

**CONSTRUCTION OF SYNTHETIC BOVINE
GROWTH HORMONE GENE VIA POLYMERASE
CHAIN REACTION**

by

SURIANI BINTI MOHAMAD

**Thesis submitted in fulfilment of the
requirements for the degree
of Master of Science**

July 1997

PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia saya, Professor Madya Dr Mohd Nazalan Mohd Najimudin di atas segala dorongan dan tunjuk-ajar yang diberikan. Kepada penyelia bersama, Dr Mohd Razip Samian untuk segala teguran dan buah fikiran yang amat membina. Tidak lupa juga kepada Dr Kamaruzaman Mohamed dan Dr Liew Kon Wui kerana bermurah hati membenarkan saya mengguna kemudahan peralatan makmal.

Ucapan terima kasih ini juga ditujukan kepada sahabat-sahabat saya, Azawiyah Abd Hamid, Astimar Abd Aziz, Adam Malik, David Perera, Hadari Yusuf, Juanita Lourdes, Khoo Siew Ling, Shaharum Samsudin, Zakiroh Ahmad serta semua rakan-rakan dari makmal 237/414 di atas segala sumbangan yang diberikan. Istimewa sekali kepada Ibu, Kak Selina, adik-adik Tina, Tini, Yati dan abang Zact, dorongan dan doa kalian amat bermakna untuk diri ini.

KANDUNGAN

	Mukasurat
PENGHARGAAN	iii
KANDUNGAN	iv
DAFTAR JADUAL	viii
DAFTAR RAJAH	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
 BAB I : PENGENALAN	
1.1 Hormon Pertumbuhan	1
1.2 Peranan dan Kepentingan Hormon Pertumbuhan	2
1.3 Biosintesis Prekursor dan Struktur Primer Hormon Pertumbuhan	5
1.4 Struktur Primer Gen Hormon Pertumbuhan	8
1.5 Kaedah-kaedah Klasik dalam Penyediaan Hormon Pertumbuhan	9
1.6 Penjuruteraan serta Penghasilan Protein Hormon Pertumbuhan Mengguna Teknologi Rekombinan DNA	11
1.7 Penyediaan/Penyusunan Gen Berasaskan Tindakbalas Rantai Polimerase	13
1.8 Objektif Kajian	19
 BAB II : BAHAN DAN KAEDAH	
2.1 Kaedah Am	
2.1.1 Penentuan Ketumpatan Optik	21

2.1.2	Kaedah Pensterilan	21
2.1.3	Penyediaan Media	21
2.2	Enzim	22
2.3	Vektor dan Strain Bakteria yang Digunakan	23
2.4	Penghasilan Gen Sintetik	24
2.4.1	Sintesis Oligonukleotida Untuk Penjanaan Gen Sintetik	24
2.4.2	Pempolimeran Serta Amplifikasi Hujung-hujung Oligomer Komplementari	27
2.4.2.1	Sintesis Gen - Peringkat I	28
2.4.2.2	Sintesis Gen - Peringkat II	30
2.4.2.3	Sintesis Gen - Peringkat III	31
2.5	Pengklonan Fragmen Sintetik	
2.5.1	Penghadaman Fragmen Sintetik oleh Enzim-enzim Pembatasan	32
2.5.2	Penghadaman Vektor Pengklonan oleh Enzim-enzim Pembatasan	32
2.5.3	Pengligatan Fragmen Sintetik Terhadap kepada Vektor Pengklonan	32
2.5.4	Transformasi Strain <i>E. coli</i> JM109	
2.5.4.1	Penyediaan Sel Kompeten	33
2.5.4.2	Transformasi JM109 dengan Plasmid pKK223-3	33
2.5.4.3	Pemencilan Plasmid daripada Sel Transforman	34
2.5.5.	Transfeksi JM109 dengan M13mp18 dan M13mp19	35
2.5.6.	Penyediaan Stok DNA M13	36
2.5.6.1	Penyediaan DNA M13 Bentuk Replikatif	37
2.5.6.2	Penyediaan DNA M13 Tetali Tunggal	37
2.6.0	Penyelitan Semula Fragmen DNA yang Hilang daripada Gen Sintetik	38

2.6.1	Penjanaan Kembali Segmen yang dibawa oleh L2	38
2.6.2	Amplifikasi Segmen dari Kawasan U1 hingga L4	39
2.6.3	Pengklonan Fragmen Gen Sintetik yang telah Diperbaiki	40
2.7.0	Penyelitan Semula Segmen Terdelesi ke dalam pbGH δ 63	41
2.7.1	Pengekstrakan Fragmen DNA daripada Gel Agarosa	41
2.7.2	Pengligatan dan Pengklonan Gen Sintetik yang telah Diperbaiki	42
2.8.0	Penjukkan DNA Gen Sintetik	43
2.8.1	Templat	43
2.8.2	Primer	43
2.8.3	Penjukkan Mengikut Kaedah Tindakbalas Penamatan Rantai	44
2.8.4	Penjukkan 'Thermal'/Berkitar	44
2.9.0	Elektroforesis Gel Nyahasli	45
2.9.1	Penyediaan Gel Poliakrilamida	45
2.9.2	Larian Gel Elektroforesis	46
2.9.3	Autoradiografi Gel Penjukkan	46

BAB III : KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

3.0	Rekabentuk Gen Sintetik Hormon Pertumbuhan Bovin	48
3.1	Tindakbalas Rantai Polimerase Untuk Penyusunan Gen Sintetik	51
3.1.1	Sintesis Gen Peringkat I	54
3.1.2	Sintesis Gen Peringkat II	57
3.1.3	Sintesis Gen Peringkat III	62
3.2	Pengklonan dan Analisis Hasil Tindakbalas Rantai Polimerase	65
3.3	Penyelitan Semula Fragmen DNA yang Hilang daripada Gen Sintetik	70

3.4	Penyelitan Semula Segmen Terdelesi ke dalam Plasmid pbGH863	74
3.5	Penjukkan Fragmen <i>Eco RI/Hin DIII</i> Plasmid pbGH613	77
3.6	Analisis Jujukan Gen bGH Sintetik yang telah Dihasilkan	81
BAB IV : KESIMPULAN		87
BIBLIOGRAFI		89
LAMPIRAN		99

DAFTAR JADUAL**Mukasurat**

Jadual 2.1 : Jujukan oligonukleotida yang telah ditempahbuat khas untuk penjanaan gen hormon pertumbuhan bovin	25
Jadual 3.1 : Perubahan komposisi asid amino akibat daripada kesilapan penyebatian bes	82

DAFTAR RAJAH

	Mukasurat
Rajah 1.1 : Skema menunjukkan satu tinjauan menyeluruh ke atas mekanisme dan saling interaksi antara ketiga-tiga hormon utama yang tergolong dalam kaskada hormon pertumbuhan	2
Rajah 1.2 : Strategi menunjukkan 2 alternatif untuk penghasilan DNA dupleks	15
Rajah 1.3 : Penyejajaran dan penjanaan gen berasaskan tindakbalas rantai polimerase	18
Rajah 2.1 : Analisis oligonukleotida atas gel poliakrilamida ternyahasli	26
Rajah 2.2 : Strategi untuk penghasilan gen hormon pertumbuhan bovin	27
Rajah 3.1(a) : Skema penghasilan fragmen A hingga F	55
Rajah 3.1(b) : Hasil sintesis gen peringkat I	56
Rajah 3.2(a) : Skema penghasilan fragmen G	58
Rajah 3.2(b) : Skema penghasilan fragmen H	59
Rajah 3.2(c) : Hasil sintesis gen peringkat II	60
Rajah 3.3(a) : Skema untuk peringkat terakhir proses penyejajaran gen	63
Rajah 3.3(b) : Hasil sintesis gen peringkat III	64
Rajah 3.4 : Analisis tapak pembatasan enzim dalam plasmid pbGH δ 63	66
Rajah 3.5 : Jujukan yang hilang daripada binaan gen sintetik	68
Rajah 3.6(a) : Penyelitan semula jujukan DNA yang terdelesi ke dalam gen sintetik	71
Rajah 3.6(b) : Hasil penyejajaran semula kawasan U1-L4 gen bGH sintetik	72
Rajah 3.7(a) : Penggantian segmen <i>EcoRI/XhoI</i> dari pbGH δ 63 oleh segmen <i>EcoRI/XhoI</i> dari pBS245ex	75
Rajah 3.7(b) : Analisis tapak pembatasan enzim dalam plasmid pbGH613	76
Rajah 3.8 : Jujukan gen bGH sintetik yang telah dijana dan diklonkan	84

DAFTAR LAMPIRAN

	Mukasurat
Lampiran A : Peta pembatasan plasmid pKK233-3	99
Lampiran B : Peta pembatasan M13mp18	100
Lampiran C : Peta pembatasan fagmid pBluescript	101
Lampiran D : Gel poliakrilamida ternyahsli serta penimbal untuk penjujukan DNA	102
Lampiran E : Jujukan hormon pertumbuhan bovin	103
Lampiran F : Penentuan jujukan gen bGH sintetik	104

ABSTRAK

Dengan menggunakan kaedah Tindakbalas Rantai Polimerase (PCR), satu binaan gen sintetik bersaiz 643 pasangan bes (bp) telah berjaya disejajar dan dijanakan. Binaan gen sintetik ini membawa jujukan yang mengkodkan keseluruhan 190 asid amino polipeptida hormon pertumbuhan bovin (bGH) matang, tapak-tapak pembatasan enzim serta jujukan yang penting untuk proses transkripsi dan translasi prokariot. Gen tersebut telah dibina dalam tiga peringkat yang mana setiap peringkat memerlukan parameter PCR yang berlainan. Hasil pertama telah mengalami delesi yang mungkin disebabkan 'mispriming' oleh satu daripada oligonukleotida yang digunakan dan ini telah diperbaiki. Untuk melihat keberkesanan serta potensi kaedah ini digunakan bagi penjanaan gen, penjujukan telah dilakukan. Penjujukan ke atas gen sintetik yang akhirnya diperolehi menunjukkan kesilapan penyebatian bes berlaku pada 7 kedudukan. Jumlah ini mewakili kira-kira 1% daripada keseluruhan binaan sintetik .

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF SYNTHETIC BOVINE GROWTH HORMONE GENE VIA POLYMERASE CHAIN REACTION

A synthetic gene of 643 base pairs (bp) was successfully assembled and generated using the polymerase chain reaction (PCR). This synthetic construct carries the sequence coding for the 190 amino acids long mature bovine growth hormone (bGH) polypeptide, restriction enzyme sites and elements necessary for prokaryotic transcriptional and translational processes. The gene was assembled in three stages. Each stage needed different PCR parameters. The initial product contained deletions possibly caused by mispriming by one of the oligonucleotides and this was eventually repaired. To get an overview of the efficiency and potential of this technique for gene assembly and generation, the final product was sequenced. Seven nucleotide misincorporations were detected and this value represented about 1% of the synthetic construct.

PENGENALAN

1.1 Hormon Pertumbuhan

Perkembangan serta kadar pertumbuhan sesuatu organisma itu merupakan satu proses kompleks yang dipengaruhi oleh interaksi pelbagai hormon dengan faktor-faktor autokrin/parakrin, keadaan pemakanan, persekitarannya dan latar belakang genetik organisma tersebut. Walau bagaimanapun, sejauh manakah faktor-faktor ini akan memberi kesan ke atas perkembangan organisma tersebut akhirnya akan ditentukan pula oleh latar belakang genetik organisma. Maka tidak hairanlah sekiranya kajian tentang proses serta kadar pertumbuhan sesuatu organisma sering kali dikaitkan kepada satu kumpulan gen yang mengkodkan protein untuk kaskada hormon pertumbuhan (Godowski *et al.*, 1989; Rexroad *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1991).

Kaskada hormon pertumbuhan ini bermula di kawasan hipotalamus, kelenjar pituitari dan juga merangkumi hati seterusnya akan bertindak ke atas organ-organ periferai sasaran (Rajah 1). Antara senarai hormon yang termasuk dalam kaskada ini ialah somatostatin, somatoliberin dan somatotropin (Wolf *et al.*, 1991). Somatostatin berperanan untuk merencat perembesan hormon pertumbuhan manakala somatoliberin menggalak perembesan hormon pertumbuhan. Kedua-dua jenis hormon ini diekspresikan oleh sel-sel di kawasan hipotalamus.

Somatotropin atau lebih dikenali sebagai hormon pertumbuhan merupakan sejenis polipeptida yang dihasil serta dirembeskan oleh sel-sel somatotropik di bahagian anterior kelenjar pituitari. Ianya adalah satu rangkaian polipeptida ringkas yang terdiri daripada 190 atau 191 residu asid amino dan mempunyai berat molekul monomer antara 20,000 hingga 22,000 (Li dan Ash, 1953; Dellarcha *et al.*, 1966; Santome *et al.*, 1973).

1.2 Peranan dan Kepentingan Hormon Pertumbuhan

Hormon pertumbuhan memainkan peranan penting dalam pengawalan kadar pertumbuhan (Palmiter *et al.*, 1982) sesuatu organisma. Hormon ini merangsang perkembangan tulang, hati serta pelbagai tisu lain. Ianya boleh berinteraksi dengan reseptor-reseptor hormon pertumbuhan yang terdapat pada sel-sel adipos untuk menggalakkan proses lipolisis yang seterusnya akan membawa kepada peningkatan kandungan asid lemak bebas. Hormon pertumbuhan turut mempunyai interaksi dengan dinding vaskular dan ini membawa kepada pemecahan polisakarida ke bentuk yang lebih ringkas iaitu glukosa. Ia juga berinteraksi dengan reseptor yang hadir pada selaput sel organ hati, ginjal serta otot dan seterusnya membawa kepada pembebasan somatomedin ke dalam kitaran darah. Somatomedin bersifat mitogenik (merangsang pertumbuhan) untuk kebanyakan sel somatik dan amat penting untuk proses pembesaran / perkembangan organisma (Rajah 1.1).

Proses hipofisektomi (pembuangan kelenjar pituitari) yang telah dilakukan ke atas mencit juvana mengakibatkan pertumbuhan mencit tersebut terbantut. Bagaimanapun, setelah disuntik dengan hormon pertumbuhan, proses pembesaran diperhatikan kembali dalam mencit tadi (Salem, 1988). Hormon pertumbuhan yang disuntik ke dalam mencit dewasa pula didapati boleh mengaruh fenomena gergasi (Palmiter *et al.*, 1982; Wolf *et al.*, 1991). Hormon ini juga mempunyai implikasi besar ke atas manusia. Kewujudan golongan manusia kerdil misalnya disebabkan oleh kegagalan kilang kelenjar pituitari mereka menghasilkan hormon pertumbuhan yang mencukupi. Sekiranya masalah ini dikenalpasti semasa peringkat kanak-kanak lagi maka kadar pertumbuhan normal boleh dicapai jika kanak-kanak tersebut diberi suntikan hormon pertumbuhan (Raben, 1958).

Hormon pertumbuhan juga berperanan dalam pengawalan berbagai proses anabolik. Ia bertanggungjawab dalam pelbagai proses metabolik seperti proses metabolisme protein, lipid, nitrogen dan karbohidrat (Swislocki *et al.*, 1970; Pandian *et al.*, 1971; Kostyo dan Nutting, 1973; Goodman, 1978). Mencit yang telah menjalani hipopisektomi didapati gagal untuk mengawal paras kolesterol gizi mereka dan ini menyarankan bahawa sistem hepatic memerlukan hormon pertumbuhan untuk pengekspresian reseptor lipoprotein ketumpatan rendah (Rudling dan Angelin, 1993). Hormon pertumbuhan juga mempunyai pengaruh secara tidak langsung terhadap pertumbuhan kartilage serta tulang (Ohlsson *et al.*, 1992) dan ada kemungkinan ianya boleh berperanan dalam perawatan berbagai masalah kesihatan seperti kelecuman, keretakan tulang dan pendarahan ulser (Goeddel *et al.*, 1979a). Di dalam sektor penternakan pula hormon ini telah digunakan untuk meningkatkan penghasilan susu oleh lembu (Peel *et al.*, 1981; 1983).

Tindakan hormon pertumbuhan adalah spesies- spesifik yakni ia bergantung kepada spesies yang digunakan sebagai organisma ujian serta sumber daripada mana hormon tersebut diperolehi. Contoh yang baik boleh diperhatikan dalam kumpulan primate (termasuk manusia), yang mana hanya hormon pertumbuhan yang diperolehi daripada kumpulan primate sahaja yang aktif ke atas kumpulan ini. Namun begitu, hormon pertumbuhan manusia boleh merangsang pertumbuhan dalam kumpulan bukan primat. Pemerhatian sebegini penting dalam bidang perubatan memandangkan hormon pertumbuhan banyak digunakan untuk merawat kanak-kanak yang menghadapi masalah dengan kelenjar pituitari mereka.

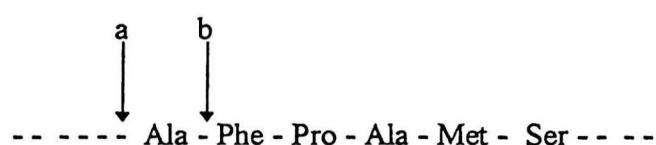
1.3 Biosintesis Prekursor dan Struktur Primer Hormon Pertumbuhan

Sejak penemuan proinsulin oleh Steiner *et al.* (1972) adalah jelas bahawa kebanyakan hormon protein dan peptida disintesis dalam bentuk prekursor oleh sel-sel yang berkaitan. Hormon pertumbuhan turut tidak terkecuali, ianya juga disintesis dalam bentuk protein prekursor dan kemudiannya diproses untuk menghasilkan hormon pertumbuhan matang.

Untuk mengkaji peristiwa yang berlaku pada peringkat permulaan biosintesis hormon pertumbuhan, Wallis (1978) telah menjalankan ujian translasi protein mengguna sistem bebas-sel 'wheat germ'. Beliau mendapati bahawa apabila mRNA daripada sel tumor kelenjar pituitari mencit ditranslasikan mengguna sistem 'wheat germ' sejenis protein yang menyerupai hormon pertumbuhan telah terhasil. Protein ini, biarpun mempunyai berat molekul yang lebih tinggi tetapi ia memiliki struktur yang mirip hormon pertumbuhan (Wallis, 1978). Proses translasi mRNA ini juga dilakukan mengguna sistem 'mammalian cell-free' (sel Krebs Ascites) dan didapati hormon pertumbuhan telah dihasilkan (Bancroft *et al.*, 1973). Pemerhatian begini menyarankan kepada kita bahawa dalam sistem sel Krebs Ascites hormon prekursor ini telah diproses kepada hormon matang manakala dalam sistem 'wheat germ' pemprosesan ini tidak berlaku. Pemprosesan hormon prekursor ke bentuk matangnya berlaku dengan begitu cepat sekali dan dalam keadaan normal, prekursor hanya wujud seketika sahaja, mungkin dalam jangkamasa 2 minit selepas sintesis oleh sel pituitari (Wallis, 1978).

Analisis ke atas hasil translasi mRNA hormon pertumbuhan yang telah diklonkan ke dalam bakteria menunjukkan kehadiran 26 asid amino tambahan yang kebanyakannya bersifat hidrofobik dan terikat secara kovalen kepada hujung amino hormon pertumbuhan matang (Goeddel *et al.*, 1979). Asid amino ini berperanan sebagai peptida

isyarat dan dipercayai membantu untuk memudahkan proses pemindahan rantai polipeptida melintasi selaput endoplasmik retikulum. Peptida isyarat ini akan dipotong secara proteolisis semasa proses pemindahan protein yang baru disintesis ini ke dalam lumen endoplasma retikulum kasar sel-sel endokrin (Blobel dan Dobberstein, 1975). Dalam bovin, misalnya, pembelahan hormon prekursor boleh berlaku pada 2 kedudukan berbeza. Prekursor hormon pertumbuhan bovin boleh dipotong pada sebelah kedudukan 'a' atau 'b' residu alanina seperti pada rajah di bawah ini.



Seandainya pembelahan telah berlaku di tapak 'a', pembelahan seterusnya tidak boleh terjadi di 'b' kerana endoprotease yang berperanan dalam pembelahan ini amat spesifik (Wallis, 1978). Perbezaan dalam mengguna tapak pembelahan pada peptida isyarat hormon prekursor ini menyebabkan wujudnya ketidak-seragaman pada hujung N-terminus hormon pertumbuhan bovin.

Oleh kerana corak pembelahan tersebut, hormon pertumbuhan bovin yang dirembes keluar oleh kelenjar pituitari mempunyai hujung amino yang heterogenus, yang mungkin bermula dengan residu alanina atau fenilalanina (Li dan Ash, 1953; Miller *et al.*, 1980). Kedua-dua jenis rantai polipeptida ini hadir dalam nisbah yang hampir sama dalam kebanyakan penyediaan hormon (Li dan Ash, 1953; Parcells dan Li, 1958; Wallis dan Dixon, 1966). Kajian menyeluruh yang dilakukan ke atas jujukan asid amino hormon ini (Fellows dan Rogol, 1969; Santome *et al.*, 1973) juga menunjukkan bahawa kedua-dua rantai tersebut adalah serupa kecuali pada hujung N-terminus yang mana salah satu daripada rantai tersebut adakalanya mempunyai tambahan asid amino alanina (Wallis, 1969). Ketidak-seragaman dalam hormon pertumbuhan bovin turut dilaporkan pada residu

asid amino residu 127, kedua-dua leusina dan valina telah dikesan semasa penjujukan (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1983).

Sebelum dirembes keluar daripada sel endokrin, proses modifikasi turut berlaku pada rantai polipeptida yang baru disintesis tadi. Pada hormon pertumbuhan bovin, misalnya, keempat-empat residu sisteina yang hadir akan mengalami oksidasi untuk membentuk 2 ikatan dwi-sulfida. Salah satu daripadanya membentuk satu gelung besar antara residu 53 dan 164 manakala gelung kedua yang lebih kecil berada antara residu 181 dan 189 (Li *et al.*, 1958). Tertakluk kepada tapak pemotongan peptida isyarat pada peptida prekursor, hormon pertumbuhan bovin yang matang mempunyai 190 atau 191 residu asid amino (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1983). Analisis serta perbandingan yang dilakukan ke atas asid amino hormon pertumbuhan bovin menunjukkan yang ianya mempunyai 83.6% homologi dengan mencit dan 66.8% dengan manusia (Miller *et al.*, 1980).

1.4 Struktur Primer Gen Hormon Pertumbuhan

Gen struktur serta cDNA hormon pertumbuhan daripada pelbagai spesies telah dikaji; ini termasuk yang diperolehi daripada manusia (Goeddel *et al.*, 1979a), mencit (Seeburg *et al.*, 1977), lembu (Seeburg *et al.*, 1983), khinzir (Seeburg *et al.*, 1983) dan ikan salmon (Sekine *et al.*, 1985). Analisis yang dilakukan ke atas gen struktur hormon pertumbuhan menunjukkan bahawa ianya bersaiz melebihi 2 kilopasanganbes (kb) (Fiddes *et al.*, 1979; Barta *et al.*, 1981; Woychick *et al.*, 1982). Pada struktur primer gen ini terdapat beberapa jujukan penganggu iaitu intron. Hormon pertumbuhan bovin, misalnya, dilaporkan terdiri daripada 4 intron dan 5 exon (Woychick *et al.*, 1982). Proses hiris-cantum ke atas prekursor mRNA akan menghasilkan mRNA matang bersaiz sekitar 800 bes (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1983). Jujukan 800 bes ini merangkumi keseluruhan kawasan pengkodan untuk prekursor hormon pertumbuhan dan juga kawasan 3' dan 5' yang tak ditranslasi (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1977; 1983).

Penggunaan kodon dalam gen hormon pertumbuhan merupakan satu proses yang tidak rawak, lazimnya G dan C sering didapati pada kedudukan ketiga kodon (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1977). Lanjutan daripada corak penggunaan yang sebegitu rupa, mRNA hormon pertumbuhan mempunyai kandungan G + C yang tinggi (Miller *et al.*, 1980; Seeburg *et al.*, 1977). Jujukan nukleotida hormon pertumbuhan bovin mempamerkan 83.9% homologi dengan hormon pertumbuhan mencit dan 76.5% homologi dengan hormon pertumbuhan manusia (Miller *et al.*, 1980).

1.5 Kaedah-Kaedah Klasik dalam Penyediaan Hormon Pertumbuhan

Peranan penting hormon pertumbuhan dalam menjamin pertumbuhan normal dan selanjut memang tidak dapat dinafikan. Bekalan yang mencukupi akan membolehkan penggunaan peptida ini dengan lebih meluas lagi dalam bidang perubatan, pertanian dan penternakan. Pelbagai kaedah telah diguna oleh para penyelidik dalam usaha mereka untuk mewujudkan serta meningkatkan bekalan peptida ini. Sebelum ini usaha untuk menyediakan bekalan polipeptida hormon pertumbuhan banyak bergantung kepada teknik-teknik klasik seperti pengekstrakan terus hormon daripada tisu atau melalui kaedah sintesis organik.

Hormon pertumbuhan dihasil dan dirembes oleh kelenjar pituitari. Kejayaan untuk mengekstrak hormon pertumbuhan daripada kelenjar pituitari pertama kali dilaporkan dalam tahun 1940-an (Li dan Evans, 1944). Kaedah terawal dalam pengekstrakan polipeptida ini melibatkan prinsip pemendakan mengguna larutan bergaram pada pH tertentu (Wilhelmi, 1954; Dellarcha dan Sonenberg, 1964). Ini diikuti dengan penulenan hasil kasar ekstraksi tadi mengguna teknik kromatografi (Papkovoff dan Li, 1958) dan teknik penurasan gel seperti Sephadex G-75 (Dellarcha dan Sonenberg, 1964).

Walau bagaimanapun, penyediaan hormon pertumbuhan mengikut tatacara begini mempunyai pelbagai masalah dan kelemahan. Untuk mengadakan bekalan hormon yang mencukupi, pihak pembekal perlu mendapatkan bekalan bahan mentah yang banyak dan adalah sukar untuk memperolehi kelenjar pituitari dengan banyak. Di samping mendapat hasil yang sedikit, ketulenan protein yang disediakan seringkali diragui. Keheterogenan protein yang disediakan mungkin disebabkan oleh kehadiran protein lain sebagai bahan asing ataupun protein itu sendiri mempunyai pelbagai bentuk seperti monomer, dimer atau multimer (Wallis dan Dixon, 1966; Lewis *et al.*, 1978). Kontaminasi

oleh hormon lain yang turut dihasilkan kelenjar pituitari kadang-kala sukar dielakkan (Saxena dan Henneman, 1966). Kelenjar pituitari dan tisu sekitarnya juga mengandungi pelbagai jenis enzim yang boleh menyebabkan degradasi pada hormon semasa proses ekstraksi dilakukan.

Penemuan kaedah penjujukan protein telah membuka satu era baru dalam penjuruteraan protein. Ini bermakna dengan mengetahui jujukan asid amino yang membina sesuatu peptida atau protein, sintesis protein tersebut secara kimia boleh dilakukan. Teknik sintesis protein fasa pepejal telah memudahkan kerja-kerja mensintesis peptida dan protein (Merrifield, 1965).

Strategi asas teknik ini melibatkan pelekatan secara kovalen hujung karboksil asid amino peptida yang dikehendaki kepada satu penyokong pepejal yang tak larut, contohnya, resin. Resin ini terlebih dahulu ditanda dengan kumpulan aktif. Asid amino pertama yang dilengkapi dengan satu kumpulan pelindung akan datang mengambil alih tempat kumpulan aktif pada resin tadi. Kumpulan pelindung dibebaskan dan asid amino kedua pula ditambah kepada yang pertama. Proses ini berulang sehingga kesemua asid amino yang membina peptida tersebut semuanya selesai dihimpunkan. Peptida tadi dibebaskan daripada resin penyokong dan dituliskan.

Sejak penemuan kaedah sintesis peptida fasa pepejal ini pelbagai jenis peptida telah cuba disintesis. Hormon protein pertama yang berjaya dihasilkan mengikut pendekatan ini ialah peptida Rantai A dan B insulin (Katsoyannis *et al.*, 1964). Dalam tahun 1970 pula hormon pertumbuhan sintetik dihasilkan (Li dan Yamashiro, 1970). Malangnya sintesis hormon ini telah didasarkan kepada jujukan asid amino yang kurang tepat serta produk yang diperolehi tidak dicirikan sepenuhnya. Namun begitu, hormon pertumbuhan sintetik ini ada menunjukkan sedikit aktiviti biologi. Misalnya, hormon sintetik ini mampu mempamerkan 10% aktiviti berbanding dengan hormon asli dalam ujian

tibia. Chillemi *et al.* (1972), pula berjaya mensintesis peptida yang sepadan kepada residu 87 - 123 dan residu 124 - 155 hormon pertumbuhan manusia. Kedua-dua fragmen sintetik ini mampu untuk menggalakkan pertumbuhan.

Kaedah sintesis protein fasa pepejal ini biarpun mudah dan cepat, mempunyai beberapa kelemahan. Sebarang produk sampingan tak terlarut yang terhasil dan mungkin terikat pada resin penyokong hanya boleh diasing selepas sintesis selesai. Masalah peraseman juga mungkin berlaku dan sekiranya ini terjadi, produk yang terhasil kemungkinan tidak aktif (Fuller *et al.*, 1981).

1.6 Penjuruteraan serta Penghasilan Protein Hormon Pertumbuhan Mengguna Teknologi Rekombinan DNA

Penyediaan hormon pertumbuhan melalui pengekstrakan terus hormon daripada tisu atau melalui kaedah sintesis organik mempunyai beberapa kelemahan yang boleh membantut usaha untuk memperbanyakkan bekalan hormon pertumbuhan ini. Teknologi rekombinan DNA menjanjikan satu alternatif lebih menarik kepada para penyelidik dalam usaha mereka untuk mewujudkan satu sistem yang akan membolehkan penghasilan protein dengan lebih murah, cekap dan yang lebih penting ialah keupayaan untuk menghasilkan satu produk yang lebih seragam dan tulen. Teknologi rekombinan DNA adalah berasaskan kepada pengetahuan bahawa maklumat genetik yang dikodkan oleh DNA serta disusun dalam bentuk gen merupakan satu sumber yang boleh diubahsuai dan dimanipulasi.

Salah satu pencapaian paling bermakna dalam teknologi rekombinan DNA ialah kemampuan untuk mengekspresikan gen eukariot dengan jayanya dalam sistem *Escherichia coli*. Ini boleh dilakukan dengan menyelitkan gen tersebut ke dalam vektor

pengklonan seperti plasmid yang mempunyai isyarat pengekspresian yang sesuai. Plasmid rekombinan tersebut akan mengambil kesempatan menggunakan radas sel hos yang sedia ada untuk mensintesis dan menghasilkan protein rekombinan. Beraneka jenis protein eukariot yang terdahulunya sukar untuk diperolehi dengan banyak daripada sumber semulajadi kini boleh dihasilkan dengan banyak oleh sel bakteria. Melalui teknologi rekombinan DNA, protein yang dikehendaki boleh dihasilkan dengan melakukan proses fermentasi ke atas mikroorganisma atau sel yang telah dijuruterakan khusus supaya ianya membawa maklumat genetik yang berperanan dalam penghasilan protein tadi.

Antara kejayaan terawal menghasilkan hormon pertumbuhan mengguna teknologi ini ialah seperti yang dilaporkan oleh Goeddel *et al.* (1979). Dengan mencantum cDNA hormon pertumbuhan manusia kepada satu cebisan DNA sintetik yang mengkod bahagian N-terminus hormon itu tadi, Goeddel dan rakan-rakannya berjaya mengklon serta mengekspresikan gen hibrid ini dalam *E.coli*. Pengekspresian gen hibrid tersebut yang dikawal oleh promoter *lac* berjaya menghasilkan polipeptida yang memiliki saiz dan ciri imunologi sama seperti hormon pertumbuhan matang. Selain daripada itu, vektor pengekspresian yang membawa gen hormon pertumbuhan daripada organisma lain seperti lembu dan khinzir turut diklon dan diekspresikan dalam *E. coli* (Seeburg *et al.*, 1983). Proses fermentasi ke atas strain *E. coli* yang membawa vektor pengekspresian tadi berjaya menghasilkan kira-kira 1.5 gram hormon pertumbuhan setiap liter isipadu kultur

Duffaud *et al.* (1989) turut melaporkan kejayaan mereka untuk mengekspresi dan merembeskan hormon pertumbuhan manusia mengguna vektor perembesan, pIN-III-OmpA3. Penggunaan vektor perembesan seperti pIN-III-OmpA3 ini membolehkan protein yang disintesis diangkut dan disimpan di kawasan ruang periplasmik. Protein yang terhasil juga didapati memiliki struktur seperti hormon pertumbuhan asli, termasuk pembentukan 2 jambatan dwi-sulfida dengan konformasi yang betul. Selain daripada *E.coli*,

pengekspresian hormon pertumbuhan turut diuji dalam sistem *Bacillus subtilis*. Honjo *et al.* (1986) telah membina satu plasmid hibrid, pES150GH yang mampu untuk mengekspresikan hormon pertumbuhan dalam sel *Bacillus*. Plasmid pES150GH membawa gen hormon pertumbuhan manusia yang dicantumkan selepas promoter dan prepropeptida gen protease *Bacillus amyloliquefaciens*. Biarpun protein yang dirembeskan mempunyai saiz yang lebih tinggi, iaitu 23kDalton berbanding dengan 22kDalton untuk hormon pertumbuhan, namun ciri-ciri imunologinya adalah serupa hormon asli (Honjo *et al.*, 1986).

1.7 Penyediaan/Penyusunan Gen Berasaskan Tindakbalas Rantai Polimerase

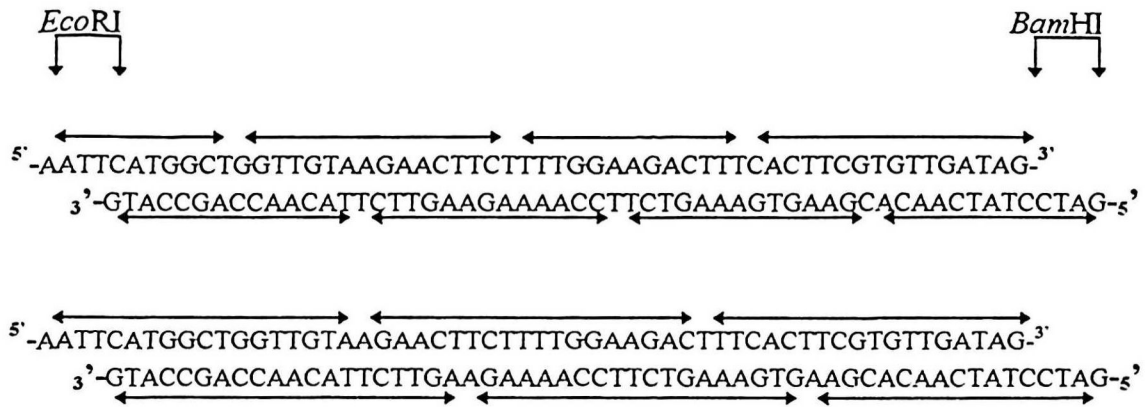
Kegunaan teknologi rekombinan DNA dalam penghasilan protein sememangnya mempunyai masa depan yang cerah. Walau bagaimanapun, terdahulu daripada ini, pengklonan serta pengekspresian gen eukariot atau heterolog lazimnya merupakan suatu tugas rumit dan memerlukan masa yang lama. Kerumitan ini berpunca daripada 2 masalah utama iaitu :

- a Pertamanya, untuk sesuatu gen atau cDNA tersebut diekspresikan oleh sistem *E. coli*, takungan gen tersebut mestilah suatu sumber yang bermonoklon (yakni mengguna plasmid homogenus dan bukannya sumber berpoliklon seperti perpustakaan gen).
- b Keduanya ialah kerana DNA eukariot tidak mempunyai jujukan tertentu yang berperanan sebagai pemberi isyarat dan boleh dikenalpasti oleh radas tanskripsi-translasi hos. Oleh yang demikian, pengklonan gen eukariot serta penghasilan protein heterologus mengguna sistem *E. coli* misalnya, seringkali menghadapi

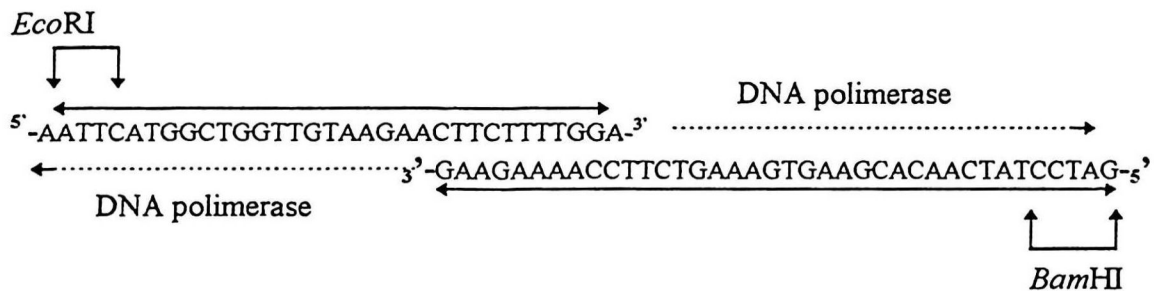
masalah dari segi pengekspresian serta sintesis protein yang dikodkan oleh gen tersebut. Ini menjadi salah satu punca utama kegagalan atau ketidak-cekapan sel hos untuk mensintesis protein heterolog.

Kaedah konvensional dalam pengklonan gen eukariot melibatkan beberapa peringkat seperti pengekstrakan mRNA daripada sel atau tisu tertentu, penukaran mRNA tadi kepada cDNA, pembinaan perpustakaan cDNA, proses penyaringan gen sasaran keluar daripada takungan gen serta pengklonan gen tadi ke dalam vektor pengekspresian. Seringkali juga pengubahsuaian perlu dilakukan terhadap gen asal supaya ianya sesuai untuk diekspresikan oleh sistem bakteria. Gen eukariot yang hendak diekspresikan menggunakan sel bakteria perlu dilengkapi dengan unsur seperti tapak ikatan ribosom, kodon pemula serta kodon penamatan. Kesemua proses ini memakan masa yang lama.

Kaedah kedua yang telah diguna didalam penyediaan gen ialah dengan melakukan sintesis secara kimia. Sejak kejayaan pertama sekali mensintesis gen tRNA alanina secara sintetik oleh Khorana (1979), pelbagai gen sintetik seperti gen yang mengkod hormon insulin (Goeddel *et al.*, 1979b), urogastrone (Urdea *et al.*, 1983), dan hormon pertumbuhan manusia (Ikehara *et al.*, 1984) telah berjaya dihasil serta diklonkan. Pada permulaannya, terdapat 2 strategi asas yang telah diguna untuk mensintesis gen sintetik ini tadi. Strategi yang pertama telah didasarkan kepada pendekatan yang digunakan oleh Khorana dimana beberapa oligonukleotida pendek (sekitar 10 hingga 15 bes) akan disusun dan dicantum untuk menghasilkan satu gen sintetik dengan bantuan enzim DNA ligase. Perkembangan teknik-teknik baru telah membolehkan penghasilan oligonukleotida yang lebih panjang dan ini mewujudkan satu lagi alternatif kepada kita untuk menghasilkan gen sintetik (Rajah 1.2a). Walau bagaimanapun bagi gen yang bersaiz besar penjanaaan gen sintetik seperti tatacara diatas menjadi tidak praktikal kerana ianya akan menelan kos yang terlalu tinggi.



1.2a



1.2b

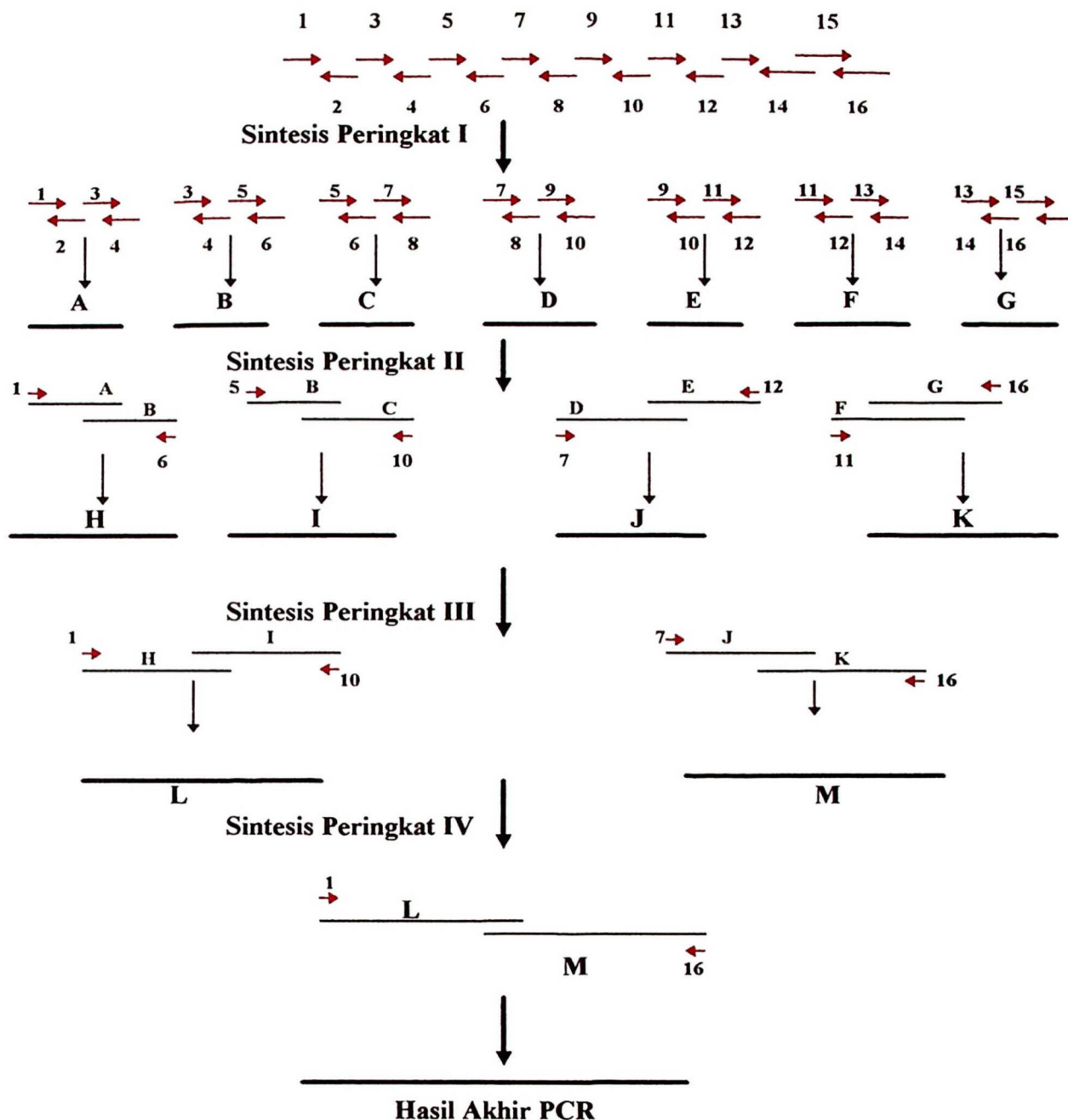
Rajah 1.2 : Strategi menunjukkan 2 alternatif yang boleh diguna untuk penghasilan DNA dupleks. Dalam 1.2a, cebisan oligonucleotida yang saling bertindih serta berkompementari disusun membentuk satu gen sintetik dengan bantuan enzim DNA ligase. Strategi 1.2b mengambil kesempatan di atas kemampuan aktiviti 'DNA repair' oleh enzim DNA polimerase. Oligonukleotida disintesis supaya ianya mempunyai kawasan yang bertindih dan berkompementari pada hujung kawasan 3'. Enzim DNA polimerase kemudiannya diguna untuk melengkapkan sintesis gen ini. Tatacara yang kedua lebih menjimatkan kos memandangkan bilangan oligonukleotida yang perlu disintesis boleh dikurangkan.

Dalam strategi kedua sintesis gen ini, oligonukleotida yang lebih panjang telah direka supaya ianya memiliki jujukan hujung 3'- yang saling berkomplementari. Oligonukleotida yang begini akan bertindak sebagai templat/primer dan akan ditukar kepada DNA dupleks dalam kehadiran enzim DNA polimerase I dari *E. coli* serta dioksinukleosida trifosfat (Rajah 1.2b). Penyediaan gen mengikut strategi yang kedua ini lebih menjimatkan kos memandangkan kita hanya perlu mensintesis sebahagian sahaja daripada gen. Namun begitu, biarpun strategi kedua ini nampaknya lebih menarik tetapi kecekapan proses polimerisasi atau pemanjangan primer oleh enzim DNA polimerase I adakalanya sukar untuk dijangkakan secara tepat. Ini adalah kerana aktiviti pemanjangan oleh DNA polimerase I akan tersekat sekiranya terdapat struktur sekunder pada rantai DNA yang terlibat. Suhu optimum bagi aktiviti DNA polimerase I ialah pada 37°C dan pada suhu begini, sebarang struktur sekunder yang mungkin hadir sukar untuk dihapuskan.

Penemuan kaedah Tindakbalas Rantai Polimerase (PCR) oleh Saiki *et al.* (1985) serta kejayaan untuk mengasingkan DNA polimerase yang rintang haba daripada *Thermus aquaticus* (*Taq*) telah membuka satu dimensi baru dalam bidang pengklonan dan seterusnya teknologi rekombinan DNA. Tindakbalas rantai polimerase merupakan satu kaedah dimana proses amplifikasi DNA boleh dilakukan secara *in vitro*. Secara ringkasnya pendekatan PCR membolehkan proses penyaringan, amplifikasi, serta modifikasi pada gen sasaran dijalankan sekaligus. Misalnya, pasangan primer yang hendak digunakan untuk amplifikasi gen sasaran boleh direka supaya jujukannya dilengkapi dengan maklumat-maklumat yang mengawal proses translasi seperti kodon pemula, tapak ikatan ribosom, kodon penamatan dan juga tapak enzim pembatasan. Sejak pertama kali diperkenalkan (Saiki *et al.*, 1985) PCR telah diguna dengan meluas. Terdahulu daripada ini, PCR kerap kali digunakan untuk tujuan diagnostik serta untuk mengamplifikasi atau mengekstrak keluar jujukan DNA spesifik daripada kumpulan DNA yang lebih kompleks.

Kemajuan serta perkembangan terkini dalam teknik PCR dan keupayaan untuk mensintesis oligonukleotida yang lebih panjang telah memberi kita keanjalan dalam memilih pendekatan yang hendak diguna untuk menyediakan gen rekombinan tadi. Ramai lagi telah mengenalpasti potensi penggunaan PCR sebagai satu alternatif bagi mengatasi masalah yang sering dihadapi apabila mengguna pendekatan yang lebih konvensional untuk pengklonan gen heterologus (Kriegler, 1990; MacFerrin *et al.*, 1993). Seiring dengan perkembangan teknologi yang semakin canggih, applikasi PCR telah dipelbagaikan lagi. Kriegler (1990) misalnya telah mengguna pendekatan PCR bagi menyusun serta menyejajarkan oligonukleotida dan telah berjaya menjanakan satu gen sintetik hibrid leukosit-interferon A-D. Pendekatan sebegini boleh dilakukan seandainya jujukan DNA sasaran telah diketahui. Sekiranya jujukan lengkap gen tidak diketahuinya, dan hanya maklumat mengenai jujukan protein sahaja yang boleh didapati maka proses translasi-berbalik ('back-translation') boleh dilakukan.

Untuk membina gen hibrid ini Kriegler (1990) telah mensintesis 16 oligonukleotida yang panjangnya 51 nukleotida. Setiap satu oligonukleotida ini telah direka supaya ianya saling bertindihan sebanyak 15 pasangan bes. Proses PCR kemudiannya dilakukan ke atas subset-subset amplimer ini tadi (Rajah 1.3). Setiap fragmen diterbitkan melalui percantuman 4 oligonukleotida yang saling berkomplementari pada hujung 3' mereka. Pada peringkat awal PCR, keempat-empat oligonukleotida akan berperanan sebagai templat-primer. Proses polimerisasi oleh DNA polimerase akan menghasilkan satu DNA dupleks yang kemudiannya akan berperanan sebagai templat untuk kitaran-kitaran seterusnya. Pada peringkat ini, hanya oligonukleotida yang mewakili kawasan hujung 3' dan 5' fragmen sahaja yang berfungsi sebagai primer. Proses penyejajaran DNA mengguna PCR diulangi beberapa kali sehingga satu gen lengkap berjaya diterbitkan (Rajah 1.3).



Rajah 1.3 : Penyejajaran dan penjanaan gen berdasarkan tindakbalas rantai polimerase (ubahsuaian daripada Kriegler, 1990)

1.8 Objektif Kajian

Dalam kajian ini satu binaan gen sintetik hormon pertumbuhan bovin (bGH) akan cuba dihasilkan secara *in-vitro* menggunakan tindakbalas rantai polimerase (PCR) dan fragmen yang terhasil akan diklonkan ke dalam vektor pengekspresian plasmid *E. coli*. Prospek serta potensi penggunaannya yang meluas dalam pelbagai bidang seperti pertanian, penternakan dan akuakultur serta beberapa ciri lain yang dimiliki oleh gen bGH membuatnya amat menarik untuk kajian. Gen strukturnya ringkas, telah dicirikan dengan mendalam dan jujukan yang mengkod peptida ini telah diketahui sepenuhnya. Keganjalan yang disediakan oleh kaedah PCR, kesukaran untuk mendapatkan bekalan kelenjar pituitari bagi penyediaan mRNA serta ciri yang dimiliki oleh mRNA bGH itu sendiri merupakan antara faktor mengapa proses penyediaan gen secara sintetik telah dipilih dan bukannya melalui pengasingan gen daripada perpustakaan cDNA.

Proses penukaran mRNA kepada cDNA memerlukan penggunaan enzim transkriptase berbalik yang mempunyai aktiviti optimum pada suhu sekitar 37°C hingga 42°C. Pada suhu ini pembentukan dan kehadiran struktur sekunder pada mRNA sukar untuk dielak atau dihapuskan. Kehadiran struktur sekunder seperti ini adakalanya boleh menjejaskan proses transkripsi berbalik mRNA kepada cDNA oleh enzim transkriptase kerana aktiviti enzim akan terhenti apabila ianya terjumpa dengan struktur sekunder tersebut. Apabila ini berlaku, kita akan memperolehi cDNA yang tidak lengkap. Kajian ke atas gen bGH menunjukkan bahawa jujukan DNA yang mengkod protein hormon tersebut mempunyai kandungan residu G dan C yang tinggi (Seeburg *et al.*, 1983). Pada kawasan berhampiran dengan hujung -5' mRNA-nya pula terdapat 2 kawasan yang berpotensi untuk membentuk struktur gelung pin rambut (Tomich *et al.*, 1989). Dengan memilih untuk mensintesis gen bGH secara *in vitro* menggunakan PCR dan bukan melalui kaedah pengklonan konvensional, masalah yang disebabkan oleh struktur sekunder ini boleh dihindari atau diminimumkan.

Gen hormon pertumbuhan bovin (bGH) seperti yang dilaporkan oleh Seeburg *et al.* (1983) dijadikan gen model dalam kajian ini. Gen bGH daripada sumber semulajadi mengkodkan satu rantaian polipeptida terbina daripada 190 asid amino (Seeburg *et al.*, 1983). Gen sintetik ini telah direka-bentuk supaya ianya membawa kesemua jujukan yang mengkod hormon pertumbuhan matang ini (Lampiran E). Strategi yang dipilih untuk menerbitkan gen sintetik ini akan didasarkan kepada teknik yang telah diperkenalkan oleh Kriegler (1990).

Secara ringkasnya, matlamat kajian adalah seperti berikut :

I Membina/menjana satu gen sintetik secara *in vitro*/PCR.

Rekabentuk binaan gen sintetik ini akan mengambil kira unsur-unsur penting yang mempengaruhi proses transkripsi dan translasi. Gen sintetik ini akan dibekalkan dengan tapak ikatan ribosom, kodon pemula ATG dan kodon penamat. Bagi memudahkan proses pengklonan ke dalam pelbagai vektor, beberapa tapak pembatasan juga akan ditempatkan pada hujung 3' dan 5' gen ini.

II Mengklonkan fragmen/produk PCR ke dalam vektor pengekspresian

III Menganalisis binaan gen sintetik yang telah dijanakan.

Untuk melihat samada proses penyejajaran dan percantuman DNA telah berlaku mengikut tertib yang dirancang, DNA yang diperolehi akan dihadam dengan beberapa enzim pembatasan terpilih. Gambaran menyeluruh tentang hasil amplifikasi PCR pula diperolehi dengan menjalankan penjujukan.

BAHAN DAN KAEDAH

2.1 KAEDAH AM

2.1.1 Penentuan ketumpatan optik

Ketumpatan optik ditentukan dengan spektrofotometer Shimadzu UV-120-01 dan Shimadzu UV-VIS pada jarak gelombang tertentu. Penentuan ketumpatan optik DNA dilakukan pada jarak gelombang 260 nm manakala untuk protein pembacaan dilakukan pada jarak gelombang 280 nm.

2.1.2 Kaedah pensterilan

Media dan radas plastik diautoklaf pada 15psi (121° C) selama 15 minit. Bahan-bahan kaca pula disterilkan di dalam ketuhar pada suhu 180°C selama 8 jam.

2.1.3 Penyediaan Media

Resipi media yang telah digunakan untuk pertumbuhan bakteria adalah seperti berikut :

a) Media Kaldu LB, Luria-Bertani (untuk setiap liter)

Tryptone 10 g

Ekstrak yis 5 g

Natrium klorida (NaCl) 10 g

pH ditetapkan pada 7.5 mengguna natrium hidrosida (NaOH). Untuk menyediakan plat agar LB, sebanyak 16 g agar ditambah kepada campuran diatas.

b) Media Minima M9 (untuk setiap liter)

di-Natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)	6 g
Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	3 g
Natrium klorida (NaCl)	0.5 g
Ammonium klorida (NH_4Cl)	1 g

pH ditetapkan pada 7.4, larutan garam diautoklaf sebelum ditambah dengan :

*1 M magnesium sulfat (MgSO_4)	2 ml
*20 % glukosa	10 ml
*1 M kalsium klorida (CaCl)	0.1 ml

Kesemua bahan bertanda * disteril secara berasingan samada melalui penurasan atau autoklaf. Untuk penyediaan plat agar, sebanyak 16 g agar Noble (Difco) ditambah kepada campuran diatas.

2.2 ENZIM

Enzim pembatasan diperolehi samada daripada Boehringer Mannheim, New England Biolabs ataupun Promega Enzim ligase T4 DNA, ^{35}S -dATP, ^{32}P -dATP dan ^{33}P -dATP pula adalah buatan Amersham. Semua tindakbalas enzim pembatasan dan enzim modifikasi DNA telah digunakan mengikut keadaan yang disyorkan oleh pembuat.

2.3

VEKTOR DAN STRAIN BAKTERIA YANG DIGUNAKAN

<u>Strain</u>	<u>Genotip</u>
JM 109	<i>rec A 1, sup E 44, end A 1, hsd R 17, gyr A 96, rel A, thi Δ (lac - pro AB), F'[tra D36 pro AB⁺ lac I^qlac ZΔM15]</i>
<u>Vektor</u>	<u>Ciri-ciri</u>
Plasmid pKK223-3	4.584 kb., memiliki tapak pengklonan pelbagai daripada pUC8 (Lampiran A); hos yang disyorkan ialah hos yang membawa repressor <i>lac</i> , iaitu bergenotip <i>lacI^q</i> .
M13mp18 & mp19	7.2 kb., tapak pengklonan pelbagai daripada pUC18/pUC19 ; (Lampiran B); hos bacteria bergenotip <i>lacI^q</i>
Fagmid pBluescript	2.96 kb (Lampiran C); komplementasi- α ; hos bacteria bergenotip <i>lacI^q</i>

2.4 PENGHASILAN GEN SINTETIK

Gen hormon pertumbuhan bovin telah dipilih di dalam percubaan untuk menghasilkan satu gen sintetik yang diharapkan dapat berfungsi dan seterusnya boleh diekspresikan apabila dimasukkan ke dalam vektor pengepresian.

2.4.1 Sintesis Oligonukleotida Untuk Penjanaan Gen Sintetik

Oligonukleotida telah ditempahbuat oleh Bio-Synthesis Inc., Amerika Syarikat berdasarkan jujukan asid amino bagi gen hormon tumbesaran bovin sepertimana yang telah dianjurkan oleh Seeburg *et al.* (1983). Sebanyak 14 fragmen atau 7 pasang oligonukleotida telah disintesis untuk binaan gen sintetik ini, masing-masing bersaiz antara 45 hingga 65 bes panjang. Jujukan serta bilangan bes untuk setiap oligomer adalah seperti yang tersenarai dalam Jadual 2.1. Sebelum digunakan, kesemua oligonukleotida yang disintesis terlebih dahulu dianalisis di atas gel 15 % poliakrilamida ternyahasli dengan 7.2 M urea (Rajah 2.1).