

In vitro transcription of HIV-1 RNA for standard RNA

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20333155&lokasi=lokal>

Abstrak

Latar belakang: Uji kuantitatif merupakan uji yang penting dalam memonitor penatalaksanaan pasien yang terinfeksi HIV-1 atau yang menderita AIDS. Tahap penting dalam pengembangan uji tersebut adalah tersedianya RNA HIV-1 standar. Oleh karena itu, dalam penelitian ini transkripsi RNA HIV-1 dioptimasi untuk menghasilkan RNA HIV-1 standar. Metode: Menggunakan teknik PCR, DNA HIV-1 diamplifikasi dari pNL43 menggunakan sepasang primer yang spesifik pada daerah yang dikonservasi dari gen Gag HIV-1. Produk PCR kemudian diklon ke dalam pBluescript II KS. Plasmid rekombinan dipotong menggunakan enzim restriksi EcoRI. Plasmid yang telah dipotong kemudian digunakan sebagai cetakan untuk reaksi transkripsi RNA. Reaksi RT-PCR dan PCR dilakukan secara bersamaan untuk mengkonfirmasi adanya fragmen RNA yang telah ditranskripsi. Hasil: Fragmen DNA sebesar 115 bp dari daerah gen Gag HIV-1 telah berhasil diklon ke dalam pBluescript II SK dengan orientasi yang benar. Reaksi transkripsi RNA juga berhasil dilakukan. Hasil transkripsi RNA telah dikonfirmasi dan menunjukkan hasil transkripsi RNA yang benar. Kesimpulan: Dalam studi ini telah berhasil dilakukan konstruksi plasmid rekombinan yang mengandung daerah yang dikonservasi dari gen Gag HIV-1, dan RNA HIV-1 juga berhasil ditranskripsi secara in vitro.

<hr>

Abstract

Background: The quantitative assays are important tests in the management of patients with HIV-1/AIDS. The important step in developing the assay is the availability of the standard HIV-1 RNA. For this purpose, we optimized in vitro HIV-1 RNA transcription to produce the standard HIV-1 RNA. Methods: The HIV-1 DNA was amplified from pNL43 by PCR using a primer pair that was specific for conserved region of HIV-1 Gag gene. The PCR product was further cloned into pBluescript II KS. The recombinant plasmid was restricted with EcoRI enzyme. Then, the linearized plasmid was used as template for RNA transcription. RT-PCR and PCR were performed simultaneously for confirmation of synthesized RNA fragment. Results: A 115 bp DNA of HIV-1 Gag gene has been cloned into pBluescript II SK with the exact true orientation. The reaction of the RNA transcription was also successfully performed. The RNA transcripts have been confirmed and showed the accuracy of the transcripts. Conclusion: we successfully constructed the recombinant plasmid containing a conserved region of HIV-1 Gag gene, and the HIV-1 RNA has been transcribed in vitro as well.