

Materi Kuliah
 Bioteknologi Pertanian
 Prodi Agribisnis
 Pertemuan Ke 5

TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

Ir. Sri Sumarsih, MP.
 Email: Sumarsih_03@yahoo.com
 Weblog: Sumarsih07.wordpress.com
 Website: agriculture.upnyk.ac.id

Pengertian

Pemuliaan tanaman konvensional:

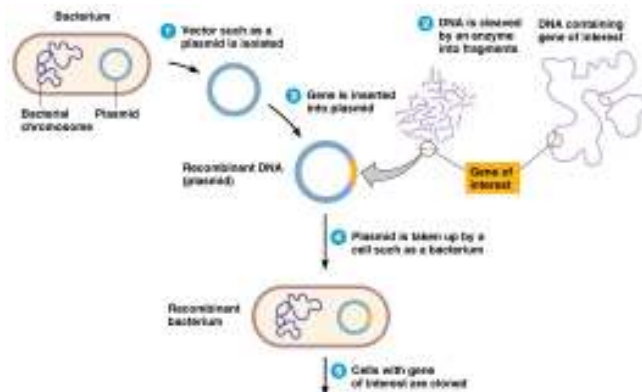
Rekombinasi genetik berlangsung secara in vivo, proses rekombinasi genetik tidak dapat diatur secara spesifik

Teknologi DNA rekombinan:

Teknik untuk menggabungkan molekul DNA secara in vitro sehingga diperoleh molekul DNA rekombinan sesuai yang diharapkan

Teknologi DNA Rekombinan juga disebut Rekayasa Genetik atau Kloning DNA

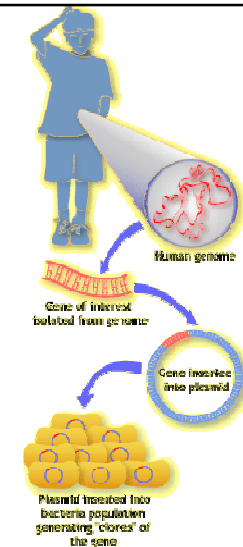
Proses rekayasa genetik pada prokariot



Cloning DNA

Tahap dasar rekombinasi DNA in vitro:

1. Isolasi DNA/gen yang akan digabungkan
2. Pemotongan DNA dengan enzim endonuklease restriksi
3. Penyambungan DNA dengan enzim DNA ligase ke DNA vektor
4. Transformasi sel inang dengan DNA rekombinan hasil ligasi
5. Analisis DNA rekombinan dalam sel inang
6. Karakterisasi fungsional gen yang diklon



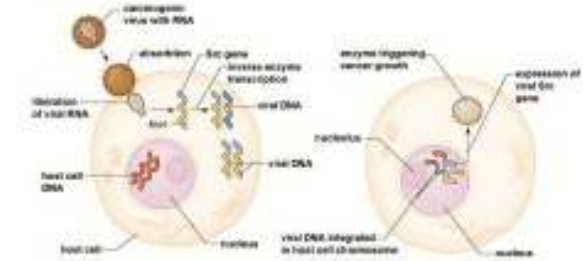
ISOLASI DNA

1. ISOLASI DNA:

- Isolasi DNA genom, kemudian dipotong dg enzim restriksi
- Isolasi m RNA hasil transkripsi dari DNA genom, kemudian membuat complementary DNA (c DNA)
- Sintesis kimia nukleotida penyusun gen (gen sintetik)
- Amplifikasi DNA dg teknik PCR

AMPLIFIKASI DNA IN VITRO

- Enzim DNA polimerase
- dNTP (di nukleotida triphosphat)
- Oligonukleotida primer
- Molekul DNA cetakan (DNA template)

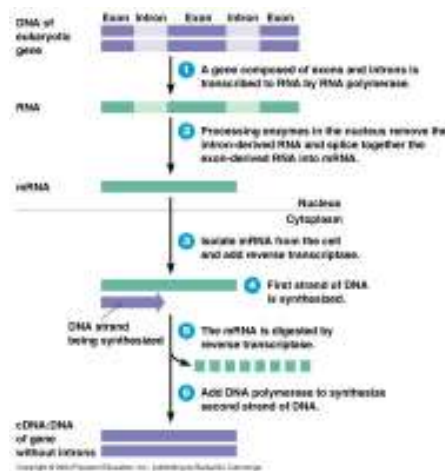


From Compton's Interactive Encyclopedia Deluxe © 1999 The Learning Company, Inc.

Virus penyebab kanker:
Transkripsi terbalik
menghasilkan DNA virus

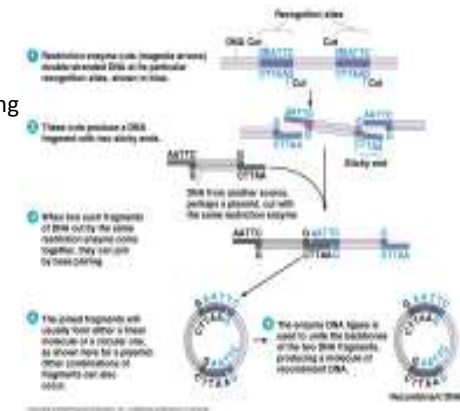
Pembuatan cDNA dari sel eukariot

- cDNA (complementary DNA)



2. Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

- Mengenal rangkaian spesifik dan memotong rangka DNA
- Enzim dinamai dari organisme tempat diisolasi
 - EcoR1 (GAATTC)
 - Sau3A (GATC)
- Generasi dengan "ujung lengket"



3. Teknik Penyambungan DNA

- Menggunakan enzim DNA ligase (T4 DNA ligase dari genom virus bakteriofag)
- Modifikasi:
 - Penambahan adaptor atau penyambung (linker)
 - Pembentukan ekor homopolimer pd ujung DNA
 - Pengisian ujung DNA kohesif
 - Penghilangan ujung DNA kohesif

Vektor

Vektor yang digunakan kloning DNA:

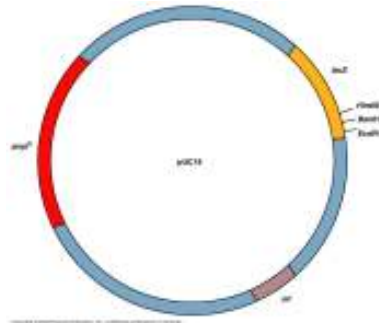
1. Vektor DNA plasmid
2. Vektor DNA bakteriofag
3. Vektor hibrid DNA plasmid dan bakteriofag

Syarat Vektor:

- Harus mampu mereplikasi sendiri
- Harus mengandung daerah promotor
- Harus memiliki ukuran normal dan sirkuler
- Sering mengandung gen penanda (gen yang resisten thd antibiotik) untuk memudahkan identifikasi sel yang mengandung vektor

Plasmid adalah vektor yang bagus

- pUC19 mengandung gen2 untuk seleksi yang mudah
- Mengandung daerah untuk enzim restriksi
- Apa yang terjadi jika plasmid ini dipotong dengan EcoR1?



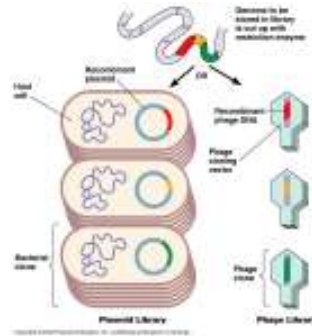
pUC19

- pUC19 memiliki gen yang resisten terhadap ampicillin
- Juga memiliki gen *LacZ* kodekan Beta-galactosidase
- Apa yang terjadi jika dipotong dengan EcoR1?



Apa sumber DNA yang disisipkan dalam vektor?

- Pustaka Gen
 - Cara untuk membuat koleksi klon yang mengandung setiap gen organisme
- Sintesis DNA dg mesin DNA



4. PROSES TRANSFORMASI GEN ASING KE SEL INANG

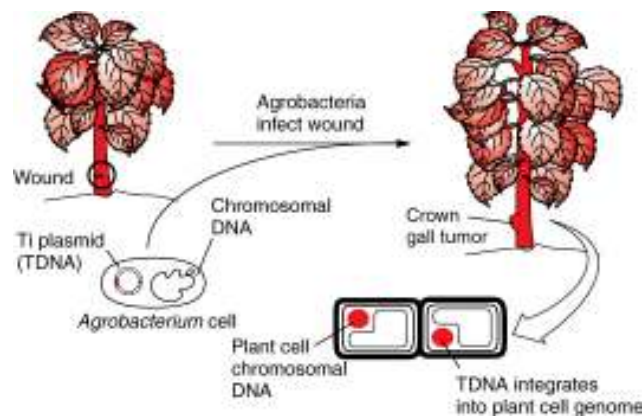
Bagaimana kita memasukkan plasmid+gen asing ke dalam sel inang prokariot?

1. Dengan teknik induksi kimia + kejutan panas
2. Dengan proses elektroporasi: listrik tegangan tinggi melubangi permukaan sel, shg DNA bisa masuk

TRANSFORMASI PADA TANAMAN:

1. Penggunaan bakteri patogen *Agrobacterium tumefaciens* atau virus tumbuhan
2. Pemasukan DNA secara langsung dengan Gen Gun
3. Transformasi langsung dg induksi kimia senyawa polietilen glikol (PEG)
4. Fusi protoplas
5. Mikroinjeksi DNA ke dalam sel

Plasmid induksi Tumor Bakteri patogen *Agrobacterium tumefaciens*



Bagaimana kita memasukkan plasmid+gen ke dalam sel?

- Pistol Gen (Gen Gun)
 - DNA dilapisi dengan emas dan didorong ke dalam sel



Bagaimana kita memasukkan plasmid+gen ke dalam sel?

- Mikroinjeksi
 - Pipet gelas ditusukkan ke dalam membran sel dan DNA disisipkan



Protoplast

- Sel tanpa dinding sel
- Dapat digunakan sebagai eksplan
- Digunakan untuk rekayasa genetika
 - Paling sering untuk ekspresi transien
 - transformasi konifer
- Digunakan untuk membuat hibrid interspesifik

Fusi Protoplas: Mengapa menggunakan ini?

- Karena dapat dilakukan
- Dimungkinkan untuk persilangan secara luas
- Digunakan untuk pengenalan ciri penyakit dan kualitas
- Potensi yg sangat besar untuk masa depan jika ingin memecahkan permasalahan yang sulit di masa kini
- Protoplas juga target untuk rekayasa genetika .

Production Hibrid Melalui Protoplas

- Empat tahap untuk produksi hibrid:
- Isolasi Protoplas
- Fusi Protoplas
- Seleksi Hibrid
- Regenerasi tanaman

Intra spesifik:

Prokariot:

Bacillus spp

Brevibacterium

Corynebacterium

Escherichia coli

Streptomyces

Intra spesifik:

Eukariot:

Aspergillus

Candida

Penicillium

Saccharomyces

Chepalosporium

Inter spesifik:

Prokariot:

Bacillus cereus x B. Thuringiensis

Brevibacterium flavum x B lactofermentum

Eukariot:

Aspergillus nidulans x A rugolusus

Penicillium crysogenum x P. notatum

Inter genetik:

Prokariot:

Rhizobium sp. x Escherichia coli

Brevibacterium flavum x Corynebacterium glutamicum

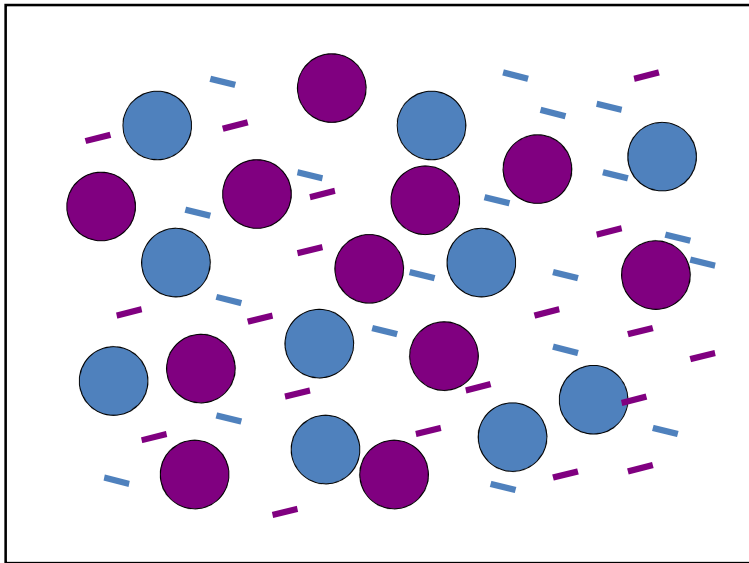
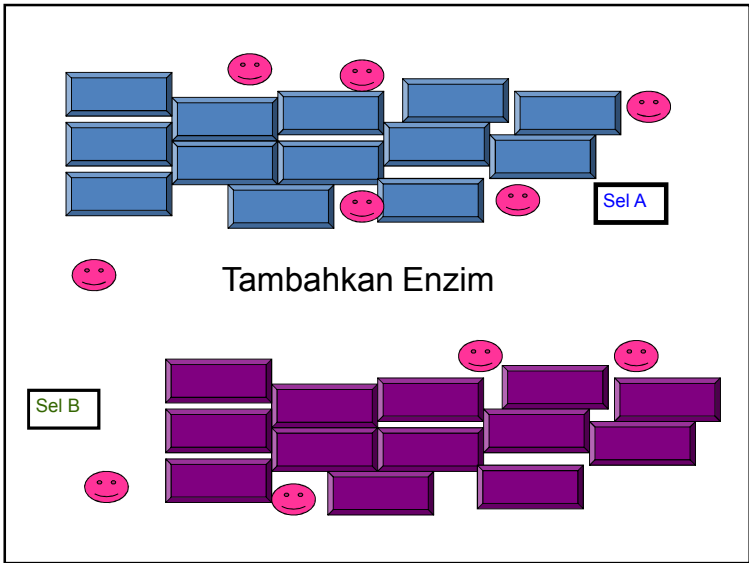
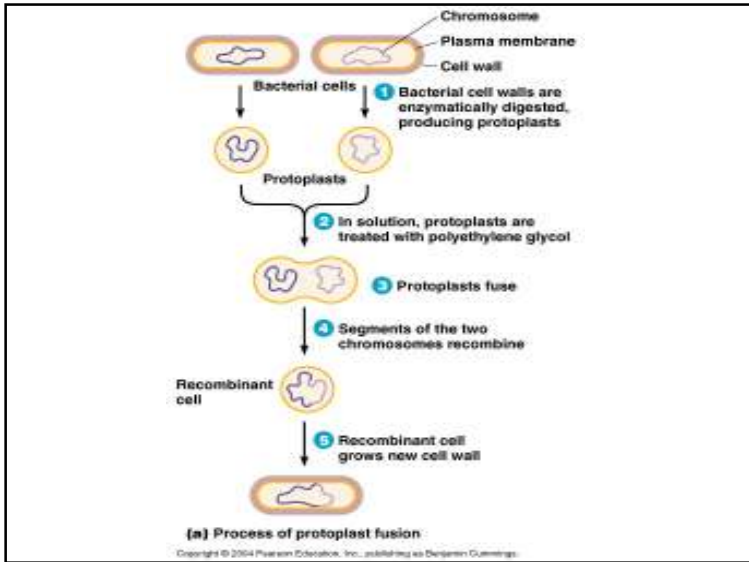
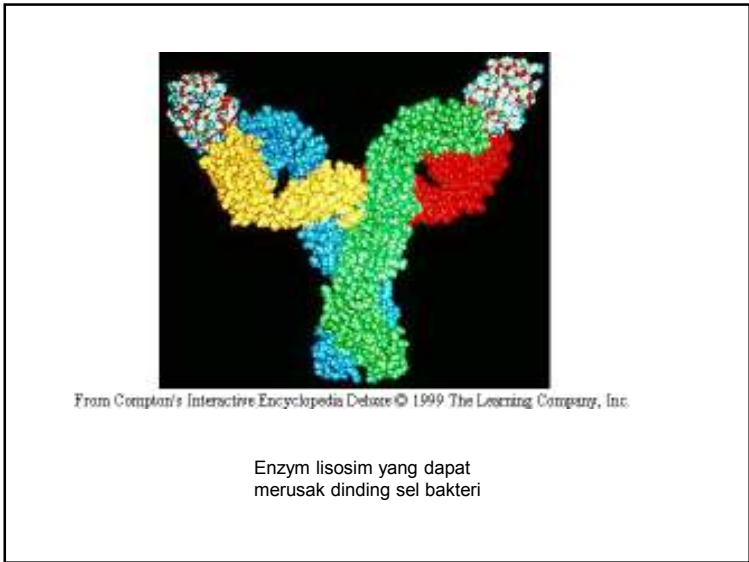
Eukariot:

Candida tropicalis x Saccharomyces fibuliger

Hansenula wingei x Saccharomyces cerevisiae

Isolasi Protoplas

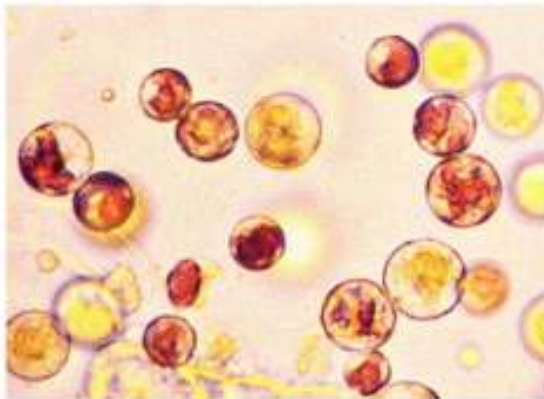
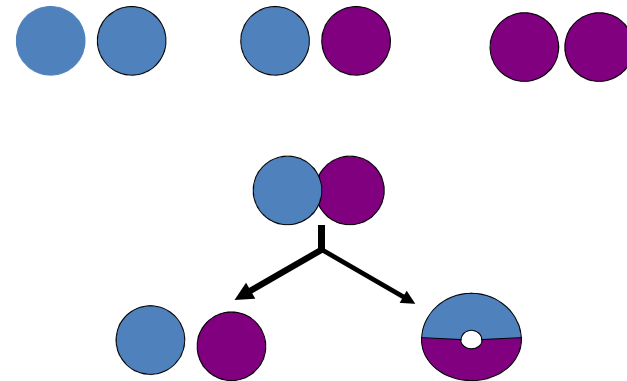
- Letakkan daun dalam Buffer
 - Isotonik sampai larutan yang hipertonic ringan
 - Biasanya mengandung mannitol atau sorbitol
- Tambahkan enzim
 - Selulase, pektinase
 - Degradasi dinding sel
- Inkubasi (& pemurnian)



FUSI PROTOPLAS:

- Tidak terjadi secara spontan
- Tambah promotor fusi
 - PEG / Elektrik / Virus
- Kemudian diinkubasi
- Tiga kemungkinan produk hasil fusi:
 - Sel A=Sel A
 - Sel B=Sel B
 - Sel A=Sel B
- Inti biasanya tidak berfusi (sel heterokarion)

Tambah Promotor Fusi



Fusi Protoplas

5. ANALISIS KEBERADAAN DNA REKOMBINAN DALAM SEL INANG SETELAH PROSES TRANSFORMASI

Teknik analisis DNA:

1. Analisis restriksi DNA
2. Hibridisasi dengan pelacak DNA
3. Analisis ekspresi gen asing yang di klon
4. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction)
5. Penentuan urutan nukleotida (DNA Sequencing)

Analisis Restriksi DNA:

- Teknik paling sederhana
- DNA diisolasi dari sel-sel hasil transformasi DNA asing yang telah ditumbuhkan dalam media selektif
- Selanjutnya DNA dipotong dg enzim restriksi spesifik, kemudian dianalisis ukuran pita DNA hasil potongan enzim restriksi tsb.

Hibridisasi dengan pelacak DNA (DNA probe):

- Pelacak DNA dilabel dg radioaktif / non-radioaktif
- Urutan basa DNA pelacak mempunyai kemiripan urutan nukleotida dg DNA rekombinan yg dilacak
- Sel dilisiskan, kemudian diberi DNA pelacak, sehingga terjadi hibridisasi antara DNA rekombinan dg DNA pelacak.
- DNA hibrid akan terdeteksi pada film berupa noktah hitam

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR:

- Amplifikasi terhadap fragmen DNA asing dg teknik PCR
- Menggunakan primer DNA yang berupa oligonukleotida yang komplementer dg fragmen DNA asing atau dg bag hulu & hilir tempat penyisipan fragmen DNA asing tsb

Penentuan urutan nukleotida DNA (DNA sequencing):

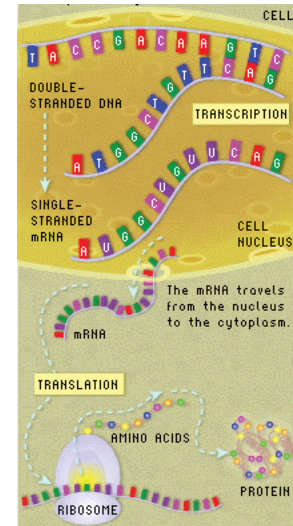
- Biasanya digunakan setelah DNA asing dipastikan keberadaannya dengan teknik yang lebih sederhana (misal analisis restriksi DNA)
- Untuk mengetahui secara rinci urutan nukleotida fragmen DNA asing

Analisis DNA rekombinan dalam sel inang dengan analisis ekspresi gen asing yang di klon:

Gen ditranskripsi dan ditranslasi sebagai cara ekspresi genetik

Khusus pada tanaman, menggunakan penanda gen khusus yang diekspresikan bersama dg gen asing.

Gen penanda khusus: gen yang mengkode enzim luciferase ekspresi nya ditunjukkan dg pendar cahaya hijau



KARAKTERISASI FUNGSIONAL GEN YANG DI KLON

Apakah gen pembawa vaksin tanaman telah berfungsi pada tanaman transgenik ini?

