

Pengklonaan dan ekspresi gen apobec3g untuk mengembangkan uji interaksi protein apobec3g dan vif hiv-1 berbasis elisa = Cloning and expression of apobec3g gene to develop an apobec3g and hiv-1 vif elisa based protein interaction assay

Rizkyana Avissa, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20477189&lokasi=lokal>

Abstrak

Replikasi virus HIV-1 pada tubuh pasien dapat ditekan dengan penggunaan antiretroviral. Namun virus HIV-1 mudah mengalami mutasi yang menyebabkan penurunan sensitifitas satu atau lebih antiretroviral dalam menahan laju replikasi virus. Oleh karena itu diperlukan kelas antiretroviral baru yang tidak rentan terhadap mutasi virus, misalnya dengan menginhibisi interaksi protein antiviral alami manusia seperti APOBEC3G dengan protein-protein virus. Dalam penelitian ini dilakukan studi pendahuluan untuk membuat sistem penapisan antiretroviral berbasis interaksi protein APOBEC3G dengan protein Vif HIV-1 secara in vitro. Penelitian diawali dengan mendesain gen APOBEC3G yang dapat diekspresikan dengan baik di sistem prokariota. Gen APOBEC3Gopt telah dapat diklona ke plasmid vektor pQE80L dan diekspresikan di E.coli BL21 pada suhu 37 oC dengan induksi IPTG 1 mM, namun berat molekul protein APOBEC3G tidak sesuai dengan teoritis yang diperkirakan diakibatkan oleh pemotongan protein oleh protease. Protein Vif diekspresikan dalam E.coli BL21 Codon Plus pada suhu 37 oC dengan induksi IPTG 1 mM. Purifikasi protein Vif dan APOBEC3G menggunakan IMAC Immobilized Metal Affinity Chromatography matriks NiNTA dilakukan dengan keadaan denaturasi dan telah dilakukan refolding dengan cara dialisis. Protein Vif hasil dialisis dapat berinteraksi dengan protein-protein dalam sel secara in vitro. Protein Vif dan APOBEC3G disuntikkan ke kelinci dan diperoleh antibodi IgG terhadap Vif dan APOBEC3G pada minggu ketiga paska penyuntikan. Optimasi keadaan ELISA yang dilakukan untuk protein Vif menunjukkan konsentrasi protein Vif 25 g/mL, pengenceran serum 1/1.000 dan skim milk sebagai protein blocker, memberikan hasil terbaik. Optimasi keadaan ELISA yang dilakukan untuk protein APOBEC3G menunjukkan konsentrasi protein APOBEC3G 25 g/mL, pengenceran serum 1/1.000 dan skim milk sebagai protein blocker, memberikan hasil terbaik.

HIV 1 replication in vivo can be reduced by using antiretroviral. However, HIV 1 virus is easily mutated that leads to reduction of antiviral sensitivity. Therefore, a new class of antiretroviral which is not susceptible toward viral mutation is highly required. One of the options is to inhibit natural antiviral protein such as APOBEC3G to interact with viral protein Vif HIV 1. This research is a preliminary study to establish a new method to screen antiretroviral candidates which inhibit interaction between APOBEC3G and Vif HIV 1. The research begins with APOBEC3G gene optimization for prokaryotic system. The gene successfully cloned to pQE80L vector and highly expressed in E.coli BL21 strain with 1mM IPTG induction in 37 oC. However, the molecular weight of APOBEC3G protein is not suitable with theoretical molecular weight. Vif protein is expressed in E.coli BL21 Codon Plus strain with 1 mM IPTG induction in 37 oC. Vif and APOBEC3G is purified using IMAC Immobilized Metal Affinity Chromatography method with NiNTA matrix in denaturing condition and successfully refolded using dialysis method. Purified Vif protein can interact with other cellular protein in vitro. Rabbits were immunized with Vif and APOBEC3G protein and high titer of IgG anti Vif and anti APOBEC3G were obtained in 3 weeks after immunization. ELISA technique conducted for Vif protein shows that 25 g mL Vif

protein, 1:1000 serum dilution, and skim milk as the protein blocker give the optimal condition. As for the APOBEC3G protein, the optimal condition obtained is also 25 g/mL APOBEC3G protein, 1:1000 serum dilution, and skim milk as the protein blocker.