



**STIKES NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**

BIOLOGI MOLEKULER

Pertemuan 10

CLONING DAN APLIKASI CLONING DNA

Desi Novita R

Cloning

Kloning Dari Bahasa Yunani yaitu- klon yang berarti tunas muda. Kumpulan turunan suatu individu yang dihasilkan tanpa melalui perkawinan; kumpulan replika sebagian atau seluruh makromolekul (contoh, DNA atau antibodi).

Suatu individu yang tumbuh dari satu sel somatik induknya serta memiliki identitas genetik yang sama dengan induknya.

Klon: Koleksi molekul atau sel yang semua identitasnya sama dengan molekul atau sel penurunnya



Tujuan Cloning

Menentukan urutan basa nukleotida penyusun gen tersebut

Menganalisis atau mengidentifikasi urutan basa nukleotida pengendali gen tersebut

Mempelajari fungsi RNA / protein/enzim yang disandi gen tersebut

Mengidentifikasi mutasi yang terjadi pada kecacatan gen yang mengakibatkan penyakit bawaan.

Merekayasa organisme untuk tujuan tertentu, misalnya memproduksi insulin, ketahanan terhadap hama, dll.

Tahapan Cloning

1. **Menyiapkan DNA yang akan di'klon'**
2. **Memotong DNA yang akan di'klon' dan plasmid pembawa menggunakan enzim endonuklease restriksi**
3. **Menyambung DNA yang akan di'klon' dan plasmid pembawa (Ligasi)**
4. **Pemindahan DNA ke dalam sel inang (Transformasi)**
5. **Penumbuhan sel inang**

Bahan yang digunakan dalam Cloning

DNA

Enzim restriksi

Enzim ligase

Vektors

Inang (*Host*)

Metoda untuk memasukkan DNA ke dalam sel inang

Sumber DNA

- DNA kromosom
- cDNA (complementary DNA) yang disintesis menggunakan mRNA sebagai cetakan (template)
- DNA yang dihasilkan dari perbanyakan menggunakan PCR

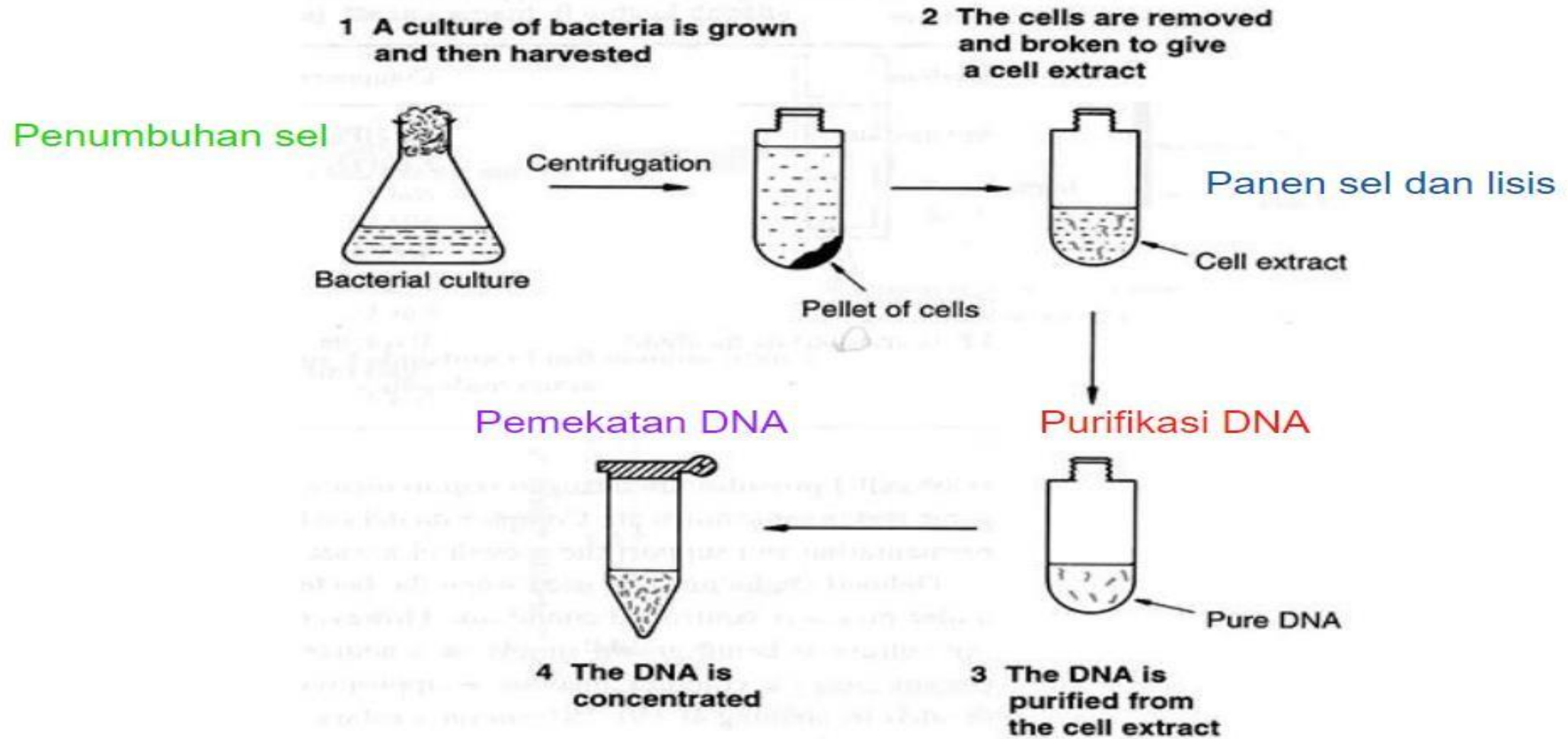


ISOLASI KARAKTERISASI DNA

1. Isolasi dan Pemurnian DNA meliputi :

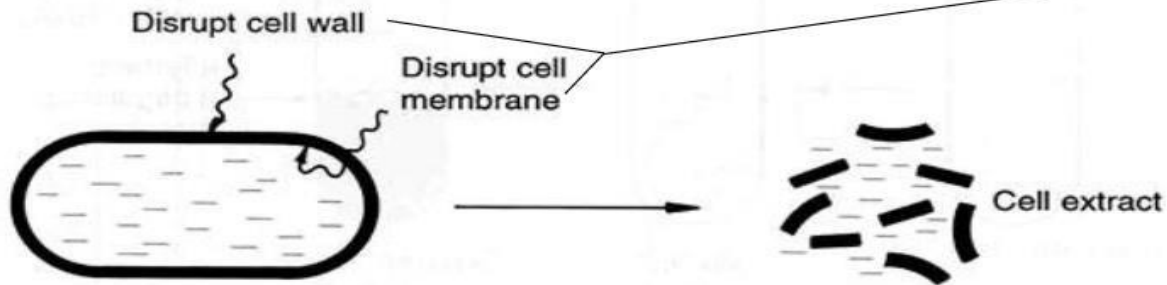
- sumber DNA (*mikroba, virus, tumbuhan, hewan dsb*)
- pemecahan sel
- pemisahan (*DNA inti dari DNA mitokondria*)
- pengendapan DNA
- pemurnian (elektroforesis)

Sistematika ekstraksi dan purifikasi DNA



Ekstraksi sel

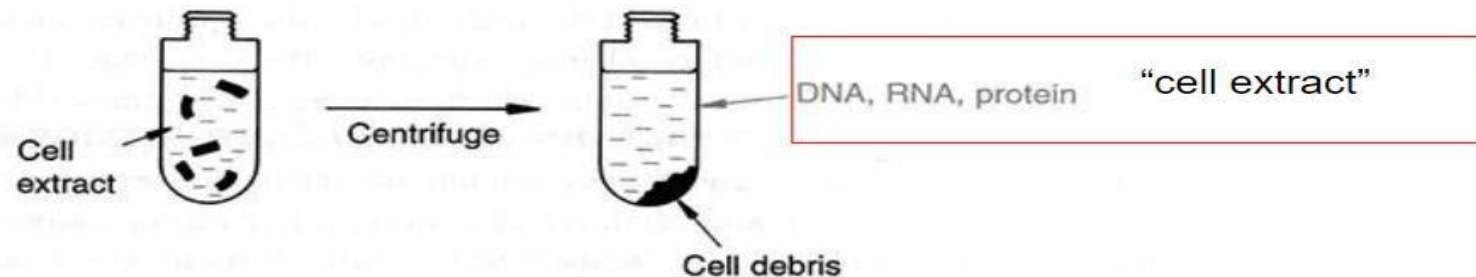
(a) Cell lysis



Butuh reagen LYSIS

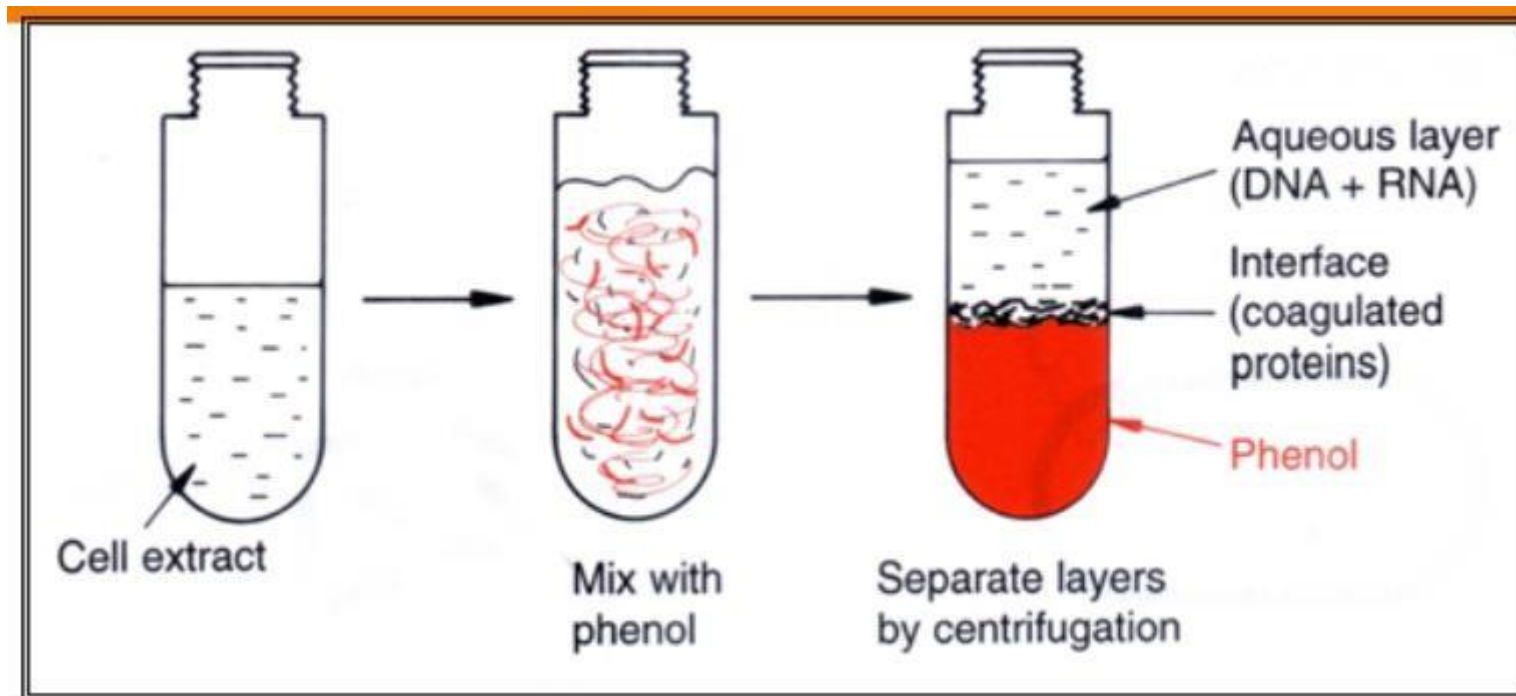
- detergen
- Buffer
- enzim protease
- panas

(b) Centrifugation to remove cell debris



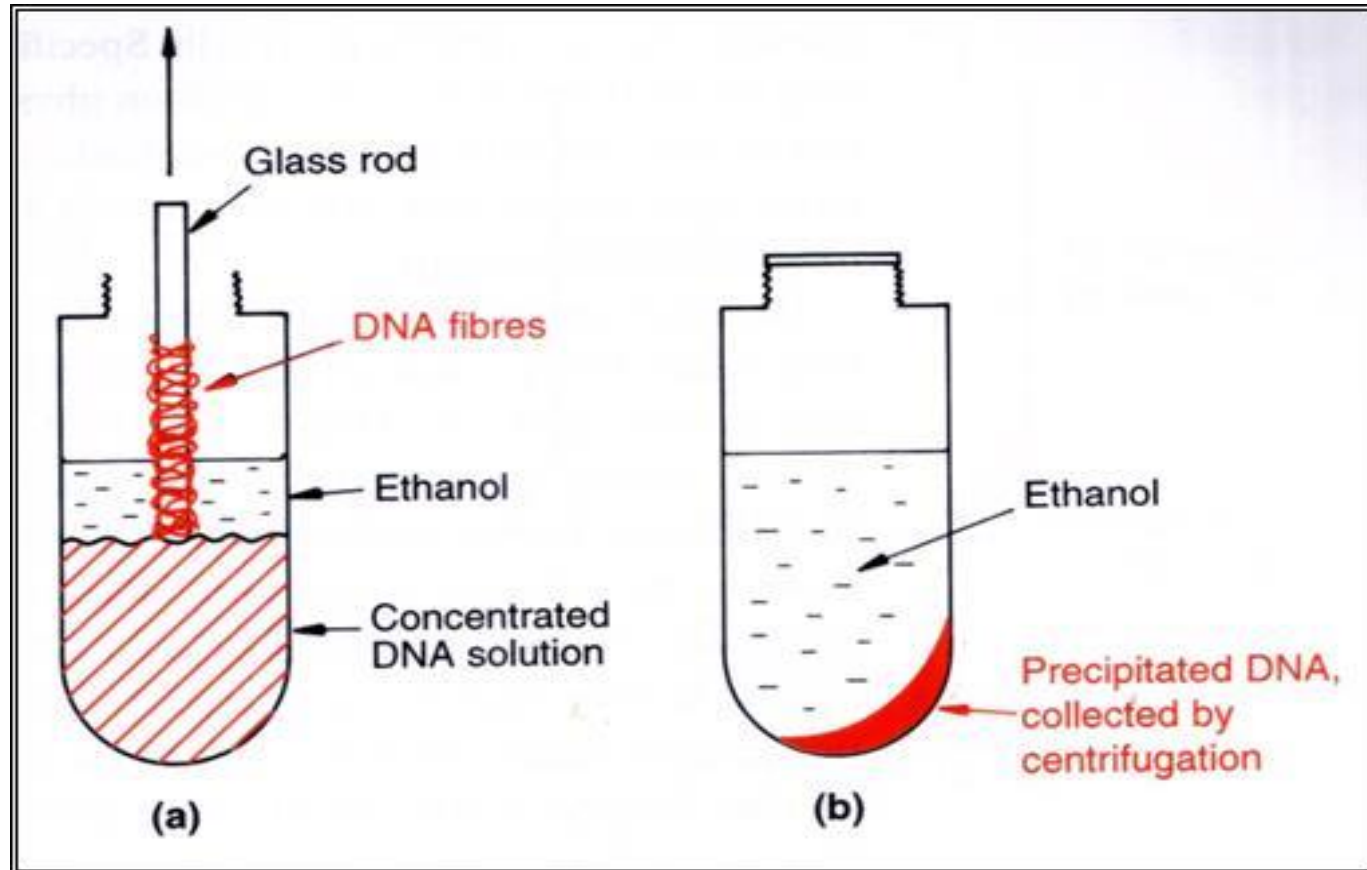
Deterjen : menangkap lemak dan protein pada dinding sel
Enzim protease /Proteinase K (opsional) : menghilangkan nuclear protein dan enzim, serta memecah ikatan peptide
Panas : denaturasi pada suhu 40 –60 °C
Buffer : Tris HCl pH 8 untuk menjaga stabilitas DNA

Penghilangan Protein dan RNA



1. Penambahan fenol secara perlahan
2. Penambahan Rnase

Pemekatan konsentrasi DNA

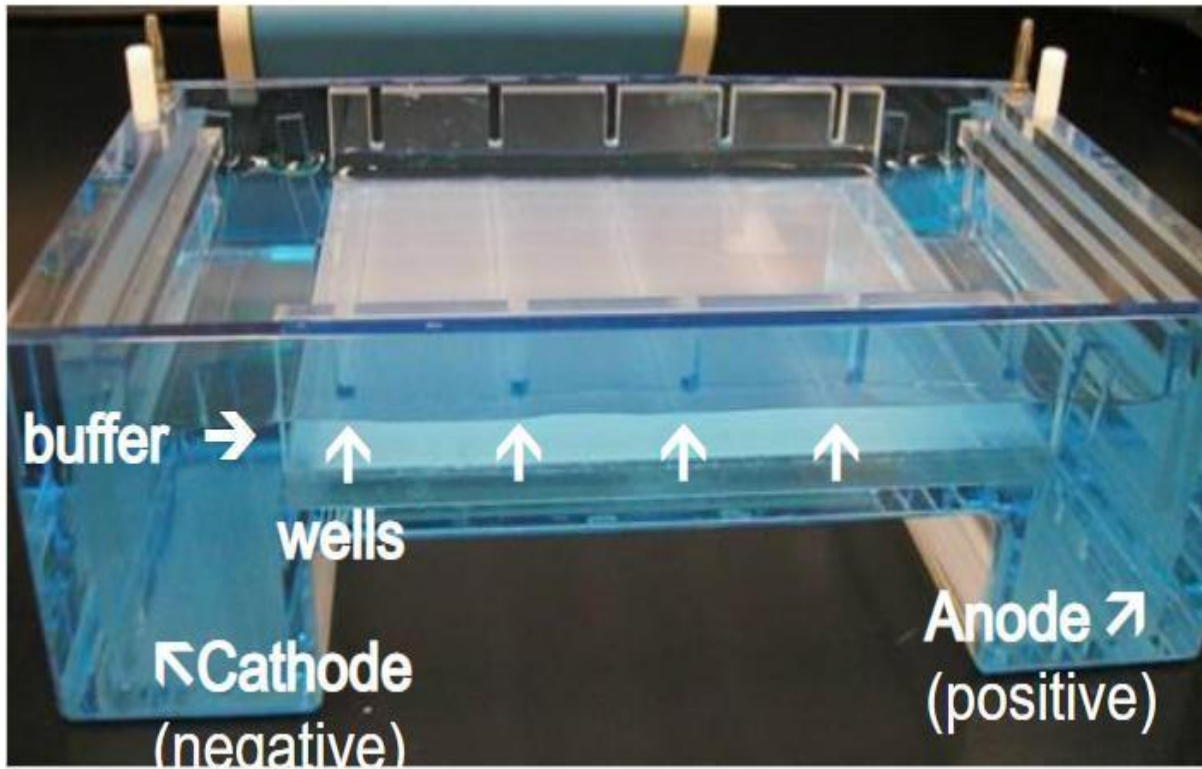


ISOLASI KARAKTERISASI DNA

2.Karakterisasi

- Elektroforesis (gel agarosa atau gel poliakrilamid)
- Kuantisasi / amplifikasi DNA
- *Southern Blotting, Northern Blotting*

Elektroforesis

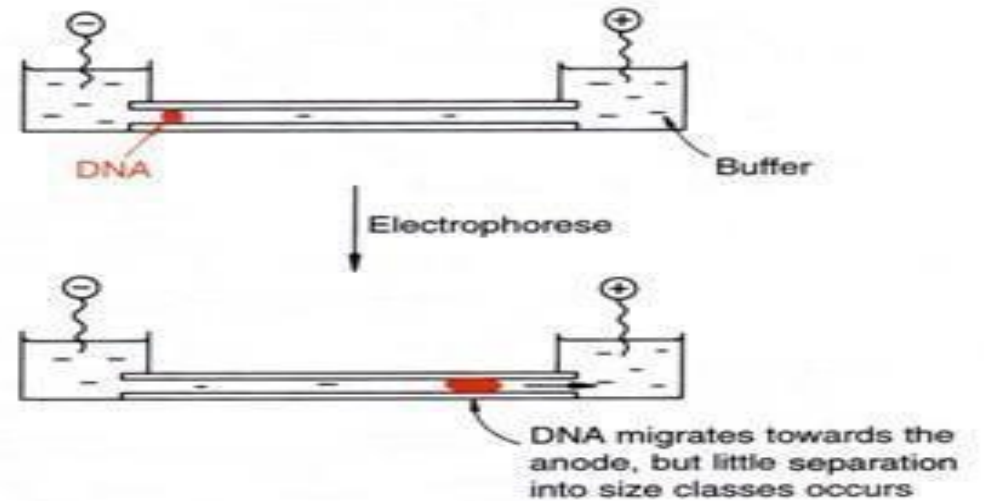


- **Elektroforesis** adalah memisahkan molekul-molekul bermuatan listrik berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan muatan listriknya
- Memanfaatkan muatan negatif pada DNA atau protein
- Secara umum, elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA.
- Gel yang biasa digunakan adalah agarosa dan poliakrilamid.
- Gel agarosa digunakan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (pb), sedangkan gel poliakrilamid digunakan untuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil.

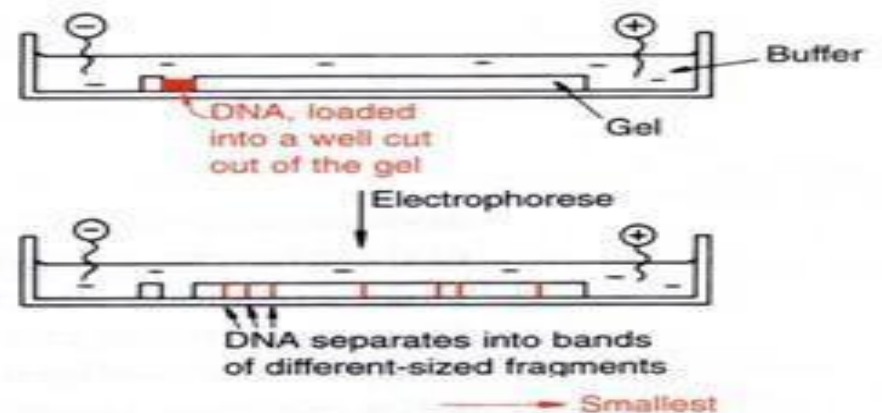
Elektroforesis

- Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anode). Makin besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya.

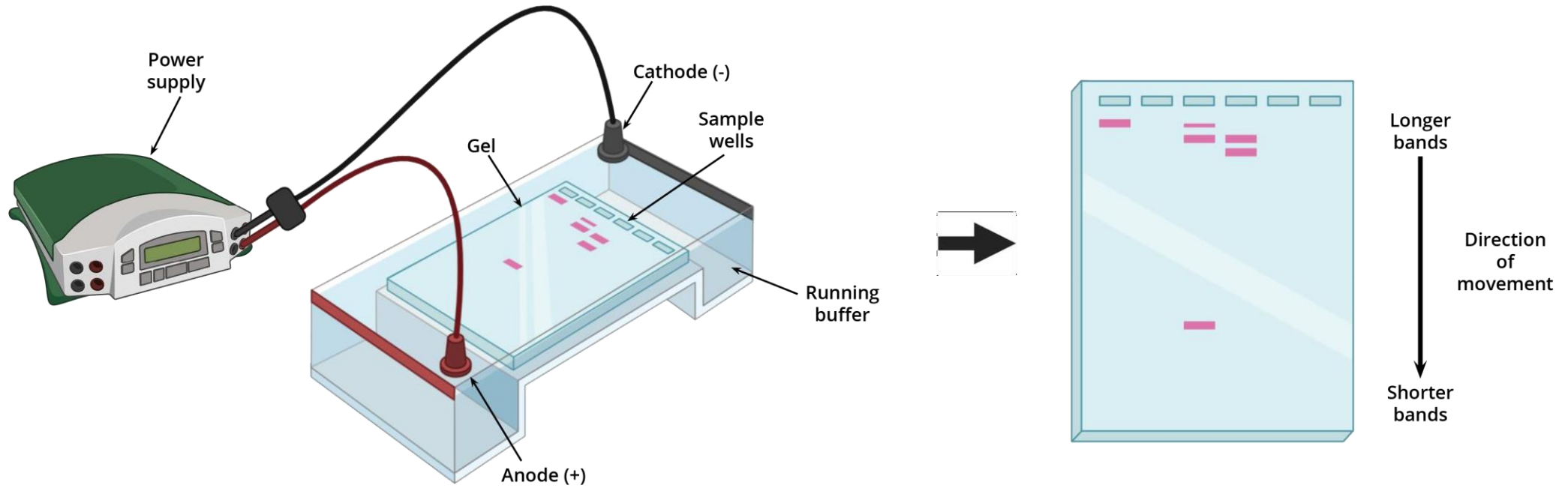
(a) Standard electrophoresis



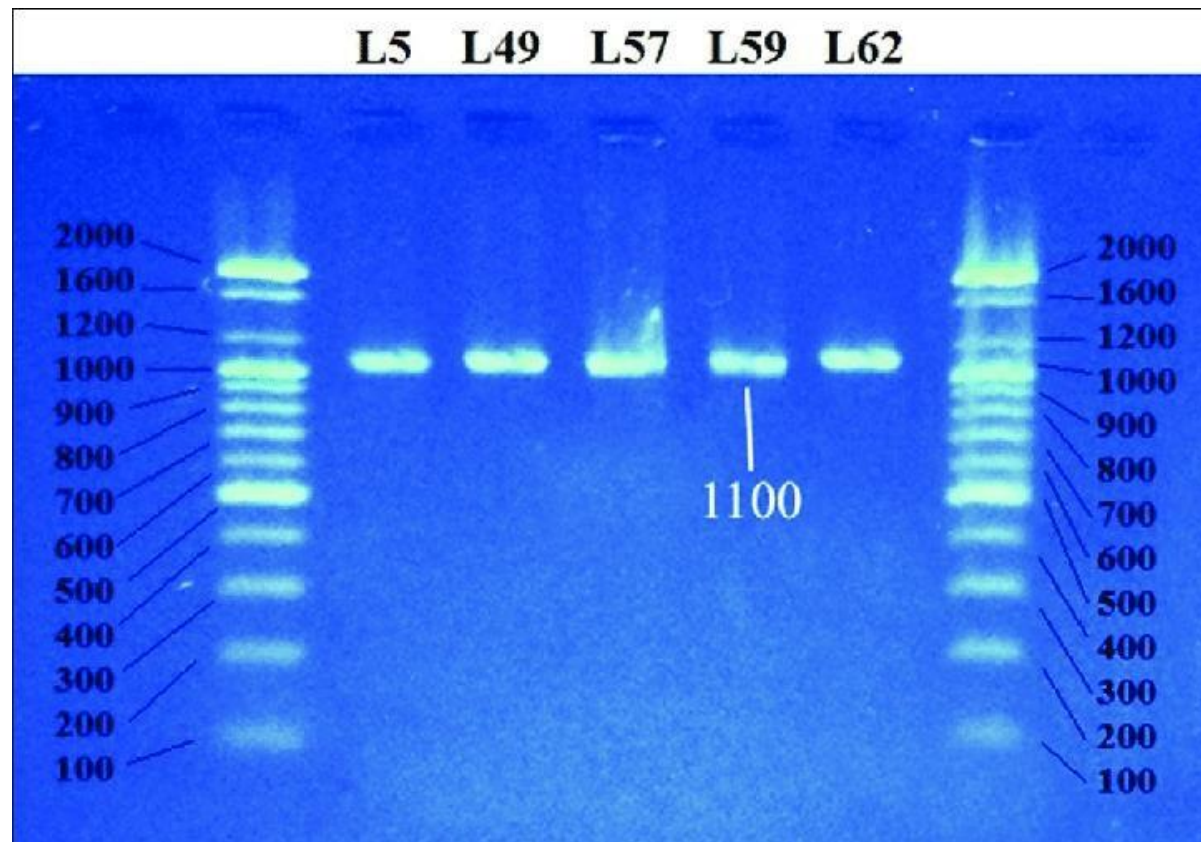
(b) Gel electrophoresis



Elektroforesis

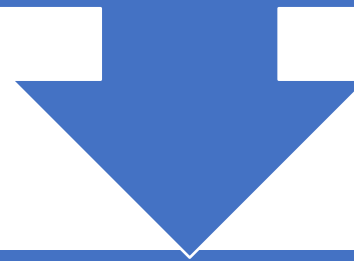


Elektroforesis



Blot/Blotting

Teknik memindahkan atau mentransfer DNA, RNA, atau protein ke lembaran tipis atau matriks membran. Teknik ini berupa lanjutan dari penggunaan elektroforesis gel.



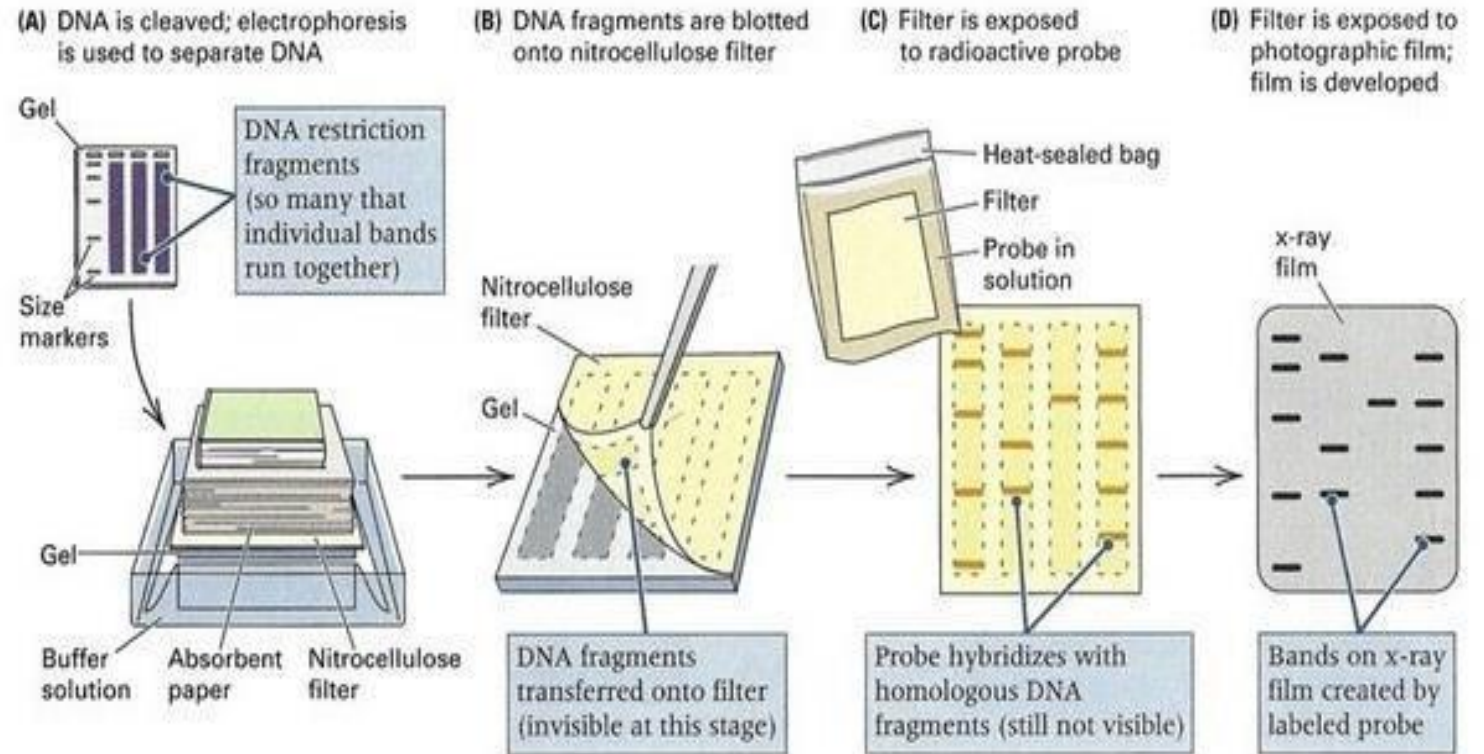
Berdasarkan Tipenya, terdiri atas :

Southern Blotting
(DNA)

Northern Blotting
(RNA)

Southern Blotting (DNA)

Sebuah metode yang sering digunakan dalam bidang Biologi Molekular untuk menguji keberadaan dari suatu sekuen DNA dalam suatu sampel DNA



Memasukkan DNA rekombinan ke Sel Inang

