

TA CLONING UNTUK PERBANYAKAN PLASMID REKOMBINAN PENYANDI GEN SPIKE HEXAPRO FOLDON

DF Agustiyanti^{1*}, Hariyatun¹, LA Syakuran², A Yuniati², W Kusharyoto¹,
A Wardiana¹

¹Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional
Jl Raya Bogor km 46, Cibinong Science Center, Bogor 16911

²Fakultas Biologi, Universitas Jendral Soedirman
Jl. DR. Soeparno No.63, Purwokerto 53122

*Email: dian023@brin.go.id /dian.fitria07@gmail.com

ABSTRAK

Protein spike dari virus SARS-CoV merupakan kandidat antigen yang potensial sebagai vaksin, dimana pada protein ini terdapat receptor binding domain (RBD) yang dapat berikatan dengan reseptor ACE2 manusia. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa protein spike membentuk konformasi trimer ketika berikatan dengan reseptor ACE2. Untuk itu, beberapa penelitian memfokuskan untuk membuat struktur trimer dari protein spike (stabilisasi prefusi) sebagai desain vaksin berbasis protein rekombinan. Sebagai upaya mendukung ketersediaan vaksin nasional, dikembangkan produksi protein rekombinan Spike pada inang *Pichia pastoris*, yang memiliki kemampuan memproduksi protein yang tinggi, dan memiliki nilai ekonomis yang memadai. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mendapatkan protein rekombinan melalui fusi gen Hexapro dengan fragmen foldon. Dengan menggunakan metode TA kloning, gen Hexapro Foldon Spike SARS-CoV-2 disisipkan ke vektor kloning pGEM-T dan pTA2. Dari hasil penelitian didapatkan plasmid rekombinan berukuran 3729 bp, yang terkonfirmasi dengan analisa sequencing DNA.

Kata kunci: Hexapro, SARS-CoV-2, Spike, Subkloning, Vaksin

PENDAHULUAN

Virus SARS CoV 2 diselubungi dengan glikoprotein spike (S) yang mengikat reseptor sel inang dan memediasi masuknya virus melalui fusi membran keduanya (Li, 2016). Protein S merupakan protein fusi trimerik yang diekspresikan sebagai polipeptida tunggal yang kemudian dipecah menjadi subunit S1 dan S2 oleh protease seluler (Millet dan Whittaker, 2014). Subunit S1 berisi *receptor-binding domain* (RBD), yang mengenali reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) pada permukaan sel inang. Sub unit 2 berfungsi sebagai fusi membran yang memiliki beberapa situs pemotongan protease. Pengikatan RBD terhadap reseptor ACE2 memicu terpisahnya protein S1, mendorong perubahan bentuk protein S2 dari bentuk prefusi menjadi bentuk postfusi yang sangat stabil. Pada proses inilah fusi protein dapat memasuki sel inang (Hoffman *et al.*, 2020). Dengan fungsi utama protein S yang sangat penting dalam penempelan dan sebagai jalan masuk untuk siklus hidupnya, membuat protein S menjadi target utama pembuatan antigen untuk vaksin terhadap virus SARS CoV 2.

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa protein spike membentuk konformasi trimer ketika berikatan dengan reseptor ACE2. Untuk itu, beberapa penelitian memfokuskan untuk membuat struktur trimer dari protein spike (stabilisasi prefusi) untuk dijadikan sebagai kandidat antigen yang akan memiliki efek lebih baik dibandingkan protein spike biasa. Salah satunya dengan fusi foldon ditambah dengan menggunakan mutein, atau mutasi beberapa posisi asam amino.

Dalam hal ini, posisi beberapa asam amino pada subunit Spike 2 diganti dengan asam amino prolin. Spike HexaPro Foldon merupakan desain protein S yang telah distabilisasi menggunakan enam substitusi prolin (F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P), mutasi *furin cleaving site* (682-GSAS-685), dan penambahan domain trimerisasi pada C-terminus sehingga memiliki konformasi trimer *prefusion* dengan kestabilan dan tingkat ekspresi rekombinan yang lebih baik dibandingkan protein S asli (Hsieh *et al.*, 2020; Seephetdee *et al.*, 2021) "ISSN": "2076393X", "abstract": "Updated and revised versions of COVID-19 vaccines are vital due to genetic variations of the SARS-CoV-2 spike antigen. Furthermore, vaccines that are safe, cost-effective, and logistic-friendly are critically needed for global equity, especially for middle-to low-income countries. Recombinant protein-based subunit vaccines against SARS-CoV-2 have been reported using the receptor-binding domain (RBD).

Penggunaan sistem ekspresi *Pichia pastoris* diharapkan mampu membantu pemenuhan kebutuhan vaksin, dikarenakan proses produksi yang cepat, relatif sederhana, dan ekonomis sehingga sangat memungkinkan untuk dikembangkan di Indonesia

METODE

Isolasi Gen Spike HexaPro Foldon Spike dengan Teknik PCR

Isolasi gen dilakukan dengan mengamplifikasi Plasmid rekombinan pαH-SARS-CoV-2 S HexaPro yang membawa gen target Spike HexaPro Foldon (HPF) berukuran 3624 bp diperoleh dari Addgene (Plasmid #154754). Amplifikasi dilakukan dengan PCR menggunakan primer HPF-forward dan primer HPF-reverse. Tahapan reaksi PCR terdiri atas predenaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit, diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing selama 30 detik dengan gradient suhu 55°C, 57,5°C, 59,9°C, 62,9°C, 65,4 °C dan 67 °C, lalu ekstensi pada suhu 72°C selama 4 menit. PCR diakhiri dengan tahapan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian divisualisasi menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa dan hasil PCR terbaik digunakan untuk menentukan temperatur annealing optimum. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarosa 1% selama 45 menit pada voltase 80 V. Analisis hasil elektroforesis dilakukan menggunakan ImageJ Software. Gen HPF Foldon target kemudian diamplifikasi kembali pada temperatur annealing optimum. Hasil amplifikasi gen HPF dipurifikasi menggunakan MinElute PCR, dan diujikan kuantitas dan kualitas nya menggunakan nanophotometer pada panjang gelombang A260 dan A280.

TA-cloning Gen HPF ke Vektor Kloning pGEM-T Easy dan pTA2

Reaksi ligasi antara vektor pGEM-T Easy atau pTA2 dan *insert* Spike HPF dibuat dalam volume total sebanyak 20 µl yang terdiri atas 2 µl *nuclease-free water*, 5 µl 2x rapid ligation buffer, 1 µl vektor pGEM-T Easy (50 ng/ µl) atau 1 µl vektor pTA2 (50ng/ µl) , 1 µl produk PCR Spike HPF (669,2 ng/ µl), dan 1 µl T4 DNA ligase (3 Weiss U/ µl). Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 4°C selama *overnight*. Plasmid rekombinan hasil ligasi kemudian dinamakan pGEM-T Easy-HPF dan pTA2-HPF.

Hasil ligasi kemudian digunakan untuk transformasi sel kompeten CaCl₂ *E. coli* Top10F' menggunakan teknik *heat shock*. Sel *E. coli* Top10F' hasil transformasi kemudian

ditumbuhkan pada media seleksi LB agar yang mengandung 100 µg/mL ampicillin, 20 µl 100 mM IPTG, dan 20 µl 4% X-Gal. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama *overnight*. Koloni yang tumbuh kemudian ditumbuhkan kembali sebagai *master plate* pada media seleksi LB agar yang mengandung 100 µg/mL ampicillin selama *overnight* pada suhu 37°C. Verifikasi terhadap koloni yang tumbuh kemudian dilakukan menggunakan teknik PCR koloni menggunakan primer spesifik HPF-*forward* dan primer HPF-*reverse*. Hasil PCR koloni kemudian divisualisasikan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa menggunakan gel agarosa 1% selama 45 menit pada voltase 80 V.

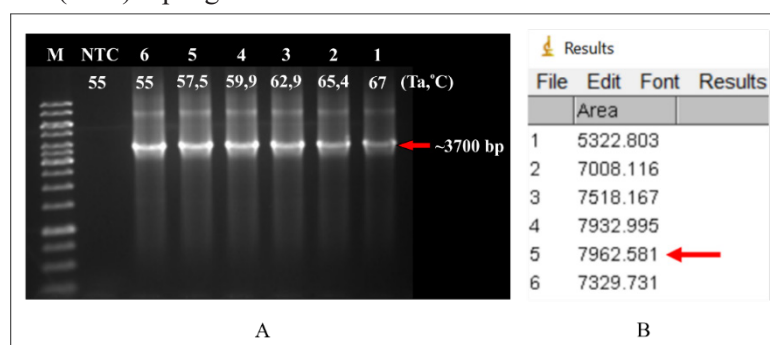
Perbanyakan *Insert Gen HPF*

Perbanyakan *insert* dilakukan dengan membuat kultur *E. coli* Top10F' pembawa plasmid rekombinan pTA2-HPF atau pGEM-T Easy-HPF. Sejumlah koloni *E. coli* Top10F' pembawa plasmid rekombinan pGEM-T Easy-HPF atau pTA2-HPF disubkultur dari *master plate* ke media LB cair yang mengandung ampicillin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm. Isolasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy-HPF dan pTA2-HPF kemudian dilakukan menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Plasmid yang sudah diisolasi kemudian didigesti menggunakan enzim restriksi untuk menentukan plasmid terbaik untuk digunakan lebih lanjut. Digesti dilakukan menggunakan enzim restriksi XhoI (NEB) dan NotI (NEB) dengan volume reaksi total 50 µl yang terdiri dari 5 µl 10X NEBuffer r3.1, 1 µl XhoI (20 U/ µl), 1 µl NotI (10 U/ µl), 1 µg DNA plasmid, dan *nuclease-free water* hingga 50 µl.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen HPF

Hasil optimasi reaksi PCR untuk amplifikasi gen HPF menunjukkan temperature *annealing* optimum pada suhu 57,5°C (Gambar 1.). Hasil ini ditunjukkan oleh analisis intensitas pita DNA yang menggunakan software ImageJ. Pewarnaan DNA oleh Ethidium Bromide (EtBr) dipengaruhi oleh konsentrasi DNA.



Gambar 1. Hasil optimasi temperatur *annealing* pada reaksi PCR gen HPF (M) marker 1 kb, (NTC), nontemplate control (Ta), annealing temperature

Keberhasilan amplifikasi sekuens DNA target sangat dipengaruhi oleh pemilihan primer dan temperatur *annealing* yang digunakan. Temperatur *annealing* umumnya 5°C dibawah temperatur *melting* dari primer dan dapat dipengaruhi oleh kandungan basa

guanodin dan sitosin (*GC-content*) dari template yang digunakan. Template dengan kandungan basa GC yang tinggi memerlukan temperatur *annealing* yang lebih tinggi (Obradovic *et al.*, 2013) especially when difficult templates need to be amplified. The aim of the present study was to optimize the PCR conditions for amplification of the epidermal growth factor receptor (EGFR).

Amplifikasi gen target kemudian kembali dilakukan pada temperatur *annealing* optimum. Visualisasi dengan teknik elektroforesis gel agarosa menunjukkan adanya ukuran pita DNA dengan ukuran sekitar 3700 bp (Gambar 1). Pita DNA tersebut merupakan fragmen DNA gen HPF yang berukuran 3624 bp dan terdapat penambahan *flanking sequence* yang memiliki situs pemotongan enzim restriksi NotI dan XhoI yang diintroduksi melalui primer HPF-reverse dan HPF-forward yang digunakan untuk amplifikasi gen.

Hasil uji kuantitas dan kualitas produk PCR gen HPF yang sudah dipurifikasi ditunjukkan pada Tabel 4.1. Rasio absorbansi A_{260}/A_{280} sampel 1 diukur sebesar 1,860 dan untuk sampel 2 sebesar 1,850. Kemurnian sampel DNA dengan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} sebesar 1,8-2,0 dianggap cukup baik (Murtiyaningsih, 2017). Sumber lain menyatakan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} sebesar 1,7-2,0 dianggap masih cukup baik. Rasio absorbansi dibawah 1,7 menunjukkan adanya kontaminasi oleh protein (Piskata *et al.*, 2019; Lucena-Aguilar *et al.*, 2016) eight DNA extraction procedures were compared—DNeasy Blood and Tissue Kit, DNeasy mericon Food Kit, chemagic DNA Tissue 10 Kit, Food DNA Isolation Kit, UltraPrep Genomic DNA Food Mini Prep Kit, High Pure PCR Template Preparation Kit, phenol—chloroform extraction, and NucleoSpin Food—Using self-prepared samples from both raw and heat-processed and/or mechanically treated muscles and different types of meat products and pet food (pork, beef, and chicken).

Tabel 1. Hasil uji kuantitas dan kualitas produk PCR gen HPF.

Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian (A_{260}/A_{280})
1	669,2	1,860
2	706,3	1,850

Sub Kloning Gen HPF

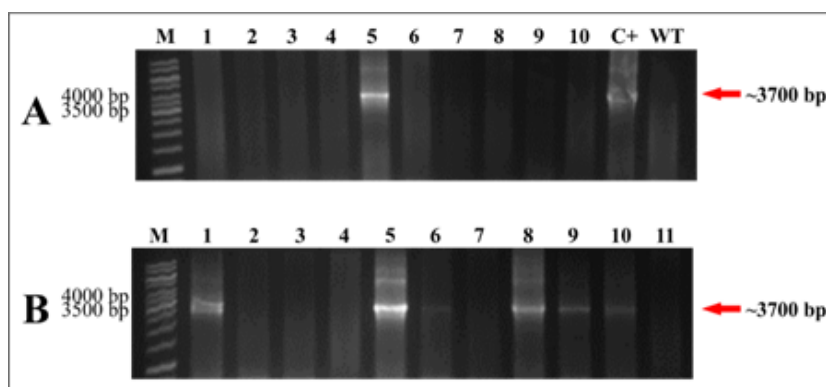
Kloning gen HPF kedalam plasmid pGEM-T easy dan pTA2 menggunakan metode TA-kloning. Sebanyak 21 koloni *E. coli* yang terdiri dari 10 klon *E. coli* Top10F' pGEM-T Easy-HPF dan 11 klon *E. coli* Top10F' pTA2-HPF berhasil diperoleh dari hasil seleksi transforman (Tabel 2.). Dengan menggunakan teknologi TA cloning, proses ligasi menjadi sangat sederhana, cukup dari produk PCR, tidak memerlukan penambahan enzim restriksi. TA cloning menggunakan basa komplementer adenin (A) dan timin (T) pada ujung fragmen DNA yang berbeda untuk berhibridisasi bersama. Produk PCR di amplifikasi menggunakan Taq DNA polymerase, yang akan menambahkan satu deoxyadenosin ke ujung 3' dari produk PCR. Sedangkan vektor linier yang disediakan dalam kit TA kloning memiliki residu 3 deoxythymidine (T) yang memungkinkan sisipan untuk mengikat ke dalam vektor secara efisien.

Tabel 2. Hasil transformasi *E. coli* Top10F' dengan plasmid pTA2-HPF dan pGEM-T Easy-HPF.

Transformasi	Jumlah Transforman	Transforman Positif Membawa <i>Insert</i>	Persentase
<i>E. coli</i> Top10F' pGEM-T HPF	11	1	10,00%
<i>E. coli</i> Top10F' pTA2-HPF	12	5	45,45%

Efisiensi transformasi tergolong sedikit rendah, antara lain disebabkan ukuran gen hexapro spike foldon yang cukup besar. Ukuran DNA insert yang cukup besar seringkali menjadi tantangan dalam tahapan ligase, DNA sulit melakukan *circulization* dan memerlukan lebih banyak enzim ligase. Peningkatan efisiensi transformasi dapat dilakukan dengan melakukan elektroporasi saat transformasi, karena elektroporasi jauh lebih efektif dibandingkan dengan transformasi dengan menggunakan metoda heat shock.

Verifikasi terhadap koloni transforman dilakukan menggunakan teknik PCR koloni. PCR koloni merupakan teknik PCR yang mengamplifikasi sekuens target tanpa melalui isolasi DNA terlebih dahulu karena sel yang membawa DNA target mengalami lisis akibat temperatur tinggi pada tahap denaturasi PCR (Azevedo *et al.*, 2017). Hasil PCR koloni dengan primer spesifik HPF-*reverse* dan HPF-*forward* menunjukkan terdapat 6 koloni *E. coli* Top10F' yang membawa *insert* HPF. Koloni tersebut antara lain yaitu ECTOP10F' pGEM-T Easy-HPF 5, ECTOP10F' pTA2-HPF 1, ECTOP10F' pTA2-HPF 5, ECTOP10F' pTA2-HPF 8, ECTOP10F' pTA2-HPF 9, dan ECTOP10F' pTA2-HPF 10 (Gambar 2)

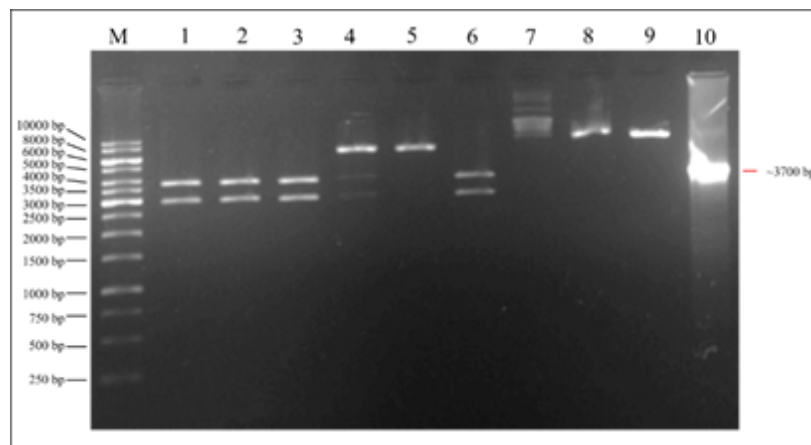


Gambar 2. Hasil purifikasi produk PCR gen HPF dari pGEM-T Easy-HPF (A) dan pTA2-HPF (B). (M) marker 1 kb, (C+) kontrol positif, (WT) wild type untransforman

Analisa Orientasi Arah Penempelan Insert

Sebanyak 6 koloni *E. coli* Top10F' terdiri dari koloni ECTOP10F' pGEM-T-HPF 5, ECTOP10F' pTA2-HPF 1, ECTOP10F' pTA2-HPF 5, ECTOP10F' pTA2-HPF 8, ECTOP10F' pTA2-HPF 9, ECTOP10F' pTA2-HPF 10 ditumbuhkan dalam media LB cair yang mengandung ampicillin 100 µg/ml selama 16 jam pada suhu 37°C. Sebanyak tiga koloni berhasil tumbuh yaitu koloni ECTOP10F' pTA2-HPF 5, ECTOP10F' pTA2-HPF 8, dan ECTOP10F' pTA2-HPF 9. Plasmid rekombinan dari ketiga kultur kemudian diisolasi dan didigesti menggunakan enzim restriksi NotI dan XhoI.

Digesti menggunakan salah satu enzim XhoI atau NotI saja digunakan sebagai kontrol. Hasil digesti enzim restriksi kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa.



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis gel agarosa hasil digesti enzim restriksi.

(M) Marker 1 kb, (1) pTA2-HPF 5 NotI, (2) pTA2-HPF 5 XhoI, (3) pTA2-HPF 5 NotI+XhoI, (4) pTA2-HPF 8 NotI, (5) pTA2-HPF 8 XhoI, (6) pTA2-HPF 8 NotI+XhoI, (7) pTA2-HPF 9 NotI, (8) pTA2-HPF 9 XhoI, (9) pTA2-HPF 9 NotI+XhoI, (10) kontrol positif HPF

Dari Gambar 3 terlihat pada lajur 1 dan 2 (koloni pTA-HPF 5) yang merupakan digesti tunggal, didapatkan 2 pita DNA, secara teori seharusnya hanya menghasilkan 1 pita tunggal. Hal ini menunjukkan adanya kesalahan pada situs restriksi yang diakibatkan karena orientasi gen menempel dengan terbalik. Hal lain yang terjadi pada lajur 9 (koloni pTA-HPF 9) yang merupakan digesti ganda dengan enzim NotI dan XhoI, seharusnya terdapat 2 pita DNA, tetapi hanya dihasilkan 1 pita DNA saja, sehingga diperkirakan ada kesalahan pada situs restriksi pada plasmid rekombinan tersebut. Analisa Digesti yang benar didapatkan pada lajur 4, 5, dan 6 (koloni pTA-HPF 8), hasil digesti tunggal menghasilkan 1 pita DNA dan hasil digesti ganda menghasilkan 2 pita DNA. Oleh karena itu koloni pTA-HPF 8 dilakukan Analisa lanjutan dengan sequencing DNA, untuk konformasi untai DNA yang seharusnya.

Hasil sekuensing DNA menunjukkan fragmen pTA2-HPF 8 memiliki ukuran 3729 bp. Hasil analisis BLAST sekuens fragmen DNA pTA2-HPF 8 juga menunjukkan kemiripan dengan sekuens vaksin mRNA-1273 (Gambar 4). Vaksin mRNA-1273 merupakan vaksin COVID-19 berbasis mRNA yang dikembangkan oleh Moderna. Vaksin ini menyandikan antigen S-2P yang terdiri dari protein Spike SARS-CoV-2 dengan modifikasi berupa substitusi prolin pada posisi asam amino 986 dan 987 (Jackson *et al.*, 2020). Hasil analisis *multiple-sequence alignment* menunjukkan adanya kemiripan antara sekuens fragmen pTA2-HPF 8 dan sekuens SARS-CoV-2 S HexaPro (Addgene 154754). Adanya kemiripan ini menunjukkan fragmen pTA2-HPF 8 merupakan fragmen yang menyandikan gen HexaPro Foldon Spike yang juga berbasis protein Spike SARS-CoV-2 sehingga dipilih untuk digunakan lebih lanjut.

Gambar 4. Hasil analisis BLAST fragmen DNA pTA2-HPF 8.

- Obradovic, J., Jurisic, V., Tosic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S., & Djordjevic, N., (2013), Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence. *Journal of clinical laboratory analysis*, 27(6), 487–493.
- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G., (2019), The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1188.
- Seephetdee, C., Buasri, N., Bhukhai, K., Srisanga, K., Manopwisedjaroen, S., Lertjintanakit, S., Phueakphud, N., Pakiranay, C., Kangwanrangsang, N., Srichatrapimuk, S., Kirdlarp, S., Sungkanuparph, S., Chutipongtanate, S., Thitithanyanont, A., Hongeng, S., & Wongtrakongate, P. (2021). Mice Immunized with the Vaccine Candidate HexaPro Spike Produce Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 9(5), 498. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050498>