

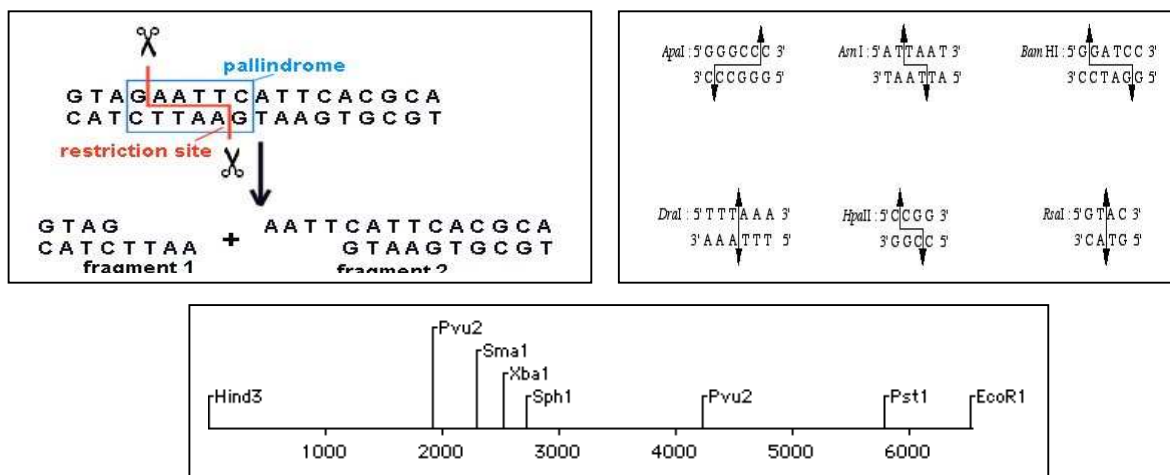
Enzim restriksi

Diah Kusumawaty, M.Si
MK: Praktikum Biologi Molekul
Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI

Pendahuluan

Perkembangan teknologi DNA rekombinan sangat dimungkinkan karena penemuan enzim yang dapat memotong molekul DNA pada lokas-lokasi yang spesifik yang jumlahnya terbatas. Enzim-enzim tersebut dikenal sebagai enzim restriksi yang ditemukan pertama kali pada bakteri pada akhir tahun 1960-an. Kerja enzim tersebut dalam tubuh inangnya adalah mengenali dan memotong DNA (termasuk DNA faga tertentu) yang asing bagi bakteri tersebut. Maksud dari kegiatan memotong DNA asing tersebut tidak lain sebagai mekanisme perlindungan bakteri terhadap DNA yang menyelip dari organisme lain seperti virus atau sel bakteri lain. Enzim-enzim ini bekerja dengan memotong-motong DNA pada lokasi-lokasi yang spesifik- mengenali daerah atau urutan DNA pendek dalam molekul DNA dimana urutan DNA yang dikenali tersebut bersifat PALINDROME. Selanjutnya enzim tersebut akan memotong DNA pada titik tertentu di dalam urutan DNA tersebut. Sel bakteri ini melindungi DNA-nya sendiri dari restriksi dengan menambahkan gugus metil (CH₃) pada adenine atau sitosin di dalam urutan yang dikenali oleh enzim restriksi tersebut. Enzim-enzim restriksi yang telah ditemukan dan telah tersedia secara komersial telah berjumlah ratusan.

Hasil pemotongan enzim restriksi ada dua jenis. Hasil pemotongan yang menghasilkan ujung tumpul atau "Blunt end" dan hasil pemotongan yang menghasilkan ujung lancip/ lengket atau "sticky end". Dengan memanfaatkan kerja enzim kita dapat membuat peta restriksi dari suatu molekul DNA. Dalam praktikum ini akan dilakukan pemetaan restriksi sederhana pada plasmid pGemT dengan menggunakan beberapa jenis enzim restriksi.



Gambar Peta Restriksi

Bahan dan Alat

Bahan

1. Plasmid pGemT tanpa sisipan (hasil isolasi dari koloni Biru)
2. Plasmid pGemT dengan sisipan (hasil isolasi dari koloni putih)
3. Enzim Eco RI
4. Enzim EcoRV
5. enzim Alw 441
6. Enzim Pvu II
7. Bufer enzim untuk masing-masing enzim
8. Air deion steril
9. es batu

Alat

1. Waterbath 37°C
2. tabung PCR 0.2 ml baru dan steril
3. tips putih, dan kuning baru dan steril
4. tabung 1.5 baru dan steril
5. Mikropipet
6. vorteks.

Cara kerja

1. Buatlah reaksi campuran untuk pemetaan restriksi dan cek sisipan DNA. Karena keterbatasan alat dan bahan maka hanya dibuat masing-masing 1 mix reaksi untuk satu kelas. Komponen reaksi seperti yang tertera pada tabel 1 dan 2 di bawah ini.
2. Inkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 1 jam
3. Setelah inkubasi selesai tambahkan kedalam masing-masing tabung reaksi 4 µl loading Dye. Kemudian homogenkan.
4. Elektroforesis semua hasil sesuai urutan yang tertera pada tabel 3 pada voltase 100V selama 1-1.5 jam
5. Dokumentasikan hasil praktikum dengan baik

Tabel 1. Komponen reaksi untuk cek sisipan DNA

Komponen	Jumlah 1 x reaksi	Reaksi campuran (tergantung jumlah kelompok)
DNA plasmid dari koloni putih	2 µl	
Enzim Eco RI	1 µl	
Buffer EcoRI	1 µl	
Air Deion	6 µl	
Total volume	10 µl	

Tabel 2. Komponen reaksi untuk Pemetaan restriksi

Komponen Reaksi	Reaksi				
	P1	P2	P3	P4	P5
DNA Plasmid tanpa sisipan	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Enzim EcoRV	1 µl			1 µl	-
Buffer EcoRV	1 µl			1 µl	-
Enzim PvuII		1 µl		1 µl	-
Buffer PvuII		1 µl		1 µl	-
Enzim Alw441			1 µl	1 µl	-
Buffer Alw441			1 µl	1 µl	-
Air deion steril	6 µl	6 µl	6 µl	2 µl	8 µl
Total volume	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabel 3. Komponen reaksi untuk elektroforesis

Komponen (satuan µl)	SUMUR															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
sumur																
Plasmid yang dipotong (kelompok)			1	2	3	4	5a	5b	6	7	8	P1	P2	P3	P4	P5
Plasmid yang tidak dipotong dari plasmid berisi DNA sisipan		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Air deion		8														
Loading Dye		4														
DNA Lambda	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plasmid	-	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14