

EKSPRESI GEN *rE* VIRUS DENGUE PADA SEL HeLa MENGUNAKAN VEKTOR pEGFP-N1

INTISARI

Virus dengue menyebabkan infeksi Demam Berdarah Dengue (DBD), yang terdiri dari empat serotipe: DENV 1-4. Protein E DENV diketahui sebagai antigen utama yang berperan dalam pengenalan dan pengikatan reseptor agar virus dapat masuk ke dalam sel. Protein multivalen rekombinan E (EDIIIIF) yang telah didesain, diketahui mampu bersifat imunogenik protektif untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin. Pengembangan vaksin DNA menggunakan sekuen hasil optimasi protein EDIIIIF menjadi strategi menjanjikan dalam pengembangan vaksin DBD. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah gen *rE* yang dikonstruksi dalam vektor pEGFP-N1 dapat terkloning dalam bakteri *E. coli* DH5 α dan mengetahui ekspresi relatif gen *rE* pada sel HeLa dengan menggunakan *Lipofectamine*TM 3000. Penelitian ini dilakukan dengan mengoptimasi kodon EDIIIIF untuk dikonstruksi pada pEGFP-N1 dan ditransformasikan dalam *E. coli* DH5 α menggunakan MgCl₂-CaCl₂ dan *heatshock*. Setelah itu, dilakukan PCR koloni, isolasi plasmid DNA rekombinan, serta verifikasi dengan sekuensing. Isolat DNA rekombinan yang telah terverifikasi digunakan untuk membuat kompleks DNA rekombinan dengan *Lipofectamine*TM 3000. Pengamatan fluoresensi dengan mikroskop konfokal pada sel HeLa hasil transfeksi dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kodon protein EDIIIIF yang dioptimasi mengalami peningkatan CAI dari 0,65 menjadi 0,74, membentuk gen *recombinant envelope (rE)*. Gen *rE* yang dikonstruksi pada vektor pEGFP-N1 tersebut berhasil ditransformasikan pada *E. coli* DH5 α , dibuktikan dengan tumbuhnya koloni *E. coli* pada medium LB agar yang mengandung kanamisin 100 μ g/ml, serta adanya *single band* berukuran 157 bp pada hasil PCR koloni menggunakan primer deteksi gen *rE*. Berdasarkan visualisasi dari hasil isolasi plasmid bakteri transforman pada gel agarosa 1%, terlihat adanya plasmid dengan konformasi *supercoiled*, *nicked* dan *linear*. PCR menggunakan primer universal pEGFP-N1 membuktikan hasil isolat plasmid mengandung insert gen *rE*. Analisis *pairwise alignment* pada hasil sekuensing menunjukkan tidak adanya mutasi pada gen *rE*, sehingga konformasi protein yang terbentuk sesuai yang diharapkan sebagai kandidat vaksin DNA. Hasil transfeksi pada kultur sel HeLa dengan *Lipofectamine* menampilkan adanya pendaran hijau EGFP yang teramati pada hasil transfeksi dengan DNA-*lipofectamine*, dengan hasil fluoresensi pada perlakuan 3,8 μ l terlihat lebih jelas dan lebih terang dibandingkan dengan perlakuan 1,9 μ l. Penelitian ini menunjukkan bahwa gen *rE* (1449 bp) berhasil diinsersi pada pEGFP-N1 (4633 bp) membentuk DNA rekombinan pEGFP-N1-*rE* (6180 bp) serta berhasil terkloning menggunakan MgCl₂-CaCl₂ dan paparan *heat shock*. Hasil pengamatan menunjukkan gen *rE* yang telah berfusi dengan *egfp* berhasil terekspresi pada sel HeLa pada perlakuan dengan transfeksi menggunakan DNA-*Lipofectamine*.

Kata kunci: gen *rE*, *Lipofectamine*TM 3000, pEGFP-N1, vaksin DNA, virus dengue

EXPRESSION OF *rE* GENE OF DENGUE VIRUS ON THE HeLa CELLS USING pEGFP-N1 VECTOR

ABSTRACT

Dengue virus is known to cause Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) infection. It consists of four serotypes: DENV 1-4. The E protein is known as the main antigen of the dengue virus, plays a role in recognition and binding of receptors, so the virus can enter the host cells. The multivalent recombinant E protein (EDIIIF) which has been designed, is known to have protective immunogenic to be developed as a vaccine candidate. The development of a DNA vaccine using the optimized sequence of the EDIIIF protein can be a promising strategy for DHF vaccine development. This study aims to determine whether the *rE* gene constructed in the pEGFP-N1 vector can be cloned in *E. coli* DH5 α bacteria and to determine the relative expression of the *rE* gene in HeLa cells using Lipofectamine™ 3000. This research was conducted by optimizing codons from EDIIIF proteins and constructed them on the pEGFP-N1 vector, then transformed into *E. coli* DH5 α using MgCl₂-CaCl₂ and heat shock. After that, colony PCR, isolation of recombinant DNA plasmids, and verification using sequencing were carried out. Verified recombinant DNA isolates were used to prepare DNA-Lipofectamine™ 3000 complexes. The complexes were transfected into HeLa cells, then fluorescence observations was performed confocal microscopy. The results showed that the optimized codon of EDIIIF protein had an increase in CAI value from 0.65 to 0.74, forming the *recombinant envelope (rE)* gene. The *rE* gene was constructed on the pEGFP-N1 vector was successfully transformed into *E. coli* DH5 α , as evidenced by the growth of *E. coli* colonies on LB medium containing 100 μ g/ml kanamycin, and the appearance of a single band measuring 157 bp on the colony PCR results using detection primers of *rE* gene. Based on the visualization results of the plasmid isolation of transformed bacterial on 1% agarose gel, plasmids can be seen in supercoiled, nicked and linear conformations. PCR using the universal primer pEGFP-N1 proved that the plasmid isolate was containing the *rE* gene insert. Pairwise alignment analysis on the sequencing results showed no mutations in the *rE* gene, so the conformation of the protein formed was as expected as a DNA vaccine candidate. The results of transfection in HeLa cell cultures with Lipofectamine showed that the green fluorescent was observed in treated HeLa cells with DNA-lipofectamine, where the fluorescent in the 3.8 μ l treatment was seen to be more abundant and brighter than the 1.9 μ l treatment. This research showed that the *rE* gene (1449 bp) was successfully inserted on pEGFP-N1 (4633 bp), forming construct pEGFP-N1-*rE* (6180 bp) and also was successfully cloned using MgCl₂-CaCl₂ combination and heat shock treatment. The research showed that the *rE* gene that had fused with *egfp* was successfully expressed in HeLa cells when transfected with DNA-Lipofectamine.

Keyword: dengue virus, DNA vaccine, Lipofectamine™ 3000, pEGFP-N1, *rE* gene.