

## TRANSFER GEN

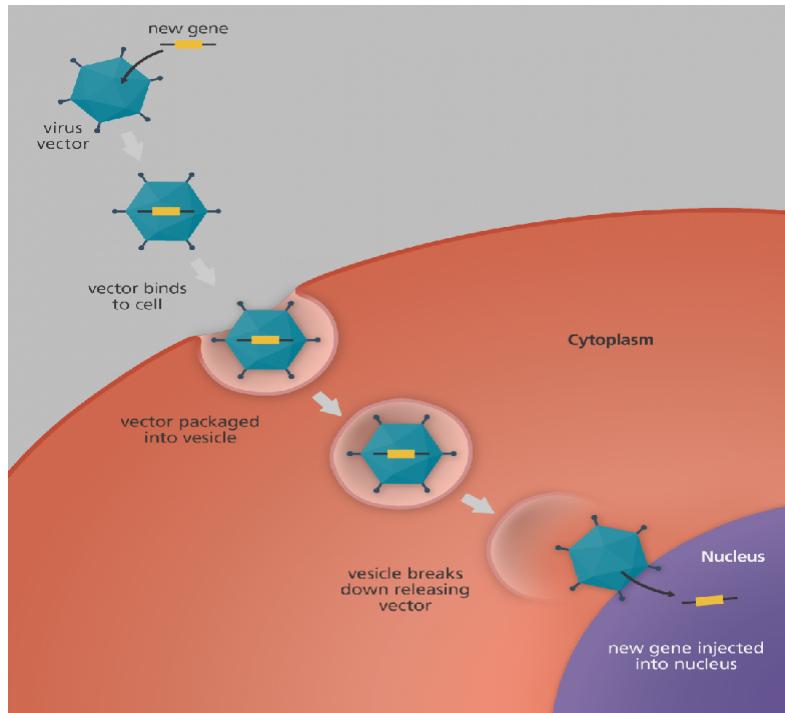
### A. Tujuan Pembelajaran

Setelah mempelajari ini mahasiswa diharapkan dapat

1. Menjelaskan apa yang dimaksud dengan transfer gen
2. Menjelaskan prinsip kerja dari masing-masing transfer gen yang digunakan
3. Membedakan transfer gen satu dengan yang lainnya
4. Melakukan transfer gen secara virtual
5. Membaca atau menganalisis hasil transfer gen
6. Dapat memecahkan masalah disekitar dengan prinsip transfer gen

### B. Prinsip Transfer Gen

Untuk memasukkan gen ke dalam sel, maka diperlukan suatu mekanisme khusus. Seperti kita ketahui sel memiliki membran yang bersifat semipermeabel yang dapat menyeleksi molekul-molekul mana yang bisa keluar masuk sel. Proses seleksi ini sangat penting untuk mencegah kerusakan sel. Molekul DNA ekstrasel yang kita masukkan melalui terapi gen merupakan molekul asing bisa jadi mengalami kesulitan untuk masuk ke dalam sel. Sehingga diperlukan mekanisme pengantaran gen ke dalam sel. Inilah prinsip *gene delivery*. Jika gen masuk ke dalam sel, diharapkan akan terekspresikan menjadi protein yang sangat diperlukan oleh tubuh.

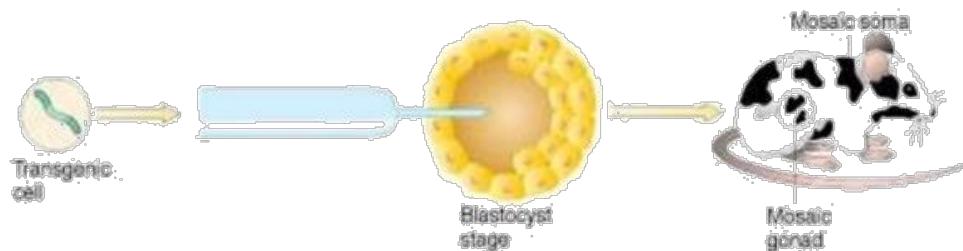


Gambar 1 Prinsip gene delivery, untuk mengantarkan gen ke dalam sel (inti sel)

Metode *gene delivery* ditemukan melalui penelitian yang panjang, bahkan sampai

sekarang masih terus dilakukan untuk menghasilkan metode yang efektif untuk mengantarkan gen ke dalam sel. Pada tahun 1990, Rosenberg dkk melakukan percobaan pengantaran gen resistensi terhadap neomycin dengan menggunakan limfosit. Lima tahun kemudian dilakukan pula percobaan untuk mengantarkan gen ADA pada penderita SCID, yang dilakukan oleh Blaese, dkk (1995). Kedua contoh penelitian ini menjadi salah satu penemuan penting terkait gene delivery pada terapi gen.

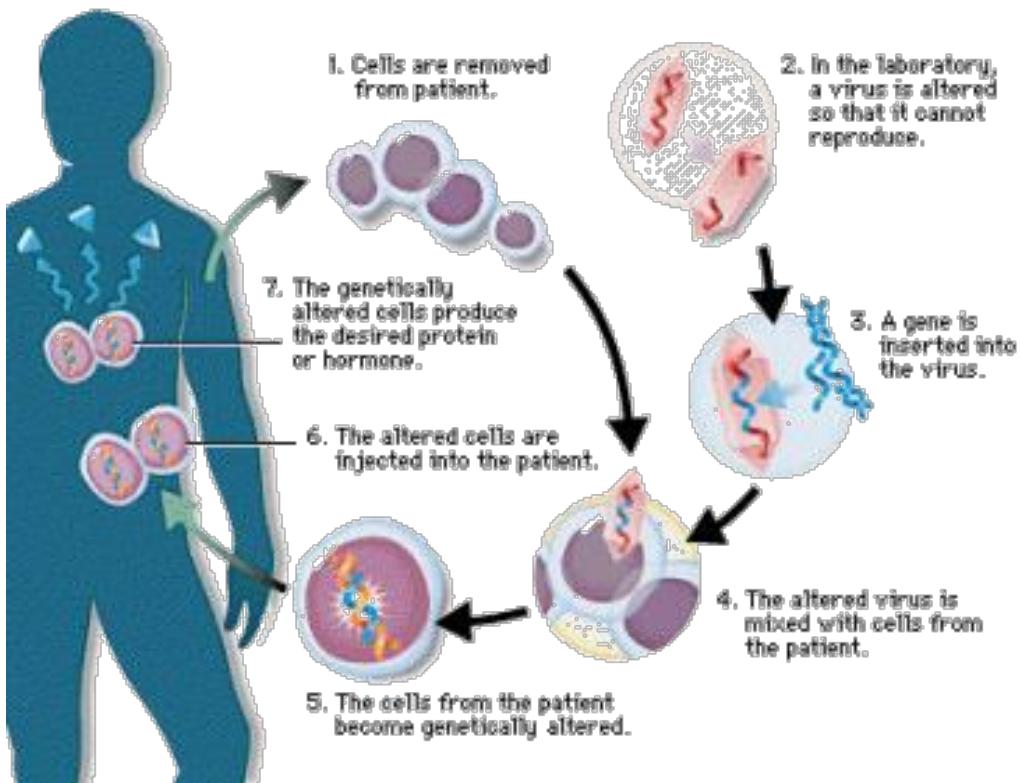
Mari kita kembai memahami mengenai prinsip terapi gen. Terdapat 2 macam terapi gen, yaitu *Germline Gene Therapy* dan *Somatic Gene Therapy*. Pada *germline gene therapy*, penggunaannya masih menimbulkan reaksi pro dan kontra terkait dengan jenis sel yang digunakannya. Gen yang digunakan akan dimasukkan ke dalam sel serma, sel telur maupun sel telur yang telah terfertilisasi (fase blastosis), sehingga hasil *editing gene* ini akan terekspresi pada keturunan. Menurut kalian, bagaimanakan kontroversi metode ini? Bagaimana pendapat pihak- pihak yang pro dan kontra dengan metode ini?



Gambar 2 Germline gene therapy

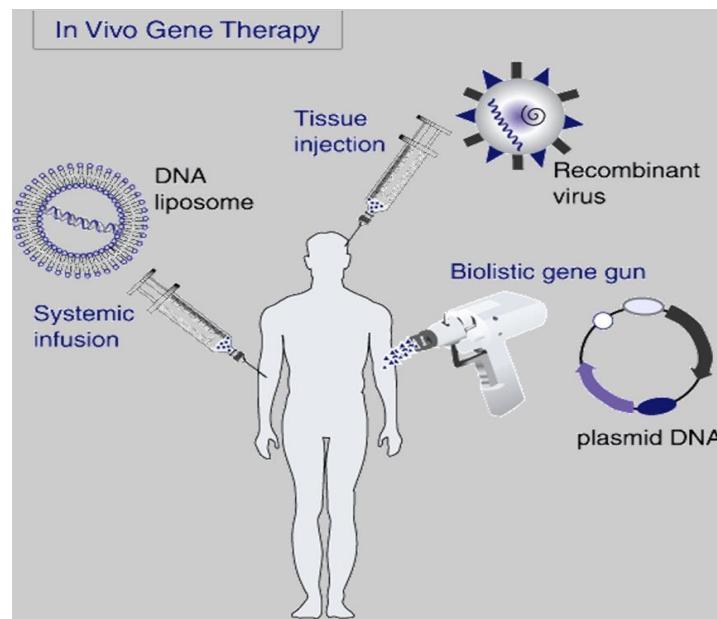
Pada Somatic gene therapy, gen yang digunakan akan dimasukkan pada sel-sel tubuh. Tentu saja target selnya tertentu atau spesifik. Karena itu, hasil editing gene tidak akan diturunkan ke anak atau keturunan. Hal ini berbeda dengan *germline gene therapy*. Metode *somatic gene therapy* ini dianggap aman dibandingkan dengan *germline gene therapy* karena tidak diturunkan ke anak. Namun metode ini memiliki kelemahan yaitu masa kerja gen yang tidak lama karena adanya proses apoptosis. Selain itu terdapat tantangan yaitu proses memasukkan gen ke dalam sel yang tidak mudah. Telah dijelaskan di atas bahwa sel kita akan menyeleksi molekul-molekul apa saja yang dapat masuk dan keluar dari dalam sel.

Terdapat berbagai macam pendekatan yang dilakukan dalam *somatic gene therapy* ini. Pertama adalah dengan mekanisme *ex vivo*. Pada mekanisme ini, sel dari penderita akan diambil, kemudian dimodifikasi di dalam laboratorium dan setelah itu dikembalikan lagi ke dalam tubuh penderita.



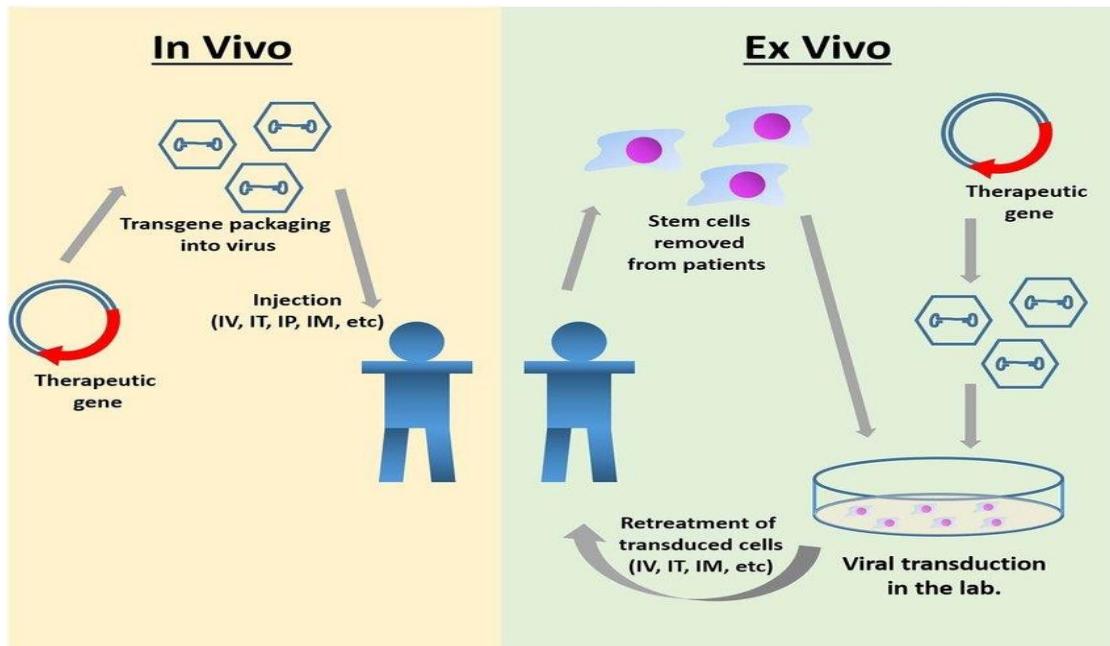
Gambar 3 Mekanisme ex vivo yang dilakukan pada somatic gene therapy

Meskipun secara teori mekanisme ini terdengar mudah, namun dalam praktiknya, perlu dilakukan optimasi kondisi modifikasi, pemilihan vektor dan-lain yang cukup rumit. Mekanisme yang kedua dalam *somatic gene therapy* adalah mekanisme *in situ*. Mekanisme ini dilakukan dengan cara memasukkan gen secara langsung ke dalam jaringan target, seperti memasukkan gen pada trachea dan bronkus pada penderita kistik fibrosis. Kemudian mekanisme ketiga adalah mekanisme *in vivo*. Hampir mirip dengan *in situ*, maka pada *in vivo* gen akan dimasukkan ke dalam tubuh melalui suntikan ke aliran darah. Beberapa referensi yang menyebutkan mekanisme *in situ* itu sama dengan *in vivo*.



Gambar 4 Mekanisme in situ, memasukkan gen secara langsung ke tubuh penderita melalui suntikan ke aliran darah atau bisa dengan gene gun.

Jika dilihat, maka terdapat perbedaan yang jelas antara mekanisme *ex vivo* dan *in vivo*. Jika mekanisme *ex vivo* sel diambil dari penderita, sedangkan pada mekanisme *in vivo* maka tidak dilakukan pengambilan sel dari penderita namun gen dimasukkan langsung ke dalam tubuh dengan berbagai cara (Gambar 11).



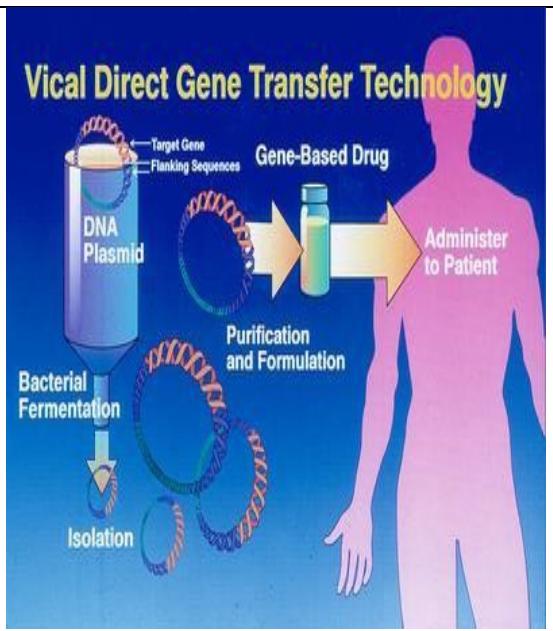
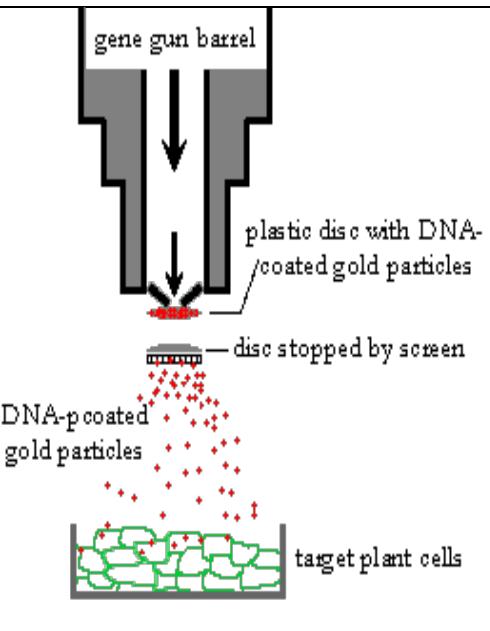
Gambar 5 Perbedaan antara mekanisme *ex vivo* dan *in vivo* pada somatic gene therapy.

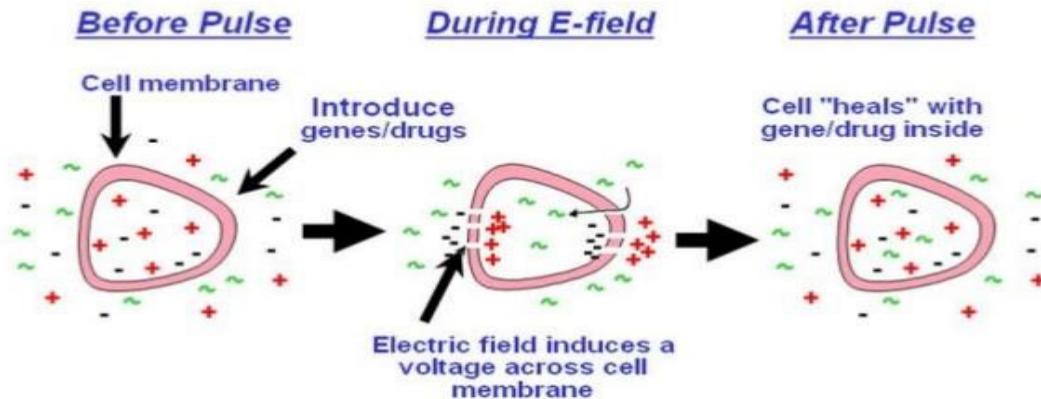
Terdapat 2 cara untuk *gene delivery* ini : (1) menggunakan vektor virus; dan (2) mekanisme penghantaran non-virus. Virus digunakan sebagai vektor karena kemampuannya dalam menginfeksi sel. Sehingga diharapkan virus dapat mengantarkan gen

ke dalam sel secara efektif. Untuk keamanannya maka gen yang berperan dalam perbanyak virus dihilangkan, sehingga tidak menimbulkan penyakit baru. Sampai saat ini, penelitian mengenai uji keamanan masih terus dilakukan. Beberapa contoh vektor virus yang bisa digunakan dalam terapi gen adalah :

- Vektor retrovirus dapat mengantarkan gen ke sel-sel yang sedang membelah.
- Vektor adenovirus dapat digunakan untuk mengantarkan gen ke beberapa macam sel (*low specificity*).
- Vektor Adeno-Associated Virus (AAV) memiliki patogenesitas dan tingkat replikasi yang rendah sehingga lebih aman dibandingkan dengan vektor adenovirus.
- Vektor Herpes Simplex Virus (HSV) sangat berpotensi untuk mengantarkan gen ke sel-sel saraf, kanker dan tumor.
- Vektor Lentivirus dapat mengantarkan gen ke sel-sel yang tidak membelah.
- Vektor Poxvirus mampu mengantarkan gen yang berukuran besar.

Untuk penghantaran gen tanpa virus (non virus) bisa dilakukan dengan 1) memasukkan DNA telanjang (naked DNA), 2) menggunakan gene gun; 3) elektroporas; 4) Ultrasound dan 5) liposom. Untuk metode memasukkan DNA telanjang (naked DNA) bisa dilakukan dengan injeksi secara langsung pada jaringan target. Namun, efisiensi penghantaran dengan metode ini rendah, karena DNA telanjang mudah sekali rusak (terdegradasi) oleh enzim-enzim DNase pada tubuh kita maupun dari proses kerja metode ini.

 <p><b>Viral Direct Gene Transfer Technology</b></p> <p>Target Gene Flanking Sequences</p> <p>Gene-Based Drug</p> <p>Administer to Patient</p> <p>Bacterial Fermentation</p> <p>Isolation</p> <p>Purification and Formulation</p>	 <p>gene gun barrel</p> <p>plastic disc with DNA-coated gold particles</p> <p>disc stopped by screen</p> <p>DNA-coated gold particles</p> <p>target plant cells</p>
<p>Gambar 6 Terapi Gen Secara Langsung</p>	<p>Gambar 7 Transfer Gen dengan Gun Gene</p>



Gambar 8 Proses eletroporasi untuk penghantaran gen ke dalam sel.

Pada metode elektroporasi, dilakukan destabilisasi membran sel dengan arus listrik, sehingga DNA yang terdapat di luar sel dapat masuk ke dalam sel. Prinsip yang sama bisa juga dilakukan dengan menggunakan gelombang suara, bukan listrik. Jika ini yang dilakukan, maka metodenya disebut dengan mekanisme ultrasound. Meskipun aman, tetapi diketahui bahwa penghantaran gen yang terjadi efisiensinya cukup rendah.

<p>Ultrasound</p> <p>Popped microbubble</p> <p>Cationic microbubble</p> <p>DNA entering cell</p>	<p>Hydrophilic drug</p> <p>DNA/RNA/siRNA</p> <p>Brush regime (High PEG density)</p> <p>Mushroom regime (Low PEG density)</p> <p>Crystalline drug</p> <p>Hydrophobic drug</p> <p>Targeting ligand (▲)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Protein</li> <li>Antibody</li> <li>Peptide</li> <li>Carbohydrate</li> <li>Small molecule</li> </ul>
<p>Gambar 9 Mekanisme Trasnfer Gen dengan Ultrasound</p>	<p>Gambar 10 Mekanisme Transfer Gen dengan Liposom</p>

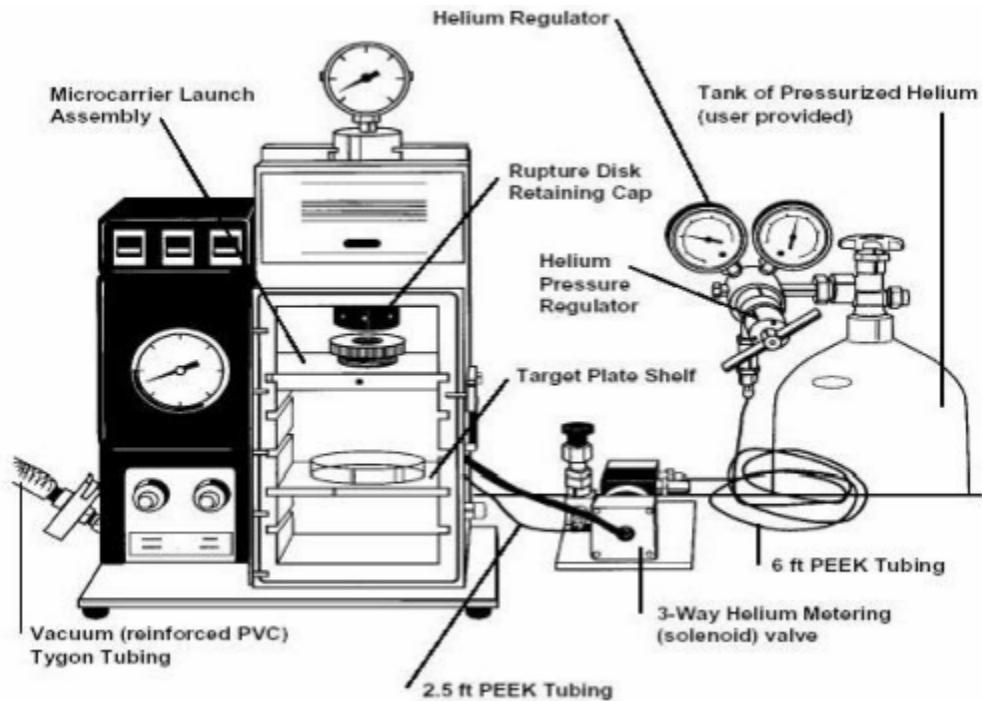
Terakhir adalah metode dengan menggunakan liposom. Liposom ini adalah lipid yang membungkus DNA yang akan dimasukkan ke dalam sel. Liposom ini kemudian dimasukkan ke dalam sel dengan ultrasound. Banyak penelitian mendapatkan hasil yang positif dengan metode ini. Sehingga metode ini merupakan metode yang menjanjikan untuk *gene delivery*.

### C. Transfer Gen dengan Gun Gene

Metode bombardir partikel yang merupakan salah satu teknologi untuk memasukkan gen asing ke dalam sel dikembangkan oleh John Sanford dan rekan-rekannya di Universitas Cornell di Amerika Serikat. Teknik ini melibatkan percepatan partikel berlapis DNA

(mikroprojektil) langsung ke jaringan atau sel yang utuh. Pengemboman partikel menggunakan proyektil mikro berkecepatan tinggi untuk mengirimkan zat ke dalam sel dan jaringan. Untuk transformasi genetik, DNA asing dilapisi ke permukaan partikel tungsten atau emas berukuran mikron dengan presipitasi dengan kalsium klorida dan spermidina. Begitu berada di dalam sel, DNA asing mencapai nukleus, maka ekspresi sementara kemungkinan akan terjadi dan transgen dapat dimasukkan secara stabil ke dalam kromosom inang. Sistem regenerasi harus diterapkan untuk mendapatkan tanaman muda yang dimodifikasi secara genetik.

Dalam teknik ini, DNA asing terdiri dari daerah pengkodean gen tertentu antara promotor dan terminator serta beberapa basa DNA terminal. Sanford dan rekan-rekannya di Universitas Cornell mengembangkan konsep pemboman asli dan menciptakan istilah "biolistics" (kependekan dari "biological ballistics") untuk proses dan perangkat tersebut. Namun, beberapa nama kini digunakan untuk perangkat tersebut seperti "gene guns" atau "particle guns" dan untuk proses seperti pemboman partikel, percepatan partikel, atau balistik. Perangkat yang paling banyak digunakan untuk transformasi tanaman adalah Sistem Pengiriman Partikel Biolistic® PDS-1000/He yang dipasarkan oleh Bio-Rad Laboratories.

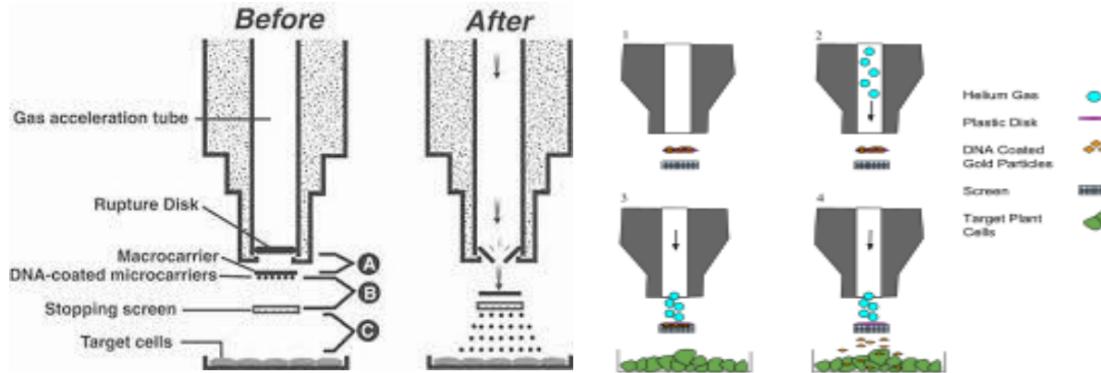


Gambar 11 Gune gen/ Biolistic bombardmen

### Cara Kerja Gun Gune

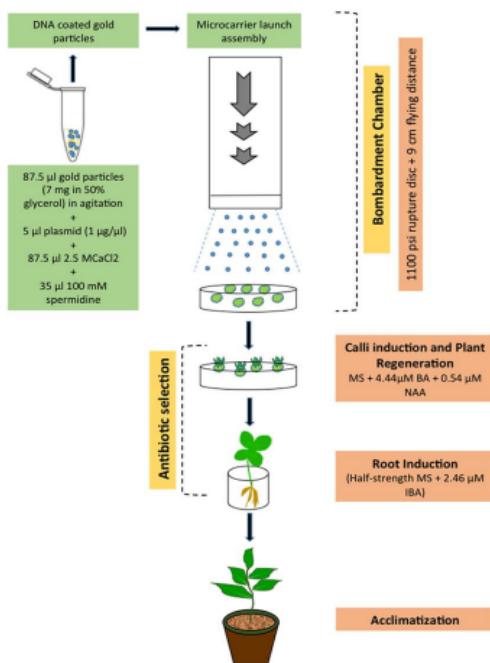
Tabung percepatan gas diisi dengan gas helium hingga tekanan maksimum cakram yang pecah tercapai. Ketika cakram pecah, gelombang kejut helium yang terjadi kemudian meluncurkan makropembawa plastik yang di atasnya mikropembawa berlapis DNA (partikel logam berlapis DNA) telah dikeringkan. Makropembawa terbang ke bawah hingga

menabrak layar penghenti. Saat terjadi benturan, makropembawa tertahan oleh layar penghenti, sementara mikropembawa diluncurkan dan terus turun dengan kecepatan tinggi hingga menabrak dan menembus sel target. Kecepatan makropembawa bergantung pada tekanan helium dalam tabung percepatan gas, jarak dari cakram yang pecah ke makropembawa (jarak celah) (A), jarak tempuh makropembawa ke layar penghenti (B), jarak antara layar penghenti dan sel target (C), dan jumlah vakum di ruang pemboman.



Gambar 12 Model kerja Gune Gene

Karena sifat fisik dan metodologinya yang sederhana, proses biolistik dapat digunakan untuk memasukkan zat ke dalam berbagai sel dan jaringan utuh dari berbagai organisme. Dalam penelitian tanaman, aplikasi utamanya adalah studi ekspresi gen sementara, produksi tanaman hasil transformasi genetik, inokulasi tanaman dengan patogen virus, transformasi kloroplas dan mitokondria, serta transformasi nuklir spesies monokotil penting seperti gandum, jagung, dan beras.



Gambar 13 Contoh Transfer Gen Antibiotik pada Tumbuhan

#### Faktor-faktor yang memengaruhi efisiensinya

Seperti halnya metode transformasi tanaman lainnya, beberapa parameter perlu dioptimalkan agar prosesnya efektif secara maksimal. Efisiensi proses sangat bergantung pada jenis, ukuran, dan kecepatan pembawa mikro. Selain itu, jumlah pemboman dan faktor-faktor yang berkaitan dengan jaringan tanaman (faktor biologis) memengaruhi keberhasilan proses.

- Jenis dan ukuran partikel

Partikel emas sering kali lebih disukai daripada partikel tungsten karena ukurannya lebih bulat dan seragam. Partikel ini secara biologis inert, tidak beracun, dan tidak merusak ikatan DNA. Di sisi lain, partikel tungsten sangat heterogen dalam ukuran dan bentuk, berpotensi beracun bagi beberapa jenis sel, dan mengalami oksidasi permukaan.

Partikel ini juga dapat mengasamkan dan merusak ikatan DNA. Namun, ada beberapa laporan tentang keberhasilan penerapan partikel tungsten dalam transformasi sel tanaman. Namun, sebagian besar peneliti telah menggunakan partikel emas untuk pengiriman gen ke jaringan tanaman. Ukuran partikel memiliki efek yang mendalam pada keberhasilan pemboman: partikel yang terlalu kecil akan memiliki kemampuan penetrasi yang rendah sehingga mengurangi jumlah sel yang ditransformasi. Pada saat yang sama, partikel yang terlalu besar akan menyebabkan peningkatan kerusakan jaringan dan selanjutnya memengaruhi regenerasi tunas.

- Kecepatan partikel

Kecepatan pembawa mikro juga sangat memengaruhi efisiensi proses. Kecepatan dapat dikontrol, terutama, melalui optimalisasi tekanan helium. Gelombang kejut helium digunakan untuk mendorong cakram pembawa makro plastik yang membawa DNA yang dilapisi dengan mikropartikel menuju jaringan target. Kemampuan mikropartikel untuk menembus berbagai lapisan sel atau jenis jaringan sangat bergantung pada gaya dorong gas helium (tekanan helium). Tekanan yang lebih rendah menyebabkan kemampuan penetrasi mikropartikel yang buruk sementara tekanan yang tinggi dapat merusak jaringan.

Dua faktor lain dapat dimanipulasi untuk mengendalikan kecepatan. Yang pertama adalah jarak terbang makrokarrier ke layar penghenti dan yang kedua adalah jarak dari layar penghenti ke jaringan target. Jarak yang ditempuh makrokarrier memengaruhi dampak makrokarrier pada layar penghenti dan akibatnya kecepatan mikrokarrier yang dilepaskan menuju jaringan target. Tercatat bahwa semakin jauh jaraknya, semakin tinggi kecepatan yang dicapai. Jarak pendek memberikan gaya dorong yang tidak cukup untuk menembus jaringan target sementara jarak jauh dikaitkan dengan ketidakstabilan makrokarrier yang mengakibatkan variabilitas dan distribusi mikrokarrier yang tidak merata. Akhirnya, tercatat bahwa jarak jauh dari layar penghenti ke jaringan memberikan gaya penetrasi yang berkurang dan dengan demikian lebih sedikit sel yang menerima DNA yang datang. Jangkauan tertutup mengakibatkan kerusakan jaringan besar-besaran seperti yang dicontohkan oleh frekuensi dislokasi jaringan yang tinggi selama pemboman.

- Jumlah pemboman

Peningkatan jumlah pemboman secara signifikan menciptakan cedera mekanis pada jaringan. Jadi, dengan meningkatkan jumlah tembakan, niscaya akan meningkatkan cedera pada target sehingga mengurangi jumlah sel yang bertahan hidup. Keuntungan dari beberapa pemboman adalah sebagai kompensasi dari kesalahan tembak pertama yang kecil yang terjadi selama penembakan.

- Jumlah DNA yang digunakan dalam pemboman

Perlu disebutkan bahwa jumlah DNA yang digunakan dalam pemboman juga harus dioptimalkan untuk menghindari penyisipan gen target dengan jumlah salinan tinggi yang bertanggung jawab atas pembungkaman gen tersebut pada generasi berikutnya.

- Parameter biologis

Parameter biologis meliputi jenis jaringan, ukuran sel, usia kultur sel, kesehatan sel secara umum, toleransi target terhadap vakum, kepadatan sel, dan tekanan turgor sel juga harus dioptimalkan. Manipulasi tekanan osmotik media yang mendukung jaringan target untuk mengurangi tekanan turgor dalam sel membantu menghindari kebocoran setelah gelombang kejut yang tercipta selama pemboman. Selain itu, beberapa eksplan mungkin memerlukan periode "penyembuhan" setelah pemboman dengan pengaturan khusus cahaya, suhu, dan kelembaban.

- Integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman

Mayoritas peristiwa integrasi terjadi di daerah telomerik dan subtelomerik, yang biasanya kaya akan gen. Setelah penetrasi sel oleh partikel logam, respons luka tanaman menyebabkan keberadaan enzim perbaikan DNA (nuklease, topoisomerase, dan ligase) yang bersama-sama dengan sejumlah besar DNA eksogen akan mensponsori degradasi DNA yang masuk dan penggabungan ujung-ujung bebas. Ini menghasilkan susunan kompleks dan variabel yang mengandung transgen utuh dan yang telah disusun ulang. Susunan tersebut kemudian akan bertindak sebagai substrat untuk integrasi. Integrasi diusulkan terjadi pada pemutusan kromosom yang terjadi secara alami. Hal ini didukung oleh prevalensi penataan ulang kromosom, misalnya translokasi dan penghapusan, di lokasi integrasi transgen.

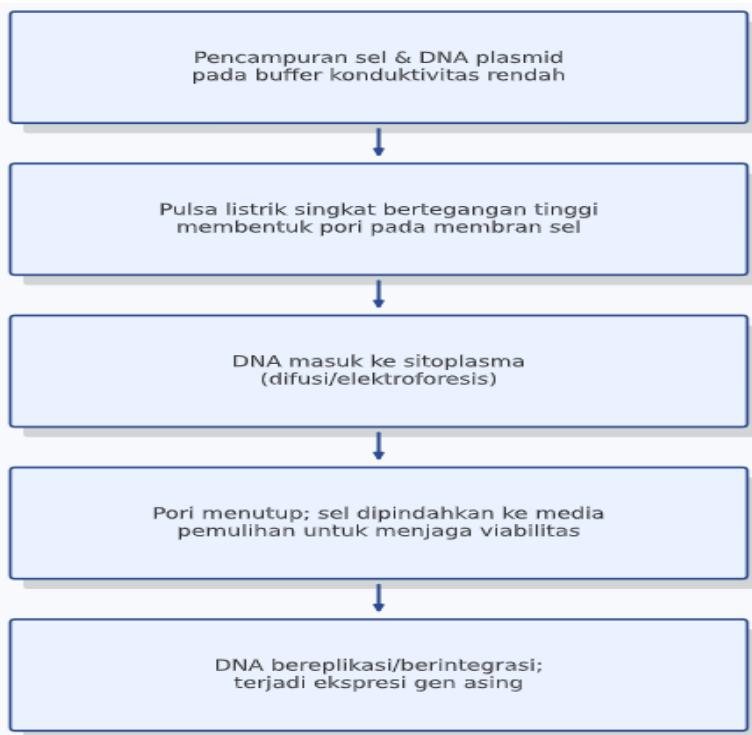
## D. Transfer Gen dengan Elektroporasi

### Pengertian dan Prinsip Kerja Elektroporasi

Elektroporasi adalah teknik fisika-biologis yang digunakan untuk meningkatkan permeabilitas membran sel dengan cara memberikan pulsa listrik bertegangan tinggi dalam waktu singkat, sehingga terbentuk pori-pori sementara (*transient pores*) pada membran lipid bilayer (Neumann et al., 1982; Tsong, 1989). Pori-pori ini bersifat reversibel, sehingga setelah pulsa dihentikan, membran dapat menutup kembali dan sel tetap hidup. Mekanisme ini memungkinkan masuknya molekul-molekul besar seperti DNA, RNA, protein, atau obat yang umumnya tidak dapat melewati membran secara normal (Weaver, 1995). Dalam bioteknologi modern, elektroporasi digunakan secara luas untuk transfer gen, baik pada bakteri, sel ragi, sel tanaman (protoplas), maupun sel mamalia. Dibandingkan dengan metode transformasi lain, elektroporasi menawarkan efisiensi tinggi dan dapat

diaplikasikan pada berbagai tipe sel, sehingga menjadikannya metode pilihan dalam rekayasa genetika, terapi gen, dan produksi organisme transgenik (Dower, Miller, & Ragsdale, 1988; Chen et al., 2010).

Prinsip kerja elektroporasi berhubungan dengan perubahan potensial transmembran (*transmembrane potential, TMP*) akibat aplikasi medan listrik eksternal. Ketika medan listrik dikenakan pada sel, TMP meningkat secara proporsional dengan tegangan dan ukuran sel. Jika TMP melebihi ambang kritis (sekitar 0,5–1 V), struktur membran lipid mengalami reorganisasi sehingga terbentuk pori sementara (Weaver, 1995; Chen et al., 2010). Ada beberapa prinsip kerja elektroporasi dalam transfer gen dapat dijelaskan sebagai berikut:



Gambar 14 Urutan Prinsip Kerja Transfer Gen dengan Elektroporasi

### Sejarah Perkembangan Transfer Gen dengan Elektroporasi

Elektroporasi adalah teknik yang digunakan untuk meningkatkan permeabilitas membran sel melalui aplikasi pulsa listrik bertegangan tinggi dalam waktu singkat, sehingga terbentuk pori-pori sementara (*transient pores*) pada lapisan lipid bilayer (Neumann et al., 1982; Tsong, 1989). Pori-pori ini memungkinkan molekul besar yang biasanya tidak dapat melewati membran, seperti DNA, RNA, protein, atau obat-obatan, masuk ke dalam sitoplasma. Setelah pulsa dihentikan, membran kembali ke keadaan normal, dan sel tetap hidup dengan membawa molekul asing tersebut.

#### - Awal Konsep Elektroporasi (1950-1970-an)

Konsep dasar elektroporasi muncul dari pengamatan awal terhadap membran biologis pada pertengahan abad ke-20. Pada 1950-an, para peneliti melaporkan bahwa membran

lipid bilayer dapat mengalami perubahan konduktivitas ketika dikenai medan listrik tinggi, fenomena yang dikenal sebagai *dielectric breakdown* (Kinosita & Tsong, 1977). Penelitian pada sel darah merah menunjukkan bahwa molekul kecil dapat melewati membran setelah stimulasi listrik, dan sebagian besar sel tetap hidup, menandakan bahwa pori yang terbentuk bersifat reversibel (Tsong, 1989). Inilah cikal bakal pemahaman tentang elektroporasi sebagai teknik transfer molekul ke dalam sel.

- **Era Eksperimen Awal (1970–1980-an)**

Pada 1970-an, ilmuwan mulai mengeksplorasi kemungkinan menggunakan pulsa listrik untuk memasukkan DNA ke dalam sel eukariot. Neumann dkk. (1982) melaporkan keberhasilan pertama transfer plasmid DNA ke sel mamalia dengan efisiensi signifikan menggunakan medan listrik terkontrol. Artikel tersebut dianggap sebagai tonggak lahirnya elektroporasi modern, dan istilah *electroporation* mulai digunakan secara resmi di literatur ilmiah (Neumann, Schaefer, Wang, & Hofsneider, 1982).

- **Perkembangan Teknologi dan Komersialisasi (1980–1990-an)**

Perkembangan bioteknologi rekombinan pada 1980-an mendorong penggunaan elektroporasi secara luas. Transformasi bakteri *Escherichia coli* dengan plasmid rekombinan menggunakan elektroporasi terbukti memiliki efisiensi lebih tinggi dibanding metode *heat shock* (Dower, Miller, & Ragsdale, 1988). Pada tanaman, protoplas dapat ditransformasi dengan gen resistensi herbisida melalui elektroporasi (Fromm, Taylor, & Walbot, 1986). Peralatan elektroporator komersial mulai diproduksi, memungkinkan laboratorium di seluruh dunia mengakses teknologi ini dengan parameter yang lebih konsisten.

- **Ekspansi Aplikasi Bioteknologi (1990–2000-an)**

Pada dekade 1990-an, elektroporasi berkembang pesat untuk kebutuhan riset dasar, industri, dan medis. Dalam mikrobiologi, teknik ini digunakan untuk menciptakan strain rekayasa genetika yang dipakai dalam produksi protein terapeutik. Pada bidang medis, konsep *electro-gene therapy* diperkenalkan, di mana plasmid DNA ditransfer ke jaringan hidup dengan bantuan pulsa listrik (Heller & Heller, 2006). Penelitian praklinis menunjukkan bahwa ekspresi protein meningkat signifikan bila DNA disuntikkan dengan kombinasi elektroporasi dibanding tanpa perlakuan listrik (Aihara & Miyazaki, 1998).

- **Era Modern dan Integrasi dengan Biomedis (2000-sekarang)**

Memasuki abad ke-21, elektroporator modern dilengkapi kontrol komputer dengan kemampuan multi-pulse, serta teknologi *nanosecond pulsed electric fields* (nsPEFs) yang memungkinkan terbentuknya pori sangat kecil dengan kerusakan minimal (Beebe et al., 2003). Aplikasi klinis mencakup electrochemotherapy, yakni kombinasi obat sitotoksik dengan pulsa listrik untuk terapi kanker, yang kini telah digunakan di Eropa dan negara lain (Mir et al., 1998; Gothelf, Gehl, & Mir, 2003). Selain itu, elektroporasi juga menjadi platform utama dalam pengembangan vaksin DNA, termasuk untuk penyakit menular seperti HIV dan COVID-19 (Yamamoto et al., 2010; Sardesai & Weiner, 2011).

## Alat dan Bahan Dalam Praktikum Elektroporasi

- **Elektroporator**

Elektroporator adalah perangkat utama dalam teknik elektroporasi yang berfungsi menghasilkan pulsa listrik bertegangan tinggi dalam waktu singkat. Pulsa listrik ini digunakan untuk meningkatkan potensial transmembran sehingga terbentuk pori sementara pada membran sel (Neumann et al., 1982). Elektroporator modern dilengkapi dengan pengaturan tegangan, kapasitansi, resistansi, serta mode pulsa tunggal (*single pulse*) maupun ganda (*multi-pulse*), sehingga dapat disesuaikan untuk berbagai jenis sel. Beberapa model juga dilengkapi dengan kontrol digital untuk memastikan reproduksibilitas hasil (Weaver, 1995).

- **Kuvet Elektroporasi**

Kuvet adalah wadah khusus yang digunakan untuk menempatkan suspensi sel dan DNA selama proses elektroporasi. Kuvet terbuat dari bahan plastik isolator dengan elektroda logam (biasanya aluminium atau platinum) pada kedua sisi yang berfungsi menghantarkan medan listrik (Fromm, Taylor, & Walbot, 1986). Ukuran kuvet umumnya bervariasi, dengan jarak antar elektroda 0,1 cm, 0,2 cm, hingga 0,4 cm. Pemilihan ukuran kuvet tergantung pada jenis sel yang digunakan dan intensitas medan listrik yang dibutuhkan. Misalnya, kuvet 0,1 cm digunakan untuk bakteri dengan kebutuhan medan listrik tinggi (12–25 kV/cm), sedangkan kuvet 0,4 cm lebih cocok untuk sel mamalia yang lebih sensitif (0,5–2 kV/cm) (Chen et al., 2010). Sterilisasi kuvet sangat penting untuk mencegah kontaminasi. Selain itu, kuvet harus benar-benar kering sebelum digunakan karena adanya tetesan air dapat menyebabkan percikan listrik (*arcung*) yang merusak sampel dan alat.

- **Larutan Buffer Elektroporsi**

Larutan buffer digunakan untuk menyiapkan suspensi sel dan DNA selama elektroporasi. Buffer harus memiliki konduktivitas rendah untuk mencegah pelepasan energi panas berlebih akibat arus listrik (Tsong, 1989). Umumnya digunakan larutan berbasis sukrosa, sorbitol, atau manitol yang bersifat nonionik untuk menjaga tekanan osmotik dan mencegah lisis sel. Komposisi buffer dapat bervariasi tergantung jenis sel. Pada bakteri, buffer berbasis sukrosa sering digunakan, sedangkan pada protoplas tanaman ditambahkan kalsium klorida untuk menstabilkan membran.

- **DNA Plasmid**

DNA plasmid merupakan materi genetik yang paling sering ditransfer melalui elektroporasi. Plasmid adalah molekul DNA sirkuler berukuran kecil hingga menengah (2–15 kb) yang dapat bereplikasi secara independen di dalam sel bakteri maupun eukariot (Neumann et al., 1982). Kualitas DNA sangat berpengaruh terhadap keberhasilan transformasi. DNA plasmid harus memiliki kemurnian tinggi dengan konsentrasi optimal (biasanya 10–100 ng/μL) dan bebas dari kontaminasi protein atau garam. Kandungan garam yang tinggi dapat menyebabkan arcing dalam kuvet, yang berakibat fatal bagi sel (Dower, Miller, & Ragsdale, 1988).

- **Sel Target**

Jenis sel target sangat menentukan parameter elektroporasi yang digunakan. Pada bakteri seperti *Escherichia coli*, proses elektroporasi relatif sederhana dan sangat efisien, sehingga sering digunakan dalam kloning DNA rekombinan (Hanahan, 1983). Pada tanaman, elektroporasi dilakukan pada protoplas—sel yang dinding selulosenya

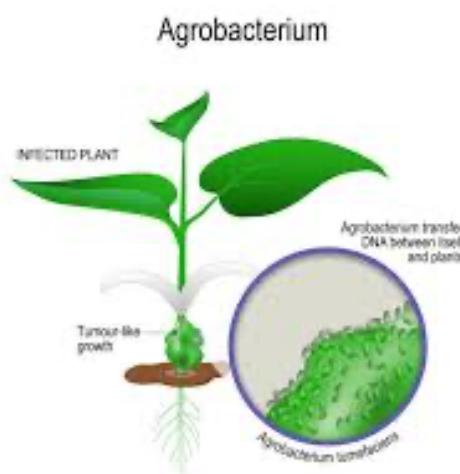
telah dihilangkan—untuk memungkinkan DNA menembus membran plasma (Fromm, Taylor, & Walbot, 1986). Pada sel mamalia, elektroporasi banyak digunakan untuk transfeksi plasmid DNA atau RNA dalam studi ekspresi gen maupun terapi gen. Namun, karena sel eukariot lebih sensitif, parameter seperti tegangan dan lama pulsa harus dioptimasi agar viabilitas tetap terjaga (Aihara & Miyazaki, 1998). Selain bakteri, tanaman, dan sel mamalia, elektroporasi juga dapat diaplikasikan pada ragi, protozoa, hingga jaringan kompleks. Hal ini menunjukkan fleksibilitas teknik ini dalam berbagai bidang bioteknologi dan biomedis.

## E. Transfer Gen dengan *Agrobacterium tumeficien*

### Peran *Agrobacterium tumefaciens* dalam Biologi Molekuler

*Agrobacterium tumefaciens* adalah bakteri tanah Gram-negatif yang dikenal sebagai agen penyebab penyakit crown gall pada tanaman dikotil. Keunikan bakteri ini adalah kemampuannya mentransfer segmen DNA khusus, yang disebut T-DNA (transfer DNA), dari plasmid tumor-inducing (Ti plasmid) ke dalam genom sel tanaman inang (Zupan et al., 2000). Integrasi T-DNA ke dalam kromosom tanaman menyebabkan sel tanaman berubah sifat, membentuk tumor, dan mensintesis senyawa khusus (*opines*) yang dapat dimanfaatkan oleh *Agrobacterium* sebagai sumber karbon dan nitrogen (Gelvin, 2003).

Fenomena transfer gen alami ini menjadikan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai salah satu organisme pertama yang diketahui melakukan horizontal gene transfer lintas kingdom, yaitu dari prokariot ke eukariot. Oleh karena itu, bakteri ini dipandang sebagai “nature’s genetic engineer” dalam biologi molekuler tanaman (Escobar & Dandekar, 2003). Kemampuan alami ini kemudian dimanfaatkan oleh peneliti untuk mengembangkan sistem transformasi genetik dengan memodifikasi plasmid Ti. Gen-gen penyebab tumor dihilangkan (*disarmed*), lalu digantikan dengan gen of interest (misalnya gen ketahanan hama, toleransi herbisida, atau peningkatan nutrisi). Dengan demikian, *Agrobacterium* berfungsi sebagai vektor alami untuk transfer DNA rekombinan ke tanaman.



Gambar 15 Tumor Pada Tumbuhan yang disebabkan *Agrobacterium tumefaciens*

### Gambar 21. Tumor Pada Tumbuhan yang disebabkan *Agrobacterium tumifaciens*

Penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai alat transfer gen memiliki arti penting dalam bioteknologi tanaman karena memungkinkan pembuatan tanaman transgenik secara lebih efisien dan stabil dibandingkan metode fisik (misalnya biolistika). Beberapa alasan utama mengapa teknik ini penting adalah:

- Efisiensi dan stabilitas Integrasi Gen

T-DNA yang dibawa oleh *Agrobacterium* terintegrasi secara relatif stabil ke dalam kromosom tanaman, sehingga gen asing dapat diturunkan secara konsisten ke generasi berikutnya (Gelvin, 2003).

- Cakupan spesies tanaman yang Luas

Awalnya hanya efektif pada dikotil, kini teknik ini juga dapat digunakan untuk monokotil (seperti padi, jagung, dan gandum) dengan protokol khusus (Hiei et al., 1994).

- Biaya Lebih Rendah dan Prosedur yang Lebih Mudah

Dibandingkan dengan *gene gun*, metode *Agrobacterium* lebih murah, lebih sederhana, dan membutuhkan peralatan laboratorium yang relatif standar.

- Aplikasi luas pada bioteknologi pertanian

Banyak varietas tanaman transgenik komersial dihasilkan melalui metode ini, misalnya:

- o Kedelai tahan herbisida (*Roundup Ready soybean*)
- o Kapas dan jagung Bt tahan hama (*Bacillus thuringiensis*)
- o Golden Rice dengan peningkatan kandungan β-karoten (Ye et al., 2000).

- Kontribusi pada ketahanan pangan dan pertanian berkelanjutan

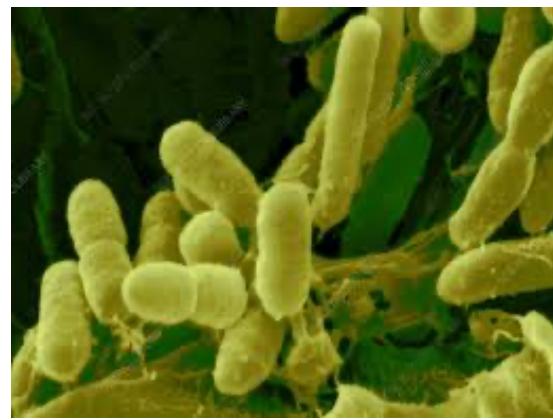
Tanaman transgenik hasil transformasi *Agrobacterium* telah membantu meningkatkan hasil panen, mengurangi penggunaan pestisida, serta memberikan kontribusi pada upaya mengatasi kekurangan gizi melalui biofortifikasi (ISAAA, 2018).

### Karakteristik *Agrobacterium tumefaciens*

Sel berbentuk batang (rod), motil dengan seikat flagela yang terlokalisasi di kutub/sub-kutub (umumnya 4–6), aerob obligat, mesofilik, tidak membentuk spora. Rentang pertumbuhan tipikal 10–30 °C (tidak tumbuh pada 5 °C dan 41 °C). Data kultur tipe menunjukkan sifat Gram-negatif yang konsisten, motilitas positif, serta kandungan GC genom sekitar 61–62 mol%. Temuan ini mendukung peran motilitas/kemotaksis pada tahap awal pelekatan dan pembentukan biofilm. Bakteri ini hidup di tanah/rizosfer dan menginfeksi jaringan terluka pada berbagai dikotil (dan kini beberapa monokotil dapat ditransformasi dengan optimasi protokol), sehingga ia penting dalam patologi tanaman dan bioteknologi.

### Tingkatan Takson *Agrobacterium tumefaciens*

Domain	:	Bakteri
Filum	:	Pseudomonadota
Kelas	:	Alphaproteobacteria
Ordo	:	Hyphomicrobiales/Rhizobiales
Famili	:	Rhizobiaceae
Genus	:	<i>Agrobacterium</i>
Spesies	:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>



Gambar 16 *Agrobacterium tumefaciens*

### Struktur Ti Plasmid (*Tumor-Inducing Plasmid*)

Keunikan *A. tumefaciens* tidak lepas dari keberadaan plasmid besar yang disebut Ti plasmid (*Tumor-inducing plasmid*), berukuran sekitar 200 kb. Struktur Ti plasmid terdiri dari beberapa elemen penting (Zupan et al., 2000; Gelvin, 2003):

- T-DNA (Transfer DNA)
  - o Segmen DNA sepanjang  $\pm$ 20–25 kb yang ditransfer ke sel tanaman.
  - o Berisi gen penginduksi tumor (auksin dan sitokin) serta gen penyandi biosintesis opine.
  - o Dibatasi oleh *border sequences* kanan dan kiri yang diperlukan untuk proses transfer.
- Gen Virulensi (*vir genes*)
  - o Mengkode protein-protein yang diperlukan untuk pemotongan T-DNA, pembentukan kompleks transfer, dan pengiriman ke sel tanaman.
  - o Terdapat pada region vir plasmid Ti.
- Gen Opine Catabolism
  - o Mengkode enzim untuk metabolisme opine yang diproduksi oleh sel tanaman transforman.
  - o Jenis opine yang dihasilkan (misalnya nopaline, octopine) menentukan klasifikasi Ti plasmid.
- Region Replication dan Conjugation
  - o Berperan dalam replikasi plasmid di dalam bakteri serta transfer plasmid antar bakteri *Agrobacterium*.

Struktur kompleks Ti plasmid inilah yang menjadi dasar pengembangan plasmid rekayasa (disarmed Ti plasmid) dan binary vector system yang banyak digunakan dalam transformasi tanaman modern (Komari et al., 1996).

### Prosedur Transfer Gen dengan *Agrobacterium tumefaciens*

- Persiapan Kultur *Agrobacterium tumefaciens*

- Strain dan vector  
Gunakan strain *Agrobacterium* yang kompatibel dengan sistem binary vector (mis. EHA105, LBA4404, GV3101). Vektor biner membawa T-DNA berisi *gene of interest* (GOI) plus marker seleksi (mis. *nptII*—kanamisin, *hpt*—higromisin, *bar*—fosfinotrisin/glufosinat), sementara fungsi **vir** disuplai oleh plasmid helper dalam bakteri (Hoekema et al., 1983; Komari et al., 1996).
- Media dan antibiotic  
Kultur *Agrobacterium* pada LB/YNB/YEP dengan antibiotik untuk menjaga plasmid (mis. rifampisin untuk strain, kanamisin/higromisin/spektinomisin untuk vektor; dosis sesuai rekomendasi vektor). Inkubasi 26–28 °C, 150–200 rpm hingga OD600 ~0,5–1,0 (fase log) agar kompeten menginfeksi (Gelvin, 2003).
- Induksi vir  
Sebelum ko-kultivasi, induksi *vir genes* dengan menambahkan asetosiringon 100–200 µM pada media suspensi (MS cair setengah kuat/INF-medium) selama ±1–4 jam pada suhu kamar/26 °C. Asetosiringon adalah sinyal luka fenolik tanaman yang mengaktifkan VirA/VirG sehingga memicu pemrosesan dan transfer T-DNA (Stachel et al., 1985; Gelvin, 2003).
- Konstruksi Plasmid Rekombinan (GOI + Marker)
  - Desain kaset T-DNA  
Rancang GOI dengan promotor yang sesuai (35S CaMV untuk jaringan luas, promotor spesifik jaringan/induksi bila diperlukan) dan terminator (NOS/OCS). Tempatkan marker seleksi di dalam batas RB-LB T-DNA agar ikut terintegrasi (Hoekema et al., 1983; Komari et al., 1996).
  - Perakitan dan verifikasi  
Rakit konstruksi (enzim restriksi/ligation, Gibson/Golden Gate). Transformasikan ke *E. coli*, screening koloni (koloni PCR/restriksi), sekuensing untuk konfirmasi. Lalu electroporation/tri-parental mating ke *Agrobacterium*. Verifikasi kehadiran vektor pada *Agrobacterium* (PCR target/marker) (Green & Sambrook, 2012; Komari et al., 1996).
  - Reporter dan control  
Sertakan reporter (GUS/GFP/LUC) untuk memudahkan readout ekspresi awal; siapkan kontrol negatif (tanpa GOI) dan positif (konstruksi reporter yang mapan) (Jefferson et al., 1987; Gelvin, 2003).
- Sumber Jaringan Tanaman & Pra-perlakuan
  - Daun/batang (dikotil): potongan leaf disc (diameter 0,5–1 cm) atau segmen batang muda; steril permukaan (NaOCl 1–2% + Tween, bilas steril).
  - Embrio (monokotil): embrio imatur (padi/jagung) atau kalus embriogenik dari media 2,4-D (Hiei et al., 1994).  
Semua eksplan dipelihara pada MS (Murashige–Skoog) dengan hormon sesuai (BAP/KIN untuk tunas; 2,4-D/NAA untuk kalus) dan diinkubasi gelap/terang sesuai spesies untuk mempertahankan vigor jaringan (Murashige & Skoog, 1962; Horsch et al., 1985).
- Ko-kultivasi *Agrobacterium* dengan Jaringan Tanaman

- Inokulasi
 

Suspensikan *Agrobacterium* terinduksi dalam MS cair ( $\frac{1}{2}\times$ ) + asetosiringon 100–200  $\mu\text{M}$  hingga OD<sub>600</sub> ~0,2–0,5. Celup/inkubasi eksplan 5–15 menit (leaf disc/segmen batang) atau vakum infiltrasi (~50 hingga ~70 kPa, 5–10 menit) untuk jaringan tebal/embrio guna meningkatkan penetrasi (Horsch et al., 1985; Clough & Bent, 1998).
- Ko-kultivasi
 

Kering-anginkan lembut pada kertas saring steril; letakkan eksplan permukaan luka menghadap ke atas di media ko-kultivasi (MS padat + asetosiringon 100–200  $\mu\text{M}$ , tanpa antibiotik seleksi), gelap, 22–25 °C, 2–3 hari. Periode ini memfasilitasi pemotongan, transfer, dan impor T-DNA (Zupan et al., 2000; Gelvin, 2003).
- Titik kendali mutu
 

Hindari overgrowth bakteri; gunakan kepadatan rendah-sedang dan ko-kultivasi tidak terlalu lama. Overgrowth menurunkan viabilitas eksplan dan mengganggu regenerasi (Gelvin, 2003).
- Induksi Infeksi Menggunakan Asetosiringon
 

Asetosiringon adalah induktor vir paling lazim. Penambahan pada tiga titik meningkatkan keberhasilan: (i) pra-induksi suspensi bakteri, (ii) suspensi inokulasi, (iii) media ko-kultivasi. Rentang 50–200  $\mu\text{M}$  lazim; konsentrasi optimal spesifik spesies/eksplan. Terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan jaringan; lakukan titrasi awal (Stachel et al., 1985; Gelvin, 2003).
- Eliminasi *Agrobacterium* & Seleksi Transforman
  - Pencucian dan antibiotik bakteriostatik
 

Usai ko-kultivasi, bilas eksplan 2–3× dalam MS cair + cefotaksim 200–500 mg/L atau timentin 150–300 mg/L untuk menekan *Agrobacterium* tanpa merusak jaringan tanaman (Gelvin, 2003).
  - Media seleksi
 

Pindahkan eksplan ke media seleksi (MS + hormon sesuai + antibiotik tanaman untuk marker; mis. kanamisin 50–100 mg/L, higromisin 20–50 mg/L, basta/glufosinat 2–10 mg/L) + cefotaksim/timentin untuk kontrol bakteri. Gunakan tahap adaptif (dosis rendah → sedang) jika jaringan sensitif (Horsch et al., 1985; Murashige & Skoog, 1962).
  - Verifikasi awal
 

Setelah 1–2 minggu, amati respon seleksi: kalus hijau, pertumbuhan tunas pada media organogenesis, atau aktivitas reporter (GUS histokimia X-Gluc/GFP fluoresen). Transforman sejati menunjukkan ketahanan konsisten dan ekspresi reporter (Jefferson et al., 1987; Gelvin, 2003).
- Regenerasi Tanaman Utuh dari Jaringan Transforman
  - Rute organogenesis (umum dikotil)
 

Eksplan (leaf disc/batang) pada SIM (Shoot Induction Medium; MS + sitokinin BAP/KIN 0,5–2 mg/L + auxin rendah NAA 0–0,1 mg/L) untuk menginduksi tunas. Setelah tunas 1–2 cm, pindah ke RIM (Root Induction Medium; MS + auxin ringan IBA/NAA) hingga berakar (Horsch et al., 1985).

- Rute embriogenesis somatik (umum monokotil)  
Embrio imatur/kalus embriogenik dipilih di media 2,4-D (kalus), kemudian regenerasi pada media tanpa auxin atau dengan sitokinin/giberelin untuk pembentukan embrio somatik dan perkembangan. Banyak protokol padi/serelia mengikuti kerangka ini (Hiei et al., 1994).
- Aklimatisasi  
Bibit berakar dipindah ke potting mix steril, kondisi kelembapan tinggi (tutup transparan) lalu hardening bertahap ke rumah kaca/fitotron (Murashige & Skoog, 1962).
- Konfirmasi Molekuler Transforman
  - PCR pada daun/tunas untuk GOI dan border T-DNA; kontrol gen endogen (Gelvin, 2003).
  - Southern blot/qPCR kopy untuk jumlah sisipan dan pola integrasi (opsional untuk bahan ajar tingkat lanjut).
  - RT-qPCR/Western/aktivitas enzim untuk ekspresi fungsional GOI.
  - Segregasi Mendel pada T1/T2 untuk menilai stabilitas pewarisan (Zupan et al., 2000).

## F. Latihan

Jawablah soal dibawah ini dengan tepat

1. Jelaskan yang dimaksud dengan transfer gen!
2. Jelaskan prinsip yang harus dipahami, sebelum memulai transfer gen.
3. Buatlah dalam bentuk bagan alur prosedur praktikum dari salah satu jenis transfer gen!
4. Jelaskan perbedaan transfer gen dengan gun gene, elektroporasi dan *agrobacterium tumificien*!
5. Menurut saudara apa yang akan terjadi jika transfer gen dilakukan tanpa memperhatikan etik? Jelaskan dan berikan satu contoh kasus!
6. Buatlah satu kasus ditempat saudara yang membutuhkan konsep transfer gen dalam menyelesaiakanya! Jelaskan prosedur secara singkat apa yang perlu dilakukan dan jenis transfer gen mana yang digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aihara, H., & Miyazaki, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature Biotechnology*, 16(9), 867-870. <https://doi.org/10.1038/nbt0998-867>
- Beebe, S. J., Fox, P. M., Rec, L. J., Somers, K., Stark, R. H., & Schoenbach, K. H. (2003). Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: Apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30(1), 286-292.
- Chen, C., Smye, S. W., Robinson, M. P., & Evans, J. A. (2010). Membrane electroporation theories: A review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 44(1-2), 5-14. <https://doi.org/10.1007/s11517-005-0020-2>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>

- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127-6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380-386. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Fromm, M., Taylor, L. P., & Walbot, V. (1986). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 5824-5828. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.17.5824>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Gothelf, A., Gehl, J., & Mir, L. M. (2003). Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Reviews*, 29(5), 371-387.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Heller, R., & Heller, L. C. (2006). In vivo electroporation for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 17(9), 890-897.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271-282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6020271.x>
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium* Ti-plasmid. *Nature*, 303(5913), 179-180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229-1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- ISAAA. (2018). *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2018 (ISAAA Brief No. 54)*. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901-3907.
- Kinosita, K., & Tsong, T. Y. (1977). Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 471(2), 227-242.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., & Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*, 10(1), 165-174. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010165.x>
- Mir, L. M., Gehl, J., Sersa, G., Collins, C. G., Garbay, J. R., Billard, V., ... Marty, M. (1998). Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator. *European Journal of Cancer Supplements*, 4(11), 14-25.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Neumann, E., Schaefer, M., Wang, Y., & Hofsneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
- Sardesai, N. Y., & Weiner, D. B. (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: Clinical trials and clinical results. *Vaccine*, 29(9), 1550–1555.
- Schoenbach, K. H., Beebe, S. J., & Buescher, E. S. (2003). Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics*, 22(6), 440–448. <https://doi.org/10.1002/bem.71>
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624–629. <https://doi.org/10.1038/318624a0>
- Tsong, T. Y. (1989). Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, 60(2), 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82054-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82054-9)
- Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory: Concepts and mechanisms. *Methods in Molecular Biology*, 55, 3–28. <https://doi.org/10.1385/0-89603-310-4:3>
- Yamamoto, T., Kawai, A., Yamamoto, N., Hattori, Y., Ohta, A., & Kato, N. (2010). DNA vaccine using electroporation for HIV-1 clinical trials. *Microbes and Infection*, 12(12–13), 1027–1032.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303–305. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23(1), 11–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00808.x>