

HAND OUT

REKAYASA GENETIKA

(TPH 495)

Oleh :
Dr. Ir. Endang Sutriswati Rahayu

Diterbitkan oleh
JURUSAN TEKNOLOGI PENGOLAHAN HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
1999

REKAYASA GENETIKA

A. Pendahuluan

Lebih dari 40 tahun, ahli biologi molekuler telah membuat langkah yang besar di dalam pemahaman ilmu genetika. Dimulai dengan penemuan Watson dan Crick, pada tahun 1950 tentang struktur DNA, ilmuwan kini mulai memahami bagaimana informasi genetika disimpan di dalam sel, bagaimana informasi ini digandakan dan bagaimana diteruskan dari sel ke sel, generasi ke generasi.

Konsep-konsep genetika molekuler telah memungkinkan pengembangan prosedur-prosedur isolasi, manipulasi dan ekspresi bahan-bahan genetika. Disiplin ilmu ini sering dikenal sebagai rekayasa genetika (*genetic engineering*) dan ilmu ini dapat diaplikasikan baik di bidang penelitian dasar maupun terapan. Pada penelitian dasar, teknik rekayasa dipergunakan untuk mempelajari mekanisme replikasi dan ekspresi gen di dalam prokariot, eukariot dan virus. Sejumlah penemuan dasar genetika molekuler yang sangat penting umumnya dilakukan menggunakan teknik rekayasa genetika. Pada penelitian terapan, rekayasa genetika dipergunakan untuk pengembangan kemampuan pengulturan mikrobia penghasil produk-produk yang bernilai ekonomi tinggi, misalnya insulin manusia hormon pertumbuhan untuk manusia dan hewan, interferon dan vaksin serta enzim-enzim untuk keperluan industri. Dengan demikian potensi rekayasa genetika terapan secara komersial nampaknya tidak terbatas.

Pokok-pokok yang mendasari semua aspek pada rekayasa genetika adalah proses isolasi dan purifikasi gen-gen spesifik, atau sering dikenal dengan kloning gen. Apabila kita mempunyai sejumlah besar isolat DNA, karakterisasi, manipulasi gen beserta produknya dapat dilakukan. Dengan adanya gen-gen yang telah diklon kita juga dapat menentukan sekuen nukleotidanya yang ditelusuri melalui kode genetiknya, atau sekuen asam amino dari produk proteinnya. DNA yang telah diklon juga dapat dipakai sebagai *probe* untuk menentukan struktur molekul-molekul DNA yang lebih kompleks, misalnya genom manusia. Dengan memindahkan gen dari organisme yang langka atau memiliki sifat yang membahayakan, ke dalam mikrobia yang telah diketahui dengan baik sifat-sifat genetiknya, bahan-bahan kehidupan yang mahal dapat diproduksi dengan mudah dan dalam jumlah yang cukup besar sampai saat musnahnya organisme yang terkeayasa tersebut. Dengan mengubah gen yang diklon dengan suatu cara yang telah ditentukan terlebih dahulu, pakar-pakar rekayasa genetika akan mampu mendisain strain baru, dan produk-produk kehidupan yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan sulit tersedia secara alami.

Tujuan tulisan ini adalah untuk memberikan pengertian dasar tentang rekayasa genetika dan menunjukkan bahwa prinsip-prinsip ini dapat diaplikasikan. Di dalam tulisan ini secara singkat juga akan dibicarakan tentang alat dan proses di dalam memperoleh dan memurnikan gen-gen yang diinginkan dengan menggunakan teknik-teknik rekombinasi *in vitro* atau dikenal sebagai teknik DNA rekombinan. Disamping itu disajikan pula tentang bagaimana rekayasa genetika digunakan untuk menghasilkan sejumlah besar produk-produk gen yang diinginkan, dan bagaimana produk-produk itu sendiri dapat diubah dengan *site-directed mutagenesis*.

Informasi yang mendukung karakter semua organisme disimpan di dalam molekul-molekul DNA (*deoxyribonucleic acid*) yang tipis dan panjang. Molekul ini dibagi ke dalam bagian-bagian yang disebut gen-gen dan gen-gen inilah yang mengendalikan aspek-aspek kimia spesifik sel. Dengan adanya perkembangan rekayasa genetika, memungkinkan tersedianya cara-cara untuk memotong beberapa molekul DNA ke dalam fragmen-fragmen spesifik dan mentransfer fragmen-fragmen DNA ini ke dalam suatu sel bakteri, mikrobia uniselular. Sel tunggal yang telah menerima fragmen DNA spesifik ini akan membelah berulang kali dan membentuk suatu *cluster* yang meliputi jutaan sel yang identik. Setiap sel dengan *cluster* atau klon akan mengandung beberapa kopi fragmen DNA yang sama. Billion sel yang identik dapat ditumbuhkan dari suatu klon dan dari sel-sel ini sejumlah besar 'suatu bagian kecil DNA' dapat diekstrak. Oleh karena itu, 'mesin biologi' ini dapat diterapkan pada proses industri untuk menghasilkan senyawa-senyawa sederhana ataupun kompleks, seperti asam organik, asam amino, enzim, hormon, antibiotik atau bahkan vaksin. Manipulasi gen didefinisikan sebagai 'pembentukan kombinasi baru' bahan-bahan yang dapat diwariskan secara turun-temurun dengan jalan menyisipkan molekul DNA, yang diperoleh dari luar sel ke dalam virus, plasmid bakteri

atau sistem vektor lain sehingga memungkinkan mereka masuk ke dalam sel inang, yaitu yang secara alami tidak mungkin terjadi namun mereka mampu untuk melanjutkan propagasi.

Permasalahan dasar. Usaha untuk mentransfer DNA asing suatu jasad prokariot dan eukariot telah ada sebelum era metoda manipulasi gen modern, namun perkembangannya tidak begitu memuaskan. Kesulitan-kesulitan yang dihadapi terletak pada proses 'masuknya' DNA asing ke sel resipien, antara lain : (a) Bahwa deteksi pengambilan DNA asing tergantung pada ekspresi gen, dan kegagalan yang sering terjadi karena kurang akuratnya proses transkripsi dan translasi; (b) DNA asing sering sulit dipertahankan di dalam sel-sel yang ditransformasikan. Namun demikian kesulitan ini tidak akan muncul apabila DNA asing dapat diintegrasikan ke dalam genom sel inang. Tetapi apabila DNA asing gagal diintegrasikan, dia akan hilang selama proses memperbanyakkan sel inangnya. Sebabnya adalah sederhana. Molekul DNA dapat melakukan replikasi apabila molekul ini mengandung pemula replikasi (*origin of replication*) dan biasanya hanya terdapat satu molekul per genom virus dan bakteri. Molekul ini disebut sebagai 'replikon'. Fragmen-fragmen DNA bukanlah replikon dan apabila tidak ada replikon mereka akan tercuci ke luar sel. Seandainya fragmen DNA mempunyai replikon mereka sering tidak berfungsi di dalam sel inang lain.

Pemecahan problem ini adalah, apabila fragmen DNA tidak dapat direplikasi oleh resipien, maka molekul ini perlu 'ditempelkan' pada replikon yang sesuai. Replikon semacam ini dikenal sebagai vektor atau 'kendaraan kloning'. Plasmid dan bakteriofag (*bacteriophage*) merupakan vektor yang tepat karena mereka mempunyai replikonnya sendiri, yang di dalam pemeliharaannya tidak harus diintegrasikan ke dalam genom sel inang dan DNANYA dapat diisolasi dengan mudah di dalam bentuk yang sempurna (*intact*). Masuknya DNA asing ke dalam vektor sering digambarkan sebagai DNA *chimaeras* (istilah yang digunakan untuk menggambarkan monster angan-angan manusia yang berkepala singa, berbadan kambing dan berekor ular), sehingga kadang-kadang muncul istilah *artificial recombinant molecules* dan sering didefinisikan sebagai rekayasa genetika atau manipulasi gen. Sedangkan prosesnya disebut sebagai kloning tingkat molekular (*molecular cloning*) atau kloning gen, karena keturunan organisme yang bersangkutan mempunyai kesamaan secara genetika, yang seluruhnya mengandung molekul gabungan. Jasad baru ini juga dapat diperbanyak dan ditumbuhkan secara besar-besaran, sehingga terjadi amplifikasi molekul DNA gabungan dan produk gen tersebut.

Kloning gen. Telah disebutkan di atas bahwa tujuan dari kloning gen adalah untuk mengisolasi gen spesifik dalam jumlah yang besar dan dalam bentuk yang murni. Secara teori adalah dimungkinkan untuk mengisolasi fragmen DNA murni dengan gen tunggal dari DNA kromosom yang dipotong-potong menggunakan enzim restriksi. Gambaran sederhana terdapat pada organisme seperti *E. coli* yang mempunyai gen-gen sebesar 1-2 kpb (kilo pasangan basa) dari genom sebesar 5.000 kpb. Sehingga rata-rata gen *E. coli* kurang dari 0,05% dari total DNA di dalam sel. Pada manusia permasalahannya dapat lebih kompleks karena gen-gen yang ada tidak lebih besar daripada gen-gen pada *E. coli*, namun besarnya genom manusia adalah 1000 kali lebih besar. Sebaliknya DNA lambda bakteriofag hanya sebesar 50 kpb dan beberapa DNA plasmid hanya berukuran kurang dari 5 kpb. Pada elemen-elemen genetik ini rata-rata gen menyusun 2-40 % DNA.

Dengan demikian dasar strategi bagi kloning gen adalah untuk memindahkan gen yang diinginkan dari suatu genom kompleks yang besar ke suatu genom yang lebih sederhana, baik secara transformasi atau transduksi. Dengan makin berkembangnya pengetahuan tentang kimia DNA dan ensimologi, memberikan kemungkinan melakukan pemotongan maupun penyambungan molekul-molekul DNA secara *in vitro*. Proses yang dikenal sebagai rekombinasi *in vitro* ini dibantu oleh beberapa alat yang penting yaitu enzim restriksi, DNA ligase, dan DNA sintetase.

Kloning gen dapat dibagi ke dalam beberapa tahap :

1. Isolasi dan fragmentasi DNA. DNA donor dapat diisolasi dari sel tumbuhan, hewan, manusia ataupun mikrobia. DNA yang berisi gen yang dikehendaki pertama kali dipotong-potong sampai dengan ukuran tertentu. Fragmen DNA ini sering disebut sebagai DNA penumpang (*passenger DNA*). Beberapa cara untuk mendapatkan fragmen DNA : (a) dengan menggunakan enzim pemotong DNA (endonuklease restriksi); (b) pemotongan secara mekanis; (c) sintesis DNA komplementer (cDNA); dan (d) sintesis langsung DNA secara kimia.

2. Penyambungan DNA ke suatu vektor. Fragmen DNA penumpang selanjutnya digabungkan dengan fragmen DNA kedua yang disebut sebagai vektor (kendaraan) yang memiliki kemampuan untuk melakukan replikasi. Beberapa contoh vektor adalah plasmid, lambda, kosmid, dan filamentous fag. Adapun enzim yang mampu melakukan penyambungan DNA disebut sebagai DNA ligase.

3. Penyisipan ke dalam sel inang (*host*). Molekul hasil rekombinasi ini harus dimasukkan ke dalam sel, tempat molekul ini dapat memperbanyak diri. Sel inang selanjutnya bertindak sebagai pabrik yang membuat sejumlah kopi dari molekul rekombinan ini. Karena molekul ini melakukan replikasi tanpa adanya proses rekombinasi berikutnya, dan molekul ini membentuk kopi yang persis sama satu dengan yang lain, maka proses ini disebut sebagai kloning molekul. Proses pemasukan molekul DNA rekombinan ke dalam sel inang ini dapat berlangsung melalui beberapa cara : (a) Transfeksi menggunakan DNA fag; (b) Transformasi menggunakan DNA plasmid; (c) Secara *in vitro* dibungkus ke dalam bungkus fag (*phage coat*), selanjutnya melalui proses transduksi dengan fag atau kosmid.

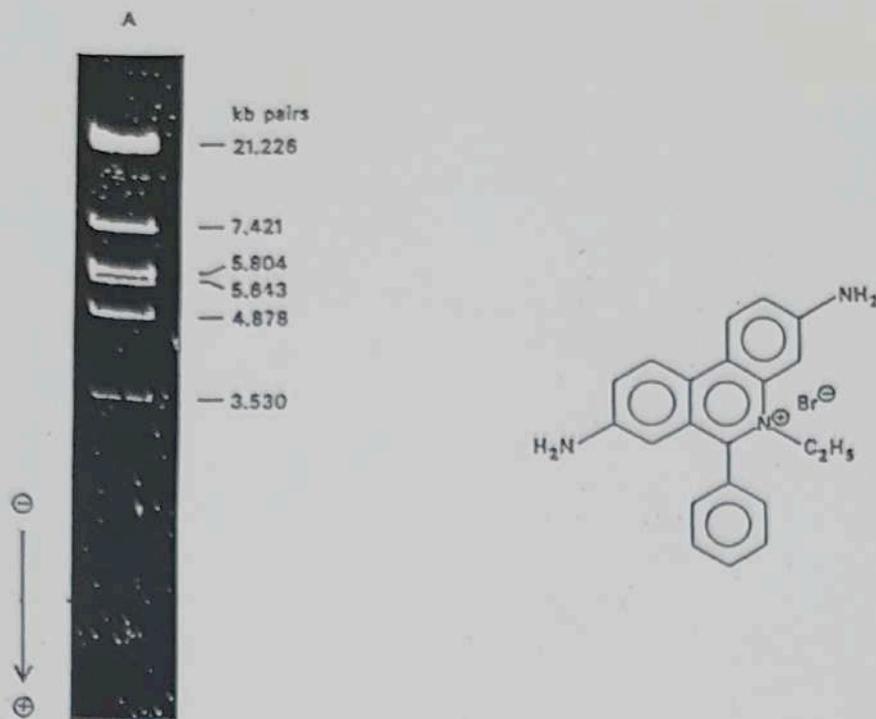
4. Deteksi dan pemurnian klon yang diinginkan. Bakteri yang membawa molekul rekombinan selanjutnya diseleksi dari bakteri yang tidak membawa molekul rekombinan. Seleksi ini dapat dilakukan dengan : (a) hibridisasi koloni; (b) mapping restriksi; (c) sequencing DNA; (d) blotting Southern.

B. Teknik Dasar

Agarose gel elektroforesis. Kemajuan di dalam percobaan pemotongan dan penyambungan molekul DNA telah dimonitor dengan kecepatan sedimentasi pada gradien sukrosa. Namun demikian, cara ini telah tergeser oleh adanya gel elektroforesis. Gel elektroforesis tidak hanya digunakan sebagai metoda analitik, namun, secara rutin metoda ini digunakan pula untuk purifikasi fragmen DNA yang spesifik. Gel ini terdiri dari poliakrilamid atau agarosa. Agarosa adalah gel yang cocok untuk pemisahan fragmen DNA dengan ukuran yang berkisar antara beberapa ratus sampai dengan 20 kpb. Poliakrilamid lebih disukai untuk fragmen DNA yang lebih kecil. Untuk fragmen DNA yang sangat besar 1000-2000 kb, elektroforesis dengan *pulsed electrical field* atau *field inversion* telah dikembangkan.

Gel adalah jaringan molekul polimer. Molekul DNA adalah bermuatan negatif dan pada daerah beraliran listrik molekul ini akan melakukan migrasi pada gel dengan kecepatan yang tergantung atas ukurannya : molekul DNA yang kecil dapat melewati gel dengan mudah dan melakukan migrasi lebih cepat dibandingkan dengan molekul yang lebih besar (Gambar 1a). Telah ditunjukkan pula bahwa migrasi molekul DNA ini sebanding (arah berlawanan) dengan logaritma berat molekulnya. Akhir-akhir ini telah ditunjukkan pula bahwa garis hubungan antara panjang fragmen atau berat molekul versus mobilitas resiproknya menghasilkan garis lurus. Pada setiap penggunaan elektroforesis gel biasanya disertakan pula fragmen DNA marker yang ukurannya telah diketahui untuk determinasi molekul DNA yang ukurannya belum diketahui menggunakan interpolasi. Salah satu keuntungan menggunakan elektroforesis gel adalah bahwa pita-pita DNA dapat langsung dideteksi dengan sensitivitas yang tinggi. Pita-pita DNA pada gel distaining dengan cat-interkalasi ethidium bromida (Gambar 1b) dan sejumlah kecil DNA (0,05 ug) pada satu pita biasanya telah dapat dideteksi dengan fluoresensi yang terlihat pada saat gel diiluminasi dengan sinar ultraviolet.

Southern blotting, Northern dan Western blotting. Sering-kali perlu untuk mengetahui sekuens di dalam fragmen restriksi DNA yang ditranskripsi ke dalam RNA, atau melakukan pemetaan sekuens-sekuens menggunakan hibridisasi ke fragmen restriksi. Oleh karena itu akaa sangat membantu apabila terdapat suatu metoda deteksi fragmen pada gel agarosa yang komplementer dengan sekuens RNA atau DNA tertentu. Hal ini dapat dilakukan dengan metoda yang telah disampaikan secara rinci oleh Southern pada tahun 1975 dan 1979, yang selanjutnya disebut sebagai Southern blotting.

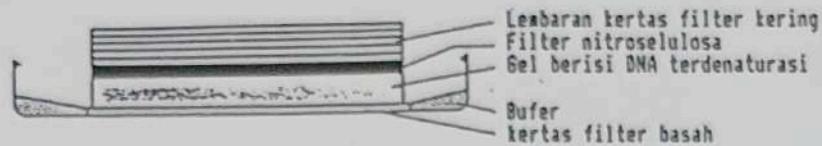


Gambar 1 (a) Elektroforesis DNA pada gel agarosa. Arah migrasi ditunjukkan dengan panah; (b) Ethidium bromida

Metoda ini telah dikembangkan pula untuk menganalisis RNA dan protein, yang selanjutnya, masing-masing disebut sebagai Northern blotting dan Western blotting.

Hal yang paling penting di dalam teknik blotting ini adalah memindahkan makromolekul dari gel tempat molekul ini dipisahkan secara elektroforesis pada permukaan membran. Setelah dipindahkan, makromolekul diimobilisasi secara permanen pada membran. Membran ini selanjutnya dapat digunakan untuk beberapa teknik-teknik analisis, misalnya deteksi dan analisis asam nukleat dan protein.

Prototip metoda Southern blotting ini disajikan pada Gambar 2. Fragmen restriksi DNA pada gel agarosa didenaturasi menjadi bentuk benang tunggal dengan perlakuan menggunakan alkali dan gel ini selanjutnya diletakkan di atas kertas saring (*filter paper*) yang telah disaturasi dengan buffer. Permukaan gel selanjutnya ditutup dengan membran filter nitroselulosa dan di atas membran ini sendiri diberi kertas saring. Selanjutnya, di atas diberi lagi berlapis-lapis kertas saring atau kertas tisu. Karena adanya daya kapiler, buffer melewati gel, diikuti dengan basahanya lapisan kertas saring yang kering, dan pada saat terjadinya ini akan mengiluskan DNA yang terdenaturasi dari gel. Pada saat DNA benang-tunggal mengadakan kontak dengan nitroselulosa, DNA ini akan terikat. Proses blotting ini secara total memerlukan waktu beberapa jam dan dengan hasil pemindahan DNA dari gel ke membran sehingga akan memberikan pola pita-pita pada permukaan membran yang serupa dengan pola fraksinasi gel yang asli, dengan kehilangan resolusi yang minimum. DNA yang sudah menempel pada membran selanjutnya diimobilisasi secara permanen dengan memanaskan membran pada suhu 80°C secara vakum.



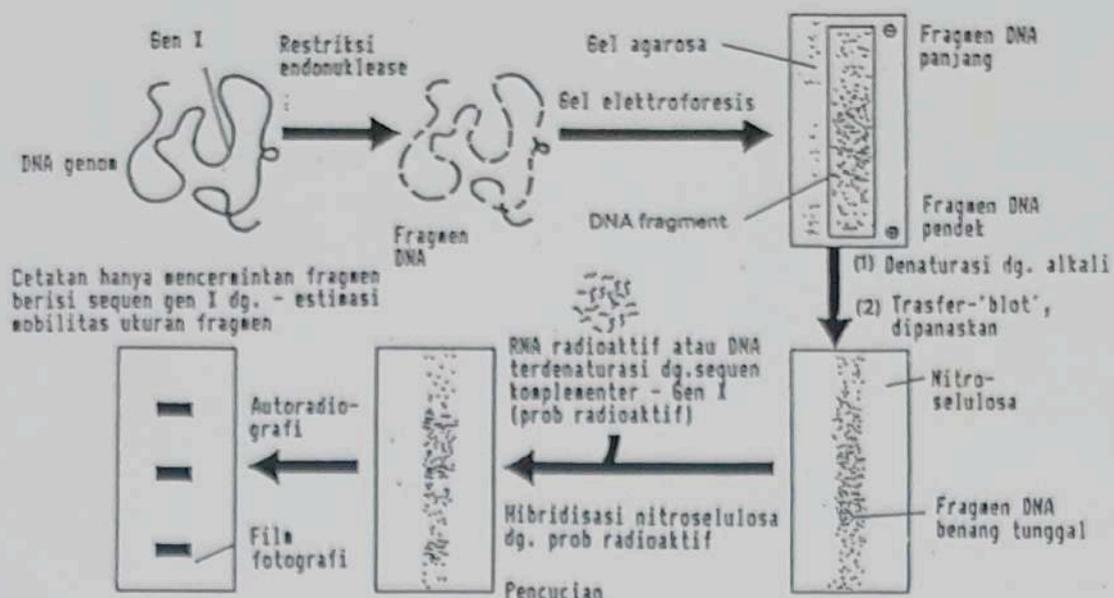
Gambar 2. Teknik Southern blot

Filter selanjutnya ditempatkan pada larutan RNA, DNA benang tunggal atau oligodeoksinukleotida yang beradioaktif dengan sequen yang komplementer dengan pita atau pita-pita hasil pemindahan secara blotting sehingga deteksi lebih lanjut dapat dilakukan. Kondisi dapat dipilih sedemikian rupa sehingga asal nukleat radioaktif melakukan hibridisasi dengan DNA pada membran. Karena asam nukleat radioaktif digunakan untuk mendeteksi dan menentukan lokasi sequen yang komplementer, maka asam nukleat ini disebut sebagai prob (pelacak/*probe*). Pengikatan prob yang non-spesifik pada membran tidak boleh terjadi, dan hal ini merupakan problem dengan DNA prob karena benang tunggal DNA, tidak seperti halnya RNA, memiliki afinitas yang tinggi terhadap membran. Denhardt (1966) menunjukkan bahwa pengikatan non-spesifik dapat dikurangi dengan perlakuan membran yang membawa DNA yang menempel, dengan larutan yang berisi Ficoll (polimer sukrosa buatan), polivinilpirolidon dan serum bovin albumin, masing-masing 0,2 %. Campuran makromolekul Denhardt biasanya dimasukkan di dalam reaksi hibridisasi dan selama tahap praperlakuan (*pretreatment*). Campuran biasanya ditambah dengan asam nukleat yang tidak-relevan seperti tRNA yang dapat berperan di dalam menempati seluruh lokasi pengikatan yang non-spesifik untuk makromolekul yang ada pada membran. Biasanya, kondisi dipilih agar terjadi kecepatan hibridisasi yang maksimum, sejalan dengan latar belakang pengikatan non-spesifik pada membran yang rendah. Setelah dilangsungkan reaksi hibridisasi, membran dicuci untuk menghilangkan radioaktif yang tidak terikat dan daerah terjadinya hibridisasi dideteksi dengan autoradiografi setelah membran ditempelkan pada film sinar-X.

Pendekatan yang umum dilakukan adalah melakukan hibridisasi dengan kondisi stringensi yang relatif rendah sehingga hibridisasi dapat berlangsung dengan kecepatan tinggi, diikuti dengan satu seri pencucian paska hibridisasi dengan stringensi yang meningkat (yaitu dengan suhu tinggi, atau yang lebih umum dilakukan, adalah dengan kekuatan ion yang lebih rendah). Autoradiografi setelah masing-masing tahap pencucian akan menunjukkan bahwa setiap pita DNA yang berkaitan dengan prob (tetapi tidak komplementer secara sempurna) juga akan memberikan estimasi tingkat terjadinya salah pasang (*mismatching*).

Metoda Southern blotting dapat menjadi sangat sensitif. Metoda ini dapat diaplikasikan untuk memeta lokasi restriksi disekitar sequen gen satu kopi pada genom yang kompleks, misalnya genom manusi (Gambar 3).

Teknik yang disampaikan oleh Southern ini adalah sangat bernilai, tetapi tidak dapat diterapkan secara langsung untuk men-blot-trasfer RNA yang telah dipisahkan dengan elektroforesis gel, karena ternyata RNA ini tidak terikat pada nitroselulosa. Oleh karena itu, Alwine dan kawan-kawannya (1979), menyajikan suatu prosedur baru dimana pita pita RNA dapat di-blot-transfer dari gel ke kertas yang reaktif (*chemically reactive paper*) yang dapat terikat secara kovalen. Kertas yang reaktif ini disiapkan dengan kertas yang diazosisasi aminobenziloksimetil (kertas diazobenziloksimetil-DBM), yang disiapkan dari kertas Whatman 540 dengan satu seri reaksi tidak sempurna. Pada saat terjadi ikatan kovalen, RNA mampu untuk hibridisasi dengan radiolabel prob DNA. Seperti hal sebelumnya, lokasi pita-pita hibridisasi ditentukan dengan autoradiograf. Metoda ini selanjutnya dikenal dengan istilah Northern blotting.



Gambar 3. Lokasi pemetaan restriksi sequeen gen hipotetik pada total DNA genom menggunakan metoda Southern-blot. DNA genom dipotong menggunakan endonuklease restriksi menjadi ratusan ribu fragmen dengan berbagai ukuran. Fragmen ini dipisahkan berdasarkan ukurannya dengan elektroforesis gel dan diblot-transfer pada kertas nitroselulosa. RNA atau DNA terdenaturasi yang radioaktif yang komplementer dengan sequeen gen X diaplikasikan pada kertas nitroselulosa yang berisi DNA hasil blot (*blotted DNA*). RNA atau DNA yang berlabel akan melakukan hibridisasi dengan sequeen gen X dan selanjutnya dapat dideteksi dengan autoradiograf, sehingga ukuran fragmen restriksi yang berisi sequeen gen X dapat diestimasi dari mobilitas elektroforesisnya. Menggunakan berbagai endonuklease restriksi (satu atau kombinasi), peta lokasi restriksi pada dan disekitar gen X dapat dibuat.

Dikarenakan kuatnya ikatan kovalen RNA pada kertas, blot-transfer seperti ini dapat digunakan kembali; prob dari reaksi hibridisasi sebelumnya dapat diilusikan dengan pencucian pada suhu saat hibridisasi tidak stabil. Meskipun pada mulanya ditujukan untuk transfer pita-pita RNA, paper yang secara kimia reaktif ini sama efektifnya apabila digunakan untuk mengikat DNA yang terdenaturasi. Pada kenyataannya, fragmen DNA kecil lebih efisien ditransfer ke derivat kertas yang telah diazotisasi daripada ke nitroselulosa.

Akhir-akhir ini, telah ditemukan bahwa pita-pita RNA dapat di-blot ke membran nitroselulosa dengan kondisi yang tepat. Membran nilon juga telah dikembangkan baik untuk Southern maupun Northern blotting. Material-material membran yang baru memiliki keuntungan, secara fisik lebih kuat dan dapat digunakan kembali (setelah prob dihilangkan dengan pencucian menggunakan suhu tinggi dan prosedur denaturasi yang lain). Membran nilon memiliki keuntungan yang lain, karena, asam nukleat dapat di *cross-linked* dan secara permanen dapat diikat (*fixed*) dengan menempatkan membran pada sinar ultra violet dalam waktu yang singkat, untuk mengganti tahap pemanasan (*baking*) yang membutuhkan waktu lama apabila digunakan nitroselulosa. Dikarenakan metoda yang baru ini lebih praktis, yaitu tidak membutuhkan kertas aktif baru, penggunaan kertas DBM ini telah menggantikan kertas yang lama.

C. Pemotongan dan penggabungan DNA

(1) Restriksi endonuklease

Enzim yang ditemukan hampir pada seluruh mikrobia ini memegang peranan penting di dalam berkembangnya teknik rekombinasi molekul DNA. Enzim ini mampu memotong DNA dan menghasilkan fragmen-fragmennya. Tahun 1960, Arber dan kawan-kawannya pada saat mempelajari efisiensi 'plating' bakteriofag lambda pada berbagai strain *E. coli* menemukan bahwa fag yang tumbuh pada strain bakteri tertentu mampu menginfeksi strain ini lebih efisien dibandingkan strain yang lainnya. Pengurangan efisiensi 'plating' pada strain bakteri yang berbeda ini ternyata disebabkan oleh adanya sistem restriksi/modifikasi. Sistem restriksi/modifikasi merupakan sistem proteksi untuk melindungi sel dari DNA asing.

Dari penelitian berikutnya diketahui gen-gen yang bertanggung jawab pada sistem restriksi/modifikasi pada *E. coli* yaitu : (1) Gen *hsdR*, gen yang memberi kode endonuklease; (2) Gen *hsdM*, memberi kode enzim yang bertanggung jawab pada proses metilasi DNA pada dasar (basal) tertentu (A dan C) untuk mencegah terjadinya serangan oleh endonuklease (yang dikode oleh *hsdR*); (3) Gen *hsdS* dibutuhkan oleh kedua enzim untuk menentukan lokasi (kedudukan) yang dikenal (*site recognition*).

Enzim endonuklease dapat digolongkan menjadi dua tipe : Endonuklease tipe I, enzim ini terlibat dengan sistem restriksi/modifikasi pada inang memiliki kemampuan memotong dan memodifikasi DNA serta membutuhkan ATP, Mg^{++} dan kofaktor S-adenosilmethionin (SAM).

Endonuklease tipe II, Enzim ini pertama kali diisolasi oleh Smith dan kawan-kawan pada tahun 1968 dari *Haemophilus influenzae* tipe d. Enzim yang membutuhkan Mg^{++} ini memiliki kemampuan untuk memotong DNA pada lokasi tertentu dan menghasilkan fragmen DNA dengan ujung kohesif (tidak tumpul).

Mengapa DNA bakteri ini tidak dirusak oleh enzim endonuklease yang dihasilkannya? Hal ini dikarenakan DNA bakteri berada dalam bentuk yang terproteksi. Masing-masing enzim restriksi berada secara bersama-sama dengan enzim modifikasi yang mampu memodifikasi tempat-tempat tertentu pada basal yang dikenali oleh enzim restriksi tersebut (melalui metilasi basal A dan C), akibatnya tempat-tempat ini tidak lagi menjadi sasaran enzim restriksi.

Tata cara pemberian nama enzim endonuklease. Dengan ditemukan sejumlah besar enzim restriksi, maka diperlukan tata cara pemberian nama mereka. Sistem pemberian nama yang didasarkan pada proposal yang disampaikan oleh Smith dan Nathans pada tahun 1973, adalah sebagai berikut :

(1) Enzim endonuklease diberi nama sesuai dengan nama genus dan spesies sel inang asal enzim ini diisolasi. Sebagai contoh *Hae* huruf pertama H yang ditulis dengan kapital adalah huruf pertama nama genus *Haemophilus* dan *ae* adalah dua huruf pertama dari nama spesies *aegypticus*. Contoh yang lain, *Eco* adalah nama enzim restriksi yang diisolasi dari *Escherichia coli*.

(2) Strain atau tipe identifikasi dituliskan sebagai *subscript* misalnya *Eco_K*. Apabila sistem restriksi dan modifikasi secara genetik dicirikan oleh virus atau plasmid singkatan nama inang diberikan dan elemen kromosomnya diidentifikasi sebagai *subscript* misalnya *Eco_{PI}*, *Eco_{RI}*.

(3) Pada saat strain inang memiliki sistem restriksi dan modifikasi berbeda mereka diidentifikasi dengan angka romawi contohnya sistem yang berasal dari *H. influenzae* strain Rd, dituliskan sebagai *Hin_d I*, *Hin_d II*, *Hin_d III* dan seterusnya. Perlu dicatat bahwa huruf roman ini tidak ada hubungannya dengan klasifikasi enzim restriksi tipe I atau tipe II.

Di dalam prakteknya, pemberian nama ini disederhanakan sebagai berikut : dikarenakan penulisan *subscript* kurang praktis seluruh singkatan ditulis dengan satu garis, sebagai contoh *Hind III*.

Letak target (*target site*). Restriksi endonuklease memotong DNA pada tempat-tempat yang dikenal (*recognition site*) yang terdiri dari pasangan empat, lima, enam, tujuh atau delapan basal.

Beberapa contoh enzim restriksi disajikan pada Tabel 1. Enzim ini juga memiliki model penyerangan yang berbeda. Pada umumnya terdapat tiga posisi potongan DNA di dalam sequen yang dikenali oleh enzim :

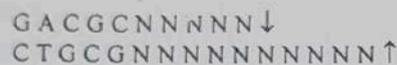
- (1) Pemotongan terjadi ditengah-tengah sehingga dihasilkan ujung yang tumpul (*blunt-end*) contoh *Hae III*



- (2) Pemotongan berlangsung kekiri maupun kekanan sehingga dihasilkan ujung kohesif (ujung yang tidak rata), contoh *Eco RI*.



- (3) Pemotongan berlangsung di luar daerah yang dikenal oleh enzim, pemotongan ini juga akan menghasilkan ujung kohesif contohnya *Hga I*.



Tabel 1. Lokasi target beberapa endonuklease restriksi

Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	G↓GATCC
Eschericia coli RY13	Eco RI	G↓AATTC
Haemophilus haemolyticus	Hha I	GCG↓C
Haemophilus influenzae Rd	Hind III	A↓AGCTT
Haemophilus parainfluenzae	Hpa I	GTT↓AAC
	Hpa II	C↓CGG
Klebsiella pneumoniae	Kpn II	GGTAC↓C
Moraxella bovis	Mbo I	↓GATC
Providencia stuartii	Pst I	CTGCA↓G
Serratia marcescens	Sma I	CCC↓GGG
Streptomyces stanford	Sst I	GAGCT↓C
Xanthomonas malvacearum	Xma I	C↓CCGGG

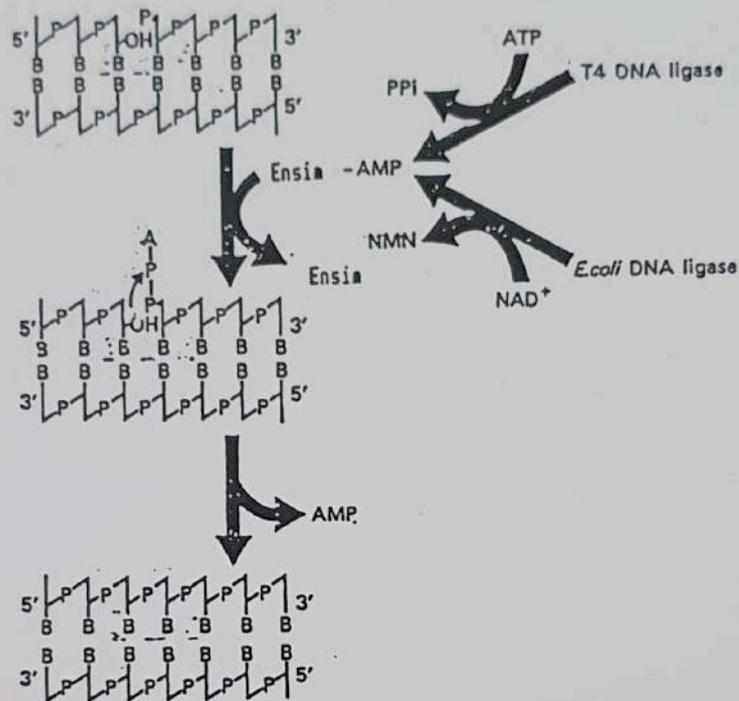
↓ Tempat pemotongan

(2) Ligase

Elemen-elemen genetik yang dapat digunakan sebagai kendaraan (vektor) harus mampu melakukan replikasi secara bebas. Vektor kloning ini secara umum didisain sedemikian rupa sehingga dimungkinkan terjadinya integrasi DNA asing pada lokasi restriksi (*restriction site*) yang memotong vektor pada satu arah dan yang tidak mempengaruhi proses replikasinya.

Penyambungan molekul DNA asing dengan vektor ini sangat tergantung dari aktivitas enzim polinukleotida (DNA) ligase yang mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara ujung 3' hidroksil dan 5' fosfat pada nukleotida yang berdekatan sehingga molekul DNA yang pada mulanya terpisah dapat disambung.

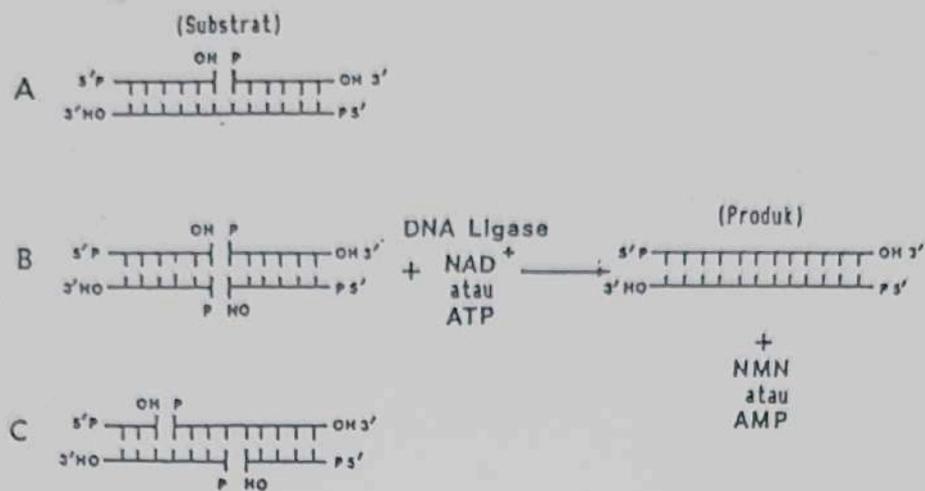
Escherichia coli dan fag T4 memberi kode enzim DNA ligase yang mampu menyambung benang tunggal yang putus (*nick*) diantara nukleotida yang berdekatan pada rantaian ganda DNA. Meskipun reaksi yang dikatalisis oleh enzim *E. coli* dan *E. coli* terinfeksi T4 sangat mirip mereka berbeda pada kebutuhan kofaktornya. Enzim T4 membutuhkan ATP, sedang enzim *E. coli* membutuhkan NAD^+ . Pada masing-masing kasus, kofaktor terpecah dan membentuk kompleks enzim-AMP. Kompleks terikat dengan *nick* yang gugus 5-fosfat dan 3-OH terbuka, dan membuat ikatan kovalen pada rantaian fosfodiester (Gambar 4).



Gambar 4. Aksi DNA ligase.

Kompleks enzim-AMP terikat pada *nick* yang memiliki gugus 3'-OH 5'-P. AMP bereaksi dengan gugus fosfat. Penyerangan pada gugus 3'-OH akan menghasilkan ikatan fosfodiester baru yang menyambung *nick*.

Proses penyambungan DNA dapat berlangsung baik di dalam sel maupun di luar sel. Aktivitas DNA ligase dapat berlangsung pada : (1) Benang ganda DNA yang satu ujungnya terputus (nick); (2) Benang-benang ganda DNA dengan ujung kohesif; (3) Benang-benang ganda dengan ujung tumpul (*blunt-end*), khusus untuk enzim ligase yang diisolasi dari fag T4 (Gambar 5).

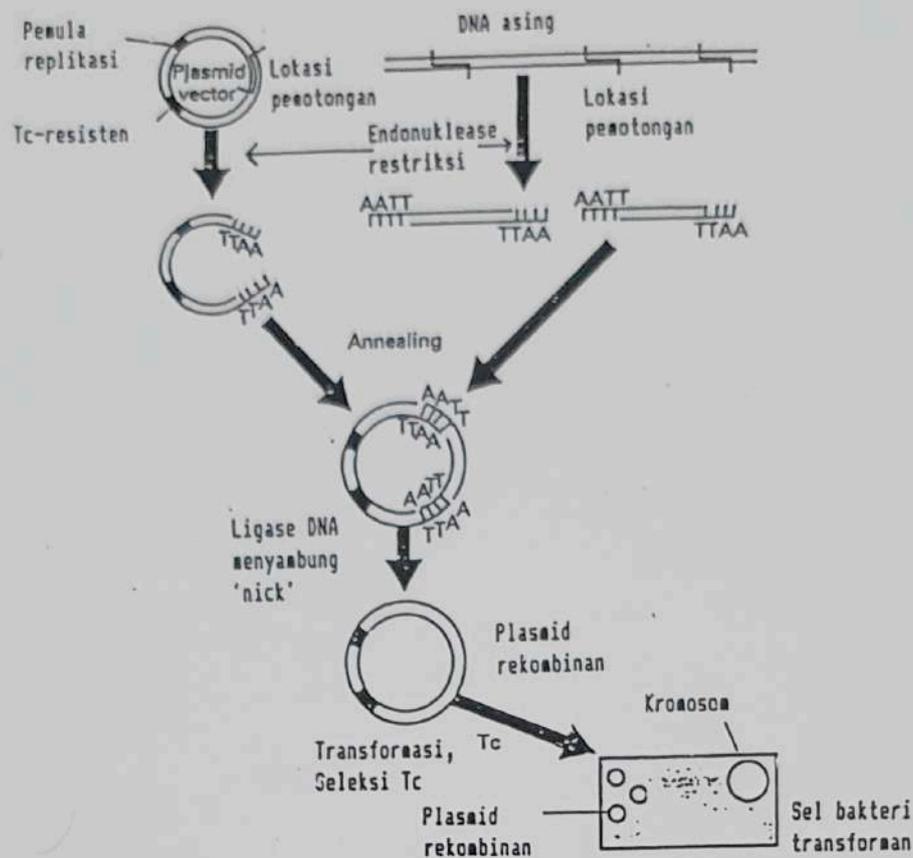


Gambar 5. Aksi DNA ligase pada (a) nick DNA; (b) DNA ujung-rata; (c) DNA ujung kohesif

Penyambungan DNA asing dengan vektor diawali secara nonkovalen dan kemudian dilanjutkan dengan pengikatan kovalen oleh enzim ligase DNA; dan penyambungan dengan cara menambahkan ekor homopolimer pada ujung 3' dengan menggunakan enzim transferase terminal. Enzim ini dapat mensintesis ekor homopolimer tanpa template.

Teknik penyambungan ini dapat diterapkan pula pada penyambungan antara fragmen DNA benang rangkap. Apabila sumber DNA dan vektor dipotong dengan enzim restriksi yang sama, penyambungan dapat dilakukan dengan *annealing* bagian-bagian benang tunggal yang memiliki ujung kohesif. Ujung tumpul yang dihasilkan oleh beberapa enzim restriksi dapat juga disambungkan menggunakan teknik-teknik khusus yaitu linker DNA atau adaptor, demikian halnya dengan ujung kohesif yang berbeda.

Reaksi ligasi ujung kohesif (Gambar 6). Beberapa endonuklease restriksi menghasilkan ujung kohesif, yang selanjutnya dapat disusun kembali menjadi dupleks yang sempurna. Reaksi yang dapat dilakukan di luar sel dengan DNA ligase yang murni ini merupakan dasar dari sejumlah prosedur manipulasi gen.

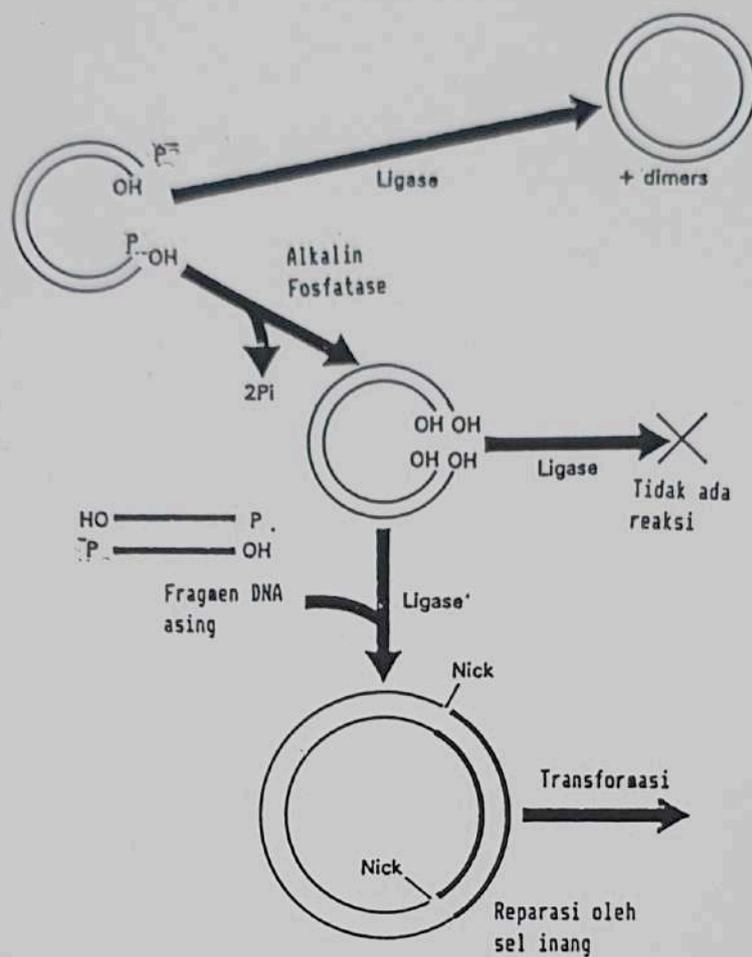


Gambar 6. Penggunaan DNA ligase untuk menyambung rekombinan DNA kovalen melalui ujung yang dihasilkan oleh Eco RI.

Temperatur optimum untuk reaksi ligase ini adalah 37 °C, namun demikian pada temperatur ini ikatan hidrogen yang terbentuk antara ujung yang kohesif tidak stabil (sebagai contoh empat basal AATT yang merupakan hasil pemotongan dengan Eco RI adalah tidak cukup resisten terhadap kerusakan karena suhu yang cukup tinggi ini. Temperatur optimum untuk reaksi ligasi ujung yang kohesif ini adalah kompromi antara kecepatan reaksi enzim dan asosiasi basal-basal ujung kohesif (4-15 °C).

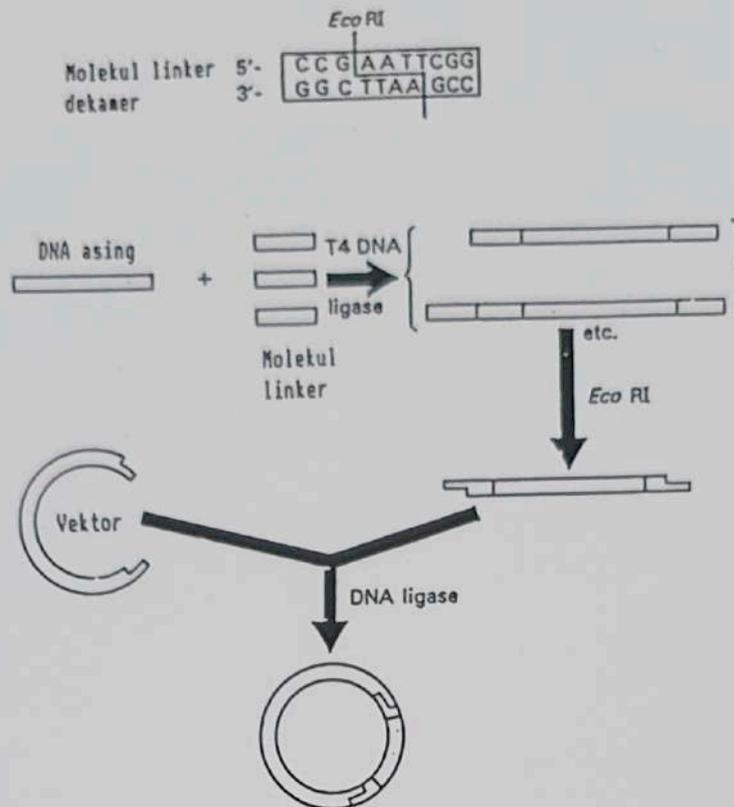
Perlakuan menggunakan alkalin fosfatase (Gambar 7). Reaksi ligase dapat digunakan untuk pembentukan molekul rekombinan dan peningkatan terbentuknya molekul rekombinan ini dapat dilakukan dengan : (a) Reaksi dilakukan pada konsentrasi DNA yang tinggi (pada larutan yang encer sirkularisasi fragmen linier lebih disukai karena berkurangnya frekuensi reaksi antar molekul); (b) plasmid DNA linier diperlakukan dengan alkalin fosfatase untuk menghilangkan ujung 5'-fosfat sehingga resirkularisas dapat dicegah.

Sirkularisasi vektor hanya dapat terjadi karena adanya insersi DNA asing yang tidak diperlakukan dengan fosfatase yang memiliki satu ujung 5'-fosfat pada masing-masing benang dengan ujung-ujung yang lain tetap tidak berhubungan. Ujung yang tidak berhubungan ini (nick) setelah transformasi pada bakteri inang akan dikembalikan ke bentuk sempurna dengan adanya mekanisme repair seluler.



Gambar 7. Perlakuan dengan fosfatase alkalin untuk mencegah re-sirkularisasi vektor plasmid yang tanpa membawa DNA asing

Ligase ujung tumpul (Gambar 8). Dikarenakan penggabungan fragmen yang memiliki ujung kohesif oleh DNA ligase merupakan proses yang relatif lebih efisien untuk menghasilkan rekombinan, oleh karena itu, untuk melakukan ligasi (penyambungan) DNA berujung tumpul dilakukan modifikasi prosedur yang telah ada. Prosedur modifikasi ini didasarkan pada kemampuan DNA ligase T4 untuk menyambung molekul DNA tumpul (ligase DNA *E. coli* tidak dapat mengkatalisis ligasi tumpul kecuali pada kondisi reaksi tertentu).

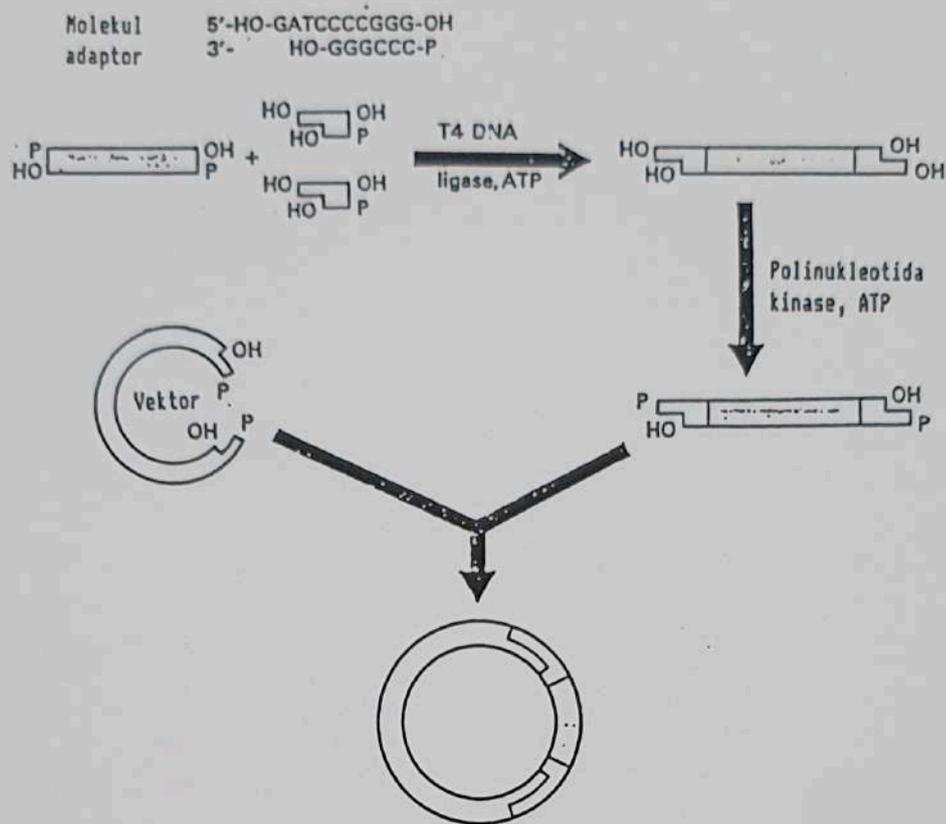


Gambar 8. Molekul linker dikamer berisi target Eco RI yang dengan ligase DNA T4 dihubungkan ke ujung-ujung DNA asing. Ujung kohesif DNA asing maupun vektor diperoleh dengan perlakuan menggunakan Eco RI selanjutnya dilakukan penyambungan menggunakan DNA ligase.

Penjelasan prosedur ini adalah sebagai berikut: (1) Fragmen DNA berujung tumpul dihubungkan dengan molekul linker/penyambung (sebagai contoh molekul linker dekamer dengan lokasi Eco RI); (2) Gabungan molekul DNA dan linker ini selanjutnya diperlakukan dengan ensim restriksi untuk menghasilkan fragmen dengan ujung kohesif; (3) Gabungan molekul DNA dan linker dengan ujung kohesif diligasi dengan vektor yang juga telah diperlakukan dengan ensim restriksi yang sama, sehingga diperoleh vektor yang telah membawa DNA yang dikehendaki.

Adaptor. Problem yang muncul pada ligasi menggunakan linker adalah apabila enzim restriksi yang digunakan untuk menghasilkan ujung kohesif pada linker juga akan memotong DNA asing yang dikehendaki, sehingga akan dihasilkan potongan-potongan DNA. Untuk mengatasi problem ini dilakukan beberapa cara : (1) Dipilih enzim restriksi yang lain; (2) Dilakukan metilasi pada lokasi restriksi di sebelah dalam dengan modifikasi metilase yang tepat ; (3) Digunakan adaptor berujung kohesif yang disintesis secara kimia (Gambar 9).

Dalam kaitannya dengan DNA asing yang berisi lokasi Bam HI (Gambar 9) yang akan di-klon dengan vektor yang juga dipotong dengan Bam HI. Molekul adaptor Bam memiliki ujung tumpul dengan gugus 5'-fosfat dan Bam ujung kohesif yang tidak terfosforilasi. Adaptor dapat disambung ke ujung DNA asing tanpa adanya resiko terjadi polimerisasi antar adaptor. DNA asing dengan adaptornya selanjutnya difosforilasi pada ujung 5' dan disambung dengan vektor yang memiliki lokasi Bam HI.



Gambar 9. Penggunaan molekul adaptor Bam HI yang dihubungkan dengan DNA asing. Adaptor yang digunakan berujung 5'OH untuk mencegah terjadinya polimerisasi sendiri. DNA asing dan adaptor difosforilasi pada ujung 5' dan disambungkan pada vektor yang sebelumnya telah dipotong dengan Bam HI.

D. Vektor

Apabila fragmen DNA asing dimasukkan ke dalam molekul DNA (vektor) yang mampu melakukan replikasi sendiri (misalnya plasmid) maka rekombinan plasmid yang terbentuk juga mampu mereplikasi di dalam sel inang (host). Disamping plasmid, bakteriofag (λ atau M13) dan kosmid juga dapat dipergunakan sebagai vektor.

Plasmid sebagai vektor kloning. Plasmid adalah ekstrakromosomal DNA yang merupakan benang sirkular dan mudah diisolasi, beberapa plasmid diketahui membawa gen yang dapat menyebabkan mikrobia resisten terhadap suatu antibiotik. Plasmid yang akan digunakan untuk tujuan kloning harus memiliki sifat-sifat berikut ini : (1) Berukuran kecil dan mampu melakukan replikasi pada sel inang (sel bakteri atau khamir) ; (2) Memiliki satu atau lebih marker untuk tujuan seleksi (satu atau lebih gen yang tahan dengan antibiotik) ; (3) Harus memiliki lokasi tunggal untuk berbagai endonuklease tunggal tempat DNA asing dapat disisipkan (contoh plasmid yang memenuhi syarat adalah pBR322).

Plasmid dengan ukuran yang kecil lebih disukai karena memiliki efisiensi transformasi yang lebih besar (kemampuan plasmid masuk ke dalam sel semakin sulit dengan meningkatnya berat molekul). Plasmid dengan berat molekul rendah juga lebih mudah dimurnikan, karena sebagai struktur sirkuler tertutup plasmid ini mudah dipisahkan dengan fragmen linier DNA kromosom. Plasmid dengan struktur sirkuler juga lebih stabil terhadap pengaruh kimia sewaktu dilakukan proses isolasi. Plasmid dengan berat molekul yang lebih besar lebih mudah terpotong-potong menjadi beberapa fragmen. Keuntungan lainnya bahwa plasmid dengan BM rendah kadang-kadang tumbuh menjadi jumlah yang banyak di dalam sel bakteri.

Plasmid yang memiliki marker (penanda) dapat digunakan untuk membedakan (seleksi), sel yang membawa plasmid ini maupun yang tidak. Keuntungan yang lain, introduksi DNA asing dapat dilakukan pada beberapa gen marker sehingga dapat menginaktifkannya. Dengan cara ini plasmid yang membawa DNA rekombinan dapat dibedakan dengan yang tidak membawa DNA ini. Disebutkan di atas bahwa plasmid harus memiliki lokasi tunggal untuk beberapa endonuklease restriksi. Alasan ini demikian, dengan adanya lebih dari satu lokasi untuk enzim tertentu (Eco RI) akan menyulitkan kloning karena akan terbentuk lebih dari satu fragmen yang dihasilkan vektor dengan enzim ini. Di lain pihak, plasmid yang memiliki sejumlah lokasi tunggal yang berbeda adalah lebih disukai karena menguntungkan para ahli rekayasa genetika untuk menempatkan fragmen dengan ujung-ujung kohesif yang berbeda dengan vektor secara mudah.

Beberapa keuntungan lain dari penggunaan plasmid sebagai vektor adalah : pemula-replikasinya bebas sehingga replikasi dalam sel berlangsung di luar pengendalian replikasi sel, jumlahnya di dalam sel lebih dari satu sehingga DNANYA dapat diperbanyak dan karenasering mempunyai gen-gen yang resisten terhadap beberapa antibiotik, deteksi dan seleksi klon yang dikandung di dalam plasmid mudah dilakukan.

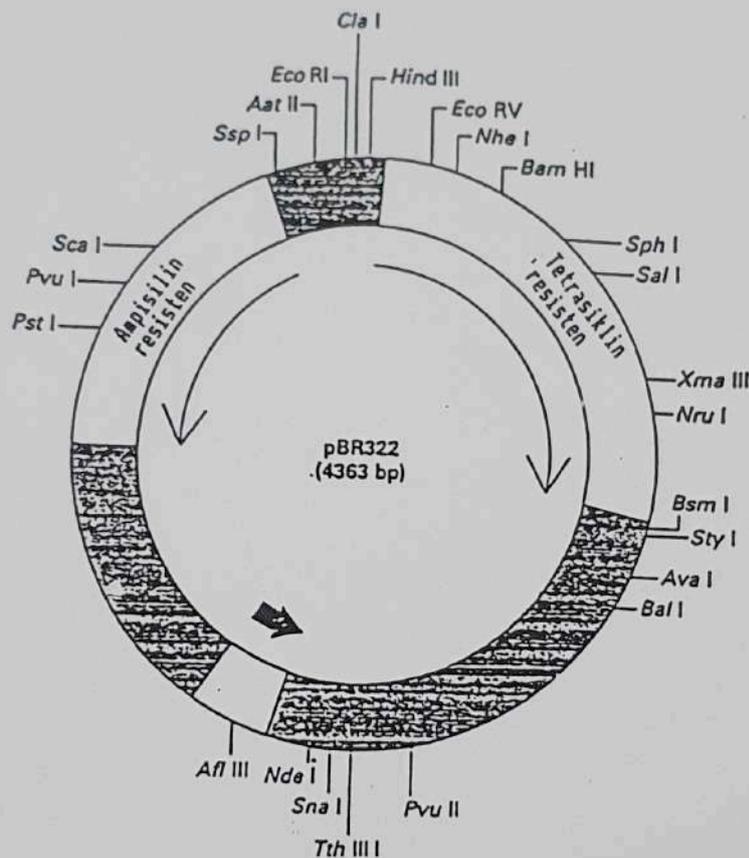
Sesudah fragmen DNA yang diinginkan (DNA manusia, hewan, tumbuhan jasad prokariotik ataupun eukariotik) disambungkan ke dalam plasmid, gabungan DNA ini selanjutnya dimasukkan bersama-sama sel-sel *Escherichia coli* ke dalam tabung; dengan cara transformasi sel *E. coli* akan mengambil fragmen DNA tersebut. Sel-sel terus tumbuh dan membelah sehingga terbentuk jutaan sel *E. coli*. Tahap lebih lanjut ialah menempatkan atau menyeleksi sel-sel bakteri yang mengandung gel-gel jasad yang diinginkan. Hasil transformasi secara *in vitro* sangat tergantung pada sistem vektor inang (host-plasmid system) karena mungkin sekali replikasi plasmid berlangsung di bawah pengendalian sel secara ketat. Dalam hal ini hanya sejumlah kecil kopi yang dapat dihasilkan sedangkan apabila pengendalian berjalan agak longgar jumlah kopi yang dihasilkan dapat lebih banyak. Perolehan sejumlah besar kopi ini merupakan faktor penting pada kloning gen dan dengan pemilihan sistem vektor inang yang tepat, pada manipulasi sintesis molekul sel, dapat diperoleh kopi plasmid yang lebih banyak per beberapa ribu sel.

Walaupun secara umum di lingkungan alam plasmid dipindahkan dengan kontak sel ke sel (konjugasi), vektor plasmid yang digunakan untuk kloning pada umumnya telah dilumpuhkan kemampuannya untuk berpindah secara alami ini, dengan alasan keamanan. Sedang pemindahan plasmid di laboratorium dapat dilangsungkan dengan prosedur transformasi. Perolehan sejumlah besar kopi merupakan hal yang sangat penting pada peristiwa kloning gen dengan pemilihan yang tepat antara plasmid-inang dan manipulasi tingkat sintesis makromolekul seluler, jumlah kopi plasmid dari beberapa ribu sel dapat dicapai.

Sebagai contoh suatu plasmid yang baik untuk melakukan kloning ialah pBR322 (Gambar 10), yang mampu melakukan replikasi di *E. coli*.

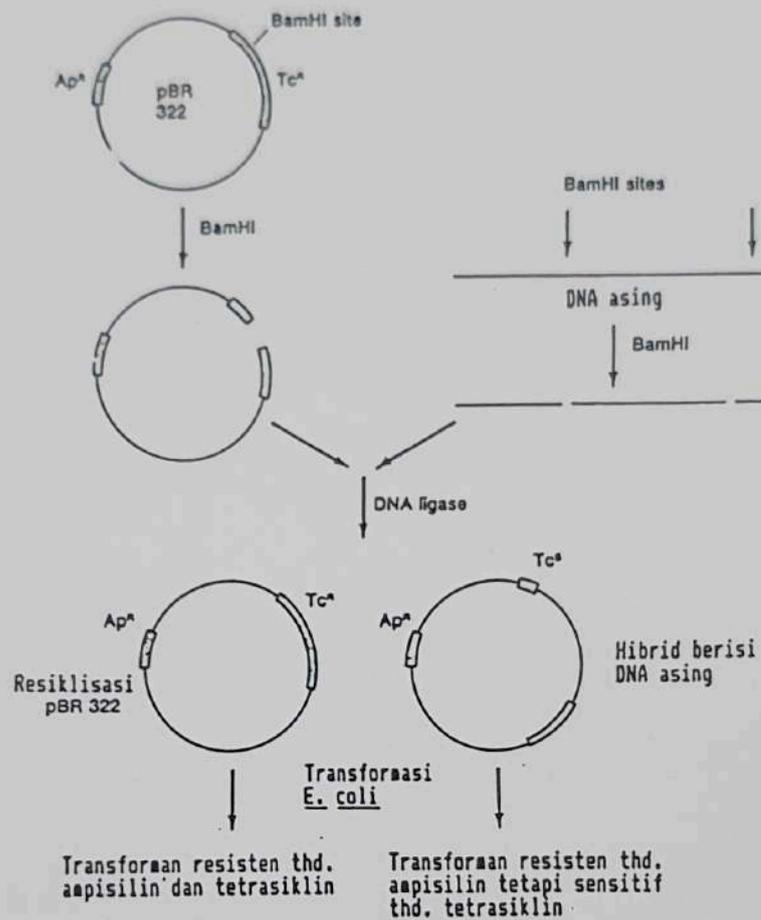
Beberapa sifat yang dimiliki plasmid ini antara lain :

1. Plasmid ini relatif kecil dengan berat molekul 2,6 juta.
2. Sangat stabil berada di dalam inang (*E. coli*) dengan jumlah kopi yang tinggi, 1-20 kopi/sel.
3. Dapat diamplifikasi sampai jumlah yang sangat banyak (1000-3000 kopi/sel, lebih kurang 40 % dari genome) dengan penambahan kloramfenikol untuk menghambat sintesis protein.
4. Mudah diisolasi dalam bentuk superkoil dengan mempergunakan gradien cesium klorida atau etidium bromida.
5. Sejumlah besar DNA asing dapat disisipkan sampai 10 kpb
6. Sequen keseluruhan basal (4362 pb) telah diketahui, sehingga lokasi penyerangan enzim-enzim restriksi dapat ditentukan dengan mudah.
7. Terdapat lokasi-lokasi potongan tunggal (*single cleavage sites*) oleh enzim-enzim restriksi PstI, Sall, EcoRI, HindIII dan BamHI. Tempat pemotongan oleh EcoRI adalah di luar gengen dari plasmid. Adalah hal yang penting bahwa tersedia satu lokasi tunggal, sedikitnya oleh satu enzim restriksi sehingga perlakuan dengan enzim ini hanya akan membuka plasmid tanpa memotongnya menjadi potongan-potongan yang lebih kecil.
8. Plasmid ini mempunyai 2 tempat penanda resistensi terhadap antibiotik, yaitu ampisilin dan tetrasiklin, yang mempermudah seleksi inang yang telah mengandung plasmid.
9. Plasmid ini dapat digunakan dengan mudah pada transformasi.



Gambar 10. Struktur plasmid pBR322 dan lokasi tempat yang dikenali (tempat penyerangan) enzim restriksi.

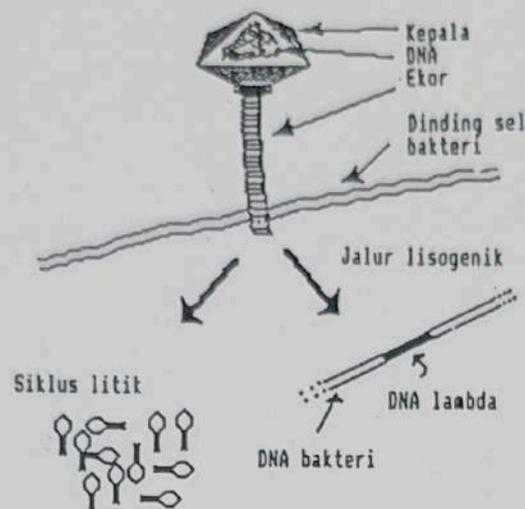
Penggunaan plasmid pBR322 dalam kloning gen, dapat dijelaskan sebagai berikut : Lokasi pemotongan oleh BamHI berada di dalam gen tetrasiklin resisten sedang lokasi (kedudukan) PstI ada di dalam gen ampisilin resisten. Apabila sepotong DNA asing disisipkan ke dalam salah satu tempat kedudukan ini gen antibiotik resisten yang berada pada tempat kedudukan ini hilang. Fenomena ini dikenal sebagai *insertional inactivation*. Fenomena ini dipakai untuk medeteksi adanya DNA asing yang berada di dalam plasmid. Sebagai contoh (Gambar 11) apabila pBR322 dipotong dengan BamHI dan digabungkan dengan DNA asing (yang telah dipotong dengan BamHI), selanjutnya dilakukan isolasi klon-klon bakteri hasil transformasi, klon-klon yang resisten terhadap kedua antibiotik ampisilin dan tetrasiklin adalah klon yang tidak memiliki DNA asing. Sedangkan sel-sel yang resisten terhadap ampisilin tetapi sensitif terhadap tetrasiklin adalah sel yang mengandung plasmid dengan DNA asing yang disisipkan. Karena gen ampisilin dan tetrasiklin-resisten dapat ditentukan secara terpisah pada cawan (plate) agar, isolasi bakteri-bakteri yang mengandung klon yang diinginkan dan seleksi sel-sel yang tidak mengandung plasmid dapat dilakuka dengan mudah.



Gambar 11. Penggunaan plasmid pBR322 sebagai vektor kloning; Masuknya DNA asing menyebabkan inaktivasi resistensi tetrasiklin, sehingga mempermudah isolasi transforman yang memiliki fragmen DNA asing.

Bakteriofag sebagai vektor kloning

Fag lambda (Gambar 12). Lambda adalah bakteriofag *temperate*. Disebut *temperate* karena virus ini memiliki dua kemampuan terpisah. Infeksi dengan lambda dapat menyebabkan produksi ratusan fag anakan dan lisis dinding sel (siklus litik). Atau, pada jalur lisogeni, lambda dapat melakukan integrasi ke dalam gen bakteri dan menetap di sana dan berfungsi seperti gen bakteri yang lain. Untuk tujuan eksperimen kloning pada umumnya jalur lisogeni ini dapat diabaikan.



Gambar 12. Lambda dengan dua kemampuan; (a) Siklus lisis dan (b) Jalur lisogeni

Struktur lambda bakteriofag. Lambda bakteriofag sangat penting sebagai vektor klonin karena genetika molekulernya telah banyak diketahui dan DNANYa dapat dikemas secara efisien di dalam partikel fag yang lebih lanjut dapat digunakan untuk menginfeksi sel-sel inang yang cocok. Molekul DNA nya tergolong besar dengan kira-kira 48.500 pb dan DNA ini mampu memberi kode paling sedikit 40 gen. Di dalam virus, lambda DNA merupakan molekul benang-ganda linier, dengan ujung benang tunggal pendek (12 nukleotida), 5' yang komplementer (kohesif). Dua ujung ini berasosiasi satu dengan yang lain setelah DNA virus diinjeksikan ke dalam bakteri, sehingga membentuk molekul sirkuler. Pada saat dua ujung melakukan hibridisasi satu dengan yang lain, mereka membentuk *cos site* (lokasi *cos*).

Lambda fag ini mempunyai suatu map genetik yang kompleks dan sejumlah fungsi-fungsi gen. Gen-gen yang terdapat pada lambda disajikan pada Gambar 13. Gen-gen yang terletak antara J dan N adalah gen yang tidak dibutuhkan untuk lisis sehingga DNA asing dapat ditempatkan untuk menggantikan gen-gen ini tanpa mempengaruhi siklus litik.

Kloning lambda. Fag lambda cocok digunakan sebagai kendaraan kloning karena beberapa alasan : (a) Bagian tengah DNA ini (antara gen J dan N) dapat dihilangkan dan diganti dengan DNA asing tanpa mengganggu kemampuan fag untuk tumbuh dan melakukan lisis; (b) Beberapa derivat lambda telah dikembangkan yaitu yang memiliki satu atau beberapa lokasi pasangan restriksi sehingga mempermudah penghilangan maupun insersi DNA.

Pengemasan lambda. Fag lambda DNA dapat dikemas secara *in vitro* dengan mencampur fag DNA dengan ekstrak fag tertentu dapat tersusun kembali partikel fag infeksius yang berisi DNA di dalam kepala fag. Pengemasan secara normal terjadi pada saat konkatamer panjang DNA fag terpotong menjadi monomer-monomer oleh protein fag yang memotong DNA pada lokasi *cos*. Perlu diperhatikan bahwa agar DNA dapat masuk pada kepala fag diperlukan ukuran potongan DNA yang tertentu. Yaitu, jarak antara lokasi *cos* yang berdekatan tidak lebih besar dari 52.500 pb dan tidak lebih kecil dari 38.000 pb (antara 78 % dan 105 % dari ukuran genome lambda tipe liar).

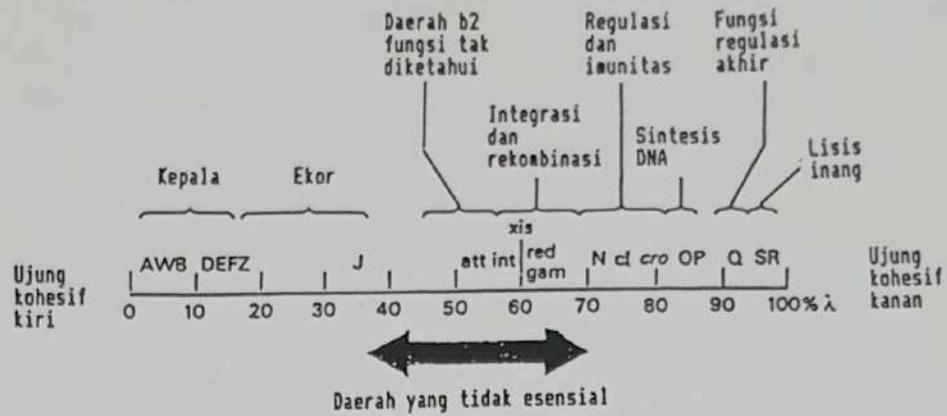
Lambda fag termodifikasi. Pada dasarnya tipe liar lambda fag tidak baik untuk dipakai sebagai vektor kloning karena terlalu banyak mempunyai tempat kedudukan enzim restriksi, sehingga mempersulit untuk mengintroduksi potongan-potongan gen tunggal yang spesifik. Untuk menghindari kesulitan ini, lambda fag yang dimodifikasi telah disusun sedemikian rupa sehingga dapat digunakan sebagai vektor kloning. Sebagai contoh, Charon fag (hasil modifikasi lambda fag) tempat kedudukan enzim restriksi yang tidak kita inginkan sudah dipindahkan dengan cara mutasi, mutasi titik, mutasi sejumlah basa hilang atau mutasi substitusi. Di dalam varian-varian yang hanya mempunyai satu kedudukan restriksi tunggal ini, fragmen DNA asing dapat disisipkan, sedangkan pada varian yang mempunyai dua tempat kedudukan, DNA asing dapat mengganti DNA lambda. Varian terakhir yang disebut vektor pengganti (*replacement vectors*) sangat berguna untuk mengklon fragmen-fragmen DNA besar.

Gen-gen asing yang disisipkan ke dalam beberapa lambda fag yang mengalami modifikasi ini, lebih mudah dilakukan deteksi klon-klon yang mengandung fag. Sebagai contoh Charon 10 dibandingkan dengan tipe liarnya lambda fag. Di dalam Charon fag ini gen beta-galaktosidase telah disisipkan ke dalam fag. Apabila Charon 10 melakukan replikasi pada strain *E. coli* yang tidak mampu menggunakan laktosa (*lactose-negative strain*), beta galaktosidase disintesis di gen fag dan adanya plag (*plaques*) laktosa positif dapat dideteksi dengan menggunakan indikator warna. Apabila suatu DNA asing disisipkan ke dalam gen beta-galaktosidase, sifat laktosa positif ini hilang. Plag laktosa-negatif dapat dengan mudah dideteksi sebagai plag yang tidak berwarna diantara suatu latar belakang plag yang berwarna.

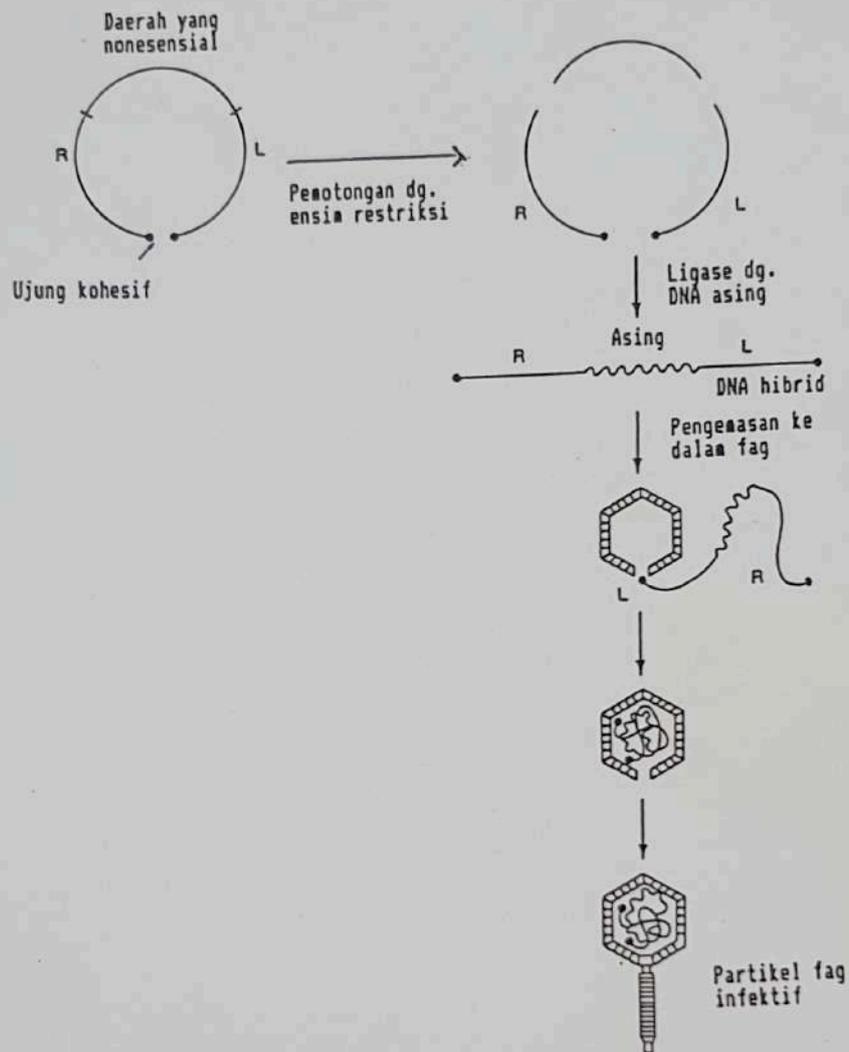
Tahap-tahap kloning dengan lambda (Gambar 14). Kloning dengan vektor pengganti lambda melibatkan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Isolasi vektor DNA dari partikel-partikel fag dan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi yang tepat.
2. Penyambungan dua fragmen lambda ke DNA asing menggunakan DNA ligase. Kondisi dipilih agar molekul-molekul yang dibentuk cukup panjang pada pengemasannya di dalam partikel fag.
3. Pengemasan DNA dengan menambahkan ekstrak sel yang mengandung *head* dan *tail protein* dan memberi peluang pembentukan partikel-partikel fag yang hidup.
4. Infeksi *E. coli* dan isolasi klon-klon fag dengan pengambilan plag pada suatu strain inang.
5. Pengecekan fag-fag rekombinan akan adanya untaian DNA asing yang diinginkan, dengan prosedur hibridisasi asam nukleat atau pengamatan sifat-sifat genetiknya.

Seleksi rekombinan dengan menggunakan lambda jauh lebih mudah dari pada dengan menggunakan plasmid karena : (1) efisiensi pemindahan DNA rekombinan ke dalam sel dengan menggunakan lambda adalah sangat tinggi; (2) fragmen lambda yang belum menerima DNA baru memiliki kemungkinan yang kecil untuk dimasukkan ke dalam partikel-partikel fag.



Gambar 13. Map kromosom Lambda



Gambar 14. Penggunaan Lambda bakteriofag sebagai kloning vektor

Walaupun lambda sangat berguna untuk vektor kloning namun ada juga pembatasannya yaitu seberapa besar DNA dapat disisipkan. Viabilitas partikel fag adalah sangat rendah apabila panjang DNA nya lebih dari 105 % dari pada panjangnya DNA lambda normal, sehingga fragmen yang cukup besar (lebih dari 20.000 basal) tidak dapat secara efisien diklonkan. Lambda juga memberikan ekspresi vektor yang sangat kecil, karena replikasinya untuk memperoleh kopi yang tinggi hanya pada saat siklus litiknya.

Vektor-vektor lain. Saat ini telah dikembangkan sejumlah vektor lain yang bermanfaat untuk bermacam-macam tujuan dalam teknologi DNA rekombinan. Hal ini dapat dimengerti, bahwa pada fase awal perkembangan DNA rekombinan, vektor-vektor yang digunakan adalah vektor yang telah digunakan secara luas dalam penelitian-penelitian. Walaupun demikian bukan berarti bahwa satu sistem genetik yang bermanfaat dalam penelitian dasar secara otomatis menyajikan sistem terbaik pada perkembangan suatu vektor kloning. Beberapa contoh vektor akan disajikan berikut ini :

Kosmid. Vektor plasmid dan lambda hanya dapat digunakan untuk kloning DNA fragmen yang kecil (5-10 kpb pada plasmid dan 15 kpb pada lambda). Dikarenakan beberapa gen dari eukariot yang tingkatnya lebih tinggi, panjangnya bisa mencapai 30 kpb, DNA ini tidak dapat disisipkan sekaligus menggunakan vektor jenis ini. Untuk mengatasi hal ini maka disusunlah kosmid di laboratorium dengan menggabungkan sifat-sifat plasmid (pBR 322 dengan fag lambda). Kosmid ini memiliki sequen ORI untuk melakukan replikasi di dalam *E. coli*, marker serta lokasi-lokasi ensim restriksi, yaitu tempat penyisipan dan kloning DNA asing, serta lokasi *cos* yang berasal dari fag lambda. Dan adanya lokasi *cos* pada kosmid ini memungkinkan pengemasan DNA ke dalam partikel fag lambda yang memberikan fasilitas untuk menyisipkan molekul DNA yang besar ke dalam sel bakteri. Dengan sifat-sifat yang dimiliki inilah kosmid merupakan vektor yang baik untuk kloning molekul DNA asing yang besar. Gambar 15 menunjukkan diagram proses ligasi DNA asing dengan kosmid linier yang menghasilkan bagian molekul dengan kosmid-kosmid yang menempel diujungnya. Seperti telah disebutkan di depan bahwa apabila jarak antara lokasi *cos* yang berdekatan berada dalam interval normal (38-58 kpb) maka DNA akan terbungkus ke dalam partikel fag infeksi. Sehingga apabila kita memiliki vektor kosmid sebesar 5 kpb, DNA asing yang dapat disisipkan sebesar 32-47 kpb, lebih besar daripada DNA yang dapat disisipkan pada vektor lambda maupun plasmid. Sehingga partikel ini dapat digunakan untuk memasukkan DNA ke dalam bakteri dengan efisiensi yang tinggi.

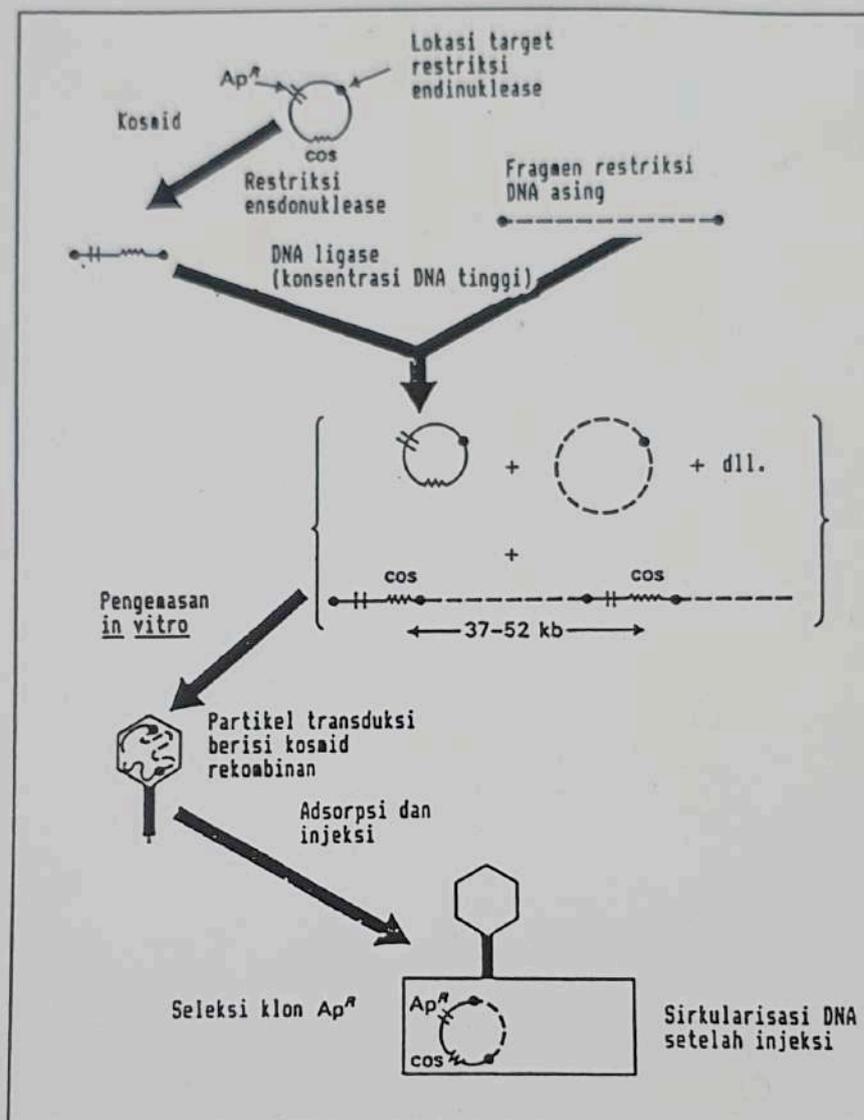
Bakteriofag M13. M13 merupakan fag berfilamen yang menghasilkan partikel infeksi berisi DNA benang tunggal sirkuler. Virus ini memiliki genom dengan ukuran 6.400 nukleotida dan berisi 10 gen. Pada saat terjadi infeksi, benang DNA tunggal ini akan berubah menjadi benang ganda dan selanjutnya memperbanyak diri sampai mencapai jumlah 50-200 molekul setiap sel (dalam keadaan *steady*). Sehingga M13 ini memiliki sifat seperti plasmid dan bentuk benang gandanya dapat dimurnikan dari sel dan dimanipulasi. M13 telah dikembangkan menjadi kloning sistem (M13mp1) oleh Messing dan kawan-kawannya. Mereka memasukkan fragmen DNA yang membawa bagian pertama dari gen beta-galaktosidase *E. coli* ke dalam daerah non-esensial kromosom fag. DNA ini akan menghasilkan peptida kecil yang dapat menyimpan aktivitas beta-galaktosidase ke dalam strain *E. coli* yang memiliki bagian yang hilang pada gen *lacZ* (gen struktural pada beta-galaktosidase. Restorasi aktivitas beta-galaktosidase ini disebut sebagai komplementasi alfa.

Pada saat bakteri memiliki M13mp1 ditumbuhkan pada medium yang berisi komponen tidak berwarna H-gal, beta-galaktosidase aktif dari bakteri ini akan menghidrolisis x-gal menjadi berwarna biru. Sehingga plaq yang berisi M13mp1 ini dapat diidentifikasi. Sehingga apabila DNA asing dimasukkan pada gen *LacZ* dari M13mp1, aktivitas beta-galaktosidasenya akan hilang. Dengan cara ini, plaq yang berisi rekombinan DNA dapat dibedakan dengan yang lainnya.

E. coli mengambil DNA dari bakteriofag lambda. Beberapa tahun kemudian, Cohen dan kawan-kawannya menunjukkan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CaCl_2 juga resipien efektif untuk plasmid DNA. Hampir setiap strain *E. coli* dapat ditransformasikan dengan plasmid DNA, dengan berbagai variasi efisiensi.

Telah disebutkan di depan bahwa berbagai bakteri memiliki sistem restriksi yang dapat berpengaruh pada efisiensi transformasi. Meskipun fungsi seluruh sistem ini tidak diketahui dengan pasti salah satu peranannya yang jelas adalah pengenalan dan degradasi DNA asing. Untuk alasan ini, adalah hal yang biasa untuk menggunakan strain *E. coli* yang defisien-restriksi sebagai inang transformabel.

Karena transformasi *E. coli* adalah tahap yang penting dalam eksperimen kloning sehingga dikehendaki tahap ini seefisien mungkin. Beberapa peneliti telah mengamati faktor-faktor yang berpengaruh pada efisiensi transformasi. Diperoleh bahwa, sel *E. coli* dan plasmid DNA melakukan interaksi secara produktif pada lingkungan ion kalsium pada suhu rendah ($0-5^\circ\text{C}$) dan diikuti dengan kejutan panas (*heat shock*) ($34-45^\circ\text{C}$) adalah hal yang penting walaupun tidak selalu dibutuhkan. Beberapa faktor yang lain, terutama penambahan ion metal selain kalsium menunjukkan adanya stimulasi proses.



Gambar 15. Skema kloning menggunakan vektor kosmid

Prosedur transformasi yang sangat sederhana, cukup efisien untuk digunakan dengan *E. coli* melibatkan resuspensi sel fase-log di dalam 50 ml kalsium klorida sebanyak 10^{10} dan menyimpannya pada es sekitar 30 menit. DNA plasmid selanjutnya ditambahkan ke aliquot ini (0,2 ml) yang disebut sebagai sel kompeten (yaitu kompeten untuk transformasi) dan inkubasi pada es dilanjutkan untuk 30 menit lagi diikuti dengan kejutan panas selama 2 menit pada suhu 42°C . Sel, selanjutnya dipindahkan ke medium nutrisi dan diinkubasikan (30 - 60 menit) untuk memberi kesempatan sifat-sifat fenotip yang ada pada plasmid diekspresikan, misalnya resistensi terhadap antibiotik yang biasanya digunakan sebagai marker yang dapat diseleksi untuk sel yang berisi plasmid. Pada akhirnya, sel di tumbuhkan pada medium selektif. Mengapa prosedur transformasi ini efektif, belum dimengerti secara sepenuhnya. Kalsium klorida mempengaruhi dinding sel dan juga bertanggung jawab pada pengikatan DNA ke permukaan sel. Yang jelas, pengambilan DNA distimulasi oleh kejutan panas yang singkat.

Hanahan pada tahun 1983 melakukan pengamatan ulang faktor-faktor yang berpengaruh pada efisiensi transformasi, dan menentukan satu set kondisi untuk efisiensi yang optimal (diekspresikan sebagai transforman setiap μg DNA plasmid) yang dapat diaplikasikan pada kebanyakan strain *E. coli* K12. Dengan cara ini biasanya akan diperoleh efisiensi 10^7 atau 10^8 transforman/ μg . Transformasi DNA yang besar ternyata kurang efisien, pada basis molar, dibandingkan dengan DNA yang kecil. Bahkan dengan prosedur transformasi yang telah diperbaiki, eksperimen kloning gen tertentu yang potensial yang membutuhkan sejumlah besar klon adalah tidak reliabel. Satu pendekatan yang dapat digunakan untuk mengatasi problem efisiensi transformasi yang rendah adalah dengan membungkus DNA rekombinan ke dalam partikel virus.

Telah kita ketahui bahwa apabila molekul DNA rekombinan yang terbentuk secara *in vitro* ini tidak dimasukkan ke dalam sel inang, maka molekul ini hanya merupakan obyek kimia dan segera akan mengalami degradasi, kecuali kalau dilakukan perlakuan tertentu. Oleh karena itu tanpa diikuti pengembangan metoda untuk memasukkan molekul pada mikrobia yang banyak digunakan di laboratorium (*E. coli* dan khamir) maka kemajuan di bidang rekombinasi DNA tidak akan menjadi kenyataan.

DNA rekombinasi dapat dimasukkan ke dalam mikrobia inang dengan transformasi DNA atau dengan infeksi fag partikel yang dilangsungkan secara *in vitro*.

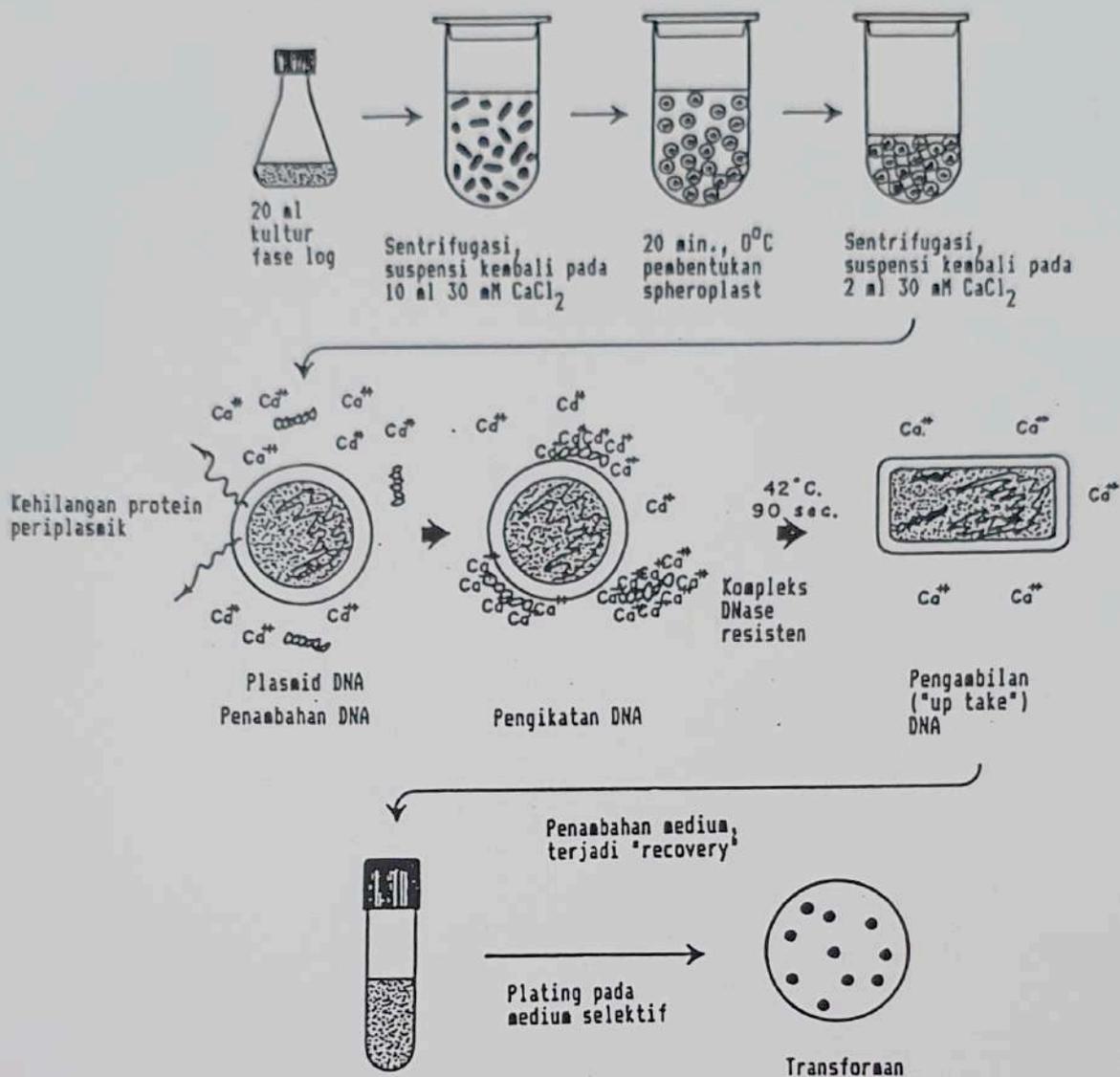
Transformasi didefinisikan sebagai perubahan sifat-sifat yang diwariskan pada strain bakteri karena DNA asing. Proses transformasi ini dapat berlangsung secara alamiah. Pelepasan fragmen DNA bersama-sama dengan kematian dan lisis sel merupakan sumber material genetik untuk rekombinasi selama pertumbuhan mikrobia pada lingkungan alami. Bakteri pada umumnya memasuki kondisi pertumbuhan yang disebut sebagai kompetens (*competence*). Pada kondisi ini bakteri memiliki kemampuan untuk mengambil DNA dari luar, namun demikian hanya strain tertentu saja yang memiliki kemampuan ini dan nampaknya kemampuan ini merupakan sifat diwariskan. Selama periode kompetens yang pendek ini permukaan sel mengalami perubahan sehingga dapat mengikat DNA asing dalam bentuk yang resisten terhadap serangan nuklease.

Setelah molekul DNA masuk ke dalam, sel akan mengalami periode yang disebut sebagai fase *eclipse*; DNA tetap resisten terhadap serangan nuklease dan informasi genetiknya tidak diekspresikan. Selama periode ini terjadi rekombinasi DNA asing dengan DNA kromosom bakteri, setelah satu benangnya mengalami degradasi.

Kompetens dapat diinduksi secara buatan dengan memasukkan sel DNA pada kalsium klorida suhu 0°C (Gamba16). Pertama kali sel akan mengalami pembengkakan (terbentuk spheroplast), sedang DNA yang dimasukkan akan membentuk kompleks yang tahan terhadap DNase dan menempel pada permukaan sel. Komplek ini dapat diambil oleh sel dengan memberikan kejutan panas pada suhu 42°C beberapa detik dan selanjutnya dipindahkan ke medium kaya untuk memberi kesempatan spheroplas menyempurnakan selnya (pembentukan dinding sel) dan gen yang ditransfer memberikan ekspresinya. Transforman dapat diisolasi dengan plating pada medium selektif.

Saat ini telah dikembangkan metoda baru, cepat dan sederhana yang digunakan untuk memasukkan DNA asing ke resipiens, yang disebut sebagai elektroporasi (*electroporation*). Teknik ini didasarkan pada penemuan Zimmerman dan kawan-kawannya pada tahun 1983 yang mendapatkan bahwa kejutan listrik dapat menginduksi membran plasma sel untuk melakukan fusi. Selanjutnya diperoleh bahwa apabila sel diberi kejutan listrik, dia akan mengambil DNA asing dari larutan disekitarnya, melalui lubang-lubang yang terdapat pada membran plasma.

Transformasi organisme yang lain. Meskipun *E. coli* kadang-kadang tetap merupakan organisme pilihan untuk eksperimen kloning, saat ini juga telah digunakan inang-inang yang lain, dan dengan inang-inang ini transformasi mungkin masih merupakan tahap yang kritis. Pada bakteri Gram positif, dua grup yang paling penting adalah *Bacillus* spp dan aktinomisetes. *Bacillus subtilis* sebagai kompeten alami untuk transformasi telah diketahui sejak lama, dan genetika organisme inipun juga telah dikembangkan. Untuk alasan ini, *B. subtilis* merupakan inang kloning prokariot alternatif yang menarik perhatian. Teknik yang sama juga digunakan untuk mentransform aktinomisetes, dan akhir-akhir ini menunjukkan bahwa frekuensi dapat ditingkatkan dengan pertama entrapping DNA pada liposom selanjutnya dilakukan fusi dengan membran sel inang.



Gambar 16. Prosedur transformasi *E. coli* dengan induksi CaCl_2

Pemilihan inang bagi vektor kloning. Sifat-sifat ideal suatu inang bagi gen-gen yang diklon antara lain : pertumbuhannya cepat, mampu tumbuh dalam medium kultur yang murah, tidak patogenik, dapat ditransformasi dengan DNA, dan stabil dalam kultur. Biasanya untuk memenuhi kepentingan ini dipilih mikrobia yang pertumbuhannya baik dan informasi genetiknya banyak tersedia, misalnya bakteri *E. coli* dan *Bacillus subtilis*, dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

Escherichia coli memberikan produk yang membahayakan pada pertumbuhan skala besar terutama sifat patogennya, disamping penghasil endotoksin yang dapat mengkontaminasi produk. Kesulitan lain, bahwa bakteri ini sering menempatkan enzim ekstraselulernya pada periplasmik sehingga mempersulit dalam ekstraksi dan purifikasinya.

Gram positif bakteri *B. subtilis* dapat dipakai sebagai inang karena tidak menghasilkan endotoksin, tidak bersifat patogenik dan tidak mengekskresikan protein di dalam medium. Namun pemakaiannya belum sebanyak *E. coli* dan beberapa plasmid sudah banyak dikonstruksi. Prosedur transformasi telah banyak ditetapkan dengan menggunakan *B. subtilis* sebagai inang dan bakteriofag dipakai sebagai vektor DNA-nya. Kesulitan yang sering muncul adalah stabilitas plasmid, serta sukar mempertahankan replikasinya setelah mengalami beberapa kali pemindahan kultur, dengan demikian sering DNA yang diklon pada jasad ini hilang dengan tidak diketahui penyebabnya. Disamping itu, sistem regulasi yang ada pada bakteri ini belum banyak diketahui sehingga menyulitkan pemakaiannya sebagai wahana untuk mengekspresikan vektor.

Kloning di dalam mikrobia eukariot mempunyai beberapa tujuan, khususnya untuk mengetahui sistem regulasi gen secara terinci pada jasad tersebut, misalnya khamir *S. cerevisiae*. Khamir ini telah diketahui sifat-sifat genetiknya dan telah banyak dipakai sebagai inang untuk melakukan kloning dan beberapa plasmid diketahui di dalam khamir serta transformasi menggunakan DNA yang direkayasa secara genetik dapat dilakukan. Karena ekspresi gen di dalam sel eukariot belum banyak diketahui sehingga mempersulit peningkatan hasilnya. Kemampuan untuk mengklon bahan-bahan genetik secara tepat pada khamir akan menyempurnakan pemahaman kita tentang pengertian sistem transkripsi dan translasi pada jasad eukariot dan akan menyajikan dasar yang lebih baik pada bidang penelitian dasar.

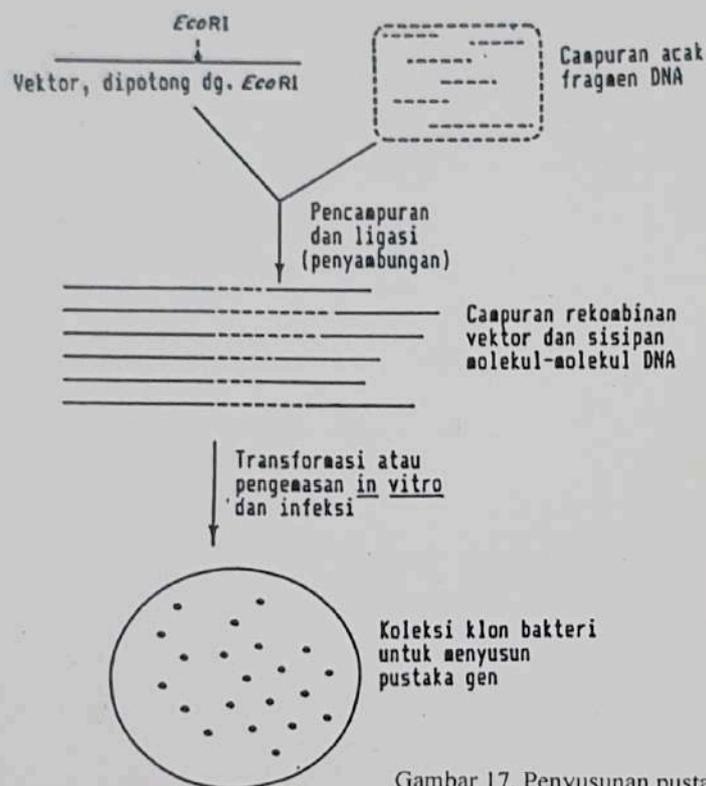
Deteksi dan pemurnian klon yang diinginkan. Dengan perkataan lain, istilah ini dapat disebut sebagai ekspresi gen asing DNA rekombinan. Tahap yang sangat menentukan pada teknologi rekombinan DNA adalah untuk mendapatkan klon yang tepat diantara campuran-campuran klon yang terbentuk. DNA asing yang digunakan di dalam prosedur kloning akan memiliki sejumlah gen-gen, yang pada umumnya hanya satu gen yang kita inginkan. Walaupun begitu, akan lebih mudah untuk melakukan seleksi terhadap koloni-koloni yang membawa vektor kloning (menggunakan penanda/marker yang tahan terhadap antibiotik), di lain pihak, adalah hal yang sangat sulit untuk menyeleksi klon yang mempunyai gen yang kita kehendaki.

Seperti telah diutarakan di atas bahwa inang yang banyak dipergunakan untuk transformasi dengan menggunakan plasmid sebagai vektor adalah *E. coli*, sebab dasar-dasar biologi molekular genetiknya telah banyak diketahui. Ekspresi gen dari produk fragmen DNA yang bukan polipeptida dapat diketahui dengan metoda hibridisasi dengan radioaktif, seandainya produk fragmen DNA-nya adalah polipeptida, metoda komplemen auksotrof selayaknya diterapkan. Reaksi pewarnaan juga dapat dipergunakan untuk mendeteksi ekspresi gen asing, misalnya gen selulase yang diekspresikan di dalam *E. coli* dapat dideteksi dengan timbulnya warna kekuning-kuningan dengan latar belakang merah di sekitar koloni setelah medium agar yang mengandung karboksimetil selulosa disiram dengan larutan cat Congo red enzim beta-galaktosidase (λ yang mengandung gen lac) dapat menghidrolisis Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-galactoside) dan membebaskan warna biru kehijau-hijauan dari senyawa 5-bromo-4-chloro-3-indole ; cara-cara imunologi-pun dapat diterapkan untuk mendeteksi ekspresi gen-gen yang diinginkan.

F. Pustaka gen

Langkah awal untuk kloning spesifik gen adalah konstruksi pustaka gen, yaitu koleksi klon-klon rekombinan yang masing-masing membawa potongan DNA yang berbeda dari organisme yang dikehendaki sehingga mereka dapat mencerminkan seluruh genom organisme tersebut. Sebagai contoh untuk menyusun pustaka gen manusia (atau lebih tepat pustaka genom, untuk membedakannya dengan pustaka cDNA), kita harus mengambil sampel DNA manusia dipotong menjadi fragmen-fragmen secara random (misalnya dengan pemotongan mekanis), dan menyambung campuran-campuran potongan tersebut dengan vektor DNA (Gambar 17). Hal ini akan menghasilkan sejumlah besar molekul rekombinan yang berbeda yang masing-masing membawa potongan DNA manusia yang berbeda (bersama-sama dengan molekul vektor yang tidak membawa potongan DNA manusia). Dalam percobaan ini tidak ada usaha yang dilakukan untuk memisahkan molekul-molekul ini; dan seluruh campuran digunakan untuk transformasi atau pembungkusan secara *in vitro* yang selanjutnya disisipkan ke dalam inang bakteri yang cocok (biasanya *E. coli*). Jika digunakan vektor plasmid atau kosmid, masing-masing sel yang membawa plasmid dapat tumbuh membentuk koloni, yang dapat diisolasi dan dimurnikan yang berisi klon. Untuk vektor fag, dilakukan pula prosedur serupa untuk memperoleh isolat murni, yang dikenal dengan purifikasi *plaque*. Istilah kloning gen muncul karena pada fase purifikasi satu isolat bakteri atau rekombinan fag fragmen DNA yang berbeda benar-benar dipisahkan.

Jumlah klon yang diperlukan untuk menyusun pustaka gen secara lengkap merupakan fungsi dari ukuran genom dan ukura rata-rata fragmen yang di-klon. Sebagai contoh, kita akan melakukan kloning kopi-tunggal gen dari genom manusia. DNA manusia ini seluruhnya kita potong-potong dengan enzim restriksi (misalnya EcoRI), fragmen disisipkan pada vektor fag lambda yang sesuai dan diusahakan untuk mengisolasi klon yang dikehendaki. Berapakah rekombinan yang perlu kita dapatkan untuk memperoleh satu isolat yang benar? Dimisalkan EcoRI rata-rata menghasilkan fragmen dengan panjang 4 kpb sedang besarnya genom manusia adalah $2,8 \times 10^6$ kpb, sehingga untuk memperoleh sequen yang dikehendaki lebih dari 7×10^5 rekombinan independen harus disiapkan dan diseleksi. Dengan kata lain, kita harus memperoleh sejumlah besar rekombinan, yang bersama-sama memiliki koleksi sempurna sequen DNA seluruh (hampir seluruh) genom manusia. Koleksi seperti ini, tempat kita dapat memperoleh klon yang kita kehendaki disebut sebagai pustaka gen atau bank gen.



Gambar 17. Penyusunan pustaka gen

Dengan pendekatan ini, terdapat dua problem. Pertama, gen mungkin terpotong di dalamnya satu kali atau lebih oleh EcoRI sehingga tidak diperoleh sebagai fragmen tunggal. Hal ini akan terjadi apabila gennya besar. Juga, mungkin diperlukan untuk mendapatkan region ekstensif yang mengapit gen atau seluruh kluster gen. Fragmen yang panjangnya berkisar antara 4 kpb nampak kurang sesuai. Alternatifnya, gen mungkin berisi fragmen EcoRI dengan ukuran lebih besar daripada yang dapat diterima oleh vektor. Pada kasus ini gen yang tepat sama sekali tidak akan diklon.

Problem ini dapat diatasi dengan kloning random fragmen DNA dengan ukuran besar (s/d 2 kpb). Dikarenakan DNA difragmentasi secara random tidak ada sequen yang tertinggal secara sistematis. Lebih lanjut, klon-klon akan overlap satu dengan yang lainnya, sehingga memberikan kesempatan untuk 'berjalan' dari satu klon ke klon didekatnya. Dikarenakan DNA masing-masing klon ukurannya lebih besar, klon yang diperlukan untuk pustaka sempurna atau hampir sempurna adalah lebih sedikit.

Berapakah klon yang diperlukan? Misalnya n adalah jumlah relatif genom yang akan diklon fragmen tunggal. Sehingga untuk genom manusia sebesar $2,8 \times 10^6$ dan ukuran fragmen yang di-klon 20 kpb, $n = 1,4 \times 10^5$. Jumlah rekombinan independen yang diperlukan di dalam pustaka harus lebih besar daripada n , sebab variasi sampling akan mengarah pada 'terlibatnya' beberapa sequen beberapa kali, dan 'hilangnya' sequen-sequen lain pada pustaka hanya dengan n rekombinan. Clarke dan Carbon, pada tahun 1976 membuat formula yang berkaitan dengan probabilitas (P) setiap sequen DNA pada pustaka random dari rekombinan independen N :

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln\left(1 - \frac{1}{n}\right)}$$

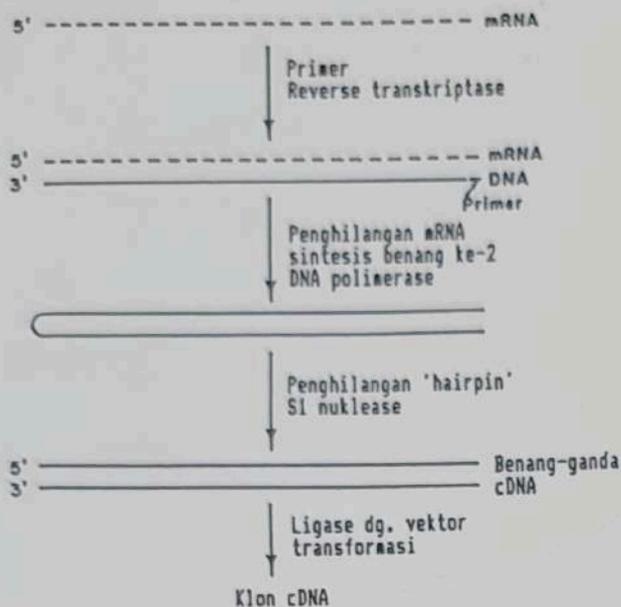
Sehingga untuk memperoleh setiap sequen istimewa (dari fragmen dengan ukuran 20 kbp) pada pustaka DNA genom manusia dengan probabilitas 95% ($P = 0,95$) adalah:

$$\begin{aligned} N &= \frac{\ln(1 - 0,95)}{\ln\left(1 - \frac{1}{1,4 \times 10^5}\right)} \\ &= 4,2 \times 10^5 \end{aligned}$$

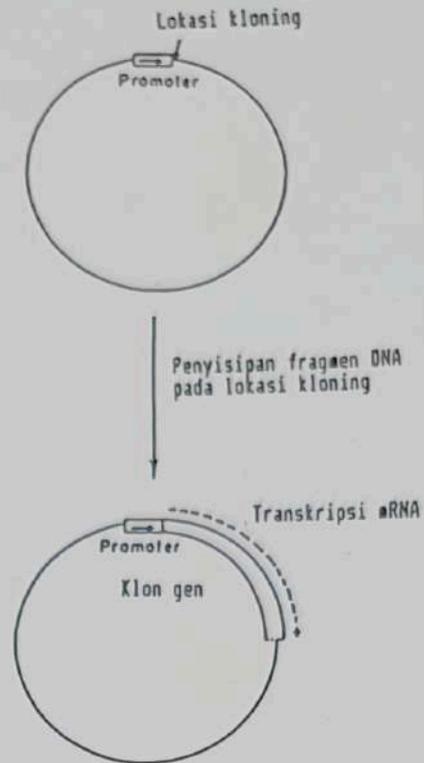
Terlihat bahwa, dibutuhkan jumlah rekombinan yang jauh lebih tinggi untuk mencapai probabilitas 99, dalam contoh ini $N = 6,5 \times 10^5$.

Jelas bahwa adalah hal yang tidak mungkin untuk mengambil satu juta koloni dan menguji satu persatu untuk melihat apakah koloni ini memiliki gen yang dikehendaki. Oleh karena itu, telah dikembangkan metoda skrining yang cepat yang digunakan untuk menguji sejumlah koloni bersama-sama. Caranya yaitu dengan mengkopi koloni-koloni (atau plaque fag) pada kertas filter nitroselulosa. Terdapatnya gen yang spesifik dapat dilacak dengan metoda koloni hibridisasi menggunakan DNA probe atau dengan ekspresi protein yang spesifik (menggunakan antibodi). Letak-letak koloni yang memberikan reaksi positif pada filter, selanjutnya dapat dilihat kembali pada cawan aslinya. Masing-masing koloni ini selanjutnya diambil, dimurnikan dan diuji lebih lanjut.

Alternatif lain untuk pustaka gen, terutama apabila berhubungan dengan organisme eukariot, dikenal dengan nama pustaka cDNA. Pada metoda ini, material awal yang digunakan bukan DNA sel tetapi mRNA. mRNA (campuran mRNA) digunakan sebagai template untuk sintesis DNA secara *in vitro* (Gambar 18) menggunakan enzim yang disebut reverse transkriptase. DNA ini dikenal sebagai DNA komplementer (*complementary*) atau cDNA, yang selanjutnya dapat disambungkan ke molekul vektor dan dimasukkan ke dalam sel bakteri, untuk menghasilkan pustaka cDNA. Dikarenakan cDNA mencerminkan mRNA yang terdapat pada material awal, maka molekul ini sangat spesifik-jaringan, yaitu pustaka cDNA ginjal akan berbeda dengan pustaka cDNA liver, hal ini tentu saja tidak sejalan dengan pustaka genom manusia yang paling tidak akan sama untuk setiap orang, artinya, tidak tergantung atas sel apa yang digunakan sebagai sumber DNA awal.



Gambar 18. Sintesis cDNA dari mRNA



Gambar 19. Struktur vektor ekspresi

Spesifitas pada cDNA ini memiliki keuntungan yang penting : jika suatu gen diekspresikan dengan level yang tinggi pada jaringan tertentu, akan terjadi frekuensi yang tinggi pada cDNA yang bersangkutan sehingga secara komparatif mudah untuk diisolasi. Keuntungan yang kedua, berkaitan dengan ekspresi gen. Eukariot kadang-kadang memiliki intron, artinya bahwa seluruh gen bisa jadi sangat besar dan sulit untuk diisolasi seutuhnya. Selanjutnya, *E. coli* mungkin tidak dapat melakukan prosesing mRNA, yaitu menghilangkan intron-intron untuk memperoleh produk fungsional gen. Namun demikian, apabila diawali dengan mRNA dari jaringan original, artinya bahwa intron ini sudah dihilangkan.

Dengan tujuan untuk mengekspresikan molekul cDNA di dalam *E. coli* maka perlu dilakukan penempelan sequen promotor padanya. Promoter adalah sisi tempat menempelnya RNA polimerase pada saat dia mengawali transkripsi. Karena tidak ditranskripsikan dirinya sendiri, promoter ini tidak terdapat pada mRNA dan tentu saja, juga tidak terdapat pada cDNA. Vektor tertentu yang disebut sebagai vektor ekspresi telah dikembangkan untuk tujuan ini (Gambar19).

G. Sintesis gen baru

Kloning gen tidak hanya terbatas pada sekuen DNA yang terjadi secara alami. Adalah dimungkinkan, untuk mensintesis DNA (oligonukleotida) dengan sekuen yang dikehendaki, dengan penambahan secara kimiawi nukleotida yang berurutan, menggunakan alat pensintesis DNA mikro-prosesor yang terkontrol (*microprocessor-controlled DNA synthesiser*).

Untuk masing-masing siklus mesin menseleksi residu berikutnya yang telah diprogram untuk ditambahkan; operator hanya menentukan sekuen yang dikehendaki dan mesinlah yang mengerjakannya. Dikarenakan hal ini merupakan proses yang esensial, ketepatan cenderung menurun dengan semakin panjangnya oligomer, tetapi sekuen dengan basal 50 - 100 dapat disusun dengan derajat ketepatan yang baik. Sekuen yang lebih panjang biasanya disusun dengan penyambungan secara enzimatis oligomer-oligomer yang pendek. Oleh karena itu, dimungkinkann untuk menyusun sekuen gen yang dikehendaki, yang selanjutnya di-klon dan diekspresikan, sehingga (setidaknya secara teori) mengarah pada produksi protein yang seluruhnya adalah novel struktur. Apabila kita mengetahui lebih banyak tentang determinan struktur protein dan mekanisme aksi enzim, dimungkinkan pula untuk merancang enzim dengan dasar aksi katalitik yang diperlukannya. Namun hal ini belum seluruhnya dapat diungkap.

Skenario yang lebih realistis adalah, pada saat terdapat enzim yang memiliki sifat-sifat dasar yang dibutuhkan, tetapi dengan sedikit modifikasi akan meningkatkan keberadaannya: sebagai contoh, enzim-enzim yang digunakan secara komersial yang memiliki aplikasi terbatas karena ketidak-stabilannya terhadap temperatur. Seandainya enzim dibuat lebih stabil, akan dimungkinkan untuk melakukan proses pada temperatur yang lebih tinggi, hal ini akan meningkatkan kecepatan reaksi dan seluruh efisiensi proses. Alternatifnya, sedikit perubahan pada sekuen asam amino disekitar letak pengikatan substrat (*substrate binding*) dapat mencapai efek spesifik secara alami pada substrat yang dikenali enzim. Perubahan semacam ini tidak selalu dapat dilakukan secara genetika konvensional. Namun demikian, teknik rekombinasi DNA, menjanjikan cara menetapkan perubahan yang diperlukan pada struktur gen.

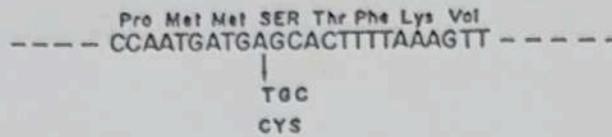
Untuk tujuan ini, tidaklah perlu untuk mensintesis seluruh gen yang baru. Karena mungkin hanya diperlukan perubahan satu asam amino, sekuen gen hanya perlu untuk diubah pada titik spesifik. Salah satu metoda untuk melakukan ini, dikenal dengan nama *site-directed mutagenesis*, yang metoda dasarnya disajikan pada Gambar 20. Oligonukleotida sintetik yang pendek disusun sehingga mencerminkan sekuen gen baru pada titik tersebut, dan gen ini dihibridisasikan dengan benang komplementer gen 'lama'. Meskipun sekuennya tidak identik, namun terdapat similaritas yang cukup untuk terjadinya pengikatan. Oligonukleotida sintetik (primer salah-pasangan) selanjutnya akan bertindak sebagai primer untuk sintesis benang DNA yang sempurna, yang sekarang berisi sekuen gen yang berubah. Setelah transformasi, beberapa sel akan berisi gen yang baru dan beberapa sel berisi gen yang lama; hal ini dapat dibedakan menggunakan primer salah pasangan sebagai prob. Pada kondisi stringensi yang tinggi (ketika, hanya sekuen identik yang melakukan hibridisasi), oligonukleotida hanya akan mendeteksi gen yang mengalami mutasi, sedang gen yang original, tidak terdeteksi. Contohnya, Gambar 20, menggambarkan bagian sisi aktif beta-laktamase, dimana residu serin memegang peranan penting di dalam proses katalitik hidrolisis ikatan beta-laktam penisilin. Perubahan residu sistein akan menghasilkan novel enzim dengan level aktivitas rendah dan sejumlah sifat-sifat yang lain (*unusual*).

Teknik ini dan sejumlah perkembangannya, menjadi dasar area riset yang maju dengan pesat, yang dikenal dengan nama rekayasa protein (*protein engineering*). Perlu disebutkan bahwa, penggantian meskipun hanya satu asam amino pada rantai protein dapat menghasilkan efek-efek yang tidak dikehendaki pada struktur protein. Rekayasa protein tidak hanya membutuhkan pengetahuan yang mendetail tentang struktur kristal protein (yang telah ada untuk sejumlah enzim), tetapi juga pengetahuan tentang apakah yang menentukan konformasi, dan hubungan antara struktur dan fungsi enzim.

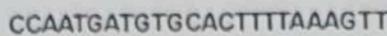
Produk-produk dari rekombinan *E. coli*. Salah satu kloning gen yang sukses adalah yang berkaitan dengan hormon pertumbuhan manusia (*human growth hormone / HGH* atau somatotropin). Polipeptida hormon ini (191 asam amino) digunakan untuk penyembuhan suatu kondisi yang disebut sebagai kekerdilan (*pituitary dwarfism*). Pertama kali, dilakukan kloning gen satu-satunya sumber material ini yaitu, kelenjar *pituitary* yang diambil dengan autopsi. Terbatasnya suplai maupun resiko transmisi infeksi virus yang berbahaya, merupakan stimulan yang kuat di dalam usaha-usaha pengembangan suplai alternatif. Dikarenakan, hormon ini secara alami merupakan produk yang disekresikan, cDNA mengkode molekul prekursor dengan signal sekuen ujung N-terminal. Dengan tujuan untuk memperoleh ekspresi langsung HGH *mature* pada *E. coli*, telah diisolasi fragmen yang mengkode asam amino 24-191, dan oligonukleotida sintetik yang bertanggung jawab pada asam amino 1-24 HGH *mature*, dan kodon inisiasi ATG disambungkan pada ujung 5'. Seluruh sekuen disisipkan pada plasmid di bawah kontrol *lac* promoter,

sehingga ekspresi dapat diatur melalui penambahan induser. Hasil yang diperoleh, strain ini memproduksi 2 mg HGH setiap liter kultur.

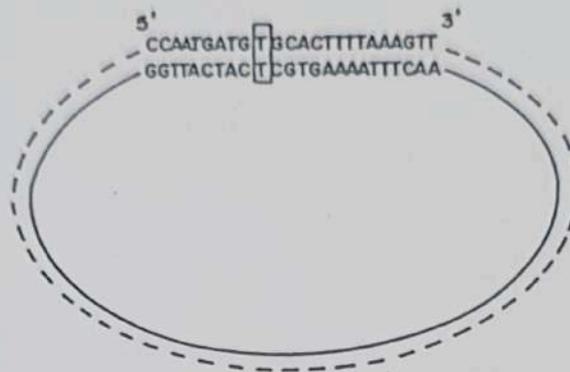
Dibutuhkan mutasi perubahan serin ke sistein



Dibuat oligonukleotida sintetik berisi basa yang berubah

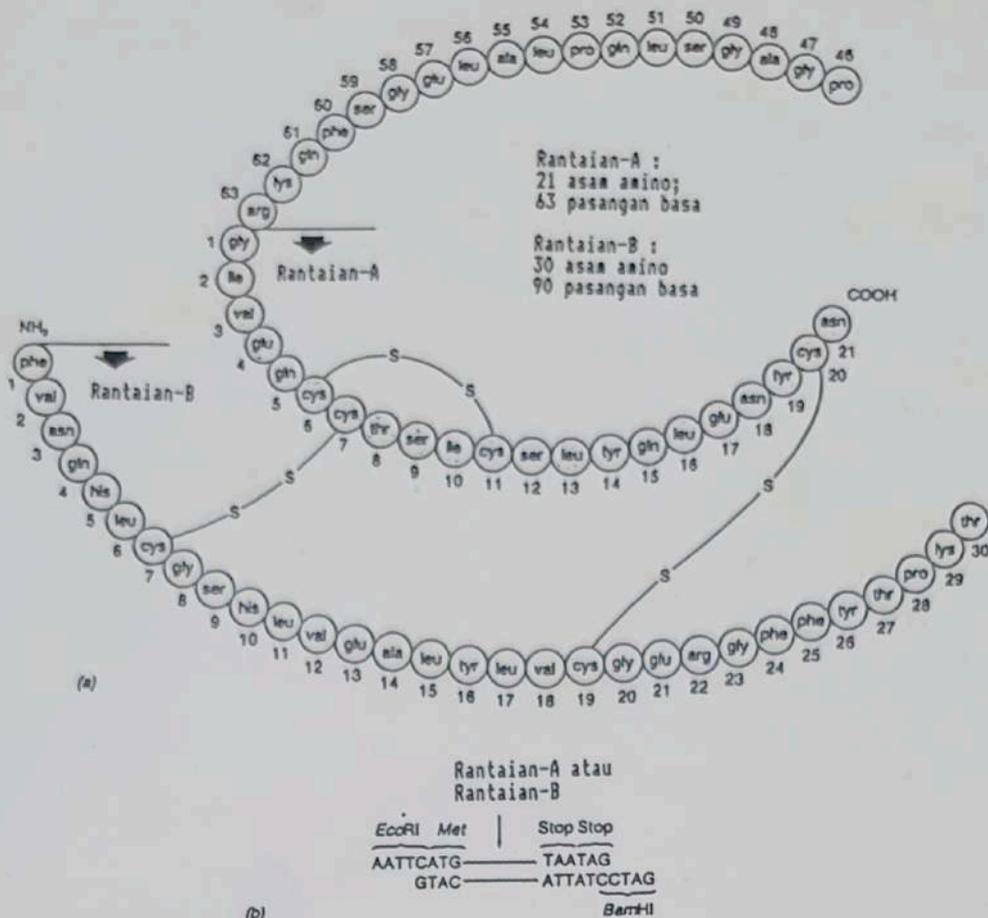


Hibridisasi oligonukleotida menjadi benang tunggal DNA sirkuler (sequen komplementer); bertindak sebagai primer untuk sintesis benang DNA baru berisi gen termutasi



Gambar 20. Mutagenesis site-directed

Produk kedua dari rekombinan *E. coli* adalah hormon manusia yang lain, insulin, yang digunakan untuk para penderita diabetes (Gambar 21). Produk awal translasi mRNA insulin adalah prekursor polipeptida- preproinsulin yang berisi signal sequen asam amino pada ujung amino. Pada situasi alami, signal ini dihilangkan selama sekresi dari prekursor perantara, proinsulin; selanjutnya, terlipat dan sequen peptida (peptida C) dihilangkan dari daerah tengah untuk menghasilkan insulin *mature*. Pada akhirnya, seperti halnya hormon yang terbentuk secara alami, yang terdiri dari rangkaian dua peptida (rantai A dan B), dihubungkan satu dengan yang lain melalui jembatan disulfida. Oleh karena itu, ekspresi fungsional *E. coli* tidak seluruhnya secara langsung, dikarenakan modifikasi paska-translasi kemungkinan berlangsung secara tidak tepat. Problem ini diatasi dengan kloning DNA sintetik yang bertanggung jawab pada rangkaian A dan B, secara terpisah. Masing-masing molekul ini disisipkan pada plasmid *E. coli* yang memiliki *lac* promotor maupun gen *beta-galaktosidase*. Sehingga satu rekombinan strain yang menghasilkan protein fusi berisi beta-galaktosidase ditambah rangkaian insulin A, sedang strain yang kedua menghasilkan fusi protein beta galaktosidase-rangkaian insulin B. Pada percobaan ini, telah diperoleh ekspresi yang sangat tinggi dengan protein fusi yang terdiri dari 20 % sel protein total pada masing-masing kasus. Rangkaian insulin dapat dipotong dari beta galaktosidase dengan bromida sianogen, dan disusun kembali untuk membentuk insulin manusia yang sempurna.



Gambar 21. Rekayasa genetika produksi insulin manusia oleh bakteri. (a) Struktur proinsulin manusia. (b) Sintesis kimia gen insulin dan linker yang cocok, sehingga dapat diklon dan diekspresikan. Fragmen hasil sintesis disambung pada lokasi restriksi Eco RI dan Bam HI ke plasmid pBR322. Sequen koding metionin disisipkan untuk pemotongan secara kimia rantai A dan B dari fusi protein yang dibuat oleh bakteri, karena reagen sianogen bromida secara spesifik memotong residu metionin dan insulin tidak memiliki metionin. Dua signal stop digabungkan pada ujung *down stream* (karboksil) sequen koding.

Sistem inang-vektor yang lain. Meskipun *E. coli* tetap merupakan inang yang sangat berguna untuk berbagai tujuan kloning gen dikarenakan tersedianya berbagai sistem, namun demikian, jasad inipun memiliki keterbatasan, sebagai contoh kesulitan memperoleh produk yang terbentuk dengan sekresi. Protein yang disekresikan akan mengutungkan produksi secara komersial, karena hal ini akan mempermudah purifikasi produk, dilain pihak kalau protein tidak disekresikan ke luar, produk ini harus dipisahkan dengan protein intraseluler. Sebagai tambahan, ekspresi protein pada level yang sangat tinggi di dalam sel akan menyebabkan kelarutan yang mencapai batas maksimum, sehingga protein yang diekspresikan akan membentuk agregat yang tidak larut dalam sel. Kondisi seperti ini dapat merusak sel, dan juga sulit untuk melarutkan kembali. Dikarenakan volume ekstra seluler kultur lebih besar, problem ini mungkin tidak muncul akibat dari protein yang disekresikan.

Pustaka :

Brown, T.A. 1995. Gene cloning : An introduction. Chapman & Hall. London.

Old, R.W. and Primrose, S.B. 1989. Principles of gene manipulation : An introduction to genetic engineering. Blacwell Scientific Publication. London.

Drlica, K. 1984. Understanding DNA and gene cloning : A guide for the curious. John Wiley & Sons. New York.