

ABSTRAK

Judul : Konstruksi *Pichia pastoris* X33 Rekombinan Pembawa Gen L1 HPV45 Terintegrasi
Nama : Nahdatul Fajriyati Alawiyah
Program Studi : Bioteknologi

Gen L1HPV45 merupakan gen penyandi protein kapsid dari *Human papilloma Virus* (HPV) tipe 45 yang bersifat imunogenik, sehingga protein tersebut dipilih sebagai salah satu kandidat vaksin. *Pichia pastoris* merupakan salah satu organisme yang banyak digunakan untuk mengeskpresikan suatu protein yang diinginkan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengintegrasikan gen L1HPV45 ke dalam genom *Pichia pastoris*. Plasmid pPICZA L1HPV45 diperbanyak menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Plasmid yang telah diperbanyak kemudian diisolasi, dilinearisasi dan ditransformasi ke sel *Pichia pastoris* kompeten menggunakan metode elektroporasi. Hasil elektroporasi ditumbuhkan dalam medium YPD dengan antibiotik zeocin 100 µg/mL. Untuk mendapatkan *Pichia pastoris* yang memiliki multikopi integran, dilakukan seleksi peningkatan konsentrasi antibiotik secara bertingkat. Koloni yang berhasil tumbuh *discreening* dengan PCR koloni menggunakan primer spesifik plasmid pPICZA. Estimasi *copy number* dilakukan dengan menganalisa intensitas pita hasil PCR dengan primer spesifik gen, menggunakan *software* ImageJ. Hasil *screening* transformasi menunjukkan 16 dari 18 koloni yang tumbuh pada media YPD zeocin 100 µg/mL mengandung gen target terintegrasi, dibuktikan dengan adanya dua pita hasil PCR pada 2,2 kb (gen AOX1) dan 1936 bp (gen target). Koloni B6 dan B10 diperkirakan memiliki jumlah *copy number* gen target 2,41 dan 2,09 kali lebih banyak dibanding dengan gen pembanding (*housekeeping gene*). Proses seleksi antibiotik secara bertingkat telah dilakukan dan didapatkan beberapa koloni yang berhasil tumbuh hingga konsentrasi 1000 µg/mL

Kata Kunci: *Pichia pastoris*, Gen L1HPV45, Plasmid, Integrasi

ABSTRACT

Title : Construction of *Pichia pastoris* X33 Recombinant Carried L1HPV45 Gene Integrated
Name : Nahdatul Fajriyati Alawiyah
Study Program : Biotechnology

L1HPV45 gene encodes for the capsid protein of *Human papilloma Virus* (HPV) type 45 which is immunogenic, therefore, this protein is a potential vaccine candidate. *Pichia pastoris* is widely used as an expression host. This study was aimed to integrate the L1HPV45 gene into *Pichia pastoris* genome. pPICZA L1HPV45 plasmid was propagated in *E. coli*. The plasmid was, then, isolated and linearized, and then used to transform competent *Pichia pastoris* cells by electroporation. Positive transformants were selected in YPD medium containing antibiotic zeocin 100 µg/mL. To obtain *Pichia pastoris* carrying multiple integrations of the plasmid, a series of selection media containing increasing antibiotic concentration was used. Growing transformants were screened by colony PCR using pPICZA specific primers. Copy numbers were estimated by analyzing band intensities of PCR products using gen specific primers, using ImageJ software. Colony PCR showed that 16 of the 18 colonies growing in the screening plates carried integrated target gene, as proven by the presence of two bands at 2.2 kb (AOX1 gene) and 1936 bp (target gene) in the PCR product. Colonies B6 and B10 were estimated to have 2,41 and 2,09 fold copy numbers in comparison to the housekeeping gene. The antibiotic selection process has been carried out in stages and several colonies were found managed to grow up to a concentration of 1000 µg/mL

Key Words: *Pichia pastoris*, Gen L1HPV45, Plasmid, Integration