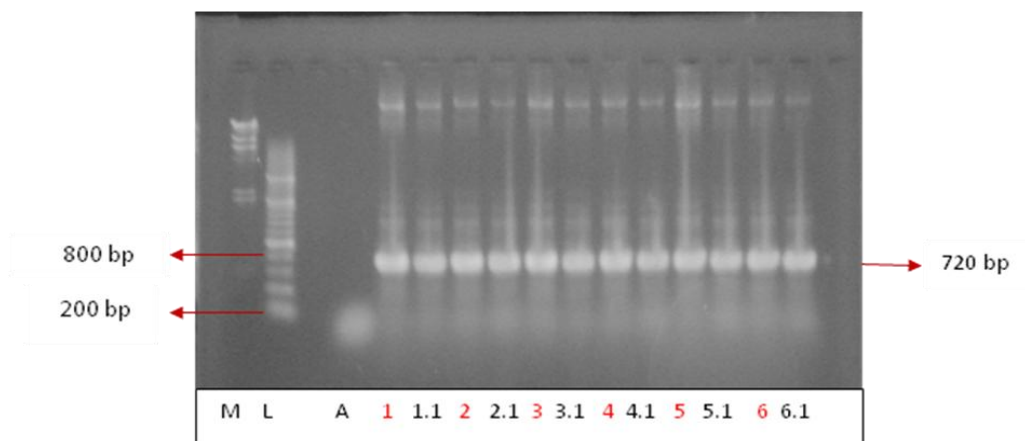
Dalam proses PCR ini digunakan suhu penempelan atau *annealing* sebesar 55°C, *primer forward* yang urutan nukleotidanya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal dari pNU400 akan menempel pada posisi komplemennya. Demikian juga *primer reverse* akan menempel pada untai tunggal lainnya. Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing-masing, enzim polimerase mulai mensintesis molekul DNA baru. Fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 yang dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* akan menghasilkan ujung potongan

kohesif atau *sticky end* pada kedua ujung fragmen tersebut, maka primer yang digunakan untuk amplifikasi *sgfpS65T* ditambahkan urutan basa yang menyandi enzim *NcoI* yaitu C/CATGG dan *BstEII* yaitu G/GTCACC. Untuk skema penempelannya dapat dilihat pada **Gambar 4.9**.



Gambar 4.9 Skema penempelan *primer forward* dan *reverse* serta enzim restriksi *NcoI* dan *BstEII* pada gen *sgfpS65T*

Hasil amplifikasi PCR setelah dikonfirmasi dengan elektroforesis menunjukkan adanya pita dengan ukuran diantara 800 bp dan 600 bp yang dapat disimpulkan sebagai fragmen yang berukuran 720 bp. Hal ini menjelaskan bahwa fragmen *sgfpS65T* berhasil diamplifikasi dari pNU400.



Keterangan :

M : Marker Δ HindIII

L : Ladder 200 bp

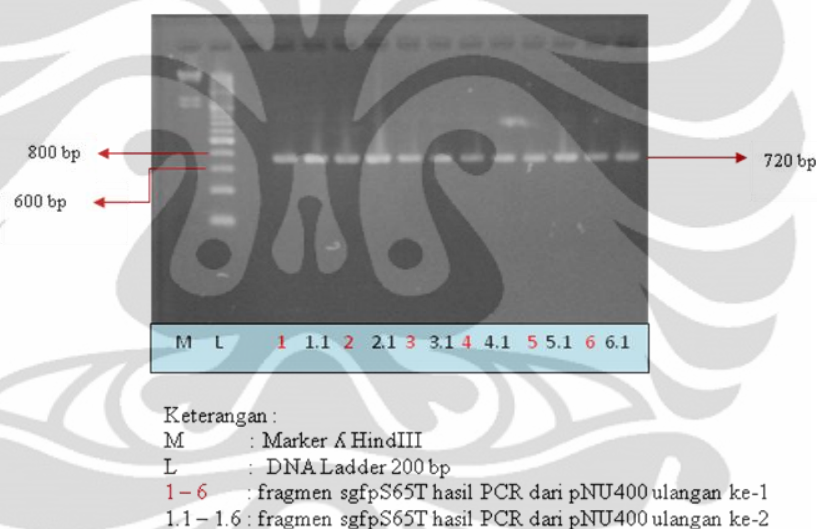
A : Kontrol air

1-6 : fragmen *sgfpS65T* hasil PCR dari pNU400 ulangan ke-1

1.1 - 1.6 : fragmen *sgfpS65T* hasil PCR dari pNU400 ulangan ke-2

Gambar 4.10 Hasil amplifikasi *sgfpS65T* dengan PCR

Pita yang berukuran 720 bp tersebut kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan fragmen *sgfpS65T* murni tanpa adanya makromolekul lain. Dari hasil purifikasi pada **Gambar 4.11** terlihat adanya pita yang muncul dengan ukuran yang sama yaitu sekitar 720 bp.

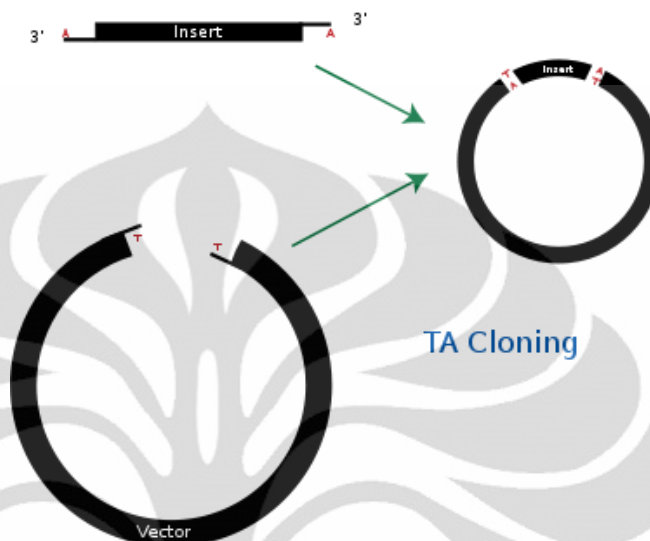


Gambar 4.11 Hasil purifikasi fragmen *sgfpS65T* dari amplifikasi PCR

4.7 Ligasi fragmen *sgfpS65T* dengan vektor pGEM-T Easy.

Seperti yang telah diketahui, produk PCR diperoleh dari proses amplifikasi suatu fragmen DNA yang diapit oleh sepasang primer dengan bantuan enzim *DNA polymerase* yang termotabil. Beberapa enzim seperti *Taq DNA Polymerase* akan menambahkan satu basa nukleotida tambahan di ujung 3' dari produk PCR. Biasanya yang ditambahkan adalah adenin (A) yang menyebabkan kedua ujung produk PCR memiliki "A" *overhang*. Vektor pGEM-T Easy dibuat untuk memanfaatkan keunikan ini dalam memudahkan pengklonan fragmen hasil

PCR yang memiliki “A” overhang tersebut. Vektor linier pGEM-T Easy yang memiliki ujung “T” overhang, sehingga basa T dengan A akan berpasangan atau berkomplemen seperti pada **Gambar 4.12**



Gambar 4.12 Proses ligasi gen target (produk PCR) yang memiliki “A” overhang dengan vektor linier yang memiliki “T” overhang. [sciencebiotech.net]

4.8 Transformasi hasil ligasi ke dalam sel *E.coli* DH5 α kompeten & seleksi biru putih.

Hasil ligasi kemudian ditransformasi ke dalam *E.coli* DH5 α dengan metode *heat shock*. Hasil transformasi dapat terlihat dengan munculnya koloni putih dan biru pada media padat LB (*Luria Bertani*) + Ampicillin + IPTG + X-Gal. Kontrol positif yang digunakan berupa sel kompeten *E.coli* DH5 α yang mengandung plasmid hasil ligasi antara vektor dengan kontrol insert. Kontrol ini menunjukkan keefektifan ligasi vektor “T” overhang dengan kontrol insert. Pada **Gambar 4.13** terlihat terbentuknya koloni putih dan koloni biru. Koloni putih merupakan koloni *E.coli* DH5 α yang berhasil tersisipi vektor pGEM-T Easy pembawa insert *sgfpS65T*, sedangkan koloni biru merupakan koloni *E.coli* DH5 α yang kemungkinan tersisipi oleh vektor pGEM-T Easy namun tidak berhasil berligasi dengan insert *sgfpS65T*. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan tidak terligasinya vektor pGEM-T Easy dengan gen target, seperti adanya kemungkinan vektor berligasi dengan vektor itu sendiri atau vektor berligasi dengan vektor yang

lain (ligasi antar vektor). Seleksi biru putih ini menggunakan prinsip kerja dari gen *Lac-Z* yang dapat menghasilkan β -galaktosidase. Pada *Multiple Cloning Site* (MCS) vektor pGEM-T Easy terdapat gen *Lac-Z*. Insert *sgfpS65T* apabila berhasil tersisipi ke dalam vektor akan merusak gen *Lac-Z*, sehingga gen *Lac-Z* tidak dapat terespresikan atau tidak terbentuknya enzim β -galaktosidase sehingga X-Gal tidak dapat terurai, indol tidak terbentuk dan koloni tetap berwarna putih. Apabila *sgfpS65T* tidak berhasil tersisipi pada MCS vektor pGEM-T Easy maka gen *Lac-Z* akan menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dengan adanya inducer IPTG akan mengurai substrat X-Gal sehingga terbentuk indol yang dapat merubah warna koloni menjadi biru.



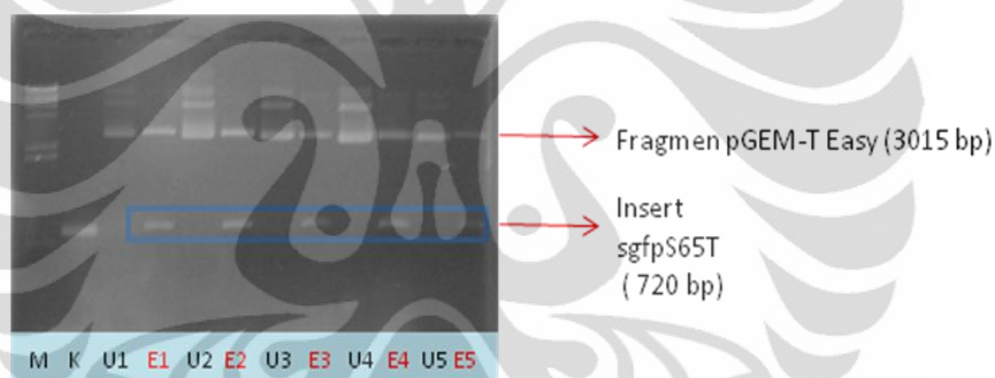
Gambar 4.13 Hasil skrining sel transforman dengan seleksi biru putih
Tabel 4.2. Jumlah koloni biru putih sel transforman

Plate	Jumlah koloni putih	Jumlah koloni biru
A. Kontrol Positif	30	1
B. pGEM T-Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> (1)	20	1
C. pGEM T-Easy pembawa <i>sgfpS65T</i> (2)	9	1

4.9 Isolasi plasmid pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* & konfirmasi hasil isolasi melalui *digest* dengan enzim *EcoRI*

Koloni berwarna putih yang diduga tersisipi oleh plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* diisolasi dengan menggunakan metode *alkaline lysis solution*. Untuk mengetahui apakah plasmid yang diisolasi merupakan plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T*, maka hasil

isolasi tersebut dipotong dengan enzim restriksi yang spesifik memotong pada vektor pGEM-T easy. Vektor linier pGEM-T Easy memiliki situs beberapa enzim restriksi yang spesifik dapat melepas insert yang masuk, baik dengan menggunakan 1 enzim (*single digest*) maupun 2 enzim (*double digest*). Untuk *single digest* dapat digunakan enzim *BstZI*, *EcoRI*, atau *NotI*. Pada penelitian ini digunakan enzim *EcoRI* dengan situs pemotongan pada posisi G/AATTC. Hasil elektroforesis dari *single digest* dengan enzim *EcoRI* pada **Gambar 4.14** menghasilkan pita yang berukuran sekitar 3015 bp yaitu vektor linier pGEM-T Easy dan 720 bp yaitu fragmen *sgfpS65T*. Sebagai kontrol digunakan kontrol *sgfpS65T* hasil purifikasi dari produk amplifikasi PCR dan kontrol plasmid pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* yang tidak dipotong dengan enzim *EcoRI*.



Keterangan :

M: Marker Δ HindIII

K : Kontrol fragmen *sgfpS65T*

U1-U5: Tidak dipotong dengan *EcoRI* (Uncut plasmid)

E1-E5 : Dipotong dengan *EcoRI*

Gambar 4.14 Hasil elektroforesis *digest* pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* dengan *EcoRI*

4.10 Sequencing plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* dan analisis hasil *sequencing*.

Dari 3 hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy pembawa *sgfpS65T* tersebut yang dilakukan *sequencing* diperoleh urutan basa seperti yang terlampir pada **Lampiran 5**. dan elektroferogram *sequence 1* (**Lampiran 11**), *sequence 2* (**Lampiran 12**) dan *sequence 3* (**Lampiran 13**). Urutan basa tersebut kemudian

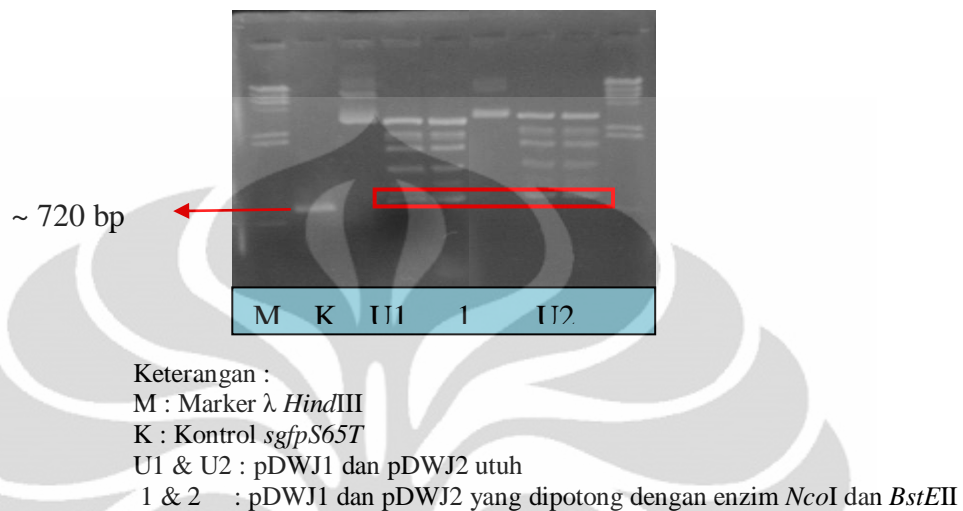
disejajarkan atau dilakukan *sequence alignment* dengan *sequence* acuannya yaitu *sequence sgfpS65T* dari pNU400 (nomor *GeneBank* : DQ225752.1).

Sequence alignment dilakukan secara *online* melalui situs <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Hasil *alignment* tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 8 dan 9**. Dari hasil *alignment* tersebut terlihat bahwa hasil *sequence* 1 (seq1) dan hasil *sequence* 2 (seq2) terdapat perbedaan basa nukleotida pada posisi 524 bp, yaitu hasil *sequence* menunjukkan basa C (Cytosin) sedangkan *sequence* acuan sebenarnya pada posisi 524 bp adalah basa G (Guanin). Namun, telah diketahui bahwa urutan nukleotida selanjutnya akan ditranslasi menjadi asam amino. Protein disusun oleh asam amino dan asam amino disandi oleh kodon yaitu deret nukleotida pada mRNA yang terdiri atas kombinasi tiga nukleotida berurutan yang menyandi suatu asam amino tertentu. Oleh karena itu hasil *sequence* 1 dan 2 ditranslasikan ke dalam bentuk *sequence* proteinnya dengan cara *online* melalui situs <http://expasy.org/tools/dna.html>. Hasil *sequence* DNA 1 dan 2 setelah diterjemahkan ke dalam bentuk proteinnya akan dilakukan *alignment* dengan *sequence* protein acuan *sgfpS65T* dari pNU400. Hasil *alignment sequence* protein dapat dilihat pada **Lampiran 10**. Dari hasil *alignment* tersebut terlihat bahwa meskipun terdapat mutasi (*base substitution*) dari G ke C pada posisi basa ke 524, hasil *sequence* urutan asam amino sekuens 1 dan 2 sama dengan sekuens asam amino *sgfpS65T* dari pNU400 yaitu sama-sama menyandi asam amino Glycine (GGC dan GGG). Namun, hasil *sequence* 3 (seq3) menunjukkan banyaknya mutasi atau perbedaan urutan nukleotida. Kemungkinan hasil *sequence* 3 (seq3) bukan merupakan fragmen dari *sgfpS65T*. Plasmid pGEM-T Easy pembawa *sequence* pertama (seq1) dinamakan pDWJ1, sementara pembawa *sequence* 2 (seq2) dinamakan pDWJ2.

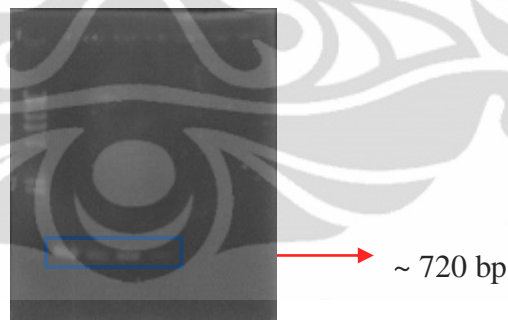
4.11 Double digest pDWJ1 dan pDWJ2 dengan *BstEII* dan *NcoI* serta ligasi fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 dengan fragmen *sgfpS65T*.

Plasmid pDWJ1 dan pDWJ2 yang menghasilkan *sequence* yang sama dengan *sequence* acuan *sgfpS65T* dari pNU400 dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* sehingga menghasilkan potongan kohesif atau *sticky end*. Hal ini

dikarenakan fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 juga dipotong dengan kedua enzim tersebut dan menghasilkan potongan yang *sticky end* pula sehingga apabila dilakukan ligasi akan dapat saling berkomplemen.



Gambar 4.15 Hasil *digest* pDWJ1 dan pDWJ2 dengan *BStEII* dan *NcoI*

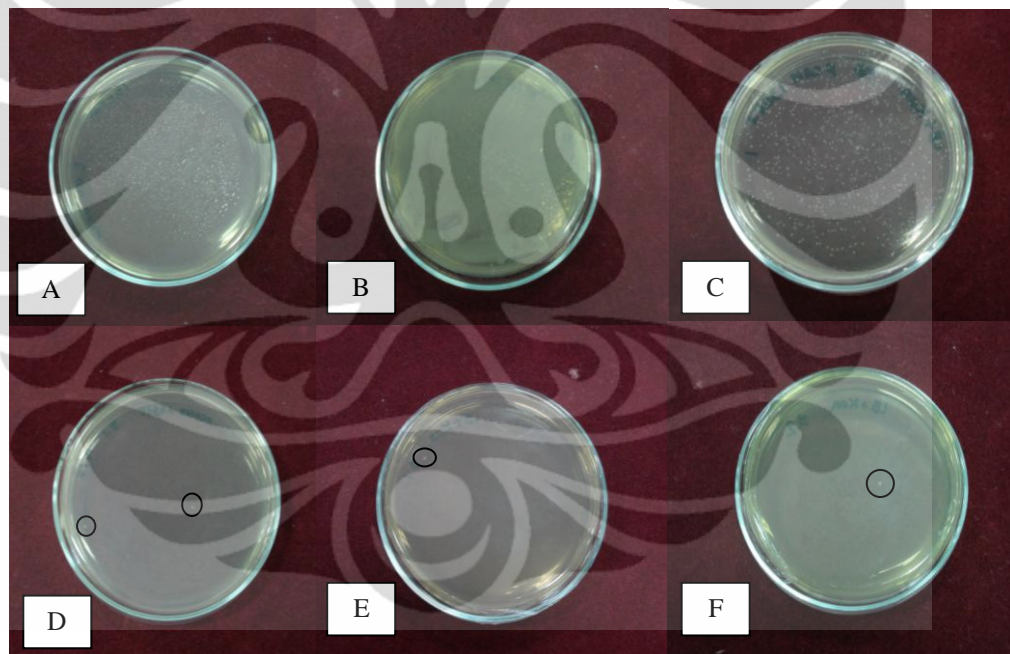


Gambar 4.16 Hasil purifikasi *sgfpS65T* dari *digest* pDWJ1 dan pDWJ2 dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*

Pita yang memiliki ukuran sama dengan kontrol *sgfpS65T* hasil *digest* *NcoI* dan *BstEII* pada **Gambar 4.16** dipotong untuk kemudian dilakukan purifikasi gel dengan *GeneJET Gel Extraction Kit* (Fermentas). Hasil purifikasi menunjukkan adanya fragmen dengan ukuran sekitar 720 bp, seperti yang diperlihatkan pada **Gambar 4.17**.

4.12 Transformasi ke dalam *E.coli* dengan teknik *heat-shock* dan seleksi hasil rekombinan dengan seleksi media padat LB dengan antibiotik kanamycin.

Hasil ligasi fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 dengan fragmen *sgfpS65T* hasil purifikasi dari pGEM-T Easy kemudian ditransformasi ke dalam sel kompeten *E.coli* DH5 α dengan metode *heat shock*. Hasil transformasi ditumbuhkan pada media padat LB dengan antibiotik kanamycin. Digunakan antibiotik kanamycin karena pada fragmen *backbone* pCAMBIA1305.1 terdapat gen resisten antibiotik kanamycin. Sehingga koloni yang tumbuh merupakan koloni yang mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T*. Dari hasil transformasi hanya diperoleh total koloni sebanyak 4 koloni.



Keterangan :

A. *E.coli* DH5 α (media LB + kanamycin)

B. *E.coli* DH5 α (media LB)

C. Kontrol Positif *E.coli* DH5 α yang mengandung pCAMBIA1305.1 (LB + kanamycin)

D – F. *E.Coli* DH5 α yang mengandung plasmid rekombinan (pDWJ3-pDWJ6) (LB + kanamycin)

Gambar 4.17 Hasil transformasi plasmid rekombinan pada media seleksi antibiotik

4.13 Isolasi plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* & konfirmasi hasil isolasi melalui *double digest* dan PCR

Plasmid rekombinan dari 4 koloni yang tumbuh diisolasi dengan metode *alkaline lysis solution*. Hasil isolasi kemudian dipotong dengan 2 enzim atau *double digest* dengan *NcoI* dan *BstEII* sebagai konfirmasi. Plasmid-plasmid tersebut untuk selanjutnya dinamakan pDWJ3 sampai pDWJ6 yang kemudian dipotong dengan 2 enzim atau *double digest* dengan *NcoI* dan *BstEII* sebagai konfirmasi.



Keterangan :

M : Marker λ *HindIII*

L : Ladder 200 bp

K : Kontrol *sgfpS65T*

Up : pCAMBIA 1305.1 tanpa dipotong dengan enzim

P : pCAMBIA1305.1 dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*

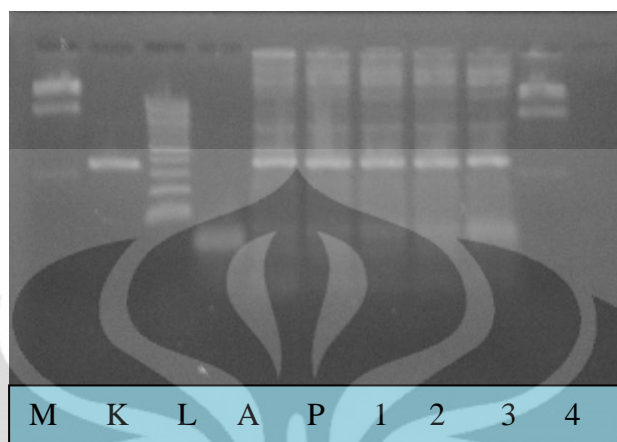
U1 – U4 : pDWJ3 – pDWJ6 tanpa dipotong dengan enzim

1 – 4 : pDWJ3 – pDWJ6 dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*

Gambar 4.18 Hasil *double digest* plasmid rekombinan dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*

Pemotongan diprediksi akan menghasilkan 2 fragmen, yang pertama sekitar 9.788 bp yang merupakan *backbone* pCAMBIA1305.1 dan yang kedua sebesar 720 bp yang merupakan fragmen *sgfpS65T*. Namun, dari hasil pemotongan tersebut diperoleh ukuran fragmen sekitar ~1000 bp yang berbeda dengan ukuran fragmen *sgfpS65T* yang sebenarnya, yaitu 720 bp seperti terlihat pada **Gambar 4.18**. Oleh karena itu, untuk mengkonfirmasi lebih lanjut keberhasilan kloning maka dilakukan amplifikasi PCR terhadap fragmen gen yang terdapat pada pDWJ3 –

pDWJ6 tersebut dengan menggunakan *primer* F *sgfpS65T* dan R *sgfpS65T* untuk mengetahui apakah plasmid tersebut mengandung gen *sgfpS65T*.



Keterangan :

M : Marker λ *HindIII*

K : Kontrol fragmen *sgfpS65T* hasil purifikasi dari pGEM-T Easy

L : Ladder 200 bp

A : Kontrol Air

P : pNU400

1-4 : pDWJ3 – pDWJ6

Gambar 4.19 Hasil amplifikasi PCR plasmid rekombinan pDWJ3 – pDWJ6

Dari **Gambar 4.19** terlihat adanya pita yang berukuran sekitar 720 bp (*sgfpS65T*) pada plasmid rekombinan hasil dari amplifikasi PCR. Hal ini dapat disimpulkan bahwa plasmid rekombinan yang diperoleh memiliki gen *sgfpS65T*.

4.14 Sequencing plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* (pDWJ3) dan analisis hasil sequencing.

Hasil *sequencing* pDWJ3 dengan primer F *sgfpS65T* diperoleh hasil elektroferogram (**Lampiran 14**) yang kemudian diterjemahkan menjadi urutan basa-basa nukleotidanya dengan *sequence scanner* seperti pada **Lampiran 16**. Hasil *sequence* pDWJ3 dengan primer R *sgfpS65T* dicari reverse komplemennya melalui situs <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/revcomp.html> .

Hasil kedua *sequence* tersebut disejajarkan (*alignment*) seperti pada **Lampiran 17**.

Dari kedua *sequence* tersebut kemudian dilakukan pengeditan dengan menghilangkan beberapa *sequence* yang tidak sejajar sehingga diperoleh hasil *sequence* yang tepat. Hasil *sequence* tersebut kemudian disejajarkan atau dilakukan *alignment* kembali dengan *sequence* acuan yaitu *sequence sgfpS65T* yang disubklon ke pGEM T-Easy. Hasil *alignment* dapat dilihat pada **Lampiran 18**, menunjukkan adanya substitusi basa yaitu pada posisi 294 bp dan 710 bp, posisi 294 bp *sequence* acuan menunjukkan basa C sedangkan hasil *sequence* pDWJ3 menunjukkan basa T, posisi 710 bp *sequence* acuan menunjukkan basa T sedangkan hasil *sequence* pDWJ3 menunjukkan basa C.

```

acuan      MVSKEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPT 60
editsequence MVSKEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPT 60
*****

acuan      LVTTFTYGVQCFSTRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL 120
editsequence LVTTFTYGVQCFSTRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL 120
*****

acuan      VNRLELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 180
editsequence VNRLELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 180
*****

acuan      DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK- 239
editsequence DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDEPKYK- 239
*****

```

Gambar 4.20 Hasil *sequence alignment* asam amino pDWJ3 dengan acuan *sgfpS65T* (pDWJ1)

Namun, setelah diterjemahkan dalam bentuk asam aminonya kemudian dilakukan *alignment*, hasil *sequence alignment* asam amino dapat dilihat pada **Gambar 4.20**, substitusi basa pada posisi 294 bp menyandi asam amino yang sama dengan asam amino acuan yaitu threonine. Kodon ACC pada *sequence* acuan dan kodon ACT pada *sequence* dari pDWJ3. Sedangkan posisi 710 bp menerjemahkan asam amino yang berbeda yaitu asam amino P (Phenylalanin) pada *sequence* pDWJ3 dan asam amino L (Leusin) pada *sequence* acuan.

Perubahan basa atau mutasi yang diidentifikasi tersebut seharusnya tidak terjadi. Hal ini dikarenakan fragmen *sgfpS65T* pada plasmid pDWJ3 adalah hasil subklon dari fragmen *sgfpS65T* dari plasmid pDWJ1 yang telah dikonfirmasi hasil

sequence sebelumnya. Untuk memastikan *sequence sgfpS65T* pada plasmid pDwj3, maka *sequencing* ulang fragmen *sgfpS65T* pada plasmid tersebut akan dilakukan. Selain itu fragmen *sgfpS65T* pada plasmid pDwj4, pDwj5 atau pDwj6 akan dilakukan *sequencing* untuk memastikan diperolehnya gen *sgfpS65T* yang benar.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Diperolehnya fragmen gen *sgfpS65T* dari pNU400 yang memiliki panjang sekitar 720 bp dengan teknik PCR memungkinkan dilakukannya subklon ke dalam vektor pGEM-T Easy, sehingga dihasilkan plasmid rekombinan pDWJ1 dan pDWJ2 yang membawa gen *sgfpS65T*.
2. Hasil dari konstruksi plasmid gen *sgfpS65T* yang berbasis vektor binary pCAMBIA1305.1 (pDWJ3-pDWJ6) setelah dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* dihasilkan potongan fragmen gen yang berukuran sekitar ~1000 bp, namun setelah dikonfirmasi lebih lanjut dengan amplifikasi PCR dihasilkan fragmen berukuran 720 bp yang sama dengan ukuran fragmen *sgfpS65T*.
3. Hasil *sequencing sgfpS65T* pada plasmid pDWJ3 menunjukkan adanya substitusi basa pada posisi 294 bp dan 710 bp, pada posisi 294 bp menyandi asam amino yang sama yaitu threonine. Namun, pada posisi 710 bp menyandi asam amino yang berbeda yaitu phenylalanin, yang seharusnya menyandi asam amino leusin. Jadi, gen *sgfpS65T* yang terdapat pada pDWJ3 kemungkinan belum dapat diekspresikan dan diperlukan analisis lebih lanjut terhadap fragmen tersebut.

5.2 Saran

1. Analisis lebih lanjut diperlukan terhadap fragmen *sgfpS65T* pada plasmid pDWJ3 untuk memastikan bahwa gen *sgfpS65T* tersebut memiliki urutan basa yang benar.
2. *Sequencing* fragmen *sgfpS65T* pada plasmid pDWJ4, pDWJ5 atau pDWJ6 perlu dilakukan.
3. Setelah diperoleh konstruksi plasmid pCAMBIA1305.1 pembawa *sgfpS65T* dengan urutan basa yang benar, maka diperlukan tahap lebih lanjut untuk menganalisis fungsi gen *sgfpS65T* melalui overekspresi di tanaman padi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaij C, & Borst P. (1972). *The gel electrophoresis of DNA*. Biochim. biophys. Acta 269, 192-200.
- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* 2(5): 91--95.
- Ahlandsberg, S; Sathish, P; Sun, C & Jansson, C (1999). *Green fluorescent protein as a reporter system in the transformation of barley cultivars*. *Physiol. Plant*, 107: 194-200.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl. (1998). *Current protocol in molecular biology 1*. John Wiley & Sons Inc., Canada: xxvi + 2.1.1--2.1.9 + 2.3.1 + 2.5A.1--2.5A.8 hlm.
- Baxevanis, A.D. & Ouellete, B.F.F. (2001). *Bioninformatics of practical guide to the analysis of genes and proteins*. 2ed. John Wiley & Sons. Inc., New York.
- Brooker, R.J. (2005). *Genetics: Analysis and principles*. McGraw Hill Companies, Inc., Boston: xxii + 842 hlm.
- Brown, Terry A. (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Wiley-Blackwell. [ISBN 978-1-4051-8173-0](https://doi.org/10.1002/9781405181730). Hal. 35-36.
- Calladine, C. R., Horace R D., Ben F L., Andrew A T. (2004). *Understanding DNA*. Amsterdam : Academic Press.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. (2002). *Biologi 5th ed*. Jakarta: Erlangga.
- Chalfie, M. et al. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. *Science* 1994; 263: 802-805.
- Chiu, W-I; Niwa, Y; Zeng, W; Hirano, T; Kobayashi, H & Sheen, J (1996). *Engineered GFP as a vital reporter for plant*. *Curr. Biol.*, 6: 325.

- De Wet, J.R. et al. *Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 7870-7873.
- Elliot, A R; Cambell, J A; Brettel, R I S & Grof, C P L (1999). *Green fluorescent protein facilitates rapin in vivo detection of genetically transformed plant cells*. Plant Cell Rep., 18: 707-714.
- Fairbanks, D. J. & W. R. Andersen. (1999). *Genetics: The continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, California: xix + 820 hlm.
- Glick, D. R. & Pasternak, J. J. (1994). *Molecular biotechnology principles and application of recombinant DNA*. ASM Press, Washington D.C.
- Griffiths, A. J. F., W. M. Gelbart, J. H. Miller, & R. C. Lewontin. (1998). *Modern genetic analysis*. W. H. Freeman and Company, New York: xvii + 675 hlm.
- Hajdukiewicz, P, Svab, Z, Maliga, P., (1994). *The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation*. Plant Mol Biol 25:989-994.
- Haseloff, J; Semering, K R; Prasher, D & Hodge, S (1997). *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 2122-2127.
- Heim R, Cubitt A, Tsien R.. (1995). *Improved green fluorescence*. Nature. **373**(6516) : 663-4.
- Hinnebusch J, Barbour AG. (1991). *Linear plasmids of Borrelia burgdorferi have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus*. J Bacteriol **173** (22): 7233-7239.
- Holme, I B; Henrik, B P; Lange, M & Holm, P B (2006). *Transformation of barley (Hordeum vulgare L.) by Agrobacterium tumefaciens infection of in vitro cultured ovules*. Plant Cell Rep., 25: 1325-1335.

- Hu, W & Cheng, C L (1995). *Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells*. FEBS Lett., 369: 331-334.
- Jordan, M C (2000). *Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation*. Plant Cell Rep., 19: 1069-1075.
- Kaeppler, H F; Menon, G K; Skadsen, R W; Nuutila, A M & Carlos, A R (2002). *Transgenic oat plants via visual selection of cell expressing green fluorescent protein*. Plant Cell Rep., 19: 561.
- Klug, W. S. & M. R. Cummings. (1994). *Concept of genetics*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs: xvi + 779 hlm.
- Lodish, H., Arnold B., S. Lawrence Z., Paul M., David B. James D. (2000). *Molecular Cell Biology*. Wh Freeman Company.
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi Kedua*. IPB Press: Bogor.
- Nakamura, T & Ishikawa, M (2006). *Transformation of suspension cultures of bromegrass (Bromus inernis) by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 84: 293-299.
- Niedz, R P; Sussman, M R & Satterlee, J S (1995). *Green fluorescent protein: an in vivo reporter of plant gene expression*. Plant cell Rep., 14: 403-406.
- Oadilla, I M G; Golis, A; Gentile, A; Damiano, C & Scorza, R (2006). *Evaluation of transformation in peach Prunus persica explants using green fluorescent protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes*. Plant Cell Tissue Organ cult., 84: 309-314.
- Old, R.W. & Primrose, S.B. (2003). *Prinsip – prinsip Manipulasi Gen : Suatu Pengantar Rekayasa Genetika*. Edisi Keempat. UI Press : Jakarta.

Paolella, P. (1998). *Introduction to molecular biology*. McGraw-Hill Companies, Inc. Boston: xiii + 241 hlm.

Prasher, D. et al. *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. *Gene* 1992; 111(2): 229-233.

Polin, P D; Liang, H; Rothrock, R E; Nairn, C J; Powell, W A & Maynard, C A (2006). *Agrobacterium-mediated transformation of American chestnut (Castanea dentata Marsh. Bork.) somatic embryos*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 84: 69-78.

Reichel, C; Mathur, J; Eckes, P; Langenkemper, K; Koncz, C; Shell, J; Reiss, B & Mass, C (1996). *Enhanced green fluorescence by the expression of an Aequorea victoria green fluorescent protein mutant in mono and dicotyledonous plant cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5888-5983.

Royston C. Clowes (September 1972). *Molecular Structure of Bacterial Plasmids*. *Bacteriological Reviews* 36 (3): 361-405.

Raven, P. H. & G. B. Johnson. (2002). *Biology*. 6th ed. McGraw-Hill Company, Inc., New York: xxix + 1238 hlm.

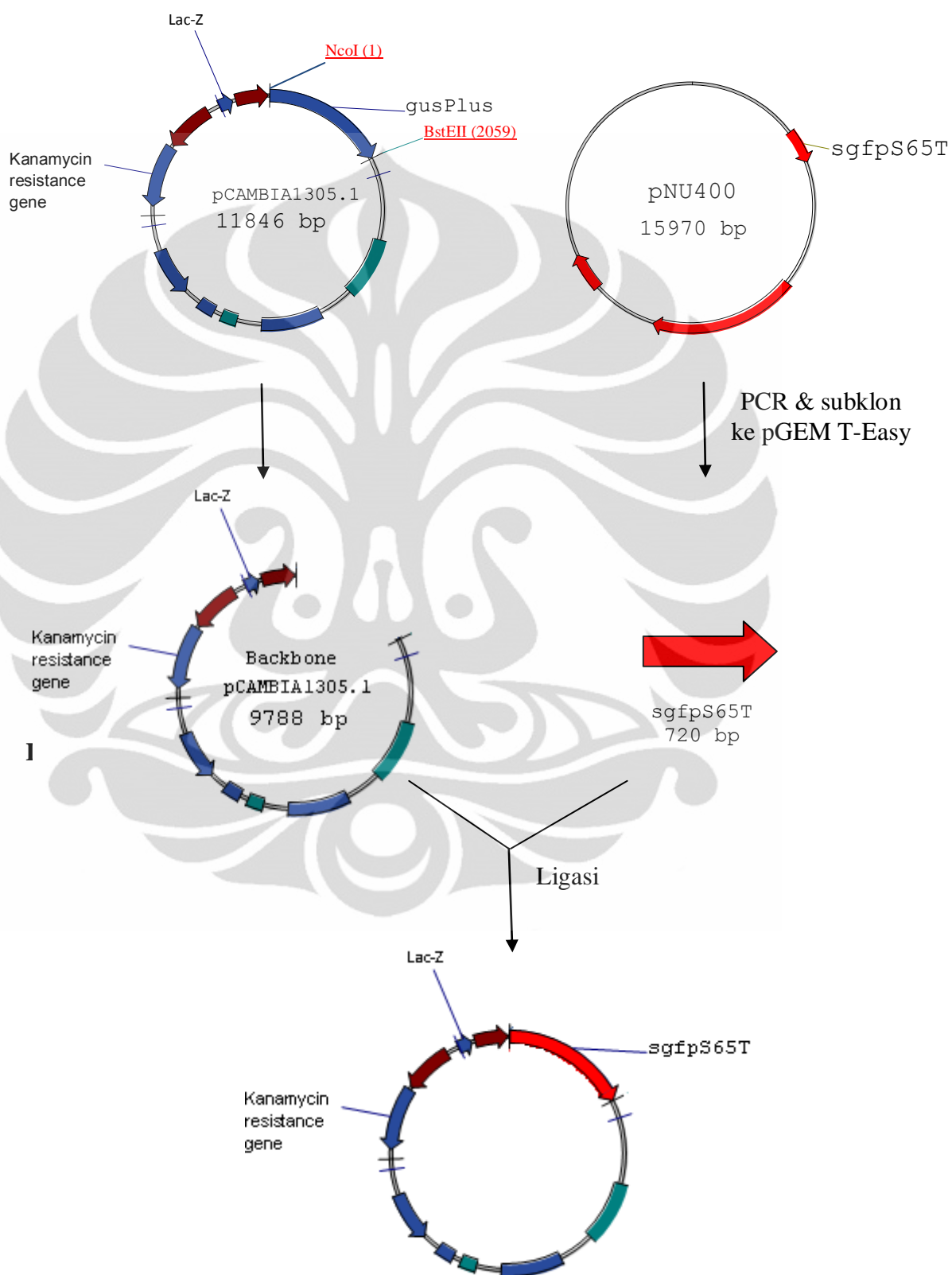
Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxxviii + 5.31 + 6.9 hlm.

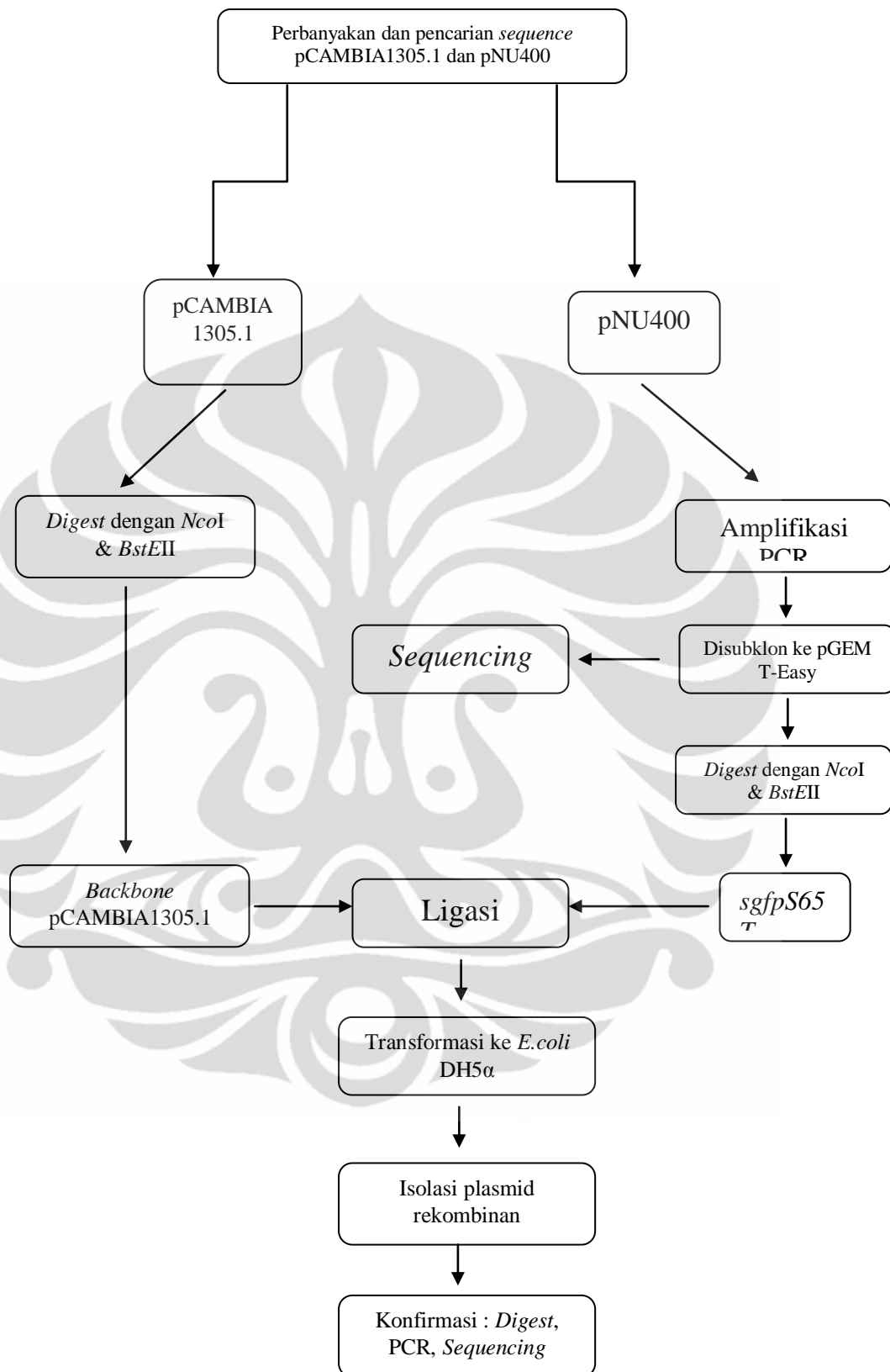
Sambrook, J. & D.W. Russel (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual, vol 1-3*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1-7.94 hlm.

Shimomura O et al. (1962). *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59 ; 223-239.

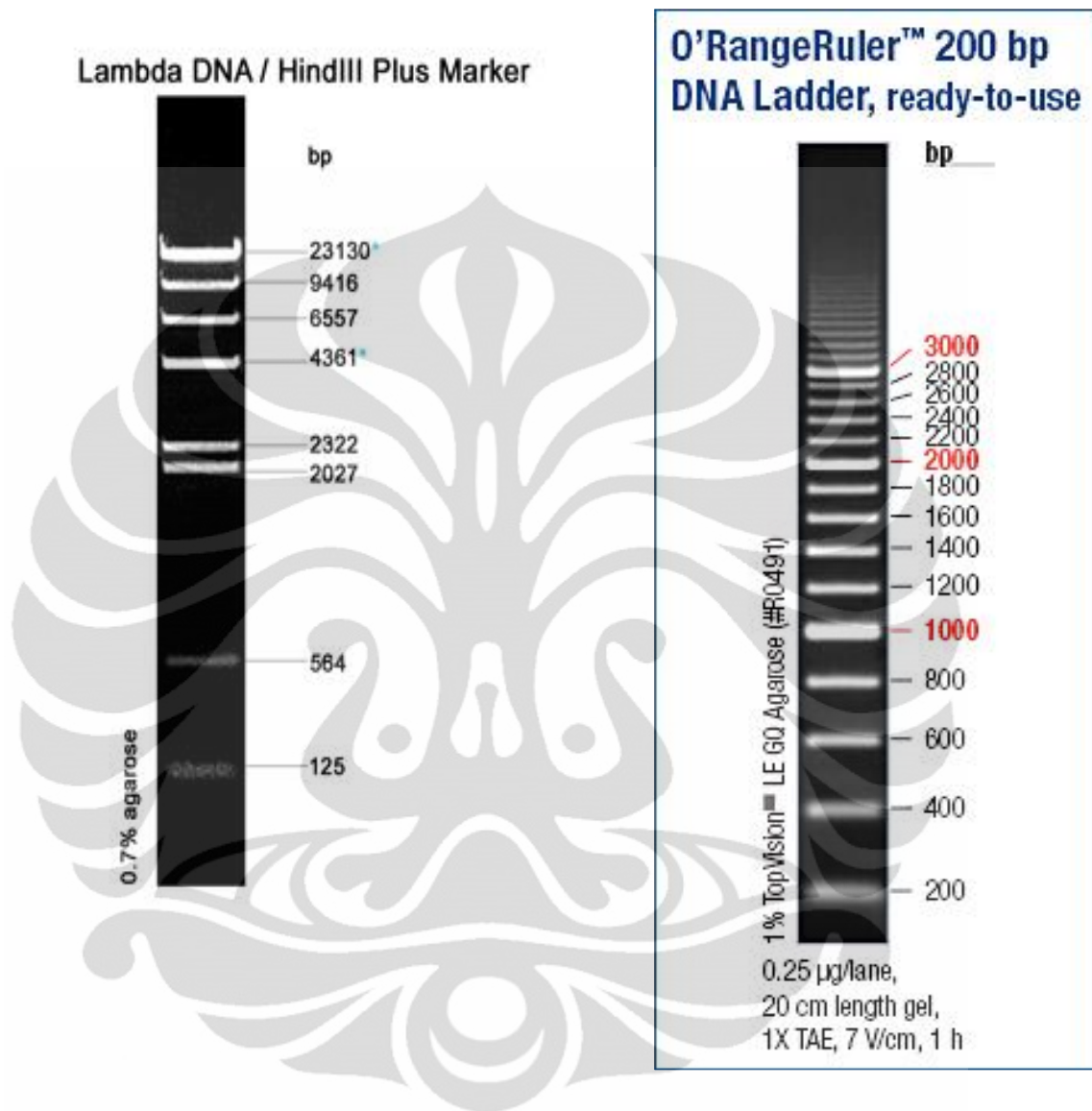
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. (2003). *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. xix + 840 hlm.
- Stanfield WD, Jaime SC, Raul JC. (1996). *Molecular and Cell Biology*. New York: Mc Graw-Hill.
- Stomp, AM. (1992). *Histochemical Localization of β -glucuronidase*. In: Sr. Gallagher (ed) *Gus Protocols: using the Gus gene as a reporter of gene expression*. London: Academic Press, Inc.
- Wolfe, S.L. (1995). *An introduction to cellular and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Wong, D.W.S. (1997). *The ABC of gene kloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Yuwono, T. (2005). *Biologi Molekular*. Erlangga: Jakarta.
- Yuwono, T. (2006). *Teori dan aplikasi: Polymerase chain reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta: viii + 239.

Lampiran 1. Skema konstruksi plasmid overekspresi gen *sgfpS65T* berbasis vektor binary pCAMBIA1305.1





Lampiran 3. Marker λ DNA/*Hind*III dan DNA ladder 200 bp



Lampiran 4. GeneBank Flat File Format pNU400

```

LOCUS       DQ225752                15970 bp    DNA    circular
SYN 14-JUL-2006
DEFINITION  Immobile Ac/T-DNA vector pNU400, complete sequence.
ACCESSION  DQ225752
VERSION    DQ225752.1  GI:81238239
KEYWORDS   .
SOURCE     Immobile Ac/T-DNA vector pNU400
ORGANISM   Immobile Ac/T-DNA vector pNU400
           other sequences; artificial sequences; vectors.
REFERENCE  1 (bases 1 to 15970)
AUTHORS    Upadhyaya,N.M., Zhu,Q.H., Zhou,X.R., Eamens,A.L.,
           Hoque,M.S.,Ramm,K., Shivakkumar,R., Smith,K.F.,
           Pan,S.T., Li,S., Peng,K., Kim,S.J. and Dennis,E.S.
TITLE      Dissociation (Ds) constructs, mapped Ds launch pads
           and a transiently-expressed transposase system
           suitable for localized insertional mutagenesis in rice
JOURNAL    Theor. Appl. Genet. 112 (7), 1326-1341 (2006)
PUBMED     16505997
REFERENCE  2 (bases 1 to 15970)
AUTHORS    Upadhyaya,N.M., Zhu,Q.-H., Zhou,X.-R., Eamens,A.L.,
           Dennis,E.S., Kim,S.J. and Ramm,K.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (29-SEP-2005) Rice Functional Genomics Group,
           Genomics and Plant Development Program, CSIRO Plant
           Industry, Cnr. Barry Drive and Clunies Ross Street,
           Canberra, ACT 2601, Australia
FEATURES   Location/Qualifiers
           source                1..15970
                                   /organism="Immobile Ac/T-DNA vector pNU400"
                                   /mol_type="other DNA"
                                   /db_xref="taxon:354258"
           gene                   2317..3036
                                   /gene="sgfps65T"
           CDS                   2317..3036
                                   /gene="sgfps65T"
                                   /note="from J. Sheen"
                                   /codon_start=1
                                   /product="modified green fluorescent protein
SGFPS65T"
                                   /protein_id="ABB59985.1"
                                   /db_xref="GI:81238240"

/translation="MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK
DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKN
GIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITHGMDELYK"
           gene                   5697..8774
                                   /gene="Ac"
           CDS
join(5697..5820,5928..7275,7347..8143,8233..8324,
      8712..8774)
                                   /gene="Ac"

```

```

/note="Ac Tpase"
/codon_start=1
/product="Ac transposase"
/protein_id="ABB59986.1"
/db_xref="GI:81238241"

```

```

/translation="MTPPVGNNPPSGSAIRLAKLMSTTRAPSTRKTNSVFSAYAQGLK
RKAEASSSRIQNVRARARGHGCGRTSPSSSTAEAEERHFIQSVSSSNANGTATDPSQDD
MAIVHEPQPQPQPQPEPQPQPQPEPEEEEEAPQKRAKKCTSDVWQHFTKKEIEVEVDGKK
YVQVWGHCNFPNCKAKYRAEGHHGTSGFRNHLRTSHSLVKGQLCLKSEKDHGKDINLI
EPYKYDEVVSLKKLHLAIIMHEYFPNIVEHEYFVEFVKSLRPHFPIKSRVTARKYIMD
LYLEEKEKLYGKLDVQSRFSTTMDMWTSCQNKSYMVCTIHWIDDDWCLQKRIVGFFH
VEGRHTGQRLSQTFTAIMVKWNIKLFALSLDNASANEVAVHDI IEDLQD TDSNLVC
DGAFFHVRCACHILNLVAKDGLAVIAGTIEKIKAIVLAVKSSPLQWEELMKCASECDL
DKSKGISYDVSTRWNSTYLMRLDALYYKPALIRLKTSDPRRYDAICPKAEWKMALTL
FKCLKKFFDLTELLSGTQYSTANLFYKGFCEIKDLIDQWCVHEKFVIRRMAMVAMSEKF
EKYWKVSNIALAVACFLDPYKILIEFYMKKFHGDSYKVHVDDFVRVIRKLYQFYSS
CSPSAPKTKTTTNDSDMDTLMENEDDEFQNYLHELKDYDQVESNELDKYMSEPLLKHS
GQFDILSWWRGRVAEYPILTQIARDVLAIQVSTVASESAFSAGGRVVDPYRNRLGSEI
VEALICTKDWVAASRKGATYFPTMIGDLEVLDSVIAAATNHENHMDDEDADAIEFSKNN

```

```

EDVASGSSP"
gene 6072..6380
/gene="cds_2"
CDS 6072..6380
/gene="cds_2"
/note="CDS2_Ac"
/codon_start=1
/product="unknown"
/protein_id="ABB59988.1"
/db_xref="GI:81238243"

```

```

/translation="MQMVQLQIRVKMIWLLFMNHNHNHNHNQNHNSHNLNPKKKHHR
RGQRSAHRMYGSISPRRKLKWRSMERNTRYGDIATFLIARLSIGLRVIMEQADFEIT
"

```

```

gene 10142..10936
/gene="nptII"
CDS 10142..10936
/gene="nptII"
/note="neomycin phosphotransferase"
/codon_start=1
/product="NPTII"
/protein_id="ABB59987.1"
/db_xref="GI:81238242"

```

```

/translation="MAKMRISPCLKKLIKRYCVKDTGEMSPAKVYKLVGENENLYLK

```

MTDSRYKGTTYDVEREKDMMMLWLEGKLPVFKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCSSEY

EDEQSPEKIIELYAECIRLRFHSIDISDCPYTNSLDSRLAELDYLLNNDLADVDCENWE

EDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKDGKVSFGFIDLGRSGRADKW

YDIAFCVRSIREDIGEEQYVELFFDLLGIKPDWEKIKYYILLDELFF"

```

1 gtttaccgc caatatatcc tgtcaaacac tgatagtta actgaaggcg ggaaacgaca
61 atctgatcca agctcaagct gctctagcat tcgccattca ggctgcgcaa ctggtgggaa
121 gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgcagctgg cgaaaggggg atgtgctgca
181 aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc
241 agtgccaagc ttgggctgca gtgcagcgtg acccggtcgt gcccctctct agagataatg
301 agcattgcat gtctaagtta taataaatta ccacatattt tttttgtcact actgttttga
361 agtgcagttt atctatcttt atacatata ttaaacttta ctctacgaat aatataatct
421 atagtactac aataatatca gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt
481 ctaaaggaca attgagtatt ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca
541 tgtgttctcc ttttttttg caaatagctt cacctatata atactctcact cactttatta
601 gtaecatcoat ttagggttta ggggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct
661 attttattct attttagcct ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat
721 ttaataattt agatataaaa tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct
781 ttaagaaatt aaaaaacta aggaaacatt tttctgttt cgagtagata atgccagcct
841 gttaaacgcc gtcgacgagt ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg
901 gccaaagcaa gcagacggca cggcatctct gtcgctgct ctggaccct ctgagagtt
961 ccgctccacc gttggacttg ctccgctgc ggcattcaga aattgctgg cggagcggca
1021 gacgtgagcc ggcacggcag gggcctctc cctcctctca cggcacggca gctacgggg
1081 attcctttcc caccgctctc tegettctcc ttctcggccc gccgtaataa atagacaacc
1141 cctccacacc ctctttcccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat
1201 ctccccaaa tccaccgctc ggcacctcgc ctcaaggta cgcgctcgt cctcccccc
1261 cccccctctc tacctctctc agatcggcgt tccggctcat ggttagggcc cggtagttct
1321 actctgttcc atgtttgtt tagatcctgt tttgtgttag atccgtcgt ctacgcttcg
1381 tacacggatg ccacctgtac gtcagacagc ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct
1441 ttggggaatc ctgggatggc tctagcctgt ccgcagacgg gatcagtttc atgatttttt
1501 ttgtttcgtt gcataggtt ttgtttgccc ttttcttta tttcaataa ttgcccgtac
1561 ttgtttctgc gtoatcttt tcatgctttt tttgtcttg gttgtgatga tgtgtgttg
1621 ttggcggtc gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggt ggatttatta
1681 attttgatc tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat
1741 ggaatatcgc atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag
1801 agatgctttt tgttcgctt gttgtgatga tgtgtgtgg ttggcggtc gttcattcgt
1861 tctagatcgg agtagaatac tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg
1921 tatgtgtgtg tcatacatct tcatagttac gagtttaaga tggatggaaa tatcagatca
1981 ggataggtat acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc
2041 actattcat atgctctaac cttagtacc tctctattat aataaacaag tagttttat
2101 aattatttt atottgatat acttgatga tggcatatgc agcagctata tgtggatfff
2161 tttagcctc ctttoatcgc ctatttattt gcttggtact gtttctttt tcgatgctca
2221 cctgtttgtt tgggtttact tctgcaggtc gactctagag gateccccggg taccgggcc
2281 cccctcagc tcgacggtat cgataagcct gatcccattg tgagcaaggc ctaggagctg
2341 ttaccggggg tgtgcccact cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc
2401 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagttcact
2461 tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgcctgg cccacctcgc tgaccacct cacctacggc
2521 gtgcagtgct tcagccgcta cccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc
2581 atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag
2641 accgcgccc aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc
2701 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcaaacgc tggagtacaa ctacaacagc
2761 cacaacgtct atatcatgac cgacaagcag aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc
2821 cgccacaaca tcgaggacgg gagcgtgcag ctgcgccgacc actaccagca gaacaccccc
2881 atcggcgacg gccccgtgct gctgccgac aacctacc tgagaccoca gtcccctc
2941 agcaaagacc ccaacgagaa gcgcatcacc atggctctgc tggagttcgt gaccgcggc
3001 gggatcactc acggcatgga cgagctgtac aagtaagcgg gccgcccggc tgcagatcgt
3061 tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgcccgtct tgcgatgatt
3121 atcatataat ttctgtttaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg
3181 ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta ataccgata
3241 gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgct atctatgta
3301 ctagatccga tgataagtc tcaaacatga gaattcctgc agcccgggg atccactaga
3361 aactgaagc gggaaacgac aatctgatcc aagctcaagc tgctctagca ttccgcatc
3421 agcgtgcgca actgttggga agggcgatc gtgcgggct ctctcctatt acgcccagct
3481 cgaaaaggg gatgtgctc aaggcgatta agttgggtaa cgcaggggt ttcccagtc
3541 gcacgttgta aaacgacgac cagtgcgaag cttgggctgc agtgacagct gaccggctc
3601 tgcccctctc tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt acccatatt
3661 tttttgtca cactgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata tttaaacttt

```


3721 actctacgaa taatataatc tatagtacta caataatadc agtgttttag agaatcatat
 3781 aaatgaacag tttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca ggactctaca
 3841 gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct tcacctatata
 3901 aatacttcat ccattttatt agtacaacca tttagggttt agggttaatg gtttttatag
 3961 actaattttt ttagtacatc ttttttattc ttttttagcc tctaaattaa gaaaactaaa
 4021 actctatttt agttttttta ttttaataatt tagatataaa atagaataaa ataaagtgc
 4081 taaaaattaa acaaatacc ttttaagaaat taaaaaaact aaggaacatc ttttctgtt
 4141 tcgagtagat aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgcagag tctaaccggac accaaccagc
 4201 gaaccagcag cgtcgcgctc ggccaagcga agcagacggc acggcatctc tgtcgtgccc
 4261 tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt cggcatccag
 4321 aaattgctgt gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggccgctcc tctctctctc
 4381 acggcacggc agctaccggg gattcccttc ccaccgctcc ttcgctttcc cttctcggc
 4441 cggcgaata aatagacacc cctccacac cctctttccc caacctcgtg ttgttcggag
 4501 cgcacacaca cacaaccaga tctcccccac atccaccctc cggcacctcc gcttcaaggt
 4561 acgcccgtcg tctccccccc cccccctctc ctacctctc tagatcggcg tcccggtcca
 4621 tggtagggc cggtagtgc tacttctggt catgtttgtg ttagatccgt gtttctgta
 4681 gatccgtgct gctagcgttc gtacacggat gcgacctgta cgtcagacac gttctgattg
 4741 ctaacttgcc agtgtttctc tttggggaat cctgggatgg ctctagccgt tcccgagacg
 4801 ggatcgattt catgattttt tttgtttcgt tgcatagggt ttgggttgcc ctttctctt
 4861 attcaatat atgcccgtca cttgtttgtc gggctacttt ttcagtcttt tttctcgtt
 4921 ggttgtgatg atgtggtctg gttgggctgt cgttctagat cggagtagaa tttctgttca
 4981 aactacctgg tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt gtgccataca tattcatagt
 5041 tacgaattga agatgatgga tggaaatadc gatctaggat aggtatacat gttgatgccc
 5101 gttttactga tgcataatac gagatgcttt ttgttctgct ggttgtgatg atgtggtgtg
 5161 gttgggctgt cgttcattcg ttctagatcg gagtagaata ctgtttcaaa ctacctggtg
 5221 tttttattaa ttttggact gtatgtgtgt gtcataatc ttcatagtta cgagtttaag
 5281 atggatgga atatcgatct aggatagga tacatgttga tgtgggtttt actgatgatc
 5341 atacatgatg gcatatgcag catctattca tatgctctaa ccttgagtac ctatctatta
 5401 taataaaca gtatgtttta taattatttt gatcttgata tacttgatg atggcatatg
 5461 cagcagctat atgtggattt ttttagccct gccctcatac gctatttatt tgcctgggtac
 5521 tgtttctttt gtcgatgctc accctgttgt ttgggtttac ttctgcaggt cgaactctaga
 5581 ggatcccggt gtaccgagct cttttacaac aattaccaac acaacaacaac acaacaacaac
 5641 attacaatta ctatttaca ttacaatgga atcgaggcta cgaactccatt cctcagatga
 5701 cgcctccggt tggaaataat cctccctcag gctcagccat aagattggcc aagttgatgt
 5761 ctaccacaag agcgccttct actcgcaaaa caaattccgt attctctgca tatgctcaag
 5821 gtatatatta gaaaaacagt agcaaatagca ttagcattac taattgggtg tagattggga
 5881 agcatcatat tgactgtaga ataatacga aaatctgttt ataacagggg tgaanaagaaa
 5941 agctgaagcc tcttctagtc ggattcagaa tgtacgtgca cgtgcccgtg ggcatggatg
 6001 tggccgcaca tcaccatcat catcaacagc tgaggccgag aggcattttta ttcagatgtg
 6061 aagcagtagt aatgcaaatg gtacagctac agatccgagt caagatgata tggctattgt
 6121 tcatgaacca caaccacaac cacaaccaca accagaacca caaccacagc cacaacctga
 6181 acccgaagaa gaagcaccac agaagagggc aaagaagtgc acatcggatg tatggcagca
 6241 tttcaceaa aggaaatttg aagtggaggt cgatggaaag aaatacgttc aggtatgggg
 6301 acattgcaac tttcctaatt goaaggctaa gtatagggtc gagggctatc atggaacaag
 6361 cggatttctga aatcacttga gaacatcaca tagtttagtt aaaggctcagt tgtgtctaaa
 6421 aagtgaana agatcatgga aagacataaa tctcatgtag ccttataagt acgatgaagt
 6481 ggttagccta aagaagcttc atttggcaat aatcatgcat gaatatacct tcaatattgt
 6541 agaacatgag tactttgttg agtttgtaa gtctctgccc cctcaacttt caataaagtc
 6601 cogtgcact gctagaaaat atatcatgga tttgtatttg gaagaaaag aaaagttgta
 6661 tggaaaacta aaagatgttc agtctcgtt cagtacaact atggatagtg ggacatcttg
 6721 tcaaaaataag tcatacatgt gtgtcaccat ccattggatt gatgatgatt ggtgtctcca
 6781 aaaaagaatt gttggctttt ttcattgtga agggcccacc actggccaaa ggttatcaca
 6841 acccttcaact gcaatcatgg ttaagtggaa cattgagaaa aaattgtttg ccttctctt
 6901 ggataatgct agtgcaaatg aagttagctgt gcacgatata attgaggatt tgcaggacac
 6961 tgattcaaat ctagtttgtg atggtgcttt ctttcatggt aggtgtgctt gtcacatact
 7021 gaacttggtt gcaaaggatg gcttggctgt aattgcagga acaattgaga aaatcaaagc
 7081 gattgttctt gctgtaaaat cttctccttt gcagtgaggaa gaactaatga agtgtgctag
 7141 tgaatgtgac ttggataaat ctaaagggat ctcatatgat gtctcaacta gatggaattc
 7201 aacctatttg atgttgaggg atgccttata ttataagcct gcactaataa ggcttaaaac
 7261 aagtgatcct cgcaggtagt tttgtctcaa ttgtttgata tgtcatcatt ataaattctc
 7321 aattaatcaa atgtcaatta ttgtaggtac gatgcaattt gtcctaagc cgaggatgg
 7381 aagatggcat taactctttt taagtgtttg aagaagtttt ttgatctcac tgaactccta
 7441 tctggtagtc aatattccac tgcaaaattt ttttacaag gtttctgtga gataaaggat
 7501 ttgattgacc aatggtgtgt tcatgaaaaa tttgtcatta ggagaatggc cgttgcaatg
 7561 agtgaaaaag ttgagaaaaa ttggaagatg tctaataattg cactagctgt agcatgctc
 7621 cttgacccta ggtacaagaa aatattgatt gagttctata tgaaaaaatt tcatggtgat
 7681 tcatacaaaag ttcattgtaga tgactttggt agggctatta gaaaattgta tcaattctat
 7741 tctagttgta gtccttcagc tccaaagaca aagacaacta ctaatgatag tatggatgat
 7801 accttgatgg aaaatgaaga tgatgaattt caaaaactatt tgcagatgag taaggattat
 7861 gatcaagtag agtcaaatga attggataaa tatatgtctg aacctctttt gaagcatagt
 7921 ggtcagtttg atattttatc atggtggagg ggaaggggtg cagaatatcc tattctcacc
 7981 caaattgcaa gggatgtgct agcaatacaa gtgtcaactg ttgcttctga gctctgcttc
 8041 agtgcctgtg gtcgtgttgt tgactcttac cgcaatcgtc ttggttcgga gatgttgaa
 8101 gctttgatata gcacaaaaa ttgggttagca gcatctagaa aaggtgaatg catatattgt

8161 ataataaagt tccaatttat agttattcaa caattatfff acttatattg atgcatatff
 8221 gtgtcattca aggtgctaca tttttccaa caatgattgg tgatctcgag gtgctagact
 8281 ctgttattgc tgctgcaaca aatcatgaga atcatatgga tgaggattff aaagattatt
 8341 atttacttcg tgcattggct attaatttgc tattattcac tactgttttg atgcatgggc
 8401 tgtttgctgt cgccttgttt tgatgcatgc gccttgctgc ccagccgtgt tatactccct
 8461 gcatggctgg cattaacaga tttttgatct cactgcatgc gccttgctgc cttgttttga
 8521 ttggctgcta gctgctagct gttaggctcc cagctgttag gcgctagctg cttagctgct
 8581 agctcccagc cgtgttagtt cacagattca tgtttccta tatgtattta ttttacttcc
 8641 ctgcataca attcatgttc ttctatatgt atttatttat ccaaaactga cttatttttg
 8701 tgtattaaca ggaatgaagc gcaatagaat tttctaagaa taatgaagat gtagcaagtg
 8761 gctcctctcc atgagcaatg tgtcttatgt ttgttgacag atgagccttg gttgtaaatg
 8821 tttatgcatg ctaagtgatc cagatgtgag caagtgatta tgaatatgtg ttttaactt
 8881 tatattgtgt catgtgtgct agtagactta tatggcttct tatgttagcc aagagcccaa
 8941 gacttatcac ttatgtgcta cattaaacta tgtgtgctcc agatttatat ggattttatc
 9001 tatgtttaat taagacttgt gtttacaatt tttttatatt gtttttaagt tttgaaata
 9061 tgttttcatg tgtgatttta cgaacaaaa ataccggttc ccgctccgatt ttttacttaa
 9121 cccgaccgga tctgatcggg tttcgattac cgtatttacc ccgcttctgt tcgttaccgg
 9181 tatacccgt tttcgtttcc gtcccgaag ttaaatatga aaatgaaaac ggtagaggta
 9241 ttttaccgac cgttaccgac cgttttctac cctagcgtga cccggccgag cgggggatcc
 9301 cccgggctgc aggaattcga tatcaagcct atcgataccg tcgacctoga gggggggccc
 9361 ggtaccaccg tttgttctcc tttagtggg gtttaattta tacgactcac tataggggga
 9421 attggagctc gaatttccag tttctccata ataattgtgt agtagttccc agataaggga
 9481 attagggttc ctatagggtt ctgctcatgt gttgagcata taagaaacc ttagtatgta
 9541 tttgtatttg taaaatactt ctatcaataa aatttctaat tctaaaacc aaaaactcagt
 9601 actaaaatcc agatccccg aattaattcg gcgttaattc agtacattaa aaactcagc
 9661 aatgtgttat taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgccacca
 9721 gccagccaac agctcccga cccgagctc ggcacaaaat caccactcga tacaggcagc
 9781 ccatacagtc gggacggcgt cagcgggaga gccgttgtaa ggcggcagac tttgctcatg
 9841 ttaccgatgc tattcggaa gacggcaact aagctgccc gtttgaaca cggatgatct
 9901 cccggagggt agcatgttga ttgtaacgat gacagagcgt tgcctgctgt gatcacccg
 9961 gtttcaaaat cggctccgtc gatactatgt tatacgcmaa ctttgaana aactttgaaa
 10021 aagctgtttt ctggtattta agtttttaga atgcaaggaa cagtgaattg gagttcgtct
 10081 tgttataatt agcttcttgg ggtatcttta aatactgtag aaaagaggaa ggaataata
 10141 aatggctaaa atgagaatat caccggaatt gaaaaaactg atcgaaaaat acccgtgctg
 10201 aaaagatagc gaaggaatgt ctctgtctaa ggtatataag ctgggtggag aaaatgaaa
 10261 ccttatatta aaaaatgacg acagccgcta taaggggacc acctatgatg ttgaaacggg
 10321 aaaggacatg atgctatggc tggaaaggaa gctgctgtt ccaaaggctc tgcactttga
 10381 accgcatgat ggtgagca atctgctcat gaggtaggac gatggcgtcc tttgctcggg
 10441 agagtatgaa gatgaacaaa gccctgaaa gattatcgag ctgtatgagg agtgcatcag
 10501 gctctttcac tccatcgaca tatcgatttg tccctatagc aatagcttag acagccgctg
 10561 agccgaattg gattacttac tgaataacga tctggccgat gttgattgag aaaactggga
 10621 agaagacact ccatttaaag atccgcccga cctgtatgat tttttaaaga cggaaaagcc
 10681 cgaagaggaa ctgtctttt cccacggcga cctgggagac agcaacatct tttgaaaga
 10741 tggcaaaagta agtggcttta ttgactttgg gagaagcggc agggcggaca agtggatga
 10801 cattgcttcc tgcgtccggt cgtatcaggga ggatactggg gaagaacagt atgtcgagct
 10861 attttttgac ttactgggga tcaagcctga ttgggagaaa ataaaatatt atattttact
 10921 ggatgaattg ttttagtacc tagaatgcat gaccaaact ccttaacgtg agttttcgtt
 10981 ccaactgagc tcagaccctg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttctttct
 11041 ggcgtaatc tgcgtcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc
 11101 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc
 11161 aaatactgtc ctctatgtgt agcctagtt agggccaccac tccaagaact ctgtagcacc
 11221 gcctacatac ctgctctgc taactctgtt accagtggct gctgcccagt gcgataagtc
 11281 gtgtcttacc ggtttggcgc caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg
 11341 aacggggggt tctgtcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata
 11401 cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac ccttcccga gggagaaagg cggacaggta
 11461 tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgag gagcttccag ggggaaacgc
 11521 ctggtatctt tatagctctg tccggttctg ccacctctga cttgagcgtc gattttgtg
 11581 atgctcgtca ggggggagg gacctatgaa aaacgcagc aacgcggcct ttttacggtt
 11641 cctggccttt tgcctggcct ttgctcacat gttcttctct gcgttatccc ctgattctgt
 11701 ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagacc gaacgaccga
 11761 gcgcagcagc tcagtgaagc aggaagcggg agagcgcctg atgcggtatt tctctcttac
 11821 gcatctgtgc ggtatttcc accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc
 11881 ccatatgata agccagatata cactccgcta tgcctactgt actgggtcat ggctcgcgcc
 11941 cgacaccgac caacaccgct tgacgcgccc tgacgggctt gctgctccc ggcattccgct
 12001 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca
 12061 ccgaaacgag cgaggcaggg tgccttgatg tgggcgccc ggttcgagtg ggcagggcgc
 12121 ggcttctccg cgccttggtg gattgctggt ccgtagggca gccatttttg agcggccagc
 12181 ggcgagata ggcgagcgg aagcggcggg ccgtagggag cgcagcagcc gaagggtagg
 12241 agctttttgc agctcttccg ctgctcgtg gccagacagt tatgacagag caggcgggt
 12301 ttaagagtt ttaataagtt ttaagagtt ttaggcggaa aaatcgcctt ttttctctt
 12361 tatatcagtc acttaccatgt gtgaccggtt cccaatgtac ggctttgggt tcccattgta
 12421 cgggttccg tcccattgt acggctttg gttcccaatg tacgtgctat cccagggaa
 12481 gagacccttt cgacctttt cccctgctag ggcaatttgc cctagcatct gctccgta
 12541 ttaggaaccg gcggatgctt cgcctctgat cagggttggg tagcgcata ctaggatcgg

```

12601 gccagcctgc cccgcctcct cttcaaatc gtactccggc aggtcatttg acccgatcag
12661 cttgcgcacg gtgaaacaga acttcttgaa ctctccggcg ctgccactgc gttcgtatagat
12721 cgtcttgaac aaccatctgg cttctgcctt gcctgcggcg cggcgtgcca ggcggtagag
12781 aaaaacggccg atgccgggat cgatcaaaaa gtaatcgggg tgaaccgtca gcacgtccgg
12841 gttcttgctt tctgtgatct cgcggtacat ccaatcagct agctcgatct cgatgtactc
12901 cggccgcccg gtttcgctct ttacgatctt gtagcggcta atcaaggctt caccctcgga
12961 taccgtcacc aggcggccgt tcttggcctt cttcgtacgc tgcattggca cgtgctgggt
13021 gtttaaccga atgcaggttt ctaccaggtc gtotttctgc tttccgccat cggctcggcg
13081 gcagaacttg agtacgtccg caacgtgtgg acggaacacg cggccgggct tgtctccctt
13141 cccttcccgg tatcggttca tggattcggg tagatgggaa accgccatca gtaccaggtc
13201 gtaatcccac aactggcca tgccggccgg ccctgcggaa acctctactg gcccgctctgg
13261 aagctcgtag cggatcacct cgccagctcg tcggtaacgc ttcgacagac ggaaaacggc
13321 cacgtccatg atgctgcgac tatcgcgggt gccacgtca tagagcatcg gaacgaaaaa
13381 atctgggtgc tcgtcgcctt tggcggcctt cctaactcgc ggcgcaccgg ctgccggcgg
13441 ttgccgggat tctttgcgga ttcgatecgc ggccgcttgc caccgattcac cggggcgtgc
13501 tttgcctcgc atcgtttgce gctggggcggc ctgcccggcc tcaactctt ccaccaggtc
13561 atcaccacgc gccggccgca tttgtaccgg gccggatggt ttgcccaccg cacgcccatt
13621 cctcgggctt gggggttcca gtgccattgc agggccggca gacaaccacg ccgcttacgc
13681 ctggccaacc gcccgcttct ccacacatgg ggcattccac ggcgtcgggt cctggttgtt
13741 cttgatttcc catgcccgtt ctttagcccg cttaaatcca tctactcatt tattcatttg
13801 ctcatttact ctggtagctg cgcgatgtat tcagatagca gctcggtaat ggtcttgcct
13861 tggcgtaccg cgtacatctt cagcttgggt tgatcctccg ccggcaactg aaagttgacc
13921 cgttccatgg ctggcgtgtc tgccaggctg gccaacgttg cagccttctg gctgcgtgcg
13981 ctccggacgc cggcacttag cgtggtttgtg cttttgctca ttttctctt acctcattaa
14041 ctcaaatgag ttttgattta atttcagcgg ccagcgcctg gaectcggg gcagcgtcgc
14101 cctcgggttc tgattcaaga acggttctgc cggcggcggc agtgccctgg tagctcacgc
14161 gctgcgtgat acgggaactca agaattggca gctcgtaccg gccacgcgc tcggcaacct
14221 caccgccgat gcgcgtgcct ttgatcgcgc gcgacacgac aaaggccgct tctagcctt
14281 catccgtgac ctcaatgcgc tgettaacca gctccaccag gtcggcgggt gcccatatgt
14341 cgttaagggt tggtgcacc ggaatcagca cgaagtccgc tgccttgatc gcggacacag
14401 ccaagtcgcg ccctcggggc gctccgtcga tcaactcaga gtcgcgcggc ccgatggcct
14461 tcacgtcgcg gtaaatcgtc gactgcctt ggggategga atcgactaac agaacatcgg
14521 geacggccgc ccaatcgcgg gactgcctt ggggategga atcgactaac agaacatcgg
14581 ccccgccgag ttgcagggcg cgggctagat ggggttcgat ggtcgtcttg cctgaccgcg
14641 ctttctggtt aagtacagcg ataaacctca tgcgctcccc ttgcgtattt gtttatttac
14701 tcatcgcatc atatacgca cgaccgcatg acgcaagctg ttttaetcaa atcacatca
14761 cttttttaga cggcggcgtc cgttttctt agcggccaag ctggccggcc aggcgccag
14821 cttggcatca gacaaaaccg ccaggatctt atgcagccg acggttgaga cgtgcgcggg
14881 cggctcgaac acgtaccggc ccgcgatcat ctccgcctcg atctcttgg taatgaaaaa
14941 cgttctgctc tggccgtcct ggtgcggttt catgettgtt cctcttggcg ttcattctcg
15001 gggccgcca gggcgtcggc ctcggtcaat cgcgtctcac ggaaggcacc gcgcgcctg
15061 gcctcgggtg gcgtcaactt ctgcgtgcgc tcaagtgcgc ggtacagggc cgagcgtatg
15121 acgccaagca gtgcagccgc ctctttcaag gtgcggcctt cctggtgatc cagctcggcg
15181 ggtgcgcgca tctgtgcggc ggtgagggtg gggcgggggc caaactcac gcctcgggcc
15241 ttggcggcct cgcgcccgct ccgggtcggc tcgatgatta gggaaacgctc gaactcggca
15301 atgcgggca acacggtoaa caccatgcgg ccggccggcg tgggtggtgc ggcccacggc
15361 tctgccaggc tacgcaggcc cgcgcgggcc tccctggatgc gctcggcaat gtccagtagg
15421 tcgcgggtgc tcgcggccag gcggtctagc ctggtcactg tcacaacgct gccagggcgt
15481 aggtggtcaa geatcctggc cagctccggg cggctcggcc tgggtcgggt gatcttctcg
15541 gaaaacagct tgggtcagcc gccgcgtgc agttcggccc gttggttgg caagtcctgg
15601 tcgtcgggtc tgacgcgggc atagccagc agggccagcg cggcgtctt gttcatggcg
15661 taatgtctcc ggttctagtc goaagtattc tactttatgc gactaaaaca cgcgacaaga
15721 aaacgccagg aaaagggcag ggccggcagc tgtcgcgtaa cttaggactt gtcgacatg
15781 tcgttttcag aagacggctg cactgaacgt cagaagccga ctgcactata gcagcggagg
15841 ggttgatca aagtactttg atcccaggg gaaccctgtg gttggcatgc acatacaaat
15901 ggacgaacg ataaacctt tcacgcctt taaatatcc gttattctaa taacgctct
15961 tttctcttag

```

//

Lampiran 5. GeneBank Flat File Format pCAMBIA1305.1

```

LOCUS       AF354045                      11846 bp    DNA     circular
SYN 16-APR-2001
DEFINITION Binary vector pCAMBIA-1305.1, complete sequence.
ACCESSION  AF354045
VERSION    AF354045.1  GI:13540346
KEYWORDS   .
SOURCE     Binary vector pCAMBIA-1305.1
ORGANISM   Binary vector pCAMBIA-1305.1
           other sequences; artificial sequences; vectors.
REFERENCE  1 (bases 1 to 11846)
AUTHORS    Jefferson,R.A., Kilian,A. and Keese,P.K.
TITLE      Microbial genes for secreted beta-glucuronidases, gene
           products and uses thereof
JOURNAL    Patent: PCT (PCT/US98/19217)-A 09-SEP-1998;
           CAMBIA; Molecular Technologies; Canberra;
           Australia;
REFERENCE  2 (bases 1 to 11846)
AUTHORS    Nguyen,T.A. and Jefferson,R.A.
TITLE      Binary vector pCAMBIA-1305.1
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  3 (bases 1 to 11846)
AUTHORS    Nguyen,T.A. and Jefferson,R.A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (13-FEB-2001) Molecular Technologies,
           CAMBIA, GPO Box 3200, Canberra, ACT 2601, Australia

FEATURES   Location/Qualifiers
           source                1..11846
                                   /organism="Binary vector pCAMBIA-1305.1"
                                   /mol_type="genomic DNA"
                                   /db_xref="taxon:156490"
                                   /join(2..16,207..2054)
                                   /note="GUSPlus-His6"
                                   /codon_start=1
                                   /transl_table=11
                                   /product="beta-glucuronidase"
                                   /protein_id="AAK29426.1"
                                   /db_xref="GI:13540350"

           CDS
           1..11846
           /translation="MVDLRNRRTSLYPINTETRGVFDLNGVWNFKLDYGKGGLEEKWYE
           SKLTDTISMAVPSSYNDIGVTKEIRNHIGYVWYEREFVTPAYLKDQRIVLRFGSATHK
           AIVYVNGELVVEHKGGFLPFEAIEINNSLRDGMNRVTVAVDNILDDSTLPVGLYSERHE
           EGLGKVI RNKPNFDFFFNYAGLHRPVKIYTTPTFTYVEDISVVTDFNGPTGTVTYTVDFQ
           GKAETVKVSVVDEEGKV VASTEGLSGNVEIPNVILWEPLNTYLYQIKVELVNDGLTID
           VYEEFPGVRTVEVNDGKFLINNKPFYFKGFGKHEDTPINGRGFNEASNVMDFNILKWI
           GANSFRTAHYPYSEELMRLADREGLVVIDETPAVGVHLNFMAT TGLGEGSERVSTWEK
           IRTFEHHQDVLRELVSRDKNHPSVVMWSIANEAATEEEGAYEYFKPLVELTKELDPQK
           RPVTIVL FVMATPETDKVAELIDVIALNRYNGWYFDGGDLEAAKVHLRQEFHAWNKRC

```

```

PGKPIMITEYGADTVAGFHDIDPVMFTEEYQVEYYQANHVVDFEFENFVGEQAWNFAD
FATSQGVMRVQGNKKGVFTRDRKPKLAAHVFRERWTNIPDFGYKNASHHHHHHV"
  intron          17..206
                    /note="catalase intron"
  polyA signal   2083..2335
                    /note="poly(A) signal from nopaline synthase"
  misc feature   2354..2378
                    /note="T-DNA right border"
  misc feature   3439..4439
                    /note="sta region from pVS1 plasmid"
  rep origin     5032..6032
                    /note="pVS1 rep"
  misc feature   6442..6702
                    /note="pBR322 bom site"
  rep origin     6842..7122
                    /note="pBR322 ori"
  CDS            complement(7413..8207)
                    /note="kanamycin resistance gene"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="neomycin phosphotransferase"
                    /protein_id="AAK29424.1"
                    /db_xref="GI:13540348"

/translation="MAKMRISPELKKLIEKYRCVKDTEGMSPAKVYKLVGENENLYLK
MTDSRYKGTTYDVEREKDMMLWLEGLPVPKVLHFERHDGWSNLLMSEADGVLCSEEY
EDEQSPEKIIELYAECIRLFHSIDISDCPYTNSLDSRLAELDYLLNNDLADVDCENWE
EDTPFKDPRELYDFLKTEKPEEELVFSHGDLGDSNIFVKDGKVSGFIDLGRSGRADKW
YDIAFCVRSIREDIGEEQYVELFFDLLGIKPDWEKIKYYILLDELF"
  misc feature   8632..8657
                    /note="T-DNA left border"
  polyA site     8798..8805
  CDS            complement(8948..9973)
                    /note="hygromycin resistance gene"
                    /codon_start=1
                    /transl_table=11
                    /product="hygromycin phosphotransferase"
                    /protein_id="AAK29425.1"
                    /db_xref="GI:13540349"

/translation="MKKPELTATSVEKFLIEKFDSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGR
GYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPPEVLDIGEFSESLTYCISRRAQGVTLQD
LPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSGFGPFGPQGIGQYTTWRDFICAIADPHVY
HWQTVMDDTVSASVAQALDELMLWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTDNGRITAVIDWS
EAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSPRLRAYMLRIGLDQLYQ
SLVDGNFDDAAWAQGRCDAIVRSGAGTVGRTQIARRSAAVWTDGCVEVLADSGNRRPS
TRPRAKK"

```

promoter complement(10009..10816)
/note="CaMV35Sx2; CaMV35S eukaryotic promoter
With duplicated enhancer region"

promoter 10938..11018
/note="PlacZ prokaryotic promoter"

CDS 11019..11252
/note="beta-galactosidase alpha fragment"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="lacZ alpha fragment"
/protein_id="[AAK29423.1](#)"
/db_xref="GI:13540347"

/translation="MTMITNSSSVPGDPLESTCRHASLALAVVLQRRDWENPGVTQLN
RLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEC"

misc feature 11033..11089
/note="pUC18 polylinker multiple cloning
site"

promoter 11303..11840
/note="CaMV35S eukaryotic promoter"

ORIGIN

```

1  catgtagat ctgagggtaa atttctagtt tttctccttc attttcttgg ttaggaccc
61  ttctctttt tattttttt agctttgatc tttctttaa ctgatctatt ttttaattga
121 ttggttatgg tgtaaatatt acatagcttt aactgataat ctgattactt tatttcgtgt
181 gtctatgatg atgatgatag ttacagaacc gacgaactag tctgtaccgc atcaacaccg
241 agaccctggc cgtcttcgac ctcaatggcg tctggaactt caagctggac tacgggaaag
301 gactggaaga gaagtgttac gaaagcaagc tgaccgacac tattagtatg gcgctcccaa
361 gcagttacaa tgacattggc gtgaccaagg aaatccgcaa ccatatcgga tatgtctggt
421 acgaacgtga gttcacggtg cggcctatc tgaaggatca gcgtatcgtg ctccgcttcg
481 gtctcgcaac tcacaaagca attgtctatg tcaatggatg gctgtcctgt gagcacaagg
541 ggggattcct gccattcgaa ggggaaatca acaactcgtc gcgtgatggc atgaatcgcg
601 tcaccgtcgc cgtggacaac atcctcgacg atagcaacct ccggttgggg ctgtacagcg
661 agcgcacaga agagggcctc ggaaaagtca ttogtaacaa gccgaacttc gacttcttca
721 actatgcagg cctgcaccgt ccggtgaaaa tctacacgac ccggttaccg tacgtcgagg
781 acatctcggg tgtgaccgac ttcaatggcc caaccgggac tgtgacctat acggtggact
841 tcaaggcaaa agccgagacc gtgaaaagtgt cggctcgtgga tgaggaaggc aaagtgtgtg
901 caagcaccga gggcctgagc ggtaacgtgg agattccgaa tgteatcctc tgggaaccac
961 tgaacacgta tctctaccag atcaaatggg aactggtgaa cgacggactg acctcgtatg
1021 tctatgaaga gccgttcggc gtgcccagcc tggaagtcaa cgaaggcaag ttctctcatca
1081 acaacaacc gttctacttc aaggcctttg gcaaacatga ggacactcct atcaaccggc
1141 gtggctttaa cgaagcgagc aatgtgatgg atttcaatat cctcaaatgg atcggcgcca
1201 acagcttcgc gaccgcacac tatecgtact ctgaagagtt gatgcgtctt ggggatcgcg
1261 aggtctctgt cgtgatcgac gagactccgg cagtttgggt gcaactcaac ttcatggcca
1321 ccacgggact cgcggaaggc agcgagcgcg agcgagcgcg tcagtacctg ggagaagatt cggacgtttg
1381 agcaceatca agacgttctc cgtgaaactg tgtctcgtga caagaacctt ccaagcgtcg
1441 tgatgtggag catcgccaac gaggcggcga ctgaggaaga gggcgcgtac gactacttca
1501 agccgtttgt ggagctgacc aaggaactcg acccacagaa gcgtccggtc acgatcgtgc
1561 tgtttgtgat ggctaccocg gagacggaca aagtccgcca actgattgac gtcacgcgcg
1621 tcaatcgcta taacggatgg tacttcgatg gcggtgatct cgaagcggcc aaagtccatc
1681 tccgccagga atttaccgcg tgaacaagc gttgccaggc aaagccgatc atgatcactg
1741 agtacggcgc agacaccggt cggggcttcc acgacattga tccagtgatg ttcaccgagg
1801 aatatcaagt cgagtactac caggcgaacc acgtcgtggt cgatgagttt gagaacttcg
1861 tgggtgagca agcgtggaac ttccgaggact tcgcaacctc tcaggcgtg atgcgcgtcc
1921 aaggaaacaa gaagggcgtg ttactcgtg accgcaagcc gaagctcgcc ggcacagtct
1981 ttccgagcgc ctggaccaac attccagatt tcgggtacaa gaacgctagc catcaccatc
2041 accatcacgt gtgaattggt gaccagctcg aatttccccg atcgttcaaa catttggcaa
2101 taaagtttct taagattgaa tctgtttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg
2161 ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg
2221 gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag
2281 cgcgcaaac aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgggaatta
2341 aactatcagt gtttgacagg ataatattggc gggtaaacct aagagaaaaag agcgtttatt
2401 agaataacgg atatttaaaa gggcgtgaaa aggtttatcc gttcgtccat ttgtatgtgc
2461 atgccaacca cagggttccc ctccggatca aagtactttg atccaacccc tccgctgcta
2521 tagtgcagtc gcttctgac gttcagtgca ccgctcttct gaaaacgaca tgtcgcacaa
2581 gtccataagtt acgagacagg ctgccgcctt gcccttttcc tggcgttttc ttgtcgcgtg
2641 ttttagtcgc ataaagtaga atacttgcca ctagaaccgg agacattacg ccatgaacaa
2701 gagcgcgccc gctggcctgc tgggctatgc ccgcgtcagc accgacgacc aggacttgac
2761 caaccaacgg gccgaactgc acgcccggcg ctgcaccaag ctgttttccg agaagatcac

```

2821 cggcaccagg cgcgaccgcc cggagctggc caggatgctt gaccacctac gccctggcga
 2881 cgttgtgaca gtgaccaggc tagaccgcct ggccccgagc acccgcgacc tactggacat
 2941 tgccgagcgc atccaggagg cggcgcgagg cctgctgtagc ctggcagagc cgtggggcga
 3001 caccaccacg ccggcgcggc gcatggtggt gaccgtgttc gccggcattg ccgagttcga
 3061 gcgttccta atcatcgacc gcacccggag cgggcgcgag gccgccaagg cccgagggct
 3121 gaagtttggc ccccgcccta cctcaccgcc ggcacagatc gcgcaacgccc gcgagctgat
 3181 cgaccaggaa ggccgcaccg tgaagaggc ggctgactg cttggcgctgc atcgctcgac
 3241 cctgtaccgc gcaactgagc gcagcgagga agtgacgccc accgaggcca ggcgctcgcg
 3301 tgcttccgt gaggacgat tgaccgagg cgacgcctg gccggccgccc agaatgaacg
 3361 ccaagaggaa caagcatgaa accgcaccag gacggccagg acgaaccggt ttctattacc
 3421 gaagagatcg aggcggagat gatcgcggcc ggttacgtgt tcgagccgccc cgcgcacgtc
 3481 tcaaccgtgc ggctgcatga aatcctggcc ggtttgtctg atgccaagct ggccgctcgg
 3541 ccggccagct tggccgctga agaaaccgag cgccgcccgc taaaaagggt atgtgtatct
 3601 gagtataaca gcttgcgcca tgcggctcgt cgcgtatatga tgcgatgagt aaataaaca
 3661 atacgcaagg ggaacgcgat aaggttatc ctgtacttaa ccagaaaggc gggctcaggca
 3721 agacgacat cgcaaccat ctaccccgcc cctgcaact cgccggggcc ggctgtcgtg
 3781 tagtcatcgc cgatcccccag ggcagtgcgc gcgattgggc ggccgtgccc gaagatcaac
 3841 cgtaaccgt tgcggcctc gaccgcccga cgattgacc cgacgtgaag gccatcggcc
 3901 ggcgcgactt cgtagtgat gacggagcgc cccaggcggc ggacttggct gtgtccgca
 3961 tcaaggcagc cgacttcgtg ctgattccgg tgcagccaag cccttacgac atatgggcca
 4021 ccgcccagct ggtggagctg gtaagcagc gcattgaggt cacggatgga aggctacaag
 4081 cggcctttgt cgtgtcggcg gcgatcaaa gcaacgcat cgccgctgag gttcggcagg
 4141 cgctggccgg gtacgagctg cccattcttg agtcccgat cacgcagcgc gtgagctacc
 4201 caggcaactg ccgcccggc acaaccgttc ttgaatcaga acccgaggcc gcagctgccc
 4261 gcgaggtcca ggcgctggcc gctgaaatta aatcaaaact ctttgaggt aatgaggtaa
 4321 agagaaaatg agcaaaaaca caaacacgct aagtgcggcc cgtccgagcg cacgcagcag
 4381 caaggtgca acgttggcca gcctggcaga cacgccagcc atgaagcggg tcaactttca
 4441 gttgcccggc gaggatcaca ccaagctgaa gatgtacgcg gtacgccaag gcaagaccat
 4501 taccgagctg ctatctgaat acatcgcgca gctaccagag taaatgagca aatgaataaa
 4561 tgagtagatg aatcttagcg gctaaaggag cgggcatgga aaatcaagaa caaccaggca
 4621 ccgacgcccgt ggaatgcccc atgtgtggag gaacggggcg ttggccaggc gtaagcggct
 4681 ggttgtctg cggcccctgc aatggcactg gaacccccaa gcccgaggaa tcggcgtagc
 4741 ggtcgcaaac catccggccc ggtacaaatc ggccgcccgc tgggtgatga cctggtggag
 4801 aagttgaagg ccgcccagcc cgcccagcgg caacgcatcg aggcagaagc acgcccggct
 4861 gaatcgtggc aagcggcccg tgatcgaatc cgcaaaagaa cccggcaacc gccgceagcc
 4921 gttgcccggc cgattaggaa gcgcccgaag ggcgacgagc aaccagattt tttcgttccc
 4981 atgctctatg acgtgggca cccgcatagt cgcagcatca tggacgtggc cgttttccgt
 5041 ctgtcgaagc gtgaccgagc agctggcgag gtgatccgct acgagcttcc agacgggac
 5101 gttagagttt ccgcaaggcc ggcccgcagc gccagtggtt gggattacga cctggtactg
 5161 atggcggctt cccatctaac cgaatccatg aaccgatacc gggaaaggaa gggagacaag
 5221 ccgcccggcg tgttccgctc acacgttggc gaegtactca agttctgccc gcgagccgat
 5281 ggccgaaagc agaaagacga cctggtagaa acctgcattc ggttaaacac cacgcacgct
 5341 gccatgcaagc gtacgaagaa ggccaagaac ggcccctggt tgacgggtatc cgaggggtgaa
 5401 gccttgatta gccgctaca gatcgtaaa agcgaaaccc ggccggccgg gtacatcgag
 5461 atcgagctag ctgattggat gtaccgagag atcacagaag gcaagaacct ggcagctgctg
 5521 accggttacc ccgattactt ttgatcagat cccggcatcg gccgttttct ctaccgctg
 5581 gcacgcccgc ccgcaaggca ggcagaagcc agatggttgt tcaagacgat ctacgaacgc
 5641 agtggcagcg ccggagagtt caagaagttc tgtttcaccg tgcgcaagct gatcgggtca
 5701 aatgacccgc cggagtagta ttgaaaggag gaggcggggc aggetggccc gatcctagtc
 5761 atgcccacc gcacctgat cgagggcgaa gcattcccgc gttcctaagt tacggagcag
 5821 atgctagggc aaattgcctc agcaggggaa aaaggtcgaa aaggtctctt tcctgtggat
 5881 agcacgtaca ttgggaacc aaagccgtac attgggaacc ggaaccgcta cattgggaac
 5941 ccaaaagcgt acattgggaa ccggtcacac atgtaagtga ctgatataaa agagaaaaaa
 6001 ggcgattttt ccgctaataa ctcttataaa ctattataaa ctcttaaac ccgcccggcc
 6061 tgtgcataac tgtctggcca gcgcacagcc gaagagctgc aaaaagcggc tacccttcgg
 6121 tcgctgcgct cctacgccc cgccgcttcg cgtcggccta tcgcccggcc tggccgctca
 6181 aaaaaggctg gcctacggcc aggcaatcta ccagggcgcg gacaagcccg gccctcgcca
 6241 ctgaccgccc ggcgcccaca tcaaggcacc ctgcctcggc cgtttcgggt atgacgggtg
 6301 aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag ccgatgcccg
 6361 gacgacaaa gcccgctcagc gcgcgtcagc ggtgttggc ggtgtcggg gcgcagccat
 6421 gaccagctca cgtagcgata gcggagtgtg tactggctta actatgcggc atcagagcag
 6481 attgtactga gactgcacca tatgctggtg gaaataccgc acagatgctg aaggagaaaa
 6541 taccgcatca ggcgctcttc cgttctctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg
 6601 ctgcccggag ccgtatcagc tcaactcaaa gcggtataac ggttatccc agaatacagg
 6661 gataacgag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggcagggaa ccgtaaaaa
 6721 gccgcttggc tggcgttttt ccataggctc gcccccctg acgagcatca caaaaatcga
 6781 cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgacaa ggactataaa gataccagcc gtttccccct
 6841 ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccc acctgcgccc ttaccggata cctgtcccgc
 6901 tttctccctt cgggaagcgt ggcgcttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg
 6961 gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc
 7021 tgccgcttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccggc taagacacga cttatcgcca
 7081 ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcagggc atgtaggcgg tgctacagag
 7141 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatgttg tatcgcgct
 7201 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc

7261 accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga
 7321 tcacaagaag atcctttgat cttttctacg ggggtctgacg ctcagtgga cgaaaactca
 7381 cgtaagga ttttggcat gcattctagg tactaaaca attcatccag taaaatataa
 7441 tttttat tctccaatc aggcttgatc cccagtaagt caaaaaatag ctcgcacatac
 7501 tgtttccc cgatacctc cctgatcgac cggacgcaga aggcaatgac ataccacttg
 7561 tccgccctgc cgcttctccc aagatcaata aagccactta ctttgccatc tttcacaaag
 7621 atgttgctgt ctcccagtc gccgtggaa aagacaagtt cctcttcggg cttttccgctc
 7681 tttaaaaaat catacagctc gcgcggatct ttaaatggag tgtcttcttc ccagttttcg
 7741 caatccacat cggccagatc gttattcagt aagtaatcca attcggctaa ggggtgtct
 7801 aagctattcg tatagggaca atccgatatg tcgatggagt gaaagagcct gatgactcc
 7861 gcatacagct cgataatctt ttcagggctt tgttcatctt catactcttc cgagcaaagg
 7921 acgccatcgg cctcactcat gaggagattg ctccagccat catgcccgtt caagtgcagg
 7981 acctttggaa caggcagctt tcttccagc catagcatca tgtccttttc ccgttcaca
 8041 tcataggtgg tccttttata cggctgtcc gtcattttta aatataaggtt ttcattttct
 8101 cccaccagct tatatacctt agcaggagac attccttccg tatcttttac gcagcggat
 8161 ttttgatca gttttttcaa ttcgggtgat attctcattt tagccattta ttcatttctt
 8221 cctcttttct acagtattta aagatacccc aagaagctaa ttataacaag acgaactcca
 8281 attcactgtt ccttgcatc taaaacctta aataccagaa aacagctttt tcaaatgtgt
 8341 tttcaaagtt ggcgtataac atagtatcga cggagccgat tttgaaaccg cgggtgatcac
 8401 agcgacaac gctctgtcat cgttacaatc aacatgctac cctccgcgag atcatccgtg
 8461 tttcaaaccg gccagcttag ttgccgttct tccgaatagc atcggtaaca tgagcaaagt
 8521 ctgcccctt acaacggctc tcccgcgtac gccgtcccgg actgatgggc tgccgtgatc
 8581 gactgggtgat tttgtgcca gctgcccgtc ggggagctgt tggctggctg gtggcaggat
 8641 atattgtggt gtaaacaaat tgacgcttag acaactaat aacacattgc gactcgtttt
 8701 aatgtaactga ataacgccc aattaattcg ggggatctgg attttagtac tggattttgg
 8761 ttttaggaat tagaaatttt attgatagaa gtattttaca aatacaata catactaagg
 8821 gtttcttata tgcacaacac atgagcgaac ccctatagga accctaattc ccttatctgg
 8881 gaactactca cacattatta tggagaact cgagctgtgc gatcgacaga tccggtcggc
 8941 atctactcta tttctttgcc ctcggacgag tgcctggggc tgggtttcca ctatcggcga
 9001 gtactttctac acagccatcg gtcccagcgg ccgcgcttct gcgggcgatt tgggtacgcc
 9061 cgacagtccc ggcctccgat cggacgattg cgtcgcacgc accctgcgcc caagctgcat
 9121 catcgaat ggcgtcaacc aagctctgat agagttggtc aagaccaatg cggagcatat
 9181 acgcccggag tctgtggcat cctgcaagct cgggatgcct ccgctcgaag tagcgcgtct
 9241 gctgctccat acaagccaac caccggcctcc agaagaagat gttggcgacc tctgattggg
 9301 aatccccgaa catgcctcag ctccagtcac tgaccgctgt tatgcccga tttgtccgtca
 9361 gacattgtt ggagccgaaa tccgcgtgca cgaggtgccc gacttgggg gactcctcgg
 9421 cccaaagcat cagctcatcg agagcctgag cgacggacgc actgacgggtg tctgcatca
 9481 cagtttgcca gtgatacaca tggggatcag caatcgcgca tatgaaatca cgcctatgtag
 9541 tgtattgacc gattccttgc ggtccgaatg ggcccgaacc gctcgtctgg ctaagatcgg
 9601 cgcagcagat cgcattccata gctcccgcga cgcctccgca cgggttggtag aacagcgggc
 9661 caggcaggtc ttgcaacgtg acaccctgtg caeggcggga gatgcaaatg gtcaggctct
 9721 cgttaaacctc cccaatgtca agcacttccc gaatcgggag cgcggccgat gcaaagtgcc
 9781 gataaacata acgatctttg tagaaacctc cggcgcagct atttaccgc aggaatatac
 9841 caccgctcc tacatcgaag ctgaaagcac gagattcttc gccctccgag gactgcatca
 9901 ggtcggagac gctgtcgaac ttttcgatac gaaacttctc gacagacgctc gcggtgagtt
 9961 caggcttttt catatctcat tgcctcccgg gatctcggaa agctcagagat agatagattt
 10021 gttagagagat actggtgatt tcagcgtgtc ctctccaaat gaaatgaact tcttatata
 10081 gaggaaggtc ttgcgaagga tagtgggatt gtgcgtcatc ccttaactca gttgagatat
 10141 caatcaatc cacttgcctt gaagacgtgg ttggaacgctc tcttttttc acgatgctcc
 10201 tctgtgggtg ggtccatctc ttgggaccac tgcctggcaga ggcattctga acgatagcct
 10261 ttcctttatc gcaatgatgg cattttagg tgccaccctc cttttctact gtccttttga
 10321 tgaagtgaca gatagctggg caatggaatc cgaggagttt tcccgatatt accctttgtt
 10381 gaaaagtctc aatagccctt tggcttctg agactgtatc tttgatattc tttgagtaga
 10441 cgagagtgtc gtgctccacc atgttatcac atcaatccac ttgctttgaa gacgtggttg
 10501 gaacgtcttc tttttccacg atgctcctcg tgggtggggg tccatctttg ggaccactgt
 10561 cggcagaggc atcttgaacg atagcctttc ctttatcaga atgatggcat ttttaggtgc
 10621 cacccttctt ttctactgct cttttgatga agtgacagat agctgggcaa tggaaatcga
 10681 ggaggtttcc cgatattacc ctttgttgaa aagtctcaat agccctttgg tcttctgaga
 10741 ctgtatcttt gatattcttg gactagacga gactgtcgtg ctccaccatg ttggcaagct
 10801 gctctagcca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg
 10861 ccacgacagg tttcccagc ggaaagcggg cagtgaagcgc aacgcaatta atgtgagttt
 10921 gctcactcat taggcacccc aggttttaca ctttatgctt ccggctcgtg tgttgtgtgg
 10981 aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgaattcga
 11041 gctcggatc cgggatcctc cttagagtcga cctgcaggca tgcagcttg gactggccg
 11101 tctgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaac cgccttgagc
 11161 cacatcccc tttcgcagc tggcgttaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc
 11221 aacagttgct cagcctgaat ggcgaatgct agagcagctt gagcttggat cagattgtcg
 11281 tttcccgcct tcagtttagc ttcattggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac
 11341 tcccgtaaa gactggcgaa cagttcatac agagctctct acgactcaat gacaagaaga
 11401 aatcttctg caacatggtg gaggacgaca cacttgtcta ctccaaaat atcaagata
 11461 cagtctcaga agacaaaagg gcaattgaga cttttcaaca aagggttaata tccgaaacc
 11521 tctcggatt ccattgccc gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag
 11581 gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg
 11641 ccgacagtg tcccaaatg ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg


```

11701 ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg
11761 acgcacaatc ccaactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt
11821 tggagagaac acgggggact cttgac
//

```

Lampiran 6. Hasil analisis restriksi pNU400 dengan 117 enzim restriksi (DNA MAN)

```

Restriction analysis on PNU400
Screened with 117 enzymes, 443 sites found
Acc65I      3      G/GTACC
                2269  5590  9361
AclI       1      AA/CGTT
                13955
AflIII     1      C/TTAAG
                3084
AgeI       3      A/CCGGT
                9093  9176  12384
AhaIII    10     TTT/AAA
                392   3713  8330  8874  10109  10269  10636  10665  12322  15932
Alw44I     7      G/TGCAC
                1555  4876  5976  6217  6929  11353  11851
AlwNI      3      CAGNNN/CTG
                11258 14077 14145
ApaBI      3      GCANNNNN/TGC
                9832  11851 13431
ApaI       4      GGGCC/C
                1310  2279  4631  9359
ApaLI      7      G/TGCAC
                1555  4876  5976  6217  6929  11353  11851
Asp718I    3      G/GTACC
                2269  5590  9361
AsuII      1      TT/CGAA
                6367
AvrII      1      C/CTAGG
                7627
BalI       7      TGG/CCA
                5748  6825  12271  13217  13684  13951  15499
BamHI      4      G/GATCC
                2260  3349  5581  9295
BbeI       2      GGCGC/C
                6817  12097
BbvII      3      GAAGACNN/
                8722  10629 15797
BclI       2      T/GATCA
                7860  9950
BglI      14     GCCNNNN/NGGC
                99    1034  3420  4355  6822  13223  13535  13948  14801  14810
                14822 15010 15244 15630
BglIII    2     A/GATCT
                1197  4518
Bpu1102I   2      GC/TNAGC
                5732  10558
Bsc91I     3      GAAGACNN/
                8722  10629 15797
BsiI       4      C/TCGTG
                1164  2497  4485  11494
BsmI       7      GAATGCN/
                8152  10055 10949 13035 87    3408  13712
Bsp1407I   2      T/GTACA
                3026  7295
BspHI      6      T/CATGA
                1489  4810  6121  7521  8303  10407
BspMI      5      ACCTGCNNNN/
                2235  5556  7263  12630 13024
BssHII     2      G/CGCGC
                3255  3279
BstD102I   11     GAG/CGG
                1015  4336  12172 963   1095  1245  4284  4416  4566  11738
                15258
BstXI      1      CCANNNNN/NTGG
                5744

```


NsiI	12	ATGCA/T	1793	2018	3175	5114	5339	6519	8152	8215	8395	8427
			8828	10949								
PacI	1	TTAAT/TAA	9010									
PflMI	3	CCANNNN/NTGG	6753	13213	14077							
PinAI	3	A/CCGGT	9093	9176	12384							
PmaCI	1	CAC/GTG	5981									
PstI	7	CTGCA/G	260	2246	3054	3341	3581	5567	9311			
PvuI	2	CGAT/CG	127	3448								
PvuII	4	CAG/CTG	156	3477	6029	8553						
RleAI	4	CCCACANNNNNNNNNNNN/	13223	1990	5311	12079						
SacI	2	GAGCT/C	5600	9429								
SacII	1	CCGC/GG	9959									
SalI	6	G/TCGAC	851	2248	2290	4172	5569	9340				
SapI	2	GCTCTTCN/	12259	11784								
SauI	1	CC/TNAGG	5726									
ScaI	5	AGT/ACT	425	3746	6551	9600	15854					
SciI	5	CTC/GAG	953	2286	4274	8267	9348					
SfiI	5	GGCCNNNN/NGGCC	13223	13535	14801	14810	15244					
SgrAI	1	CR/CCGGYG	12096									
SmaI	4	CCC/GGG	2267	3345	5588	9303						
SphI	5	GCATG/C	7616	8429	8499	8830	15889					
SpI	1	C/GTACG	12994									
SspI	6	AAT/ATT	6535	7453	7579	7596	7643	10907				
SstI	2	GAGCT/C	5600	9429								
SstII	1	CCGC/GG	9959									
SunI	1	C/GTACG	12994									
Tth111I	6	GACN/NNGTC	273	476	3594	3797	9796	11923				
VspI	7	AT/TAAT	1678	1906	4999	5227	7323	8362	9623			
XbaI	11	T/CTAGA	288	1278	1633	1861	2254	3609	4599	4954	5182	5575
			8134									
XcmI	5	CCANNNNN/NNNTGG	1003	4324	10306	14324	15479					
XhoI	5	C/TCGAG	951	2284	4272	8265	9346					
XmaI	4	C/CCGGG	2265	3343	5586	9301						
XmaIII	16	C/GGCCG	3039	9283	12180	12785	12901	12974	13121	13224	13470	13987
			14448	14524	14898	15002	15328	15560				
XmnI	1	GAANN/NN TTC	9624									
XorII	2	CGAT/CG	127	3448								
Non Cut Enzymes												
AatII	AccIII	AscI	BspMII	BstEII	CspI							

1441 TTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGATTTTTTT
 ClaI BspHI
 1501 TTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCCTTTATTTCATATATGCCGTGCAC
 ApaLI
 Alw44I
 1561 TTGTTTGTCTGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGG
 XbaI EcoRI VspI
 1621 TTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTA
 1681 ATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGAT
 ClaI NsiI
 1741 GGAAATATCGATCTAGGATAGGTATAACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAG
 1801 AGATGCTTTTTGTTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTCTG
 XbaI VspI
 1861 TCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTG
 ClaI
 1921 TATGTGTGTGCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTA
 RleAI NsiI NdeI
 1981 GGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC
 NdeI
 2041 ATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATATAATAAACAAGTATGTTTTAT
 NdeI
 2101 AATTATTTTGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTT
 2161 TTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGATGCTCA
 KpnI
 Acc65I
 Asp718I
 SmaI
 Sali XmaI
 2221 CCCTGTGTTTGGTGTACTTCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGTACCGGGCCC
 BspMI PstI XbaI BamHI ApaI
 Sali
 2281 CCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
 XhoI ClaI HindIII NcoI
 2341 TTCACGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTC
 2401 AGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATC
 Eco57I BsiI Eco57I
 2461 TGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGC
 2521 GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCC
 2581 ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG
 2641 ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 Eco57I
 2701 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGC
 2761 CACAACGTCTATATCATGCCCCACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATC
 2821 CGCCACAACATCGAGGACGGGAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC
 2881 ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTG
 2941 AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
 XmaIII

EagI
 Eco52I
 Bsp1407I NotI PstI
 3001 GGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCGCGCTGCAGATCGT

AflII
 3061 TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATT

NsiI
 3121 ATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG

3181 TTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCATA

BssHII BssHII
 3241 GAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAAATTATCGCGCGGGTGCATCTATGTTA

BamHI
 SmaI
 XmaI
 EcoRI PstI
 3301 CTAGATCCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGA

Eco57I BsmI BglI
 3361 AACTGAAGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGCTCAAGCTGCTCTAGCATTGCGCAATC

PvuI
 MstI XorII PvuII
 3421 AGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGATCGGTGCGGGCCTCTCGCTATTACGCCAGCTG

3481 GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCA

HindIII PstI Tth111I
 3541 CGACGTTGTAACGACGGCCAGTGCCAAGCTGGGCTGCAGTGCAGCGTGACCCGGTGC

XbaI
 3601 TGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATT

DraI
 AhaIII
 3661 TTTTTGTACACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTT

ScaI
 3721 ACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATAT

Tth111I MfeI
 3781 AAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACA

3841 GTTTTATCTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATAT

3901 AATATTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAG

3961 ACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAACATAA

4021 ACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAAATAGAATAAAAATAAAGTGAC

4081 TAAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTT

SalI
 4141 TCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGC

4201 GAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCC

SciI
 XhoI BstD102I
 4261 TCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAG

BglI
 NaeI
 XcmI BstD102I Eco56I
 4321 AAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTC

BstD102I
 4381 ACGGCACGGCAGCTACGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTCCTCGCC

4441 CGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCAACCTCGTGTGTTCCGGAG BsiI
 4501 CGCACACACACAACC**BglII****AGATCTC**CCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGT
 4561 BstD102I XbaI NcoI
 ACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCGGT**CCA**
 4621 ApaI
TGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTTGTTGTTA
 4681 NheI DrdI
 GATCCGTGCTGCTAGCGTTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTG
 4741 CTAACTTGCCAGTGTTCCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACG
 4801 ClaI BspHI
 GGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCCTTT
 4861 ApaLI Alw44I
 ATTTCAATATATGCCGIGCACTTGTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTGTCTT
 4921 XbaI EcoRI
 GGTGTGATGATGTGGTCTGGTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCA
 4981 VspI
 AACTACCTGGTGGATTTATTAATTTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATTCATAGT
 5041 ClaI
 TACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGG
 5101 NsiI
 GTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTG
 5161 XbaI
 GTTGGGCGGTCGTTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTG
 5221 VspI
 TATTTATTAATTTGGAACTGTATGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAAG
 5281 ClaI RleAI NsiI
 ATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGTTTTACTGATGCAT
 5341 NdeI NdeI
 ATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTGAGTACCTATCTATTA
 5401 NdeI
 TAATAACAAGTATGTTTTATAAATTTTGTCTTGATATACTTGGATGATGCATATG
 5461 CAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTAC
 5521 Sali BspMI PstI XbaI
 TGTTCCTTTGTCGATGCTCACCTGTTGTTGGTGTACTTCTGCAGGTCGACTCTAGA
 5581 SstI
SacI
 EcoICRI
 Ecl136II
 KpnI
 Acc65I
 Asp718I
 SmaI
 XmaI
 BamHI
 5581 GGATCCCCGGGTACCG**GAGCTCT**TTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAAC
 5641 ATTACAATTACTATTTACAATTACAATGGAATCGAGGCTACGACTCCATTCTCAGATGA
 MstII
 CvnI
 Bsu36I MscI

SauI Bpu1102I Bali
 EcoNI EspI BstXI
 5701 CGCCTCCGGTTGGAAATAATCCTCCCTCAGGCTCAGCCATAAGATTGGCCAAGTTGATGT
 NdeI
 5761 CTACCACAAGAGCGCCTTCTACTCGCAAAACAAATTCGATATCTCTGCATATGCTCAAG
 5821 GTATATATTAGAAAAACAGTAGCAATAGCATTAGCATTACTAATTGGTTGTAGATTGGGA
 5881 AGCATCATATTGACTGTAGAATAATACGAAAAATCTGTTTATAACAGGGTTGAAAAGAAA
 Eco72I
 PmaCI
 Eco57I ApaLI
 Alw44I
 5941 AGCTGAAGCCTCTTCTAGTCGGATTTCAGAATGTACGTGCACGTGCGCGTGGGCATGGATG
 PvuII
 6001 TGGCCGCACATCACCATCATCATCAACAGCTGAGGCCGAGAGGCATTTTATTAGAGTGT
 6061 AAGCAGTAGTAATGCAAATGGTACAGCTACAGATCCGAGTCAAGATGATATGGCTATTGT
 BspHI
 6121 TCATGAACCACAACCACAACCACAACCACAACCAGAACCACAACCACAGCCACAACCTGA
 Alw44I
 ApaLI
 6181 ACCCGAAGAAGAAGCACCACAGAAGAGGGCAAAGAAGTGCACATCGGATGTATGGCAGCA
 6241 TTTACCAAGAAGGAAATTGAAGTGGAGGTCGATGGAAAGAAATACGTTTCAGGTATGGGG
 6301 ACATTGCAACTTTCCTAATTGCAAGGCTAAGTATAGGGCTGAGGGTCATCATGGAACAAG
 AsuII
 Csp45I
 6361 CGGATTTTCGAAATCACTTGAGAACATCACATAGTTTAGTTAAAGGTCAGTTGTGTCTAAA
 6421 AAGTGAAAAGGATCATGGCAAAGACATAAATCTCATTGAGCCTTATAAGTACGATGAAGT
 HindIII NsiI SspI
 6481 GGTTAGCCTAAAGAAGCTTCATTTGGCAATAATCATGCATGAATATCCTTTCAATATTGT
 ScaI
 6541 AGAACATGAGTACTTTGTTGAGTTTGTTAAGTCTCTGGCCCTCACTTTCCAATAAAGTC
 6601 CCGTGTCACTGCTAGAAAATATATCATGGATTGTATTGGAAGAAAAAGAAAAGTTGTA
 Eco57I Eam1105I
 6661 TGGAAAACATAAAGATGTTTCAGTCTCGCTTCAGTACAACATGGATATGTGGACATCTTG
 PflMI
 6721 TCAAAATAAGTCATACATGTGTGTCCACCATCCATTGGATTGATGATGATTGGTGTCTCCA
 BbeI Bali
 EheI MscI
 NarI BglI
 6781 AAAAAGAATTGTGGCTTTTTTCATGTTGAAGGGCGCCACACTGGCCAAAGGTTATCACA
 6841 AACCTTCACTGCAATCATGGTTAAGTGAACATGAGAAAAAATTGTTTGCCTTGTCTTT
 ApaLI
 Alw44I
 6901 GGATAATGCTAGTGCAAATGAAGTAGCTGTGCACGATATAATTGAGGATTTGCAGGACAC
 6961 TGATTCAAATCTAGTTTGTGATGGTGCTTTCTTTTCATGTGAGGTGTGCTTGTACATACT
 MfeI
 7021 GAACTTGGTTGCAAAGGATGGCTTGGCTGTAATTGCAGGAACAATTGAGAAAATCAAAGC
 7081 GATTGTTCTTGCTGTAAAATCTTCTCCTTTGCAGTGGGAAGAACTAATGAAGTGTGCTAG
 NdeI EcoRI
 7141 TGAATGTGACTTGGATAAATCTAAAGGGATCTCATATGATGTCTCAACTAGATGGAATTC

8701 TGTATTAACAGGATGAAGACGCAATAGAATTTTCTAAGAATAATGAAGATGTAGCAAGTG

8761 GCTCCTCTCCATGAGCAATGTGTCTTATGTTTGTGACAGATGAGCCTTGGTTGTAATAG

SphI AhaIII
NsiI DraI

8821 TTTATGCATGCTAAGTGATCCAGATGTGAGCAAGTGATTATGAATATGTGTTTTAAACTT

8881 TATATGTGTGCATGTGTGCTAGTAGACTTATATGGCTTCTTATGTTAGCCAAGAGCCCAA

8941 GACTTATCACTTATGTGCTACATTAACCTATGTGTGCTCCAGATTTATATGGATTTTATC

PacI

9001 TATGTTTAATTAAGACTTGTGTTTACAATTTTTTATATTTGTTTTTAAGTTTTGAATATA

AgeI
PinAI

9061 TGTTTTTCATGTGTGATTTTACCGAACAAAAATACCGTTCCCGTCCGATTTTCGACTTTAA

AgeI
PinAI

9121 CCCGACCGGATCGTATCGGTTTTTCGATTACCGTATTTATCCCGTTCGTTTTTCGTTACCGG

9181 TATATCCCGTTTTTCGTTCCGTCGCCGCAAGTTAAATATGAAAATGAAAACGGTAGAGGTA

XmaIII
Eco52I
EagI BamHI

9241 TTTTACCGACCGTTACCGACCGTTTTTCATCCCTAGCGTGACCCGGCCGCGGGGGATCC

ClaI

SmaI EcoRI HindIII SciI
XmaI PstI EcoRV SalI XhoI ApaI

9301 CCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCC

KpnI
Acc65I
Asp718I

9361 GGTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTAATACGACTCACTATAGGGCGA

SacI

SstI
EcoICRI
Ecl136II

9421 ATTG**GAGCTC**GAATTTTCGAGTTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCAGATAAGGGA

9481 ATTAGGGTTCATAGGGTTTTCGTCAATGTGTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTA

ScaI

9541 TTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGT

XmnI
VspI

9601 ACTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCGTTAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGC

9661 AATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCA

9721 GCCAGCCAACAGCTCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCACGATACAGGCAGC

Tth111I ApaBI

9781 CCATCAGTCCGGGACGGCGTCAGCGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATG

9841 TTACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTTGAACACGGATGATCT

SstII
SacII
BclI Mlu113I

9901 CGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTGTGATCACCGCG

9961 GTTTCAAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTATACGCCAACTTTGAAAACAACCTTGAA

BsmI

10021 AAGCTGTTTTCTGGTATTTAAGGTTTTAGAATGCAAGGAACAGTGAATTGGAGTTCGTCT

DraI
 AhaIII
 10081 TGT TATAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATACTGTAGAAAAGAGGAAGGAAATAATA
 10141 AATGGCTAAAATGAGAAATATCACCGGAATTGAAAAAACTGATCGAAAAATACCGCTGCGT
 10201 AAAAGATACGGAAGGAATGTCTCTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAA

 AhaIII
 DraI
 XcmI
 10261 CCTATATTTAAAAATGACGGACAGCCGGTATAAAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGA
 10321 AAAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAAGCTGCCTGTTCCAAAGGTCTGCACCTTTGA

 BspHI
 10381 ACGGCATGATGGCTGGAGCAATCTGCTCATGAGTGAGCCGATGGCGTCCTTTGCTCGGA
 10441 AGAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAAAAGATTATCGAGCTGATGCGGAGTGCATCAG

 Bpu1102I
 EspI
 10501 GCTCTTTCACCTCCATCGACATATCGGATTGTCCCTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTT
 10561 AGCCGAATTGGATTACTTACTGAATAACGATCTGGCCGATGTGGATTGCGAAAAGTGGGA

 BbvII AhaIII
 Bsc91I DraI
 DraI
 AhaIII
 10621 AGAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCGGAGCTGTATGATTTTTTAAAGACGGAAAAGCC
 10681 CGAAGAGGAACTTGTCTTTTCCACGCGACCTGGGAGACAGCAACATCTTTGTGAAAGA
 10741 TGGCAAAGTAAGTGGCTTTATTGATCTTGGGAGAAGCGGCAGGGCGGACAAGTGGTATGA

 EcoRV
 10801 CATTGCCTTCTGCGTCCGGTCGATCAGGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCT

 SspI
 10861 ATTTTTGACTTACTGGGATCAAGCCTGATTGGGAGAAAATAAAATATTATATTTTACT

 BsmI
 NsiI
 10921 GGATGAATTGTTTTAGTACCTAGAATGCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTT
 10981 CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
 11041 GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCG

 Eco57I
 11101 GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACC
 11161 AAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACC

 AlwNI
 11221 GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC
 11281 GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTG

 Alw44I
 ApaLI
 11341 AACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
 11401 CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTA

 BsiI
 11461 TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGC

 DrdI
 11521 CTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTG
 11581 ATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTT
 11641 CCTGGCCTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGT

 BstD102I

11701 GGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGA

SapI

11761 GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC

ApaBI
ApaLI
NdeI Alw44I

11821 GCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGC

Tth111I

11881 CGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCC

DrdI

11941 CGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCT

12001 TACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCA

NaeI
BbeI
SgrAI
Eco56I
EheI
RleAI NarI

12061 CCGAAACGCGCAGGCAGGGTGCCTTGATGTGGCGCCGGGTCGAGTGCCGACGGCGC

EagI
Eco52I
XmaIII
NotI
BstD102I

12121 GGCTTGTCGCGCCCTGGTAGATTGCCTGGCCGCTAGGCCAGCCATTTTGGAGCGCCAGC

12181 GGCCCGCATAGCCGACGCGAAGCGGGGGCGTAGGGAGCGCAGCGACCGAAGGGTAGG

BalI
SapI MscI

12241 CGCTTTTGCAGCTCTTCGGCTGTGCGCTGGCCAGACAGTTATGCACAGGCCAGGCGGGT

DraI
AhaIII

12301 TTTAAGAGTTTTAATAAGTTTTAAAGAGTTTTAGCGGAAAAATCGCCTTTTTTCTCTTT

PinAI
AgeI

12361 TATATCAGTCACTTACATGTGTGACCGGTTCCCAATGTACGGCTTTGGGTCCCAATGTA

Eco31I

12421 CGGGTCCGGTTCCCAATGTACGGCTTTGGGTTCCCAATGTACGTGCTATCCACAGGAAA

12481 GAGACCTTTTCGACCTTTTCCCTGCTAGGGCAATTGCCCCTAGCATCTGCTCCGTACA

EcoNI

12541 TTAGGAACCGCGGATGCTTCGCCCTCGATCAGGTTGCGGTAGCGCATGACTAGGATCGG

BspMI

12601 GCCAGCTGCCCGCCTCCTCCTTCAAATCGTACTCCGGCAGGTCATTTGACCCGATCAG

MstI

12661 CTTGCGCAGGTTGAAACAGAACTTCTTGAACCTCTCCGGCGCTGCCACTGCGTTCGTAGAT

12721 CGTCTTGAACAACCATCTGGCTTCTGCCTTGCTGCGGCGGGCGTCCAGGCGGTAGAG

XmaIII
EagI
Eco52I ClaI

12781 AAAACGCCGATGCCGGGATCGATCAAAAAGTAATCGGGTGAACCGTCAGCACGTCCGG

NheI

12841 GTTCTTGCTTCTGTGATCTCGCGGTACATCCAATCAGCTAGCTCGATCTCGATGTACTC

Eco52I
XmaIII
EagI

12901 CGGCCGCCGGTTTCGCTCTTTACGATCTTGTAGCGGCTAATCAAGGCTTCACCTCGGA

XmaIII
EagI
Eco52I

SunI
SplI

12961 TACCGTCACCAGGCGGCCGTTCTTGGCCTTCTTCGTACGCTGCATGGCAACGTGCGTGGT

BspMI BsmI

NaeI
Eco56I

13021 GTTTAACCGAATGCAGGTTTCTACCAGGTCGTCTTTCTGCTTTCCGCCATCGGCTCGCCG

Eco52I
EagI
XmaIII

13081 GCAGAACTTGAGTACGTCCGCAACGTGTGGACGGAACACGCGCCGGGCTTGTCTCCCTT

13141 CCCTTCCCGGTATCGGTTTCATGGATTTCGGTTAGATGGGAAACCGCCATCAGTACCAGGTC

NaeI
XmaIII
EagI
Eco52I
SfiI
BalI RleAI
MscI BglI
PflMI Eco56I FseI

13201 GTAATCCCACACACTGGCCATGCCGGCCGGCCCTGCGGAAACCTCTACGTGCCCGTCTGG

13261 AAGCTCGTAGCGGATCACCTCGCCAGCTCGTTCGGTACGCTTCGACAGACGGAAAACGGC

13321 CACGTCCATGATGCTGCGACTATCGCGGGTGCCACGTCATAGAGCATCGGAACGAAAA

NaeI
Eco56I
ApaBI

13381 ATCTGGTTGCTCGTCGCCCTTGGGCGGCTTCCTAATCGACGGCGCACCGGCTGCCGGCGG

NotI
XmaIII
Eco52I
EagI

13441 TTGCCGGGATTCTTTGGGATTTCGATCAGCGCCGCTTGCCACGATTACCGGGGCGTGC

SfiI
BglI

13501 TTCTGCCTCGATGCGTTGCCGCTGGGCGGCCCTGCGCGCCTTCAACTTCTCCACCAGGTC

13561 ATCACCAGCGCCGCGCGGATTGTACCGGGCCGATGGTTTGCACCGTCACGCCGATT

NaeI
Eco56I

13621 CCTCGGGCTTGGGGTTCCAGTGCCATTGCAGGGCCGGCAGACAACCCAGCCGCTTACGC

MscI
BalI

BsmI

13681 CTGGCCAACCGCCGTTCTCCACACATGGGGCATTCACGGCGTCGGTGCCTGGTTGTT

13741 CTTGATTTTCCATGCCGCTCCTTTAGCCGCTAAAATTCATCTACTCATTATTCATTTG

13801 CTCATTTACTCTGGTAGCTGCGCGATGTATTAGATAGCAGCTCGGTAATGGTCTTGCCT

NaeI
Eco56I

13861 TGGCGTACCGCGTACATCTTACGCTTGGTGTGATCCTCCGCCGCAACTGAAAGTTGACC

AclI
BalI
MscI
BglI

13921 CGCTTCATGGCTGGCGTGTCTGCCAGGCTGGCCAACGTTGCAGCCTTGCTGCTGCGTGCG

NaeI
Eco56I
XmaIII

EagI
 Eco52I
 13981 CTCGGACGGCCGGCACTTAGCGTGTGTTGTGCTTTTGCTCATTTTCTCTTTACCTCATTAA

PflMI
 AlwNI
 14041 CTCAATGAGTTTTGATTTAATTTAGCGGCCAGCGCCTGGACCTCGCGGGCAGCGTCGC

NaeI
 Eco56I
 AlwNI
 14101 CCTCGGGTTCTGATTCAAGAACGGTTGTGCCGGCGGGCAGTGCCTGGGTAGCTCACGC
 14161 GCTGCGTGATACGGGACTCAAGAATGGGCAGCTCGTACCCGGCCAGCGCCTCGGCAACCT
 14221 CACCGCCGATGCGCGTGCCTTTGATCGCCCGGACACGACAAAGGCCGCTTGTAGCCTTC

XcmI
 NdeI
 14281 CATCCGTGACCTCAATGCGCTGCTTAACCAGTCCACCAGGTCGGCGGTGGCCCATATGT
 14341 CGTAAGGGCTTGGCTGCACCGAATCAGCACGAAGTCGGCTGCCTTGATCGCGGACACAG

XmaIII
 Eco52I
 NaeI
 EagI
 Eco56I
 14401 CCAAGTCCGCCGCTGGGGCGTCCGTCGATCACTACGAAGTCGGCCGGCCGATGGCCT
 14461 TCACGTCGCGGTCAATCGTCCGGCGGTGATGCCGACAACGGTTAGCGGTTGATCTTCCC

EagI
 Eco52I
 XmaIII
 14521 GCACGGCCGCCAATCGCGGGCACTGCCCCTGGGGATCGGAATCGACTAACAGAACATCGG
 14581 CCCCGGCGAGTTGCAGGGCGGGCTAGATGGGTTGCGATGGTTCGCTTTCCTGACCCGC
 14641 CTTTCTGGTTAAGTACAGCGATAACCTTCATGCGTTCGCCCTTGCATTTTGTATTATTC
 14701 TCATCGCATCATATACGCAGCGACCGCATGACGCAAGCTGTTTTACTCAAATACACATCA

BglI
 SfiI
 FseI
 NaeI
 Eco56I
 BglI
 SfiI
 Eco57I
 14761 CCTTTTTAGACGGCGCGCTCGGTTTCTTCAGCGCCAAGCTGGCCGGCCAGGCCGCCAG

BglI
 14821 CTTGGCATCAGACAAACCGGCCAGGATTTTCATGCAGCCGCACGGTTGAGACGTGCGCGGG

Eco52I
 EagI
 XmaIII
 14881 CGGCTCGAACACGTACCCGGCCGATCATCTCCGCCTCGATCTCTTCGGTAATGAAAAA
 14941 CGGTTGCTCCTGGCCGTCCTGGTGCAGTTTCATGCTTGTTCCTCTTGGCGTTCATTCTCG

XmaIII
 NotI
 Eco52I
 EagI
 BglI
 15001 GCGGCCGCCAGGGCGTCCGCTCGGTCAATGCGTCCACGGAAGGCCACCGCCGCCCTG
 15061 GCCTCGGTGGGCGTCACTTCTCGCTGCGCTCAAGTGCAGGTTACAGGGTCGAGCGATGC
 15121 ACGCCAAGCAGTGCAGCCGCTCTTTTCAGGTTGCGGCTTCTGGTTCGATCAGCTCGCGG
 15181 GCGTGCAGCATCTGTGCCGGGGTGGGGTAGGGTAGGGCGGGGGCCAAACTTCACGCCTCGGGCC

BglI
 SfiI
 BstD102I

15241 TTGGCGGCTCGGCCCCGCTCCGGGTGCGGTCGATGATTAGGGAACGCTCGAACTCGGCA

FseI
NaeI
Eco56I
XmaIII
EagI
Eco52I

15301 ATGCCGGCGAACACGGTCAACACCATGCGGCCGGCCGGCGTGGTGGTGTGCGCCACGGC

NaeI
Eco56I

15361 TCTGCCAGGCTACGCAGGCCCGCGCCGCTCCTGGATGCGCTCGGCAATGTCCAGTAGG

XcmI

15421 TCGCGGGTGCTGCGGGCCAGGCGGTCTAGCCTGGTCACTGTCACAACGTCGCCAGGGCGT

Bali
MscI

15481 AGGTGGTCAAGCATCCTGGCCAGCTCCGGGCGGTGCGCCTGGTGCCGGTGATCTTCTCG

NaeI
EagI
Eco52I
XmaIII
Eco56I

15541 GAAAACAGCTTGGTGCAGCCGGCCGCGTGCAGTTCGGCCCGTTGGTTGGTCAAGTCCTGG

BglI

15601 TCGTCGGTGCTGACGCGGGCATAGCCAGCAGGCCAGCGGCGCGCTCTGTTCATGGCG

15661 TAATGTCTCCGGTCTAGTCGCAAGTATTCTACTTTATGCGACTAAAACACGCGACAAGA

15721 AAACGCCAGGAAAAGGGCAGGGCGGCAGCCTGTCGCGTAACTTAGGACTTGTGCGACATG

BbvII
Bsc91I

15781 TCGTTTTTCAGAAGACGGCTGCACTGAACGTCAGAAGCCGACTGCACTATAGCAGCGGAGG

ScaI
SphI

15841 GGTGGATCAAAGTACTTTGATCCCGAGGGGAACCTGTGGTTGGCATGCACATACAAAT

AhaIII
DraI

15901 GGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATATCCGTTATTCTAATAAACGCTCT

15961 TTTCTCTAG

Lampiran 7. Hasil *sequence* fragmen *sgfpS65T* yang terdapat pada pGEM T-Easy

```
>seq1
GGGGCCCCAAGGCTATTTAGGTGAACATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCAT
ATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTGATTTGATCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
ACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTG
GCCACCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
GACTTCTCAAGTCCGCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTATATCATGGCC
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCG
CCGACCACTACCAGCAGAAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCAC
CCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCCGCCCG
GGGACTACTCAGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGTGACCATAAATCGAATTCGCCGGCCCGCGG
CCCGGAGCATGCGACGTGCGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGTATACAATTCAGTTCGCGCGTGGCTTTTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCG
CCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCC
TAAGCGCCCGCTCCTTCCGTTTTCTTCCCTTCTTTTCCCGCGTTTCGCCGGTTTTCCCGTCAAGTCTAAAT
CGGGGTCCCTTTAAGGTTCCAATTTAGGGTTT
```

```
>seq2
GGGCCCCAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCATA
TGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTGATTTGATCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
CCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGG
CCCACCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACG
ACTTCTTCAAGTCCGCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA
CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTATATCATGGCCG
ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC
CGACCACTACCAGCAGAAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCAC
CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCCGCCCG
GGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGTGACCATAAATCGAATTCGCCGGCCCGCATGGCGG
CCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGTATACAATTCAGTTCGCGCGTGGCTTTTAC
AACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTG
GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACCCGC
CCTGTAAACGCCGATTAACCGCGGGGTGTGGTGGTTACCGCCAACGTGACCGCTTAACTTTGCCAGCGCCC
TTACCGCCCCCTCCTTTTCGTTTTTTCCTTCTTTTTCGCCCGTTTTCGCCGGTTTTCCCGTAAAGTTAA
AATCGGGGGTCCCTTTAAAGGTTCCGATTTT
```

```
>seq3
GGGCCCAGCTATTTAGGTGAACATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGG
TCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTGATTTAGGTGACCTTACTTGTACGGCTCGTCCATGCCGTGA
GTGATCCCGGCGGGTACGAACCTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTGGGGTCTTTGCTCAGGG
CGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTGGGCGACGACCGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGTGGTA
GTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCCTCGATGTTGTGGCGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTC
TGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGT
CCTCCTGAAGTCGATGCCCTTCAGTTCGATGCGGTTACCAGGGTGTGCCCTCGAATTCACCTCGGCGCG
GGTCTTGTAGTTGCCGTCGCTTGAAGAAGATAGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGACTTG
AAGAAGTCGTGCTTTCATGTGGTTCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTACGA
GGTGGGCCAGGGCAGGGCAGCTTCCGGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCAGCTTCCCGTAGGTGGCAGC
GCCCCTGCCCTCGCCGACACGCTGAACCTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACGAGGATGGGCACC
ACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTCACCATGGGATCAAATCGAATTCGCCGGCCCGCATGGCGGCCG
GGAGCATGCGACGTGCGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGTATACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAAC
GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG
TAATAACCAAAAAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCCAGCCTGAATGGCAAATGGACCCCCC
TGTAACGGCCATTAAGCCCGGGGTGTGGTGGTTACCCCCAACGTGACCCCTAACTTTGCCAGCCCCCTAA
GCCCCCTCCTTTTCGTTTTTTCCTTCTTTTTCGCCACNGTTCCCGGTTTTCCCGTCAACTTTAAATCG
GGGCTCCCTTTAA
```


Lampiran 8. Hasil *multiple sequence alignment* tiga *sequence DNA* penyandi *sgfpS65T* 1, 2 dan 3 menggunakan Clustal W

```

seqacuan      ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq1          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq2          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq3          ATGG-----GATCAAATCGAAT 17
          ****                               * * * * *

seqacuan      GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
seq1          GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
seq2          GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
seq3          -----TCCCGCG-----GCCGCC-AT 32
          **** * * * * * * * * * *

seqacuan      GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
seq1          GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
seq2          GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
seq3          GGCGG-----CCGGGAG--CAT--GCGACGTCGG-----GCCAA-- 63
          ***          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
seq1          CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
seq2          CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
seq3          -----TTCGCC-----TATAGTG---AGTCGT-----ATTACA----- 89
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
seq1          CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
seq2          CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
seq3          -----ATTCATG-----GCCGTCGTT 106
          * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG 360
seq1          TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG 360
seq2          TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG 360
seq3          TT-----ACAACG-----TCGTGACTGGGAAAA-----CCCTG 134
          **          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
seq1          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
seq2          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
seq3          GCG----TACCCTA--TA-----ATCGCCTT-----GCAGCA-CATCT----- 168
          * *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      AAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
seq1          AAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
seq2          AAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
seq3          -----CCCTTTC---GCCAGCTGGCGTAATAAC 193
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGGAGCGTGCAGCTCGCC 540
seq1          GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGGAGCGTGCAGCTCGCC 540
seq2          GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGGAGCGTGCAGCTCGCC 540
seq3          -----CAAA-----AAGGCCCG-----ACCGA-----TCGCC 216
          ***          *** * * * * * * * * * * * * * * * *

seqacuan      GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
seq1          GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
seq2          GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
seq3          -----CTTCCAACAGTTG- 230
          * * * * * * * * * *

seqacuan      TACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
seq1          TACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
seq2          TACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
seq3          -----CCCAG-----CCTGAATGG-----CAAATGGAC 253
          *****          *****          * * * * * * *

```

```

seqacuan      CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
seq1          CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
seq2          CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
seq3          CCCC-----CTGTAACGGCCC-----ATTAAGCCCGGC--GGGTGTGGTG----GTTA 296
              * *                * * * * *                * * * * * * * * * *                * * *

```

Lampiran 9. Hasil *multiple sequence alignment* dua sekuens DNA penyandi *sgfpS65T 1 & 2* menggunakan Clustal W

```

seq1          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seq2          ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
seqacuan      ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
              *****

seq1          GCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
seq2          GCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
seqacuan      GCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
              *****

seq1          GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
seq2          GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
seqacuan      GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
              *****

seq1          CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
seq2          CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
seqacuan      CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
              *****

seq1          CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
seq2          CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
seqacuan      CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC 300
              *****

seq1          TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG 360
seq2          TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG 360
seqacuan      TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG 360
              *****

seq1          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
seq2          GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
seqacuan      GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
              *****

seq1          AAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
seq2          AAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
seqacuan      AAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
              *****

seq1          GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC 540
seq2          GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC 540
seqacuan      GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC 540
              *****

seq1          GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
seq2          GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
seqacuan      GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC 600
              *****

seq1          TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
seq2          TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
seqacuan      TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
              *****

seq1          CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
seq2          CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
seqacuan      CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA 720
              *****

```

Lampiran 10. Hasil *multiple sequence alignment* asam amino penyandi *sgfpS65T* 1 & 2 menggunakan Clustal W

```

seqacuan
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPT 60
seq1
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPT 60
seq2
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPT 60

*****

seqacuan
LVTTFTTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTL 120
seq1
LVTTFTTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTL 120
seq2
LVTTFTTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEQDTL 120

*****

seqacuan
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 180
seq1
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 180
seq2
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 180

*****

seqacuan
DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYK- 239
seq1
DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYK- 239
seq2
DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHGMDELYK- 239

*****

```

Lampiran 11 . Elektroferogram *sequence 1 (seq1)* penyandi *sgfpS65T* menggunakan *Sequence Scanner*



1st_BASE_404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

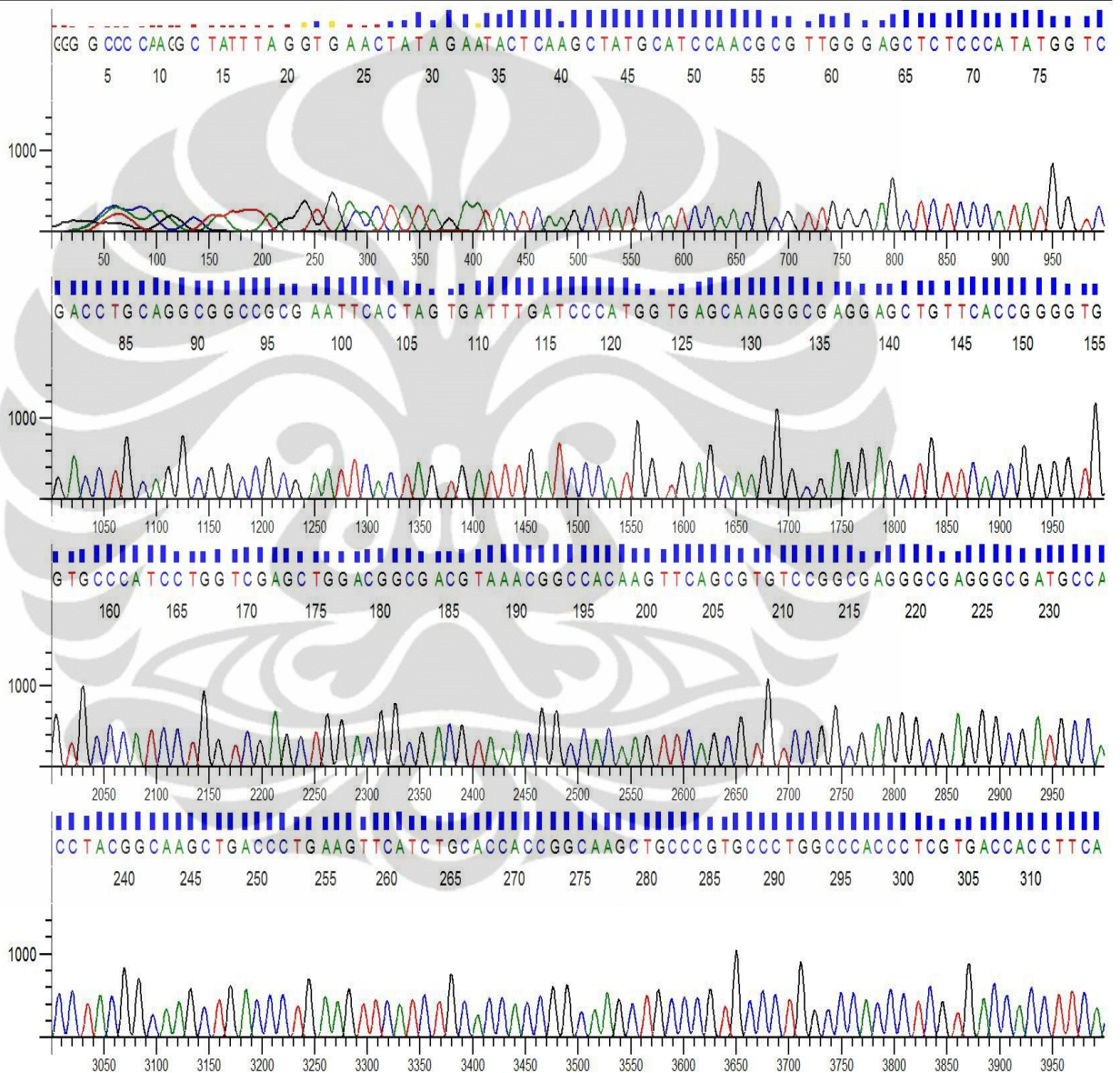
404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

Signal: G:665 A:828 T:638 C:735 AvgSig: 716

C#:10 W:D2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1075 QV20+:1130

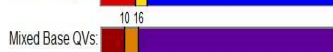


Inst Model/Name:3730x/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12,2011 12:45:57 GMT

Sequence Scanner v1.0



Electropherogram Data Page 1 of 4

Sequence Scanner v1.0



Electropherogram Data Page 1 of 4



1st_BASE_404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

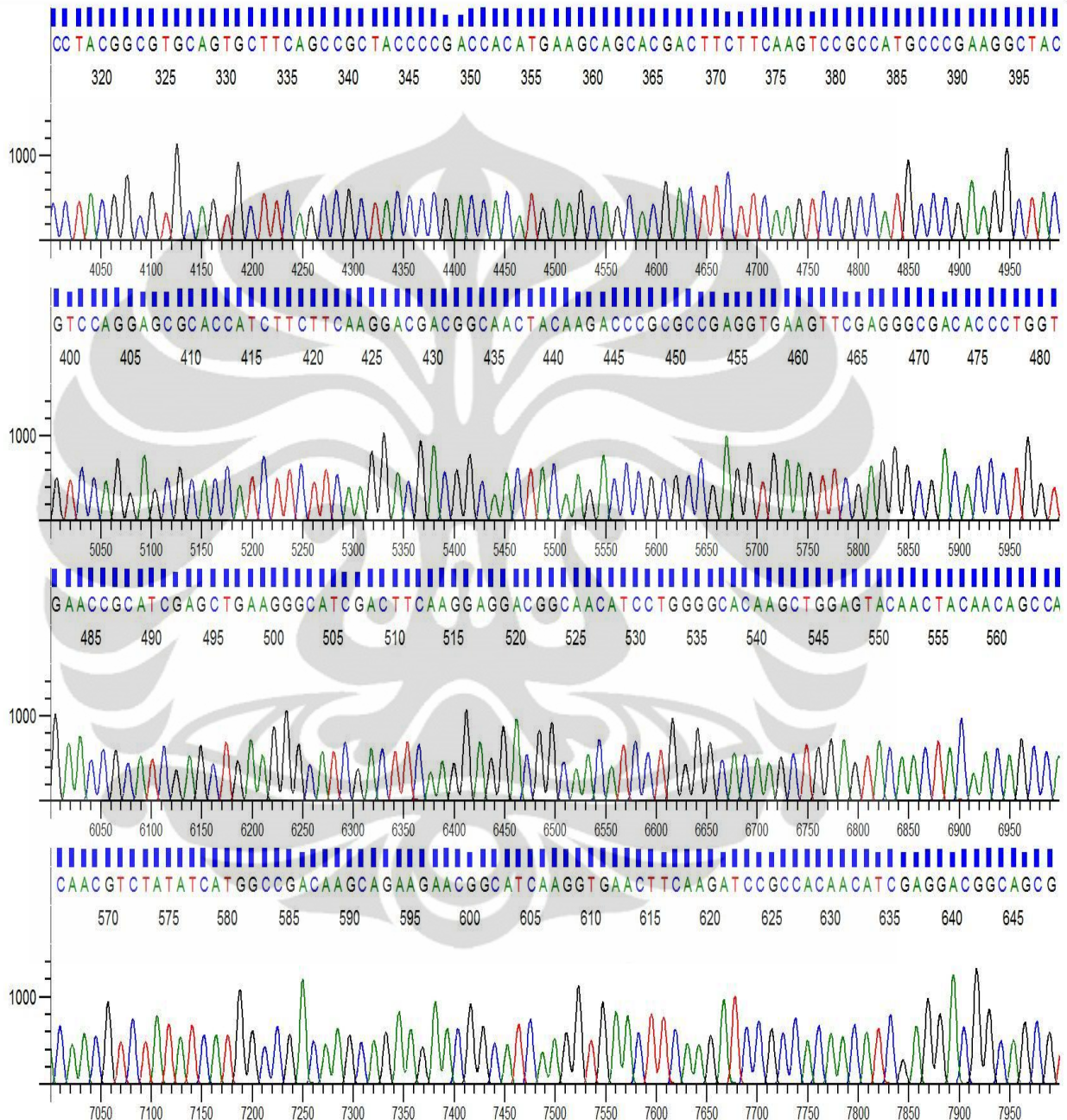
404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

Signal: G:665 A:828 T:638 C:735 AvgSig: 716

C#10 W:D2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1075 QV20+:1130



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12,2011 12:45:57 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 2 of 4



1st_BASE_404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC__-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

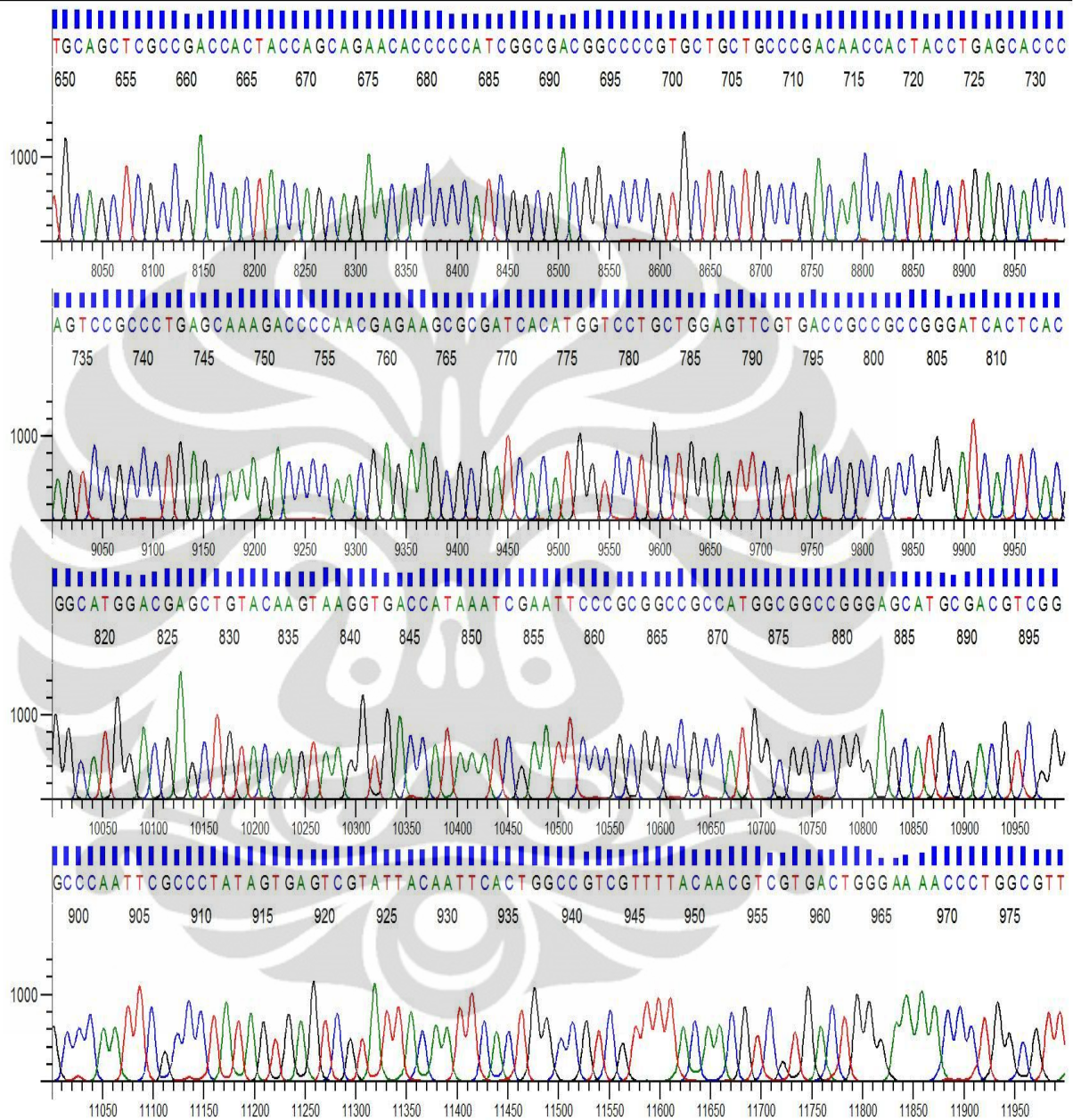
404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC__-26_

KB_3730_POP7_BDTV3.mob

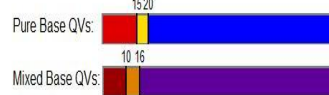
Signal: G:665 A:828 T:638 C:735 AvgSig: 716

C#:10 W:D2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1075 QV20+:1130



Inst Model/Name:3730x/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 12:45:57 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



1st_BASE_404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

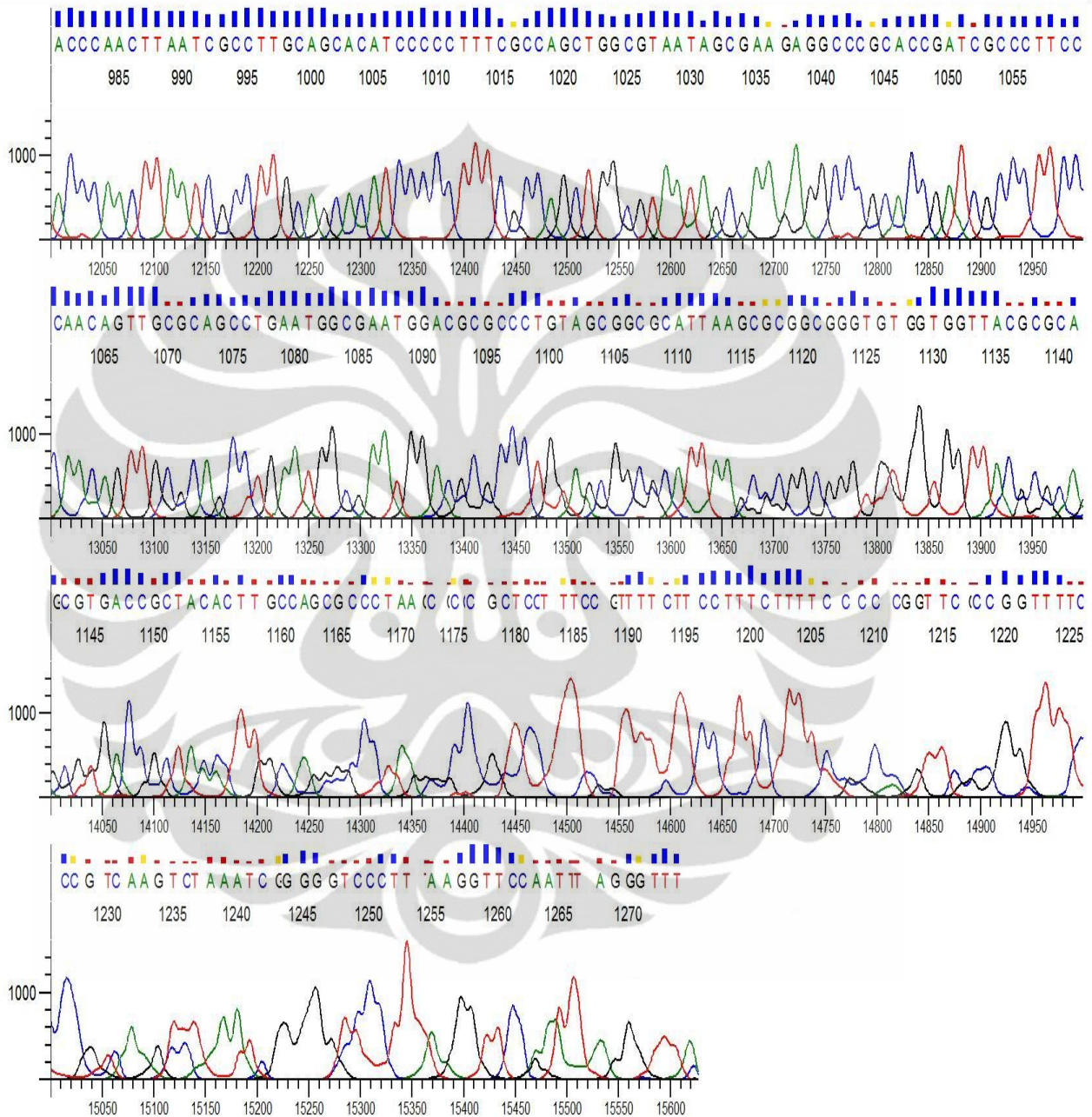
404224_1_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

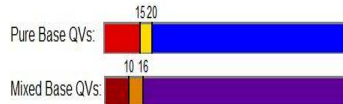
Signal: G:665 A:828 T:638 C:735 AvgSig: 716

Ch#:10 W:D2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1075 QV20+:1130



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12,2011 12:45:57 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 4 of 4

Lampiran 12. Elektroferogram *sequence 2 (seq2)* penyandi *sgfpS65T* menggunakan *Sequence Scanner*



1st_BASE_404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

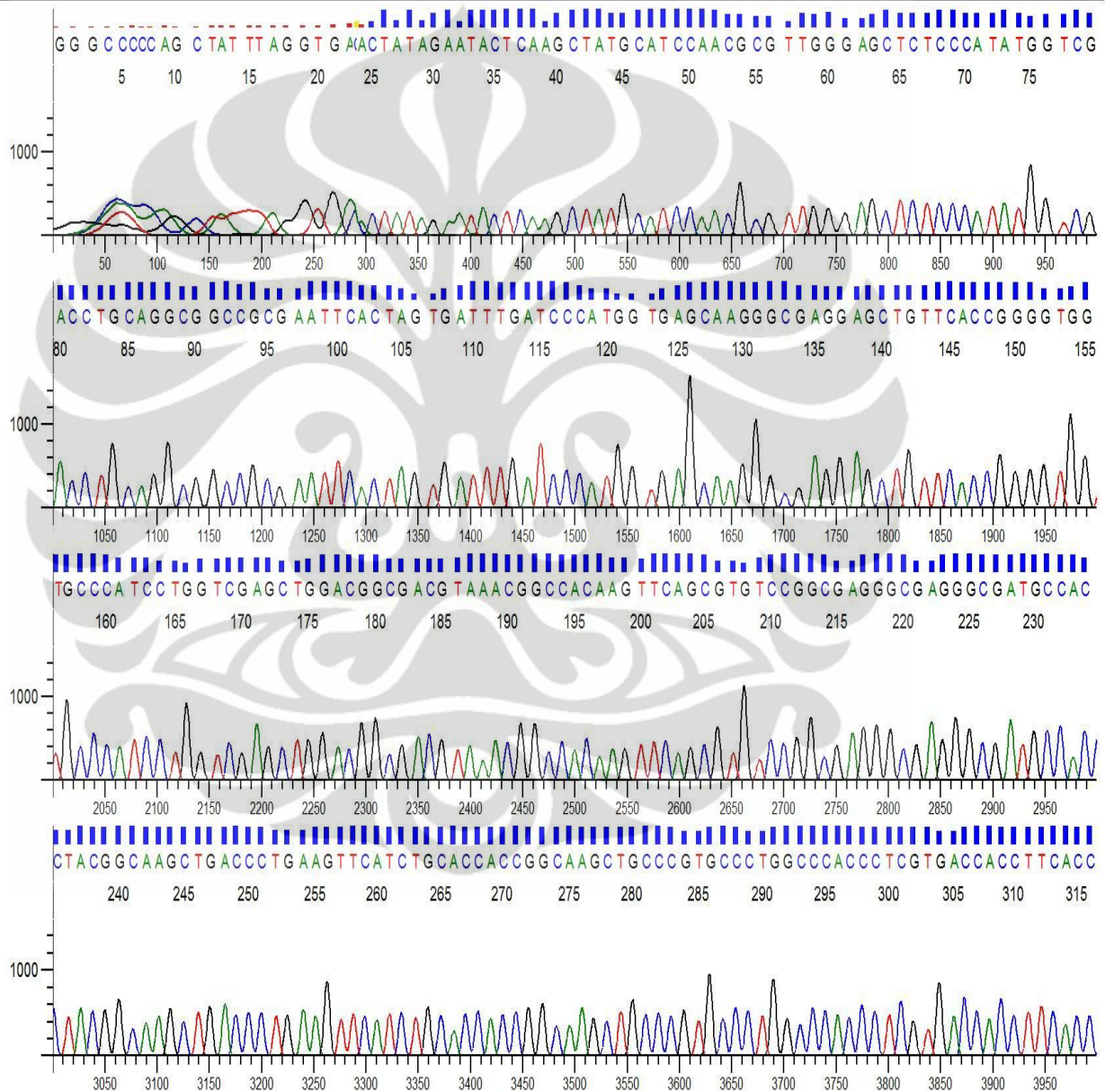
404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

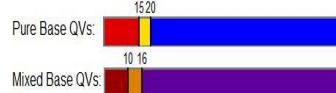
Signal: G:409 A:518 T:432 C:544 AvgSig: 475

C#:8 W:E2 Plate Name:Run6699

TS:42 CRL:1066 QV20+:1126



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12,2011 14:12:08 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 1 of 4



1st_BASE_404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC__26_ab1

KB.1.2 KB.bcp

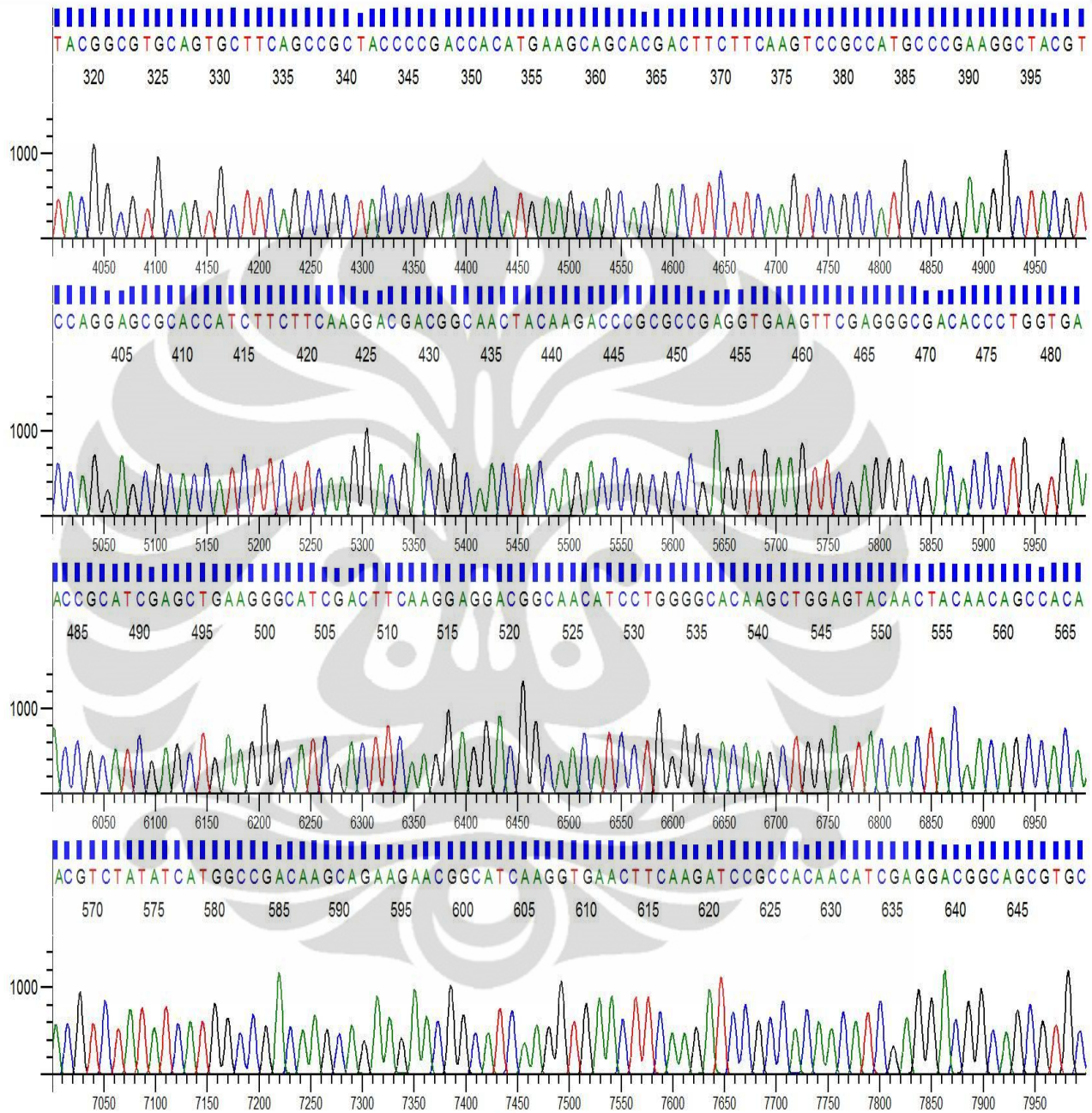
404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC__26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

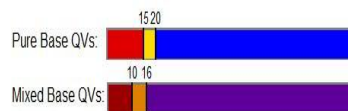
Signal: G:409 A:518 T:432 C:544 AvgSig: 475

C#:8 W:E2 Plate Name:Run6699

TS:42 CRL:1066 QV20+:1126



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 14:12:08 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 2 of 4



1st_BASE_404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB.1.2 KB.bcp

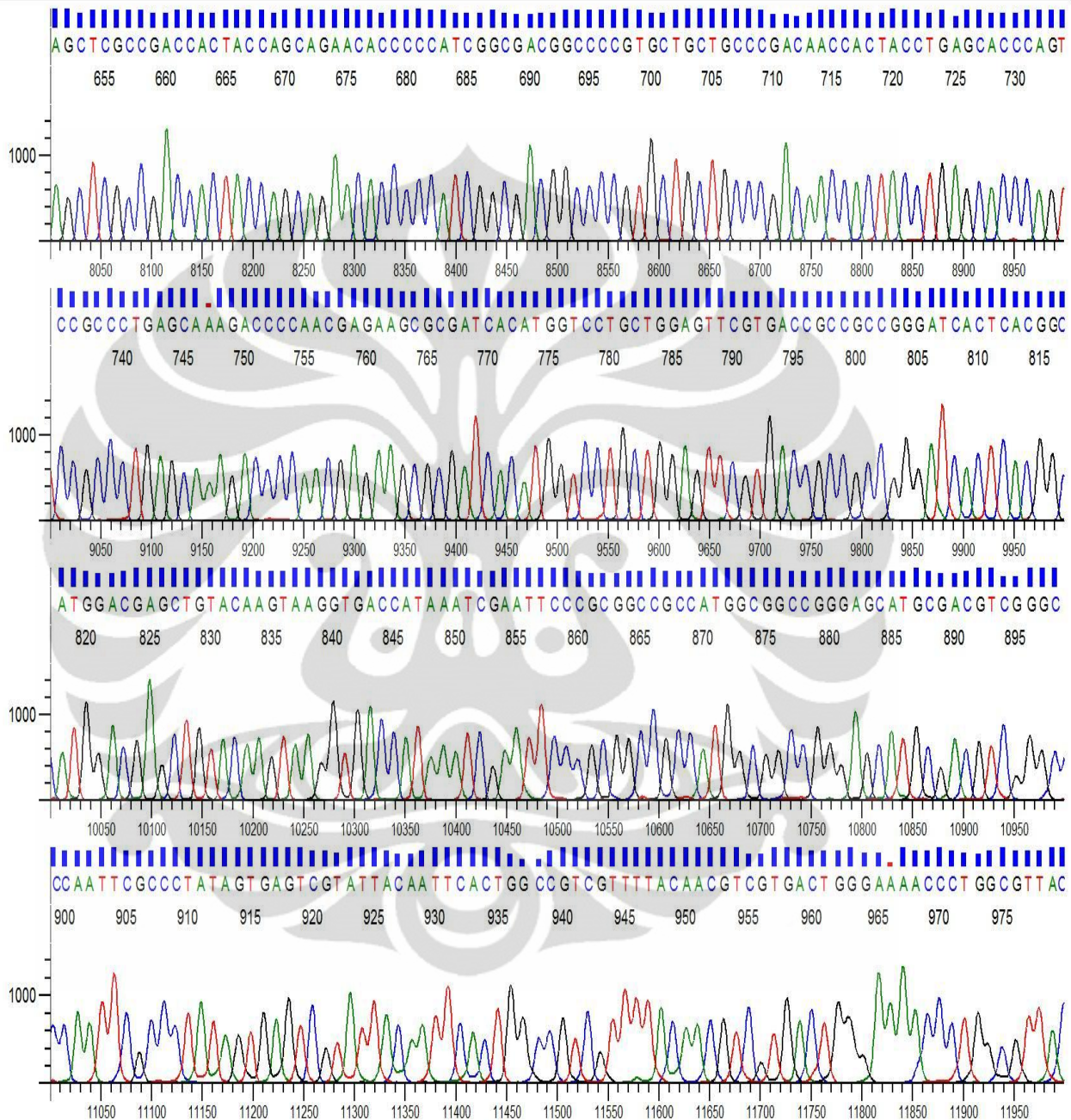
404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

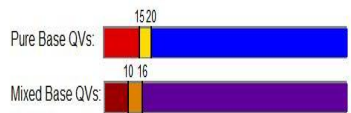
Signal: G:409 A:518 T:432 C:544 AvgSig: 475

C#:8 W:E2 Plate Name:Run6699

TS:42 CRL:1066 QV20+:1126



Inst Model/Name:3730xI/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 14:12:08 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



1st_BASE_404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC__26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

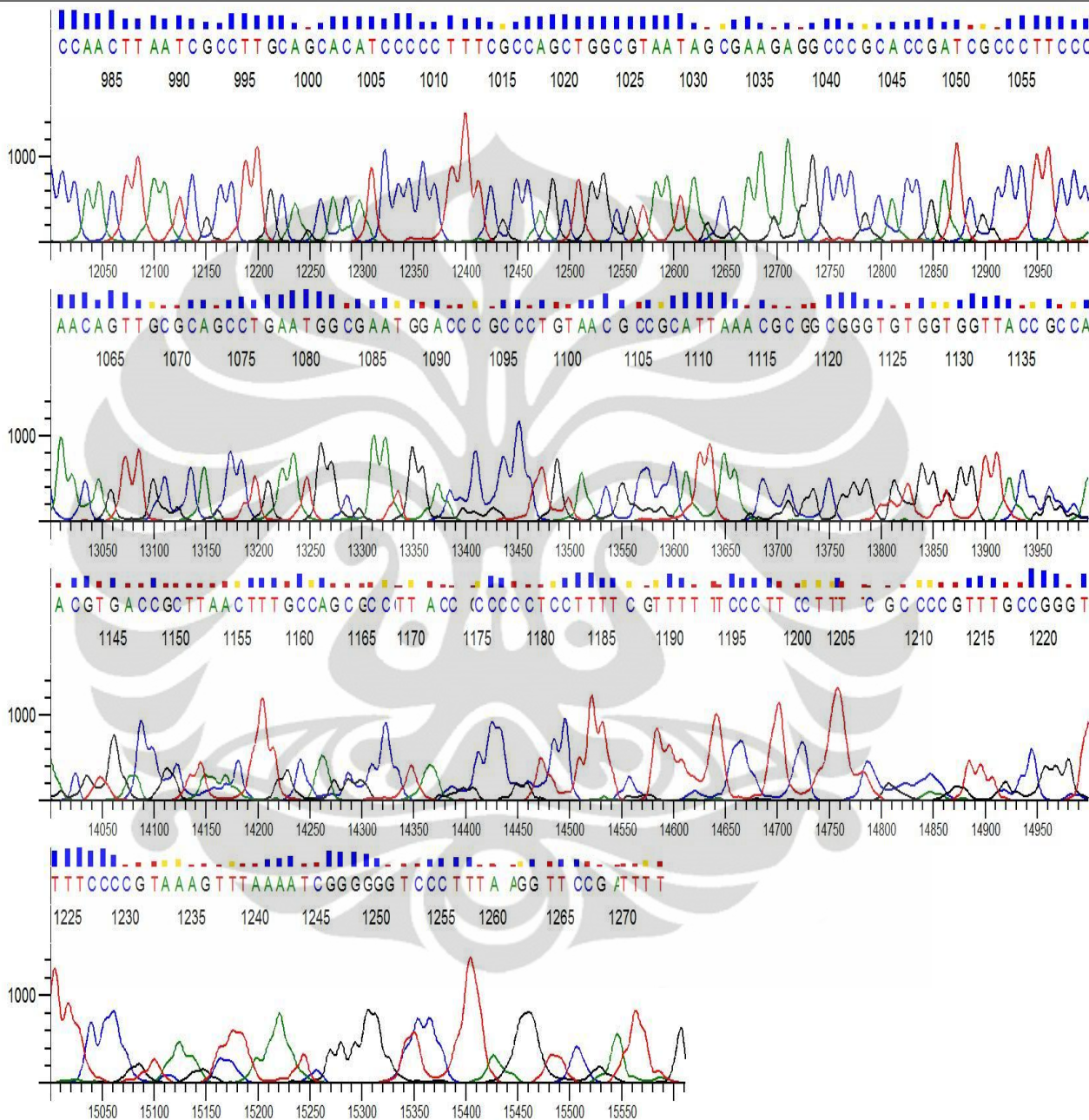
404225_2_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC__26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

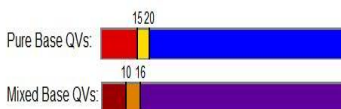
Signal: G:409 A:518 T:432 C:544 AvgSig: 475

C#8 W:E2 Plate Name:Run6699

TS:42 CRL:1066 QV20+:1126



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 14:12:08 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 4 of 4

Lampiran 13 . Elektroferogram *sequence 3 (seq3)* penyandi *sgfpS65T* menggunakan *Sequence Scanner*



1st_BASE_404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

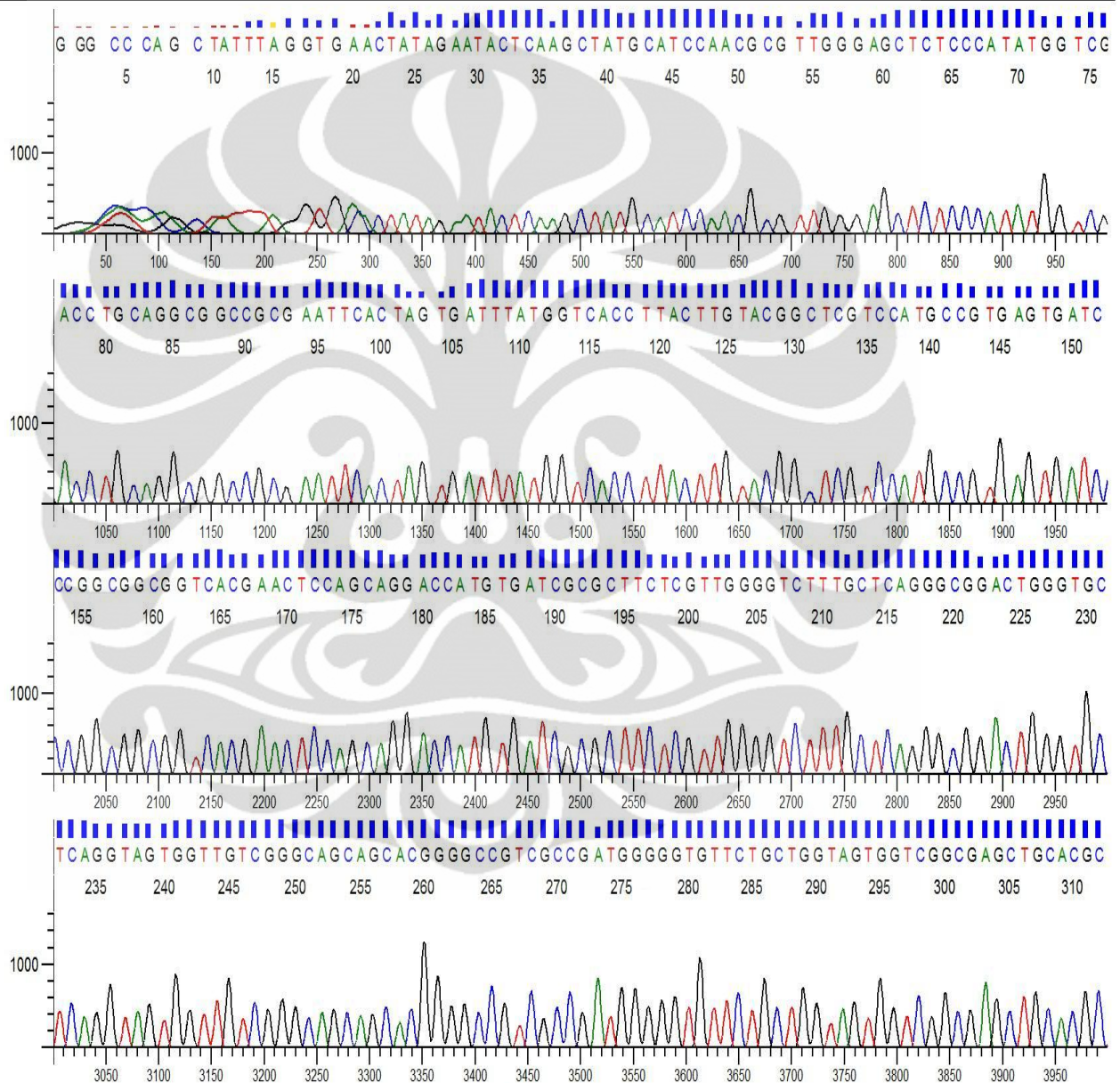
404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

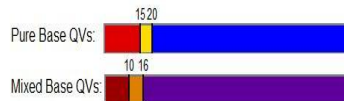
Signal: G:652 A:664 T:912 C:865 AvgSig: 773

C#:6 W:F2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1089 QV20+:1142



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12,2011 15:06:22 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 1 of 4



1st_BASE_404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

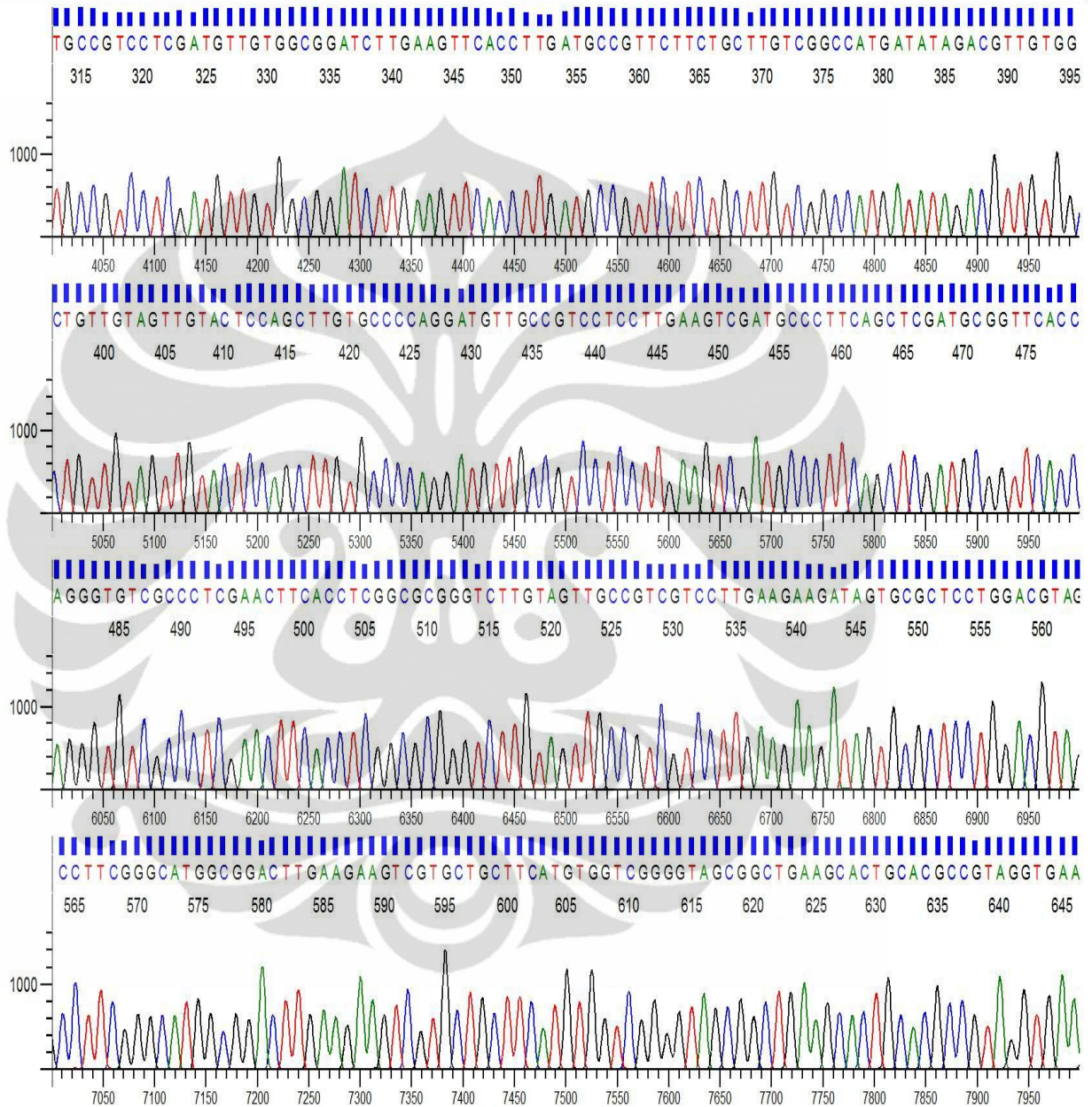
404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

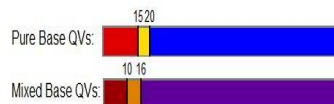
Signal: G:652 A:664 T:912 C:865 AvgSig: 773

C#6 W:F2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1089 QV20+:1142



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 15:08:22 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 2 of 4



1st_BASE_404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC__-26_ab1

KB 1.2 KB.bcp

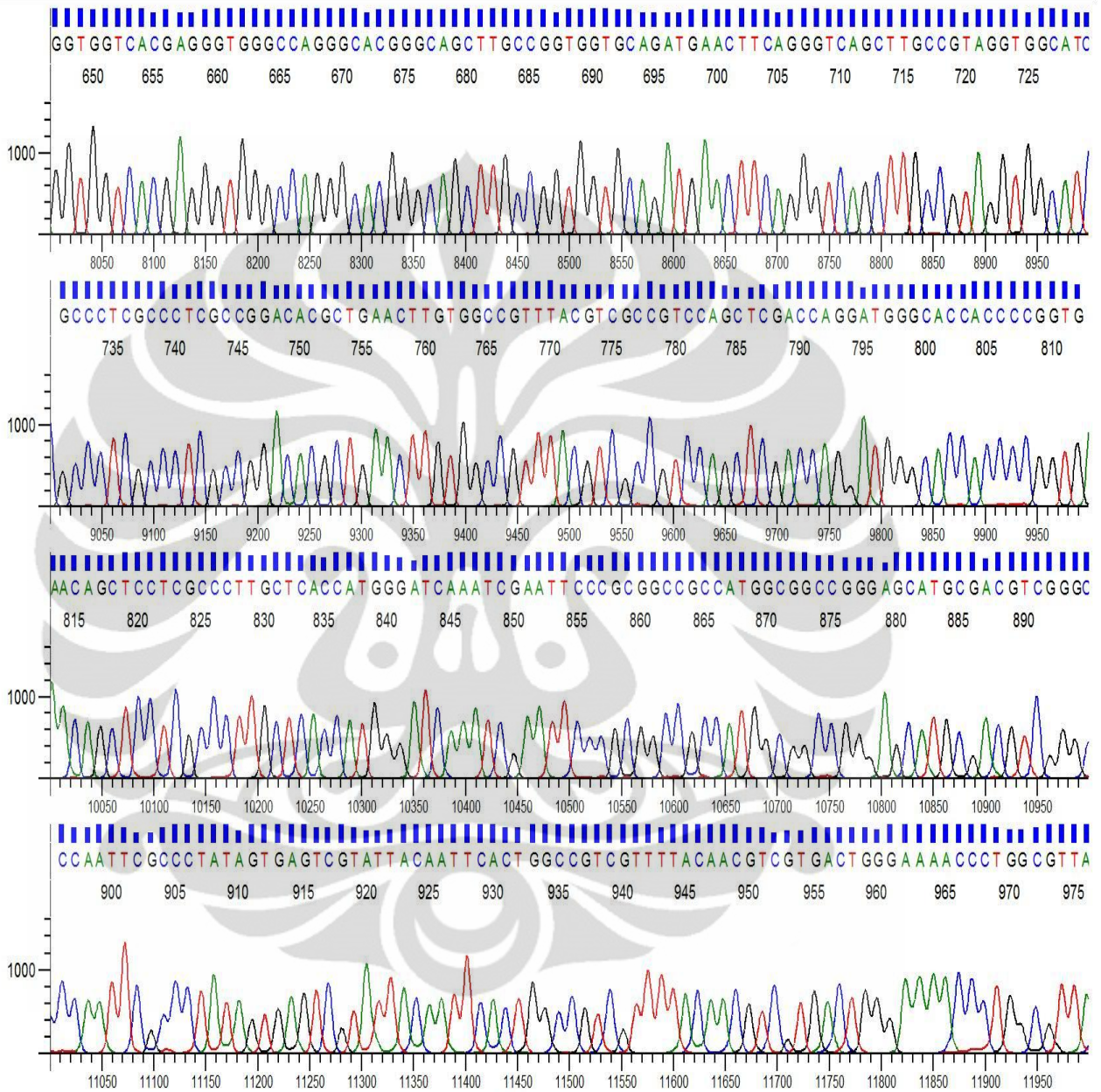
404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC__-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

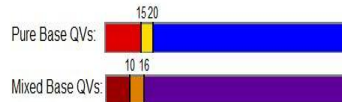
Signal: G:652 A:664 T:912 C:865 AvgSig: 773

C#6 W:F2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1089 QV20+:1142



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 15:06:22 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



1st_BASE_404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T...UC_-26_ab1

KB.1.2 KB.bcp

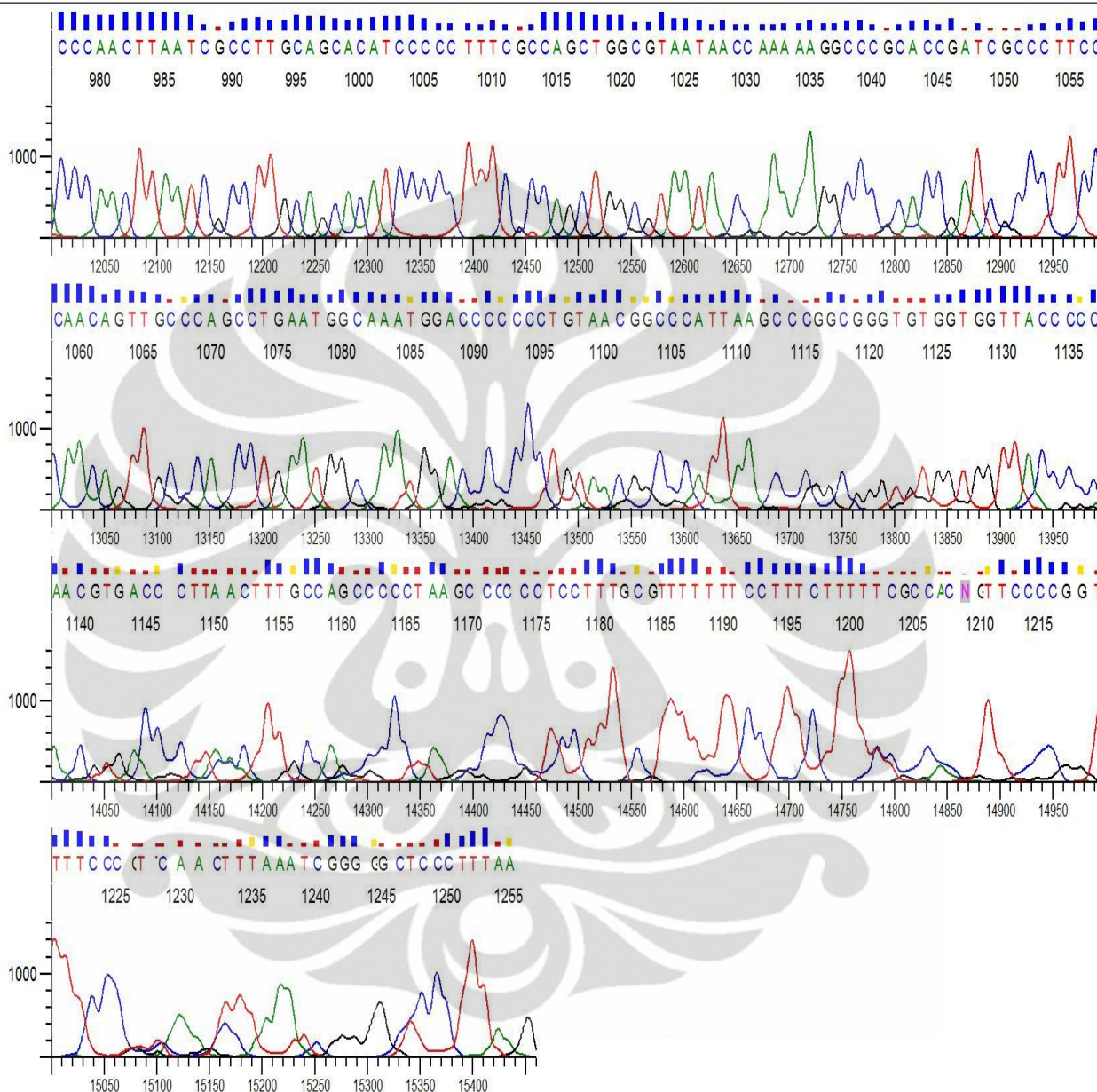
404226_3_pGEM-T_Easy_sgfpS65T_M13R-pUC_-26_

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

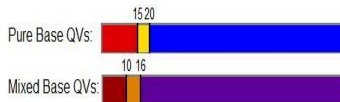
Signal: G:652 A:664 T:912 C:865 AvgSig: 773

C#6 W:F2 Plate Name:Run6699

TS:43 CRL:1089 QV20+:1142



Inst Model/Name:3730xl/ABI-3730-XL-1406-002



Printed on: Jun 12, 2011 15:06:22 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 4 of 4

Lampiran 14 . Elektroferogram *sequence* penyandi *sgfpS65T* dengan primer F *sgfpS65T*



1st_BASE_417563_Sampel_A_Forward_sgfp.ab1

KB 1.2 KB.bcp

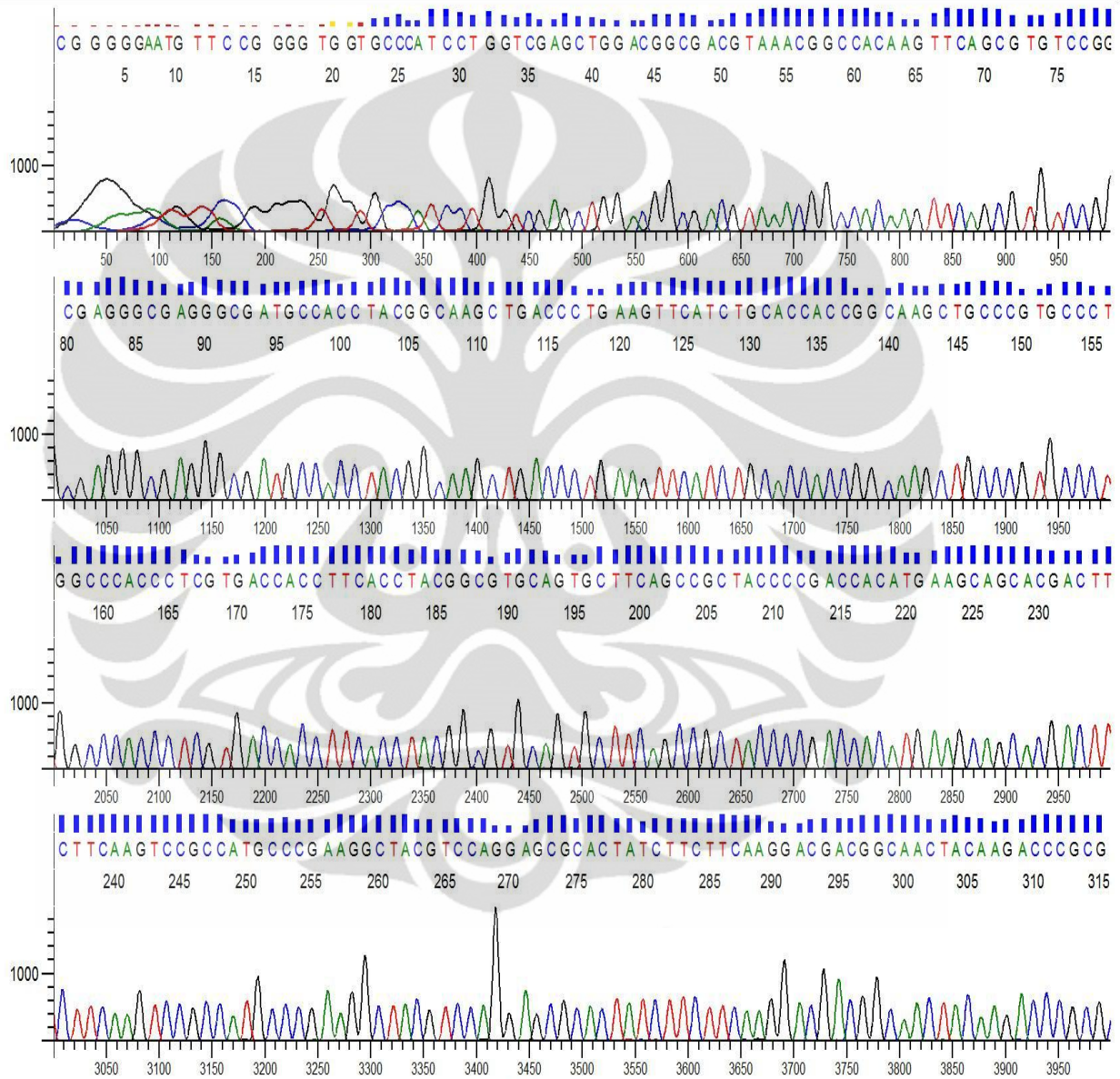
417563_Sampel_A_Forward_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

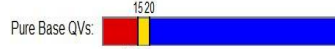
Signal: G:274 A:378 T:246 C:391 AvgSig: 322

C#:31 W:A3 Plate Name:Run6859

TS:42 CRL:1071 QV20+:1104



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12,2011 12:29:35 GMT

Sequence Scanner v1.0



Electropherogram Data Page 1 of 4



1st_BASE_417563_Sampel_A_Forward_sgfp.ab1

KB 1.2 KB.bcp

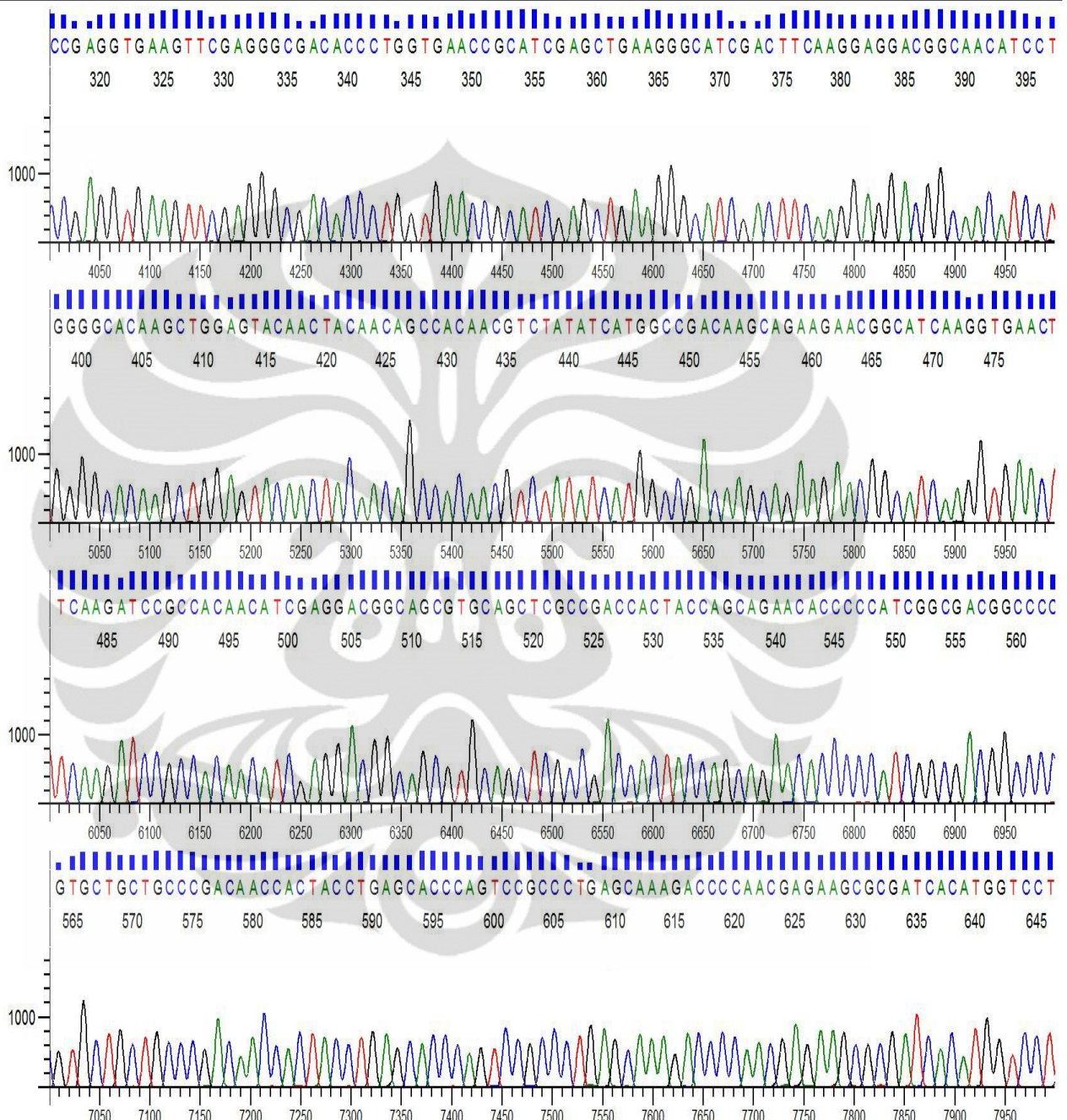
417563_Sampel_A_Forward_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

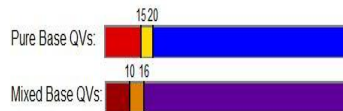
Signal: G:274 A:378 T:246 C:391 AvgSig: 322

C#:31 W:A3 Plate Name:Run6859

TS:42 CRL:1071 QV20+:1104



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12, 2011 12:29:35 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 2 of 4



1st_BASE_417563_Sampel_A_Forward_sgfp.ab1

KB.1.2 KB.bcp

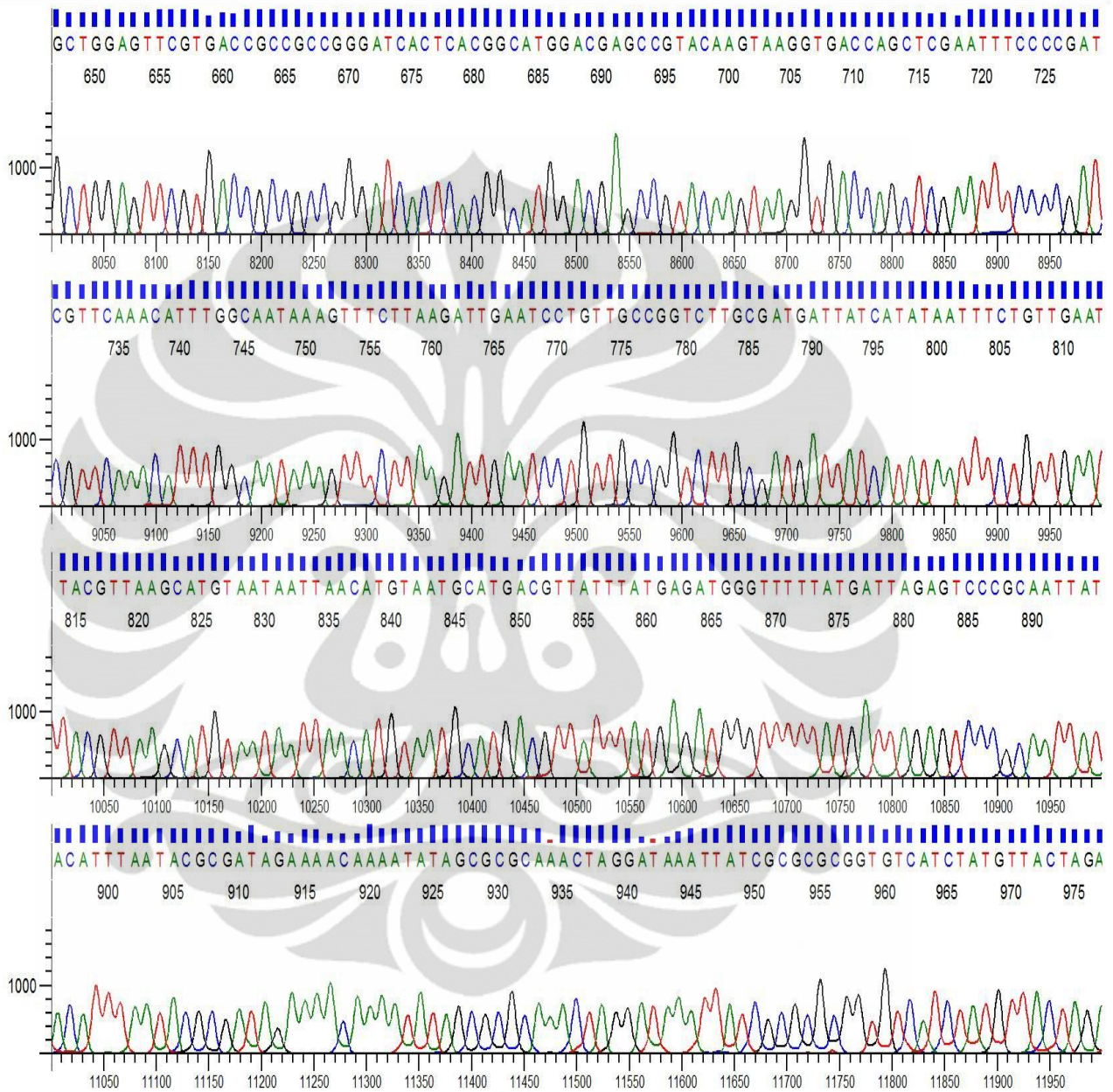
417563_Sampel_A_Forward_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

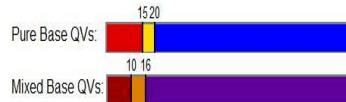
Signal: G:274 A:378 T:246 C:391 AvgSig: 322

C#:31 W:A3 Plate Name:Run6859

TS:42 CRL:1071 QV20+:1104



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12, 2011 12:29:35 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



1st_BASE_417563_Sampel_A_Forward_sgfp.ab1

KB 1.2 KB.bcp

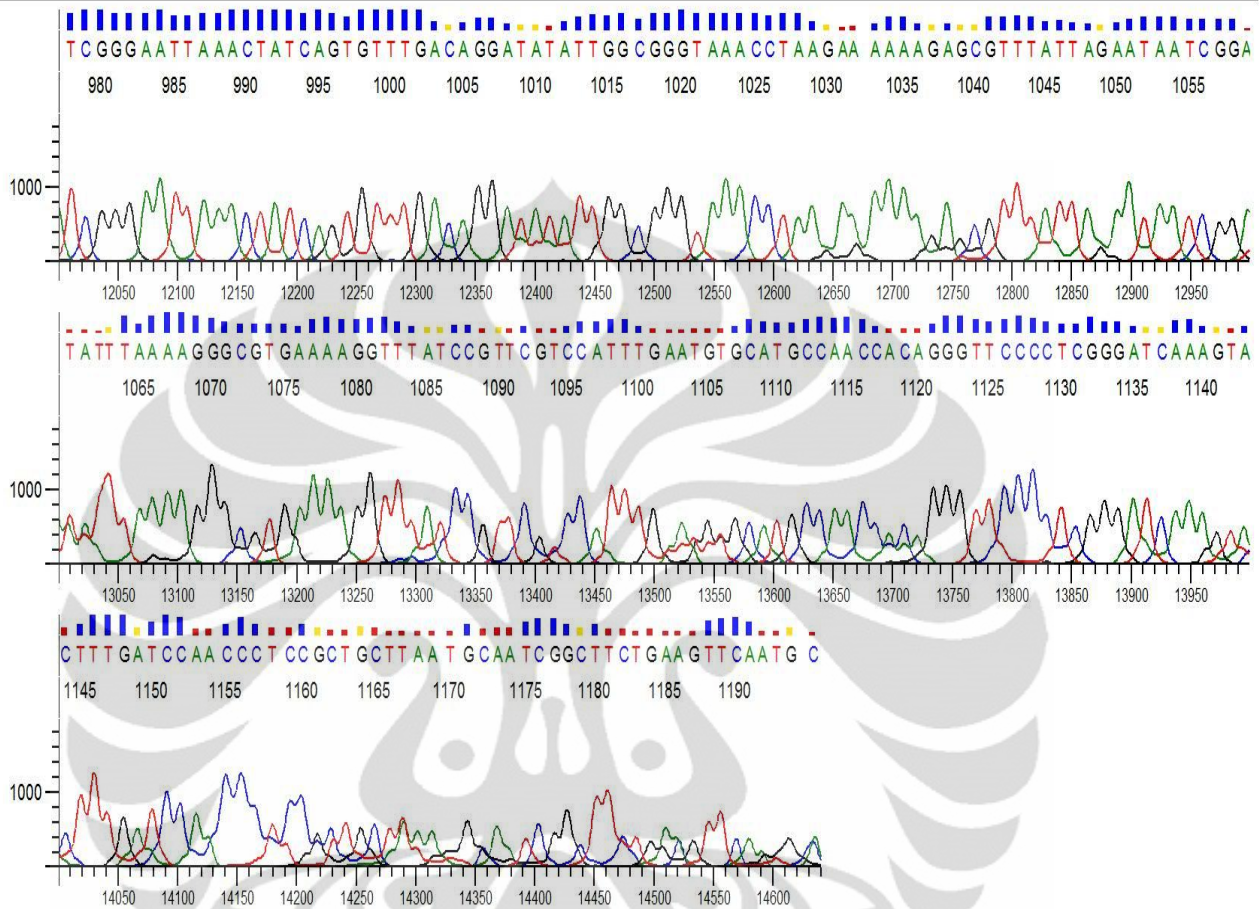
417563_Sampel_A_Forward_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

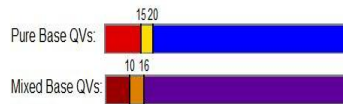
Signal: G:274 A:378 T:246 C:391 AvgSig: 322

C#:31 W:A3 Plate Name:Run6859

TS:42 CRL:1071 QV20+:1104



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12, 2011 12:29:35 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 4 of 4

Lampiran 15 . Elektroferogram *sequence* penyandi *sgfpS65T* dengan primer R *sgfpS65T*



1st_BASE_417564_Sampel_A_Reverse_sgfp.ab1

KB 1.2 KB.bcp

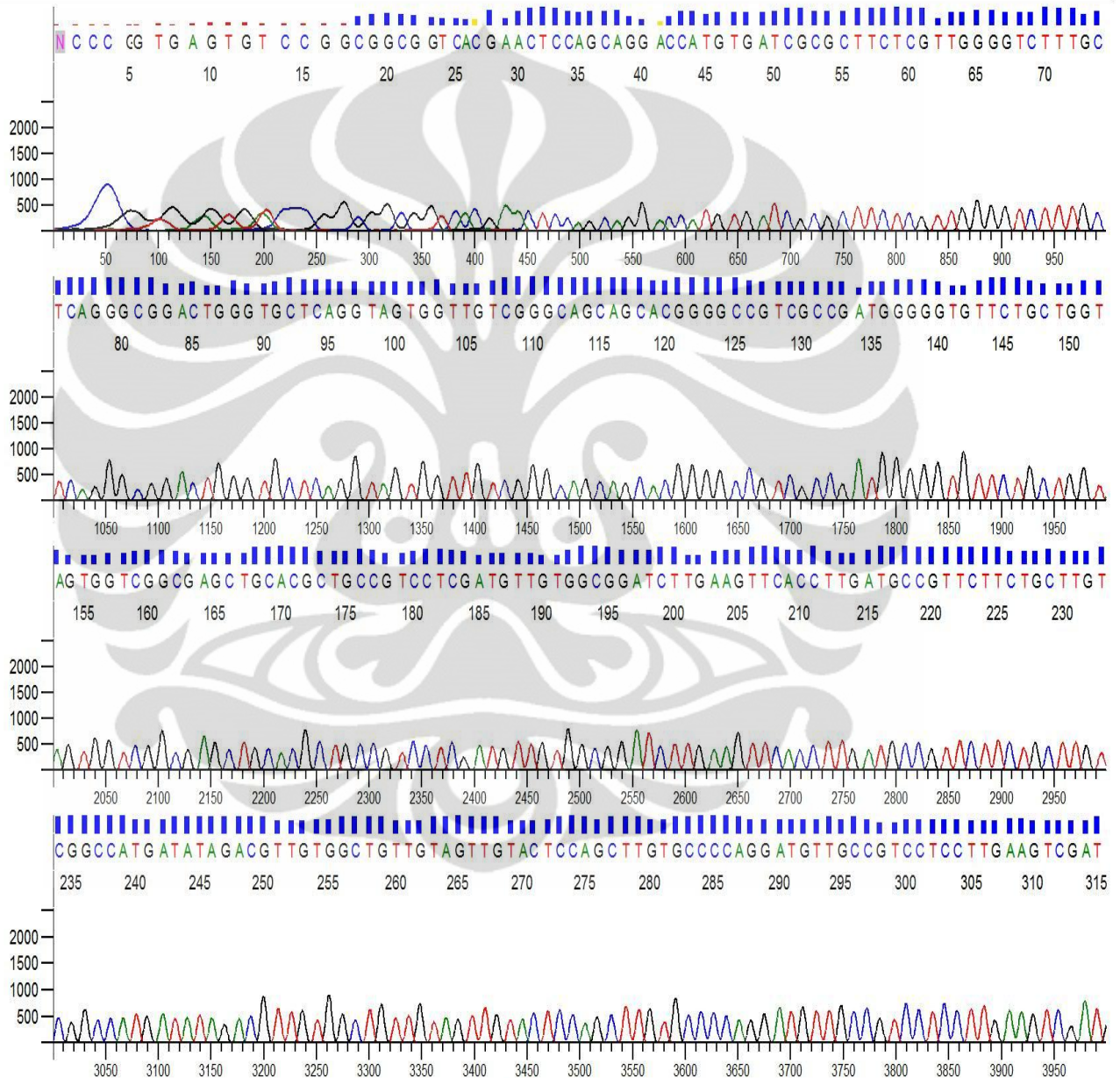
417564_Sampel_A_Reverse_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

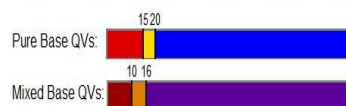
Signal: G:368 A:269 T:311 C:353 AvgSig: 325

C#:29 W:B3 Plate Name:Run6859

TS:43 CRL:960 QV20+968



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12, 2011 19:32:02 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electroferogram Data Page 1 of 4



1st_BASE_417564_Sampel_A_Reverse_sgfp.ab1

KB.1.2 KB.bcp

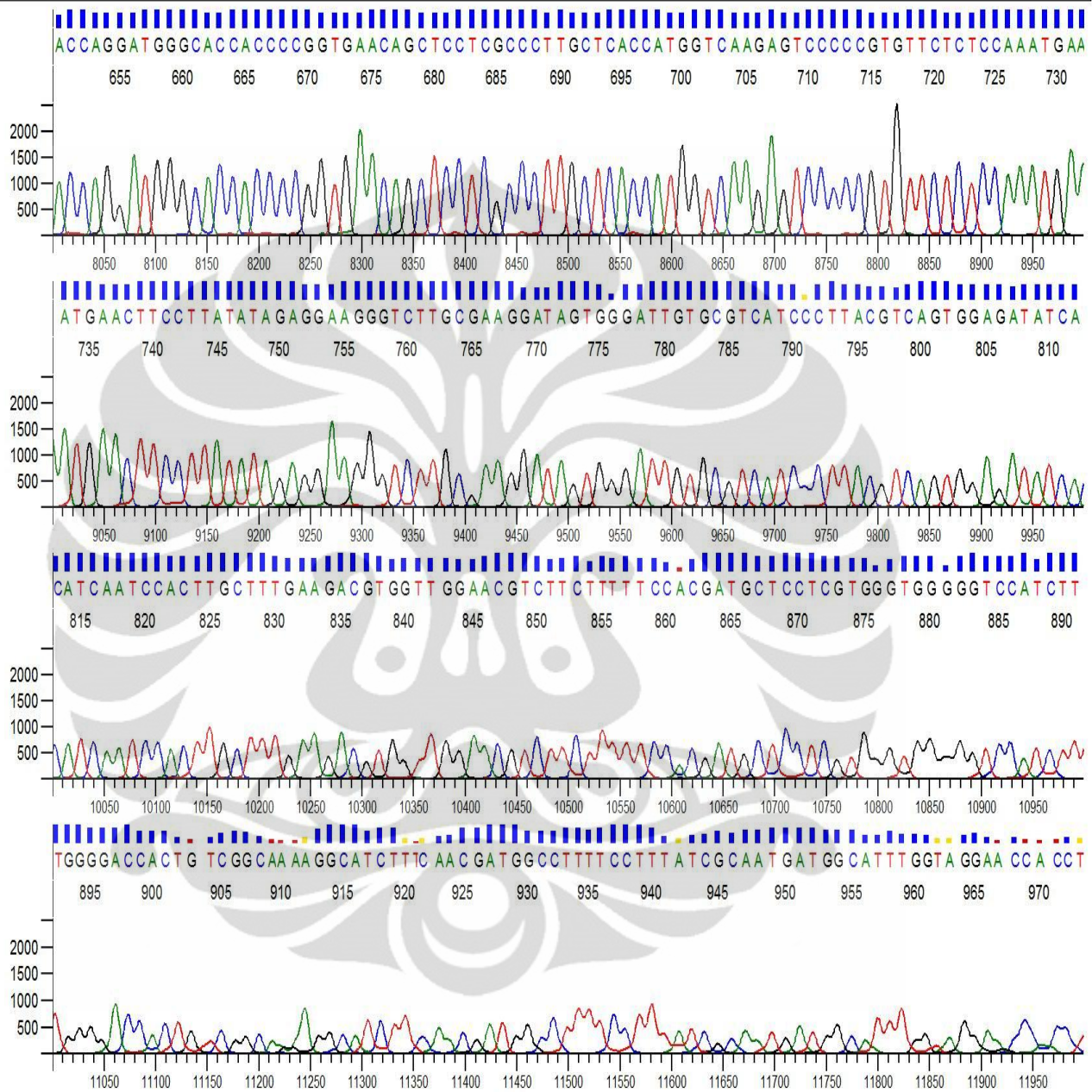
417564_Sampel_A_Reverse_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

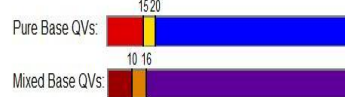
Signal: G:368 A:269 T:311 C:353 AvgSig: 325

C#:29 W:B3 Plate Name:Run6859

TS:43 CRL:960 QV20+968



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12, 2011 19:32:02 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 3 of 4



1st_BASE_417564_Sampel_A_Reverse_sgfp.ab1

KB 1.2 KB.bcp

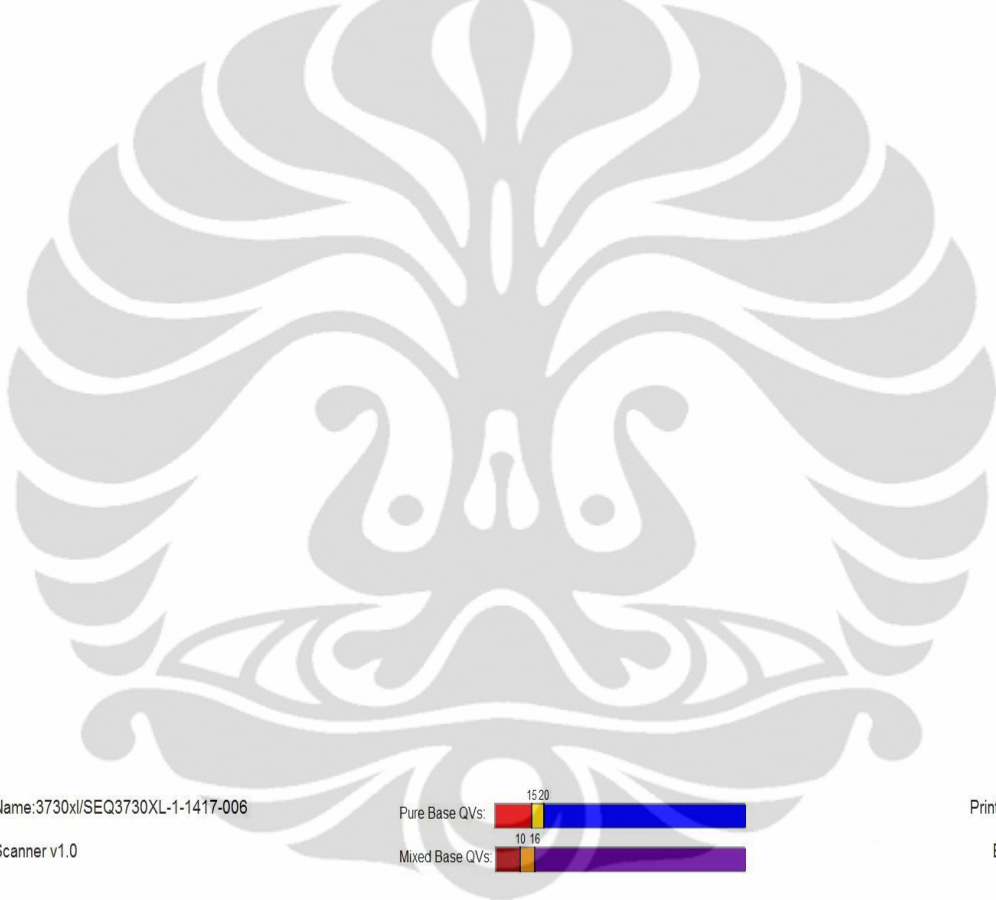
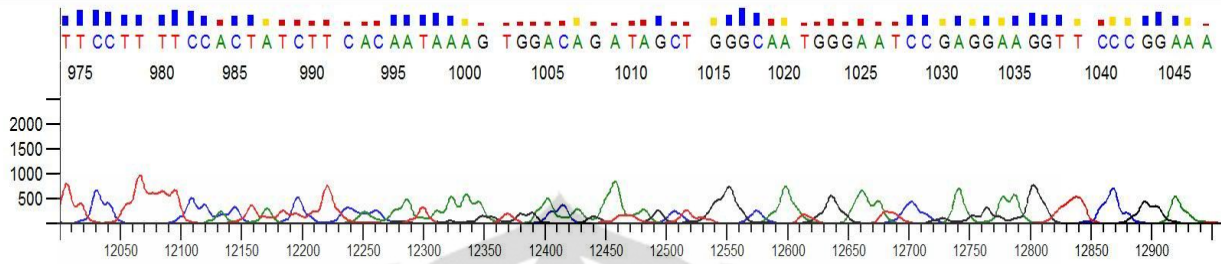
417564_Sampel_A_Reverse_sgfp

KB_3730_POP7_BDTv3.mob

Signal: G:368 A:269 T:311 C:353 AvgSig: 325

C#:29 W:B3 Plate Name:Run6859

TS:43 CRL:960 QV20+:968



Inst Model/Name:3730xl/SEQ3730XL-1-1417-006



Printed on: Jun 12,2011 19:32:02 GMT

Sequence Scanner v1.0

Electropherogram Data Page 4 of 4

Lampiran 16. Hasil *sequence* pDWJ3 dengan primer F *sgfpS65T* dan R *sgfpS65T*.

>pDWJ3_Forward_ *sgfpS65T*

```
CGGGGGAATGTTCCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGA
GGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGTGTACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCC
CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCG
CCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACTATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT
CGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG
GAGTACAACCTACAACAGCCACAAGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGGC
ACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGTGCC
CGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTC
GTGACCCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCCGTACAAGTAAGGTGACCAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAAC
ATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTGCGATGATTATCATATAAATTTCTGTGAATTACGTTA
AGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTA
ACGCTTGTGGCTTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGGGAA
TTAAACTATCAGTGTGACAGGATATATGGCGGGTAAACCTAAGAAAAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAA
AAGGGCGTGAAGGTTTATCCGTTCTGTCATTTGAATGTGCATGCCAACACAGGGTCCCCTCGGGATCAAAGTACTTTG
ATCCAACCTCCGCTGCTTAATGCAATCGGCTTCTGAAGTTCATGC
```

>pDWJ3_Reverse_ *sgfpS65T*

```
NCCCGGTGAGTGTCCGGGGCGGTTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCG
GACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCCGGCAGCAGCAGCGGGCGTCCGGATGGGGGTGTTCTGTGGTGTGGTCCGGGA
GCTGCACGCTGCCGTCFCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGTGTGGCCATGATATA
GAGTTGTGGCTTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCG
ATGCCGTTACACAGGTTGTCGCCCTCGAACTTCACTCCGGCGCGGTTCTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATAGTGC
GCTCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCAATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTG
CACGCCGTAGGTGAAGTGGTTCAGGAGGTTGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGC
TTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTGAACCTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGA
TGGGCACCAACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTACCATGGTCAAGAGTCCCCCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAAC
TTCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGAGGATAGTGGGATGTTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATACATCAATC
CACTTGTCTTGAAGACGTGGTTGGAACGCTCTCTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATCTTTGGGGACCACT
GTCGGCAAAAGGCATCTTCAACGATGGCCTTTCTCTTATCGCAATGATGGCATTTGGTAGAACACCCTTCCCTTTTCCA
CTATCTTCACAATAAAGTGGACAGATAGCTGGGCAATGGGAATCCGAGGAAGTTCCCGGAAA
```

Hasil *reverse complement* pDWJ3_Reverse_ *sgfpS65T* :

```
TTTCCGGGAACCTTCCCTCGGATTCCTTGCACGCTATCTGTCCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAAGGTGGTT
CCTACCAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCCATCGTTGAAAGATGCCTTTTGGCGACAGTGGTCCCAAGATGGA
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCA
CTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAG
AACACGGGGGACTCTTGACCATGGTGAAGCAAGGCGGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGG
CGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATC
TGCACCACCGGCAAGTGGCCGTCGCCCTGGCCACCCTCGTGAACACCTTCACTACGGCGTCCAGCTGCTTCAGCCGCTACC
CCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACTATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC
TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGC
AGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCCGCCACTACCAGCA
GAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCC
AACGAGAAGCGCATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGACACTCACCCGGN
```

Lampiran 17. Hasil *sequence alignment* pDWJ3_Forward_ *sgfpS65T* dengan *reverse complement* pDWJ3_Reverse_ *sgfpS65T*

```
forward -----
reverse TTTCCGGGAACCTTCCCTCGGATTCCTTGCACGCTATCTGTCCACTTTATTGTGAAGA 60

forward -----
```



```

reverse          TAGTGAAAAGGAAAGGTGGTTCCTACCAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCCA 120

forward
reverse        -----
TCGTTGAAAGATGCCTTTTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCACGAGGA 180

forward
reverse        -----
GCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATA 240

forward
reverse        -----
TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTA 300

forward
reverse        -----CGGGGGAATGTT----- 12
TATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCATGGTGAGCAAG 360
                      ***** * **

forward
reverse        -----CGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC 56
GGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC 420
                      *****

forward
reverse        GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC 116
GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC 480
                      *****

forward
reverse        CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACC 176
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACC 540
                      *****

forward
reverse        TTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTC 236
TTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTC 600
                      *****

forward
reverse        TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACTATCTTCTTCAAGGACGAC 296
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACTATCTTCTTCAAGGACGAC 660
                      *****

forward
reverse        GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC 356
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC 720
                      *****

forward
reverse        GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC 416
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC 780
                      *****

forward
reverse        AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG 476
AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG 840
                      *****

forward
reverse        AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG 536
AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG 900
                      *****

forward
reverse        CAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACC 596
CAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACC 960
                      *****

forward
reverse        CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTC 656
CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTC 1020
                      *****

forward
reverse        GTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCCGTACAAGTAAGGTGACCAGCTC 716
GTGACCGCCGCGGA--CACTCAC-----CGGGN----- 1047
                      *****          * *

forward
reverse        GAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGC 776
-----

forward
reverse        CGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAA 836
-----

```

forward CATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATA 896
reverse -----

forward CATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGC 956
reverse -----

forward GGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTAAACTATCAGTGTGACAGGATATATTGG 1016
reverse -----

forward CGGGTAAACCTAAGAAAAAGAGCGTTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAAGGCGTGA 1076
reverse -----

forward AAAGGTTTATCCGTTTCGTCATTGGAATGTGCATGCCAACACAGGGTCCCTCGGGAT 1136
reverse -----

forward CAAAGTACTTTGATCCAACCCTCGCTGCTTAATGCAATCGGCTTCTGAAGTTCAATGC 1195
reverse -----



Lampiran 18. Hasil *sequence alignment* pDWJ3_edit dengan *sequence* acuan *sgfpS65T* dari pDWJ1

```

seq_acuan      ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
pDWJ3_edit    ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC 60
*****

seq_acuan      GCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
pDWJ3_edit    GCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC 120
*****

seq_acuan      GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
pDWJ3_edit    GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC 180
*****

seq_acuan      CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
pDWJ3_edit    CTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG 240
*****

seq_acuan      CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACATCTTC 300
pDWJ3_edit    CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACATCTTC 300
*****

seq_acuan      TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG 360
pDWJ3_edit    TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG 360
*****

seq_acuan      GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
pDWJ3_edit    GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC 420
*****

seq_acuan      AAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
pDWJ3_edit    AAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC 480
*****

seq_acuan      GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC 540
pDWJ3_edit    GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC 540
*****

seq_acuan      GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCAC 600
pDWJ3_edit    GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCAC 600
*****

seq_acuan      TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
pDWJ3_edit    TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC 660
*****

seq_acuan      CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCGTACAAGTAA 720
pDWJ3_edit    CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCGTACAAGTAA 720
*****

```

Lampiran 19. Kode Genetik

		Second Position				
		U	C	A	G	
First Position (5' end)	U	UUU (Phe)	UCU (Ser)	UAU (Tyr)	UGU (Cys)	U
		UUC (Phe)	UCC (Ser)	UAC (Tyr)	UGC (Cys)	C
		UUA (Leu)	UCA (Ser)	UAA (Stop)	UGA (Stop)	A
		UUG (Leu)	UCG (Ser)	UAG (Stop)	UGG (Trp)	G
	C	CUU (Leu)	CCU (Pro)	CAU (His)	CGU (Arg)	U
		CUC (Leu)	CCC (Pro)	CAC (His)	CGC (Arg)	C
		CUA (Leu)	CCA (Pro)	CAA (Gln)	CGA (Arg)	A
		CUG (Leu)	CCG (Pro)	CAG (Gln)	CGG (Arg)	G
	A	AUU (Ile)	ACU (Thr)	AAU (Asn)	AGU (Ser)	U
		AUC (Ile)	ACC (Thr)	AAC (Asn)	AGC (Ser)	C
		AUA (Ile)	ACA (Thr)	AAA (Lys)	AGA (Arg)	A
		AUG (Met/Start)	ACG (Thr)	AAG (Lys)	AGG (Arg)	G
	G	GUU (Val)	GCU (Ala)	GAU (Asp)	GGU (Gly)	U
		GUC (Val)	GCC (Ala)	GAC (Asp)	GGC (Gly)	C
		GUA (Val)	GCA (Ala)	GAA (Glu)	GGA (Gly)	A
		GUG (Val)	GCG (Ala)	GAG (Glu)	GGG (Gly)	G
						Third Position (3' end)

Amino Acid	3-letter code	1-letter code	Codon, Genetic Code
Alanine	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Arginine	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Aspartic acid	Asp	D	GAU, GAC

Cysteine	Cys	C	UGU, UGC
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glutamic acid	Glu	E	GAA, GAG
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Methionine	Met	M	AUG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Start			AUG
Stop			UAG, UGA, UAA

Lampiran 20. Komposisi bahan kimia dan media yang digunakan dalam penelitian

Larutan / media	Cara pembuatan	Acuan
Media LB (<i>Luria bertani</i>) cair	10 g bacto tryptone, 5 g NaCl dan 5 g yeast extract dilarutkan dengan akuades 800 mL. Diukur pH nya hingga 7 lalu ditambahkan akuades hingga 1 L. Disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit)	Sambrook dkk,1989
Media LB (<i>Luria bertani</i>) padat	10 g bacto tryptone, 5 g NaCl, 5 gr yeast extract, dan 15 g bacto agar dilarutkan dengan akuades 800 mL. Diukur pH nya hingga 7,5 lalu ditambahkan akuades hingga 1 L. Disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit).	Sambrook dkk, 1989
TBE 5×	Sebanyak 54 g tris base dan 27,5 g boric acid dilarutkan dengan akuades sekitar 500 mL, lalu ditambahkan dengan 20 mL EDTA 0,5 M pH 8. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 1000 mL, lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit).	Sambrook & Russel (2001)
Tris-Cl 1 M pH 8	Sebanyak 121,1 g tris base dilarutkan dengan akuades sekitar 800 mL, ditambahkan HCl M hingga mencapai pH 8. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 1000 mL, lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit).	Sambrook dkk (1989)
EDTA 0,5 M pH 8	Sebanyak 186,1 g Na ₂ EDTA . 2H ₂ O dilarutkan dengan akuades sekitar 800 mL. Ditambahkan dengan NaOH (~ 20 g pelet) hingga mencapai pH 8. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 200 mL, lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit). ³³	Sambrook dkk (1989)
TE (Tris-EDTA) pH 8	Sebanyak 1 mL Tris-Cl 1 M pH 8 dan 0,5 mL EDTA 0,5 M pH 8 dilarutkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 100 mL.	Sambrook dkk (1989)
Larutan / media	Cara pembuatan	Acuan
Larutan I	50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA (pH 8), campuran larutan ini kemudian diautoklaf selama 15 menit dan disimpan pada suhu 4°C.	Sambrook dkk,1989

Larutan II	Untuk pembuatan 500 mL : 50 mL SDS 10% dan 100 mL NaOH 1 N dilarutkan dengan akuades hingga volume 500 mL	Sambrook dkk, 1989
Larutan III	Untuk pembuatan 100 mL : 60 mL kalium asetat 5M dan 11,5 mL asam asetat glasial dilarutkan dalam 28,5 mL akuades, lalu disimpan pada suhu 4°C.	Sambrook & Russel (1989)
Media SOC	Untuk pembuatan 1 L : 20 g bacto tryptone, 5 g yeast extract, dan 0,5 g NaCl ditambahkan 10 mL KCl 250 mM. Diukur pH nya hingga 7 dengan penambahan NaOH 5 N (~ 0,2 mL). Ditambahkan akuades hingga 1 L dan disterilisasi dengan autoklaf. Setelah disterilisasi ditambahkan dengan 5 mL MgCl ₂ 2M dan 20 mL glukosa 1M steril.	Sambrook dkk (1989)