

ANALISIS MOLEKUL VIRUS NIPAH :  
PENCIRIAN GEN L DAN PEMBANGUNAN  
SISTEM MINIGENOM

SHAHREZA BIN MD SHERIFF

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA



**ANALISIS MOLEKUL VIRUS NIPAH : PENCIRIAN GEN L DAN  
PEMBANGUNAN SISTEM MINIGENOM**

PENGARAH

**SHAHREZA BIN MD SHERIFF**

Saya yang bertanda di bawah ini adalah orang yang saya sendiri lakukan penelitian dan penelitian yang  
tersebut adalah benar-benar saya lakukan sendiri.

11000531

SHAHREZA BIN MD SHERIFF

2008

**TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
DOKTOR FALSAFAH**

**FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
BANGI**

**2008**

11000531



## PENGHARGAAN

Alhamdulillah. Terlebih dahulu saya ingin mengucapkan syukur kepada Allah S.A.W kerana dengan izinnya dapat saya menyiapkan projek penyelidikan dan tesis ini. Setinggi penghargaan dan terima kasih ingin saya ucapkan kepada penyelia saya Prof. Madya Dr. Zulkeflie Zamrod dan Dr. Nazlina Ibrahim yang telah banyak membantu, membimbing dan memberi nasihat kepada saya untuk memantapkan kemahiran, kefahaman dan pengetahuan saya di dalam saya menyiapkan projek penyelidikan ini. Setinggi-tinggi penghargaan juga disampaikan kepada para pensyarah, semua pegawai dan kakitangan Pusat Analisis dan Teknologi Gen dan Institut Genomik Malaysia yang telah banyak memberi kemudahan dan bantuan kepada saya untuk menyiapkan projek ini. Saya ingin merakamkan penghargaan dan terima kasih kepada pensyarah-pensyarah dan kakitangan Fakulti Sains dan Teknologi UKM, Universiti Malaysia Terengganu serta Institut Penyelidikan Veterinar dalam melancarkan pengajian saya di UKM.

Penghargaan yang tidak terhingga juga diucapkan kepada Nur Asma Ariffin yang sentiasa berada dibelakang saya samada di dalam keadaan suka dan duka mengharungi pahit getir dan cabaran yang sangat hebat dalam menyiapkan projek penyelidikan dan tesis ini. Jutaan terima kasih juga diucapkan kepada penyokong kuat saya iaitu Pak Cik dan Mak Cik saya Azmi Abd. Hamid, Kamariah Abd. Hamid, Rozinah Abd Hamid, Rahani Abd Hamid, Jamil Abd Hamid, Roshidah Abd Hamid, Zulkifli Shamsudin, Marziah Mahmud yang tidak jemu-jemu membantu, memberi dorongan dan semangat kepada saya dalam mengharungi suka dan duka meniti perjalanan pengajian saya di UKM.

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan saya iaitu Siah Eng Thian dan Sharon Lee Yet Yin serta ramai lagi rakan seperjuangan lain yang tidak muat untuk dinyatakan di dalam tesis ini yang telah memberi tunjuk ajar kepada saya dalam menjadikan saya seorang yang berkemahiran tinggi di dalam bidang yang saya ceburi.

Akhir kata saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada mentor saya iaitu ibubapa saya Md. Sheriff Shamsudin dan Rahmah Abd Hamid yang banyak mengajar saya erti ketabahan dan kesabaran dalam mengejar cita-cita saya. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Shahrezan Md. Sheriff, Razewil Md Sheriff, Azahar Abd Rahim, Amanda Rizween, Alyssa Razniena, Mohd Ruzain Azfar, Mohd Raziq Azrai yang telah banyak menceriakan kehidupan saya sebagai seorang pelajar PhD.

## ABSTRAK

Satu kajian telah dijalankan untuk mencari gen L virus Nipah (NiV) serta membangun dan menganalisa proses transkripsi NiV. Di dalam kajian ini, gen L NiV diklon dan keseluruhan gen dijujuk. Gen L yang mempunyai 6,735 nukleotida mengkodkan protein sepanjang 2,244 asid amino dengan anggaran kiraan berat molekul 257,202 Da. Pengekspresan Gen L di dalam Yis, *Pichia pastoris* menunjukkan berat molekul yang hampir serupa dengan berat molekul anggaran. Pencirian bioinformatik ke atas gen L NiV menunjukkan bahawa gen L NiV mengandungi kesemua kawasan terpelihara bagi polimerase virus RNA bebenang negatif. Walau bagaimanapun, hasil analisis mendapati rantau penambat RNA bagi NiV yang terletak pada Domain II tidak mengikut susunan jujukan bagi motif penambat RNA di mana asid amino kelima dan pasangan asid amino bercas positif yang pertama adalah asid amino hidrofilik berbanding dengan asid amino hidrofobik yang terdapat pada virus lain. Hasil analisis juga menunjukkan bahawa susunan jujukan ini bersamaan dengan jujukan yang terdapat pada virus Hendra dan ia didapati spesifik bagi sesuatu genus. Seterusnya satu sistem genetik berbalik NiV telah dibangunkan dan analisis transkripsi menggunakan minigenom NiV dan plasmid pembantu dilakukan menggunakan sel vero sebagai hos. Konstruk minigenom NiV dibina mengandungi 5' dan 3' jujukan pemimpin dan pengekor NiV dan disambung pada gen pelapor CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) yang menggantikan gen-gen NiV. Di dalam kajian ini, 6 minigenom NiV dibina terdiri daripada minigenom mengandungi jujukan asal (NiVMGWT), minigenom mengikut peraturan pembahagian 6 (NiVMGR6) dan 3 minigenom dengan pengubahsuaian 1 nukleotida pada jujukan pemula gen yang dinamakan NiVMGr6GS1, NiVMGr6GS2 dan NiVMGr6GS3 masing-masing. Apabila sel ditransfek dengan plasmid pembantu yang mengandungi gen N, P dan L NiV bersama dengan minigenom NiV, RNA telah ditranskripsi dan protein CAT dapat dikesan melalui ELISA dengan kepekatan masing-masing iaitu 480 pg/mg (NiVMGWT), 606 pg/mg (NiVMGR6), 864.3 pg/mg (NiVMGr6GS1), 787.3 pg/mg (NiVMGr6GS2) dan 644.3 pg/mg (NiVMGr6GS3). Amplifikasi RT-PCR ke atas RNA minigenom menunjukkan bahawa gen CAT dapat ditranskripsi dan diekspreskan. Hasil analisis PCR masa nyata menunjukkan bahawa minigenom NiVMGR6 dan NiVMGr6GS1 menghasilkan transkrip dan protein CAT yang tertinggi dengan NiVMGR6 menghasilkan transkrip RNA CAT pada tahap 10 kali lebih tinggi berbanding dengan minigenom asal (NiVMGWT). Ini menunjukkan bahawa proses transkripsi NiV adalah mengikut peraturan pembahagian 6. Hasil ini juga menunjukkan pengubahsuaian jujukan pada nukleotida pertama jujukan pemula gen daripada U kepada C (NiVMGr6GS1) boleh mempengaruhi pengekspresan protein CAT. Kajian yang dilakukan telah menunjukkan bahawa gen L NiV yang diklon serta sistem genetik berbalik NiV minigenom yang dibangunkan adalah berfungsi dan dapat digunakan untuk kajian replikasi dan transkripsi NiV selanjutnya.

## MOLECULAR ANALYSIS OF NIPAH VIRUS : CHARACTERIZATION OF L GENE AND DEVELOPMENT OF MINIGENOME SYSTEM

### ABSTRACT

A study was done to characterize the NiV L gene, and to develop and analyse the transcription process of NiV. In this study, NiV L protein was cloned and the entire gene was sequenced. The L gene, which consists of 6,735 nucleotides, encoded a protein of 2,244 amino acids with a calculated molecular weight of 257,202 Da. Expression of the L gene in yeast, *Pichia pastoris* showed the predicted molecular weight of 257 kDa protein. Sequence analysis of the L gene showed that the L gene carries all the main polymerase gene features of negative stranded RNA viruses. However, result showed that the NiV RNA binding motif of NiV L protein which is situated in Domain II did not follow the normal RNA binding motif sequence found on other negative stranded RNA viruses. In NiV, the fifth amino acid and the first pair of positive charged amino acids were hydrophilic compared to the amino acids found on other negative strand RNA viruses which were hydrophobic. This sequence was similar to Hendra virus L protein and the result of the analysis showed that the sequence of the motif is genus specific. Furthermore, NiV reverse genetic system was developed and the transcription analysis using NiV minigenome and helper plasmids carrying NiV N, P and L genes was conducted using Vero cells. NiV minigenome construct was constructed containing the NiV 3' and 5' terminal and transcriptional sequences fused to a reporter gene (Chloramphenicol Acetyl Transferase) in replacement of NiV viral genes. In this study, six different types of NiV minigenome were constructed consisting of wild type minigenome (NiVMGWT), minigenome following the rule of six (NiVMGR6) and three minigenomes with single nucleotide mutation at the gene start sequence namely NiVMGr6GS1, NiVMGr6GS2 and NiVMGr6GS3 respectively. When cells were transfected with NiV N, P and L genes together with NiV minigenome, the RNA was transcribed and the CAT protein was detected through ELISA method with protein concentration of 480 pg/mg (NiVMGWT), 606 pg/mg (NiVMGR6), 864.3 pg/mg (NiVMGr6GS1), 787.3 pg/mg (NiVMGr6GS2) and 644.3 pg/mg (NiVMGr6GS3), respectively. RT-PCR amplification of the RNA indicated that the CAT gene was transcribed and expressed. Real-Time PCR analysis showed that minigenome NiVMGR6 and NiVMGr6GS1 produced the highest level of CAT transcript with NiVMGR6 produced CAT transcript at 10 times higher compared to the wild type minigenome NiVMGWT. These results showed that the transcription process of NiV follows the rule of six. Moreover, these results also indicate that the nucleotide substitution at the first nucleotide of the gene start sequence from U to C (NiVMGr6GS1) can affect the transcription of CAT gene. Together, these results showed that the cloned NiV L gene and the NiV reverse genetic system developed were functional and can be further used for analysing NiV replication and transcription processes in the future.