

Tersedia online di: [journal.gunabangsa.ac.id](http://journal.gunabangsa.ac.id)

# Journal of Health (JoH)

ISSN (online): 2407-6376 | ISSN (print): 2355-8857



## Codon Optimization and Construction of Recombinant Plasmid for SARS-CoV-2 RBD Protein on *E. coli* BL21(DE3)

### Optimasi Kodon dan Konstruksi Plasmid Rekombinan Protein RBD SARS-CoV-2 pada *E. coli* BL21(DE3)

Elly Widyarni Eka Purnamasari<sup>1</sup>, Dini Wahyu Kartika Sari<sup>2</sup>, Tenri Ashari Wanahari<sup>3</sup>, Khairun Nissa<sup>4</sup>, Asmarani Kusumawati<sup>5\*</sup>

<sup>1,2,4,5</sup>Universitas Gajah Mada Yogyakarta, <sup>3</sup> Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin

#### ABSTRACT

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) resulted over 7 million deaths worldwide. Comprehensive strategies are necessary to combat this pandemic, especially vaccination to mitigate further infection and devastation. The development of vaccines hinges upon the utilization of immunogenic proteins from the SARS-CoV-2 virus, with particular emphasis on the receptor-binding domain (RBD) located within the spike glycoprotein's subunit 1. This protein plays a key role in the virus's interaction with host cells via ACE2 receptor to infect the host along with the subunit 2 to mediate the cell membrane fusion. While there are multiple vaccines in existence, there is a requirement to create more affordable and accessible vaccine alternatives, especially in developing countries. Potential improvements can be implemented within the vaccine development paradigm, including the exploration of recombinant protein-based vaccines as a viable alternative. In the present study, we optimized the RBD gene sequence as the critical step to construct a recombinant plasmid for heterologous prokaryotic protein expression in *Escherichia coli* BL21(DE3). The optimized codon then inserted into the plasmid vector pET-15b and constructed a recombinant plasmid for transformation into cell host by heat-shock method. The study was evaluated and validated through colony PCR, plasmid isolation, and sequencing. These findings offering a foundational basis for further research in the expression and purification of RBD SARS-CoV-2 protein in *E. coli* BL21(DE3) as a candidate for subunit recombinant protein vaccine or diagnostic tool in COVID-19 research.

**Keywords:** RBD protein, SARS-CoV-2, Codon Optimization, Recombinant Plasmid

#### INFORMASI ARTIKEL

Diterima	:	18 September 2023
Direvisi	:	25 Oktober 2023
Disetujui	:	26 Oktober 2023
Dipublikasi	:	15 Januari 2024

#### KORESPONDENSI

Asmarani Kusumawati  
uma\_vet@ugm.ac.id

#### INTISARI

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), yang disebabkan oleh Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), telah menyebabkan lebih dari 7 juta kematian di seluruh dunia. Strategi komprehensif diperlukan untuk mengatasi pandemi ini, terutama vaksinasi untuk mengurangi infeksi lebih lanjut. Pengembangan vaksin bergantung pada pemanfaatan protein imunogenik dari virus SARS-CoV-2, khususnya pada Receptor-binding Domain (RBD) yang terletak dalam Subunit 1 Spike Glycoprotein. Protein ini berperan penting dalam interaksi virus dengan sel inang melalui reseptor ACE2 untuk menginfeksi inang bersama dengan Subunit 2 untuk memediasi fusi pada membran sel. Meskipun beberapa vaksin telah tersedia, kebutuhan terhadap alternatif vaksin yang lebih terjangkau dan mudah diakses masih terus dikembangkan, terutama untuk negara-negara berkembang dan berpenghasilan rendah. Salah satu alternatif yang dapat dikembangkan dapat berupa vaksin berbasis protein rekombinan. Dalam penelitian ini, urutan

Copyright © 2024 Author(s)



Di bawah lisensi Creative Commons Attribution 4.0 International License.

DOI: [doi.org/10.30590/joh.v11n1.715](https://doi.org/10.30590/joh.v11n1.715)

gen RBD dioptimasi untuk digunakan pada konstruksi plasmid rekombinan pada ekspresi protein heterolog dalam sistem ekspresi prokaryot yaitu *Escherichia coli* BL21(DE3). Kodon yang telah dioptimasi kemudian disisipkan ke dalam vektor plasmid pET-15b dan dikonstruksikan menjadi plasmid rekombinan untuk transformasi ke dalam sel inang dengan metode *heat-shock*. Penelitian ini dievaluasi dan divalidasi melalui PCR koloni, isolasi plasmid, dan sekuensing. Hasil pada penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lanjutan pada ekspresi dan purifikasi protein RBD SARS-CoV-2 pada *E. coli* BL21(DE3) sebagai kandidat vaksin protein subunit rekombinan atau uji diagnostik pada penelitian terkait COVID-19.

**Kata Kunci:** Protein RBD, SARS-CoV-2, Optimasi Kodon, Plasmid Rekombinan

## PENDAHULUAN

Kemunculan *Coronavirus Infectious Disease* (COVID-19) sejak Desember 2019 yang disebabkan oleh infeksi virus SARS-CoV-2 masih menjadi masalah kesehatan di berbagai penjuru dunia. Per tanggal 6 Juli 2023, tercatat lebih dari 700 juta orang telah terinfeksi COVID-19 dan mengakibatkan kematian pada hampir 7 juta orang di seluruh dunia (WHO, 2023). SARS-CoV-2 diketahui memiliki kemiripan yang tinggi pada *spike glycoprotein* terhadap SARS-CoV dan MERS-CoV yang menjadi dasar bagi pengembangan vaksin untuk pencegahan infeksi yang lebih meluas (Kumar & Al Khodor, 2020). Protein *spike* (S) tersusun dari 2 subunit yaitu S1 dan S2. Subunit S1 diketahui memiliki sebuah *receptor-binding domain* (RBD) yang dapat mengenali dan berikatan dengan *reseptor angiotensin-converting enzyme* (ACE2) pada sel sementara S2 akan memediasi fusi dengan membran sel (Hoffmann dkk, 2020).

Kandidat vaksin untuk SARS-CoV-2 telah dikembangkan dengan berbagai metode yaitu dengan virus yang diinaktivasi, virus yang dilemahkan (*live-attenuated virus*), partikel menyerupai virus (*virus-like particle*), vektor virus hingga vaksin berbasis protein, DNA dan mRNA. Vaksin berbasis mRNA diketahui memiliki tingkat efikasi dan efisiensi paling tinggi dibandingkan jenis vaksin lainnya karena dapat menstimulasi respon imun humoral maupun seluler (Andrews dkk., 2022). Namun, vaksin berbasis mRNA merupakan vaksin yang membutuhkan biaya tinggi dalam proses produksinya dengan penyimpanan pada suhu yang sangat rendah (-80°C). Hal ini membuat vaksin mRNA masih belum ideal untuk digunakan dalam vaksinasi massal di wilayah berpendapatan

sedang hingga rendah (Frederiksen dkk., 2020). Pilihan lain untuk produksi vaksin skala besar juga dapat dilakukan dengan protein rekombinan dengan proses produksi yang lebih sederhana, terjangkau, dan efisien.

Selain dimanfaatkan sebagai vaksin, produksi protein rekombinan dapat pula dimanfaatkan untuk berbagai keperluan diagnostik hingga imunologis seperti mempelajari respon imun, identifikasi antibodi, dan interaksinya dengan berbagai protein atau komponen pada sel inang (Altincekic dkk., 2021). Pada SARS-CoV-2, produksi protein rekombinan lebih banyak dikembangkan pada *yeast* atau sel mamalia dan sistem eukariotik lainnya karena adanya kemampuan modifikasi *post-translational* pada protein. Namun, masih sedikit penelitian yang menggunakan sistem ekspresi prokariotik seperti *E. coli* (Gao dkk., 2021). *E. coli* dikenal memiliki beberapa keunggulan dalam ekspresi protein heterolog mulai dari pertumbuhan yang cepat hingga pilihan modifikasi genetik yang beragam (Terol dkk., 2021).

Produksi protein rekombinan secara heterolog sistem ekspresi *E. coli* juga membutuhkan beberapa penyesuaian salah satunya optimasi pada kodon penyandi gen target. Bias penggunaan kodon (*codon usage bias*) dapat mempengaruhi tingkat translasi protein dikarenakan sebagian besar asam amino disandi oleh beberapa kodon sinonim. Hal ini juga berkorelasi dengan kemelimpahan tRNA pada suatu organisme yang membuat tingkat translasi dapat berbeda pada kodon satu dan lainnya (Mauro dan Chappell, 2014). Optimasi kodon dapat menjadi salah satu strategi dengan meningkatkan distribusi frekuensi kodon yang meningkatkan translasi protein sehingga dapat

diekspresikan lebih tinggi (Menzella, 2011). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan sebagai penelitian pendahuluan untuk mengoptimasi sekuen gen RBD dari SARS-CoV-2 pada vektor plasmid pET-15b yang akan digunakan untuk ekspresi protein rekombinan RBD pada *E. coli* BL21(DE3).

## METODE

Sekuen basa nukleotida gen RBD virus SARS-CoV-2 diperoleh dari *National Centre of Biotechnology Information* (NCBI) dengan *accession number* QHD43416.1. Sekuen dioptimasi menyesuaikan model sistem ekspresi protein pada *Escherichia coli* BL21(DE3). Sekuen yang telah dioptimasi kemudian dikonstruksikan pada vektor plasmid pET-15b pada situs restriksi *NdeI* (CATATG) dan *XhoI* (CTCGAG). Plasmid pET-15b-RBD hasil konstruksi disintesis oleh *Gene Universal* (USA) untuk ditransformasikan pada sel kompeten *E. coli* BL21(DE3).

Transformasi plasmid rekombinan pET-15b-RBD diawali dengan pembuatan sel kompeten *E. coli* BL21(DE3) dengan CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Sel *E. coli* kompeten dapat digunakan untuk transformasi dengan metode *heat-shock* dengan menambahkan 1 µL plasmid pET-15b-RBD dan diinkubasi pada es selama 30 menit. Kemudian, sel dipanaskan dengan suhu 42 °C selama 45 detik lalu diletakkan pada es dengan cepat selama 2 menit. Sel hasil transformasi selanjutnya ditambahkan dengan media LB *broth* sebanyak 0,9 mL dan diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm pada *shaker incubator*.

Keberhasilan proses transformasi dikonfirmasi dengan melakukan PCR pada koloni

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi Kodon dan Konstruksi Plasmid Rekombinan

Gen yang menyandi *receptor-binding domain* (RBD) pada protein spike glycoprotein SARS-CoV-2 diperoleh dari basis data NCBI (*accession number*: QHD43416.1). Urutan residu asam amino yang berada pada posisi 319-541

bakteri transforman yang telah tumbuh pada media LB dengan seleksi ampisilin. Sebanyak 3 koloni yang tumbuh disuspensikan ke dalam tube PCR yang telah diisi dengan mix PCR dengan total 25 µL. Mix PCR terdiri dari 12,5 µL PowerPol 2x PCR Mix, 0,5 µL Primer Forward (10 µM), 0,5 µL Primer Reverse (10 µM) dan 11,5 µL NFW. *Primer forward* dan *reverse* yang digunakan merupakan pasangan primer yang spesifik untuk mendeteksi sekuen gen RBD pada SARS-CoV-2 yang telah didesain menggunakan program Primer3Plus dengan suhu *annealing* pada 53,8°C. Hasil amplifikasi PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan SYBR safe 2,5 µL untuk dielektroforesis pada TBE 1x menggunakan tegangan 100 V selama 25 menit.

Koloni yang telah terkonfirmasi pada PCR koloni selanjutnya ditumbuhkan kembali pada 150 mL media LB *broth* dengan ampisilin untuk diisolasi plasmidnya. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan *FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp) sesuai protokol yang diberikan pada kit. Konsentrasi hasil isolasi plasmid kemudian diukur menggunakan NanoDrop (Maestro Gen). Hasil isolasi plasmid selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa konsentrasi 1% dan SYBR safe 2,5 µL untuk di-running menggunakan tegangan 100 V selama 30 menit. Isolat plasmid yang telah terkonfirmasi dengan elektroforesis selanjutnya diampifikasi dengan primer T7 untuk dilakukan sekuensing dengan metode Sanger.

Penelitian ini sudah melakukan pembuatan Ethical Clearance dengan nomor surat Ref. No.: KE/FK/1130/EC/2022.

yang disandi oleh 675 nukleotida dilakukan optimasi kodon untuk ekspresi protein heterolog sistem ekspresi *E. coli* BL21(DE3). Optimasi kodon dilakukan melalui *Gene Universal Inc.* berdasarkan distribusi frekuensi suatu kodon pada genom yang tersedia dan dapat diekspresikan lebih tinggi. Parameter lainnya seperti komposisi GC, struktur sekunder mRNA,

jumlah sekuen berulang, dan situs pengenalan enzim restriksi juga digunakan untuk meningkatkan kestabilan fragmen DNA dan meningkatkan efisiensi ekspresi gen. Selain meningkatkan tingkat ekspresi, optimasi kodon

dapat mencegah adanya elemen repetitif yang dapat memicu delesi hingga mencegah terbentuknya *Ribosome-binding site*, sinyal poliadenilasi atau terminator transkripsi yang menghambat ekspresi (Elena dkk., 2014).



Original DNA

```
AGGGTGGTGTCCAGCGGAGACGTGGTGAGATTTCCCAACATCACCAACCTGTGCCCTTCGGCGAGGTGTCAACGCC
ACCAAGTTCCTTCCGTGTACGCCTGGGAGAGGAAGAAGATCAGCAACTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAATT
CCACCTTTTTCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGAGCGCCACAAAGCTGAATGATCTGTGTTTTTCCAATGTGTACGCC
GATTCCTTCGTGGTGAAGGGCGACGACGTGAGACAGATCGCCCCGGCCAGACAGGCGTGATCGCCGATTACAATTAC
AAGCTGCCCCACGATTTTCATGGGCTGTGTGCTGGCCTGGAATACCAGGAATATCGATGCCACATCCACAGGCAATCAC
AACTACAAGTACAGGTACCTGAGACACGGCAAGCTGAGGCCCTTCGAGAGAGATATCTCCAATGTGCCCTTTTCCCCCG
ATGGCAAGCCTTGCACCCTCCCGCCTGAACTGTACTGGCCTCTGAACGACTACGGCTTTACACCACCACCGGCAT
CGGCTACCAGCCTTACAGGGTGGTGGTGTCTCTTTGAGCTGTGAATGCCCTGCCACAGTGTGGGCCCCAAGCTG
TCCACAGACCTGATCAAGAATCAGTGGTGAATTTCTCCGGCTAA
```

Optimized DNA

```
CGTGTGTGTCGGAGCGCGATGTTGTTCGTTTTCCGAATATTACCAATCTGTGTCCGTTTGGCGAAGTGTTAATGCCAC
CAAATTTCCGAGCGTTATGCTGGGAACGTAAAAGATTAGCAAITGCGTGGCCGATTATAGCGTGTGTATAATAGC
ACCTTTTTCAGTACCTTTAAGTGCTATGGCGTTAGCGCAACCAAAGTGAATGATCTGTGCTTTAGTAAATGTGTATGCCGA
TAGCTTTGTGTGTTAAAGGCGATGATGTGCGCCAGATGCCCCGGGTGAGACCGGCGTGATGAGATTATAAATTAAA
CTGCCGGATGATTTTCATGGGTGCGTCTGGCATGGAATACCCGTAATATGATGCCACAGIACCGGCAATCAATAIT
ATAAATATCGTTACCTGCGCCATGGCAAACTGCGTCCGTTTGAACGTGATATTAGCAATGTTCCGTTTAGTCCGGATGG
TAAACCGTGCACCCCGCGCCCTGAAATTGTTATTTGGCCGCTGAATGATATGTTTITATACCACCACCGGTATTGGCT
ATCAGCCGTATCGTGTGTGGTGTGAGCTTTGAACTGCTGAATGCACCGGCCACCCTGTGCGGTCCGAAACTGAGCAC
CGATCTGATTAGAATCAGTGTGTTAATTTAGTGGCTAA
```

**Gambar 1. a)** Protein RBD pada subunit 1 Spike Glycoprotein SARS-CoV-2 **b)** Hasil optimasi sekuen RBD

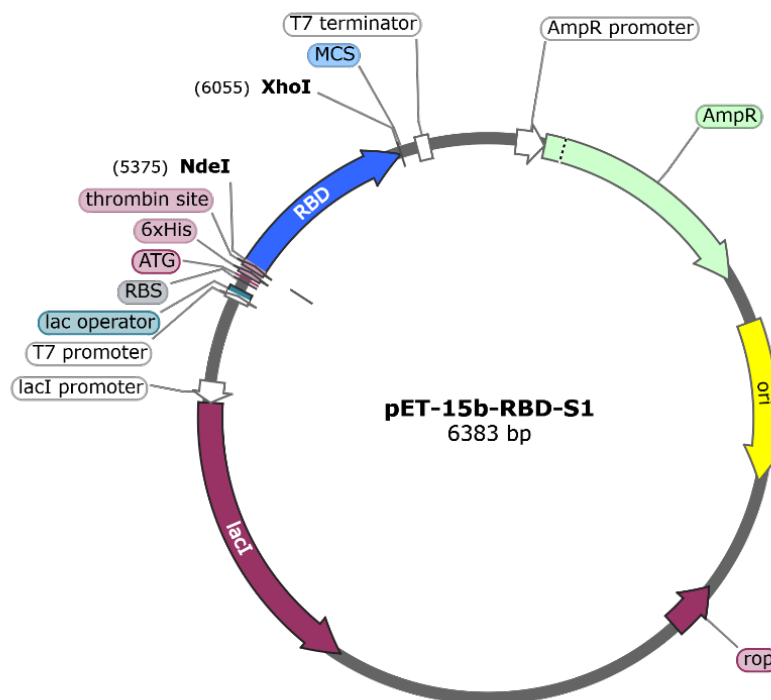
Salah satu parameter pada optimasi kodon yaitu *codon adaptation index* (CAI) digunakan untuk mengukur *synonymous codon usage bias* atau bias penggunaan kodon yang sinonim dan kecocokannya pada sistem ekspresi yang digunakan. Optimasi kodon yang dilakukan menunjukkan nilai CAI yang meningkat dari 0,72 menjadi 0,96. Menurut Sharp dan Li (1987) pada Cantoia dkk., (2021), nilai CAI mendekati 1,0 menunjukkan kecenderungan sekuens untuk dapat terekspresi dengan tinggi pada sistem ekspresi yang digunakan dalam hal ini pada *E. coli* BL21(DE3).

Nilai CAI pada beberapa organisme didasarkan pada frekuensi penggunaan kodon pada serangkaian gen referensi yang

diekspresikan tinggi oleh organisme tersebut. Nilai CAI pada gen spesifik kemudian dapat ditentukan dengan membandingkan frekuensi penggunaan kodon dengan serangkaian gen yang dijadikan referensi (Quax dkk., 2015). Beberapa penelitian juga telah melaporkan keberhasilan optimasi kodon dapat meningkatkan ekspresi suatu gen hingga 1.000 kali dengan mengoptimasi sekuen pengkodenya. (Gustafsson dkk., 2012). Keberhasilan peningkatan level ekspresi dengan optimasi kodon juga ditunjukkan pada ekspresi beberapa gen manusia pada *E. coli* yang lebih tinggi dibandingkan mengekspresi tRNA tambahan (Maerteens dkk., 2010). Peningkatan level ekspresi dengan dilakukannya optimasi kodon sesuai dengan sistem ekspresi yang

digunakan juga diharapkan dapat memberikan peningkatan yang signifikan pada ekspresi

protein RBD pada *E. coli* BL21 (DE3) melalui penelitian lanjutan.



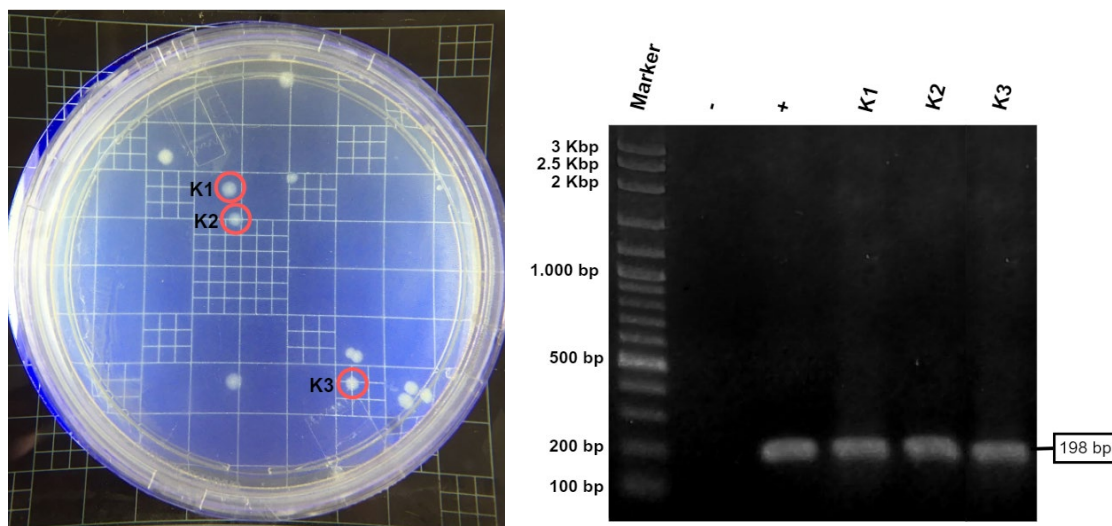
**Gambar 2.** Peta plasmid rekombinan pET-15b-RBD

Sekuen yang menyandi protein RBD yang telah dioptimasi kemudian disisipkan pada plasmid pET-15b untuk membentuk plasmid rekombinan pET-15b-RBD. Plasmid pET-15b yang berukuran 5.708 bp pada situs restriksi *NdeI* (CATATG) dan *XhoI* (CTCGAG) membentuk plasmid rekombinan pET-15b-RBD sepanjang 6.383 bp (Gambar 2). Plasmid pET-15b merupakan salah satu vektor ekspresi yang telah dilengkapi dengan sekuens 6x His pada sisi N terminal untuk memudahkan purifikasi pada produksi protein rekombinan.

### Transformasi, PCR Koloni dan Isolasi Plasmid

Hasil konstruksi plasmid rekombinan pET-15b-RBD yang telah disintesis kemudian ditransformasikan pada *E. coli* BL21(DE3) kompeten dengan metode *heat-shock* dan ditumbuhkan pada media LB dengan antibiotik ampisilin (100 µg/mL). Ampisilin digunakan untuk menyeleksi koloni *E. coli* BL21(DE3) yang berhasil ditransformasikan. Gambar 3

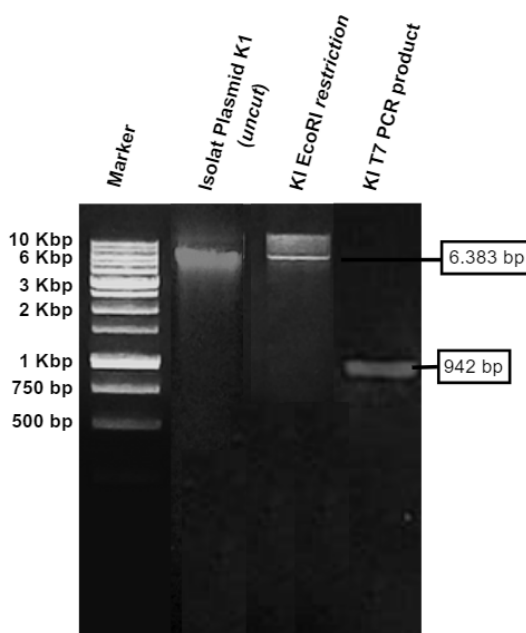
menunjukkan adanya koloni transforman dari *E. coli* BL21(DE3) yang telah membawa plasmid rekombinan pET-15b-RBD pada media pertumbuhan LB agar dengan ampisilin. Koloni tersebut kemudian digunakan untuk konfirmasi lebih lanjut dengan PCR koloni.



**Gambar 3.** Koloni hasil transformasi pada media LB agar (kiri) dan visualisasi elektroforesis hasil PCR koloni (kanan) (M: Marker 100 bp; -: kontrol negatif; +: kontrol positif; K1-K3: sampel koloni 1-3)

Hasil PCR koloni pada Gambar 3 menunjukkan adanya pita DNA yang terdeteksi pada ukuran 198 bp dan menunjukkan bahwa sekuen gen RBD dapat dijumpai pada ketiga sampel koloni transforman yang digunakan. Hal ini juga menunjukkan keberhasilan transformasi plasmid transforman pET-15b-RBD pada koloni *E. coli* BL21(DE3). Koloni transforman yang telah terkonfirmasi membawa gen RBD pada PCR koloni digunakan untuk konfirmasi selanjutnya dengan sekuensing isolat plasmid. Isolat plasmid diperoleh dengan konsentrasi 110,23 µg/mL dan

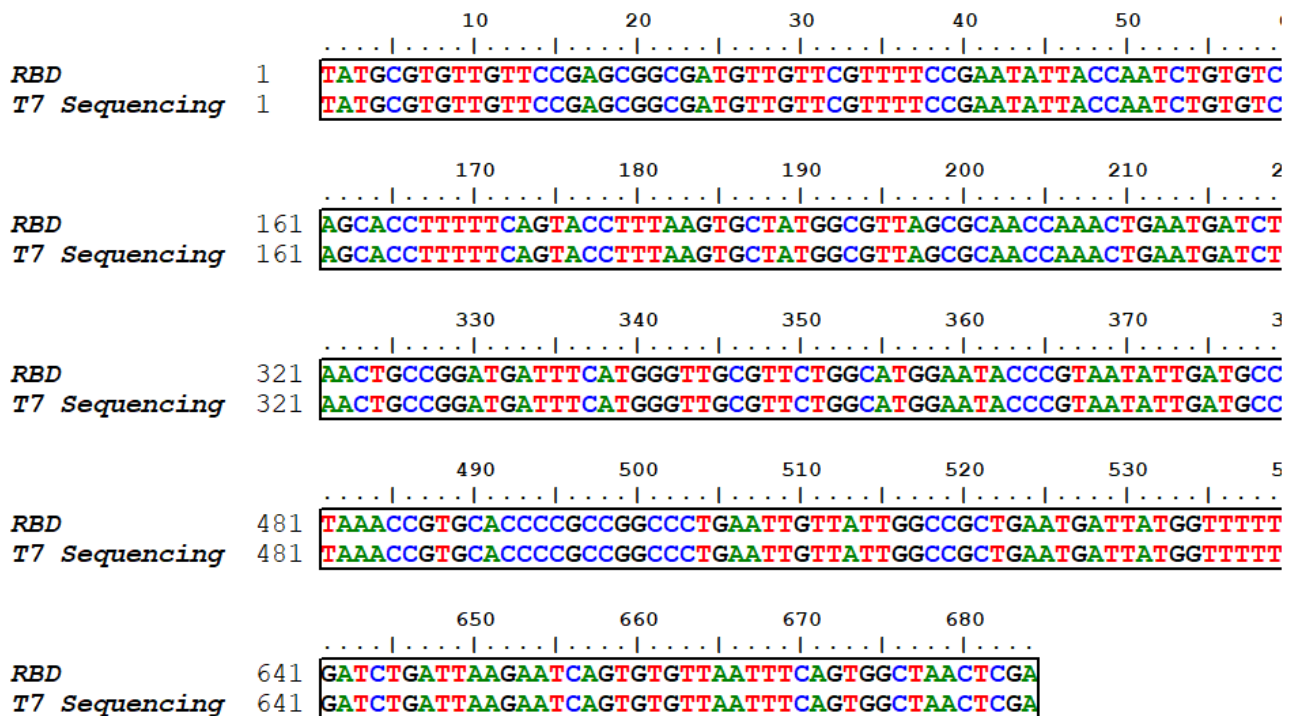
kemurnian 1,99 pada rasio absorbansi 260 dan 280 nm. Menurut Gallagher (2001) pada Pookhamsak dkk. (2019), DNA murni memiliki rasio sekitar 1,8 pada absorbansi 260 dan 280 nm dengan rasio di atas 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi RNA karena absorbansi yang tidak dapat membedakan DNA atau RNA pada pembacaan. Adanya kontaminasi RNA juga dapat disebabkan oleh tidak adanya penambahan enzim RNase yang dapat mendegradasi RNA pada tahapan isolasi DNA.



**Gambar 4.** Visualisasi elektroforesis isolat plasmid pET-15b-RBD

Hasil restriksi *single digest* dari isolat plasmid juga terkonfirmasi menunjukkan pita berukuran 6.383 bp pada elektroforesis agarose 1% (Gambar 4). Panjang pita plasmid linear menunjukkan ukuran yang sama dengan ukuran plasmid pET-15b-RBD yang dikonstruksikan sebelumnya yang juga mengonfirmasi keberhasilan transformasi plasmid pada koloni transforman K1. Isolat plasmid kemudian

diampifikasi dengan primer T7 forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') dan T7 reverse (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') yang akan memperbanyak sekuen DNA dari ujung T7 promoter hingga T7 terminator pada plasmid pET-15b-RBD. Produk PCR sepanjang 942 bp yang dihasilkan kemudian digunakan untuk konfirmasi urutan sekuen melalui sekuensing.



**Gambar 5.** Penyejajaran urutan sekuen kontrak RBD dan hasil sekuensing

Penyejajaran hasil sekuensing dan konstruksi plasmid pET-15b-RBD (Gambar 5) menunjukkan tidak terdapat perubahan basa nukleotida atau mutasi pada gen RBD pada plasmid yang diisolasi dari koloni transforman yang digunakan. Hal ini mengindikasikan pula tidak terjadi perubahan asam amino pada tahap translasi selama ekspresi protein rekombinan dilakukan pada sistem *E. coli* BL21(DE3).

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, optimasi kodon menunjukkan adanya peningkatan nilai CAI yang dapat meningkatkan kemampuan translasi pada sistem ekspresi yang digunakan, yaitu *E. coli* BL21(DE3). Plasmid

rekombinan pET-15b-RBD yang dikonstruksikan juga dapat ditransformasikan tanpa adanya perubahan basa nukleotida yang menjadi protein RBD pada koloni transforman *E. coli* (BL21(DE3)) yang digunakan. Hasil optimasi dan konstruksi plasmid rekombinan pET-15b-RBD pada penelitian ini dapat digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya yaitu ekspresi dan purifikasi untuk memperoleh protein rekombinan RBD SARS-CoV-2.

## APRESIASI

Penelitian ini dapat terlaksana melalui hibah dana penelitian pada Program Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Tahun Anggaran 2023 dengan Kontrak Nomor

3210/UN1/DITLIT/Dit-Lit/PT.01.03/2023 yang diselenggarakan oleh Direktorat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Altincekic, N., Korn, S. M., Qureshi, N. S., Dujardin, M., Ninot-Pedrosa, M., Abele, R., Abi Saad, M. J., Alfano, C., Almeida, F. C. L., Alshamleh, I., de Amorim, G. C., Anderson, T. K., Anobom, C. D., Anorma, C., Bains, J. K., Bax, A., Blackledge, M., Blechar, J., Böckmann, A., Brigandat, L., ... Schlundt, A. (2021). Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 653148. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.653148>
- Andrews, N., Stowe, J., Kirsebom, F., Toffa, S., Rickeard, T., Gallagher, E., Gower, C., Kall, M., Groves, N., O'Connell, A. M., Simons, D., Blomquist, P. B., Zaidi, A., Nash, S., Iwani Binti Abdul Aziz, N., Thelwall, S., Dabrera, G., Myers, R., Amirthalingam, G., Gharbia, S., ... Lopez Bernal, J. (2022). Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *The New England journal of medicine*, 386(16), 1532-1546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>.
- Cantoia, A., Lucero, D. A., Ceccarelli, E. A., Rosano, G. L. (2021). From the notebook to recombinant protein production in *Escherichia coli*: Design of expression vectors and gene cloning. *Methods in Enzymology*, 659, 19-35. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.008>.
- Elena, C., Ravasi, P., Castelli, M. E., Peirú, S., & Menzella, H. G. (2014). Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 78262. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00021/BIBTEX>.
- Frederiksen, L. S. F., Zhang, Y., Foged, C., & Thakur, A. (2020). The Long Road Toward COVID-19 Herd Immunity: Vaccine Platform Technologies and Mass Immunization Strategies. *Frontiers in Immunology*, 11, 560652. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01817/BIBTEX>.
- Gallagher, S. (2001). Quantitation of nucleic acids with absorption spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science*, Appendix 4, A.4K.1-A.4K.3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA04KS13>.
- Gao, X., Peng, S., Mei, S., Liang, K., Khan, M. S. I., Vong, E. G., & Zhan, J. (2022). Expression and functional identification of recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) from *E. coli* system. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 52(3), 318-324. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1941106>.
- Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S, Ness J, Villalobos A, Welch M. (2012). Engineering genes for predictable protein expression. *Protein Expr Purif*. 83(1):37-46. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.013>.
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718-725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>.
- Kumar, M., & Al Khodor, S. (2020). Pathophysiology and treatment strategies



- for COVID-19. *Journal of Translational Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-020-02520-8>.
- Maertens B, Spriestersbach A, von Groll U, Roth U, Kubicek J, Gerrits M, Graf M, Liss M, Daubert D, Wagner R, Schäfer F. (2010). Gene optimization mechanisms: a multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 19(7):1312-26. <https://doi.org/10.1002/pro.408>.
- Mauro, V. P., & Chappell, S. A. (2014). A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 20(11), 604–613. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.003>.
- Menzella H. G. (2011). Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 10 15 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-15>.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., & King, J. (1991). Global Suppression of Protein Folding Defects and Inclusion Body Formation. *Science*, 253(5015), 54–58. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1648264>.
- Pookhamsak, P., Pornbungkerd, P., dan Tantasawat, P. A. (2019). Simple, Rapid, and Cost-effective DNA Extraction Method for High Quality DNA Suitable for PCR based Downstream Application in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 346. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/346/1/012037>.
- Quax, T. E., Claassens, N. J., Söll, D., & van der Oost, J. (2015). Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Molecular cell*, 59(2), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.035>.
- Sharp, P. M., & Li, W. H. (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1281–1295. <https://doi.org/10.1093/NAR/15.3.1281>.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-015-0222-8>.
- Lozano Terol G, Gallego-Jara J, Sola Martinez RA, Martinez Vivancos A, Canovas Diaz M, de Diego Puente T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Front Microbiol.* 2021;12:682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>.
- World Health Organization (WHO). (2023, July 6). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO. <https://covid19.who.int/>.
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.