

# Konstruksi dan ekspresi transien vektor bisistronik pengeksresi hemagglutinin influenza A H5N1 dan enhanced green fluorescent protein = Construction and transient expression of bicistronic vector of hemagglutinin influenza A H5N1 protein and enhanced green fluorescent protein

Ekawati Betty Pratiwi, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20350430&lokasi=lokal>

---

## Abstrak

Virus Influenza A H5N1 sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang signifikan. Kemampuan genetic drift dan shift virus dapat menjadi ancaman bagi efikasi vaksin influenza A H5N1 yang ada saat ini. Pengembangan vaksin influenza berbasis respon sel T CD8 diharapkan dapat memberikan daya proteksi silang yang lebih luas. FATTC-CTL assay merupakan suatu metode pengukuran aktivitas sel sitotoksik sel T CD8 melalui kuantifikasi lisis sel target pengeksresi antigen dan protein penanda oleh sel T CD8. Tahapan awal untuk pembuatan FATTC-CTL assay adalah konstruksi plasmid penyandi mRNA bisistronik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi plasmid penyandi mRNA bisistronik pengeksresi protein Hemagglutinin (HA) dari H5N1 dan protein penanda enhanced Green Fluorescent (eGFP) melalui sistem internal ribosome entry site (IRES). Gen eGFP, HA H5N1, dan elemen IRES HIV-1 diklona ke dalam vektor ekspresi mamalia pcDNA5FRT/TO. Konstruksi plasmid rekombinan penyandi mRNA bisistronik tersebut kemudian ditransfeksi transien ke dalam sel CHO-K1. Analisis ekspresi dari plasmid bisistronik dilakukan dengan pengamatan hasil pewarnaan imunofluoresens menggunakan mikroskop konfokal. Kuantifikasi ekspresi sel pengeksresi eGFP diketahui menggunakan perangkat TALI cytometer. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa gen Hemagglutinin (HA) H5N1, sekuen IRES HIV-1, dan eGFP berhasil diklona ke dalam vektor plasmid pcDNA5FRT/TO. Pengujian transfeksi transien terhadap seluruh klona plasmid, yaitu plasmid wild type pcDNA5FRT/TO, pcDNA5FRT/TO-eGFP, pcDNA5FRT/TO-IRESHIV1-GFP, pcDNA5FRT/TO-HA H5N1 dan pcDNA5FRT/TO-HA H5N1-IRESHIV1-GFP ke dalam sel CHO-K1 menunjukkan bahwa protein Hemagglutinin dan eGFP berhasil diekspresikan. Perbandingan rerata sel CHO-K1 pengeksresi eGFP dari sel setelah ditransfeksi dengan setiap konstruksi plasmid tersebut di atas menunjukkan bahwa ekspresi eGFP pada sel CHO-K1 ditransfeksi plasmid rekombinan pengeksresi mRNA bisistronik HA dan eGFP relatif lebih rendah dibandingkan yang ditransfeksi plasmid rekombinan pengeksresi mRNA monosistronik eGFP maupun plasmid rekombinan pengeksresi mRNA bisistronik yang mengandung gen penyandi eGFP dan IRES HIV-1.

.....

H5N1 Influenza A infection remains a significant human and animal health problem in the worldwide. The continuous antigenic drift and shift of virus can become threatens the efficacy of the influenza vaccines nowadays. Development of CD8 T cells response based influenza vaccine is expected to provide the broader cross protection. Fluorescent Antigen-Transfected Target Cell-CTL (FATT-CTL) assay is currently developing method to measure the activities of CD8 cytotoxic T cells. The aim of this study is to construct and transiently expressing the bicistronic vector carried H5N1 hemagglutinin (HA H5N1) and enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene, linked with internal ribosome entry site element of HIV-1. The eGFP, HA H5N1, and IRES HIV-1 gene were cloned into pcDNA5FR/TO plasmid. The recombinant

plasmid encoding bicistronic mRNA was transiently transfected into CHO-K1 cell. Analysis of the bicistronic plasmid expression were done by indirect immunofluorescence and visualized with confocal microscope. Quantification of cells expressing eGFP protein were done by using TALI cytometer. The nucleotide sequencing result showed that the open reading frame of the Hemagglutinin (HA) H5N1-IRES HIV-eGFP DNA was accurately cloned into pcDNA5FRT/TO. Transient transfection of all the plasmid constructs (wild type pcDNA5FRT/TO, pcDNA5FRT/TO-eGFP, pcDNA5FRT/TO-IRESHIV1-GFP, pcDNA5FRT/TO-HA H5N1 and pcDNA5FRT/TO-HA H5N1-IRESHIV1-GFP) show that hemagglutinin and enhanced green fluorescent protein successfully expressed in CHO-K1 cells. Comparison of mean CHO-K1 cells expressing eGFP from cells after transfected with each plasmid construction above shows that EGFP expression in CHO-K1 cells transfected recombinant plasmids expressing HA and eGFP bicistronic mRNA relatively lower than those transfected recombinant plasmid expressing EGFP mRNA monocistronic and recombinant plasmid expressing bicistronic mRNA containing EGFP-coding genes and IRES HIV-1.