Universitas Indonesia Library >> UI - Tesis Membership

Pengembangan sistem purifikasi protein yang berbasis protease: Ekspresi protein fusi GST-protease Moloney Murine Leukemia Virus (MLV) pada Escherichia coli BL21

Wahyuni, author

Deskripsi Lengkap: https://lib.ui.ac.id/detail?id=108099&lokasi=lokal

---

Abstrak

Protein rekombinan yang difusikan ke suatu peptida tag dapat diimobilisasi pada matriks yang telah dilapisi substrat berafinitas dengan tag tersebut. Dalam proses purifikasi, protein tag kadang kala dipisahkan dari protein rekombinan. Pemisahan tag dapat dilakukan dengan menyisipkan sekuens pengenalan protease di antara tag dan protein rekombinan yang memungkinkan pemisahan tag dari protein rekombinan oleh restriksi enzim protease. Pads beberapa sistem purifikasi, protease yang telah difusikan dengan tag telah digunakan untuk memotong peptida tag, sehingga baik tag maupun protease yang memotong tag dan protein dapat dipisahkan dari protein rekombinan. Sistem tersebut sangat menguntungkan namun hanya protease PreScission (protease Human Rhinovirus) yang telah dikembangkan untuk sistem tersebut. Oleh karena itu, untuk memperoleh alternatif lain dari sistern tersebut. dilakukan konstruksi vektor pengekspresi protease MLV di dalam sistem ekspresi protein fus; tag GST. Gen protease MLV disisipkan di antara situs restriksi BamHI dan EcoRl pGEX-6P-l, di hilir ORF GST dan situs pengenalan protease PreScission. Penyisipan gen protease MLV di dalam plusmid rekombinan (pG6P I .Pro) dikonfirmasi dengan analisis perbaiidingan pola migrasi. pG6P 1.Pro yang dibandingkan dengan plasniid wild type (pGEX-6P-I) dal. identifikasi insert pada jel agarose setelah restriksi dengan BamHI-EcoRI. Kombinasi orientasi gen protease dalam pG6PI. Pro dengan analisis restriksi enzim Apal, dan BstEII. Konfirmasi akhir yang bersifat definitif dilakukan dengan sekuensing pO6Pl.Pro. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa pG6P 1.Pro telah berhasil dikonstruksi dengan benar. namun dari basil ekspresi protein fusi GST-Protease MLV tidak mendapatkan protein fusi utuh (43,8 kDa). Mutasi 'pada N terminal protease tidak mempengaruhi ekspresi protein fusi GST-Protease MLV dan tetap tidak menghasilkan protein fusi yang utuh (44,8 kDa dan 43,97 kDa), Kegagalan ekspresi protein fusi tersebut mungkin disebabkan adanya peristiwa autokatalisis.