

Studi awal pengembangan vaksin subunit karakterisasi molekular pengklonaan gen dan ekspresi protein rekombinan VP6 rotavirus strain indonesia genotipe I R55 dan II R10 = A preliminary study of subunit vaccine development molecular characterization gene cloning and expression of recombinant protein VP6 of rotavirus strains Indonesia genotype I R55 and II R10

Retno Anggrina Khalistha Dewi, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20389678&lokasi=lokal>

Abstrak

Background: VP6 protein is an intermediate layer on rotavirus outer capsid shell which is the major structural protein and play an important role in replication cycle. VP6 protein is a conserved region that can induce immune response as target protein of T cell with cross-reactive epitopes within another genotypes.

Objectives: This research conducted to determine the molecular characterization of rotavirus VP6 recombinant protein of Indonesia strain, and to determine the clone and expression of VP6 protein in *Escherichia coli* BL21 for development of rotavirus vaccine.

Methods: Rotavirus RNA was extracted from clinical sample of R55 and R10 strains that having correlation with genotypes I and II rotavirus. RNA samples were amplified with RT-PCR reaction and produced 1194 bp amplicon, and sequencing reaction were conducted to confirm and analyze the molecular characterization of VP6 protein in bioinformatics. VP6 gene as insert and pQE-80L plasmids as vector were double restricted and then ligated by ligation enzyme. Product of ligation were transformed to *E.coli* Top 10 competent cells and the clones were selected to get the recombinant plasmids which bearing VP6 gene. The recombinant plasmid than subcloned to *E.coli* BL21 competent cells and induced by IPTG and its pellets were loaded directly onto SDS-PAGE, approximately 45 kDa protein was observed on the SDS-PAGE. The protein was analyzed using Western-blotting.

Results: Level of amino acids homology from R55 and R10 rotavirus strain compared with vaccine strains and vaccine candidate strains showed high level of homology, with the conserved regions of T-cell epitopes. R55 strain having close relativity with genotype I while R10 strain having close relativitywith genotype II. there are the same level of hydrophobicity between R55 and R10 which indicated as surface proteins or as a hydrophilic protein. The differences of secondary structure between R55 and R10 in amino acids position of 149-152 and 341-349. The VP6 cloned obtained from *E.coli* Top 10 with pQE-80L plasmid. The profile of expressed VP6 recombinant protein from R55 and R10 strains in SDS-PAGE showed the different intensity of protein between induced condition with IPTG and non-induced condition, indicated that VP6 protein might be successfully expressed. The Western-Blot assay showed the same result between the cell that induced and non-induced, but it still need another confirmation.

Conclusion: The result of molecular characterization from VP6 recombinant protein and the cloned of VP6 gene that obtained from R55 and R10 rotavirus strains of Indonesia could be applied as a preliminary study

to develop rotavirus candidate vaccine based on subunit vaccine.

<hr>Latar belakang: Protein VP6 rotavirus adalah protein struktural utama yang berperan penting selama replikasi, dan merupakan bagian yang paling lestari dan memiliki potensi dalam menstimulasi respon imun, yaitu sebagai protein target yang dapat menstimulasi sel T, dan memiliki epitop yang cross-reactive di antara genotipe rotavirus lainnya, sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai vaksin.

Tujuan: Untuk mengetahui karakterisasi molekular protein VP6 rotavirus strain Indonesia, serta pengklonaan gen dan ekspresi protein VP6 pada *Escherichia coli* BL21 untuk pengembangan vaksin rotavirus.

Metode: RNA rotavirus R55 dan R10 diperoleh dari ekstraksi sampel klinis. RNA tersebut kemudian diamplifikasi dengan reaksi RT-PCR dan menghasilkan amplicon 1194 bp yang selanjutnya disekuensing untuk konfirmasi dan mengetahui karakterisasi molekular protein VP6 secara bioinformatika. Gen VP6 sebagai sisipan dan plasmid pQE-80L sebagai vektor direstriksi ganda dengan enzim restriksi dan diligasi menggunakan enzim ligasi. Produk ligasi ditransformasikan pada sel kompeten *E. coli* Top 10 dan diseleksi klon pembawa plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan yang mengandung gen VP6 ditransformasikan ke sel kompeten *E. coli* BL21. Ekspresi protein dilakukan dengan induksi IPTG. Hasil ekspresi dianalisis dengan SDS-PAGE dan dikonfirmasi dengan Uji Western Blot.

Hasil: Sekuen asam amino gen VP6 rotavirus strain Indonesia R55 dan R10 memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan epitop yang lestari bila dibandingkan dengan strain vaksin dan kandidat vaksin rotavirus; strain R55 lebih dekat kekerabatannya dengan rotavirus genotipe I, strain R10 lebih dekat kekerabatannya dengan rotavirus genotipe II. Sekuen VP6 rotavirus strain R55 dan R10 menunjukkan tingkat hidrofobisitas yang sama, hal ini mengindikasikan sejenis protein permukaan atau protein yang bersifat hidrofilik. Hasil analisa struktur sekunder pada strain R55 dan R10 menunjukkan adanya perbedaan pada posisi asam amino 149-152 dan 341-349. Telah didapatkan klon pQE-80L yang mengandung gen VP6 dari strain R55 dan R10. Ekspresi protein VP6 pada SDS-PAGE menunjukkan adanya perbedaan intensitas pita protein antara sel *E. coli* yang diinduksi IPTG dengan yang tidak diinduksi, mengindikasikan protein VP6 diduga berhasil diekspresikan. Konfirmasi ekspresi protein menggunakan Western-Blot menunjukkan hasil yang sama antara sel yang diinduksi dengan yang tidak diinduksi, namun hasil ini perlu dikonfirmasi lebih lanjut.

Kesimpulan: Hasil karakterisasi molekular protein VP6 rekombinan dan pengklonaan gen VP6 dari rotavirus strain Indonesia R55 dan R10 dapat dikembangkan sebagai studi awal pada pengembangan vaksin subunit berbasis protein VP6 rekombinan. Namun untuk tahap ekspresi protein rekombinan VP6 perlu optimasi lebih lanjut.