

Ekspresi Gen *rE* Virus Dengue pada Sel HeLa menggunakan Vektor pEGFP-C1

INTISARI

Vaksin pertama untuk virus Dengue, yaitu Dengvaxia® (CYD-TDV) sebagai salah satu *live attenuated vaccine* diketahui masih terbatas untuk menetralkan serotipe kedua virus Dengue (DENV-2) dan pencegahan terhadap infeksi virus Dengue terbatas pada pengobatan pasca infeksi. Vaksin DNA sebagai pendekatan baru melalui pendekatan teknologi DNA rekombinan menawarkan sejumlah keuntungan yang potensial. Protein multivalen rekombinan E (EDIIIIF) (protein *rE*) merupakan protein yang dikonstruksi berdasarkan domain III protein *envelope* virus Dengue, berisi wilayah spesifik untuk perlekatan dan fusi virus pada sel inang, serta dapat menginduksi antibodi penetral virus yang bersifat preventif terhadap infeksi virus Dengue. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi gen target *rE* dengan vektor plasmid EGFP-C1 pada sel HeLa sebagai model sistem eukariot menggunakan agen penghantaran *Lipofectamine* 3000 sebagai kandidat vaksin DNA. Penelitian ini diawali dengan optimasi kodon gen *rE* berdasarkan *human target* dan disisipkan pada vektor ekspresi eukariot pEGFP-C1, membentuk plasmid DNA rekombinan. Perbanyakkan plasmid DNA rekombinan pada *host cloning Escherichia coli* DH5α setelah insersi dilakukan dengan penggunaan MgCl₂-CaCl₂ diikuti oleh perlakuan *heat-shock* pada suhu 42°C selama 45 detik. Isolasi plasmid DNA rekombinan dilakukan untuk keperluan sekuensing terhadap gen *rE* dalam mengkonfirmasi urutan basa yang benar pada plasmid DNA rekombinan. Transfeksi dilakukan dengan metode kimia menggunakan agen penghantar *Lipofectamine* 3000 selama 24 jam inkubasi. Keberhasilan sistem penghantaran dianalisis berdasarkan ekspresi protein EGFP-*rE* melalui pengamatan pendaran hijau dengan mikroskop konfokal pada 24 jam pasca transfeksi. Hasil penelitian menunjukkan gen target *rE* (1449 bp) yang diinsersi pada vektor pEGFP-C1 (4731 bp) membentuk plasmid DNA rekombinan pEGFP-C1-*rE* sebesar 6178 bp. Keberhasilan transformasi plasmid DNA rekombinan ditandai dengan pertumbuhan koloni transforman dengan volume 100 µl pada media selektif kanamisin 100 µg/ml. Produk amplifikasi hasil koloni PCR menunjukkan kemunculan pita dengan ukuran produk 157 bp pada gel agarosa 1.5%. Isolat plasmid DNA rekombinan memperoleh kemurnian >1,8 dengan kemunculan konformasi *supercoiled* dan *nicked-circular*. Analisis data menggunakan *pairwise alignment* pada *software* BioEdit menunjukkan adanya kecocokan urutan basa pada plasmid DNA rekombinan dengan urutan basa gen referen *rE* berdasarkan kecocokan asam aminonya. Pendaran hijau protein EGFP-*rE* yang terlihat di bawah pengamatan mikroskop konfokal 24 jam pasca transfeksi menunjukkan keberhasilan transfeksi pada perlakuan kompleks *Lipofectamine*-DNA volume 1,9 µl dan 3,8 µl, dengan jumlah sel positif yang menghasilkan pendaran hijau protein EGFP-*rE* lebih banyak diperoleh pada pemberian kompleks *Lipofectamine*-DNA volume 3,8 µl.

Kata Kunci: Dengue, gen *rE*, *lipofectamine* 3000, transfeksi, vaksin DNA

Dengue Virus *Recombinant Envelope* Gene Expression in HeLa Cells using pEGFP-C1 as Vector

ABSTRACT

The first vaccine for Dengue virus, Dengvaxia® (CYD-TDV) as a live attenuated vaccine is known to be limited in neutralizing the second serotype of Dengue virus (DENV-2). Besides, the potential return of attenuated organism to a virulent state may be a barrier in the development of these kind of vaccines, and prevention against Dengue virus infection is required to overcome limited post infection treatment. DNA vaccine as a new approach through the advent of recombinant technology offer several potential advantages. Recombinant multivalent protein E (EDIIIIF) (*rE* protein) is a constructed protein based on domain III of the Dengue virus envelope protein. Protein E contain specific region for viral attachment and fusion to host cells and can induce virus-neutralizing antibodies that are preventive against Dengue virus infection. The study aims to evaluate the expression of *rE* target gene in HeLa cells representing eukaryotic system model with pEGFP-C1 as plasmid vector using delivery agent *Lipofectamine* 3000, as DNA vaccine candidate. This study conducted by transforming optimized *rE* gene mediated with plasmid vector pEGFP-C1 using a brief *heat-shock* treatment in *Escherichia coli* DH5 α as cloning host. Competent cells were produced using the combination of MgCl₂-CaCl₂ solution. Plasmid isolation was carried out using *Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit* followed by Sanger sequencing method to analyze form of mutation presence in DNA sequence of transformant. Gene expression was conducted by chemical transfection method using *Lipofectamine* 3000 in HeLa cells for 24 hours of incubation. The efficacy of the delivery system was analyzed based on luminescence of EGFP-*rE* protein expression under confocal microscope at 24 hours post-transfection (hpt). The *rE* target gene (1449 bp) was cloned to pEGFP-C1 (4731 bp) generates pEGFP-C1-*rE* in total size of 6178 bp. Successful transformation was seen on 100 μ g/ml kanamycin selective media by the appearance of transformant colonies given in volume of 100 μ l and was confirmed by colony PCR with the amplification product at 157 bp on agarose gel 1.5%. Plasmid DNA concentration was obtained with the purity of >1,8. Electrophoresis gel indicates a supercoiled and nicked-circular band. Pairwise alignment showed a compatibility of the reference gene sequence and the recombinant plasmid sequence according to the amino acid presence. Fluorescence of EGFP-*rE* protein was seen in the given volume of 1.9 and 3.8 μ l DNA-*Lipofectamine* complex, with the optimal volume resulting in higher positives cells producing green fluorescence protein was in 3.8 μ l of given DNA-*Lipofectamine* complex.

Keywords: Dengue, *rE* gene, *lipofectamine* 3000, transfection, DNA vaccine