

Pengklonaan Gen Nonstruktural 3 Virus Dengue Serotipe 2 (ns3 dengv-2) *Strain* Indonesia ke dalam Plasmid umvc4a

Mardhatillah Sariyanti, Beti E. Dewi, *Tjahjani M. Sudiro

Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta

Abstrak

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama dunia. Penyakit DBD disebabkan oleh virus dengue dari famili *Flaviviridae* yang terdiri atas empat serotipe. Genom virus dengue terdiri atas tiga gen penyandi protein struktural dan tujuh gen penyandi protein nonstruktural. Protein nonstruktural-3 (NS3) merupakan protein yang memiliki beberapa fungsi, yaitu dalam pemrosesan poliprotein, replikasi dan *capping* RNA, serta sebagai target utama respons imun selular, baik sel T CD4⁺ maupun sel T sitotoksik CD8⁺. Protein tersebut mengandung banyak epitop yang dapat dikenali oleh sistem imun humoral maupun selular. Oleh karena itu, protein NS3 merupakan target potensial bagi pengembangan vaksin dengue. Penelitian ini bertujuan memperoleh klon gen NS3 dalam pUMVC4a. Gen NS3 diamplifikasi dengan teknik PCR. Gen NS3 dan pUMV4a didigesti dengan enzim *PstI* dan *NotI*, kemudian diligasi menggunakan enzim T4 ligase dan ditransformasi ke dalam sel *Escherichia coli* DH5 α . Visualisasi hasil isolasi plasmid rekombinan menunjukkan empat rekombinan memiliki pola migrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan plasmid *wild-type*. Verifikasi insert dan analisis orientasi dengan PCR dan sekuensing menunjukkan sisipan gen NS3 dalam pUMVC4a dengan orientasi yang benar.

Kata kunci: dengue, nonstruktural 3 (NS3), vaksin

Cloning Nonstructural 3 Gene Dengue Virus Serotype -2 (ns3 dengv-2) Indonesian Strain into the pumvc4a Vector

Abstract

Dengue haemorrhagic fever (DHF) remains one of the world's major health problems. Dengue fever is caused by dengue virus of the family *Flaviviridae*, which consists of four serotypes. Dengue virus genome consists of three genes encoding structural proteins and seven genes encoding nonstructural proteins. Nonstructural protein 3 (NS3) is a multifunctional protein that function in polyprotein processing, replication and RNA capping, as well as the main target of cellular immune responses, both CD4 T cells and CD8 cytotoxic T cells. It has many epitopes that can be recognized by the humoral and cellular immune system. Therefore, the NS3 protein is a potential target for the development of dengue vaccine. This study aims to obtain the NS3 gene in the pUMVC4a vector. NS3 gene was amplified by PCR. NS3 gene and plasmid were digested with enzymes *PstI* and *NotI*, then ligated using T4 ligase enzyme and transformed into *Escherichia coli* DH5 α cells. Visualization of the isolated recombinant plasmid showed four clones have migration pattern higher than migration of plasmid of wild type. Verification the orientation of the insert by PCR and sequencing analysis showed that NS3 gene was inserted in pUMVC4a with the correct orientation.

Key words: dengue, nonstructural 3 (NS3), vaccine

*BED: Penulis koresponden; E-mail: betied@yahoo.com

Pendahuluan

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama dunia. Sejak tahun 1968 hingga tahun 2009, WHO mencatat Indonesia sebagai negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara. Upaya pengendalian nyamuk *Aedes aegypti* belum efektif untuk mencegah dan mengatasi DBD. Hal itu disebabkan faktor kepadatan penduduk, urbanisasi yang masif, serta tingkat perjalanan masyarakat baik regional maupun internasional yang terus meningkat.¹ Oleh karena itu, upaya pembuatan vaksin dengue perlu dikembangkan.

Protein nonstruktural 3 (NS3) merupakan protein multifungsi yang berperan dalam pemrosesan poliprotein, replikasi dan *capping* RNA. Aktivitas protease terletak pada sisi N-terminal yang mengandung domain serin. Enzim protease tersebut menguraikan poliprotein yang dihasilkan oleh proses translasi menjadi masing-masing protein yang terpisah secara individu. Pada sisi C-terminal mengandung tiga domain enzim, yaitu *nucleoside triphosphatase* (NTPase), RNA helikase, dan RNA *triphosphatase* (RTPase). Ketiga enzim tersebut berperan penting dalam proses replikasi dan *capping* RNA.²

Protein nonstruktural NS3 merupakan antigen target sistem imun selular, baik sel T CD4⁺ maupun sel T sitotoksik CD8⁺. Protein tersebut mengandung banyak epitop yang dapat dikenali oleh sistem imun humoral maupun selular.³ Penelitian oleh Okamoto *et al.*,⁴ menemukan epitop untuk pengenalan sel T CD4⁺ yang bersifat *serotype-cross reactive*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mendapatkan klon gen NS3 virus dengue serotipe-2 galur Indonesia untuk pengembangan vaksin dengue berbasis DNA.

Bahan dan Cara Kerja

Bahan

Pada penelitian digunakan cDNA virus dengue serotipe-2 strain DS18/09 koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang berasal dari pasien DBD di Jakarta tahun 2003. Plasmid yang digunakan untuk vektor pengklonaan adalah pUMVC4a. yang didapat dari Kobe University, sedangkan sel inang yang digunakan untuk pengklonaan adalah *Escherichia coli strain DH5α*.

Cara Kerja

Penelitian dilakukan dengan berbagai tahapan kerja, meliputi: (i) amplifikasi gen NS3 dari cDNA virus dengue serotipe-2 (DENV-2) galur DS18/09 koleksi Departemen Mikrobiologi FK UI; (ii) pengklonaan gen NS3 DENV-2 ke dalam vektor pUMVC4a.

Amplifikasi gen NS3 DENV-2

Amplifikasi gen NS3 dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) memakai primer 4425sden2-PstI-SacII: 5'-CGC CCG CGG CTG CAG ACC ATG CAT TAG GAC AGG ACT GCT GG-3' dan primer 6475cden2-NotI: 5'-TGC GCG GCC GCT TAC CGT ATG CAG GAC TGC TAA G-3'.

Isolasi Vektor Plasmid

Isolasi vektor plasmid dilakukan dengan teknik alkali lisis berdasarkan prosedur kit QIAGEN (no. Kat 27106, Jerman). Selanjutnya digesti DNA sisipan dan vektor menggunakan dua enzim, yaitu enzim *PstI* dan *NotI*.

Ligasi dan Transformasi

Ligasi DNA NS3 dan pUMVC4a menggunakan enzim T4 ligase, kemudian ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α dengan metode *heat shock*.

Identifikasi Klon Pembawa Plasmid Rekombinan

Untuk identifikasi plasmid rekombinan dilakukan isolasi plasmid, verifikasi insert dengan teknik PCR, analisis orientasi, dan sekuensing.

Hasil

Amplifikasi Gen NS3 DENV-2

Amplifikasi gen NS3 virus dengue serotipe-2 dilakukan dengan teknik PCR. Visualisasi hasil amplifikasi menunjukkan ampikon yang bermigrasi di antara marka DNA 2027 pb dan 2322 pb, sehingga diduga

merupakan gen NS3 DENV-2 yang berhasil diamplifikasi. Ampikon gen NS3 yang diharapkan berukuran sekitar 2050 pb.

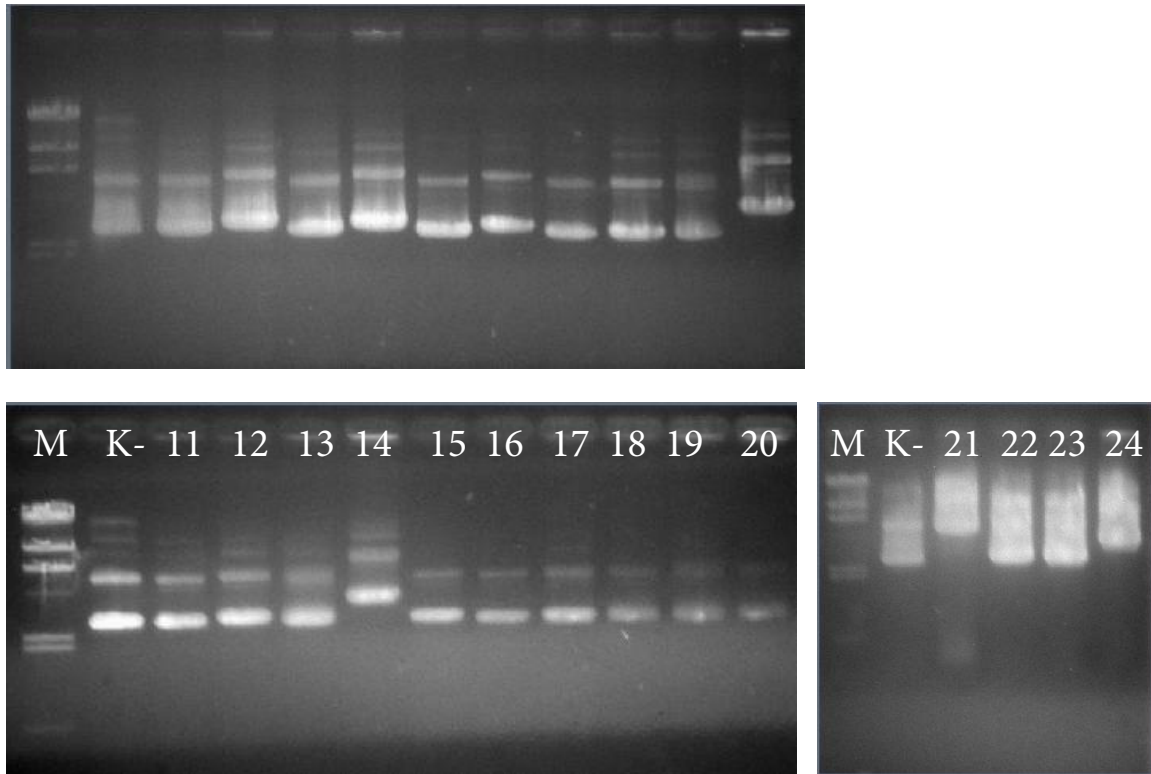
Pengklonaan Gen NS3 DENV-2 ke dalam Vektor pUMVC4a

Hasil isolasi plasmid divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Hasil visualisasi menunjukkan terbentuknya beberapa topologi DNA, yaitu *supercoiled*, *nicked circle*, dan linear. Visualisasi hasil digesti pUMVC4a menunjukkan satu pita DNA yang berukuran sekitar 4479 pb.

Hasil transformasi yang telah diinkubasi selama 16 jam menunjukkan pertumbuhan bakteri *E. coli* DH5 α pada hasil ligasi sebanyak 250 koloni. Selanjutnya dilakukan isolasi plasmid sebanyak 24 koloni yang dipilih secara acak dari 250 koloni yang tumbuh. Berdasarkan visualisasi hasil isolasi dapat terlihat adanya perbedaan pola migrasi 4 pita DNA rekombinan.



Gambar 1. Hasil elektroforesis amplifikasi gen NS3 dengan teknik PCR
Lajur 1. Marka DNA λ *Hind*III; Lajur 2. Gen NS3



Gambar 1. Elektroforesis hasil isolasi plasmid rekombinan. M. Marka DNA λ HindIII; K-. pUMVC4a tanpa sisipan (*wild-type*); lajur 1-24. Plasmid rekombinan

Verifikasi Plasmid Rekombinan

Analisis plasmid rekombinan dengan metode PCR untuk membuktikan insersi gen NS3 ke dalam vektor pUMVC4a. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% menunjukkan gen NS3 DENV-2 berhasil diklonasi dengan terbentuknya pita DNA berukuran 2050 pb.

Pemeriksaan PCR untuk analisis orientasi menggunakan primer CMV *forward* dan NS3DENV2 *reverse*. Primer CMV mengenali bagian promoter CMV pada plasmid UMVC4a pada posisi 450 pb, sehingga apabila arah orientasi sisipan gen NS3 didalam plasmid benar, akan dihasilkan pita DNA berukuran sekitar 2500 pb.

Pada analisis sekuensing, penyisipan klon NS3 DENV-2 dalam plasmid UMVC4a memiliki orientasi yang benar. Analisis

dengan membandingkan nukleotida dan asam amino NS3 DENV2 galur DS18/09 sebelum pengklonaan dengan nukleotida NS3 DENV2 setelah pengklonaan memiliki kemiripan 97%.

Diskusi

Vaksin dengue hingga saat ini belum tersedia. Pengembangan vaksin DNA berbasis gen NS3 DENV-2 galur DS18/09 pada penelitian ini diharapkan menghasilkan kandidat vaksin di masa mendatang. Penelitian ini diawali dengan proses persiapan gen NS3 DENV-2 galur DS18/09. Dalam reaksi amplifikasi gen NS3 digunakan enzim *platinum taq* DNA *polymerase*. Enzim tersebut memiliki spesifisitas tinggi, sehingga mengurangi produk amplifikasi nonspesifik seperti primer dimer, namun enzim tersebut

mempunyai potensi terjadinya kesalahan dalam menggabungkan nukleotida sehingga terdapat kemungkinan terjadi mutasi pada fragmen gen hasil amplifikasi.⁵

Persiapan DNA vektor diawali dengan mengisolasi pUMVC4a. Isolasi plasmid dilakukan dengan metode alkali lisis. Variasi topologi DNA plasmid pada visualisasi hasil isolasi disebabkan adanya perbedaan kecepatan migrasi pita DNA pada gel agarosa yang dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain ukuran molekul DNA dan konsentrasi gel agarosa yang digunakan.⁶

Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong gen sisipan dan vektor harus sama supaya kedua fragmen tersebut memiliki ujung pemotongan yang bersesuaian, sehingga dapat saling menempel pada proses ligasi. Enzim *NotI* dan *PstI* menghasilkan ujung pemotongan lengket atau *sticky-end*. Ujung pemotongan tersebut menyebabkan penempelan antara DNA sisipan dan DNA vektor lebih kuat dibandingkan dengan ujung pemotongan *blunt-end*.⁷

Rasio konsentrasi DNA vektor dan sisipan yang digunakan dalam reaksi ligasi adalah 1:3. Perbandingan DNA sisipan yang lebih banyak daripada DNA vektor diharapkan dapat meningkatkan probabilitas ligasi antara kedua fragmen tersebut. Reaksi ligasi gen NS3 dan vektor pUMVC4a menggunakan enzim T4 ligase yang mengkatalisis ikatan fosfodiester antara dua ujung molekul DNA yang saling berkomplemen.⁸

Pembuatan sel kompeten dilakukan dengan metode kimiawi, yaitu disuspensikan ke dalam larutan kalsium klorida (CaCl_2) dingin (0°C). Kation bivalen Ca^{2+} terikat pada membran fosfolipid *E. coli* dan memberikan muatan positif pada membran tersebut, sehingga molekul DNA yang bermuatan negatif dapat berikatan dengan molekul lipid pada membran.⁹

Persentase kemiripan antara sekuen NS3 sebelum dan sesudah pengklonaan sebesar 97%. Perubahan atau mutasi tersebut dapat terjadi pada proses amplifikasi gen NS3 pada awal pengklonaan. Proses amplifikasi yang menggunakan enzim *platinum taq* DNA polimerase memungkinkan terjadinya mutasi. Hal tersebut disebabkan aktivitas *proofreading* dalam sintesis DNA yang dimiliki enzim *platinum taq* DNA polimerase kurang baik dibandingkan dengan enzim DNA polimerase yang lain, seperti *Pfu* DNA polimerase.⁵

Analisis yang dilakukan BLASTN pada situs *National Center for Biology Information* menunjukkan bahwa sekuen NS3 DENV-2 yang diklon ke dalam plasmid UMVC4a memiliki persentase kemiripan (*maximum identity*) sebesar 98% dengan sekuen NS3 virus dengue 2-2/SG/D2Y98P-PP1/2009, Singapura. Menurut Hall,¹⁰ semakin besar persentase *identity* suatu sekuen dengan sekuen lain menunjukkan bahwa sekuen tersebut memiliki kemiripan yang tinggi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada Konsorsium Vaksin Dengue Indonesia dan Hibah Riset UI.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization (WHO). *Dengue and severe dengue*. Diunduh dari: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> 28 Januari 2012.
2. Dahai Luo, Ting Xu, Randall PW, Daniella SB, Aruna S, Wolfgang J, *et al.*. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by flavivirus NS3 protein. *EMBO J.* 2008;27(23): 3209-19.
3. Brinton MA, Ichiro K, Anuja M, Zeng L, Shi PY, Alan R, Francis AE. Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. *Clin Diag Virol.* 1998;10: 129-39.

4. Okamoto Y, Ichiro K, Anita ML, Francis AE. Definition of the region on NS3 which contains multiple epitopes recognized by dengue virus serotype-cross-reactive and flavivirus-cross-reactive, HLA-DPw2-restricted CD4 T cell clones. *J Gen Virol*. 1998;79: 697-704.
5. Yuwono T. Teori dan aplikasi *polymerase chain reaction*. Yogyakarta: Penerbit ANDI; 2006.
6. Weaver RF. *Molecular biology*. 3rd ed. New York: McGraw Hill Higer Education; 1999.
7. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001a.
8. Brown TA. *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
9. Singh M, A. Yadav, X. Ma, E. Amoah. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperature, duration and cold incubation CaCl₂ treated cells. *Int J Biotechnol Biochem*. 2010;6 (4): 561-8.
10. Hall BE. *Phylogenetic trees made easy: A how to manual for molecular biologists*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc; 2001.