

DNA Rekombinan

Suatu Pelajaran Singkat

James D. Watson John Tooze David T. Kurtz

Wisnu Gunarso



Daftar Isi

Kata Pengantar xiii

1. Menetapkan Peranan Gen di dalam Sel 1
 - Sel Merupakan Unsur Pembangun Semua Makhluk Hidup 2
 - Sel Merupakan Pabrik Kecil yang Dapat Diperluas Secara Simultan yang Mensintesis Beberapa Ribu Molekul Berbeda 2
 - Molekul-molekul Sel Dapat Dibagi Menjadi Molekul-molekul Kecil dan Molekul-molekul Makro 3
 - Katalisator Selular Khusus yang Disebut Enzim Secara Efektif Menentukan Reaksi Kimia yang Terjadi di Dalam Sel 3
 - Suatu Protein Tertentu Mempunyai Urutan Asam Amino yang Unik di Sepanjang Rantai Polipeptidanya 4
 - Berfungsinya Suatu Enzim Memerlukan Pelipatan Rantai Polipeptida yang Tepat 5
 - Pengaktifan Molekul-molekul Menjadi Bentuk-bentuk Berenergi Tinggi Mempertinggi Reaktivitas Kimia Mereka 5
 - Metabolisme Sel Dapat Digambarkan Secara Visual dengan Menggunakan Peta Metabolik 6
 - Enzim Tidak Dapat Menentukan Urutan Asam Amino pada Rantai Polipeptida 6
 - Percobaan-percobaan Pemuliaan Mendel dengan Tanaman Ercis Pertama Kali Mengungkapkan Faktor-faktor yang Menentukan Sifat-sifat Genetik (Gen) 7
 - Kromosom Merupakan Pembawa Sifat Menurun (Hereditas) di Dalam Sel 8
 - Hipotesis Satu Gen-Satu-Protein 10
2. DNA Merupakan Bahan Genetik Primer 13
 - DNA Terletak Secara Eksklusif pada Kromosom 13
 - Sel Mengandung RNA Maupun DNA 14
 - Telah Ditemukan Pengujian Biologis terhadap Molekul-molekul Genetik 15
 - Virus Merupakan Paket Unsur-unsur Genetik yang Berpindah dari Sel ke Sel 16
 - Molekul-molekul dengan Ukuran dan Bentuk yang Komplementer Saling Menarik 17
 - Diameter DNA Telah Ditetapkan 18
 - Nukleotida-nukleotida dari DNA dan RNA Terpaut Satu Sama Lain oleh Ikatan-ikatan Fosfodiester 5'—3' yang Teratur 19
 - Komposisi Basa DNA dari Berbagai Organisme Sangat Bervariasi 19

DNA Mempunyai Bentuk yang Sangat Teratur	20
Unit Dasar DNA Terdiri dari Dua Rantai Polinukleotida yang Saling Jalin-menjalin (Double Helix/Heliks Ganda)	21
Heliks Ganda Tersebut Terikat Menjadi Satu oleh Ikatan-ikatan Hidrogen antara Pasangan-pasangan Basanya	21
Sifat Komplementer DNA Merupakan Intisari Kemampuannya untuk Replikasi Diri	23
Bukti Tentang Pemisahan Untaian (Strand) Selama Replikasi DNA	24
Molekul-molekul DNA dapat Direnaturasi Maupun Didenaturasi	25
Pasangan-pasangan Basa G—C Lebih Sukar Dipisahkan daripada Ekuivalen-ekuivalen A—T Mereka	25
Palindrom Memperkuat Ikatan Hidrogen Antaruntai	25
5-Metilsitosin Dapat Menggantikan Sitosin pada DNA	25
Kromosom Mengandung Molekul-molekul DNA Tunggal	26
Virus Merupakan Sumber Molekul-molekul DNA yang Homogen	27
DNA Fag λ Dapat Menyisipkan Diri pada Tempat Spesifik di Sepanjang Kromosom <i>E. Coli</i>	27
Fag yang Mentransduksi (Memindahkan Gen) secara Abnormal Memberikan Segmen-segmen Unik pada Kromosom-kromosom Bakteri	28
Plasmid Merupakan Minikromosom yang Bereplikasi secara Autonom	29
Molekul-molekul DNA Berbentuk Lingkaran Dapat Terpilin-Ganda (Supercoiled)	30
Kebanyakan Heliks Ganda Terpilin ke Kanan Tetapi Dalam Keadaan Khusus Urutan Nukleotida DNA Tertentu Menghasilkan Heliks yang Terpilin ke Kiri	

3. Penjelasan Mengenai Kode Genetik 37

Mengidentifikasi Penggantian Asam Amino dalam Suatu Molekul Hemoglobin Mutan	37
Perkembangan Genetika Struktur Halus	38
Gen dan Produk-produk Polipeptidanya adalah Kolinear	38
RNA Membawa Informasi dari DNA ke Tempat-tempat Sintesis Protein di Dalam Sitoplasma	39
Bagaimana Cara Asam Amino Berjajar pada Cetakan RNA?	40
Peranan Enzim dan Cetakan dalam Sintesis Asam Nukleat dan Protein	41
Protein-protein Disintesis dari Terminal-N ke Terminal-C	42
Tiga Bentuk RNA yang Terlibat dalam Sintesis Protein	42
Bukti Genetik bahwa Kodon Mengandung Tiga Basa	43
Rantai-rantai RNA Disintesis maupun Ditranslasi dengan Arah 5' ke 3'	44
mRNA Sintetik Digunakan untuk Membuat Penugasan Kodon	45
Kode Genetik Telah Benar-benar Terpecahkan pada Tahun 1966	45
"Goyangan" (Wobble) Seringkali Memungkinkan Species tRNA Tunggal Mengenal Kodon-kodon Ganda	46
Sampai Seberapa Jauh Sifat Universal suatu Kode Genetik Itu?	46
Gen-gen yang Berukuran Rata-rata Mengandung Paling Sedikit 1200 Pasangan Basa	47
tRNA Suppressor Menyebabkan Kekeliruan dalam Pembacaan Kode Genetik	47
Tanda-tanda untuk Memulai dan Mengakhiri Sintesis Molekul-molekul RNA Spesifik Terkode di dalam Urutan DNA	48
Sistem-sistem yang Makin Akurat Telah Dikembangkan untuk Translasi <i>in Vitro</i> mRNA yang Ditambahkan secara Eksogen	50

4. Unsur-unsur Genetik yang Mengendalikan Ekspresi Gen 53
 - Represor Mengendalikan Sintesis Enzim Perangsang 53
 - Gen-gen Bakteri dengan Fungsi yang Berkaitan, Terorganisasi ke dalam Operon-operon 55
 - Promotor Merupakan Tanda Mulai untuk Sintesis RNA 55
 - Sintesis Konstitutif Molekul-molekul Represor 56
 - Represor Telah Diisolasi dan Diidentifikasi 56
 - Peraturan Positif untuk Transkripsi Gen 57
 - Perlemahan (Attenuation) 57
 - Pengendalian Translasi 58
 - Kesulitan-kesulitan Awal dalam Menyelidiki Pengaturan Gen pada Tumbuhan dan Hewan Tingkat Tinggi 60
 - Pemurnian Gen-gen RNA Ribosom *Xenopus* 61
 - mRNA Eukariot Mempunyai Topi dan Ekor 61
 - Tiga Jenis RNA Polimerase dalam Eukariota 61
 - DNA Eukariot Terorganisasi ke dalam Nukleosom 62
 - Virus-virus Hewan Merupakan Sistem Model untuk Ekspresi Gen pada Sel-sel Tingkat Tinggi 63
 - Virus-virus Tumor RNA Bereplikasi dengan Memakai DNA Perantara yang Beruntai Ganda 64
5. Metode-metode Pembuatan Molekul DNA Rekombinan 68
 - Pengembangan Metode-metode Pengurutan Asam Nukleat 68
 - Enzim Restriksi Membuat Rangkaian Spesifik pada DNA yang Terpotong-potong 69
 - Peta Restriksi adalah Sangat Spesifik 70
 - Fragmen-fragmen Restriksi Membawa ke Metode Baru yang Berkemampuan Tinggi untuk Menyusun Rangkaian DNA 72
 - Oligonukleotida dapat Disintesis secara Kimia 75
 - Eco* RI Menghasilkan Fragmen-fragmen yang Mengandung Ujung-ujung yang Lekat (Kohesif) 76
 - Banyak Enzim yang Terlibat dalam Replikasi DNA 76
 - Ujung-ujung yang Lekat Dapat Ditambahkan secara Enzimatis pada Molekul-molekul DNA yang Berujung Tumpul 77
 - Plasmid Kecil Merupakan Vektor bagi Pengklonan Gen-gen Asing 78
 - DNA dari Organisme Tingkat Tinggi Menjadi Terbuka untuk Analisis Molekular 80
 - Para Ilmuwan Menyatakan Kekhawatiran Mereka Mengenai Bahaya dari Pengklonan Gen yang Tidak Dapat Direstriksi 81
 - Pedoman-pedoman untuk Meneliti DNA Rekombinan Diusulkan di Konferensi Asilomar 81
6. Isolasi Gen-gen Klon 85
 - Bakteri "Aman" dan Vektor-vektor Plasmid Telah Dikembangkan 85
 - Mengapa Menggunakan Plasmid-plasmid yang Resisten terhadap Obat-obatan? 86
 - Alat-alat Peneliti untuk Gen-gen Klon 87
 - Sintesis dan Pengklonan cDNA 87
 - Mengidentifikasi Klon-klon cDNA Spesifik 90
 - Fragmen-fragmen Genom Diklonkan pada Bakteriofag λ 91
 - Kosmid Memungkinkan Pengklonan Segmen-segmen DNA Asing yang Lebih Besar 93
 - Kromosom Berjalan Digunakan untuk Menganalisis Potongan-potongan Panjang

- DNA Eukariot 94
- Pengklonan DNA dalam Fag M13 Mempercepat Perangkaian Sanger 95
- Pembercakan (Blotting) Southern dan Northern 98
- Mengembangkan Prosedur Pengklonan Gen yang Mengkode Protein-protein
Langka 99
- Penyaringan Perpustakaan Gen dengan Alat Peneliti Oligonukleotida 100
- Komputer Membandingkan Golongan cDNA 100
- Vektor-vektor Ekspresi Dapat Digunakan untuk Mengisolasi cDNA Eukariot yang
Spesifik 101
- Penyaringan Imunologis untuk Produk-produk Vektor Ekspresi 103
- 7. Kerumitan yang Tak Diharapkan dari Gen-gen Eukariot 107
 - Gen-gen Pembelahan telah Ditemukan 107
 - Rangkaian-rangkaian Basa Spesifik Ditemukan pada Perbatasan Intron—Exon 109
 - Penemuan Penyambungan yang Autonom 110
 - Perangkaian Lengkap dari Gen-gen Mammalia Pertama 111
 - Kerangka Pembacaan Terbuka pada DNA Melukiskan Daerah-daerah Pengkode
Protein 112
 - Rangkaian-rangkaian Penuntun pada Ujung-ujung Terminal-NH₂ dari Pengeluaran
Sekret Protein 113
 - Kadang-kadang Intron Menandai Daerah-daerah Protein Fungsional 113
 - Alternatif Lintasan Penyambungan Menghasilkan Berbagai mRNA dari Suatu Gen
Tunggal 114
 - Daerah-daerah Pengendali Terdapat pada Ujung Gen 5' dan 3' 115
 - Pengelompokan Suku-suku Gen Dapat Meliputi Peninggalan-peninggalan Evolusi
(Relik) yang Rudimenter 116
 - Suku-suku Gen Dapat Diperluas Melalui Transkripsi Balik Molekul-molekul
mRNA 117
 - DNA Eukariot Mengandung Rangkaian Berulang yang Terdapat Secara Berhambur-
an 118
 - Prekursor-prekursor Polipeptida Melahirkan Protein Hormon 119
- 8. Mutagenesis *In Vitro* 124
 - Penghapusan (Deletions) 124
 - Penyerapan (Penyisipan) 127
 - Substitusi: Deaminasi Sitosin 128
 - Substitusi: Penyerapan (Incorporation) Analog-analog Nukleotida 130
 - Substitusi: Salah Penyerapan Nukleotida 130
 - Mutan-mutan Dapat Dibuat Melalui Penggunaan Oligonukleotida dengan Rangkaian
Tertentu 130
- 9. Penyusunan Kembali Segmen-segmen DNA Galur Nutfah untuk Membentuk Gen-gen
Antibodi 137
 - Penetapan Struktur Dasar Molekul Antibodi 137
 - Diusulkan Gen-gen Tersendiri untuk Segmen-segmen V dan C 138
 - Alat-alat Peneliti RNA Messenger (mRNA) Digunakan untuk Mendapatkan Penun-
jang bagi Penyambungan Gen-gen V dan C 138
 - Gen-gen Antibodi Fungsional Diisolasikan dari Sel-sel Myeloma 139
 - Sel-sel Embrio Merupakan Sumber Gen-gen V dan C yang Tak Tersambung 139
 - Segmen-segmen Ganda J (Bersambungan) Melekat pada Segmen-segmen Genom C
(Konstan) 140

- Tiga Daerah yang Diskontinu dari Kode DNA untuk Asam-asam Amino Rantai Berat 141
- Peristiwa Eliminasi (Pembuangan) DNA Memungkinkan suatu Gen V_H Agar Terikat pada Dua Gen C_H yang Berbeda 141
- Alternatif Penyambungan Memungkinkan Sel-sel Tunggal untuk Membuat Rantai-rantai Berat Kelas μ dan δ dengan Segmen-segmen V_H yang Identik 142
- Mutasi-mutasi Somatik Merupakan Sumber Keanekaragaman Imunoglobulin Lebih Lanjut 143
- Menetapkan Gen Protein Kompleks Histokompatibilitas Utama (MHC) dan Antibodi-antibodi Protein Mereka Melalui Pengklonan Gen 144

10. Virus-virus Tumor 148

- Pengklonan Bentuk-bentuk Terintegrasi dari Virus-virus Tumor DNA 149
- Protein-protein Tumor SV40 dan Polyoma 149
- Kode Gen yang Tumpang Tindih untuk Protein Struktural yang Mengelilingi Kromatin SV40 dan Polyoma 151
- Berbagai Sinyal Pengendali untuk Memulai (Inisiasi) Sintesis mRNA Awal dan Akhir dari SV40 dan Polyoma 151
- Daerah yang Mendekati 100 Pasangan Basa Meliputi Sumber Replikasi DNA SV40 Organisasi Virus Tumor (Retrovirus) RNA yang Rumit 154
- Retrovirus yang Sangat Onkogenik Mengandung Rangkaian Onkogen Khusus 154
- Provirus Memelihara Susunan Gen yang Sama dengan Genom RNA 154
- Promotor Sintesis RNA Terletak di dalam LTR 155
- Onkogen Retrovirus Sering Mengkode Protein Kinase 156
- Gen-gen Selular Normal Merupakan Nenek Moyang Onkogen Retrovirus 157
- Penentuan Apakah Onkogenesis Retrovirus Diakibatkan oleh Ekspresi Berlebihan atau Ekspresi Salah dari Gen-gen Sel Normal 157
- Perangsangan Kanker oleh Retrovirus Onkogen yang Lemah 158
- Teori Umum untuk Perangsangan Kanker 158

11. Gen-gen yang Dapat Bergerak

- Gerakan Transposon Meliputi Pembuatan Suatu Transposon Anak Baru 164
- Unsur-unsur Genetik yang Mobil Mungkin Merupakan Sifat Umum dari Semua Organisme 165
- Menggunakan Unsur-unsur Mobil untuk Rekayasa Genetik Embrio-embrio *Drosophila* 166
- Isolasi Unsur Ds yang Dapat Ditransposisi dari Jagung 168
- Apakah Genom-genom Virus Tumor RNA Berkembang dari Unsur-unsur Genetik yang Mobil? 169
- Apakah Secara Fungsional Terdapat Dua Kelas Transposon yang Berbeda? 169
- Perubahan-perubahan Seks pada Ragi Melalui Penggantian Gen: Model Kaset 170
- Perubahan Antigen pada *Trypanosoma* Melalui Pergantian Gen 170
- Perubahan Antigen pada *Neisseria gonorrhoeae* Melalui Penyusunan Kembali Gen-nya 173

12. Introduksi DNA ke dalam Sel-sel Ragi yang Terkendali Secara Eksperimen 177

- Sferoplas Ragi Menyerap DNA yang Ditambahkan dari Luar 178
- Ekspresi Gen-gen Ragi dalam *E. Coli* 178
- Vektor Ulang-Alik (Shuttle Vectors) 178
- Ragi Juga Mengandung Plasmid 179
- Meningkatkan Efisiensi Transformasi Melalui Penambahan Sumber Replikasi 179
- Menstabilkan Plasmid-plasmid Ragi dengan DNA Sentromer Ragi 180

Lingkar Tusuk Konde pada Ujung-ujung (Telomer) Kromosom Ragi	187
Integrasi Terarah dari DNA Klon ke dalam Kromosom Ragi	184
Vektor-vektor Pemulih (Retriever Vectors)	185
Organisasi Gen	187
Pengaturan Ekspresi Gen pada Ragi	187

13. Rekayasa Genetik Tumbuh-tumbuhan dengan Menggunakan Plasmid-plasmid Crown Gall 191

Metodologi Pemuliaan Tumbuhan yang Konvensional	191
Sel-sel Tumbuhan dalam Kultur	191
Rediferensiasi Tumbuhan yang Utuh dari Kultur Sel-sel Tumbuhan	192
Protoplas Tumbuhan Dapat Meregenerasi Tumbuhan yang Utuh	192
Membuat Tanaman Hibrida dengan Fusi Protoplas	192
Rekayasa Genetik pada Tanaman	195
Tumor-tumor Crown Gall (Bisul Mahkota)	
Plasmid-plasmid Perangsang Tumor (Plasmid-plasmid Ti)	196
Mutan-mutan Plasmid Ti	196
Integrasi DNA T ke dalam Kromosom Tanaman	197
Apakah DNA T itu suatu Transposon?	197
Pewarisan Sifat DNA T Menurut Mendel	198
Plasmid DNA Ti dapat Digunakan Sebagai Vektor	198
Transformasi Sel-sel Tanaman dan Protoplas	198
Mobilisasi DNA T oleh Segmen <i>vir</i> dari Plasmid Ti	200
Vektor-vektor DNA T yang Diperlukan Memungkinkan Regenerasi Tanaman yang Utuh dari Sel-sel Tunggal	200
Penyerapan DNA T Dapat Digunakan untuk Mengisolasi Gen-gen Tanaman	201
Peranan Praktis dari Rekayasa Tanaman dengan Menggunakan Plasmid Ti	202

14. Pemindahan Gen ke dalam Sel-sel Mammalia 205

Ca ⁺⁺ Merangsang Penyerapan DNA oleh Sel-sel Vertebrata	205
Timidin kinase (Tk) Berperan sebagai Prototip Marker Selektif untuk Percobaan-percobaan Transfeksi	206
Marker-marker yang Beraksi-Dominan untuk Transformasi Sel-sel Normal	206
Kotransformasi Setelah Pengikatan Intraselular	208
Mikroinjeksi DNA ke dalam Sel-sel Mammalia	208
Penurunan Semistabil dari DNA Bermetil yang Ditransfeksi	209
Isolasi Gen-gen yang Dipindahkan	210
Pengaturan Setelah Gen Dipindahkan	213
Menentukan Eksistensi Gen Kanker Manusia yang Spesifik Melalui Percobaan-percobaan Pemindahan DNA	214
Pengklonan Onkogen Manusia	215

15. Vektor-vektor Virus 220

Vektor-vektor SV40	220
Virion-virion SV40 sebagai Vektor	221
Penggantian Daerah Akhir SV40	221
Penggantian Daerah Awal SV40	221
Analisis Gen-gen Antigen Permukaan yang Diklon	221
Replikasi DNA yang Menyerupai Plasmid di dalam Sel-sel COS	224
Bantuan (Rescue) DNA SV40 yang Berintegrasi Melalui Fusi Sel COS	225

Struktur Insulin Manusia	269
"Gen-gen" Insulin Sintetik	270
cDNA Proinsulin	271
Bakteri yang Mensekresi Proinsulin	272
Pengklonan Hormon Pertumbuhan Manusia	272
Membuat "Gen" Hormon Pertumbuhan	273
Masalah Metionin	273
Berbagai Tipe Interferon	274
Ekspresi Tingkat Tinggi Interferon α Manusia dalam <i>E. Coli</i>	276
Pengklonan Interferon γ (Imun)	276
Protein-protein Virus untuk Vaksin	277
Pengklonan Virus Kuku dan Mulut	277
Vaksin-vaksin Peptida Sintetik	277
Vaksin-vaksin untuk Virus Hepatitis B Manusia	278
Antigen Hepatitis B dengan Pengklonan Gen	278
Riwayat DNA Rekombinan	281
LAMPIRAN A Enzim-enzim Restriksi	287
LAMPIRAN B Lain-lain Enzim yang Digunakan pada Penelitian DNA Rekombinan	293
Indeks	294