

Kloning gen Human Interferon Alpha 2a pada vektor pET-32b(+) dan ekspresi pada Escherichia coli

Arizah Kusumawati, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20336060&lokasi=lokal>

Abstrak

Interferon (IFN) merupakan sitokin yang diproduksi oleh berbagai tipe sel sebagai respon rangsangan terhadap stimulasi virus, bakteri, parasit, sel tumor, atau antigen lain. Interferon termasuk kelompok IFN tipe I yang mempunyai berbagai efek biologis yang meliputi antiviral, antitumor dan juga sebagai immunoterapeutik. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis protein rekombinan human IFN α 2a melalui sistem ekspresi pada bakteri E. coli BL21(DE3). Pada gen human ifn α 2a dilakukan penambahan situs pemotongan enzim restriksi Nco I dan Xho I menggunakan metode PCR, kemudian dilanjutkan dengan proses ligasi ke vektor pET-32b(+) dan selanjutnya ditransformasikan pada E. coli DH5 α .

Hasil sekuensing menunjukkan bahwa vektor rekombinan (pET-32b(+)-IFN α 2a) memiliki urutan nukleotida yang benar. Vektor rekombinan ini selanjutnya ditransformasikan ke dalam E.coli BL21(DE3). Klone transforman yang diperoleh dikultur dan diinduksi dengan penambahan IPTG 1 mM sehingga mengekspresikan protein rekombinan human IFN α 2a. Dari hasil isolasi, diperoleh protein rekombinan human IFN α 2a dalam bentuk protein terfusi sehingga mempermudah proses deteksi dan purifikasi. Protein dikarakterisasi melalui metode SDS PAGE dilanjutkan dengan Western blot dan pewarnaan CBB. Pita protein rekombinan human IFN α 2a yang diperoleh berukuran 36 kDa. Hasil maksimal ditunjukkan ekspresi pada suhu 37 $^{\circ}$ C dengan waktu inkubasi 5 jam setelah induksi.

<hr>

Interferon (IFN) is a cytokine produced by various cell types as a response of stimulation to viruses, bacteria, parasites, tumor cells, or other antigens. Interferon type I IFN groups have various biological effects, including antiviral, antitumor and immunotherapeutic. The aim of this research is to synthesize recombinant human IFN α 2a proteins through bacterial expression systems in E. coli BL21 (DE3). Addition genes of human IFN α 2a, which are restriction enzyme cutting sites for Nco I and Xho I, are added through PCR method. This step is followed by ligation process to the pET-32b(+) vector and then transformed into E. coli DH5 α .

The recombinant vector (pET-32b(+)-IFN α 2a) has a nucleotide right sequence after it was being sequenced, after was transformed into E. coli BL21 (DE3). Obtained transformant clones were cultured and induced by addition of IPTG 1 mM to produce the expression of recombinant human IFN α 2a proteins. As result of isolation process, recombinant protein of human IFN α 2a are collected in fused protein thus can simplify the detection and purification method. The proteins are characterized by the SDS PAGE method followed by Western blot and CBB staining. The results show that the recombinant human IFN α 2a protein bands are exactly 36 kDa. The maximum expression results were obtained at 37 $^{\circ}$ C with 5 hours incubation after induction process.