

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. Pada 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 sistem tersebut, dilakukan konstruksi vektor pengeksresi protease MLV di dalam sistem ekspresi protein fusi; tag GST. Gen protease MLV disisipkan di antara situs restriksi BamHI dan EcoRI pGEX-6P-1, di hilir ORF GST dan situs pengenalan protease PreScission. Penyisipan gen protease MLV di dalam plusmid rekombinan (pG6P I .Pro) dikonfirmasi dengan analisis perbandingan pola migrasi. pG6P I.Pro yang dibandingkan dengan plasmid wild type (pGEX-6P-I) dilakukan identifikasi insert pada gel agarose setelah restriksi dengan BamHI-EcoRI. Kombinasi orientasi gen protease dalam pG6P I .Pro dengan analisis restriksi enzim ApaI, dan BstEII. Konfirmasi akhir yang bersifat definitif dilakukan dengan sekuensing pG6P I.Pro. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa pG6P I.Pro telah berhasil dikonstruksi dengan benar. Namun dari hasil 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.