

Karakterisasi Nanobodi Anti-Protein Non-Struktural 1 (Anti- NS1) pada Virus Dengue (DENV) menggunakan Metode Thermal Shift Assay (TSA). = Characterization of DENV (Dengue Virus) Anti-Protein Non-Structural 1 Nanobody (Nanobody Anti-NS1) using Thermal Shift Assay (TSA) Method.

Arkan Askarillah Hidayat, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920528272&lokasi=lokal>

Abstrak

Deteksi cepat yang umum digunakan untuk penyakit demam berdarah (DBD) atau Dengue Fever (DF) adalah dengan memanfaatkan monoklonal antibodi (mAb) anti-protein non-struktural 1 (anti-NS1). Akan tetapi, terdapat kelemahan dari penggunaan mAb, seperti biaya dan waktu produksi yang tinggi serta lama. Single domain-antibody (sdAb) atau nanobodi yang dapat mendeteksi protein non-struktural 1 (nanobodi anti- NS1) dari DENV sedang dalam tahap pengembangan sebagai solusi permasalahan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan buffer dengan pH paling optimal yang mampu meningkatkan stabilitas termal dari nanobodi anti-NS1 klon DD5 dan DD7 menggunakan metode TSA. Nanobodi anti-NS1 klon DD5 dan DD7 yang menjadi sampel diproduksi pada *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) dan dipurifikasi dengan metode Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Nanobodi anti-NS1 berhasil diproduksi dan dipurifikasi sebanyak 294 g/mL untuk klon DD5 dan 377 g/mL untuk klon DD7. Dari sepuluh buffer yang diuji, hanya beberapa buffer yang menghasilkan data konsisten, yakni sodium fosfat pH 7, pH 7,4, dan pH 9; HEPES pH 7 dan pH 8; serta Tris- HCl pH 7. Buffer lain menunjukkan data yang tidak konsisten. Hal tersebut, disebabkan oleh keadaan uji yang tidak optimal, seperti rasio protein dan dye yang kurang baik, pelipatan protein yang tidak sempurna atau terbukanya lipatan protein pada awal uji, dan berikatannya dye dengan plastik dari plate. Kedua klon nanobodi anti-NS1 paling stabil berada dalam buffer sodium fosfat dengan pH 7,4 yang saat ini digunakan sebagai buffer penyimpanan saat ini. Rata-rata titik leleh (T_m) pada buffer tersebut merupakan yang paling tinggi untuk klon DD5 ($47,9 \pm 3,7^\circ\text{C}$) maupun klon DD7 ($50,8 \pm 4,3^\circ\text{C}$). Nanobodi anti-NS1 pada kedua klon menunjukkan destabilisasi dalam buffer lain yang ditandai turunnya rata-rata T_m pada kedua klon. Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah metode Thermal Shift Assay (TSA) dapat digunakan untuk mendapatkan buffer dengan pH optimal yang meningkatkan stabilitas termal dari nanobodi anti-NS1.

.....Rapid detection commonly used for Dengue Fever (DF) is by utilizing monoclonal antibodies (mAb) against non-structural protein 1 (anti-NS1). However, there are weaknesses by using mAb, such as high production costs and long production time. Single domain-antibody (sdAb) or nanobody, which can detect non-structural protein 1 (anti- NS1 nanobody) from DENV, is currently under development as a solution to these problems. This study aims to obtain the most optimal pH buffer capable of enhancing the thermal stability of DD5 and DD7 anti-NS1 nanobodies using the Thermal Shift Assay (TSA) method. The DD5 and DD7 anti-NS1 nanobodies, which are the samples, were produced in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) and purified using the Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) method. The anti-NS1 nanobodies were successfully produced and purified, yielding 294 g/mL for DD5 clone and 377 g/mL for DD7 clone. Out of the ten tested buffers, only a few produced consistent data, namely, sodium phosphate pH 7, pH 7.4, and pH 9; HEPES pH 7 and pH 8; and Tris-HCl pH 7. Other buffers showed inconsistent data due

to suboptimal test conditions, such as poor protein-to-dye ratio, imperfect protein folding, protein unfolding at the beginning of the test, and dye binding to the plastic of the plate. Both stable anti-NS1 nanobody clones were found in sodium phosphate buffer with pH 7.4, currently used as the storage buffer. The average melting point (T_m) in this buffer was the highest for both DD5 ($47.9 \pm 3.7^\circ\text{C}$) and DD7 ($50.8 \pm 4.3^\circ\text{C}$) clones. The anti-NS1 nanobodies in both clones showed destabilization in other buffers, indicated by a decrease in the average T_m for both clones. The conclusion drawn from this research is that the Thermal Shift Assay (TSA) method can be used to obtain the optimal pH buffer that enhances the thermal stability of anti- NS1 nanobodies.