

Purifikasi antibody poliklonal sebagai reagensia sandwich ELISA pendeteksi protein P24 Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)

Deka Larasati, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20341287&lokasi=lokal>

Abstrak

Penggunaan antibodi poliklonal dalam sistem pendeteksi antigen P24 HIV-1 layak untuk dipertimbangkan mengingat variasi susunan epitop P24 pada berbagai subtype HIV-1 berpotensi mengakibatkan kegagalan pengenalan epitop oleh antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal yang diperoleh melalui induksi dengan antigen rekombinan berpotensi bereaksi secara non spesifik terhadap protein kontaminan yang terdapat dalam sediaan antigen rekombinan sehingga dapat berpengaruh pada spesifisitas sistem pendeteksi antigen.

Pada penelitian sebelumnya diperoleh informasi mengenai reaksi non spesifik serum anti P24 HIV-1 poliklonal yang dihasilkan melalui imunisasi kelinci, khususnya terhadap antigen E.coli dan Bovine Serum Albumin (BSA). Oleh karena penelitian ini, maka diteliti efek purifikasi dengan kromatografi afinitas dalam menghilangkan reaktivitas non spesifik antara serum anti P24 dengan E.coli dan BSA. Dampak ini dinilai dengan menggunakan teknik sandwich Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan dua kolom kromatografi afinitas dengan ligan E.coli pada kolom pertama dan ligan P24 rekombinan HIV-1 pada kolom kedua. Sepharose 4B digunakan sebagai matriks. Proses elusi menggunakan glycine HCl, pH 2,7. Eluen hasil purifikasi dikonfirmasi dengan teknik SDS PAGE, western blot dan sandwich ELISA pendeteksi antigen P24 HIV-1. Pada SDS PAGE terbentuk pita an tara berat molekul 45-116 kDa yang menunjukkan pita antibodi. Pada uji western blot terdapat pita spesifik protein P24 rekombinan HIV-1 dan tidak muncul pita non spesifik terhadap E.coli. Sedangkan pada uji sandwich ELISA, eluen menunjukkan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, dan terdapat penurunan nilai absorbansi dibandingkan dengan sistem laripati antibodi yang dipurifikasi. Nilai absorbansi eluen juga tidak menunjukkan hasil yang berbeda dengan kontrol negatif jika direaksikan dengan antigen E.coli. Namun reaktivitas non spesifik eluen dengan BSA pada sistem sandwich ELISA tidak berbeda dengan reaktivitas serum prepurifikasi. Pada uji western blot dan sandwich ELISA diperoleh pula informasi yang menunjukkan adanya reaksi non spesifik antara antibodi anti-kelinci yang digunakan dengan protein E.coli.

Purifikasi antibodi dengan menggunakan metode kromatografi afinitas telah berhasil dilakukan dengan kondisi optimal pemurnian dan telah diperoleh eluen yang mengandung antibodi terhadap P24 rekombinan HIV-1 yang tidak bereaksi dengan protein E.coli. Reagensia yang digunakan dalam sistem pendeteksi berpotensi menimbulkan ikatan non spesifik yang dapat mengganggu nilai absorbansi sehingga sebelum digunakan harus dinilai kelayakannya untuk digunakan dalam sistem diagnostik tertentu.

<hr>

Polyclonal antibody may be important to be considered in sandwich ELISA which detected HIV-1 P24 due to the existing variations in P24 epitope structure. Variations in epitope structure has the potential to

produce false negative result in serologic diagnostic system that utilize monoclonal antibody. Polyclonal antibody induced by recombinant antigen could exhibit non specific reaction due to the presence of coniaminamnl in antigen preparation that originates from the host used for expression of the recombinant antigen.

In the previous research, we have already known that our polyclonal antibody in P24 HIV recombinant immunized rabbit serum had non specific reaction with E. coli protein and Bovine Serum Albumin (BSA) in sandwich ELISA system for detecting HIV-1 P24 recombinant protein. This was the major reason to purify the antibody with affinity chromatography. Our goal was to reduce the non specific reaction. We used sandwich Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) to see the effect of purification.

We used two columns affinity chromatography with different ligand in each column and CnBr sepharose as solid support. The first column utilized E.coli protein as ligand and the second one used HIV-1 P24 recombinant protein. We used glycine HCl, pH 2, 7 to elute antibody from affinity chromatography column. Eluen from the second column was confirmed with SDS PAGE, western blot and sandwich ELISA. SDS PAGE followed by comassie blue staining showed specific bands between 45-116 kDa molecular weight, which were interpreted as heavy and light chain fragments of antibody. Purified antibody in the second eluen was shown to be reactive with HIV-1 P24 recombinant protein but not E. coli protein by western blot analysis. There was a decline in the absorbance when eluen was used as detection antibody in sandwich ELISA system, compared with the system that utilized pre purified antibody. We also observed there was non specific reaction between the components in sandwich ELISA for detection of HIV-1 P24 recombinant antigen, in that we found the antibody against anti- rabbit JgG which was used in sandwich ELISA system had non specific reaction with E.coli protein.

We concluded that we gained optimal condition in polyclonal antibody purification to reduce non specific reaction between polyclonal antibody to HIV-1 P24 recombinant antigen with E.coli protein. Reagents which used in our sandwich ELISA system potentially Caused non specific reaction so we have to consider their application.