

KAJIAN KEFUNGSIAN GENOM IKAN SIAKAP (*Lates calcarifer*)  
MENGUNAKAN PENDEKATAN EST DAN MIKROATUR DNA

NUR ASMA BINTI ARIFFIN

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA





KAJIAN KEFUNGSIAN GENOM IKAN SIAKAP (*Lates calcarifer*)  
MENGUNAKAN PENDEKATAN EST DAN MIKROATUR DNA

PENGARJAN  
NUR ASMA BINTI ARIFFIN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
BANGI

2009

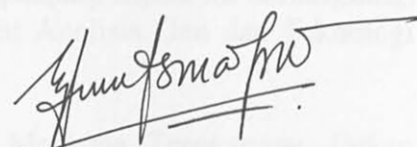
## PENGHARGAAN

Penyusunan dan pengisian dokumen kepada penyelia utama saya iaitu Prof. Dr. Abdul Halim yang selama ini telah memberi bimbingan, galakan dan dorongan yang sangat berharga saya di dalam menyelesaikan kajian ini. Dengan penghargaan juga diberikan kepada Prof. Madya Dr. Wan Yuzi Lian yang selama ini memberikan galakan dan dorongan saya. Penghargaan juga diberikan Prof. Madya Dr. Zulkarna Zaidi yang memberi bimbingan di dalam kajian ini. Tidak ketinggalan Dr. Nur Hafiz, Adnan Ullah serta ramai yang memberi saya bimbingan dan dorongan dalam di dalam penyusunan kajian ini.

## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

30 Jun 2009



NUR ASMA BINTI ARIFFIN  
P20194

## PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan ditujukan kepada penyelia utama saya iaitu Prof. Dr. Rahmah Mohamed yang sentiasa memberi peluang, galakan dan bimbingan yang berterusan kepada saya di dalam menjalankan kajian ini. Ucapan penghargaan juga ditujukan kepada Prof. Madya. Dr. Wan Kiew Lian yang sentiasa memberikan galakan dan percambahan idea. Penghargaan juga diberikan Prof. Madya. Dr. Zulkeflie Zamrod yang memberi nasihat di dalam kajian ini. Tidak dilupakan Dr. Adura Mohd. Adnan selaku ketua projek yang memberi saya peluang menjalankan kajian di bawah peruntukan projek beliau.

Penghargaan diucapkan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi yang membiayai projek ini dibawah geran penyelidikan IRPA 05-02-02-006 (BTK/ER/30). Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada kakitangan Pusat Pengajian Siswazah UKM yang memberi sepenuh kerjasama sepanjang kajian ini dijalankan. Penghargaan juga ditujukan kepada para pensyarah dan kakitangan Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, UKM. Ucapan penghargaan ini juga ditujukan kepada semua kakitangan Institut Genomik Kebangsaan, MOSTI terutamanya kepada Md. Noor Mat Isa, Irni Suhayu dan Halimah Alias yang sentiasa memberikan kerjasama sepanjang kajian ini berlangsung. Tidak ketinggalan juga kepada semua kakitangan Pusat Analisis Gen dan Teknologi (CGAT), UKM yang telah melancarkan pengajian saya.

Perhargaan juga ditujukan kepada Universiti Malaysia Terengganu, Dekan Fakulti Agroteknologi dan Sains Makanan dan Ketua Jabatan Sains Perikanan dan Akuakultur yang memberi saya peluang melanjutkan pengajian di UKM. Perhargaan juga kepada Pusat Pengeluaran dan Penyelidikan Benih Ikan Laut, Tanjong Demong, Terengganu dan Pusat Penyelidikan Perikanan, Pulau Pinang yang telah bekerjasama membekalkan sampel kajian. Tidak ketinggalan kepada Nurul Yuziana, Khoo Choon Kiat dan Norazfa yang telah membekalkan sebahagian klon-klon DNA bagi kajian ini. Ribuan terima kasih yang tidak terhingga ditujukan kepada semua pelajar yang sama-sama menjalankan kajian di Fakulti Sains dan Teknologi, UKM yang tidak muat nama mereka untuk dinyatakan di sini. Terima kasih di atas segala perkongsian ilmu dan kemahiran selama ini. Setinggi-tinggi penghargaan buat keluarga iaitu Allahyarham Ariffin Muhd. Ghazali, Samriah Idris, Md. Sheriff Shamsudin, Rahmah Abd. Hamid dan adik-beradik yang sentiasa memahami. Penghargaan tidak terhingga ditujukan kepada Shahreza Md. Sheriff yang menjadi penyokong kuat dan setia dalam bersama-sama mengharungi cabaran sepanjang menyiapkan penyelidikan dan tesis ini. Tidak dilupakan kepada semua yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini. Hanya Allah sahaja yang mampu membalasnya.

## ABSTRAK

Kajian dilakukan bagi mengenalpasti profil pengekspresan gen-gen tisu otot *L. calcarifer* mengikut peringkat tumbesaran. Pendekatan pencarian dan pengenalpastian gen-gen tisu otot menggunakan penanda jujukan terekspres (EST) telah digunakan. Perpustakaan cDNA tisu otot dengan nilai titer perpustakaan primer sebanyak  $4.58 \times 10^5$  pfu, peratusan rekombinan 98% dan purata saiz selitan sebanyak 1000pb telah berjaya dibina. Sebanyak 2262 jujukan EST telah diperolehi dan sebanyak 435 transkrip unik telah dihasilkan daripada analisis pengkelompokan menggunakan StackPACK. Analisis pemadanan jujukan mendapati 142 transkrip mempunyai padanan dengan jujukan spesies ikan manakala sejumlah 177 transkrip tidak mempunyai padanan dengan mana-mana jujukan yang sedia ada dalam pangkalan data umum nr GenBank. Ini merupakan sumber maklumat baru dan mungkin merupakan jujukan spesifik bagi *L. calcarifer*. Gen-gen miofibril dikenalpasti mempunyai kelimpahan yang tinggi di dalam tisu otot *L. calcarifer*. Dalam kajian ini, parvalbumin dikenalpasti sebagai transkrip yang paling banyak ditemui iaitu kira-kira 33.6%. Pencirian tiga jenis parvalbumin (PV1, PV2 dan PV3) daripada konsensus berbeza telah dilakukan dan didapati semua parvalbumin yang dikaji adalah isoform  $\beta$ . Hasil analisis juga mendapati PV1 mempunyai hubungan yang lebih rapat dengan PV3 berbanding PV2. Hasil daripada analisis EST digunakan dalam pembinaan mikroatur DNA bagi *L. calcarifer*. Mikroatur DNA ini mengandungi sejumlah 2087 produk amplifikasi PCR tulen daripada klon-klon cDNA tisu otot, hepar, limpa dan otak *L. calcarifer* serta 119 kawalan. Mikroatur DNA ini digunakan bagi mendapatkan profil pengekspresan gen tisu otot mengikut enam peringkat tumbesaran iaitu 20, 31, 111, 202, 475 dan 717 hari. Analisis PCR masa nyata telah digunakan untuk mengesahkan hasil kajian mikroatur DNA. Hasil kajian mendapati bilangan gen yang mengalami peningkatan pengekspresan bertambah mengikut peringkat umur. Bagaimanapun, gen yang mengalami penurunan pengekspresan hanya didapati pada *L. calcarifer* berumur 475 dan 717 hari. Hasil kajian juga mendapati terdapat perbezaan profil pengekspresan yang jelas di antara *L. calcarifer* berumur 20, 31, 111 dan 202 hari berbanding 475 dan 717 hari. Perbezaan aras pengekspresan gen mengikut peringkat umur mungkin disebabkan oleh keperluan fungsi yang berbeza pada setiap peringkat umur. Selain itu, pelbagai faktor luaran dan dalaman mungkin turut mempengaruhi fungsi tisu otot *L. calcarifer* sepanjang proses tumbesaran. Hasil kajian menunjukkan mikroatur DNA yang dibina telah menunjukkan keupayaan yang baik dalam menentukan profil pengekspresan gen tisu otot *L. calcarifer* mengikut peringkat tumbesaran.

## FUNCTIONAL GENOMICS STUDY OF ASIAN SEA BASS (*Lates calcarifer*) USING EST AND DNA MICROARRAY APPROACH

### ABSTRACT

A study was done to determine the expression profile of *L. calcarifer* skeletal muscle genes during development. Expressed sequence tag (EST) analysis was used in the isolation and identification of *L. calcarifer* skeletal muscle genes. A cDNA library from the *L. calcarifer* skeletal muscle was successfully constructed. The titer of the primary library obtained was  $4.58 \times 10^3$  pfu, the percentage of recombinant was 98% and the average of insert size was 1000bp. A total of 2262 ESTs were obtained and approximately 435 unique transcripts were identified from the clustering analysis using the StackPACK program. Comparative sequence analysis showed that 142 transcripts matched fish sequences whereas 177 transcripts did not match with any sequence available in the public database GenBank. This indicated that these sequences could be novel or specific sequences from *L. calcarifer*. It was found that myofibrillar proteins were abundant in *L. calcarifer* skeletal muscle. In this study, parvalbumins were found to be highly expressed with a percentage of 33.6%. Characterization of three parvalbumins (PV1, PV2 and PV3) from different consensi was done and it showed that all the parvalbumins belong to the  $\beta$ -isoform. The results of the analysis showed that PV1 was more closely related to PV3 than PV2. The results obtained from the EST findings were used in the development of a *L. calcarifer* DNA microarray chip. This DNA microarray chip contains a total of 2087 purified PCR products from *L. calcarifer* skeletal muscle, liver, brain and spleen and 119 controls. In this study, the *L. calcarifer* DNA microarray chip was used to determine the gene expression profiles of the skeletal muscle genes in 20, 31, 111, 202, 425, 717 day old *L. calcarifer*. Real-time PCR analysis was done to validate the DNA microarray results. The results showed that the number of expressed genes increased with age. However, down regulated expression was only found in 475 and 717 day old fish. The results also showed that the gene expression profiles of the skeletal muscle genes were different in 20, 31 111 and 202 day old from 475 and 717 day old fish. The changes in the gene expression levels during development were assumed to be controlled by different physiological demands and activities involved in each developmental stage. Apart from that, various internal and external factors could affect the function of the *L. calcarifer* skeletal muscle during development. The results demonstrated the ability of the constructed *L. calcarifer* DNA microarray chip in determining differentially expressed genes during skeletal muscle development.