

Uji coba metode eliminasi protein E. coli kontaminan pada antigen hemagglutinin rekombinan = Trial methods for eliminating contaminant E. coli proteins in recombinant HA2 antigen.

Fransiska Liliani Nugroho, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20348190&lokasi=lokal>

Abstrak

Salah satu prosedur immunoassay untuk mengukur titer antibodi spesifik terhadap antigen hemagglutinin HA2 virus H5N1 dalam serum hewan coba pasca vaksinasi ialah uji ELISA yang berbasis antigen HA2 rekombinan yang diekspresikan pada sistem prokariota *Escherichia coli*. Kemurnian antigen HA2 rekombinan yang digunakan sebagai larutan pelapis sumur plat dalam metode ELISA tersebut sangat penting agar selektivitas dan keakuratan metode meningkat. Purifikasi antigen HA2 rekombinan dengan tag 6xHistidin menggunakan kromatografi afinitas Ni-NTA kurang berhasil memurnikan antigen rekombinan tersebut dari kontaminasi yang berasal dari sel hospes pengeksresi *E. coli*.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji coba metode eliminasi protein *E. coli* kontaminan melalui tahapan optimasi kondisi ekspresi dan pemurnian antigen HA2 rekombinan. Kondisi optimum untuk ekspresi antigen HA2 rekombinan ialah dengan induksi IPTG 1 mM selama 4 jam. Kromatografi afinitas Ni-NTA dengan dapar pencuci yang mengandung 40 mM imidazol dan dilakukan sebanyak 5 kali dapat meminimalisir jumlah protein *E. coli* kontaminan pada eluat. Eluat Ni-NTA selanjutnya dipurifikasi dengan kromatografi imunoafinitas dengan ligan berupa serum kelinci yang diimunisasi lisat *E. coli*. Hasil western blot dari flowthrough kolom menunjukkan protein *E. coli* yang semula ada pada eluat Ni-NTA tidak dideteksi setelah inkubasi dengan matriks imunoafinitas.

.....One of immunoassay procedures for measuring specific antibody titers against hemagglutinin HA2 of H5N1 avian influenza virus in the experimental animals serum post-vaccination is ELISA test which based on HA2 recombinant antigen expressed in *Escherichia coli* prokaryotic system. The purity of HA2 recombinant which used as antigen coating in ELISA microplates will increase the selectivity and accuracy of the method. Purification of 6xHistidine-tagged HA2 protein using Ni-NTA affinity chromatography is not fully successful because there are several endogenous protein from host bacteria who routinely coeluted with the target protein.

Therefore this research aims to eliminate those *E. coli* contaminant proteins through optimization of HA2 recombinant antigen's expression and purification. The optimum condition for the expression of HA2 recombinant antigen is by induction of 1 mM IPTG for 4 hours. Ni-NTA affinity chromatography with washing buffer containing 40 mM imidazole and performed 5 times can reduce the amount of contaminant *E. coli* proteins in the eluates. Ni-NTA eluates are further purified by immunoaffinity chromatography which utilize serum from immunized rabbit with *E. coli* lysate as a ligand. The western blot result of column flowthrough shows that the contaminant *E. coli* proteins is not detected after incubation with immunoaffinity matrixes.