Pengklonan Plasmid Rekombinan gp125-gp36 *Human Immunodeficiency Virus* tipe 2 (HIV-2) untuk Pengembangan Sistem Diagnostik HIV-2

Fathurrohlim¹, Silvia Tri Widyaningtyas², Budiman Bela^{2,3*}

¹Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

²Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia,

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia,

*E-mail: budiman.bela@yahoo.com, budiman.bela@ui.ac.id

Abstract

From 36.9 million people infected by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) at the end of 2018 in the whole world, 1-2 million are infected by HIV-2. Accurately diagnostic is required to ensure whether an individual has been infected HIV-1, HIV-2, or HIV-1 and HIV-2 co-infection. HIV-2 diagnostic error using rapid diagnostic tests (RDT) frequently occurs. Misdiagnostic of HIV-2 infection may cause treatment failure which leads to the development of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). In this study, expression plasmid pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 that can produce recombinant antigen gp125-gp36 HIV-2 was successfully constructed and verified properly. The antigen is based on multiepitope, immunodominant and sustainable properties obtained by bioinformatics study. Plasmid pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 may be used to produce recombinant antigens that benefit to detect anti-HIV-2 antibodies in an individual.

Keywords: Antigen, Diagnostic, HIV-2, Cloning; Recombinant

Abstrak

Dari 36,9 juta individu yang terinfeksi oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada akhir tahun 2018 di seluruh dunia, terdapat sekitar 1 – 2 juta individu yang terinfeksi dengan HIV-2. Diagnostik yang akurat diperlukan untuk menentukan apakah suatu individu telah terinfeksi HIV-1, HIV-2 atau koinfeksi HIV-1 dan HIV-2. Kesalahan diagnostik HIV-2 menggunakan *rapid diagnostic tests* (RDT) sering sekali terjadi. Misdiagnosis infeksi HIV-2 dapat menyebabkan kegagalan pengobatan yang berujung pada perkembangan *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS). Pada penelitian ini plasmid pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 pengeksresi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 telah berhasil dikonstruksi dan terverifikasi dengan baik. Antigen tersebut berbasis multiepitop, immunodominan dan bersifat lestari yang didapatkan dari studi bioinformatik. Plasmid pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 dapat digunakan untuk memproduksi antigen rekombinan yang dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi antibodi anti HIV-2 pada suatu individu.

Kata kunci: Antigen; Diagnostik; HIV-2; Kloning; Rekombinan

Pendahuluan

Infeksi *Human Immunodeficiency Virus* tipe 2 (HIV-2) merupakan salah satu penyebab penyakit yang banyak terjadi di sejumlah wilayah di dunia.^{1,2} Dari 36,9 juta orang yang terinfeksi oleh HIV pada akhir tahun 2018 di seluruh dunia, terdapat sekitar satu sampai dua juta yang terinfeksi dengan HIV-2.³ Di era globalisasi ini tidak

menutup kemungkinan infeksi HIV-2 dapat menjadi pandemi global seperti *Human Immunodeficiency Virus* tipe 1 (HIV-1) mengingat cara penularannya yang sama seperti HIV-1.²

Dalam suatu tes diagnostik HIV, diperlukan pengujian yang dapat menentukan apakah suatu individu telah terinfeksi HIV-1, HIV-2 atau koinfeksi

HIV-1 dan HIV-2. Penentuan tersebut sangat penting mengingat adanya perbedaan dalam hal perkembangan penyakit serta pemilihan *antiretroviral treatment* (ART) yang akan diberikan. Misdiagnosis infeksi HIV-2 pada pasien yang dianggap sebagai individu terinfeksi HIV-1 atau pada individu yang koinfeksi HIV-1 dan HIV-2 dapat menyebabkan kegagalan pengobatan yang berujung pada perkembangan *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS).⁴

Uji skrining infeksi HIV-2 dapat dilakukan dengan *rapid diagnostic tests* (RDT). Uji ini dapat membedakan antara infeksi HIV-1 dan HIV-2.⁵ Pada saat ini, RDT yang ada untuk mendeteksi infeksi HIV-2 hanya menggunakan peptida spesifik dari gp36.^{5,6} Kesalahan diagnostik HIV-2 menggunakan RDT sering sekali terjadi. Dari 312 individu yang diklasifikasikan terinfeksi HIV-2, terdapat 5,1% yang direklasifikasi sebagai individu terinfeksi HIV-1. Kemudian dari 235 individu yang diklasifikasikan koinfeksi HIV-1 dan HIV-2, terdapat 43,8% yang direklasifikasi sebagai individu monoinfeksi HIV-1.⁷

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Leligdowicz dkk, daerah yang paling imunodominan pada HIV-2 adalah protein *Gag* dan yang kedua adalah protein *Env* (gp125 dan gp36).⁸ Akan tetapi, pada protein *Gag* banyak terjadi reaksi silang dengan HIV-1.⁸ Pengembangan antigen rekombinan HIV-2 yang menggunakan beberapa peptida spesifik dari protein *Env* (target protein: 28,27 kDa) diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk membuat klon plasmid pengeksresi antigen rekombinan spesifik gp125-gp36 HIV-2 yang berbasis multiepitop, imunodominan dan bersifat lestari.

Metode

Penyiapan DNA sisipan dan vektor

Gen penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 (741 pb) dibuat secara

sinetik (Macrogen) dalam vektor plasmid pUC57 untuk selanjutnya disubklona ke vektor ekspresi pQE80L (Qiagen). Gen tersebut didapatkan dari transkripsi balik hasil studi literatur dan bioinformatik dengan memprediksi epitop linear sel B menggunakan *immune epitope database* (IEDB) (<https://www.iedb.org>), serta piranti lunak *Mega7* dan *BioEdit* untuk menganalisis epitop yang bersifat lestari.⁹ Strategi pengklonaan dapat dilihat pada Gambar 1.

Plasmid pQE80L dan pUC57-gp125-gp36 HIV-2 yang berada pada *E. coli* Top10 (*Invitrogen*) ditumbuhkan pada media *Luria-Bertani* (LB) (500 ml) dengan ampicilin (100 µg/ml) untuk diisolasi plasmid sesuai dengan metode *Hispeed Maxi Kit* (Qiagen). Penyiapan vektor ekspresi dan DNA sisipan dilakukan dengan merestriksi plasmid menggunakan enzim BamHI (*New England Biolabs* - NEB) dan HindIII (NEB). Total masing-masing plasmid pada proses ini adalah 10 µg. Restriksi pertama dilakukan dengan enzim BamHI (NEB) kemudian dilanjutkan dengan proses purifikasi menggunakan Qiaex II (Qiagen). Restriksi kedua dilakukan dengan enzim HindIII (NEB). Untuk mencegah vektor ekspresi pQE80L autoligasi, dilakukan reaksi *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) menggunakan enzim FastAP (Fermentas). DNA vektor dan DNA sisipan yang telah direstriksi kemudian dielektroforesis gel *low melting agarose* (LMA) dan dilanjutkan ke tahapan *desalting* sesuai prosedur Qiaex II (Qiagen). Hasil purifikasi dielektroforesis gel agarose 0,8% (b/v) 100 volt, 30 menit.

Ligasi

Ligasi DNA vektor dan DNA sisipan dilakukan dengan perbandingan rasio molar 1 : 3 menggunakan enzim T4 ligase (NEB). Campuran diinkubasikan menggunakan inkubator 16°C selama 16 jam.

Transformasi

Plasmid hasil ligasi ditransformasikan ke sel *E. coli* Top10 (Invitrogen) kompeten menggunakan metode *heat shock*. Pembuatan sel kompeten dilakukan secara kimiawi menggunakan 100 mM MgCl₂ dan 100 mM CaCl₂. Sebanyak 5 µl plasmid hasil ligasi ditambahkan pada *E. coli* Top10 kompeten. Campuran diinkubasi di es selama 1 jam, kemudian diinkubasi menggunakan penangas air 38°C selama 90 detik dan diinkubasi kembali di es selama 60 detik. Medium *Super Optimal broth with Catabolites* (SOC) (*Thermo scientific*) ditambahkan sebanyak 200 µl kemudian diinkubasi pada inkubator *shaker* 150 rpm dengan suhu 37°C, selama 1 jam. Sebanyak 50 µl campuran disebar pada LB agar dengan ampisilin (100 µg/ml) dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C, selama 16 jam.

Verifikasi

Koloni yang tumbuh dari hasil transformasi diverifikasi menggunakan PCR koloni, analisis restriksi, dan sekuensing. Primer yang digunakan untuk PCR koloni adalah pQE *forward* dan pQE *reverse*. Hasil positif akan ditunjukkan dengan penambahan panjang nukleotida sebanyak 250 pb. Koloni *E. coli* yang

dianalisis PCR dibuat juga replikanya pada LB agar yang mengandung ampisilin. Hasil PCR koloni dielektroforesis gel agarose 0,8% (b/v) 100 volt, 30 menit.

Koloni yang menunjukkan hasil positif diisolasi plasmidnya menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) kemudian diverifikasi lebih lanjut menggunakan analisis enzim restriksi BamHI (NBE) dan HindIII (NBE). Analisis enzim restriksi juga dilakukan menggunakan enzim yang memotong di daerah sisipan yaitu enzim PstI (NBE). Hasil restriksi dielektroforesis gel agarose 0,8% (b/v) 100 volt, 30 menit. Hasil positif dari PCR koloni dan analisis enzim restriksi selanjutnya dilakukan sekuensing. Analisis hasil sekuensing dilakukan menggunakan *software BioEdit versi 7.2.6* dan *Mega7 versi 7.0.26*.

Hasil

Pengklonan gen sintetik gp125-gp36 HIV-2 diawali dengan penyiapan vektor ekspresi (plasmid pQE80L) dan DNA sisipan penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 dengan merestriksi plasmid pQE80L dan pUC57-gp125-gp36 HIV-2 menggunakan enzim BamHI dan HindIII. Hasil restriksi dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 1. Strategi pengklonaan gen sintetik gp125-gp36 HIV-2. Ket: 1: Pemotongan dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII. 2: sub-klon ke plasmid pQE80L.

Vektor plasmid pQE80L mempunyai panjang 4751 pb. Pemotongan dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII menghasilkan DNA dengan panjang 4709

pb dan 42 pb. Untuk DNA dengan panjang 42 pb tidak dapat terlihat pada gel agarose. Adapun plasmid pUC57-gp125-gp36 HIV-2 mempunyai panjang 3415 pb,

Pemotongan dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII menghasilkan DNA dengan panjang 2674 pb (pUC57) dan 741 pb (DNA penyandi antigen spesifik gp125-gp36 HIV-2).

Gambar 2. Elektroforesis gel agarose plasmid pQE80L dan pUC57-gp125-gp36 HIV-2. M: Marker. Lajur 1 dan 3: Plasmid pQE80L (4751 pb) dan pUC57-gp125-gp36 HIV-2 (3415 pb) yang tidak dipotong enzim restriksi. Lajur 2 dan 4: Plasmid pQE80L (4709 pb) dan pUC57-gp125-gp36 HIV-2 (2674 pb dan 741 pb) yang dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII.

DNA vektor dan sisipan kemudian dipurifikasi menggunakan LMA. Hasilnya diperoleh konsentrasi DNA vektor (pQE80L) 10,2 ng/μl, dan DNA sisipan (gen sintetik penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2) 15,2 ng/μl. Elektroforesis gel agarose hasil purifikasi LMA dapat dilihat pada Gambar 3. Dari hasil tersebut terkonfirmasi bahwa DNA vektor dan DNA sisipan mempunyai ukuran yang sesuai yaitu: 4709 pb dan 741 pb.

Ligasi antara DNA vektor dan DNA sisipan menghasilkan plasmid rekombinan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 dengan panjang 5450 pb. Jumlah koloni yang tumbuh dari hasil transformasi plasmid rekombinan dapat dilihat pada Tabel 1.

Gambar 3. Elektroforesis gel agarose hasil purifikasi DNA sisipan (DNA penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2) dan DNA vektor (plasmid pQE80L). M: Marker. Lajur 1: DNA vektor pQE80L (4709). Lajur 2: DNA sisipan penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 (741 pb).

Tabel 1. Jumlah koloni *E. coli* Top10 hasil transformasi.

DNA yang ditransformasi	Jumlah koloni
pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 (plasmid hasil ligasi DNA sisipan gp125-gp36 HIV-2 dengan vektor pQE80L)	1168
pQE80L hasil restriksi tanpa DNA sisipan (kontrol ligasi)	73
pQE80L <i>wild type</i> (Kontrol positif transformasi)	~
Tanpa plasmid (kontrol negatif transformasi)	0

Keterangan: ~ (tidak bisa dihitung)

Verifikasi plasmid rekombinan hasil ligasi kemudian dilakukan menggunakan tiga metode yaitu PCR koloni, analisis restriksi dan sekuensing. Dari sepuluh koloni yang dipilih secara acak, terdapat 1 koloni yang positif mengandung gen sisipan penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2. Hasil positif PCR koloni dapat dilihat pada Gambar 4 yang ditunjukkan oleh pita berukuran 991 pb. Panjang pita DNA tersebut berasal dari 741 pb DNA sisipan penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 dan 250 pb dari DNA plasmid.

Gambar 4. Elektroforesis gel agarose hasil PCR koloni. M: Marker. Lajur 1: Koloni *E. coli* Top10-pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 (hasil positif 991 pb). Lajur 2: Kontrol positif PCR koloni (plasmid pQE80L *wild type*) (250 pb). Lajur 3: Kontrol negatif PCR koloni (tanpa *template* DNA).

Gambar 5. Elektroforesis gel agarose hasil analisis enzim restriksi. M: Marker. (A). Analisis enzim restriksi menggunakan BamHI dan HindIII. Lajur 1 dan 2: Plasmid pQE80L *wild type* (4751 pb) dan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 yang tidak dipotong enzim restriksi (5450 pb). Lajur 3: Plasmid rekombinan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 yang dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII (4709 pb dan 741 pb). (B). Analisis enzim restriksi menggunakan PstI. Lajur 1 dan 4: Plasmid pQE80L *wild type* (4751 pb) dan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 yang tidak dipotong enzim restriksi (5450 pb). Lajur 2 dan 3: Plasmid pQE80L *wild type* (4751 pb) dan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 yang dipotong dengan enzim restriksi PstI (5450 pb).

Analisis restriksi dilakukan untuk koloni yang positif berdasarkan PCR

koloni. Enzim restriksi yang digunakan adalah BamHI dan HindIII. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 5. Plasmid rekombinan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 mempunyai panjang 5450 pb. Pemotongan dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII menghasilkan DNA dengan panjang 4709 pb (pQE80L) dan 741 pb (DNA penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2). Analisis enzim restriksi juga dilakukan menggunakan enzim restriksi yang memotong di bagian DNA sisipan (PstI). Pemotongan dengan enzim restriksi PstI menghasilkan DNA linier dengan panjang 5450.

Koloni yang terverifikasi dengan dua metode tersebut kemudian dilakukan sekuensing (hasil tidak dilampirkan karena dalam proses pengajuan paten). Berdasarkan hasil analisis sekuensing, susunan DNA penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 sesuai dengan rancangan dan tidak ada mutasi yang terjadi.

Pembahasan

Diagnostik infeksi HIV-2 perlu dibedakan dari infeksi HIV-1 karena adanya perbedaan dalam hal perkembangan penyakit serta pengobatan yang akan diberikan.² Kesalahan diagnostik HIV-2 menggunakan RDT sering sekali terjadi.⁷ Hal tersebut disebabkan karena persamaan homologi sekuens asam amino antara HIV-1 dan HIV-2 yang cukup besar dan besarnya variasi antar subtype maupun di dalam satu subtype HIV-2.¹ Antigen rekombinan HIV-2 yang dimanfaatkan untuk deteksi antibodi anti-HIV-2 hanya menggunakan peptida spesifik gp36.^{5,6} Beberapa asam amino dari peptida spesifik tersebut tidak bersifat lestari untuk semua isolat HIV-2.

Antigen rekombinan yang akan diekspresikan oleh plasmid pQE80L-gp125-gp36 HIV2 merupakan antigen rekombinan HIV-2 yang berbasis multiepitop. Antigen rekombinan tersebut dirancang berdasarkan studi bioinformatik

dari protein *envelope* HIV-2 yang terdiri dari gp125 (*surface*) dan gp36 (*transmembran*). Sekuens asam amino yang dipilih merupakan sekuens yang bersifat immunodominan, lestari, dan dapat mengenali semua isolat HIV-2.⁹

Sekuens nukleotida penyandi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 selanjutnya dibuat secara sintetik dalam vektor plasmid pUC57 melalui vendor penyedia jasa dalam biologi molekuler (Macrogen). Gen sintetik tersebut kemudian dikonstruksi pada plasmid ekspresi pQE80L.

Plasmid pUC57-gp125-gp36 HIV-2 ditransformasikan pada sel *E. coli* Top10 kompeten. Pembuatan sel kompeten dilakukan secara kimiawi menggunakan CaCl_2 yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sel *E. coli*.¹⁰ Dengan metode *heat shock* plasmid dipaksa masuk ke dalam sel karena perubahan suhu yang mendadak. Plasmid pUC57 mempunyai *origin of replication* pMB1 yang telah termutasi dan mampu menghasilkan 500 – 700 *copy* plasmid per sel. Selain itu, plasmid pUC57 mempunyai gen resisten ampisilin yang dijadikan sebagai marker seleksi transforman.¹¹

Plasmid pQE80L digunakan sebagai plasmid pengekspresi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2. Plasmid ini mempunyai promotor T5 yang dapat dikontrol dan dikenali oleh RNA polimerase *E. coli* dan 2 sekuens *lac* operator, *synthetic ribosomal binding site* (RBS: AAAGAGGAG) yang berperan dalam ekspresi antigen rekombinan. Pada saat tidak terdapat agen penginduksi seperti IPTG, protein *lac* akan menghambat promotor sehingga tidak dapat diakses oleh RNA polimerase *E. coli*. Selain itu terdapat juga fusi *polyhistidine* (*poly-His*) berupa 6xHis-tag pada ujung N-terminal yang dapat digunakan untuk purifikasi antigen rekombinan.¹²

Enzim BamHI memotong pada sekuens GGATCC pada ujung 5',

sedangkan untuk enzim HindIII memotong pada sekuens AAGCTT pada ujung 3' dari vektor pQE80L dan pUC57gp125-gp36. Kedua enzim tersebut menghasilkan pemotongan dengan ujung lancip (*sticky end*) yang dapat meningkatkan efisiensi ligasi.^{13,14} Pemotongan dengan dua enzim restriksi secara terpisah pada saat penyiapan DNA vektor dan DNA sisipan bertujuan untuk menghindari adanya *star activity*. *Star activity* tersebut dapat disebabkan karena konsentrasi gliserol menjadi >5% (v/v) akibat dari penggunaan dua enzim restriksi dalam satu reaksi.¹⁵ Purifikasi Qiaex II sebelum pemotongan enzim kedua akan membersihkan garam dan protein kontaminan yang dapat mengganggu reaksi enzimatik, sedangkan DNA akan menempel pada partikel silika.¹⁶ Pada saat pemotongan vektor pQE80L, fragmen dengan panjang 42 pb tidak dapat divisualisasi pada gel agarose disebabkan karena ukurannya yang terlalu kecil. Kecepatan migrasi molekul DNA dalam arus listrik dipengaruhi oleh ukuran DNA tersebut. Semakin kecil ukurannya maka molekul tersebut akan bermigrasi semakin jauh.¹⁷

Reaksi CIAP pada DNA vektor sebelum dilakukan LMA dapat mencegah terjadinya autoligasi akibat dari masih adanya vektor yang belum terpotong oleh enzim BamHI dan HindIII. Enzim alkaline phosphatase akan mendefosforilasi ujung 5' dan 3' DNA vektor.¹⁸ Ligasi DNA vektor pQE80L dan DNA sisipan gp125-gp36 HIV-2 terjadi karena pembentukan ikatan *phosphodiester* dan ikatan hidrogen pada ujung *sticky end* yang saling berkomplemen.¹³ Perbandingan jumlah koloni antara plasmid rekombinan pQE80L-gp125-gp36 HIV-2 (5450 pb) dan kontrol ligasi yang ditransformasikan ke *E. coli* Top10 adalah 1 : 16. Adanya koloni pada kontrol ligasi kemungkinan terjadi karena adanya autoligasi dari vektor dan adanya plasmid yang belum terpotong.

Berdasarkan tiga metode verifikasi yang dilakukan, sekuens DNA penyandi

antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 berhasil dikonstruksikan pada vektor plasmid pQE80L. Plasmid rekombinan tersebut dapat diekspresikan pada sel *E. coli* yang dapat digunakan untuk mengekspresikan protein dengan promotor RNA polimerase T5 seperti BL21.¹⁹

Kesimpulan

Plasmid pengeksresi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 telah berhasil dikonstruksi dan telah terverifikasi kebenaran sekuensnya.

Saran

Pada penelitian ini, kontrol ligasi pada saat transformasi diperoleh jumlah koloni yang cukup tinggi yaitu 73 koloni. Untuk memperoleh hasil ligasi yang lebih baik, pastikan vektor plasmid terpotong seluruhnya, hal tersebut dapat dilakukan dengan cara mengecek hasil potongan dengan elektroforesis gel agarose, dan apabila belum terpotong seluruhnya, campuran reaksi dapat dilakukan penambahan waktu inkubasi.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada hibah Sinas HIV PRVKP FKUI-RSCM yang telah mendanai penelitian ini dari awal sampai akhir, kepada Dr. dr. Budiman Bela, Sp.MK(K) dan Dr. drh. Silvia Tri Widyaningtyas, M.Biomed yang telah membimbing dalam penelitian ini.

Daftar Rujukan

1. Visseaux B, Damond F, Matheron S, Descamps D, Charpentier C. Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2016;46:233–7.
2. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(6):780–7.
3. WHO. Global AIDS Update 2018. World Health Organization; 2019.
4. Mendoza C de, Requena S, Caballero E, Cabezas T, Peñaranda M, Amengual MJ, et al. Antiretroviral treatment of HIV-2 infection. *Future Virol.* 2017;12(8):461–11.
5. WHO. HIV assays report 18. World Health Organization; 2015.
6. Malloch L, Kadivar K, Putz J, et al. Comparative evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 Confirmatory Assay and the Bio-Rad Multispot HIV-1/2 Rapid Test as an alternative differentiation assay for CLSI M53 algorithm-I. *J Clin Virol.* 2013;58(SUPPL1):85–6.
7. Tchounga BK, Inwoley A, Coffie PA, et al. Re-testing and misclassification of HIV-2 and HIV-1&2 dually reactive patients among the HIV-2 cohort of the West African Database to evaluate AIDS collaboration. *J Int AIDS Soc.* 2014;17(1):19064.
8. Leligidowicz A, Yindom LM, Onyango C, Sarge-Njie R, Alabi A, Cotten M, et al. Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *J Clin Invest.* 2007;117(10):3067–7.
9. Fathurrohik. Struktur dan ekspresi antigen rekombinan gp125-gp36 HIV-2 untuk deteksi antibodi antivirus HIV-2 [thesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2019.
10. Hans S, Gimpel M, Glauche F, Neubauer P, Cruz-Bournazou M. Automated Cell Treatment for Competence and Transformation of *Escherichia coli* in a High-Throughput Quasi-Turbidostat Using Microtiter Plates. *MDPI.* 2018;6(60):1–14.
11. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:1–17.
12. Qiagen. The QIA expressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th ed. UDA: Qiagen; 2003.
13. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. Harper's Illustrated Biochemistry. 25th ed. United States of America: McGraw-Hill Companies; 2003.
14. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol.* 2016;6:1–17.
15. Bitinaite J, Schildkraut I. Self-generated DNA termini relax the specificity of SgrAI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1164–6.
16. Qiagen. QIAEXII handbook for DNA extraction from agarose and polyacrilamide gels and for desalting and concentrating DNA from solutions. Qiagen; 2015.
17. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 1 st-3rd ed.

- New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
18. Glick BR, Pasternak JJ. Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. Washinton DC: ASM Pres. 2003.
 19. Hayat S, Farahani N, Golichenari B, Sahebkar A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. Curr Pharm Des. 2018;24:1–8.