

**KONSTRUKSI *BACKBONE* PLASMID *SINGLE TARGET* DAN
tRNA-gRNA (TGR) SISTEM CRISPR-Cas9 UNTUK
TANAMAN**

SKRIPSI

Oleh



**NICHOLAS FARRELL WIJAYA
NIM. 1810211007**

Dosen Pembimbing

**Pembimbing 1 : Prof. Dr. sc.agr. Ir. Jamsari, MP
Pembimbing 2 : Ir. Irawati, M.Rur.Sc., PhD**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2022**

KONSTRUKSI *BACKBONE* PLASMID *SINGLE TARGET* DAN tRNA-gRNA (TGR) SISTEM CRISPR-Cas9 UNTUK TANAMAN

Abstrak

Konstruksi plasmid merupakan salah satu kegiatan utama di dalam *genome editing* menggunakan CRISPR-Cas9. Target gen yang berbeda-beda antar organisme dan tujuan penelitian menyebabkan perlunya *backbone* plasmid dengan kemampuan *multiplexing* (tRNA-gRNA) dan bersifat fleksibel di mana bagian crRNA dapat diganti. Terlebih lagi, ukuran plasmid menjadi salah satu aspek yang mempengaruhi efisiensi transformasi plasmid. Oleh karena itu, perlu dikonstruksi *backbone* plasmid yang memiliki karakteristik tersebut. Metode *Golden Gate Assembly* dipilih dengan menggabungkannya bersama reaksi PCR (disebut juga metode *Golden Gate – PCR*) untuk menyelesaikan dua permasalahan yang saling tumpang tindih yaitu mutagenesis *recognition sequence* dari enzim restriksi *BsaI* pada pVS1 Ori dan menggabungkan 8 fragmen yang saling terpisah. Hasil penelitian menunjukkan plasmid berhasil dikonstruksi dengan ukuran akhir 14.728 bp. Verifikasi susunan fragmen menggunakan PCR (ukuran kecil hingga seluruh panjang plasmid) mengindikasikan seluruh fragmen tersusun pada posisi yang diinginkan. Adapun metode yang paling efisien dalam menggunakan *Golden Gate – PCR* adalah dengan langsung memperbanyak produk *Golden Gate* tersebut (*direct PCR from Golden Gate*). Meskipun reaksi PCR pada produk *Golden Gate* yang diinginkan dan telah dipurifikasi juga menghasilkan produk yang diinginkan, teknik ini menghabiskan 2 reaksi purifikasi untuk tiap penyatuan fragmen. Satu-satunya keterbatasan dari metode *Golden Gate – PCR* adalah hanya mampu dilakukan pada fragmen berukuran kecil.

Kata kunci: *backbone plasmid*, CRISPR-Cas9, *Golden Gate-PCR*, tRNA-gRNA



CONSTRUCTION OF SINGLE TARGET AND tRNA-gRNA (TGR) CRISPR-Cas9 BACKBONE PLASMID FOR PLANTS

Abstract

Plasmid construction is one of many important steps within genome editing study using CRISPR-Cas9. Variety of genes that were targeted across different organisms and research's purposes make it necessary to acquire the backbone plasmid with multiplexing capability (tRNA-gRNA) and flexibility to change its target by modifying crRNA sequences. Moreover, the size of plasmid also affects transformation efficiency. Therefore, it becomes clear that backbone plasmid is needed to be constructed with such characteristics. Golden Gate Assembly method was chosen with a combination of PCR reaction (henceforth called Golden Gate – PCR method) to complete two overlapping objectives, mutagenesis of BsaI recognition sequences at pVS1 Ori and combining 8 separate fragments, both backbone and insert PCR products. The results show that the final plasmid has been successfully constructed with a final size of 14,728 bp. PCR verification, short to full-length plasmid, of fragments' order showed that all parts are assembled in intended positions. Furthermore, the most efficient method for applying Golden Gate – PCR is by directly amplifying Golden Gate reaction mixture with flanking primers (Direct PCR from Golden Gate). While the PCR reaction following purification of the correct Golden Gate product (Golden Gate – Purification – PCR) also yields the desired products, it consumes two purification reactions for each assembly. Capability to assemble only small fragments is the only limitation for Golden Gate – PCR method.

Keywords: backbone plasmid, CRISPR-Cas9, Golden Gate-PCR, tRNA-gRNA

