

Pengembangan system 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=79642&lokasi=lokal>

Abstrak

Protein rekombinan yang difusikan ke suatu peptida tag dapat dimobilisasi 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 dari 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 plasmid rekombinan (pG6PI.Pro) dikonfirmasi dengan analisis perbandingan pola migrasi pG6PI.Pro yang dibandingkan dengan plasmid wild type (pGEX-6P-1) dan identifikasi insert pada jel agarose setelah restriksi dengan BamHI-EcoRI. Konfirmasi orientasi gen protease dalam pG6PI.Pro dengan analisis restriksi enzim ApaI, dan Bs:Ell. Konfirmasi akhir yang bersifat definitif dilakukan dengan sekuensing pG6PI.Pro. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa pG6P 1.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 1:Da). Kegagalan ekspresi protein fusi tersebut mungkin disebabkan adanya peristiwa autokatalisis.