

Konstruksi dan ekspresi transient promoter eEF1A dari tebu pada biji dan kecambah cabai (*Capsicum frutescens* L.)

Mahasiswa: Nadya Farah

Tesis (2009), Program Studi Magister Bioteknologi SITH, email: onad2k@yahoo.com

Pembimbing: Dr. Sony Suhandono

SITH-ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Gelar: Magister Sains (M.Si), Wisuda Juli 2009

Abstrak

Eukaryotic elongation factor-1A (eEF1A) merupakan faktor elongasi pada pemanjangan rantai polipeptida dalam sintesis protein eukariot dan memiliki kelimpahan yang tinggi dalam sel. Dua promoter gen eEF1A dari tebu (*Saccharum officinarum* L.) var PS861 yaitu *SoeEF1A3* (1045 pb) dan *SoeEF1A4* (1084 pb) telah dipindahkan dari konstruksi plasmid pGEM[®]-T Easy ke dalam pCAMBIA 1303 menggunakan enzim restriksi *Nco*I dan *Sac*I. Kedua promoter ini difusikan dengan gen pelapor GUS yang ada dalam pCAMBIA 1303 menggantikan promoter CaMV 35S. Kegiatan yang sama juga dilakukan terhadap promoter *F2* (900 pb) yang diamplifikasi dari promoter gen eEF1A tebu *SEF1a* (AF331849). Ketiga konstruksi plasmid yang dihasilkan, yaitu pCSoeEF1A3, pCSoeEF1A4 dan pCF2 kemudian dimasukkan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 untuk kemudian mentransformasi biji dan kecambah cabai (*Capsicum frutescens* L.). Sebagai pembanding, digunakan promoter CaMV 35S dalam pCAMBIA 1303 karena ekspresinya yang dikenal kuat dan konstitutif pada tanaman dikotil. Transformasi dengan metode vakum infiltrasi dilakukan terhadap biji dan kecambah cabai hasil imbibisi 0, 2 dan 4 hari. Ekspresi GUS diamati menggunakan pewarna histokimia yang menghasilkan warna biru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa promoter CaMV 35S menghasilkan ekspresi GUS yang relatif jelas terlihat pada bagian biji, radikula maupun hipokotil dengan persentase uji GUS positif > 90% untuk transformasi biji tanpa imbibisi dan imbibisi 2 hari, serta 20,43% untuk transformasi kecambah hasil imbibisi 4 hari. Berbeda dengan promoter CaMV 35S, ketiga promoter gen eEF1A menghasilkan ekspresi GUS yang hanya terlihat pada biji dan tidak terlihat pada bagian radikula maupun hipokotil kecambah. Persentase uji GUS positif untuk promoter *SoeEF1A3* adalah sebesar 4,95% untuk transformasi biji hasil imbibisi 2 hari dan vakum selama 10 menit, sementara untuk promoter *SoeEF1A4* adalah sebesar 9,80% untuk transformasi biji tanpa imbibisi dengan kondisi vakum selama 2 menit. Promoter *F2* menghasilkan persentase uji GUS positif sebesar 4,22% dan 10,78% berturut-turut untuk transformasi biji tanpa imbibisi dengan kondisi vakum selama 2 dan 5 menit. Berdasarkan uji ekspresi transien promoter yang dilakukan, terlihat bahwa promoter *SoeEF1A3*, *SoeEF1A4* dan *F2* memberikan hasil ekspresi yang berbeda dengan promoter CaMV 35S.

Kata kunci : promoter eEF1A tebu, transformasi cabai, uji ekspresi transien.

Construction and transient expression of eEF1A gene promoter from sugarcane in seeds and seedlings of chilli pepper (*Capsicum frutescens* L.)

Student: Nadya Farah

Thesis (2009), Master's program In Biotechnology, School of Life Sciences and Technology-ITB,
email: onad2k@yahoo.com

Advisors: Dr. Sony Suhandono

School of Life Sciences and Technology ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Degree: Magister Sains (M.Si), Conferred July 2009

Abstract

Eukaryotic elongation factor-1A (eEF1A) is an elongation factor in polypeptide chain elongation reaction in eukaryotic protein synthesis and is highly abundant in cytoplasmic cells. Two eEF1A gene promoters from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var PS861, which are *SoeEF1A3* (1045 bp) and *SoeEF1A4* (1084 bp), have been cloned into pCAMBIA 1303 using *NcoI* and *SacI* restriction enzymes. The two promoters were fused with GUS reporter gene and replaced the CaMV 35S promoter in pCAMBIA 1303. Same activity was conducted on *F2* promoter (900 bp) which was amplified from sugarcane eEF1A gene promoter *SEF1 α* (AF331849). The three plasmid constructs, which are pCSoeEF1A3, pCSoeEF1A4 and pCF2, were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 for further seeds and seedlings of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) transformation. As comparison, CaMV 35S promoter in pCAMBIA 1303 was used for its strong and constitutive expression in dicotyledonous plants. *Agrobacterium*-mediated transformation using vacuum infiltration method was conducted on seeds and seedlings which were imbibed for 0, 2 and 4 days. GUS expression was observed using histochemical assay that gives blue staining. The results showed that CaMV 35S promoter gave GUS expressions that were relatively clearly observable in seeds, radicles and hypocotyls with positive GUS percentages greater than 90% for transformation of seeds without imbibition and 2 days imbibition, and 20,43% for transformation of 4 days imbibed seedlings. As for the three eEF1A gene promoters, GUS expressions were only observed in seeds and not in radicles nor hypocotyls. *SoeEF1A3* promoter gave positive GUS percentage of 4,95% for transformation of 2 days imbibed seeds and 10 minutes vacuum infiltration, while *SoeEF1A4* promoter gave 9,80% positive GUS percentage for transformation of seeds without imbibition and 2 minutes vacuum infiltration. *F2* promoter gave positive GUS percentages of 4,22% and 10,78% for transformation of seeds without imbibition and vacuum infiltration for 2 and 5 minutes respectively. From the transient promoter expression assay, we observed that the *SoeEF1A3*, *SoeEF1A4* and *F2* promoters gave different expressions from the CaMV 35S promoter.

Keywords: sugarcane eEF1A promoter, chili pepper transformation, transient expression assay.