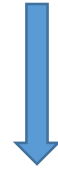


□ Teknologi DNA Rekombinan

MEKANISME REKOMBINASI DNA

Pengertian Teknologi DNA Rekombinan



pembentukan kombinasi materi genetik yang baru



dengan cara

penyisipan molekul DNA ke dalam suatu vektor

Apa itu rekombinasi??

- Pertukaran sekuen genetik antara **kromosom yang berbeda** atau **antara gen-gen yang terletak dalam satu kromosom**
- Salah satu bentuk dari rekombinasi adalah **pindah silang**



(Brooker, 2009)

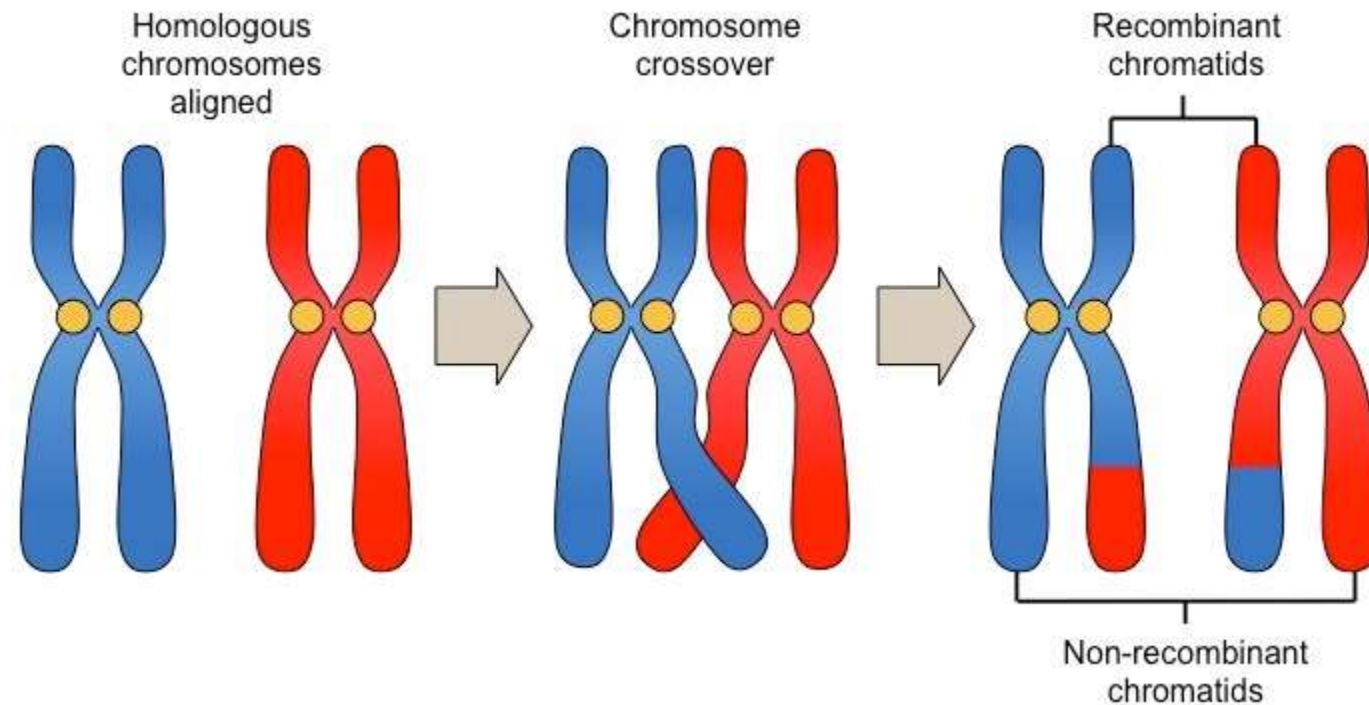
Manfaat Teknologi DNA Rekombinan

Meliputi empat bidang:

- Bidang kesehatan
- Bidang Pertanian
- Bidang Hukum
- Bidang Pengemangan Ilmu Pengetahuan

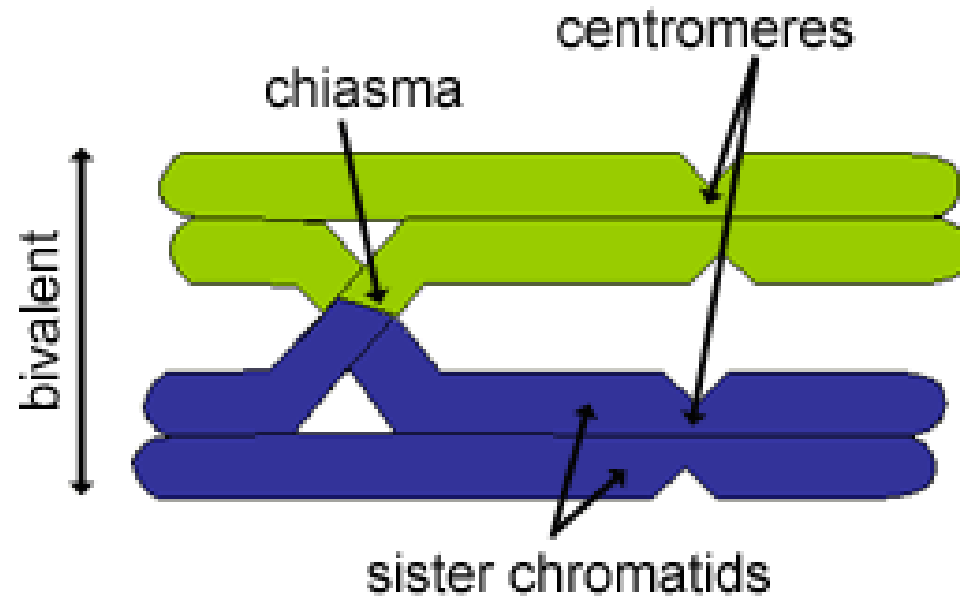
Pindah silang (*crossing over*)

- Proses pindah silang ini akan menghasilkan kromatid-kromatid rekombinan



Pindah silang (*crossing over*)

- Titik dimana 2 segmen kromatid saling pindah silang dinamakan kiasma



Ada 3 tipe rekombinasi

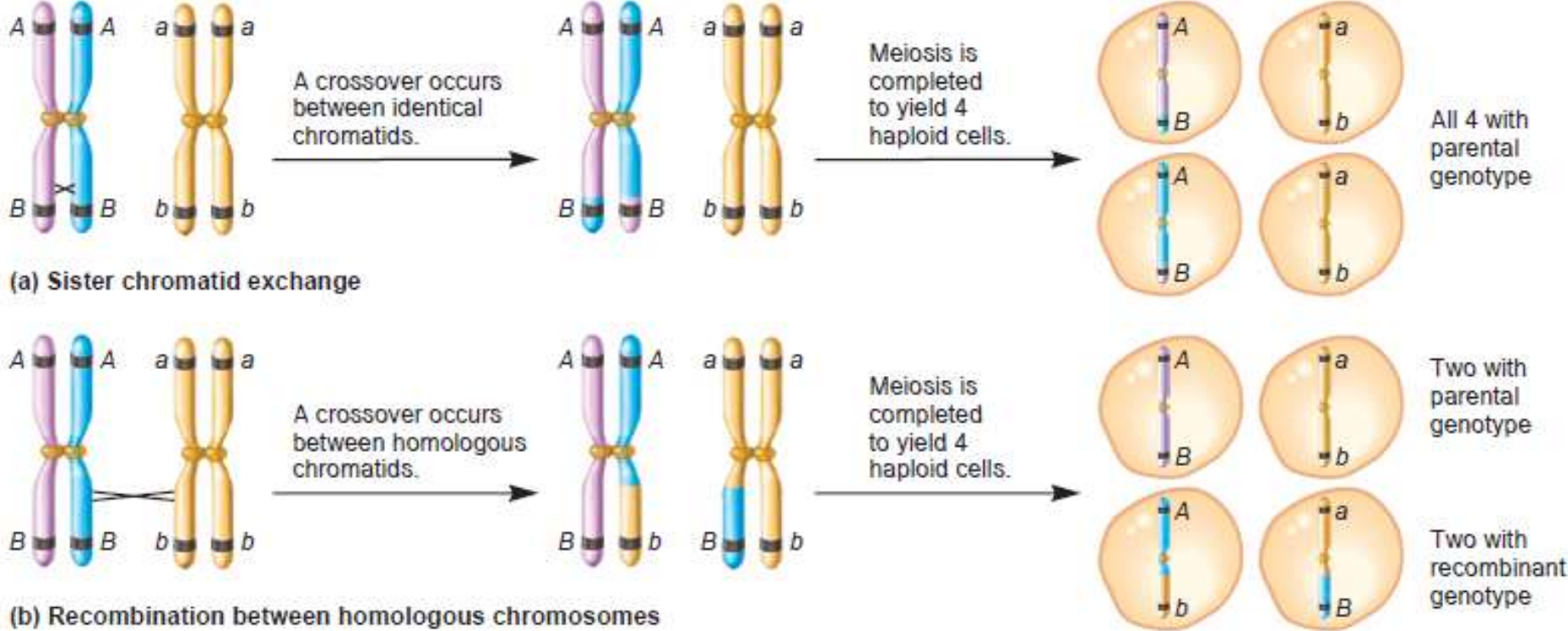
- Tipe-tipe rekombinasi :

1. Rekombinasi homolog/umum
2. Rekombinasi situs khusus (*site-specific recombination*)
3. Rekombinasi transposisi

1. Rekombinasi homolog/umum

- Adalah pertukaran segmen-segmen DNA yang sama atau identik
- Bisa berupa:
 - Pertukaran segmen DNA antar *sister chromatid*
 - Pertukaran segmen DNA antar kromosom homolog

Bentuk Rekombinasi Homolog

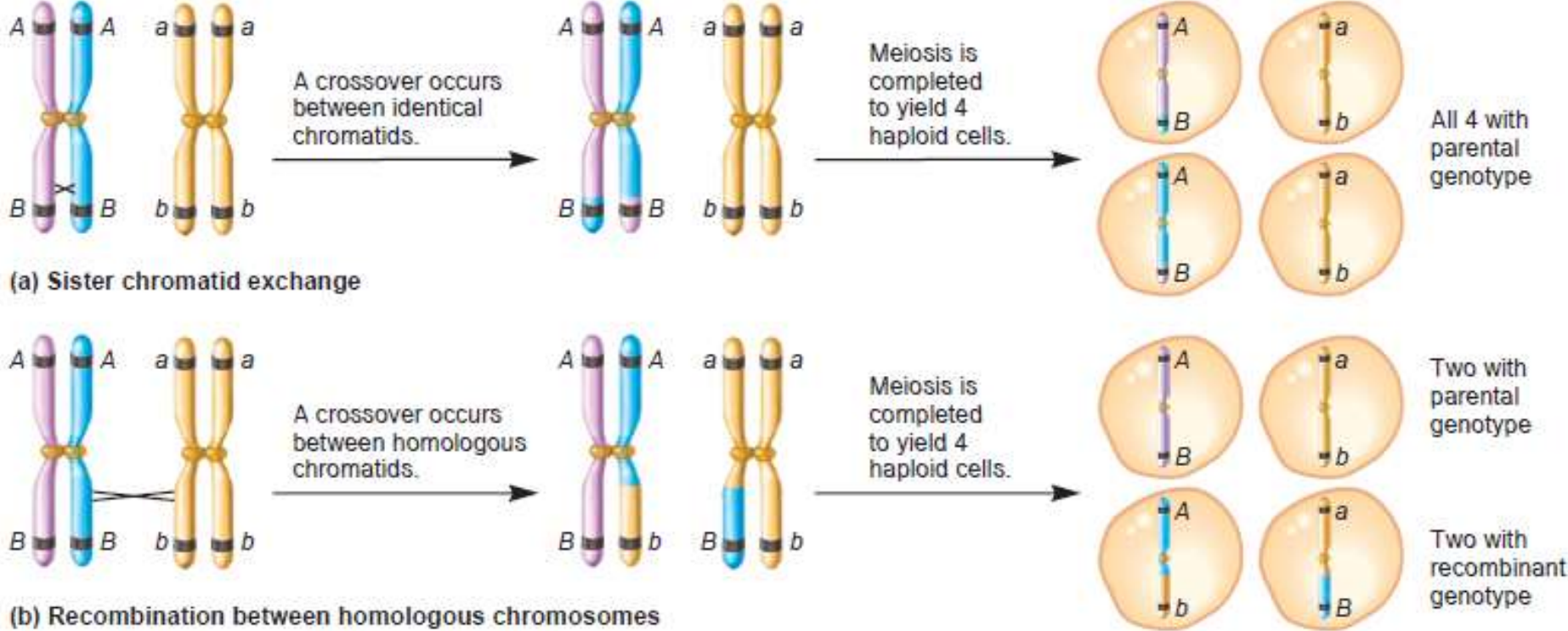


(Brooker, 2009)

Hasil dari rekombinasi homolog

- Apabila terjadi *rekombinasi antar sister chromatid* maka **tidak terjadi** kombinasi alel baru (sama dengan alel induk)
- Apabila terjadi *rekombinasi antar kromosom homolog* maka **akan terjadi** kombinasi alel baru

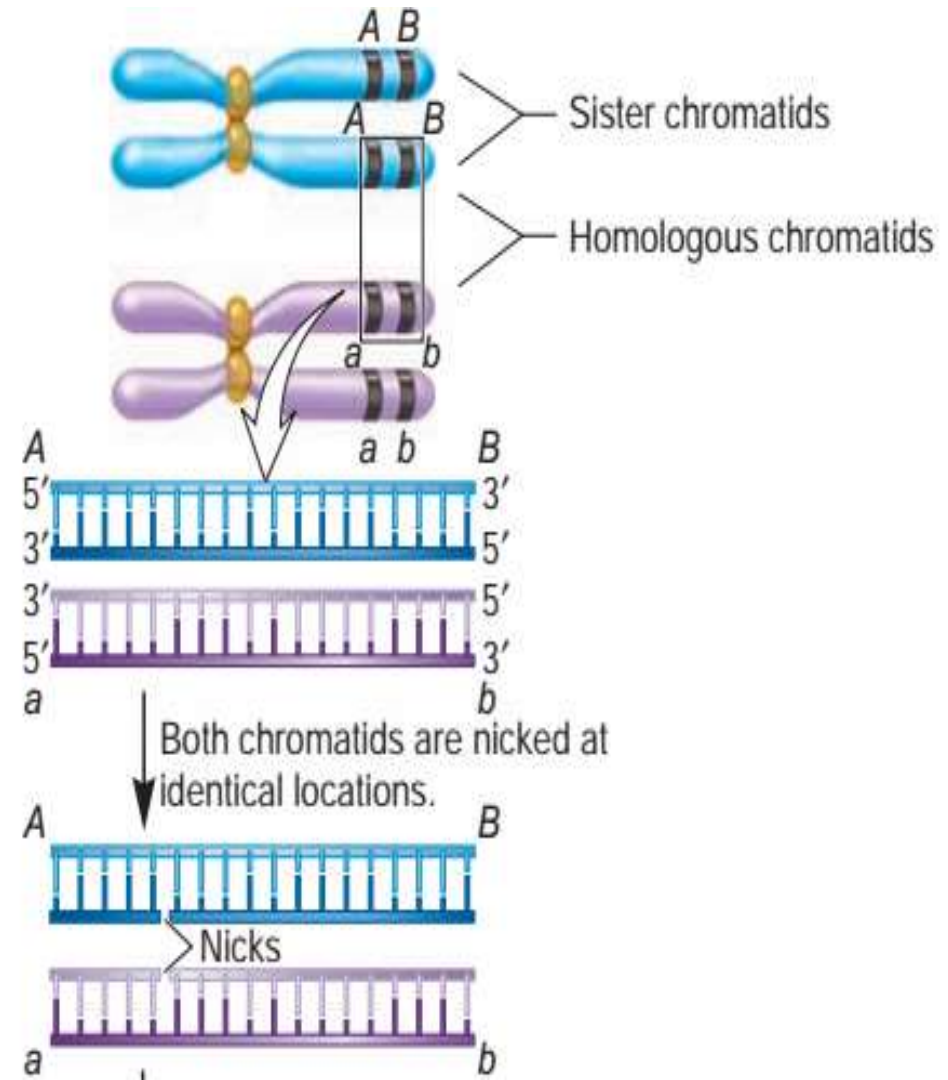
Bentuk Rekombinasi Homolog



(Brooker, 2009)

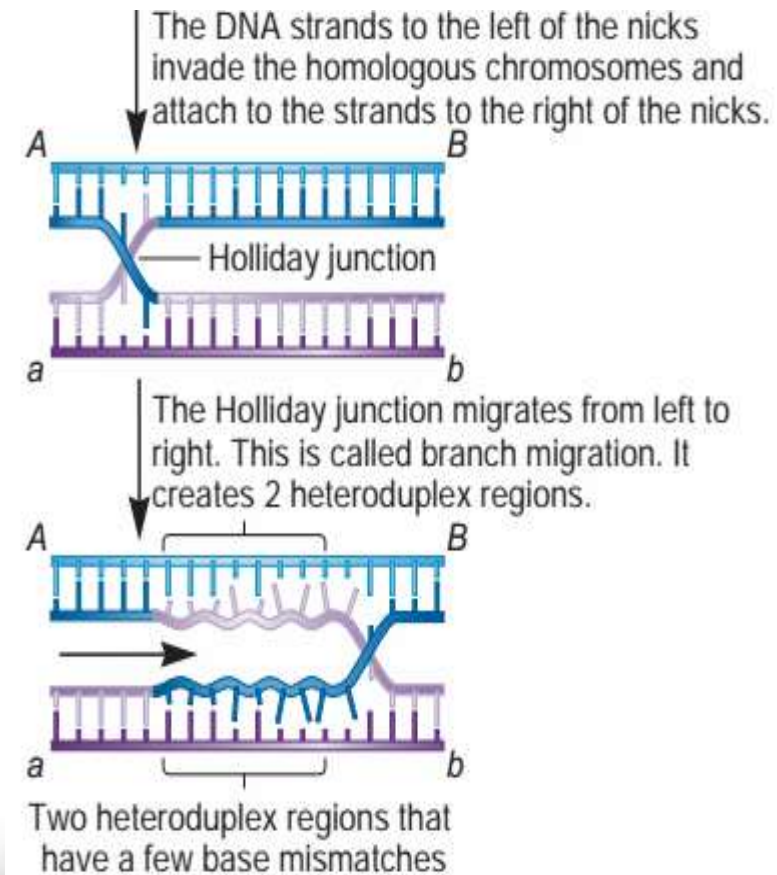
Model Holliday pada Rekombinasi Homolog

- Tahap I : terjadinya pemotongan DNA di salah satu titik oleh nuclease



Model Holliday pada Rekombinasi Homolog

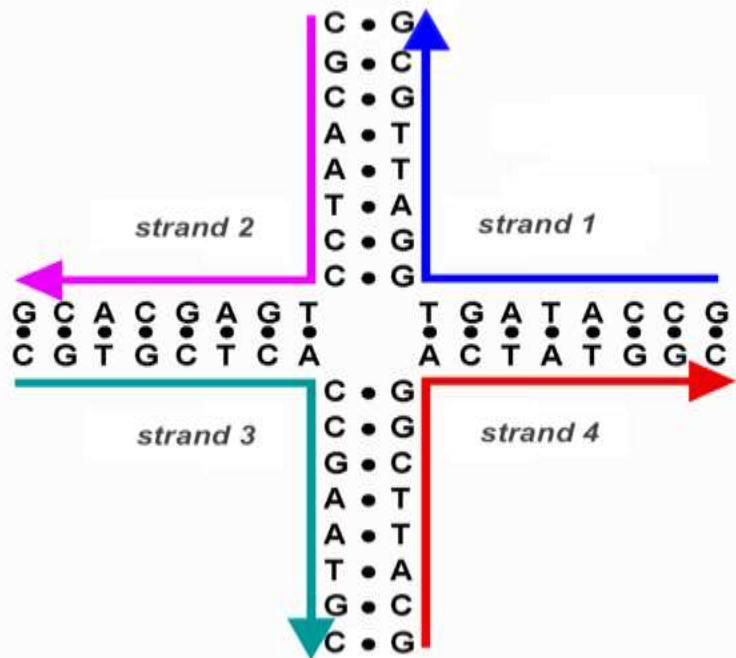
- Tahap II : terjadi pindah silang pada untai-untai DNA yang terpotong
- Terjadi pembentukan *Holliday junction* → struktur DNA bercabang yang terbentuk karena pindah silang



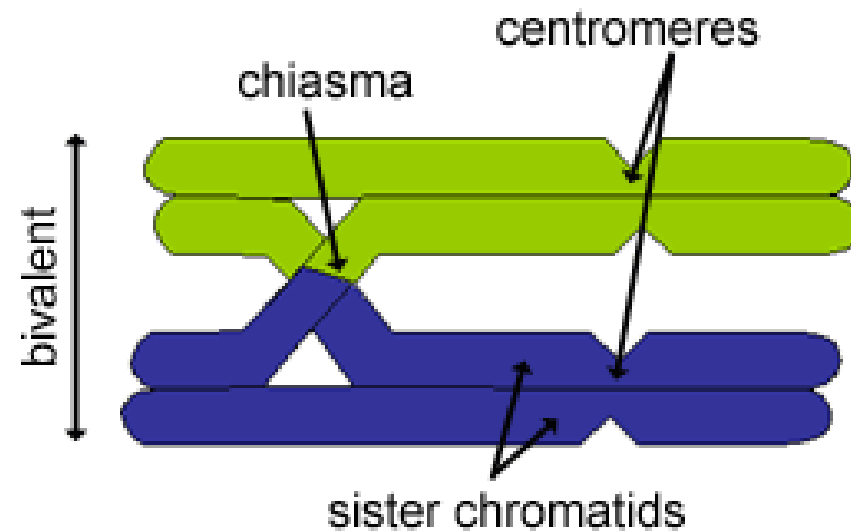
Apakah Holliday Junction sama dengan Kiasma?

- Keduanya hampir mirip dalam proses rekombinasi
- Kiasma merupakan titik antara 2 kromatid melakukan pindah silang
- Holliday junction merupakan struktur tetrahedral antara segmen-segmen DNA yang melakukan rekombinasi homolog

Holliday Junction vs Kiasma



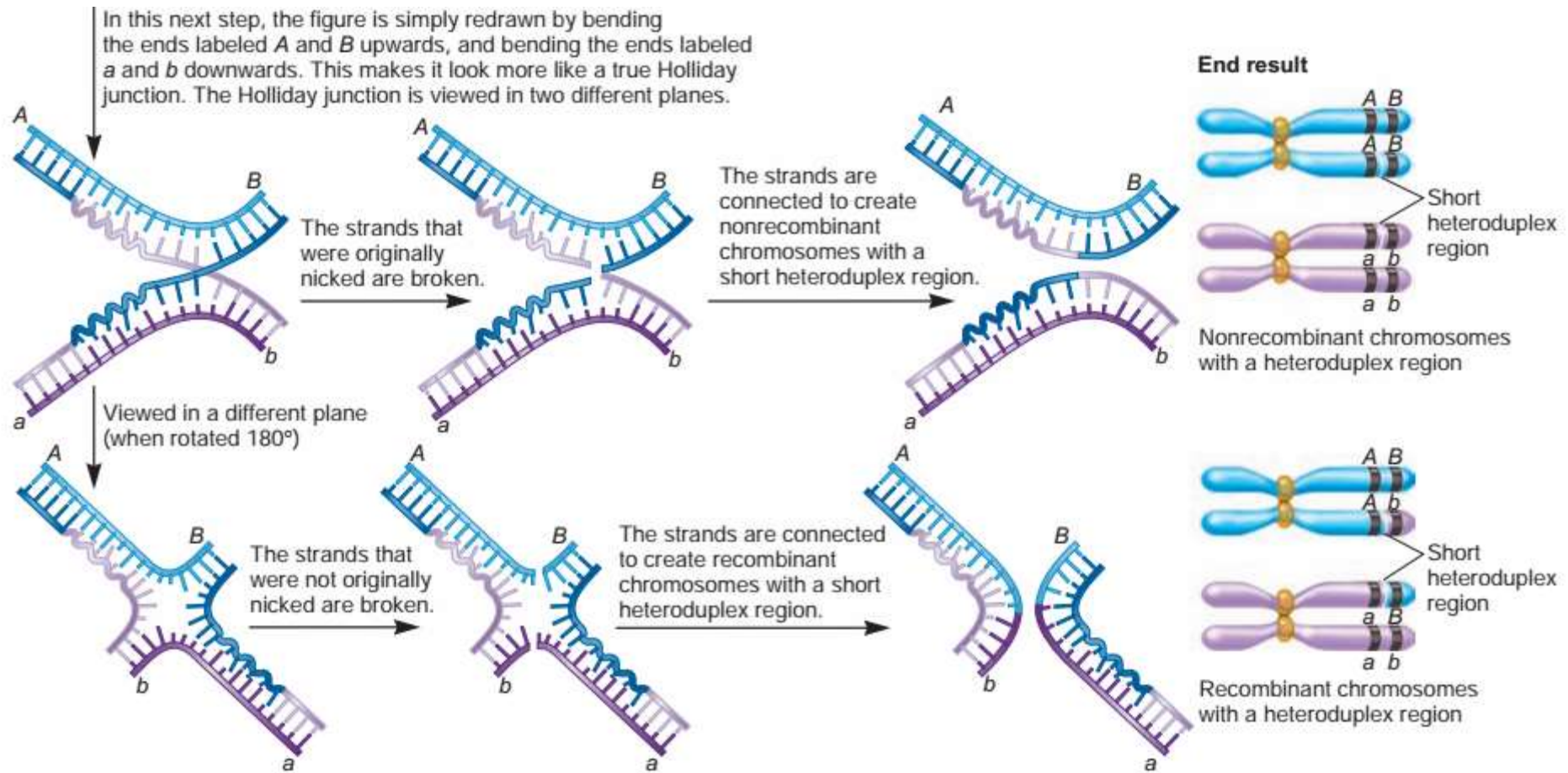
Holliday junction



Kiasma

Model Holliday pada Rekombinasi Homolog

- Holliday junction kemudian bergeser sepanjang pita DNA
- Pergeseran ini disebut dengan migrasi cabang (*branch migration*)



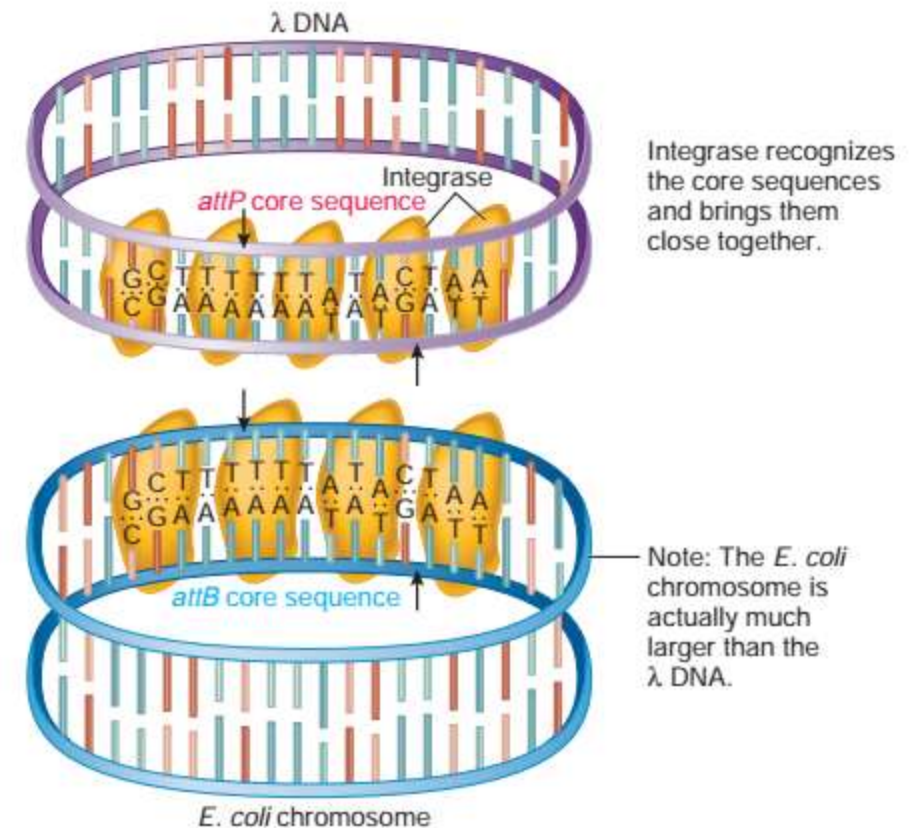
(a) The Holliday model for homologous recombination

2. Rekombinasi Situs Khusus

- Yaitu rekombinasi antara segmen-segmen DNA yang tidak mirip atau sama pada situs tertentu
- Contohnya rekombinasi antara segmen DNA virus dengan DNA bakteri
- Pada rekombinasi ini, terdapat pula enzim-enzim yang berperan dalam pemotongan dan penyambungan segmen-segmen DNA

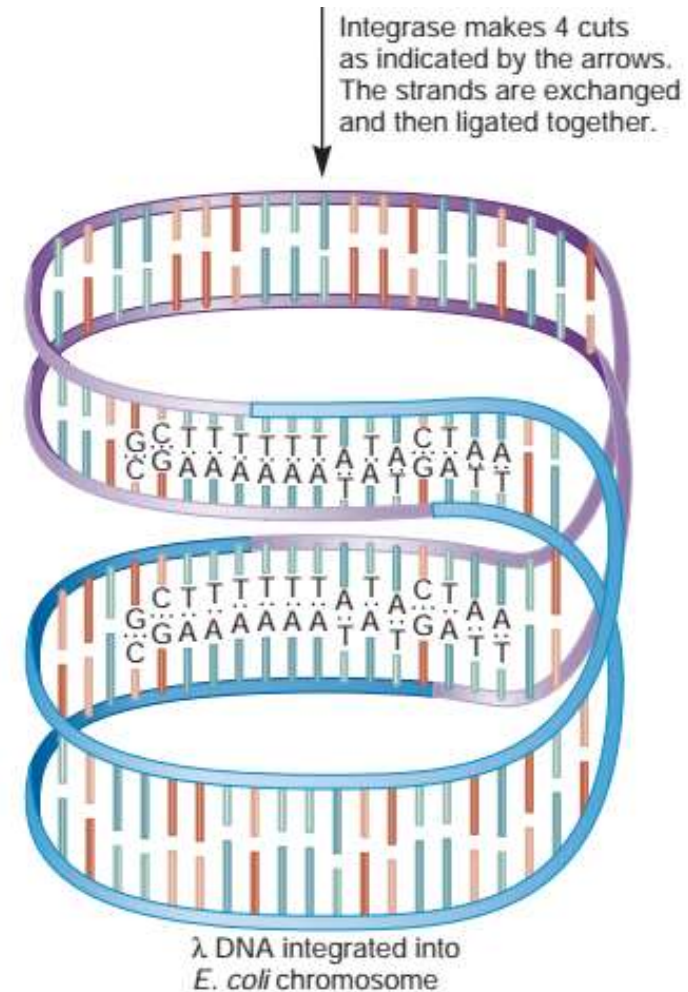
Contoh rekombinasi antara DNA bakteriofaga λ (virus) dengan DNA bakteri

- Enzim integrase (enzim untuk menggabungkan kedua segmen DNA) mengenali sekuen attP dan attB yang memiliki sedikit kemiripan
- Kedua DNA akan sejajar



Contoh rekombinasi antara DNA bakteriofaga λ (virus) dengan DNA bakteri

- Integrase kemudian memotong di sekuen-sekuen kedua DNA
- Terjadi penyambungan kedua DNA



Contoh rekombinasi situs khusus pada manusia

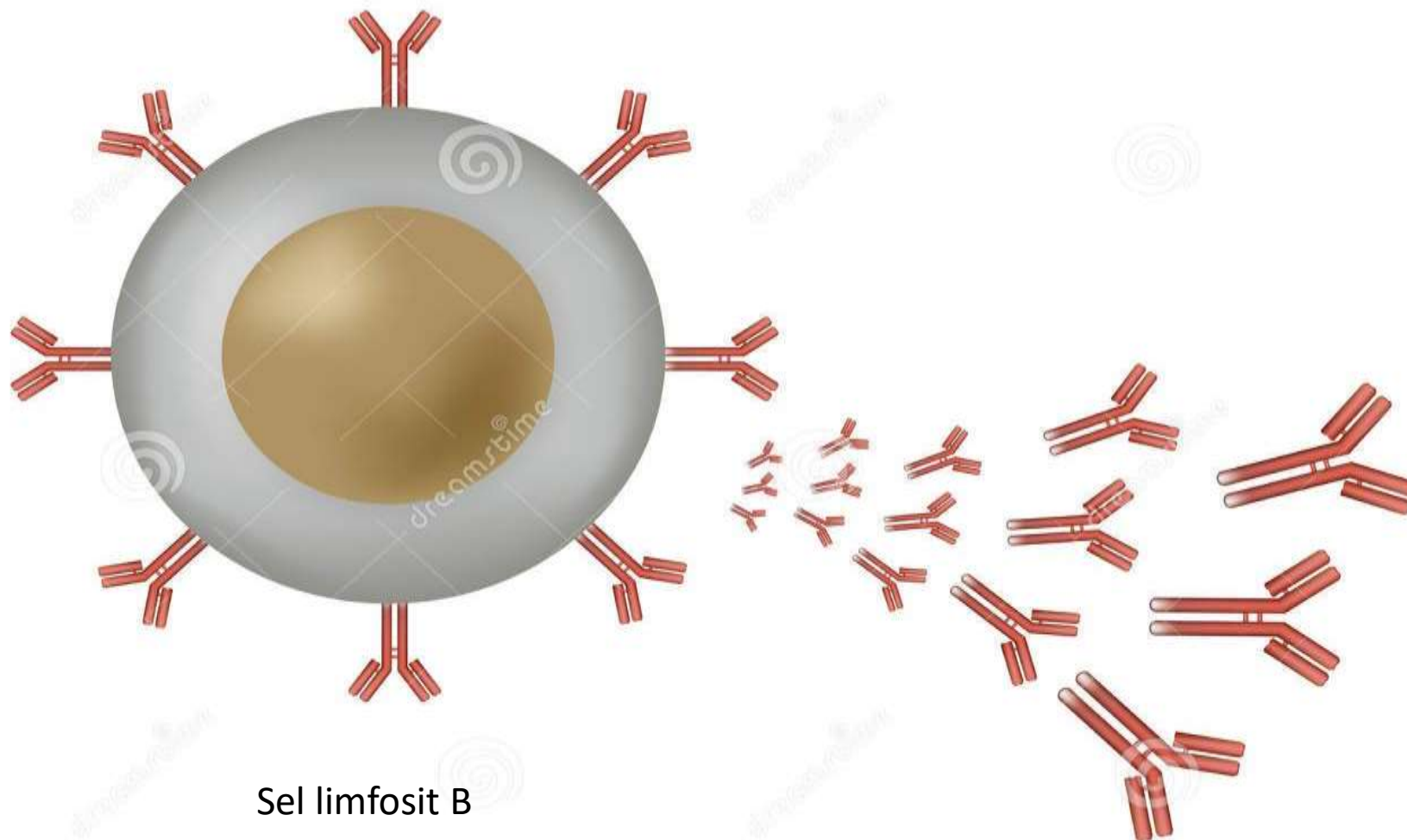
- Contoh yang terjadi pada manusia adalah proses pembentukan antibodi
- Antibodi merupakan salah satu komponen dalam sistem kekebalan tubuh manusia
- Antibodi bekerja spesifik mengenali antigen (benda asing) → satu antibodi untuk satu antigen

Antibodi

- Dihasilkan oleh sel B (sel plasma)
- Dikenal juga dengan *Immunoglobulin* (Ig)
- Terdapat 5 kelas imunoglobulin: **IgG, IgM, IgE, IgA, IgD**
- Memiliki struktur yang khas

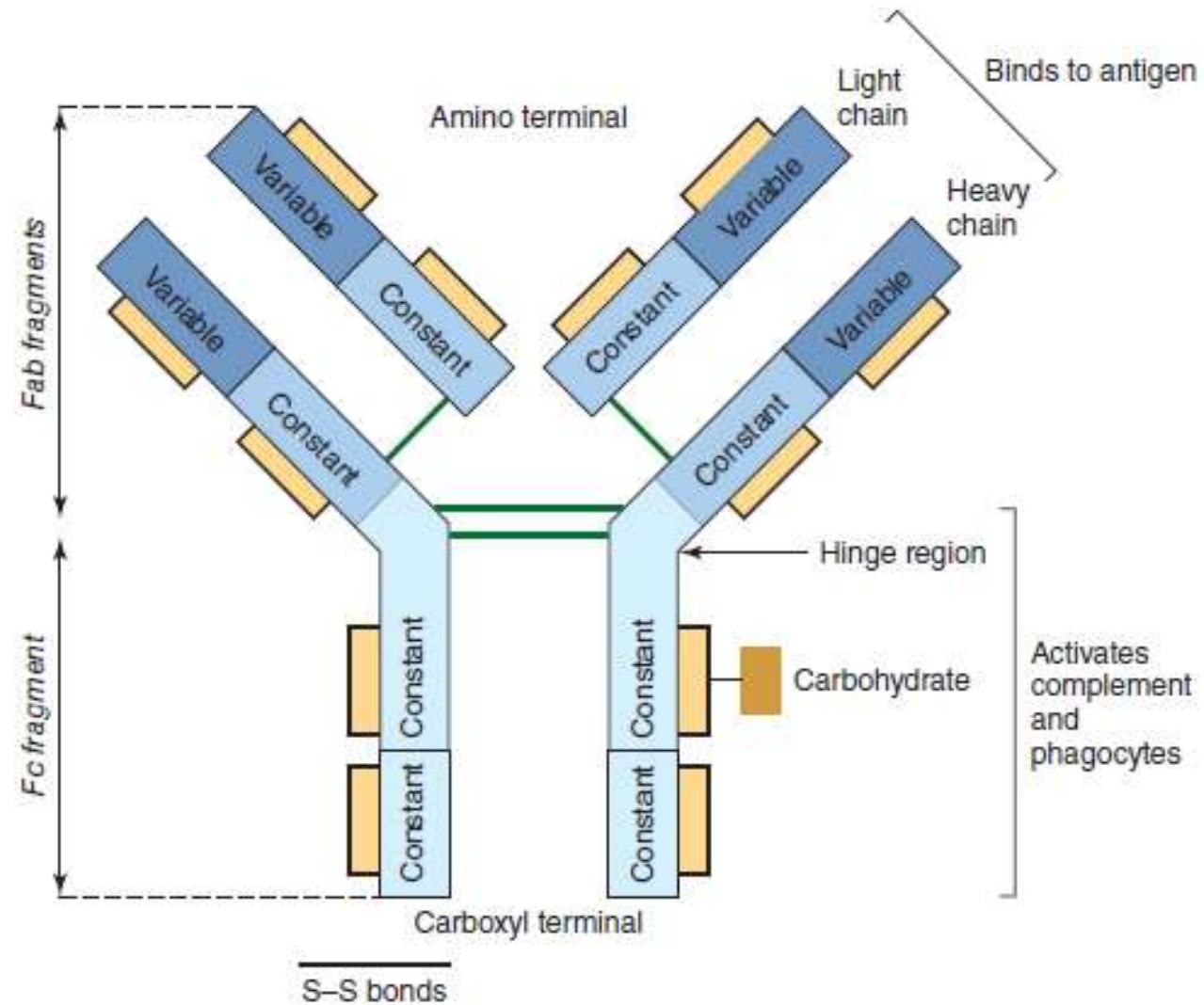


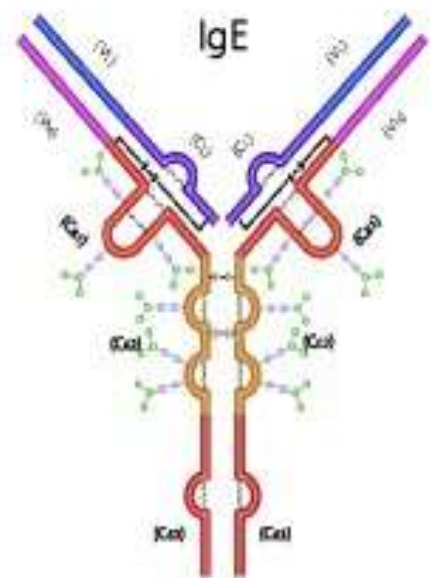
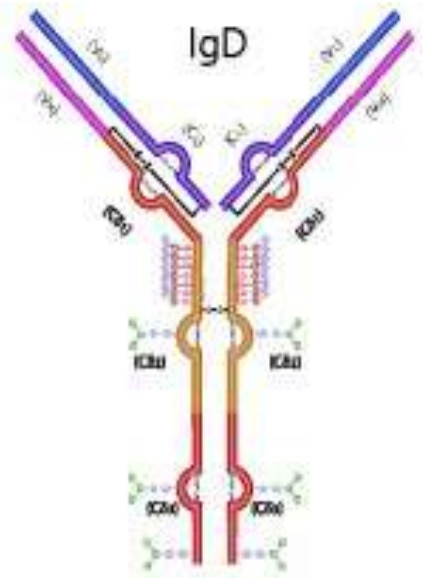
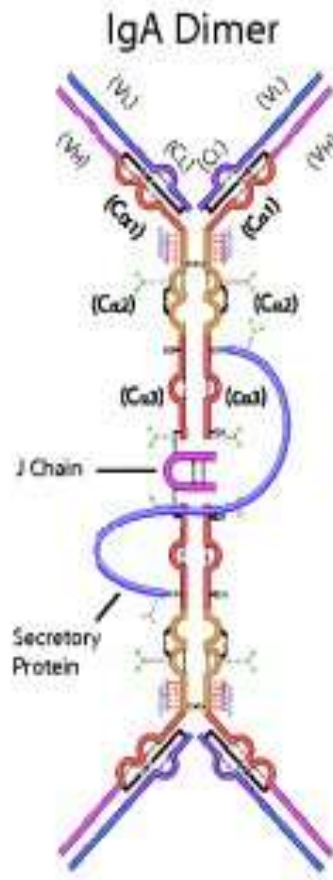
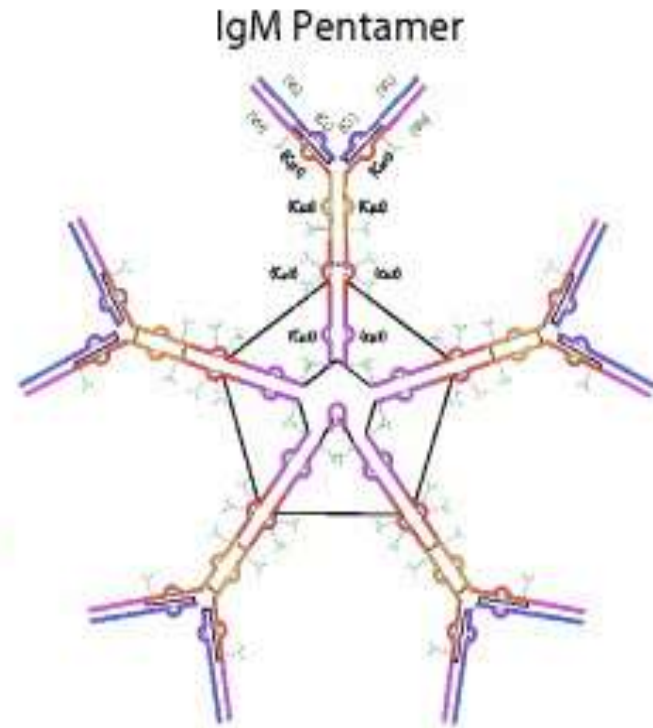
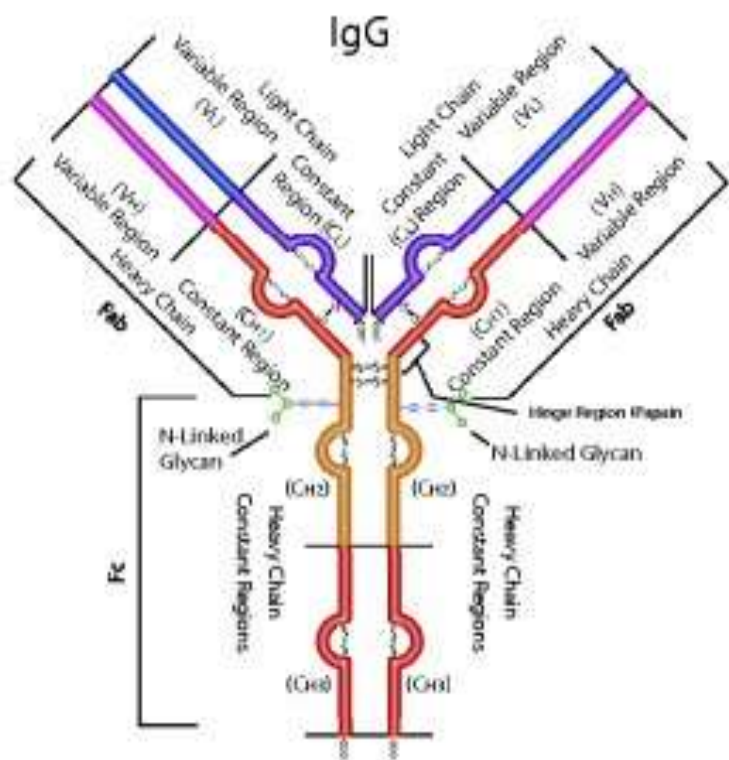
Produksi antibodi



Sel limfosit B

Struktur Antibodi





Bagaimana cara sel B memproduksi antibodi yang spesifik?

- Yaitu dengan cara rekombinasi situs khusus
- Beberapa segmen dalam gen antibodi mengalami pemotongan dan penyambungan
- Sehingga terbentuk antibodi yang spesifik dengan antigennya

3. Transposisi

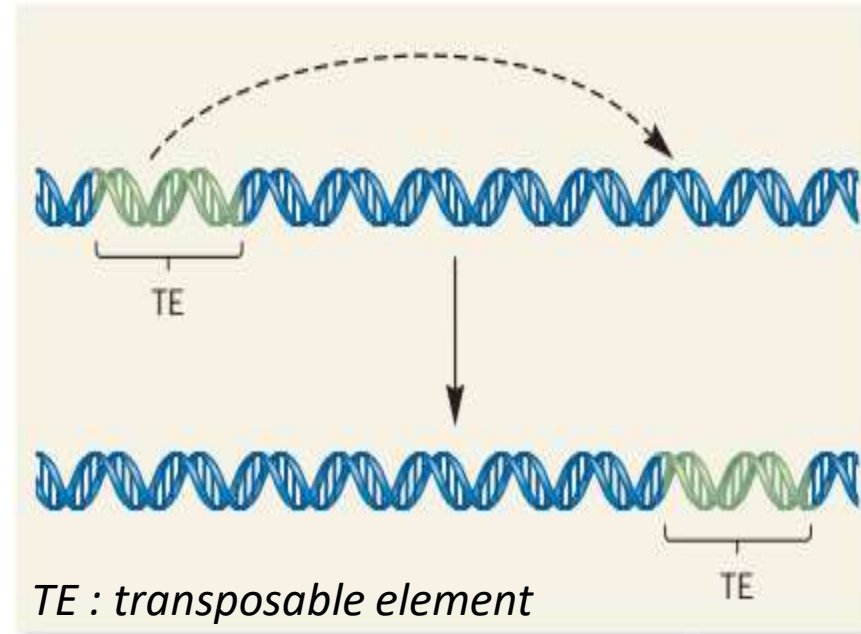
- Yaitu pemindahan segmen DNA dari suatu lokus ke lokus yang lain pada satu kromosom
- **Lokus** → posisi gen pada suatu kromosom
- Transposisi juga bisa terjadi pada kromosom yang berbeda
- Pola transposisi mirip dengan rekombinasi situs khusus
- Segmen DNA yang dapat berpindah-pindah dinamakan **transposon**

Macam-macam Transposisi

- Transposisi bisa dibedakan menjadi 3 macam :
 1. Transposisi sederhana
 2. Transposisi replikatif
 3. Retrotransposon

Transposisi sederhana adalah...

- Pemindahan segmen DNA dari lokus satu ke lokus yang lain dalam satu kromosom



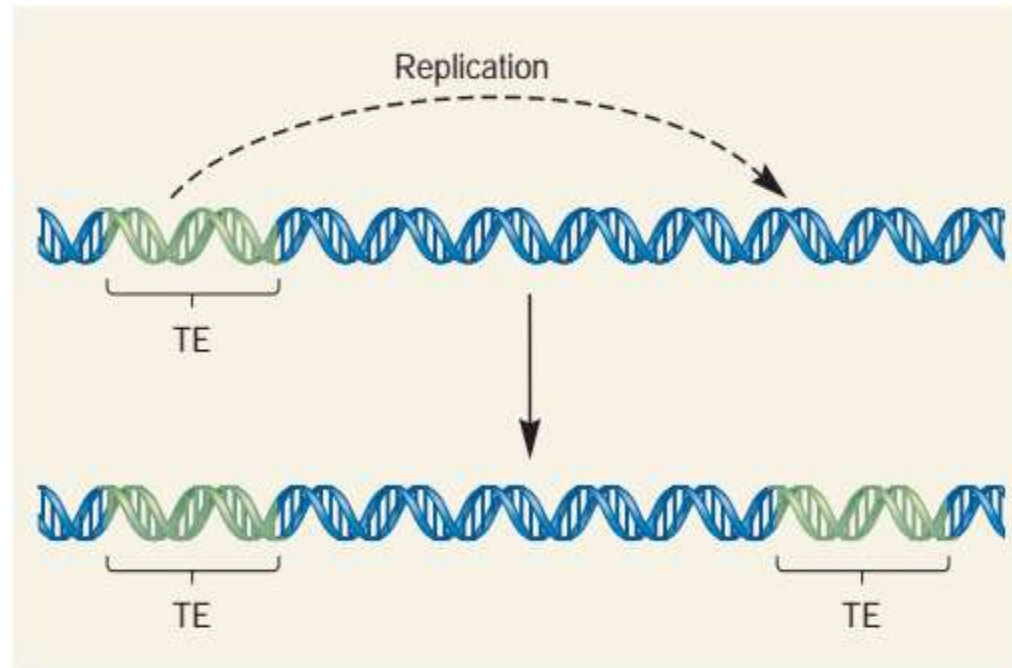
(Brooker, 2009)

Transposisi sederhana

- Sering juga disebut transposisi potong-tempel (*cut-and-paste transposition*)
- Terjadi pada organisme prokariotik dan eukariotik
- Pada transposisi sederhana diperlukan enzim **transposase** untuk memotong transposon (*transposable element*) dan meligasiannya di lokus yang baru

Transposisi replikatif yaitu....

- Proses transposisi dimana transposon mengalami replikasi terlebih dahulu sebelum masuk ke lokus yang baru
- Hasil replikasi yang dimasukkan ke lokus baru



TE : transposable element

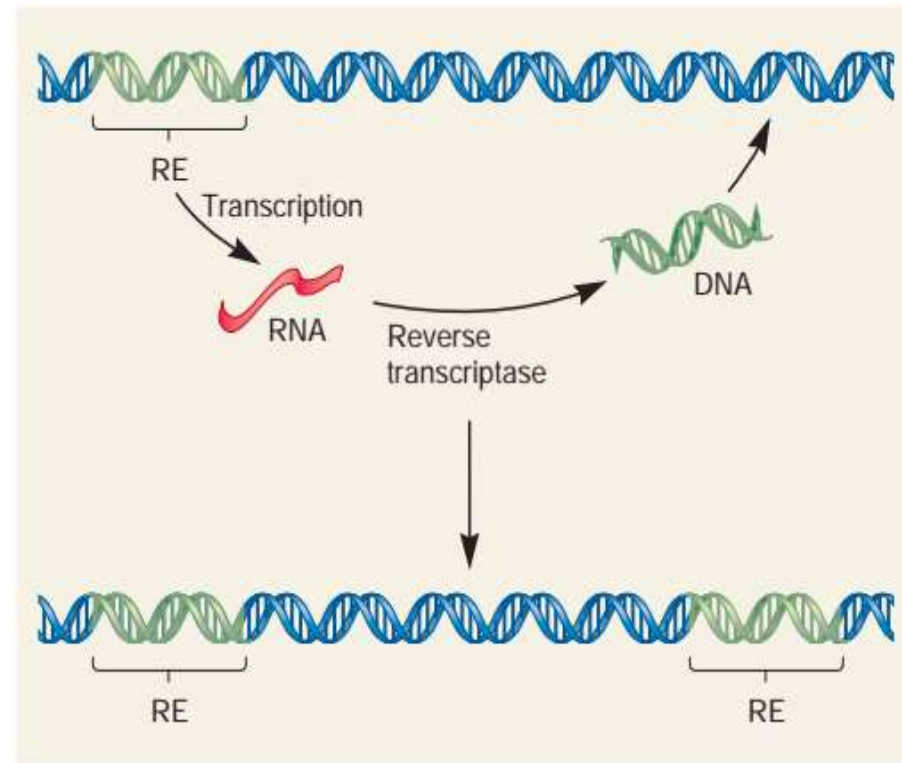
(Brooker, 2009)

Transposisi replikatif

- Hasil dari transposisi replikatif jarang sekali terjadi
- Hanya terjadi pada bakteri

Retrotransposon adalah...

- Transposisi dengan menggunakan RNA untuk masuk ke lokus yang baru
- TE diubah dulu menjadi RNA kemudian diubah lagi menjadi DNA



TE : transposable element

RE : Retroelement

(Brooker, 2009)

Retrotransposon

- Memerlukan enzim **reverse transcriptase** untuk mengubah RNA menjadi DNA
- Terjadi pada organisme eukariotik dan sering terjadi
- Segmen DNA yang berpindah dinamakan **retroelemen, retrotransposon atau retroposon**

Teknologi DNA Rekombinan

- Tek.DNA rekombinan adalah suatu teknik molekuler untuk mengisolasi dan memanipulasi material genetik
-



At harvest time Ted's ethical objections to the use of frog genes in potato breeding were conveniently forgotten.

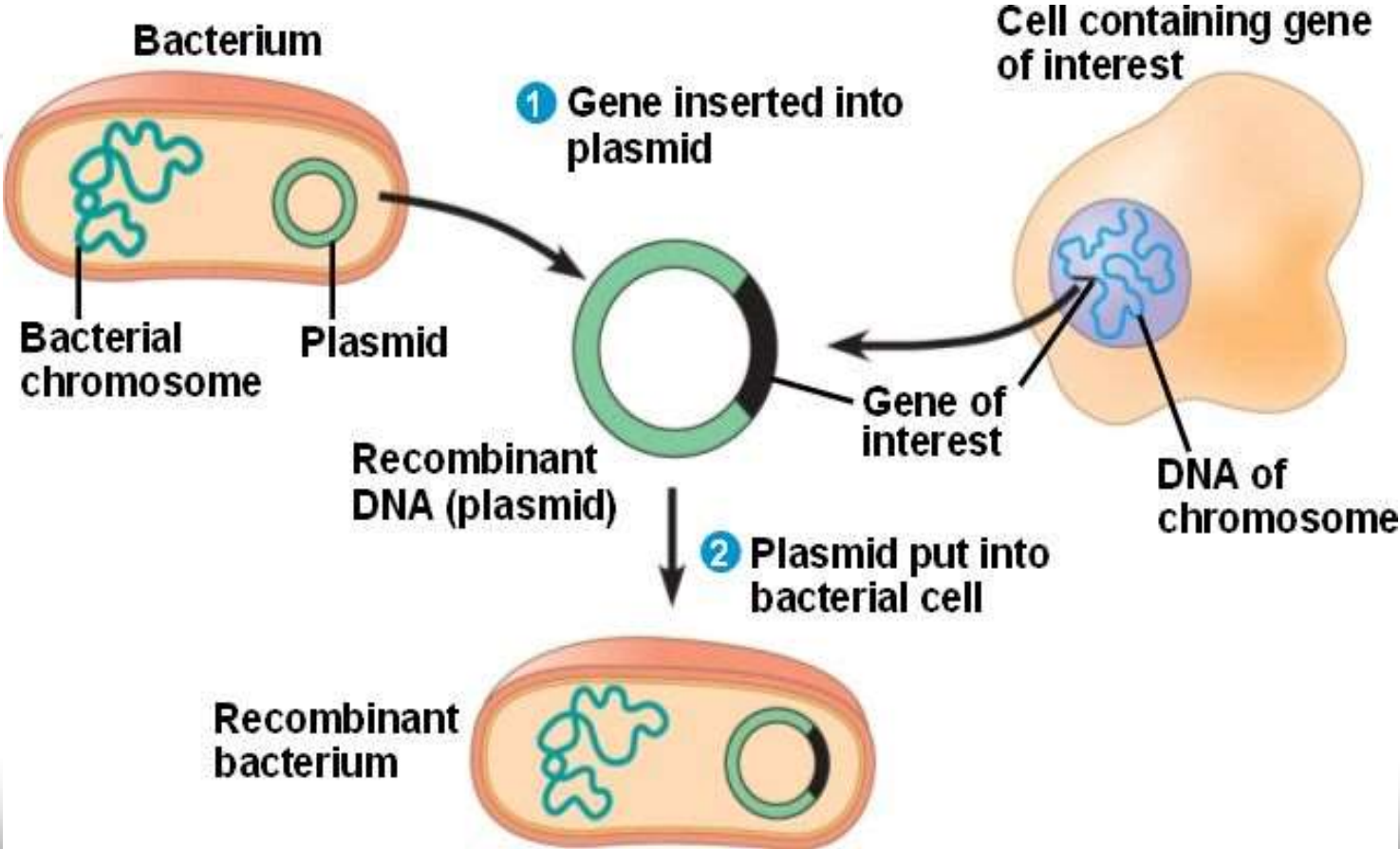
Awal Mula Keberhasilan Teknologi DNA Rekombinan

- Pada akhir tahun 1970-an sekelompok peneliti dari Universitas Stanford berhasil mengisolasi DNA dan melakukan penyambungan DNA dari sumber yang berbeda (*secara in vitro*)
- Setelah itu terdapat beberapa peneliti yang mampu memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel hidup
- Ternyata di dalam sel hidup, DNA rekombinan ini dapat memperbanyak diri (bereplikasi)
- Teknik ini sekarang dikenal dengan teknik **DNA cloning (kloning DNA)**

Kloning DNA

- Teknologi ini memerlukan kerjasama penelitian dari beberapa ilmuwan : ahli biologi, biokimia, bioteknologi, genetika, klinisi
- Teknologi cloning terdiri dari beberapa tahap :
 - Penentuan gen yang akan dikloning
 - Penentuan vector DNA yang akan digunakan
 - Pemotongan gen yang akan dikloning
 - Penyambungan gen dan vector
 - Memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel hidup
 - Memperbanyak DNA rekombinan

Kloning DNA

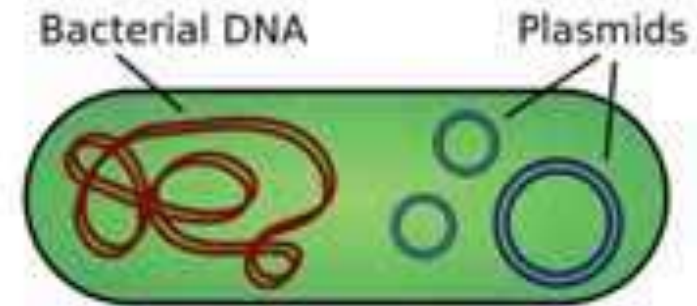


DNA target dan vektor diperlukan dalam kloning DNA

- DNA target merupakan gen atau sekuen DNA yang akan dikloning
- DNA vektor adalah DNA yang digunakan untuk membawa DNA target ke dalam sel hidup
- DNA vektor bersifat dapat bereplikasi sendiri pada sel hidup
- Vektor yang banyak digunakan adalah **plasmid**

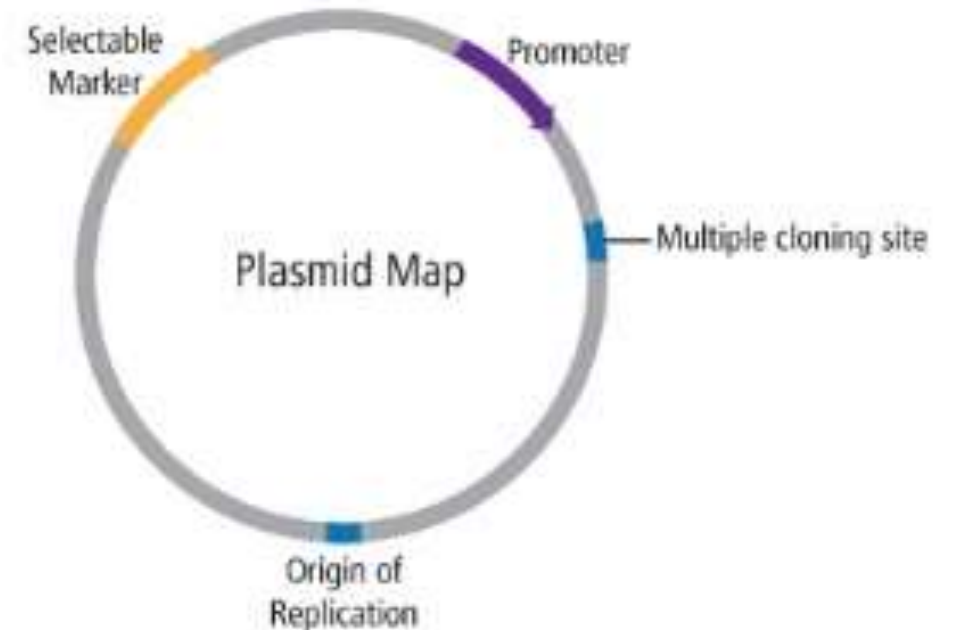
Plasmid sebagai DNA vektor

- Plasmid merupakan DNA ekstra kromosom yang terdapat pada bakteri
- Memiliki sekuen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik



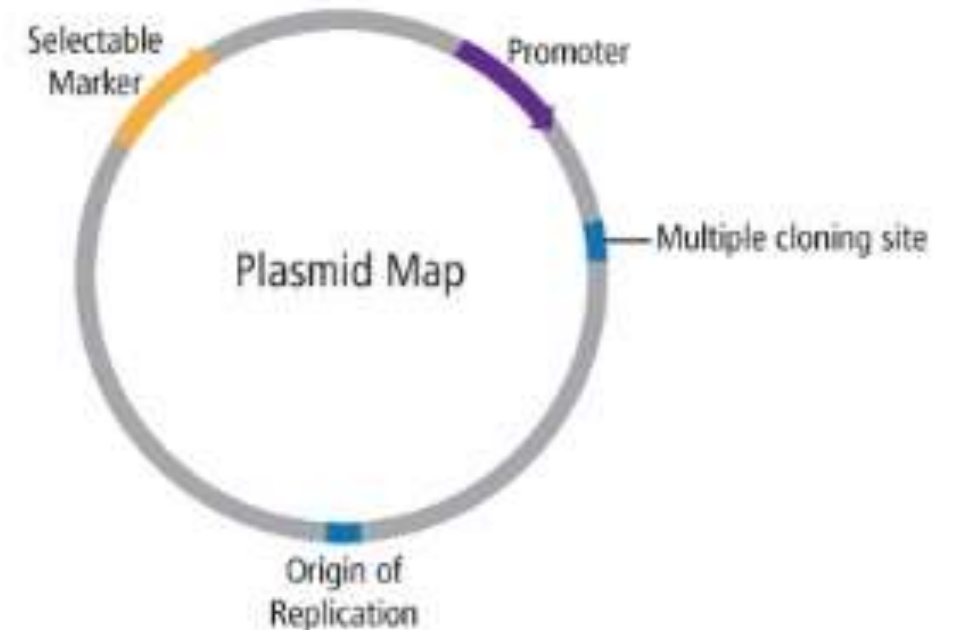
Plasmid sebagai DNA vektor

- Plasmid memiliki **origin of replication (ORI)** → sebagai tempat berawalnya proses replikasi
- Sekuen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik digunakan sebagai *selectable marker* (penanda penyeleksi)
- Contohnya gen Amp^R pada plasmid menandakan bahwa bakteri membawa gen resisten terhadap ampisilin
- Sehingga bakteri dapat ditumbuhkan pada media dengan ampisilin

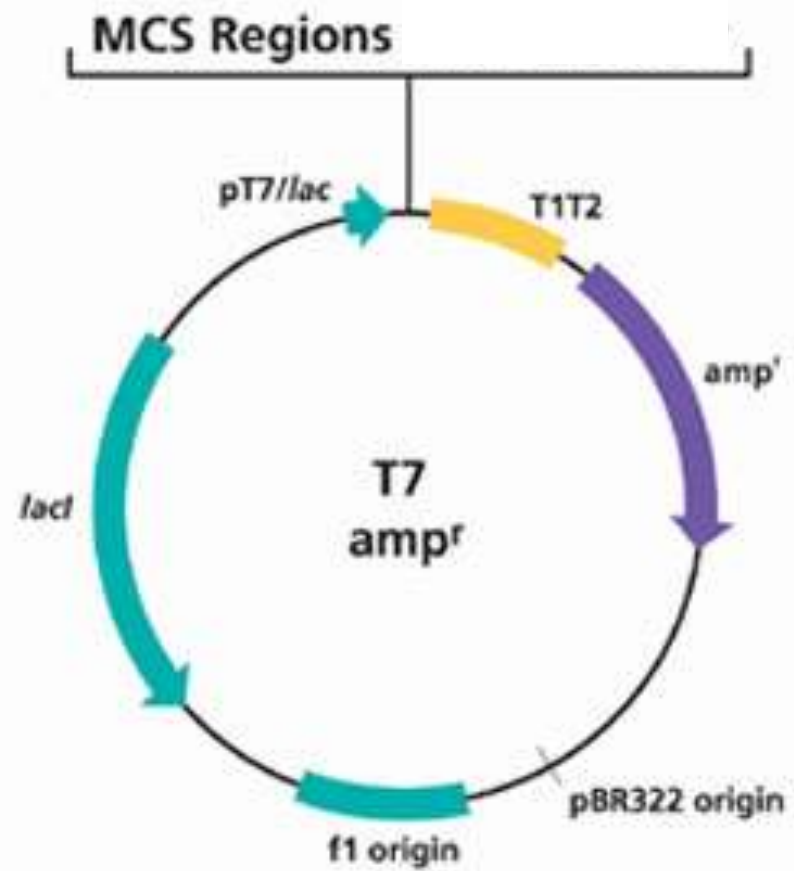


Plasmid sebagai DNA vektor

- Terdapat ***promoter*** sebagai segmen yang mengatur proses transkripsi dan sel tempat protein dari gen target dapat dihasilkan/diekspresikan
- ***Multiple cloning site (MCS)*** merupakan daerah tempat gen target dimasukkan atau disisipkan
- Plasmid secara komersial dijual untuk kloning DNA

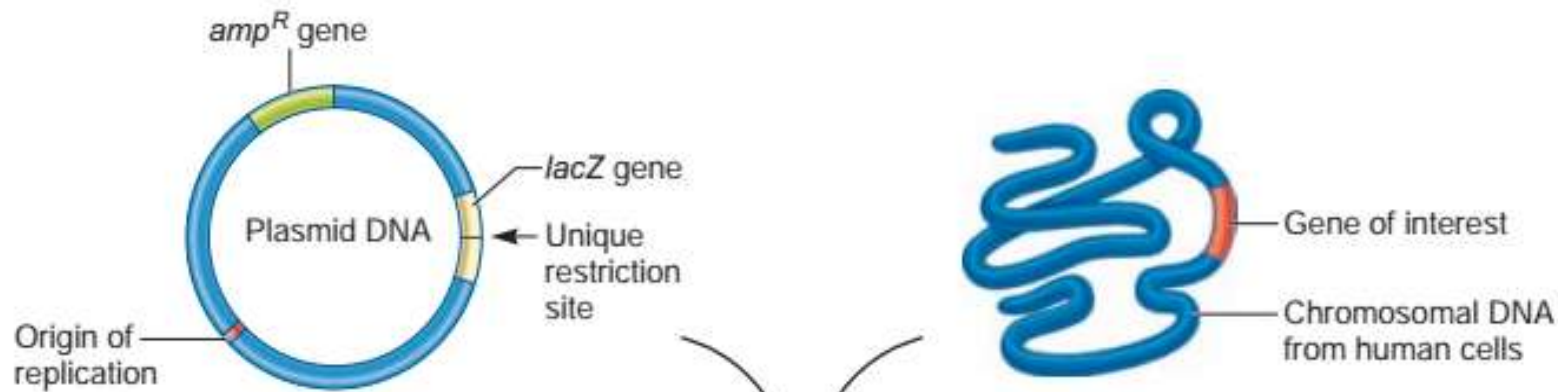


Contoh plasmid

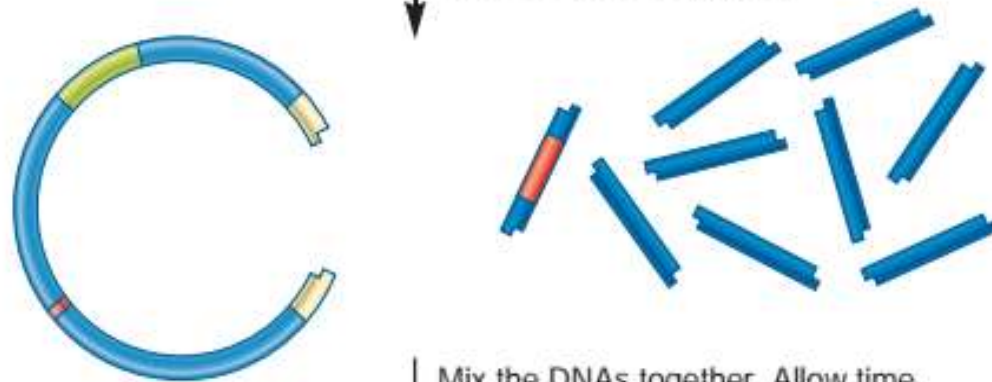


Tahapan Kloning DNA

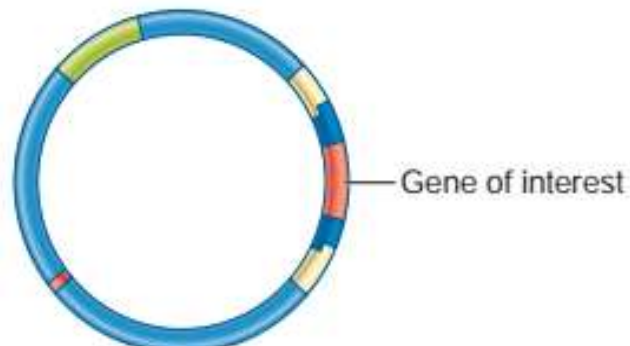
1. DNA/gen target dan plasmid dipotong dengan enzim restriksi yang sama
2. Setelah itu gen diligasikan ke plasmid di daerah MCS
3. Plasmid yang berisi gen target dimasukkan ke dalam bakteri
4. Bakteri ditumbuhkan pada medium pertumbuhan + antibiotik
5. Diinkubasikan selama beberapa waktu pada suhu tertentu
6. Akan tumbuh banyak bakteri (sel kompeten) dengan plasmid rekombinan



Cut the DNAs with the same restriction enzyme.



Mix the DNAs together. Allow time for sticky ends to base-pair. Add DNA ligase to covalently link a piece of chromosomal DNA into the plasmid.



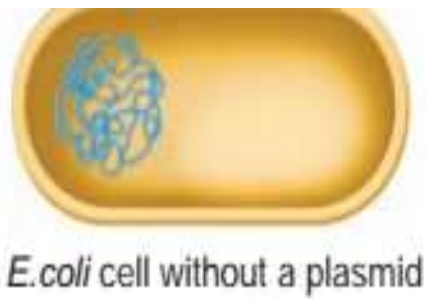
Note: In this case, the gene of interest was inserted into the plasmid. It is also possible for any other DNA fragment to be inserted into the plasmid. And it is possible for the plasmid to recircularize without an insert.

Restriksi DNA

- Adalah pemotongan DNA menggunakan enzim DNA restriksi
- Ada beberapa macam enzim DNA restriksi endonuklease, contohnya *BamHI*, *Sall*, *XhoI* dll
- Tiap enzim spesifik terhadap kode genetik DNA → misal *BamHI* hanya akan memotong DNA dengan kode GGATCC

Ligasi DNA

- Penggabungan DNA menggunakan enzim DNA ligase
- Proses ini memerlukan kode genetik yang sesuai antara kedua DNA yang digabungkan
- Bersama dengan restriksi DNA, proses ini berperan dalam kloning gen



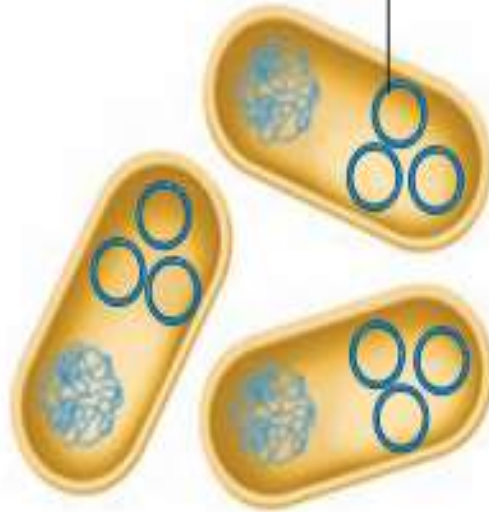
Mix DNA with many *E. coli* cells that have been treated with agents that make them permeable to DNA.



Note: This shows a bacterial cell with the plasmid carrying the gene of interest. Other bacterial cells would have other recombinant vectors or a recircularized vector.

Recircularized vector without an insert

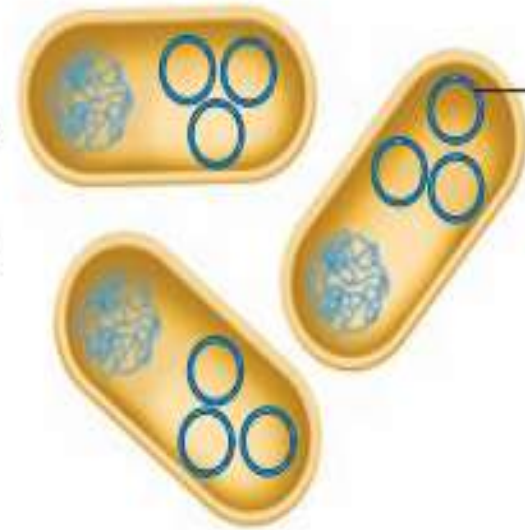
Plate cells on media containing X-Gal, IPTG, and ampicillin. Incubate overnight.



Blue colony



White colony



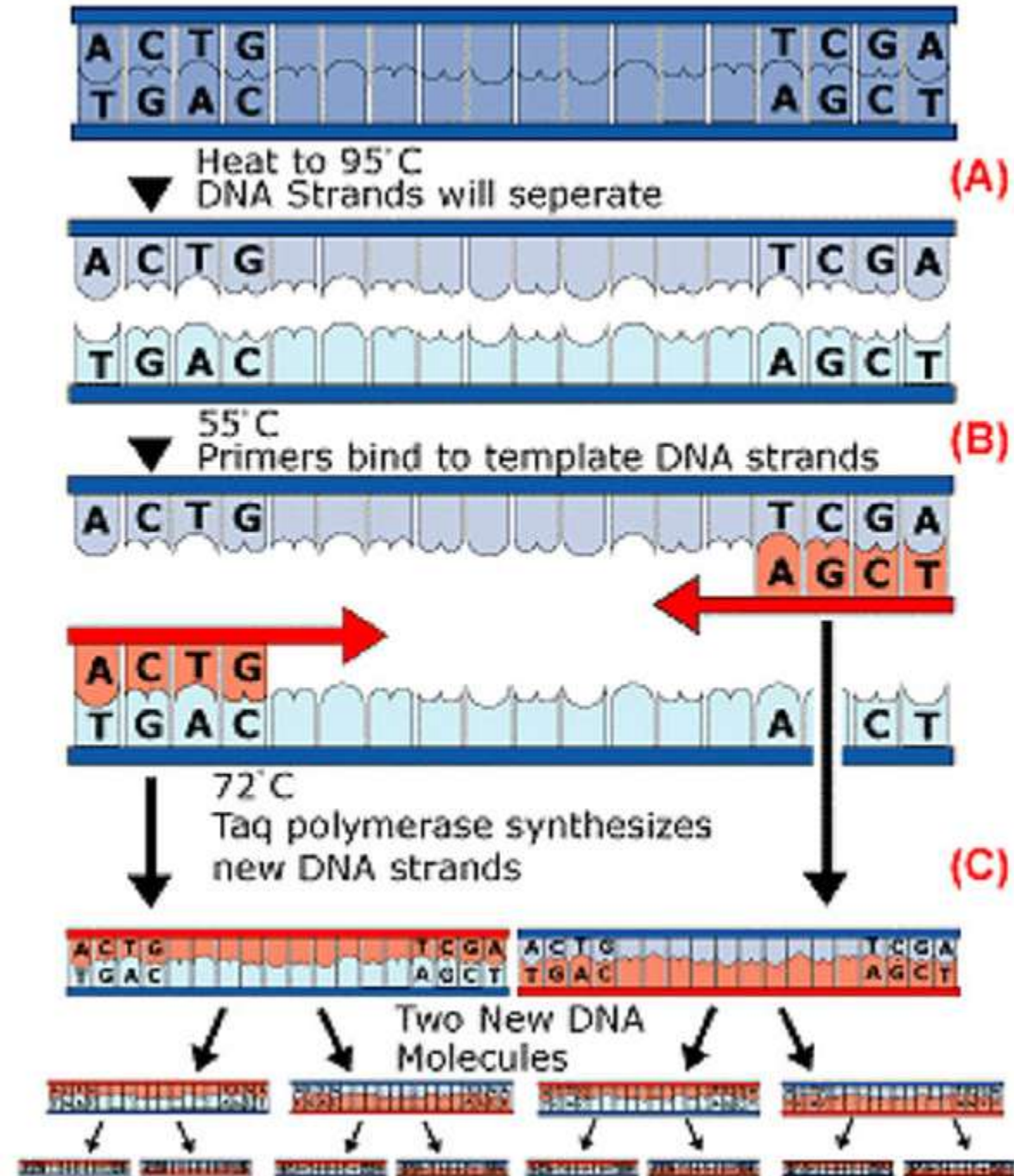
Recombinant vector with an insert

Each bacterial colony is derived from a single cell; so all the cells in a colony are genetically identical.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Merupakan metode perbanyakan gen (DNA) menggunakan reaksi berantai
- Dibantu oleh enzim DNA polimerase
- Memerlukan primer → DNA spesifik dengan panjang 18-24 pb
- Terdiri dari 3 tahap :
 - Denaturasi → pemisahan untai ganda DNA
 - *Annealing* → penempelan primer pada DNA
 - Elongasi → pembentukan DNA/gen baru

Tahapan PCR
(A) Denaturasi
(B) Annealing
(C) Elongasi



Kloning DNA digunakan untuk beberapa manfaat

1. Bidang kedokteran → produksi vaksin, produksi hormon
2. Bidang pertanian → menghasilkan bibit baru yang lebih unggul (seperti tahan hama, panen cepat, dll)
3. Ilmu pengetahuan → untuk mengetahui peran suatu gen yang belum diketahui