

Kloning dan Analisis Sekuens Promoter Gen eEF1A (*Eukaryotic Elongation Factor 1A*)
Tebu (*Saccharum officinarum*)

Mahasiswa:

Reza Ernawan

Pembimbing:

Dr. Sony Suhandono

Gelar:

Sarjana Sains (S.Si), Wisuda Maret 2008

Abstrak

eEF1A (*eukaryotic elongation factor 1A*) adalah protein yang dikode oleh famili gen, memiliki kelimpahan yang tinggi pada sel, serta berperan utama dalam menghantarkan aminoasil-tRNA ke sisi A ribosom selama tahapan elongasi pada translasi eukariot (Abbott dan Proud, 2004). Promoter gen eEF1A diduga memiliki tingkat ekspresi yang tinggi serta karakteristik ekspresi yang bervariasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning dan analisis sekuens promoter gen eEF1A tebu (*Saccharum officinarum*). Promoter gen eEF1A terlebih dahulu diisolasi dengan menggunakan metode *genome walking* yang dikembangkan oleh Siebert *et al.* (1995). Promoter kemudian diklon ke dalam vektor plasmid pGEM[®]-T Easy (Promega) dan ditransformasi ke dalam *Escherichia coli* galur DH5 α . Selanjutnya promoter disekuensing dengan menggunakan primer SP6 dan T7 (Macrogen, Inc.). Terdapat empat hasil *genome walking* berukuran 1045 pb (selanjutnya diberi nama *SoeEF1A3*), 1084 pb (*SoeEF1A4*), 1108 pb (*SoeEF1A6*), dan 610 pb (*SoeEF1A12*). Hasil penjajaran menggunakan BLASTN menunjukkan bahwa hanya *SoeEF1A3*, *SoeEF1A4*, dan *SoeEF1A12* yang merepresentasikan gen eEF1A *Saccharum officinarum*. Selanjutnya hasil penjajaran menggunakan data EST pada BLASTN menunjukkan bahwa hanya *SoeEF1A3* dan *SoeEF1A4* yang mengandung daerah promoter. *SoeEF1A3* dan *SoeEF1A4* berturut-turut memiliki homologi sebesar 94% dan 99% dengan SEF1 α (Yang *et al.*, 2003). Perbedaan yang terdapat diantara ketiganya adalah adanya 43 pb delesi, 1 pb insersi, dan 23 pb substitusi pada *SoeEF1A3* serta 3 pb delesi dan 8 pb substitusi pada *SoeEF1A4*. Sebagian perbedaan tersebut juga ditemukan pada sekuens F1 dan F2 hasil amplifikasi promoter gen eEF1A *Saccharum officinarum* dengan menggunakan primer spesifik gen. Hal tersebut mengindikasikan bahwa perbedaan tersebut benar terdapat pada genom dan bukan merupakan hasil dari kesalahan PCR atau kloning. Elemen promoter putatif yang ditemukan pada *SoeEF1A3* dan *SoeEF1A4* adalah TSS, TATA *box* (posisi -23 dari TSS), TELO *box* (-41), motif *Site Iib* (-62), CAAT *box* (-68), dan motif *Site Iia* (-72). Elemen promoter putatif yang hanya ditemukan pada *SoeEF1A4* adalah GARE (-170).

Kata Kunci: Tebu, Gen eEF1A, Promoter, *Genome Walking*

Cloning and Sequence Analysis of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) eEF1A (Eukaryotic Elongation Factor 1A) Gene Promoter

Student:

Reza Ernawan

Advisor:

Dr. Sony Suhandono

Degree:

Degree Sains (S.Si), Conferred March 2008

Abstract

eEF1A (eukaryotic elongation factor 1A) is an abundant-gene family encoded protein mainly responsible in delivering aminoacyl-tRNA to the A-site of the ribosome during elongation stage in eukaryotic translation (Abbott and Proud, 2004). eEF1A gene promoter is expected to have high expression level and various expression characters. The aim of this research is to do cloning and sequence analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum*) eEF1A gene promoter. eEF1A gene promoter was isolated using genome walking method developed by Siebert *et al.* (1995). The promoter was cloned into pGEM[®]-T Easy plasmid vector (Promega) and then was transformed into *Escherichia coli* strain DH5 α . The promoter then was sequenced using SP6 and T7 primer (Macrogen, Inc.). The genome walking resulted in four fragments with 1045 bp (named *SoeEF1A3*), 1084 bp (*SoeEF1A4*), 1108 bp (*SoeEF1A6*), and 610 bp (*SoeEF1A12*) in size. Alignment results using BLASTN showed that only *SoeEF1A3*, *SoeEF1A4*, and *SoeEF1A12* represented *Saccharum officinarum* eEF1A gene. Alignment results using BLASTN with EST database showed that only *SoeEF1A3* and *SoeEF1A4* contained the promoter region. *SoeEF1A3* and *SoeEF1A4* have 94% and 99% homology with SEF1 α (Yang *et al.*, 2003), respectively. The differences between the three of them were 43 bp deletions, 1 bp insertion, and 23 bp substitutions in *SoeEF1A3* and 3 bp deletions and 8 bp substitutions in *SoeEF1A4*. Some of these differences were also found in F1 and F2 sequences resulting from *Saccharum officinarum* eEF1A gene promoter amplification using gene-specific primers. It can be concluded that these differences really existed in the genome and were not artifacts of PCR or cloning. Putative promoter elements found in *SoeEF1A3* and *SoeEF1A4* were TSS, TATA box (position -23 from TSS), TELO box, Site Iib motif (-62), CAAT box (-68), and Site Iia motif (-72). Putative promoter element found only in *SoeEF1A4* was GARE (-170).

Key words:

Sugarcane, eEF1A Gene, Promoter, *Genome Walking*