

Pustaka Gen

Donna Mesina R. Pasaribu*

*Bagian Mikrobiologi FK UKRIDA

Alamat Korespondensi : Jl Terusan Arjuna No. 6 Jakarta Barat

Abstrak

Untuk mengisolasi suatu gen atau segmen DNA dari organisme tunggal, dapat dilakukan dengan teknik DNA rekombinan, dimana akan didapatkan koleksi hibrid plasmid-DNA bakteri dengan ukuran yang sesuai. Proses DNA genom menjadi elemen yang dapat diklon dan menginsersi mereka ke sel hospes dinamakan membuat pustaka gen, bank klon atau bank gen. Pustaka sel hospes lengkap menurut definisinya mengandung semua DNA genom organisme sumber.

Target DNA didigesti menggunakan campuran dari dua enzim restriksi, enzim dapat membaca empat nukleotida sehingga akan memotong secara berulang pada target DNA. Hasil potongan tersebut difragmentasikan dengan menggunakan sukrosa gradien atau elektroforesis gel agarose, sehingga akan diperoleh fragmen yang dikehendaki. Setelah pustaka dihasilkan, klon-klon dengan sekuen target harus diidentifikasi dengan metode hibridisasi DNA dengan probe DNA yang dilabel, deteksi dengan imunologi untuk produk protein, dan deteksi untuk aktivitas protein.

Kata Kunci : pustaka gen, klon vektor, plasmid, DNA rekombinan

Abstract

To isolate a gen or DNA segment from single organism, can be done with DNA recombinant technique, which obtaine collection of DNA plasmid hybrid bacterium with appropriate size. DNA genome process become element which is able to be cloned and insert to host cell is called gen dictionary creation, clone bank or gen bank. Complete host cell dictionary according to its definition contain all DNA genome original organism.

DNA target is digested by using blended of two restriction enzyme, enzim can read four nucleotide with the result that will cut repeatly on DNA target. Cut result is fragmented using gradient sucrose or agarose gel electrophoresis, so that will obtaine desired fragments. Since dictionary is produced, clone with sequence target must be identified by DNA hybridization method with DNA probe labeled, is detected with immunology for protein products, and is detected for protein activity.

Key Words : *gen library*, clon vector, plasmid, DNA recombinan,

Pendahuluan

Semua informasi biologik setiap makhluk hidup diatur dan dikendalikan oleh DNA. Informasi dalam DNA didistribusi dan ditransmisikan untuk diubah menjadi informasi genetik di dalam sel, melalui translasi dan transkripsi sehingga dihasilkan suatu ekspresi gen. Ekspresi gen pada umumnya bersifat umum dan lestari (*conserve*). Dalam perkembangan bioteknologi saat ini dimungkinkan merekayasa ekspresi gen, sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Salah satu rekayasa gen dimanfaatkan untuk memperbanyak gen dengan menggunakan bakteri, yeast sebagai vector, sehingga dihasilkan pustaka gen (*gen library*) secara *in vitro* yang akan dimanfaatkan untuk bermacam-macam keperluan seperti terapi gen, produk transgenik dan vaksin rekombinan.

Pada prinsipnya untuk mengisolasi suatu gen atau segmen DNA dari organisme tunggal, dapat dilakukan dengan teknik DNA rekombinan, dimana akan didapatkan koleksi hibrid plasmid-DNA bakteri dengan ukuran yang sesuai. Proses DNA genom menjadi elemen yang dapat diklon dan menginsersi mereka ke sel hospes dinamakan membuat pustaka gen, bank klon atau bank gen.¹ Pustaka sel hospes lengkap menurut definisinya mengandung semua DNA genom organisme sumber.

Dalam tulisan ini akan dikemukakan bagaimana *gen library* tersebut dikembangkan untuk mendapatkan sekuen yang dikehendaki. Sebagai contohnya apabila diinginkan untuk melakukan kloning *gen single copy* dari genom manusia, maka pertama kali yang perlu dilakukan adalah digesti total DNA dengan enzim restriksi endonuklease misalnya *EcoRI*. Selanjutnya fragmen tersebut disisipkan ke dalam vektor lamda phaga yang sesuai dan kemudian dilakukan isolasi klon yang diharapkan. Sedangkan untuk mengetahui berapa rekombinan yang akan diseleksi untuk mendapatkan satu klon yang diharapkan pada prinsipnya dapat diperhitungkan dari perbandingan besar genom dan rata-rata panjang fragmen yang akan diklon.

Pemotongan Fragmen DNA

Pemotongan DNA kromosom dengan *EcoRI* menghasilkan fragmen dengan panjang sekitar 4 kb, sedangkan haploid genom manusia mempunyai panjang 2.8×10^6 kb. Dari data

tersebut dapat diketahui bahwa untuk memperoleh sekuen yang dikehendaki diperlukan lebih kurang 6×10^5 rekombinan klon.² Dalam melakukan pendekatan seperti di atas, ada dua masalah yang perlu diperhatikan, yakni:^{2,3}

- a. Kemungkinan dari gen tersebut akan terpotong oleh *EcoRI* pada bagian tengahnya sehingga nantinya tidak kita dapatkan satu fragmen yang utuh. Kemungkinan ini pada umumnya terjadi pada gen dengan ukuran besar.
- b. Kemungkinan tidak didapatkannya daerah ekstensif yang mengapit gen tersebut atau mendapatkan seluruh kluster gen yang kadang-kadang diperlukan. Untuk keperluan tersebut, fragmen 4 kb sangat terlalu kecil sehingga pemilihan vektor harus diperhatikan.

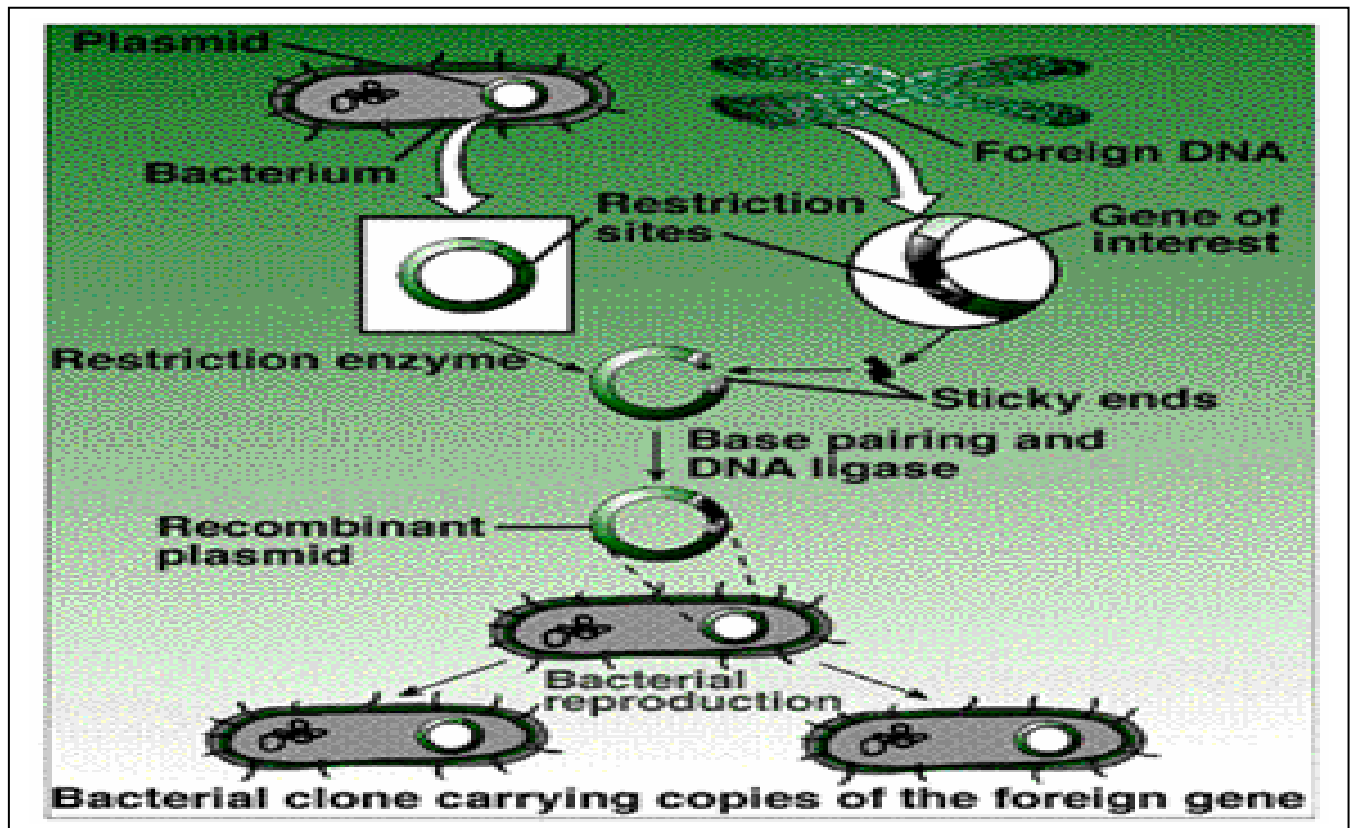
Untuk mengatasi masalah tersebut dapat diatasi dengan melakukan kloning DNA secara acak, dengan fragmen sebesar lebih kurang 20 kb, karena DNA genom tersebut difraksinasi secara acak maka tidak ada pengecualian secara sistematis untuk setiap sekuen, dimana klon tersusun tumpang tindih satu sama lain sehingga memberikan peluang mengamati satu klon ke klon yang lain. Makin panjang DNA yang diklon makin banyak klon yang diperlukan untuk suatu *library* yang komplis atau hampir komplis.

Ada beberapa cara untuk mendapatkan fragmen secara acak dengan ukuran tertentu, diantaranya adalah dilakukan secara mekanikal, tetapi yang umum dilakukan adalah pemotongan dengan enzim restriksi seperti terlihat pada gambar 1.

Target DNA didigesti menggunakan campuran dari dua enzim restriksi. Enzim tersebut dapat membaca empat nukleotida sehingga akan memotong secara berulang pada target DNA. Apabila DNA tersebut didigesti secara total maka akan menghasilkan fragmen dengan panjang rata-rata 1kb. Akan tetapi untuk kepentingan kloning, reaksi restriksinya dilakukan secara partial, sehingga akan dihasilkan suatu fragmen yang relatif panjang, antara 10 – 30 kb.^{2,4} Hasil potongan tersebut dapat difragmentasikan dengan menggunakan sukrosa gradien atau elektroforesis gel agarosa secara preparative, sehingga akan diperoleh fragmen yang dikehendaki. *Packing* secara *in vitro* dapat menjamin diperolehnya sejumlah

besar rekombinan secara independen yang akan

memberikan hasil yang hampir sempurna.^{2,3}



Gambar 1. Strategi untuk mendapatkan suatu pustaka gen¹.

Untuk memperoleh fragmentasi yang hampir acak dapat dilakukan secara *double* digesti menggunakan AluI dan HaeIII. Kedua enzim tersebut akan menghasilkan potongan dengan ujung tumpul sehingga untuk kloningnya diperlukan suatu *linker* (nukleotida penyambung).² Cara lain yang lebih menguntungkan adalah dengan memakai satu enzim restriksi yang memotong secara sering, misalnya Sau3A. Enzim ini akan menghasilkan suatu digesti secara partial yang lebih mendekati random dibanding dengan yang dihasilkan oleh dua enzim. Penggunaan Sau3A ini memberikan keuntungan yang besar dimana fragmen yang dihasilkan dapat langsung disisipkan pada vektor mislamdaL47 atau lamdaEMB23 yang telah didigesti dengan BamHI, sehingga Sau3A dan BamHI mempunyai ujung yang kohesif.³ Metoda digesti partial dan diinsersi ke dalam

suatu vektor secara *in vitro*, seperti pada lamda merupakan metode yang banyak digunakan dalam membuat *genom library*^{2,3,4}

Selain vektor lamda, vektor cosmid juga banyak digunakan, karena cosmid mempunyai efisiensi yang tinggi dan kapasitas yang besar dibanding dengan lamda, tetapi lamda mempunyai keunggulan, jika digunakan hibridisasi untuk tahap seleksi klon yang dihasilkan. Selain itu lamda menghasilkan *plaque* dengan latar belakang lebih bersih jika dibandingkan dengan cosmid yang menghasilkan koloni. Keuntungan yang lain adalah phaga (vektor lamda) mempunyai waktu hidup yang lebih lama dibanding dengan *Escherichia coli*, sehingga dapat dilakukan penyimpanan dan kemudian dilakukan seleksi menggunakan probe.⁴

Setelah pustaka dihasilkan, klon-klon dengan sekuen target harus diidentifikasi. Tiga metode identifikasi yang populer digunakan adalah hibridisasi DNA dengan probe DNA yang dilabel, deteksi dengan imunologi untuk produk protein, dan deteksi untuk aktivitas protein.

Membuat Pustaka Gen

Isolasi gen yang mengkode protein sering sebagai tujuan eksperimen bioteknologi. Pada organisme prokariot, setiap gen struktural mempunyai domain kode yang panjang pada DNA genom; pada eukariot, daerah kode (exon) dari gen struktural dipisah oleh daerah non kode (intron). Karena itu, strategi kloning yang berbeda harus digunakan untuk gen prokariot dan eukariot.² Pada prokariot, sekuen yang diinginkan (DNA target) jumlahnya kecil sekali (kurang 0,02%) dari total DNA kromosom sehingga untuk mengklon dan memilih DNA target, DNA organisme lengkap dipotong dengan endonuklease restriksi untuk menghasilkan fragmen-fragmen dan setiap fragmen diinsersi ke dalam vektor.² Kemudian, galur sel spesifik (klon) yang membawa sekuen DNA target harus diidentifikasi, diisolasi, disubkultur, dan dikarakterisasi.

Pustaka DNA

Teknologi rekombinan DNA juga salah satu cara kloning gen yaitu mentransfer informasi genetik dari satu organisme ke

organisme lain. Eksperimen DNA rekombinan secara umum menurut prosedur untuk membuat pustaka gen (gambar 2).

- Ekstraksi dan rekombinasi.

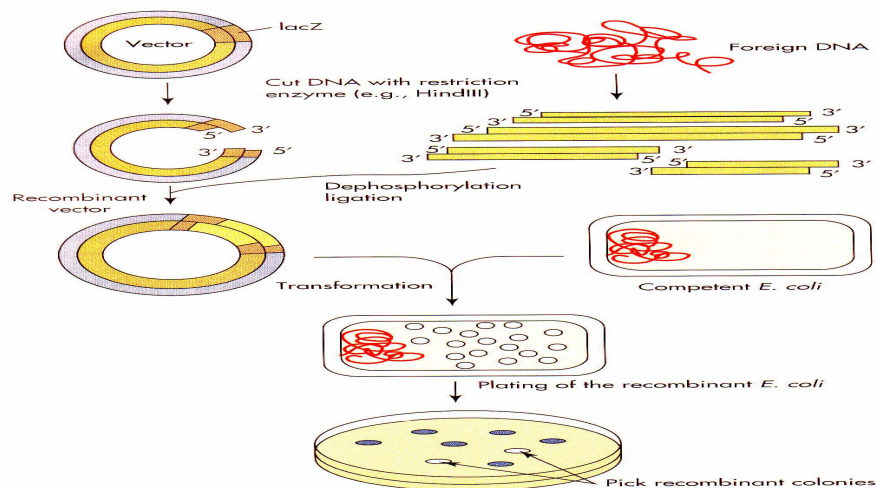
DNA target dari organisme donor diekstraksi, pemotongan dengan enzim, dan disambung kembali (diligasi) pada molekul DNA lain (vector klon) untuk membentuk molekul DNA rekombinan (*cloning vector-insert DNA construct*). **Transfer cloning vector-insert DNA construct**. DNA target yang telah diinsersi pada vector ditransfer ke dalam sel hospes. Proses memasukkan DNA target ke dalam sel hospes dinamakan transformasi.^{3,4}

- Identifikasi.

Sel hospes yang mengandung vector yang membawa DNA target (sel yang ditransformasi) diidentifikasi dan dipilih dari sel yang tidak mengandung vector pembawa DNA target.

- Purifikasi dan Rekombinasi

Metode umum untuk mendapatkan sekuen DNA target dari organisme donor adalah jaringan atau sel-sel dihomogenkan, diekstraksi atau dilisis, kemudian DNA dipurifikasi. Setelah mendapatkan DNA target, kemudian menentukan vektor yang akan digunakan. Salah satu vektor yang digunakan untuk pustaka DNA adalah vektor plasmid pUC19.



Gambar 2. Prosedur kloning DNA rekombinan DNA dari organisme sumber dipotong dengan endonuklease restriksi dan diinsersi ke dalam kloning vector. Selanjutnya, vector yang telah diinsersi DNA target dimasukkan ke sel hospes dan sel-sel yang mengandung vektor tersebut diidentifikasi dan ditumbuhkan³.

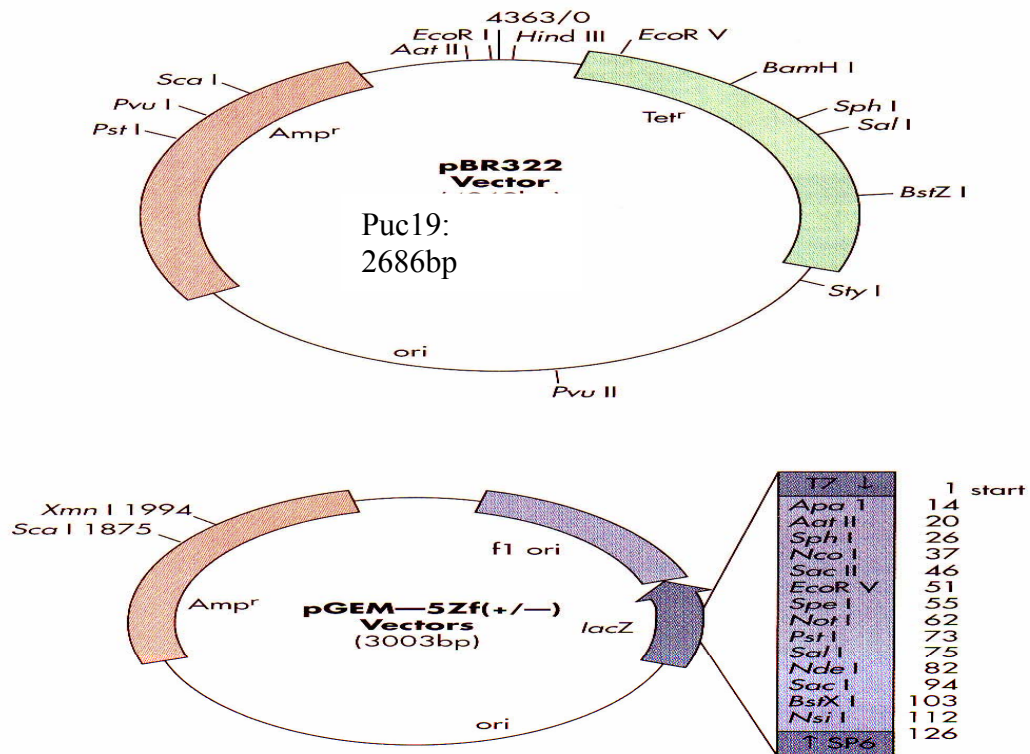
Vektor plasmid pUC19.

Vektor plasmid Puc19 mempunyai 2.686 bp dan mengandung gen resisten untuk ampisilin; gen β-galaktosidase (*LacZ'*) dari operon laktosa *E.coli*. Gen *LacI* menghasilkan protein represor yang mengatur ekspresi gen *LacZ'*; sekuen pendek dengan mengandung banyak tempat klon (yaitu, *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *XmaI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *HincII*, *AccI*, *BspMI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*) dan *origin of replication* dari Pbr 322 (lihat gambar 3).

Prosedur kerja plasmid pUC19 sel-sel yang membawa plasmid pUC19 ditumbuhkan pada medium yang mengandung isopropiltiogalaktosidase (IPTG) sebagai perangsang operon *lac*, produk gen *LacI* tidak bisa mengikat daerah operator promotor dari gen *LacZ'*, sehingga gen *LacZ* pada plasmid ditranskripsi dan ditranslasi. Protein *LacZ'* merupakan kombinasi dengan protein yang dikode oleh DNA kromosom untuk membentuk

β-galaktosidase hybrid aktif. Jika substrat 5-bromo-4-kloroindolil-β-galaktosidase hybrid dan menghasilkan produk biru. Pada kondisi ini koloni mengandung vektor pUC19 yang diinsersi oleh DNA target, koloni akan tetap berwarna putih.^{2,4}

Untuk eksperimen klon pUC19, DNA dari organisme sumber dipotong dengan satu enzim restriksi yang mengenal tempat pada sekuen klon multiple (enzim) restriksi yang sama dan mengenal tempat klon multiple pada plasmid). DNA sumber ini dicampur dengan plasmid pUC19 yang sebelumnya telah diperlakukan dengan endonuklease restriksi yang sama, dan kemudian, diberi alkalifosfatase. Setelah ligasi dengan DNA ligase T4, campuran reaksi ditransformasi ke dalam sel hospes yang dapat mensintesis sebagai enzim β-galaktosidase, dan bersifat fungsional jika dikombinasi dengan gen *LacZ'* dari plasmid.^{2,4}



Gambar 3. Contoh vektor plasmid pUC19

Sel hospes ditumbuhkan pada medium yang mengandung ampisilin, IPTG, dan X-gal. Sel yang tidak ditransformasi tidak dapat tumbuh pada medium yang mengandung ampisilin. Sel yang mengandung plasmid pUC19 yang tidak diinsersi oleh sekuen DNA target dapat tumbuh pada medium yang mengandung ampisilin dan karena mereka bisa membentuk β -galaktosidase fungsional, mereka menghasilkan produk warna biru. Sebaliknya, sel-sel yang membawa vektor pUC 19 yang telah diinsersi dengan DNA target (*plasmids-cloned DNA construct*) menghasilkan koloni warna putih pada medium yang sama. Karena DNA yang diinsersi sekuen vektor pUC19 akan mengganggu atau merusak kerangka baca (*reading frame*) dari gen *LacZ'* dan mencegah produksi protein *LacZ'* fungsional, dengan demikian β -galaktosidase, X-gal pada medium tidak diubah menjadi komponen warna biru pada koloni ini dan tetap warna putih.^{3,4} Kemudian koloni warna putih (hasil positif) harus diidentifikasi (*screening*) untuk sekuen DNA target spesifik (seperti tampak pada gambar 2).

- Pustaka cDNA

Untuk mengklon gen struktural dan fungsional eukariot dilakukan dengan tehnik khusus. Hal ini disebabkan hospes prokariot tidak dapat menghilangkan intron dari molekul RNA yang ditranskripsi, oleh karena itu mRNA tidak ditranslasi dengan benar oleh sel hospes bakteri. Sekuen mRNA eukariot tidak memiliki intron, tetapi terdapat Cap G pada ujung 5' dan untaian panjang sampai dua ratus residu adenin (*poly A tail*) pada ujung 3'.^{3,4}

Poly A tail ini dapat digunakan untuk memisahkan fraksi mRNA, tRNA dan rRNA. RNA sel eukariot difraksinasi melalui kolom gel selulosa yang dilapisi atau diikat dengan residu timidin, panjangnya sekitar 15 nukleotida (oligo-dT15). *Poly A tail* dari mRNA berikatan melalui ikatan hidrogen dengan rantai oligo-dT. Molekul tRNA dan rRNA yang tidak mempunyai *poly A tail*, lewat melalui kolom. mRNA kemudian dielus dari kolom dengan memberikan buffer yang merusak ikatan hidrogen A:T, sehingga melepaskan mRNA yang terikat.^{3,4}

Sebelum molekul mRNA diklon ke dalam vektor, mereka harus diubah menjadi *DNA double strand*. Sintesis menggunakan dua polimerase asam nukleat yang berbeda: *reverse transcriptase* (transkripsi balik) dan *Klenow*

fragmen DNA polimerase.^{1,3} Setelah fraksi mRNA dipurifikasi, sekuen pendek oligo-dT ditambahkan pada sampel bersama dengan enzim transkripsi balik dan empat deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP). Oligo-dT berkomplementari dengan *poly A tail* dan sebagai primer untuk sintesis strand DNA.^{3,4}

Strand DNA kedua disintesis dengan menambahkan fragmen Klenow DNA polimerase *Escherichia coli* yang menggunakan strand DNA pertama sebagai *template* dan menambahkan deoksiribonukleotida pada strand yang sedang tumbuh, dimulai dari ujung *hairpin loop*. Setelah reaksi selesai, sampel diberi dengan enzim RNase H yang berfungsi mendegradasi molekul mRNA dan dengan nuclease S1 yang membuka *hairpin loop* dan mendegradasi DNA *single strand*. cDNA ini dapat diklon dengan ligasi *blunt-end* (ujung tumpul) ke dalam vektor kloning plasmid untuk membentuk pustaka cDNA.^{3,4} Pustaka cDNA dapat dideteksi (*screening*) dengan DNA hibridisasi dan imunologi.

Transformasi Genetik Prokariota Transfer DNA ke dalam *E.coli*

Transformasi ini adalah suatu proses memasukkan DNA bebas (plasmid) ke dalam sel bakteri *E. coli*. Bakteri merupakan sel hospes utama untuk DNA rekombinan. Tehnik transformasi ini dapat dilakukan dengan beberapa cara:

- Pendinginan dan Pemanasan Cepat

DNA plasmid dengan cara memperlakukan sel pada *ice-cold CaCl₂*, diikuti dengan pemanasan selama 90 detik suhu 42°C.⁴ Perlakuan ini membuat dinding sel bakteri rusak pada daerah tertentu, sehingga memungkinkan DNA plasmid dalam larutan masuk ke dalam sel bakteri. Sel-sel bakteri yang dapat mengambil DNA plasmid dinamakan *sel-sel kompeten*. Untuk *E.coli* proses tersebut harus dirangsang, sedangkan pada bakteri lain, proses tersebut terjadi secara alami dan kadang-kadang dapat ditingkatkan dengan menggunakan medium pertumbuhan spesifik. Tehnik ini sering dilakukan untuk mendapatkan transformasi genetik karena mudah dan sederhana.

- Elektroporesis

Pengambilan DNA bebas dapat diinduksi dengan memperlakukan bakteri pada lapangan

tegangan listrik tinggi. Prosedur elektroporesis ini, menyebabkan perubahan permeabilitas membran bakteri sehingga DNA plasmid memungkinkan masuk ke dalam sel. *E.coli* (~50µL) dan DNA plasmid ditempatkan dalam ruang yang diberi elektroda, dan satu getar listrik kira-kira 25 mikrofara-days, 2,5 kilovolts, dan 200 ohms dipaparkan selama 4,6 milidetik.

- Konjugasi

Beberapa bakteri, dapat mengalami transmisi DNA plasmid dari donor sel ke sel penerima secara alami, dan hal ini telah digunakan untuk mentransfer DNA plasmid yang telah diinsersi kepada sel hospes yang tidak mudah ditransformasi.³ Kontak efektif antara sel donor dan penerima disebabkan oleh sifat konjugasi, dan transfer DNA melalui elemen yang dapat bergerak (contoh elemen loncat atau transposon). Kebanyakan plasmid yang digunakan untuk DNA rekombinasi tidak memiliki sifat konjugasi oleh karena itu DNA plasmid ini tidak bisa pindah ke sel penerima melalui proses konjugasi. Untuk mengatasi hal ini vektor klon plasmid digerakkan dan ditransfer melalui sifat konjugasi yang diberikan oleh plasmid kedua dalam sel yang sama. Jadi, dengan memasukkan satu plasmid yang memiliki sifat konjugasi ke dalam sel bakteri yang membawa vektor klon plasmid yang dapat bergerak, memungkinkan untuk mentransfer vektor klon plsmid ke sel penerima yang sulit dilakukan transformasi dengan metode lain.

Deteksi Pustaka Gen

- Deteksi dengan hibridisasi DNA

Adanya sekuen nukleotida target pada sampel DNA dapat ditentukan dengan probe DNA. Prosedur ini dinamakan hibridisasi DNA dan tergantung pada stabilitas pasangan basa antara probe dan sekuen target.^{2,3} Hibridisasi DNA mungkin dilakukan karena DNA *double strand* dapat diubah menjadi DNA *single strand* dengan perlakuan alkali dan pemanasan. Pemanasan DNA akan merusak ikatan hydrogen (denaturasi) tetapi tidak mempengaruhi ikatan fosfodiester sebagai tulang punggung DNA. Jika larutan yang dipanaskan dengan cepat didinginkan, strand tetap sebagai *single strand*. Jika suhu larutan DNA yang dipanaskan diturunkan dengan lambat, strand menjadi *double strand* (renaturasi) sedangkan prosesnya dinamakan *annealing*. Beberapa produk proses

ini mengandung molekul DNA hybrid, yaitu dua strand yang berasal dari molekul DNA yang berbeda.⁴

Umumnya, untuk uji hibridisasi DNA, DNA target didenaturasi dan *single strand* bersifat irreversibel yang diikat pada matriks (seperti, nilon atau nitroselulosa), proses ini sering dilakukan pada suhu tinggi. Kemudian, probe DNA yang telah dilabel baik dengan radioisotop ataupun penanda lainnya diinkubasi dengan DNA sample yang terikat pada nilon. Jika sekuen nukleotida pada probe DNA berkomplementari dengan sekuen nukleotida pada sampel, akan terjadi perpasangan basa. Hibridisasi dapat dideteksi dengan autoradiografi atau prosedur visualisasi lainnya, tergantung sifat label probe. Jika sekuen nukleotida probe tidak berpasangan basa dengan sekuen DNA sampel, sehingga tidak terjadi hibridisasi maka hasil uji memberikan hasil negatif. Umumnya, panjang probe berkisar dari 100 sampai lebih dari 1000 bp dan sangat tergantung pada kondisi reaksi hibridisasi, pengikatan yang stabil biasanya lebih tinggi dari 80% pada segmen 50 basa.^{2,4}

- Deteksi dengan uji imunologi

Deteksi dengan uji imunologi digunakan untuk klon DNA yang ditranskripsi dan ditranslasi mengandung suatu protein. Secara teknis, prosedur ini lebih umum dari DNA hibridisasi. Semua galur sel (klon) pustaka ditumbuhkan pada plate utama. Sampel setiap koloni ditransfer ke matriks, sel dilisis dan protein dilepaskan dan menempel pada matriks.

Matriks yang ada protein terikat dengan antibodi pertama, setelah terjadi interaksi antara antibodi pertama dengan protein, Antibodi yang terikat dibersihkan, dan kemudian diberi lagi antibodi kedua yang sudah dilabel dengan enzim (seperti alkaline fosfatase) dan spesifik untuk antibodi pertama. Setelah matriks dicuci, kemudian ditambahkan substrat yang tidak berwarna. Jika antibodi kedua mengikat antibodi pertama, substrat yang tidak berwarna akan dihidrolisis oleh enzim yang menempel pada antibodi kedua dan menghasilkan komponen-komponen yang berwarna dan terakumulasi pada tempat reaksi.^{2,4}

- Deteksi dengan aktivitas protein

Hibridisasi DNA dan uji imunologi sangat baik untuk deteksi jenis gen dan produk gen.⁴ Jika produk gen target adalah enzim, uji

plate dapat dilakukan untuk identifikasi anggota pustaka yang membawa gen fungsional yang mengkode enzim. Contohnya, gen-gen untuk α -amilase, endoglukanase, dan β -glukosidase dari beberapa organisme yang telah diisolasi dengan memplate pustaka genom pada *E. coli* pada medium yang ditambah dengan substrat spesifik dan kemudian menggunakan pewarnaan selektif untuk identifikasi koloni-koloni yang mampu memanfaatkan substrat. Jika gen mengkode satu produk yang penting untuk pertumbuhan sel hospes yang telah terjadi mutasi, kemudian pustaka bisa dimasukkan dengan mentrasformasi pada sel mutan-mutan ini.⁴

Penutup

Penggunaan utama teknologi DNA rekombinan sampai hari ini adalah untuk memproduksi protein. Kebanyakan protein rekombinan dihasilkan oleh organisme mikroba,

meskipun penggunaan sel mamalia rekombinan meningkat dan penting dalam pengembangan bidang farmakologi. Protein yang diekspresikan seperti protein penggunaan dalam farmakologi, katalis untuk reaksi kimia, dan biosintesis antibiotik. Protein yang memiliki aktivitas katalitik lainnya, telah diintroduksi ke dalam mikroorganisme dengan manipulasi genetik dan digunakan sebagai pustaka DNA untuk menghasilkan komponen berat molekul rendah *in vivo* termasuk vitamin, asam amino, bahan celup, antibiotik, dan precursor untuk biopolimer.

Pada kondisi ini, hospes mikroorganisme direkayasa menjadi satu pabrik dalam memproduksi metabolit-metabolit yang berguna. Saat ini, gen-gen (kebanyakan cDNA) berjumlah lebih dari 300 protein yang penting untuk terapi manusia telah diklon.^{2,3,4} Sejumlah sekuen-sekuen ini telah diekspresikan dalam sel hospes, dan baru-baru ini telah diuji untuk pengobatan beberapa penyakit manusia (Tabel 1)

Tabel 1. Protein manusia yang diproduksi oleh teknologi DNA rekombinan³

Protein	Penggunaannya
α -Antitripsin	Pengobatan enfisema
Hormon Adrenokortikotropik	Pengobatan penyakit reumatik
Faktor pertumbuhan sel-B	Pengobatan penyakit imun
Calsitonin	Pengobatan esteomalasia
Faktor stimulasi koloni	Pengobatan kerusakan darah
Korionik gonadotropin	Pengobatan anovulasi
Endorpin dan enkepalin	Bahan analgesik
Faktor pertumbuhan epidermal	Penyembuhan luka
Eritropoitin	Pengobatan anemia
Faktor VIII	Faktor koagulasi; pengobatan hemopolia
Faktor IX	Faktor koagulasi; pengobatan hemopolia
Hormon pertumbuhan	Peningkatan pertumbuhan
Faktor yang melepaskan faktor pertumbuhan	Peningkatan pertumbuhan
Insulin	Pengobatan diabetes
Interferon (α , β , γ)	Antivirus, antitumor, antikanker
Interleukin	Terapi kanker, pengobatan kerusakan imun
Limfotoksin	Antitumor
Faktor aktivasi makrofaga	Antitumor
Faktor pertumbuhan urat saraf	Pengobatan kerusakan saraf
Faktor pertumbuhan derivat platelet	Pengobatan aterosklerosis
Relaxin	Mempermudah persalinan
Albumin serum	Suplemen plasma
Somatomedin C	Meningkatkan pertumbuhan
Aktivator plasminogen jaringan	Bahan trombolitik
Faktor nekrosis tumor	Antitumor
Urogastron	Antiulserasi
Urokinase	Bahan trombolitik

Daftar Pustaka

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, D.J. 2000. Molecular Biology of the Cell. 3rd Ed. Garland Publishing, Inc. New York & London. 292-332p.
2. Brown, A.T. 1997. Genomes. John Wiley & Sons (ASIA) PTE LTD. New York, USA. 472p
3. Glik, R.B., and Pasternak, J.J. 1994. Molecular Biotechnology. Principle and Applications of Recobinant DNA. Department of Biology, University of Waterloo Waterloo, Otario, Canada. ASM press, Washington D.C, USA. 500p.
4. Ausuber Fredrick, M. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1. Published Simultaneously in Canada.