



TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

PENDAHULUAN

Dalam bioteknologi, manusia berusaha memanipulasi atau memodifikasi organisme atau komponen organisme untuk menghasilkan produk yang diinginkan/bermanfaat.



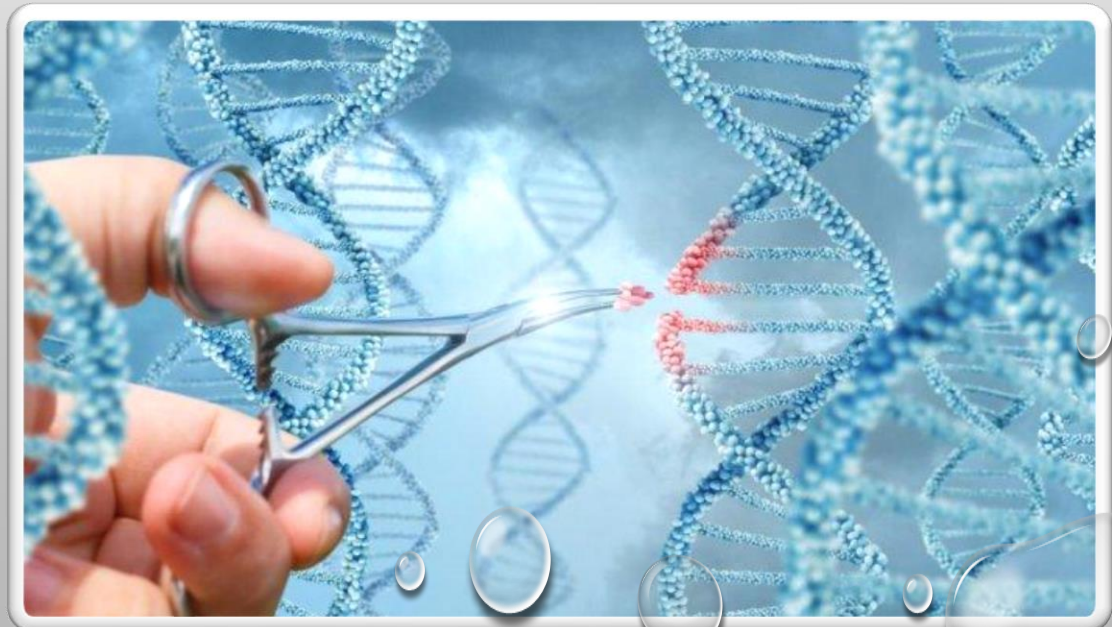
Salah satu bentuk manipulasi tersebut terjadi melalui perubahan informasi genetik (DNA) suatu organisme melalui Rekayasa Genetik.

Rekayasa genetik menggunakan teknologi DNA rekombinan

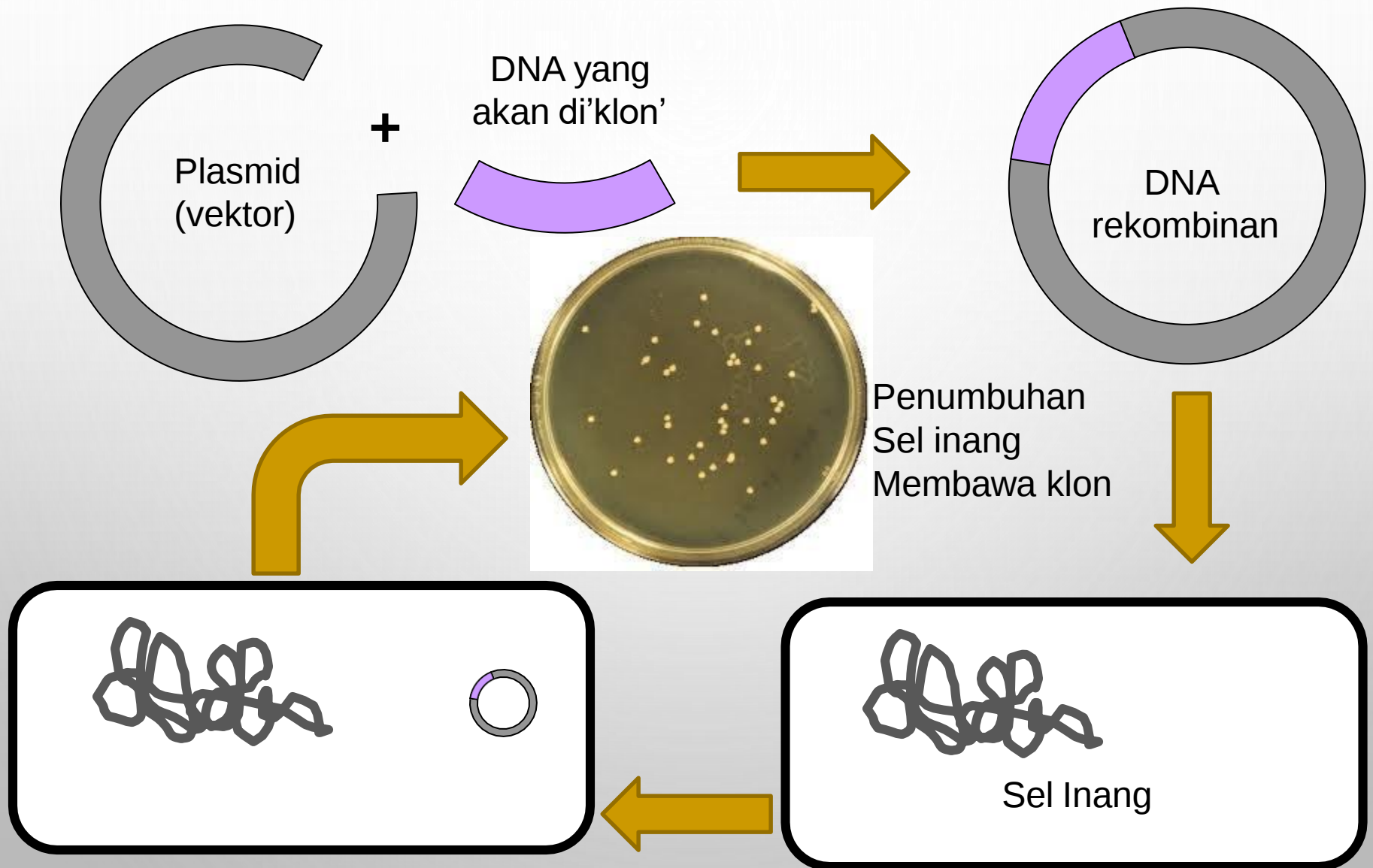


Teknologi DNA rekombinan merupakan kumpulan teknik atau metode yang menggabungkan atau mengkombinasikan gen-gen yang berasal dari sumber-sumber yang berbeda

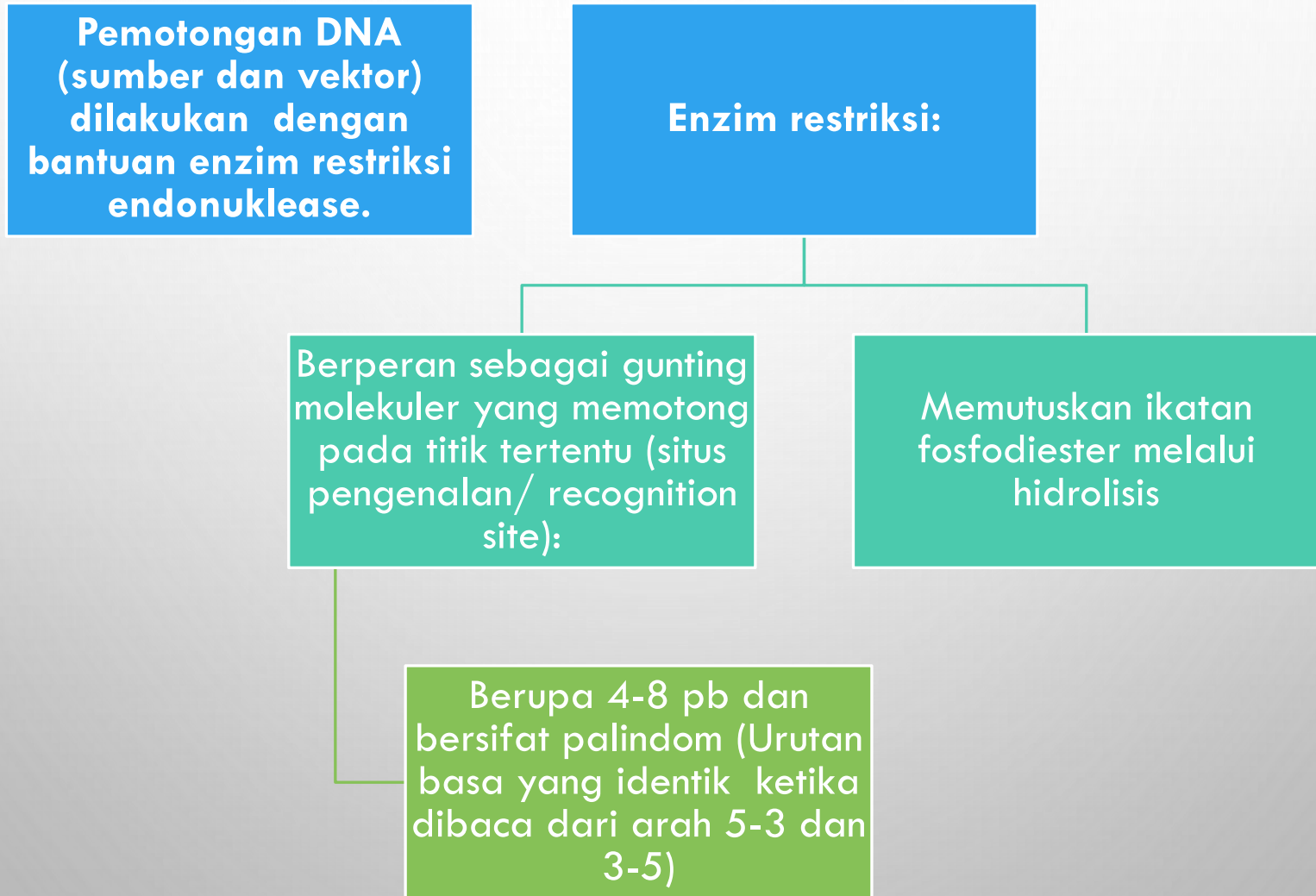
- Teknologi DNA Rekombinan Meliputi:
 - Teknik Pemotongan DNA (Donor Dan Vektor)
 - Teknik Pembentukan DNA Rekombinan
 - Teknik Kloning DNA Rekombinan
 - Teknik Penapisan Hasil Kloning DNA



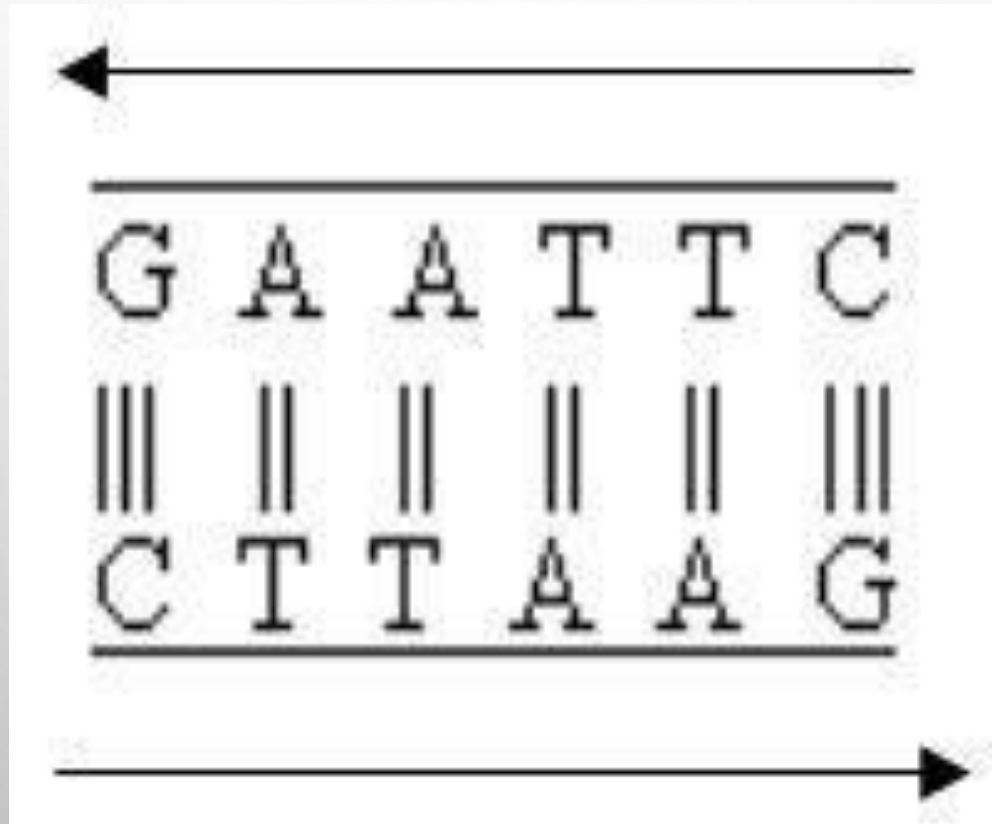
TAHAPAN TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN



TEKNIK PEMOTONGAN DNA



URUTAN BASA PALINDROM



AKTIVITAS ENZIM RESTRIKSI

Scanning

GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Recognition Sequence

GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Cleavage

GGACGCTAGCTGAT**G** **AATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAA** **G**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

TEKNIK PEMOTONGAN DNA (2)

■ Penamaan Enzim Restriksi:

□ EcoRI

- | | |
|--------------------------|----------------------|
| • E= genus (Escherichia) | • co= species (coli) |
| • R= strain | • I = # of enzyme |

■ Enzim restriksi akan menghasilkan dua pola potongan:

- Ujung tumpul (blunt)
- Ujung lengket (overhang atau sticky)

■ Enzim restriksi yang berbeda akan menghasilkan pola potongan yang berbeda pula

JENIS-JENIS ENZIM RESTRIKSI

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a)			
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>		5' overhang
PstI	<i>Providencia stuartii</i>		3' overhang
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>		Blunt ends
(b)			
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>		Blunt ends
HpaII	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		5' overhang

TEKNIK PEMOTONGAN DNA

- DNA sumber (donor) dan vektor dipotong dengan enzim restriksi yang sama
 - DNA Sumber (donor)
 - DNA kromosom
 - DNA yang dihasilkan dari perbanyakan menggunakan PCR
 - cDNA (complementary DNA) yang disintesis menggunakan mRNA sebagai cetakan (template)

TEKNIK PEMOTONGAN DNA

❑ Vektor:

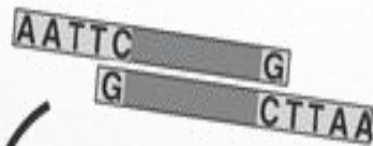
- Merupakan suatu wahana (vehicle) untuk memasukkan suatu potongan DNA ke dalam sel agar DNA tersebut dapat disimpan dan diperbanyak di dalam sel tersebut
- Memiliki situs pengenalan bagi enzim restriksi; dapat bereplikasi/memperbanyak diri pada sel inang; dapat memuat gen yang akan dimasukan; mengandung penanda selektif (selectable marker)
- Berupa:
 - ❑ plasmid (umum);
 - ❑ bakteriofage;
 - ❑ kosmid;
 - ❑ BACs (Bacterial Artificial Chromosome); dan YACs (Yeast Artificial Chromosome)

TEKNIK PEMBENTUKAN DNA REKOMBINAN

- DNA donor maupun vektor yang telah dipotong dengan enzim restriksi yang sama akan saling berhibridisasi (perpasangan basa-basa komplementer) melalui pembentukan ikatan-H pada ujung-ujungnya (sticky ends)
- Enzim Ligase membentuk ikatan fosfodiester antar DNA donor dan vektor
 - Terbentuk DNA rekombinan

HIBRIDISASI DAN LIGASI DNA REKOMBINAN

DNA fragment from another source is added. Base pairing of sticky ends produces various combinations.



Fragment from different DNA molecule cut by the same restriction enzyme

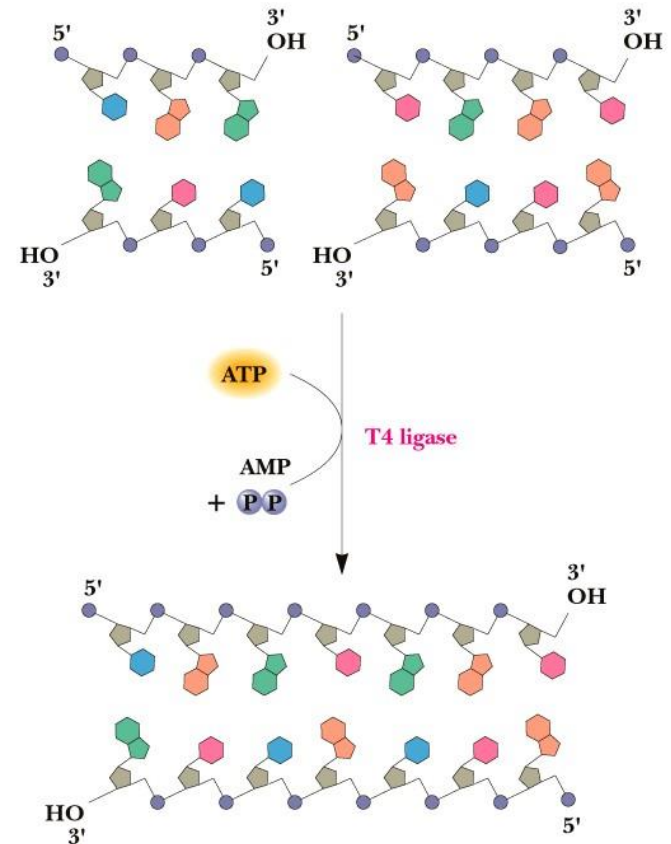


One possible combination

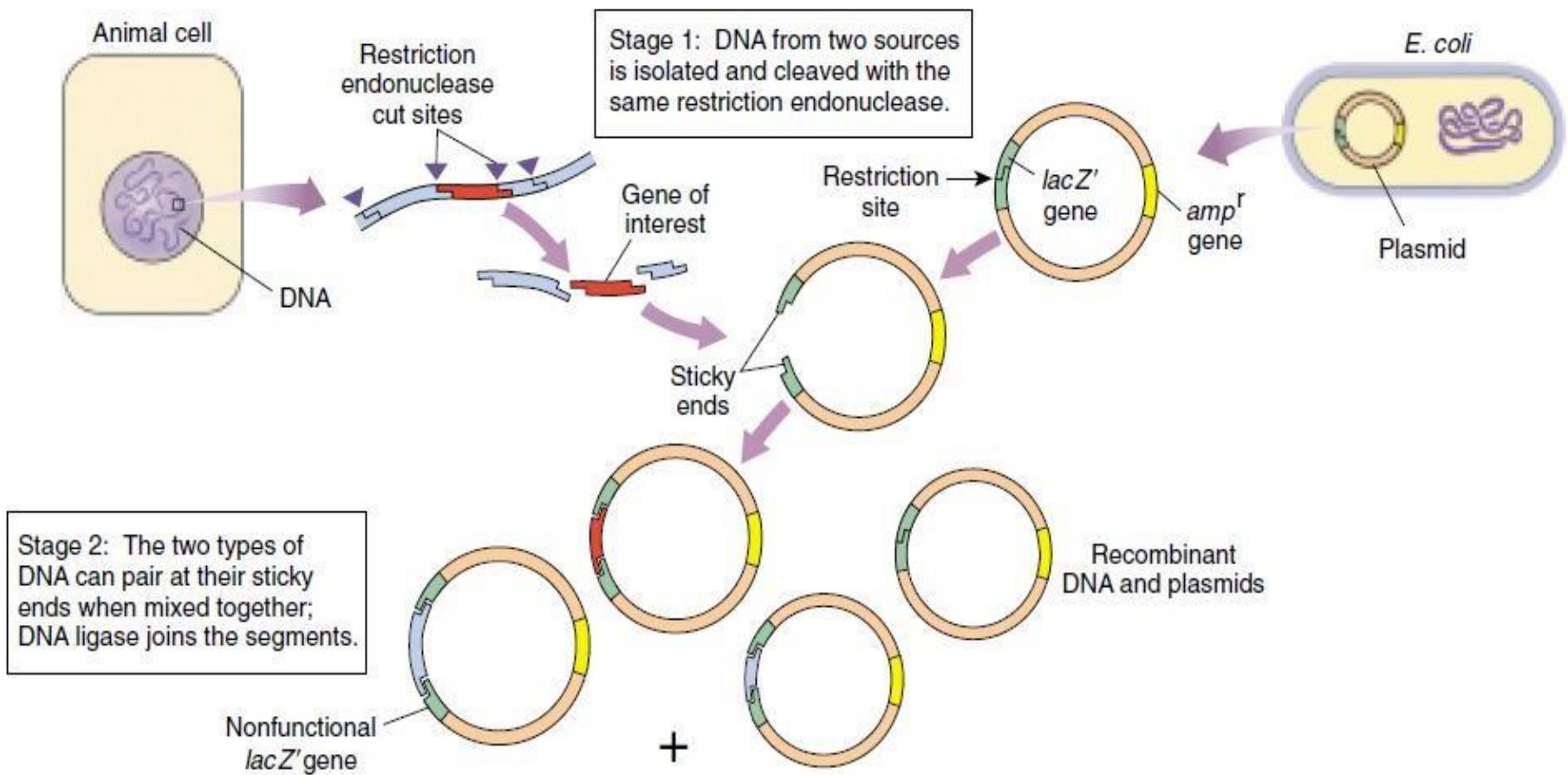
DNA ligase seals the strands.



Recombinant DNA molecule



TEKNIK PEMBENTUKAN DNA REKOMBINAN



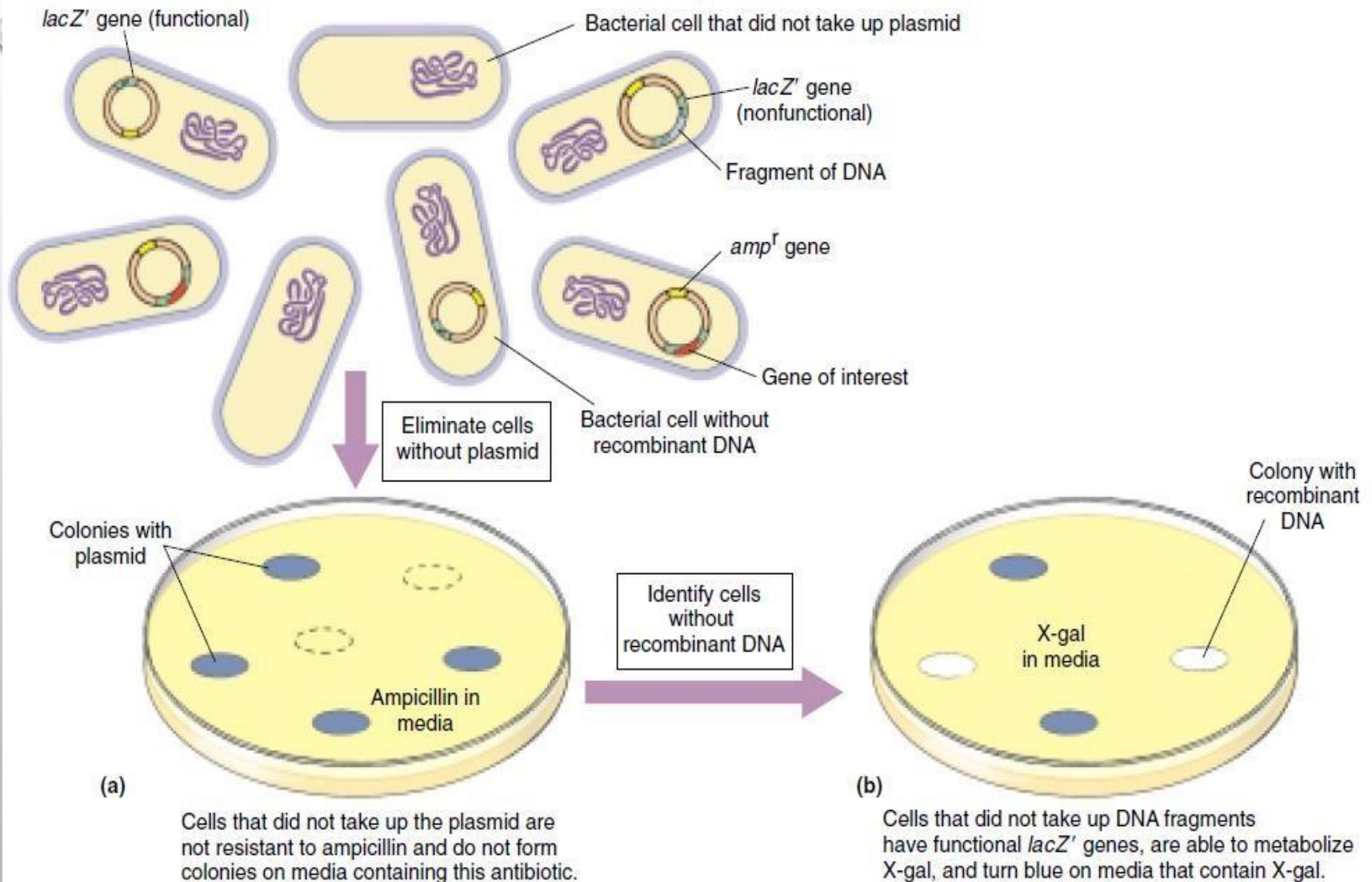
TEKNIK KLONING DNA REKOMBINAN

- DNA rekombinan yang telah terbentuk selanjutnya diintroduksi ke dalam sel inang melalui proses transformasi
- Sel inang yang digunakan umumnya berupa sel bakteri (*E.coli*):
 - Informasi genetiknya sudah sangat dipahami
 - Tumbuh cepat dan tidak banyak persyaratan
 - Dapat menerima berbagai vektor, mudah ditransformasi

TEKNIK PENAPISAN HASIL KLONING DNA

- Penapisan dilakukan dengan menumbuhkan bakteri inang pada media selektif
 - Mengandung antibiotik:
 - Mengandung senyawa tertentu: X-gal
- Bakteri inang yang membawa plasmid rekombinan akan resisten terhadap antibiotik dan tidak mampu mengubah memecah X-gal (koloni berwarna putih)

TEKNIK PENAPISAN HASIL KLONING DNA



SELEKSI GEN YANG DIKLONING

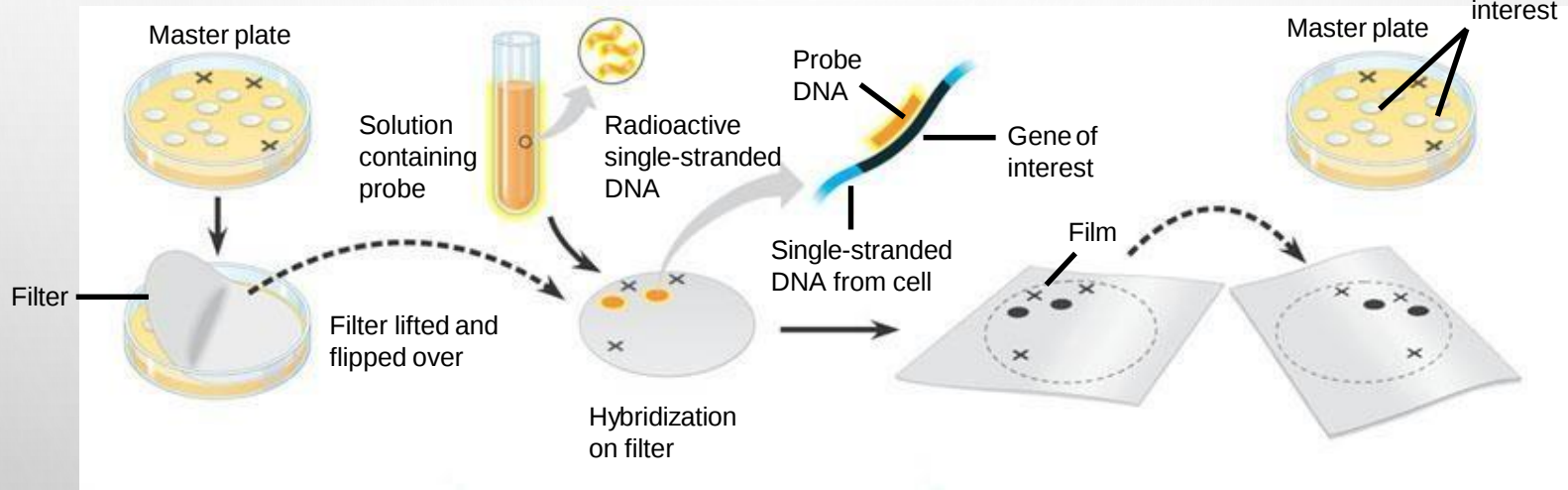
- Bakteri inang yang membawa plasmid rekombinan (berisi gen yang diinginkan maupun potongan gen yang tidak diinginkan) harus diseleksi
- Dilakukan dengan cara hibridisasi asam nukleat dengan menggunakan suatu penanda (probe)
 - Probe asam nukleat diberi label radio isotop sehingga pada saat penelusuran dapat dilihat DNA klon yang komplementer dengan DNA probe yang berikatan hidrogen secara spesifik.

SELEKSI GEN YANG DIKLONING (2)

APPLICATION Hybridization with a complementary nucleic acid probe detects a specific DNA within a mixture of DNA molecules. In this example, a collection of bacterial clones (colonies) are screened to identify those carrying a plasmid with a gene of interest.

TECHNIQUE Cells from each colony known to contain recombinant plasmids (white colonies in Figure 20.4, step 5) are transferred to separate locations on a new agar plate and allowed to grow into visible colonies. This collection of bacterial colonies is the master plate.

Colonies containing gene of interest

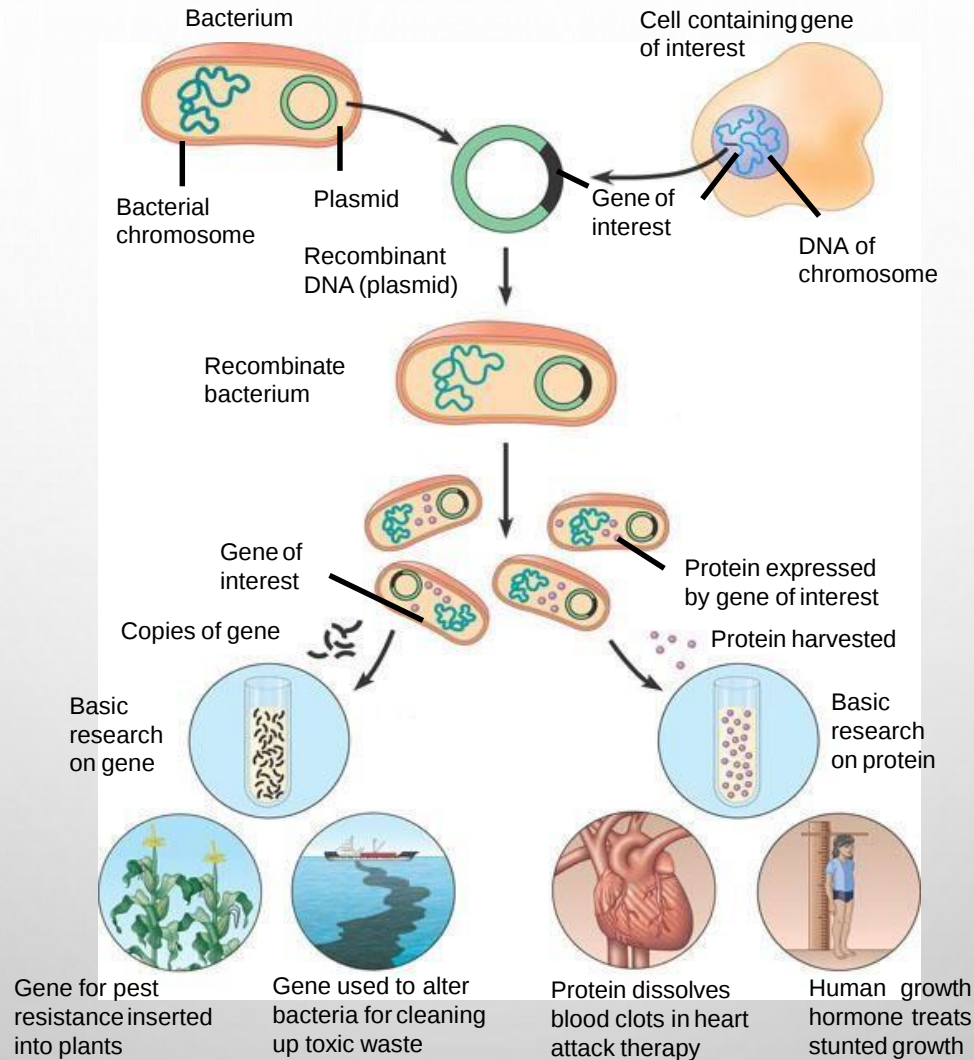


RESULTS Colonies of cells containing the gene of interest have been identified by nucleic acid hybridization. Cells from colonies tagged with the probe can be grown in large tanks of liquid growth medium. Large amounts of the DNA containing the gene of interest can be isolated from these cultures. By using probes with different nucleotide sequences, the collection of bacterial clones can be screened for different genes.

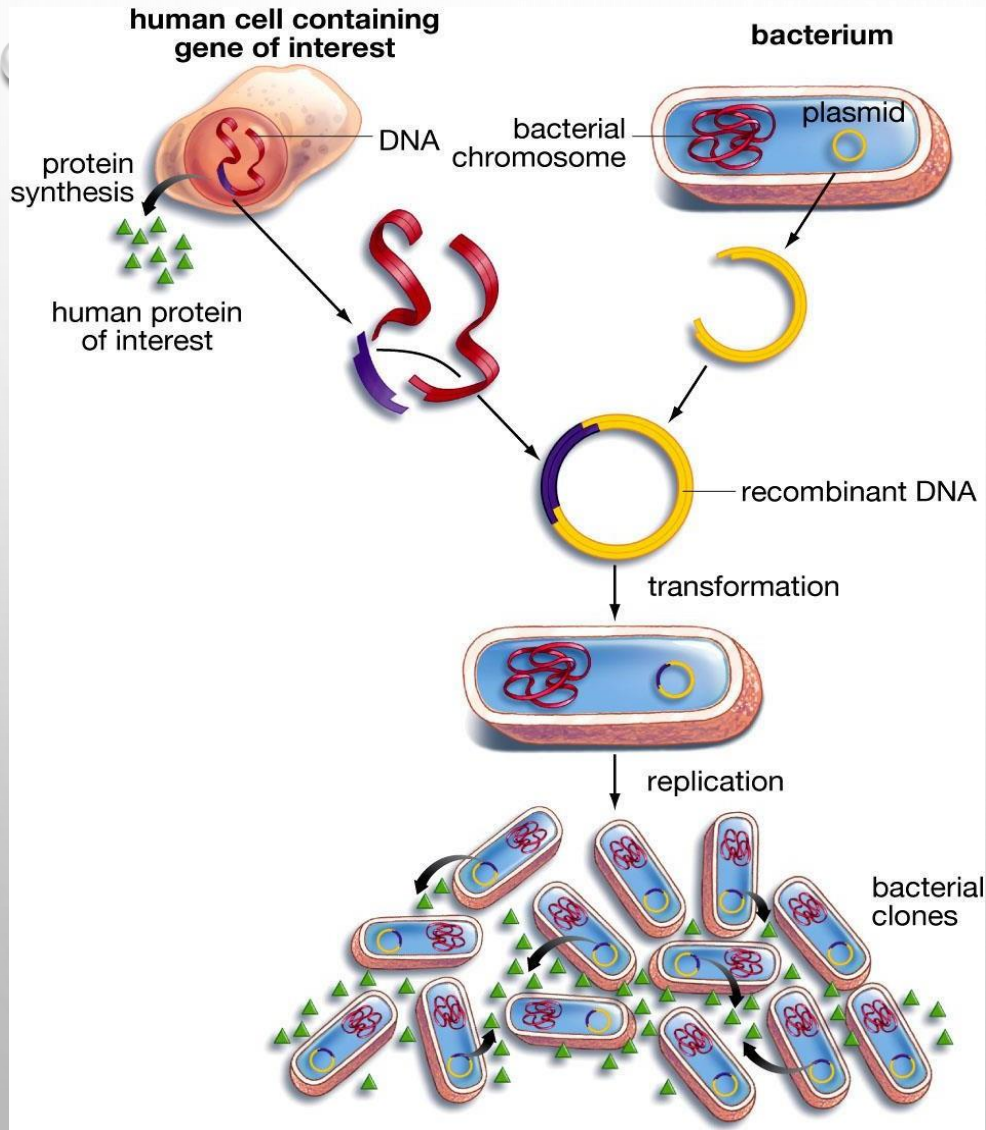
APLIKASI TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

- Teknologi DNA rekombinan telah memberikan manfaat di bidang ilmu pengetahuan dan terapan
 - Dalam Bidang Kedokteran:
 - Produksi Insulin
 - Dalam bidang pertanian:
 - Tanaman transgenik
 - Dalam bidang hukum:
- Analisis sidik jari DNA

APLIKASI TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN



PRODUKSI INSULIN



TANAMAN TRANSGENIK

APPLICATION

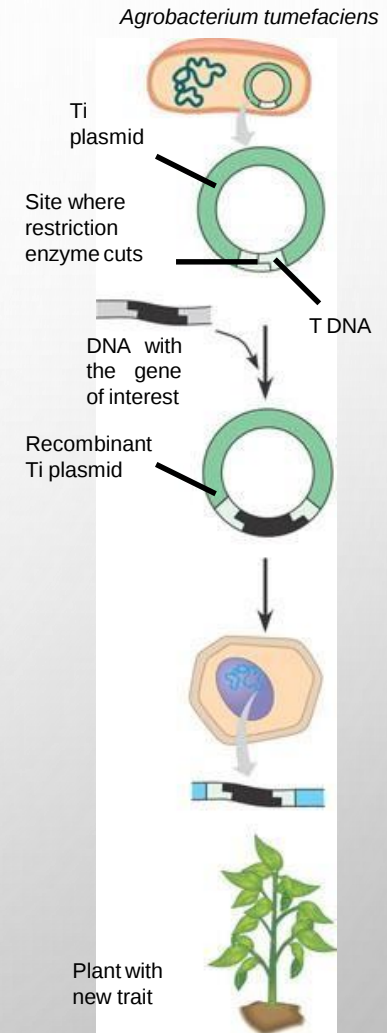
Genes conferring useful traits, such as pest resistance, herbicide resistance, delayed ripening, and increased nutritional value, can be transferred from one plant variety or species to another using the Ti plasmid as a vector.

TECHNIQUE

- 1 The Ti plasmid is isolated from the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. The segment of the plasmid that integrates into the genome of host cells is called T DNA.
- 2 Isolated plasmids and foreign DNA containing a gene of interest are incubated with a restriction enzyme that cuts in the middle of T DNA. After base pairing occurs between the sticky ends of the plasmids and foreign DNA fragments, DNA ligase is added. Some of the resulting stable recombinant plasmids contain the gene of interest.
- 3 Recombinant plasmids can be introduced into cultured plant cells by electroporation. Or plasmids can be returned to *Agrobacterium*, which is then applied as a liquid suspension to the leaves of susceptible plants, infecting them. Once a plasmid is taken into a plant cell, its T DNA integrates into the cell's chromosomal DNA.

RESULTS

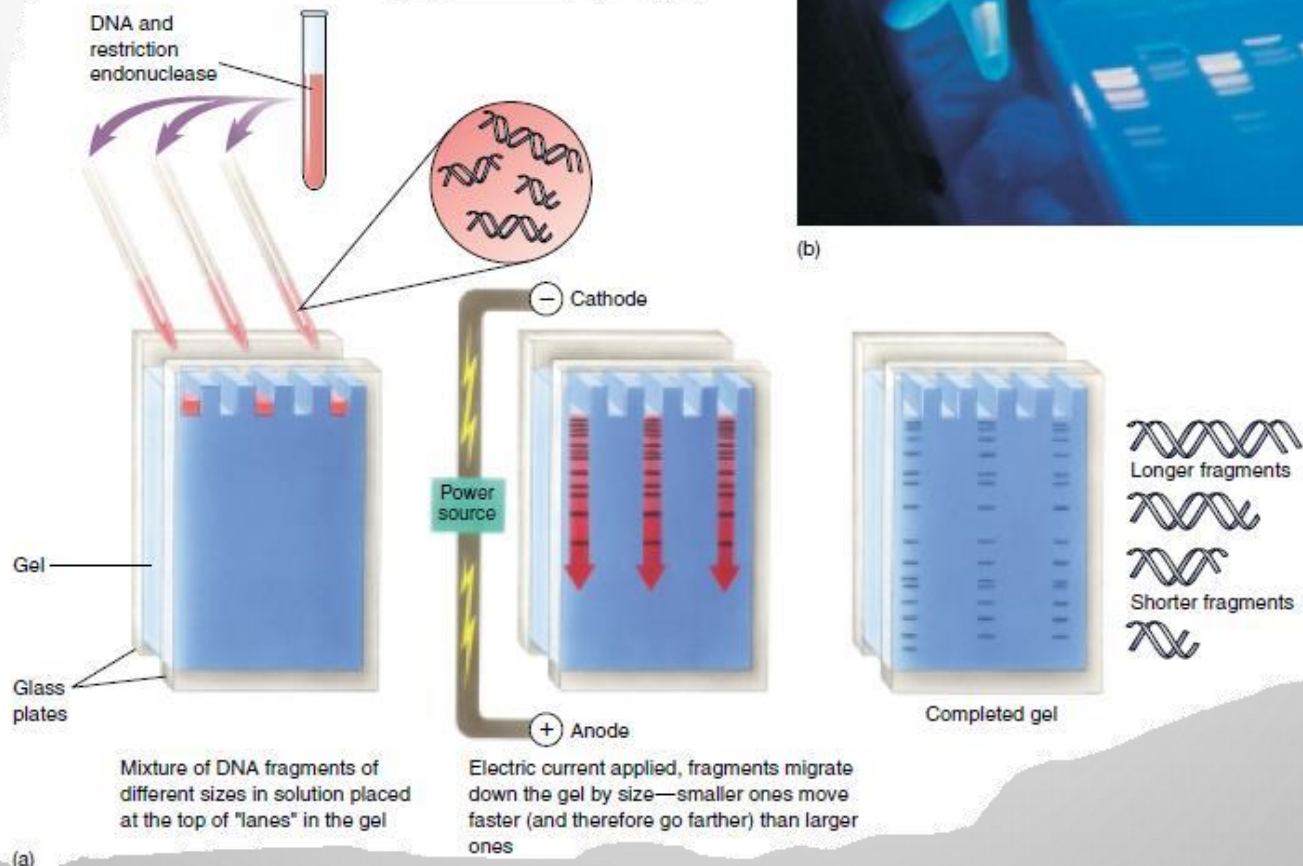
Transformed cells carrying the transgene of interest can regenerate complete plants that exhibit the new trait conferred by the transgene.



SIDIK JARI ATAU FORENSIK DNA

- Dilakukan dengan menganalisis **Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)**, yaitu intron (daerah bukan pengkode) yang tersusun atas utasan berulang 20-100 bp pada DNA
 - ❑ Pola ulangan yang bersifat unik antar individu sehingga dapat menjadi “sidik jari”
 - ❑ Memanfaatkan teknik *Elektroforesis gel* dan *Southern blotting of DNA fragments*.
 - ❑ VNTRs seseorang berasal dari informasi genetik yang diwariskan oleh kedua orang tuanya (ibu dan/atau ayah).

GEL ELEKTROFORESIS



(b)

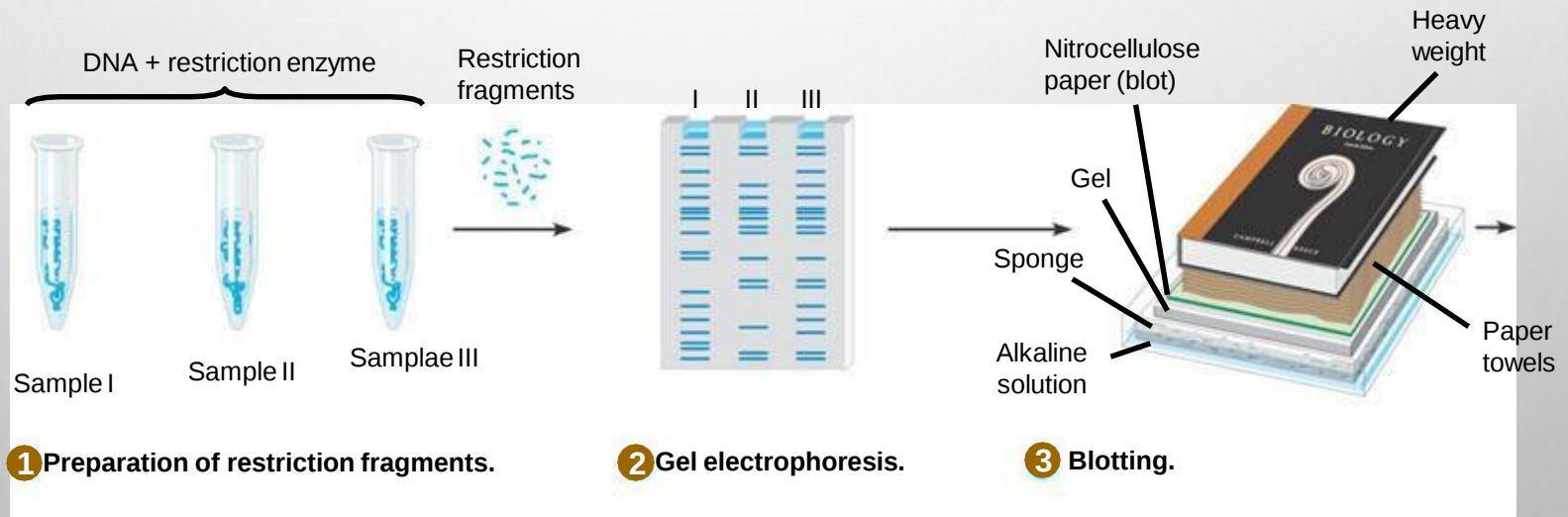
SOUTHERN BLOTTING OF DNA FRAGMENTS

APPLICATION

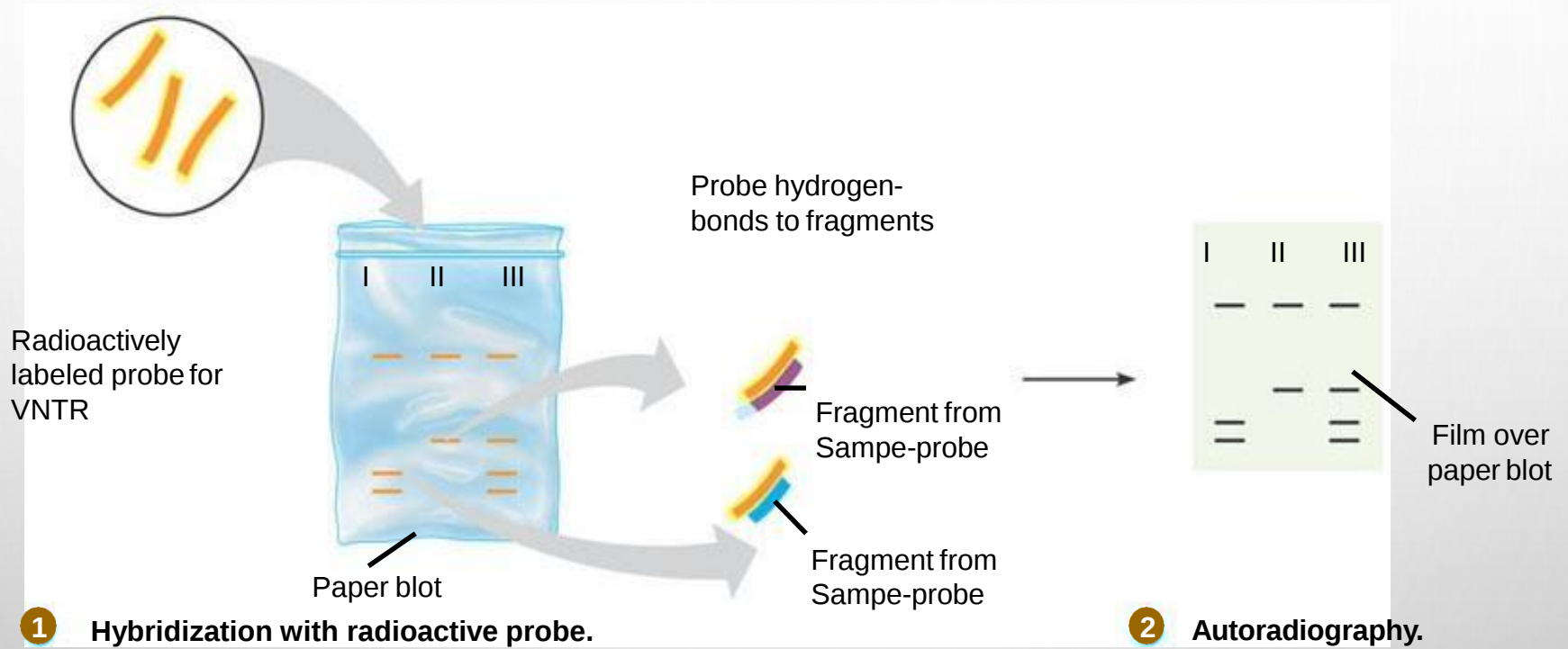
Researchers can detect specific nucleotide sequences within a DNA sample with this method. In particular, Southern blotting is useful for comparing the restriction fragments produced from different samples of genomic DNA.

TECHNIQUE

In this example, we compare genomic DNA samples from three individuals: a homozygote for the normal α -globin allele (I), a homozygote for the mutant sickle-cell allele (II), and a heterozygote (III).



SOUTHERN BLOTTING OF DNA FRAGMENTS

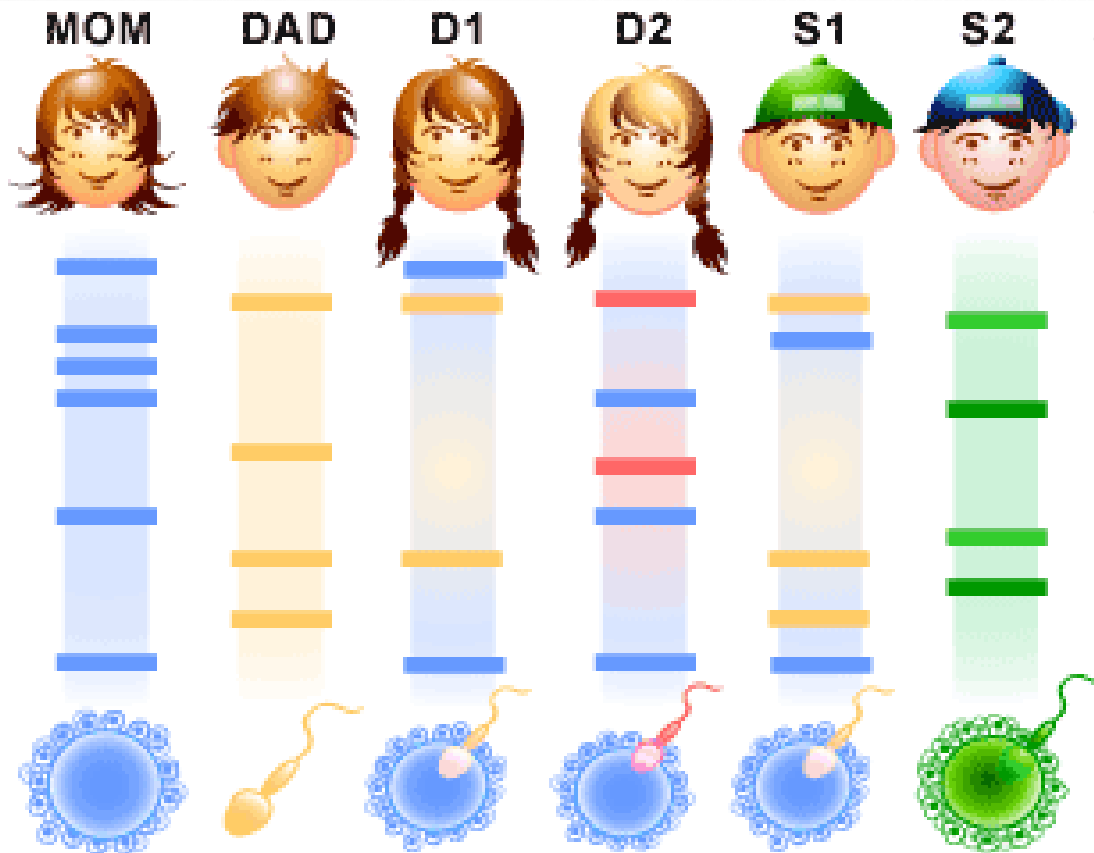


SIDIK JARI ATAU FORENSIK DNA

■ Aplikasi:

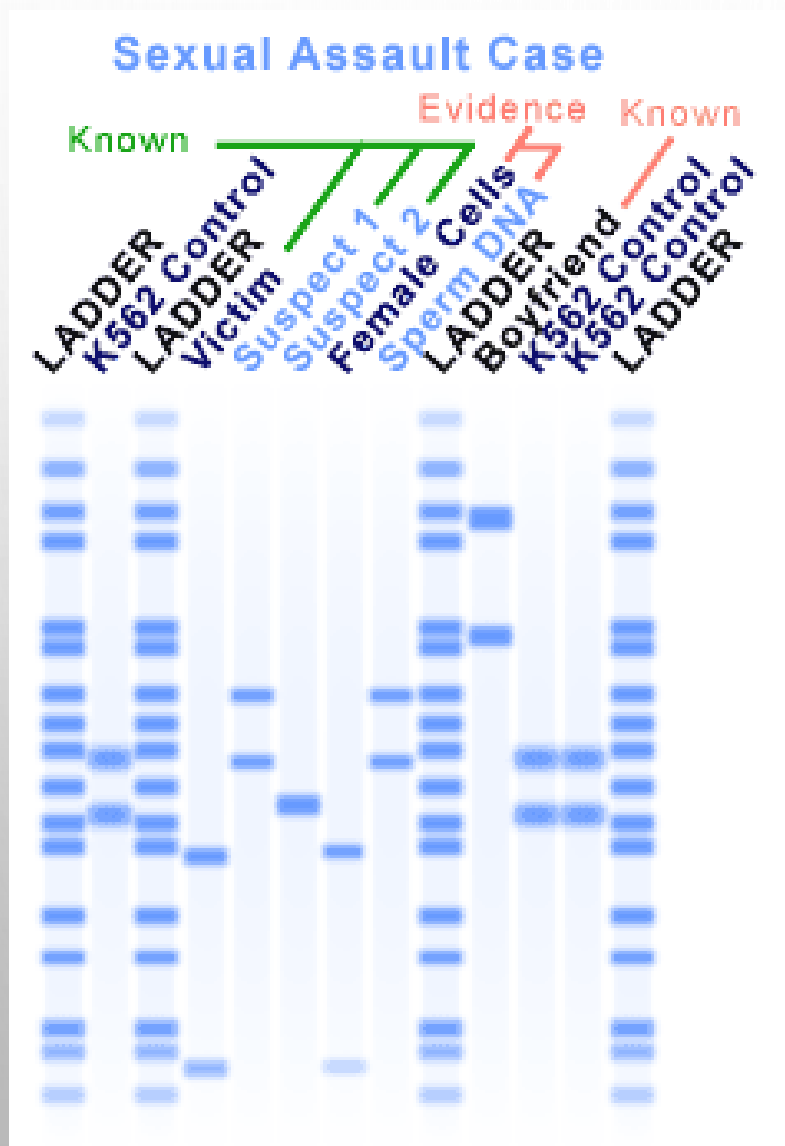
- Penentuan ke-bapak-an dan ke-ibu-an (Paternity and Maternity)
 - karena seseorang mewarisi VNTRs dari orang tuanya, maka pola VNTRs dapat digunakan untuk menentukan ke-bapak-an dan ke-ibu-an.
- Identifikasi Penjahat dan Forensik
 - DNA yang diisolasi dari darah, air mani (semen), rambut, sel-sel kulit, atau barang bukti genetik lainnya yang ditemukan di tempat kejadian perkara dibandingkan (melalui pola VNTR) dengan DNA dari tersangka pelaku kejahatan, untuk menentukan bersalah atau tidaknya si tersangka tersebut.
 - Pola VNTR juga berguna dalam menetapkan identitas dari korban pembunuhan, juga dari DNA yang ditemukan sebagai barang bukti atau dari mayat itu sendiri.

PATERNITY AND MATERNITY TEST



- In this example, a family consists of a mom and dad, two daughters and two sons.
- The parents have one daughter and one son together, one daughter is from the mother's previous marriage, and one son is adopted, sharing no genetic material with either parent.
 - daughter 2 is the child from the mother's previous marriage and son 2 is adopted.
 - daughter 1 and son 1 are the children from current marriage

PATERNITY AND MATERNITY TEST



- DNA samples were taken from a crime scene, the female victim and two suspects in a sexual assault case.
- The victim's boyfriend was also tested. The DNA ladders are used to judge the sizes of the DNA fragments.
- Control samples are also run, to ensure that the experiment is done correctly.
- Can you determine which suspect is likely the criminal?
 - The DNA fingerprint from suspect 1 matches up with the fingerprint of the sperm DNA from the crime scene. You can also see that the female cells from the scene match the victim's DNA.

TERIMA KASIH

