

Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Rekombinan Spike dan Nukleokapsid SARS-CoV-2 untuk Deteksi Antibodi Anti-SARS-CoV-2

Construction of Recombinant Antigens Plasmid Expressing Spike and Nucleocapsid SARS-CoV-2 for Detection of the Antibodies Anti-SARS-CoV-2

Sari Artauli¹, Silvia Tri Widyaningtyas², Fera Ibrahim^{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: feraib@yahoo.fr

Diterima: 24 November 2020

Direvisi: 20 Januari 2021

Disetujui: 18 Agustus 2021

ABSTRACT

Covid-19 infection is still a health problem in Indonesia and even throughout the globe. To control Covid-19, efforts are made for each country to conduct research to develop raw materials that can be used for anti-SARS-CoV-2 detection in serological diagnostics. This study aimed to construct recombinant plasmids expressing SARS-CoV-2 antigen so that it be used in the production of raw materials in developing the SARS-CoV-2 serological test. The genes coding spike and nucleocapsid recombinant antigens cloned in pUC57 were subcloned into the pQE80L expression vector to produce pQE80L-spike and pQE80L-nucleocapsid plasmids. The recombinant bacterial selection was carried out by colony Polymerase Chain Reaction, recombinant plasmids were analyzed with BamHI and HindIII restriction enzymes. The recombinant plasmids were verified by sequencing. The PCR results showed the colonies containing recombinant plasmids pQE80L-spike and pQE80L-nucleocapsid produced deoxyribonucleic acid bands of 1438 bp and 772 bp, respectively. The restriction analysis of pQE80L-Spike and pQE80L-nucleocapsid plasmids produced 4709 bp vector fragments and 1188 bp and 522 bp of inserted DNA, respectively. The sequencing showed the spike and nucleocapsid coding gene have been cloned into pQE80L. The construction of SARS-CoV-2 plasmid expression spike and nucleoprotein SARS-CoV-2 was successful to develop qualitative and quantitative anti-SARS-CoV-2 antibody detection tests.

Keywords: spike, nucleocapsid, SARS-CoV-2, cloning, anti-SARS-CoV-2 detection

ABSTRAK

Infeksi Covid-19 masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia bahkan juga di seluruh negara. Dalam rangka pengendalian infeksi Covid-19, maka setiap negara berupaya melakukan penelitian untuk mengembangkan bahan baku yang dapat digunakan untuk uji deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2, salah satunya adalah diagnostik serologi. Tujuan penelitian ini adalah mengkonstruksi plasmid rekombinan pengekspresi antigen SARS-CoV-2 sehingga dapat digunakan dalam memproduksi bahan baku dalam pengembangan uji diagnostik serologi SARS-CoV-2. Gen pengekspresi antigen rekombinan spike (S) dan nukleokapsid (N) yang berada dalam pUC57 disubklona ke dalam vektor ekspresi pQE80L untuk menghasilkan plasmid pQE80L-Spike dan pQE80L-Nukleokapsid. Seleksi bakteri rekombinan dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) koloni, plasmid rekombinan dianalisis dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII, serta diverifikasi dengan sekuensing. Hasil PCR menunjukkan koloni mengandung plasmid rekombinan pQE80L-Spike dan pQE80L-Nukleokapsid menghasilkan pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) masing-masing berukuran 1438 pb dan 772 pb. Analisis restriksi plasmid pQE80L-Spike dan pQE80L-Nukleokapsid menghasilkan fragmen vektor 4709 pb dan DNA sisipan berturut turut 1188 pb dan 522 pb. Hasil sekuensing menunjukkan spike dan nukleokapsid terklona dalam vektor pQE80L. Konstruksi plasmid pengekspresi spike dan nukleokapsid SARS-CoV-2 telah berhasil dilakukan untuk mengembangkan uji deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2 baik kualitatif maupun kuantitatif.

Kata kunci: spike, nukleokapsid, SARS-CoV-2, kloning, deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2

Pendahuluan

Dua kasus positif Covid-19 ditemukan pertama kali di Indonesia tanggal 2 Maret 2020. Data per tanggal 12 Juli 2021 dilaporkan sebanyak 2.567.630 kasus positif Covid-19 di 34 provinsi di Indonesia dengan 67.335 yang meninggal.¹ Data *World Health Organization* (WHO) per 11 Juli 2021 melaporkan bahwa terdapat 186.240.393 kasus positif SARS-CoV-2 diseluruh negara di dunia.² Pada awal pandemi, Indonesia memiliki angka kematian akibat Covid-19 mencapai 8,8%, dimana angka ini melampaui angka kematian di negara-negara yang sudah terdampak Covid-19 lebih dulu seperti Cina (4,07%), Amerika Serikat (3,95%) dan Iran (6,24%).³

SARS-CoV-2 merupakan virus *ribonucleic acid* (RNA) famili *Coronaviridae*, genus *Coronavirus*, dan merupakan virus *single stranded* untai positif *non segmented*.⁴ Virus ini memiliki empat protein struktural utama yaitu protein nukleokapsid (N), matriks (M), *envelope* (E) dan *spike* (S). *Spike* merupakan jalur utama virus dapat menginfeksi sel inang. Protein *spike* terdiri dari dua subunit yaitu S1 dan S2. *Receptor Binding Domain* (RBD) pada S1 akan mengikat virus ke reseptor sel inang melalui ikatan dengan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2), sedangkan S2 pada *Heptad Repeat* (HR) akan terlibat melakukan fusi virus pada membran sel inang sehingga virus dapat masuk dan melakukan replikasi di sel inang.^{5,6} Di antara protein virus SARS-CoV-2 lainnya terdapat juga protein N yang merupakan struktur inti virion dan bertanggung jawab mengikat RNA genom virus serta mengemasnya menjadi kompleks ribonukleoprotein (RNP) yang sangat berperan dalam transkripsi dan replikasi mRNA virus.⁷

Proses penularan yang terjadi begitu cepat dipengaruhi oleh sifat transmisi virus pada sel inang dimana jalur utama penularan SARS-CoV-2 adalah melalui droplet pernapasan. Penderita dapat

menularkan ke manusia sehat lainnya melalui droplet yang dapat menyebar dalam radius 4 m melalui batuk, bersin, berbicara, dan aktivitas oral lainnya. Besarnya angka kematian dan jumlah penularan yang terus meningkat adalah ancaman yang besar untuk Indonesia. Salah satu cara mengatasinya adalah dengan pemberian vaksin SARS-CoV-2 untuk memutus rantai penularan.⁸ Dalam rangka mendukung pengendalian infeksi Covid-19, maka tiap negara diupayakan melakukan penelitian untuk mengembangkan bahan baku yang dapat digunakan untuk uji deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2, salah satunya adalah diagnostik serologi. Pengujian ini dapat digunakan untuk uji diagnostik cepat mengetahui ada tidaknya antibodi dalam tubuh seseorang, monitoring antibodi pada penyintas Covid-19 untuk donor terapi plasma konvalesen, serta dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi paska vaksinasi.⁹

Diketahui bahwa *spike* dan nukleokapsid adalah protein SARS-CoV-2 yang antigenik. Protein ini memiliki bagian *immunodominant* yang merupakan bagian antigen yang mendominasi dalam menghasilkan respon imun. Penggunaan bagian *immunodominant* dalam suatu antigen yang dikembangkan dapat meningkatkan sistem deteksi untuk sistem deteksi serologi.^{10,11}

Penelitian sebelumnya pernah dilakukan oleh James S Terry dkk¹² menggunakan protein rekombinan nukleokapsid SARS-CoV-2 yang diekspresikan pada sistem prokariota dan diimunisasikan pada mencit untuk menghasilkan antibody monoklonal, namun hasilnya masih memiliki *cross reactivity* dengan nukleokapsid SARS-CoV. Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi plasmid antigen rekombinan SARS-CoV-2 menggunakan dua antigen rekombinan yaitu *spike* dan nukleokapsid yang *immunodominant* sehingga dapat memproduksi bahan baku untuk mengembangkan uji diagnostik

serologi SARS-CoV-2 yang menghasilkan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik untuk menghindari adanya *cross-reactivity* terhadap strain lain.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PRVKP - FKUI) dari Maret sampai November 2020.

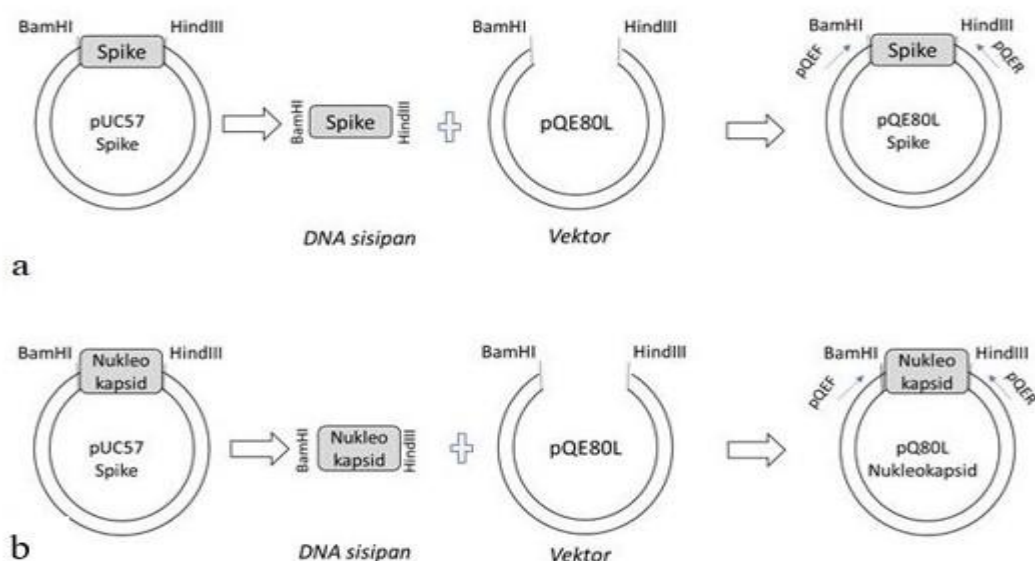
Penelitian menggunakan pUC57-Spike dan pUC57-Nukleokapsid, plasmid pQE80L sebagai vektor ekspresi gen sisipan, *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 kompeten yang akan membawa plasmid pengekspresi antigen rekombinan, QIAprep Spin Miniprep [Qiagen] untuk isolasi plasmid, Qiaex II [Qiagen] untuk purifikasi hasil restriksi, enzim ligase, enzim restriksi BamHI dan HindIII untuk memotong dan verifikasi plasmid rekombinan, primer pQE80L-forward (pQEF) dan pQE80L-reverse (pQER) digunakan untuk verifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) koloni, *Luria Bertani* (LB), *Medium Super Optimal broth with Catabolites repression* (SOC) [®Thermo scientific], *low melting agar* 0,8%, dan *Agarosa* 0,8%. Sementara itu, alat yang digunakan adalah Erlenmeyer, tabung steril 1,5 mL, tabung steril 10 mL, tabung steril 25 mL, ose steril, cawan petri, *incubator shaker*, *sentrifuge* [®Tomy MX-series], dan *Gel Doc* [®Bio-Rad].

Konstruksi plasmid rekombinan penyandi antigen spike dan nukleokapsid

Penentuan peptide spesifik spike dan nukleokapsid dilakukan dengan mengambil data protein spike dan nukleokapsid SARS-COV-2 dari *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) kemudian prediksi epitope *immunodominant* menggunakan *Immune Epitope Database (IEDB) Analysis Resource*. Konstruksi plasmid rekombinan dilakukan sesuai prosedur yang dijelaskan dalam Ausubel M *et al.*¹³ Konstruksi

plasmid rekombinan pengekspresi spike dan nukleokapsid SARS-COV-2 diawali dengan men-subklon gen spike dan nukleokapsid dari plasmid pUC57 ke dalam vektor ekspresi sistem prokariota pQE80L (Plasmid pQE80L), pUC57-Spike dan pUC57-Nukleokapsid direstriksi menggunakan enzim BamHI dan HindIII, sehingga masing-masing menghasilkan pQE80L-Spike dan pQE80L-Nukleokapsid (Gambar 1).

Konsentrasi plasmid yang digunakan dalam penyediaan vektor dan sisipan adalah 10 µg. Reaksi restriksi plasmid dilakukan dengan menambahkan 10 µg plasmid ke dalam tabung 1,5 mL berisi 1x buffer Neb2, 1xBovine Serum Albumin (BSA) dan 40.000 Unit BamHI (NEB), serta air bebas DNase-RNase (®Ambion) sampai volume 100 µL. Campuran diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, DNA dilakukan *desalting* untuk menghilangkan garam menggunakan kit ekstraksi gel QiaecII (®Qiagen) mengikuti prosedur yang dijelaskan oleh pabrik. Selanjutnya, DNA direstriksi dengan HindIII. DNA yang telah dipotong dengan BamHI ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 1x buffer Neb4, 1xBSA, dan 40.000 Unit HindIII (NEB) serta air bebas DNase-RNase (®Ambion) hingga volume 100 µL. Setelah diinkubasi semalaman pada suhu 37°C, fragmen DNA hasil restriksi dipisahkan pada *low melting agar* (LMA) 0,8% yang mengandung kristal violet (®Invitrogen). DNA dimurnikan dari LMA dengan menggunakan kit Qiaex II (®Qiagen) sesuai prosedur yang dijelaskan oleh Qiagen. Ligasi dilakukan dengan vektor: sisipan perbandingan = 1: 3. Reaksi ligasi adalah vektor 80 ng, sisipan 80 ng, 1x buffer ligasi (NEB), 2.5 Unit T4 Ligase (NEB), dan air bebas DNaseRNase (Ambion) hingga volume 20 µL. Reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 16°C selama semalam. Ligasi ditransformasi dengan metode *heat shock* ke *E. coli* Top10 yang dibuat kompeten secara kimiawi.



Gambar 1. Skema pengsubklonan gen penyandi *spike* dan nukleokapsid ke dalam vektor pQE80L. Keterangan: a. Pengsubklonan *spike* dari pUC57 ke dalam pQE80L untuk menghasilkan pQE80L-*Spike*, b. Pengsubklonan nukleokapsid dari pUC57 ke dalam pQE80L untuk menghasilkan pQE80L-Nukleokapsid. pQEF dan pQER merupakan pasangan primer yang digunakan untuk PCR.

Seleksi koloni dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, analisis enzim restriksi, dan sekuensing

Koloni bakteri rekombinan yang mengandung plasmid penyandi *spike* dan nukleokapsid ditapis menggunakan PCR koloni. Pasangan primer pQEF (GTATCAGGAGGCCCTTTCGTCT) dan pQER (CATTACTGGATCTATCAACAGGAG) yang mengenali situs spesifik di pQE80L digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang disisipkan di situs restriksi BamHI dan HindIII. Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan *DreamTaq DNA polymerase* [Thermo scientific] sesuai instruksi pabrik [Thermo scientific]. Koloni bakteri diambil menggunakan tusuk gigi steril, ditanam pada plat agar replica, dan dimasukkan ke dalam tabung PCR sebagai cetakan PCR. Koloni yang menghasilkan ampikon DNA yang diharapkan ditanam dalam kaldu LB 4 mL yang mengandung 100 µg/mL Ampisilin, diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Selanjutnya dilakukan isolasi plasmid dengan menggunakan *Qiaprep*

miniprep [®Qiagen] sesuai prosedur yang dijelaskan dalam buku petunjuk Qiagen.

Plasmid rekombinan pQE80L yang mengandung DNA sisipan *spike* dan nukleokapsid selanjutnya dianalisis dengan enzim restriksi untuk mengeluarkan DNA sisipan dari vektor pQE80L. Dilakukan pembuatan *master mix* reaksi pemotongan enzim untuk 10 plasmid. Sebanyak 10 µL Neb2, 10 µL 10% BSA, 46 µL air bebas DNase-RNase (®Ambion), dan 4 µL 40.000 Unit BamHI (NEB). *Master mix* kemudian di-*aliquot* ke dalam tabung 1,5 mL sebanyak 7 µL, kemudian ke dalam *master mix* ditambahkan 3 µL plasmid hasil isolasi dengan *Miniprep* dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan *desalting* menggunakan *Qiaquick PCR purification kit* (®Qiagen) dengan prosedur seperti yang dijelaskan oleh pabrik dengan modifikasi pada bagian elusi. Selanjutnya pemotongan enzim kedua, yaitu HindIII, dilakukan. Penyiapan *master mix* adalah sebagai berikut 20 µL Neb2, 20 µL 10% BSA, 56 µL air bebas DNaseRNase (®Ambion), dan 4 µL 40.000 Unit HindIII

Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Rekombinan Spike dan Nukleokapsid SARS CoV-2 (Sari Artauli dkk) (NEB). *Master mix* kemudian di-*aliquot* ke dalam tabung 1,5 mL sebanyak 10 µL, kemudian ke dalam *master mix* ditambahkan 10 µL plasmid hasil restriksi BamHI yang telah di-*desalting*. Reaksi inkubasi pada 37°C selama 1 jam dan dianalisis pada *agarose* 1%. Plasmid yang menghasilkan pola potongan seperti yang diharapkan disekuensing dengan metode *Sanger* untuk mengetahui kebenaran DNA sisipan.

Hasil

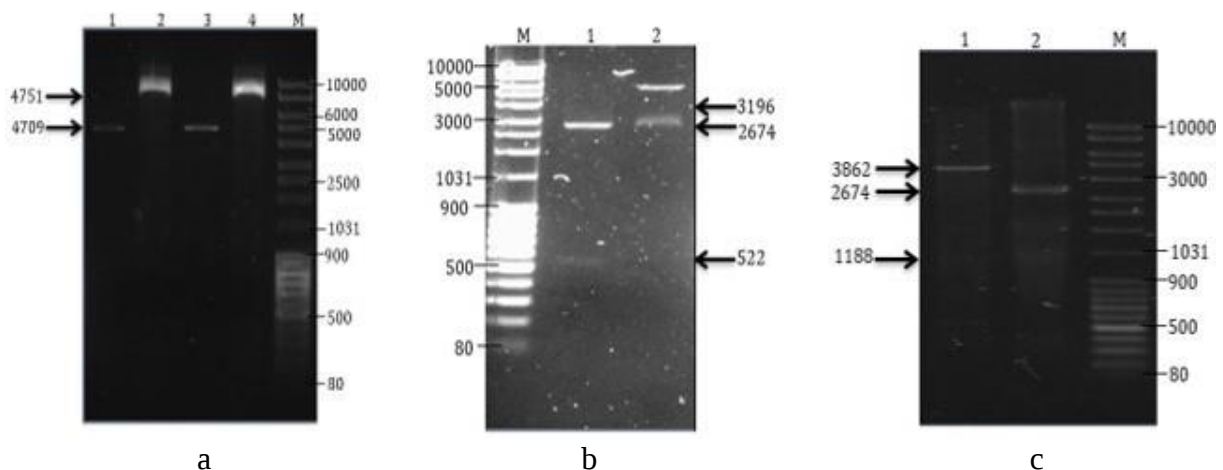
Konstruksi plasmid rekombinan penyandi antigen spike dan nukleokapsid

Pada tahap penyiapan vektor plasmid pQE80L direstriksi dengan BamHI dan HindIII menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 4800 pb dan 42 pb, sedangkan untuk DNA 42 pb (tidak dapat diamati pada gel *agarose*) (Gambar 2a). Hasil restriksi dengan BamHI dan HindIII menghasilkan DNA fragmen berukuran

2674 pb (pUC57) dan 522 pb yang DNA penyandi antigen rekombinan nukleokapsid SARS-CoV-2) (Gambar 2b). Pemotongan pUC57-*Spike* dengan BamHI dan HindIII menghasilkan fragmen DNA berukuran 2674 pb yang merupakan DNA pUC57 dan 1188 pb yang merupakan DNA penyandi antigen rekombinan *spike* SARS-CoV-2 (Gambar 2c).

Seleksi koloni dengan PCR, analisis enzim restriksi, dan sekuensing

Hasil PCR koloni menggunakan pasangan primer pQEF dan pQER menghasilkan DNA berukuran 1438 pb dan 772 pb berturut-turut untuk plasmid pQE80L-*Spike* dan pQE80L-Nukleokapsid (Gambar 3a). Hasil analisis restriksi plasmid pQE80L-*Spike* dengan BamHI dan HindIII menghasilkan pita 4709 pb yang merupakan fragmen DNA pQE80L dan 1188 pb yang merupakan fragmen DNA penyandi antigen rekombinan *spike* (Gambar 3b). Pemotongan pQE80L-



Gambar 2. Analisis restriksi plasmid pQE80L wild type, pUC57-Nukleokapsid, dan pUC57-*Spike*. Keterangan: a. M: Marka. Lajur 1,3 : Plasmid pQE80L yang dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII. Lajur 2,4: Plasmid pQE80L yang tidak dipotong dengan enzim restriksi, b. M: Marka. Lajur 1: Plasmid pUC57-Nukleokapsid SARS-CoV-2 yang dipotong dengan emzim BamHI dan HindIII. Lajur 2: Plasmid pUC57-Nukleokapsid SARS-CoV-2 yang tidak dipotong dengan enzim restriksi, c. M: Marka. Lajur 1: Plasmid pUC57-*Spike* SARS-CoV-2 yang tidak dipotong dengan enzim restriksi. Lajur 2: Plasmid pUC57-*Spike* SARS-CoV-2 yang dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan HindIII. *Agarose* 1%; 100 volt; 40 menit.

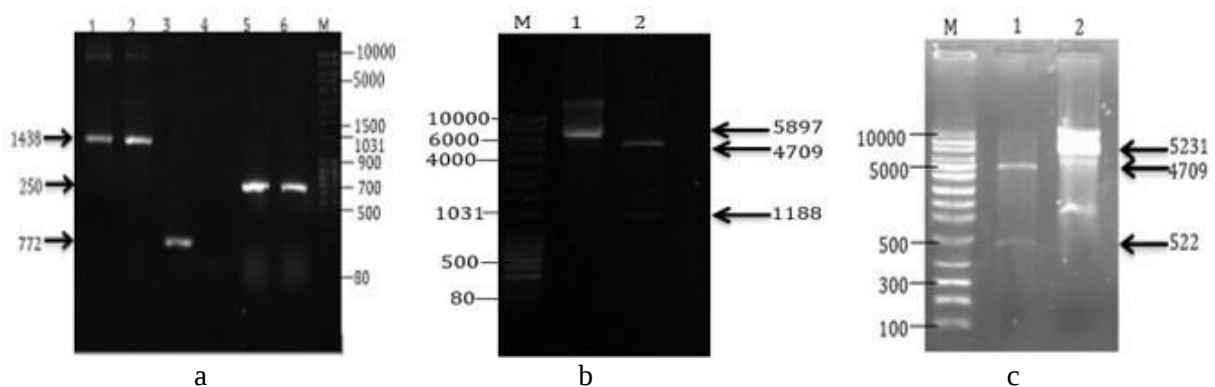
Nukleokapsid dengan BamHI dan HindIII menghasilkan pita 4709 pb dan 522 pb yang merupakan DNA penyandi nukleokapsid (Gambar 3c).

Hasil sekuensing menunjukkan gen *spike* dan gen nukleokapsid telah berhasil diklonasi di dalam vektor pQE80L. DNA sisipan terklonasi secara *in frame* dengan 6X *Histidine* dan tidak terjadi pergeseran basa *spike* dan nukleokapsid yang menyebabkan perubahan susunan asam amino kedua protein (Gambar 4).

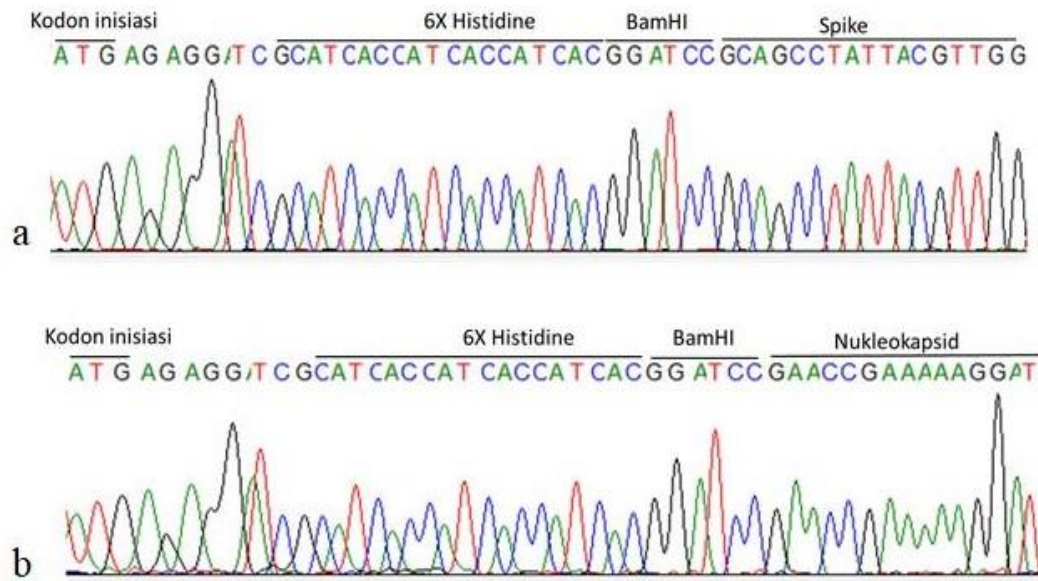
Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pengembangan antigen rekombinan SARS-CoV-2 untuk pengembangan uji diagnostik serologi SARS-CoV-2. Dalam penelitian ini, antigen diproduksi dalam sistem prokariota yaitu *Escherichia coli* dibandingkan dengan sistem ekspresi mamalia *yeast* ataupun *Baculovirus*. Sistem ekspresi prokariota memiliki beberapa keunggulan seperti pertumbuhan yang cepat, manipulasi gen yang mudah, biaya produksi yang rendah dan mudah

untuk ditingkatkan.^{14,15} Sistem ini sesuai untuk negara berkembang dengan penduduk banyak seperti Indonesia di mana pemenuhan antigen rekombinan untuk keperluan diagnosis, ataupun deteksi antibodi paska vaksinasi atau infeksi. Penelitian yang sama pernah dilakukan oleh James S Terry dkk¹² menggunakan protein rekombinan nukleokapsid SARS-CoV-2 yang diekspresikan pada sistem prokariota dan diimunisasikan pada mencit untuk menghasilkan antibodi monoklonal, namun hasilnya masih memiliki *cross-reactivity* dengan nukleokapsid SARS-CoV. Pada penelitian ini kami menggunakan dua antigen target yaitu *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 yang *immunodominant*. Penggunaan bagian *immunodominant* dalam suatu antigen yang dikembangkan dalam sistem deteksi serologi diharapkan dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas sistem deteksi, sehingga hal ini dapat menghindari adanya *cross-reactivity* dengan galur SARS-CoV.^{16,17}



Gambar 3. Uji tapis koloni mengandung plasmid rekombinan. Keterangan: a. PCR koloni, M : Marka, Lajur 1-2 : koloni *E. coli* Top10-pQE80L-Spike SARS-CoV-2, Lajur 3 : Kontrol positif PCR koloni (plasmid pQE80L *wild type*), Lajur 4 : Kontrol negatif PCR koloni (tanpa *template* DNA), dan Lajur 5-6 : Koloni *E. coli* Top10-pQE80L-Nukleokapsid SARS-CoV-2, b. Analisis restriksi pQE80L-Spike, M: Marka, Lajur 1: pQE80L-Spike yang tidak dipotong, Lajur 2: Plasmid pQE80L-Spike yang direstriksi BamHI dan HindIII, c. Analisis restriksi pQE80L-Nukleokapsid, M: Marka, Lajur 1: Plasmid pQE80L-Nukleokapsid direstriksi BamHI dan HindIII, Lajur 2: Plasmid pQE80L-nukleokapsid yang tidak dipotong. *Agarose* 0,8%; 100 volt; 40 menit.



Gambar 4. Hasil sekuensing gen sisipan spike dan nukleokapsid. Keterangan: a. Sekuen DNA sisipan *spike*, b. Sekuen DNA sisipan nukleokapsid.

Dalam merancang antigen *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 yang bersifat *immunodominant*, optimasi kodon dilakukan untuk menghindari adanya perbedaan kodon antara *messenger RNA* yang mengandung kodon virus dengan kodon transfer RNA (tRNA) *sel host* dalam hal ini *E. coli* yang dapat mempengaruhi efisiensi translasi protein.^{18,19} Tahapan pengkloningan gen sintetik antigen rekombinan dilakukan untuk mengamplifikasi gen tersebut dalam rangka untuk meyiapkannya sebagai gen sisipan yang akan dimasukkan ke dalam vektor ekspresi, yaitu plasmid pQE80L. Pengkloningan gen sintetik dilakukan pada plasmid pUC57 karena plasmid ini memiliki kemampuan *copy number* yang tinggi.

Konstruksi plasmid rekombinan pengeksresi *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 pada pQE80L yang merupakan vektor ekspresi prokariota berturut-turut menghasilkan pQE80L-*Spike* dan pQE80L-Nukleokapsid. DNA penyandi *spike* dan nukleokapsid disisipkan pada situs restriksi BamHI dan

HindIII karena situs restriksi tidak terdapat pada DNA sisipan sehingga tidak akan memotong DNA sisipan. Kemudian jenis potongan yang dihasilkan dari enzim BamHI dan HindIII tersebut menghasilkan potongan *sticky ends* yang akan meningkatkan efektifitas pada saat reaksi ligase. Penyisipan pada situs BamHI menyebabkan DNA sisipan akan berada dalam satu kerangka baca (*open reading frame*) dengan 6X *Histidine*. *Histidine* yang berada pada bagian hulu antigen diperlukan untuk membantu proses purifikasi protein. Dengan demikian antigen rekombinan dapat diekspresikan secara terfusi dengan 6X *Histidine* dan dapat dipurifikasi dengan *nickel-nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA).^{20,21} HindIII merupakan enzim restriksi yang berada di bagian ujung 3' *multiple cloning site* (MCS) pQE80L dan tepat di 3' HindIII terdapat *stop codon*. Pengklonaan menggunakan enzim HindIII menyebabkan pada saat proses translasi, DNA sisipan yang tidak memiliki *stop codon* tidak akan mengalami penambahan asam amino hasil translasi sekuen DNA yang berada di

MCS. Penambahan asam amino tersebut kemungkinan dapat mempengaruhi struktur protein rekombinan.

LMA adalah agarosa dengan suhu rendah. Metode ini dilakukan untuk mempurifikasi gen sisipan dengan suhu rendah agar DNA tidak terdenaturasi.²² Hasil purifikasi pUC57 dan gen sisipan, yaitu *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 kemudian mengalami tahapan restriksi berskala besar menggunakan enzim restriksi BamHI dan HindIII. Kedua enzim restriksi ini dapat menghasilkan pola pemotongan ujung lancip yang dapat saling berpasangan dengan komplemen ujung lancip lain melalui ikatan hidrogen sehingga saat DNA sisipan diligasikan dengan DNA vektor dapat meningkatkan efektivitas proses reaksi ligasi. Ligasi akan terjadi karena adanya pembentukan ikatan fosfodiester dan ikatan hidrogen pada ujung *sticky end* yang saling berkomplementer.¹⁶

Plasmid hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke *E. coli* BL21 kompeten. Proses transformasi ke *E. coli* BL21 kompeten bertujuan sebagai inang untuk ekspresi protein rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2. Pembuatan sel kompeten dilakukan dengan cara kimiawi menggunakan CaCl_2 yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sel *E. coli*. DNA akan masuk ke permukaan sel dengan bantuan kation divalen Ca^{2+} . Pada metode *heat-shock*, plasmid dipaksa masuk ke dalam sel karena perubahan suhu yang mendadak dari 0°C menjadi 38°C dan kembali lagi ke suhu 0°C .²³ Langkah *heat-shock* ini akan membantu DNA masuk ke dalam sitosol sel vektor. Setelah itu, hasil transformasi *E. coli* BL21-pQE80L-*spike* dan *E. coli* BL21-pQE80L-nukleokapsid SARS CoV-2 dikultur pada media Luria Bertani Agar yang mengandung ampicilin ($100\mu\text{g/mL}$).²⁴

Bakteri mengandung plasmid rekombinan dapat ditapis dengan beberapa metode seperti PCR koloni, analisis enzim restriksi, *marker* tertentu seperti *blue-white*

screening, dan reaksi sekuensing. Dalam studi ini seleksi koloni dilakukan dengan menggunakan metode PCR koloni sebagai metode pertama untuk menapis bakteri pembawa plasmid rekombinan. Metode ini memiliki akurasi yang lebih baik karena menggunakan pasangan primer pQEF dan pQER yang mengenali daerah spesifik yang mengapit kerangka MCS pQE80L sehingga sangat baik untuk mengkonfirmasi pQE80L yang membawa gen sisipan *spike* dan nukleokapsid. Amplifikasi menggunakan pQEF dan pQER menyebabkan penambahan 250 pb pada panjang DNA sisipan (Gambar 3a). Selain pQEF dan pQER, primer spesifik untuk DNA sisipan juga dapat digunakan untuk PCR koloni, namun perlu dipertimbangkan adanya kemungkinan perubahan suhu *annealing* pada saat DNA sisipan telah terklona dalam suatu vektor ekspresi yang berpengaruh pada keberhasilan PCR koloni.²⁵

Metode seleksi koloni kedua yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis restriksi. Analisis restriksi ditujukan untuk mengetahui ukuran plasmid rekombinan dan ukuran DNA sisipan serta ukuran DNA vektor. Pemotongan plasmid pQE80L-*Spike* dan pQE80L-Nukleokapsid dengan 2 enzim untuk pengklonaan, BamHI dan HindIII akan menyebabkan kedua plasmid menjadi 2 fragmen yaitu fragmen DNA vektor (pQE80L) berukuran 4709 pb dan DNA sisipan berturut turut 1188 pb dan 522 pb. Kemudian hasil sekuensing yang telah dilakukan menunjukkan gen sisipan sesuai dengan rancangan dan tidak terdapat mutasi. Karena itu, hasil analisis ketiga metode tersebut menyatakan bahwa konstruksi plasmid rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 telah berhasil dilakukan, yang terverifikasi dengan PCR koloni, analisis enzim restriksi, dan sekuensing.

Pada penelitian ini konstruksi antigen rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 telah berhasil dilakukan, namun keterbatasan penelitian

ini belum dapat menguji tingkat sensitivitas dan spesifisitas plasmid rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 sehingga perlu dilanjutkan untuk mempersiapkan ekspresi dan purifikasi antigen rekombinan agar dapat mengetahui kemampuan antigen rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 untuk mengenali antibodi anti-SARS-CoV-2.

Kesimpulan

Konstruksi plasmid rekombinan *spike* dan nukleokapsid SARS-CoV-2 telah berhasil dilakukan yang terverifikasi dengan metode PCR koloni, analisis enzim restriksi, dan sekuensing sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku untuk mengembangkan uji deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini sebagian telah didanai oleh Hibah Publikasi Terindeks Internasional (PUTI) SAINTEKES FKUI.

Saran

Studi lebih lanjut perlu dilakukan mengenai kemampuan antigen rekombinan *spike* dan nukleokapsid untuk diekspresikan dalam sistem prokariota dan dipurifikasi dengan NiNTA serta kemampuan antigen tersebut untuk dikenali oleh antibodi spesifik sehingga bahan baku siap pakai untuk deteksi antibodi anti-SARS-CoV-2.

Daftar Rujukan

1. Media Informasi Resmi Terkini Penyakit Infeksi Emerging. *Situasi Terkini Perkembangan Coronavirus Disease (COVID-19)* 12 Juli.; 2021. <https://infeksiemerging.kemkes.go.id/document/situasi-terkini-perkembangan-coronavirus-disease-covid-19-13-juli-2021/view>
2. World Health Organization. *COVID-19 Weekly Epidemiological Update*.; 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19--13-july-2021>
3. Suryono H. Pengelompokan Provinsi di Indonesia Berdasarkan Resiko Covid-19 dan Ketahanan Pangan. *Semin Nas Off Stat*. 2021;2020(1):116-123. doi:10.34123/semnasoffstat.v2020i1.599
4. Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, Saxena SK. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). 2020;2:23-31. doi:10.1007/978-981-15-4814-7_3
5. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol*. 2003;77(16):8801-8811. doi:10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003
6. Perlman S, Netland J. Coronaviruses Post-SARS: Update on Replication and Pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(6):439-450. doi:10.1038/nrmicro2147
7. Ruth McBride M van Z and BCF. The Coronavirus Nucleocapsid is a Multifunctional Protein. *Viruses*. 2014;6(8):2991-3018. doi:10.3390/v6082991
8. Adekunle S, Chuku O, Sadaf Y, et al. Transmission and Control Efforts of COVID-19. *J Infect Dis Epidemiol*. 2020;6(3):1-6. doi:10.23937/2474-3658/1510126
9. Samad N, Sodunke TE, Al Banna H, et al. Convalescent Plasma Therapy for Management of COVID-19: Perspectives and Deployment in the Current Global Pandemic. *Risk Manag Healthc Policy*. 2020;13:2707-2728. doi:10.2147/RMHP.S281388
10. Tehrani ZR, Saadat S, Saleh E, et al. Performance of Nucleocapsid and Spike Based SARS-CoV-2 Serologic Assays. *PLoS One*. 2020;15(11 November):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0237828
11. Dai Y, Chen H, Zhuang S, et al. Immunodominant Regions Prediction of Nucleocapsid Protein for SARS-CoV-2 Early Diagnosis: a Bioinformatics and Immunoinformatics Study. *Pathog Glob Health*. 2020;114(8):463-470. doi:10.1080/20477724.2020.1838190
12. James S. Terry, Loran BR Anderson, Michael S. Scherman, Carley E. McAlister, Rushika Perera, Tony Schountz BJG. *Working Title: Development of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Specific Monoclonal Antibodies* James.; 2020. doi:doi:10.1101/2020.09.03.280370
13. Ausubel M, Brent R, Kingston RE et al. *Current Protocols in Molecular Biology*.

- Volumes 1. (John Wiley & Sons, Inc. Inc., Media, PA, ed.). Mol Reprod Dev; 1988. Published online 1989
14. Khow O, Suntrarachun S. Strategies for Production of Active Eukaryotic Proteins in Bacterial Expression System. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012;2(2):159-162. doi:10.1016/S2221-1691(11)60213-X
 15. Kalia VC, Saini AK. *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes.*; 2017. doi:10.1007/978-981-10-5511-9
 16. Amirulloh D, Widyaningtyas ST, Bela B. Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Rekombinan HCV Berbasis Multiepitop untuk Deteksi Antibodi Anti-HCV. *Media Penelit dan Pengemb Kesehat.* 2018;28(3):175-182. doi:10.22435/mpk.v28i3.39
 17. Fathurrohman F, Widyaningtyas ST, Bela B. Pengklonaan Plasmid Rekombinan gp125-gp36 Human Immunodeficiency Virus tipe 2 (HIV-2) untuk Pengembangan Sistem Diagnostik HIV-2. *J Biotek Medisiana Indones.* 2019;8(1):59-66. doi:10.22435/jbmi.v8i1.2584
 18. Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, van der Oost J. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol Cell.* 2015;59(2):149-161. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.035
 19. Wei Y, Silke JR, Xia X. An Improved Estimation of tRNA Expression to Better Elucidate the Coevolution Between tRNA Abundance and Codon Usage in Bacteria. *Sci Rep.* 2019;(October 2018):1-11. doi:10.1038/s41598-019-39369-x
 20. Bornhorst, J.A., Falke J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzym.* 2010;2000(326):245-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909483/pdf/nihms214279.pdf>
 21. IBA. *Expression and Purification of Proteins Using 6x Histidine -Tag A Comprehensive Manual.*; 2012. <https://www.iba-lifesciences.com/patents-licenses-trademarks.html>.
 22. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp.* 2012;(62):1-5. doi:10.3791/3923
 23. Maral Rahimzadeh1, Majid Sadeghzadeh2,* , Farhood Najafi3, Seyed Shahriar Arab4 HM. Impact of Heat Shock Step on Bacterial Transformation Efficiency. 2016;5(4):257-261.
 24. Ukai H, Ukai-Tadenuma M, Ogiu T, Tsuji H. A New Technique to Prevent Self-Ligation of DNA. *J Biotechnol.* 2002;97(3):233-242. doi:10.1016/S0168-1656(02)00107-4
 25. Avissa R, Widyaningtyas ST, Bela B. Optimization of the Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptide-like-3G (APOBEC3G) Gene to Enhance Its Expression in Escherichia coli. 2020;29(2):120-128.