

Konstruksi plasmid penyandi protein fusi vp22 gag hiv1 egfp untuk pengembangan vaksin sub unit gag hiv 1 endogen dan analisis lokalisasi protein vp22 egfp pada sel vero = Construction of plasmid encoding vp22 gag hiv1 egfp fusion protein for endogenous gag hiv 1 sub unit vaccine development and analysis of vp22 egfp protein localization in vero cells

Melinda Remelia, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20390381&lokasi=lokal>

Abstrak

Latar belakang: Vaksin HIV-1 berbasis protein Gag diharapkan dapat menstimulus respon imun sel T CD8+ (sitotoksik). Protein Gag yang dihasilkan pada sistem ekspresi prokariota E.coli merupakan antigen yang berfungsi sebagai antigen eksogen. Fusi protein VP22 diharapkan dapat menghantarkan protein GagHIV1 ke sitoplasma sel sehingga berfungsi sebagai antigen endogen. Fusi protein eGFP berperan sebagai marker fluoresen untuk analisis lokalisasi protein sebagai pembuktian secara in vitro bahwa protein rekombinan VP22-eGFP mampu berpenetrasi dan masuk ke dalam sel vero.

Metodologi: Sekuens VP22, GagHIV1, dan eGFP diinsersikan ke dalam plasmid pQE80L melalui proses transformasi. Protein rekombinan eGFP, VP22-eGFP, GagHIV1-eGFP, dan VP22-GagHIV1-eGFP diklona dan diekspresikan pada sistem E.coli. Proses purifikasi protein rekombinan dilakukan dengan metode Ni-NTA [QIAGEN]. Lokalisasi protein rekombinan dianalisis dengan menggunakan mikroskop fluoresen konvensional dan konfokal.

Hasil: Konstruksi plasmid rekombinan pengeksresi protein eGFP, VP22-eGFP, GagHIV1-eGFP, dan VP22-GagHIV1-eGFP telah berhasil diperoleh dan keakuratan susunan basa nukleotida telah dibuktikan dengan metode sekuensing DNA. Hasil sekuens DNA memperlihatkan open reading frame yang sesuai untuk ekspresi protein rekombinan target. Ekspresi protein rekombinan GagHIV1-eGFP dan VP22-GagHIV1-eGFP dengan sistem E.coli belum berhasil diperoleh, kemungkinan disebabkan oleh ukuran protein yang besar (>60 kDa). Sedangkan protein rekombinan eGFP (31,38 kDa) dan VP22-eGFP (27,02 kDa) telah berhasil diekspresikan dan dipurifikasi. Analisis lokalisasi protein rekombinan VP22-eGFP menunjukkan terdapat fluoresen hijau di sitoplasma dan nukleus sel vero. Sedangkan protein rekombinan eGFP tidak ditemukan fluoresen di dalam sel vero.

Kesimpulan: Ekspresi protein rekombinan GagHIV1-eGFP dan VP22-GagHIV1-eGFP dengan sistem E.coli masih perlu dioptimasi. Protein rekombinan VP22-eGFP pada penelitian ini dibuktikan dapat berpenetrasi ke sitoplasma dan inti sel vero. Selain vaksin GagHIV1, plasmid rekombinan pQE80L-eGFP dan pQE80L-VP22-eGFP yang diperoleh pada penelitian ini juga berpotensi untuk pengembangan vaksin sub unit eksogen virus lainnya yang ingin diubah menjadi bersifat endogen.

<hr>

Background: HIV-1 vaccine based Gag protein is expected to stimulate the immune response of CD8 + T cells (cytotoxic). Gag protein produced in E.coli prokaryotic expression system serves as an exogenous

antigen. Fusion of VP22 protein is expected to deliver Gag HIV1 proteins to the cytoplasm of cell thus functions as an endogenous antigen. Fusion of eGFP protein is performed as a fluorescent marker for localization analysis conducted as the in vitro evidence of VP22-eGFP recombinant protein ability to penetrate and get into vero cell cytoplasm.

Methodology: Sequence of VP22, Gag HIV1, and eGFP is inserted into pQE80L plasmid through the transformation method. The eGFP, VP22-eGFP, GagHIV1-eGFP, and VP22-GagHIV1-eGFP recombinant proteins were cloned and expressed in E. coli system. Recombinant protein purification process was conducted using Ni-NTA [QIAGEN]. Localization of recombinant proteins were analyzed using conventional fluorescence and confocal microscopy.

Results: Construction of a recombinant plasmid encoding eGFP, VP22-eGFP, GagHIV1-eGFP, and VP22-GagHIV1-eGFP proteins has successfully obtained and the accuracy of the nucleotide base composition has been demonstrated by DNA sequencing. The results of the DNA sequence showed an open reading frame corresponding to the target recombinant protein expression. Expression of GagHIV1-eGFP and VP22-GagHIV1-eGFP recombinant proteins in E. coli system has not successfully obtained, probably due to the large size of the protein (> 60 kDa). While the recombinant protein VP22-eGFP (31,38 kDa) and eGFP (27,02 kDa) was successfully expressed and purified. Localization analysis of VP22-eGFP recombinant protein performs green fluorescent in cytoplasm and nucleus of vero cells. While eGFP recombinant protein in vero cell was not performs green fluorescent.

Conclusion: Expression of GagHIV1-eGFP and eGFP-VP22-GagHIV1 recombinant protein in E.coli system still need to be optimized. The VP22-eGFP recombinant protein in this study indicates can penetrate to the cytoplasm and nucleus vero cells. Besides Gag HIV1 vaccines, pQE80L-eGFP and pQE80L- VP22-eGFP recombinant plasmids in this study can be utilized for the development of other viruses exogenous subunit vaccines which would be turned into endogenous.