

**PENGLONAN DAN PENJUJUKAN DNA
RETROVIRUS ENDOGENUS DARIPADA
IKAN MARIN SABAH**

NABILA HANA AB HAMID

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

2007



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PENGLONAN DAN PENJUJUAN RETROVIRUS ENDOGENUS
DARI IKAN MARIN SABAH

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN

SESI PENGAJIAN: 2004/05

Saya NABILA HANA BT AE HAMID
 (HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Nabilafana

(TANDATANGAN PENULIS)

Disahkan oleh

Juziah

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 22 JLN TUN PERAK,
MEDAN TOK SIDA, 25050

DR. ROZIAH HS KAMBOL
 Nama Penyelia

KUANTAN, PAHANG

Tarikh: 20/04/07

Tarikh: 23/04/07

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

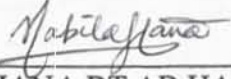
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

20 April 2007

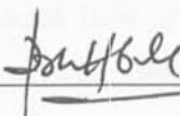

NABILA HANA BT AB HAMID
HS2004-1863



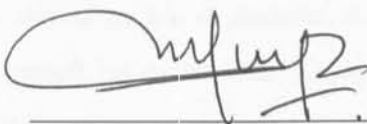
PENGESAHAN

TANDATANGAN

1. PENYELIA
(DR. ROZIAH HJ. KAMBOL)



2. PEMERIKSA 1
(DR. VIJAY KUMAR)



3. PEMERIKSA 2
(DR. LEE PING CHIN)



4. DEKAN
(SUPT/KS. PROF MADYA DR. SHARIFF
A. KADIR S. OMANG)





PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin memanjatkan kesyukuran ke hadrat Ilahi di atas limpah kurnia-Nya saya akhirnya berjaya menyiapkan projek tahun akhir dan disertasi ini. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada penyelia saya, Dr. Roziah Kambol, yang tanpa jemu memberikan tunjuk ajar sama ada di makmal mahu pun berbentuk perbincangan di pejabatnya sepanjang projek ini dijalankan. Kejayaan melakukan projek ini juga tidak mungkin terjadi tanpa rakan seperjuangan, Raha Haniza Abdul Rahman, yang banyak bekerjasama dalam menjalankan kerja-kerja makmal. Sesungguhnya, memori bersama di dalam makmal akan kekal menjadi kenangan terindah diantara kita berdua.

Sekalung penghargaan kepada pensyarah-pensyarah lain, terutamanya Dr. Vijay Kumar dan Dr. Michael Wong yang telah menyampaikan ilmu dalam teknik-teknik molekular sepanjang mengendalikan kursus SY3053, Kejuruteraan Genetik, di mana pengajaran di dalam kelas ini membantu dalam pengendalian projek ini. Tidak lupa juga kepada pelajar pascasiswazah Institut Penyelidikan Bioteknologi, En. Awang Sagaf yang sudi memberi tunjuk ajar di dalam makmal dan secara tidak langsung menjadi tutor kepada saya.

Kepada rakan-rakan yang lain, terima kasih kerana memberi sokongan dan tidak putus membawa sinar keceriaan ke dalam kehidupan saya sepanjang bergelar mahasiswi. Akhir sekali, terima kasih yang tidak terhingga kepada ibubapa saya dan ahli keluarga yang lain di atas sokongan moral yang telah diberikan.

ABSTRAK

Kajian ini bertujuan mengklon dan mendapatkan jujukan gen transkriptase berbalik (RT) dan gen protease (PRO) retrovirus endogenus dari ikan marin Sabah. Tujuh sampel ikan berlainan spesies telah melalui pengekstrakan genomik DNA di mana lima darinya mendapat keputusan positif dengan menghasilkan jalur tunggal setelah melalui analisa gel elektroforesis. Lima sampel yang mendapat hasil positif ini kemudiannya diampifikasikan gen transkriptase berbalik (RT) dan gen protease (PRO) dengan menjalani tindakbalas berantai polimerase (PCR). Langkah ini dijalankan bagi membuat banyak salinan gen-gen yang dikehendaki dengan menggunakan dua primer universal iaitu PRO (protease) dan RT (transkriptase berbalik). Dua sampel ikan iaitu ikan Merah dan ikan Sebelah telah memberikan hasil positif dengan penghasilan produk PCR bersaiz sekitar 600 hingga 900 pasangan bes. Kedua-dua sampel telah dipotong dari gel agaros dan dipurifikasikan. Kejayaan proses purifikasi membawa kepada proses seterusnya iaitu transformasi gen ke dalam vektor plasmid dan seterusnya kemasukan vektor tersebut ke dalam sel perumah iaitu *E. coli* DH5 α . Hasil transformasi ini kemudiannya dikultur di atas piring media LB/amp/X-gal. Koloni putih yang dihasilkan oleh kedua-dua sampel digunakan dalam proses seterusnya iaitu miniprep dan pemotongan plasmid. Langkah terakhir iaitu pemotongan menggunakan enzim pembatasan memberikan hasil positif dengan menghasilkan jalur dalam lingkungan saiz 600 hingga 900 pasangan bes. Kedua-dua sampel telah dihantar untuk proses penjujukan ke MacroGen bertempat di Seoul, Korea Selatan. Keputusan penjujukan DNA yang diperolehi menunjukkan RV-Merah yang mempunyai 793 pasangan bes DNA. Walau bagaimanapun, RV-Sebelah tidak berjaya dijujukan. Analisa lanjut menunjukkan bahawa RV-Merah bukan merupakan retrovirus endogenus. Oleh itu, objektif kajian gagal dicapai.



ABSTRACT

This study was conducted to cloned and sequenced the reverse transcriptase (RT) and protease (PRO) genes from endogenous retrovirus found in Sabah marine fish. Seven different species underwent DNA extraction and five namely ikan Mong, ikan Tenggiri, ikan Sebelah, ikan Merah and ikan Blais gave positive results by producing band after analysis with gel electrophoresis. These five samples were later subjected to polymerase chain reaction (PCR) to amplify their reverse transcriptase (RT) and protease (PRO) genes. This step was done to make multiple copies of the studied gene using two universal primer that were PRO (protease) and RT (reverse transcriptase). Two samples namely ikan Merah and ikan Sebelah gave positive results by producing bands in the range of 600 to 900 base pairs. They were later cut from the agarose gel and purified. The success of purification led to the next process which was the transformation of the gene into the plasmid vector and later the insertion of this vector into the host cell namely *E. coli* DH5 α . The product of transformation was later cultured on the culture media of LB/amp/X-gal. White colonies resulting from the transformation of both samples were then used in miniprep and plasmid digestion steps. The plasmid digestion produced positive results by producing band of insert within the range of 600 to 900 base pairs. Both samples were sent to MacroGen in Seoul, South Korea for sequencing. DNA sequencing result from ikan Sebelah and ikan Merah were obtained with RV-Merah having 793 base pairs of DNA. Unfortunately, RV-Sebelah was not successfully sequenced. Further analysis on RV-Merah showed that it is not an endogenous retrovirus. Therefore, objectives of this study were not achieved.



KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Objektif kajian	4
BAB 2 RUJUKAN PERPUSTAKAAN	5
2.1 Retrovirus	5
2.1.1 Genom retrovirus	6
2.1.2 Kitar hidup retrovirus	7
2.2 Pengkelasan retrovirus	11
2.2.1 <i>Alpharetrovirus</i>	12
2.2.2 <i>Betaretrovirus</i>	13
2.2.3 <i>Gammaretrovirus</i>	14
2.2.4 <i>Deltaretovirus</i>	14
2.2.5 <i>Epsilonretrovirus</i>	15
2.2.6 <i>Lentivirus</i>	16
2.2.7 <i>Spumavirus</i>	17



2.3	Fragmen retrovirus endogenus dari sampel ikan Malaysia	17
BAB 3	KAEDAH DAN BAHAN	19
3.1	Persampelan ikan	19
3.2	Pengekstrakan DNA	20
3.3	Kuantifikasi genomik DNA	23
3.3.1	Gel elektrofresis	23
3.3.2	Pengukuran kepekatan DNA	24
3.4	Amplifikasi PCR gen trankriptase berbalik (RT) dan gen protease (PRO)	25
3.4.1	Reagen PCR	27
3.4.2	Elektroforesis gel produk PCR	28
3.5	Penulenan produk PCR	29
3.6	Transformasi DNA sasaran	30
3.7	Pengekstrakan plasmid DNA dan analisa penghadaman enzim pembatasan	32
3.8	Penjjukan DNA	35
BAB 4	KEPUTUSAN	36
4.1	Pengekstrakan DNA	36
4.2	Kuantifikasi DNA melalui spektrofotometer	38
4.3	Tindakbalas berantai polimerase (PCR)	39
4.4	Purifikasi produk PCR	40
4.5	Transformasi	42
4.6	Pengekstrakan plasmid DNA dan analisa penghadaman enzim pembatasan	45
4.7	Penjjukan DNA	47
4.8	Analisa asid amino RV-Merah	48



BAB 5	PERBINCANGAN	51
5.1	Pengekstrakan DNA	51
5.2	Kuantifikasi DNA melalui spektrofotometer	54
5.3	Tindakbalas berantai polimerase (PCR)	55
5.4	Purifikasi produk PCR	57
5.5	Transformasi	58
5.6	Pengekstrakan plasmid DNA dan analisa penghadaman enzim pembatasan	60
5.7	Penjjukan DNA	63
BAB 6	KESIMPULAN	68
RUJUKAN		70
LAMPIRAN		74



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Tujuh genera retrovirus bersama jenis spesis virus dan perumah	11
3.1 Jadual senarai nama sampel ikan	20
3.2 Jadual menunjukkan reagen yang terlibat di dalam tindakbalas berantai polimerase (PCR)	27
3.3 Jadual menunjukkan reagen yang terlibat dalam penyediaan hasil ligasi	32
3.4 Jadual menunjukkan reagen yang terlibat dalam pemotongan plasmid	34
4.1 Sampel ikan yang menjalani proses pengestrakan DNA	37
4.2 Kepekatan DNA bagi lima sampel ikan	38
4.3 Sampel ikan serta keputusan tindakbalas berantai polimerase (PCR)	39



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Susunan organisasi genom retrovirus	6
4.1 Jujukan DNA RV-Merah dengan panjang jujukan 793 pasangan bes DNA	47
4.2 Jujukan asid amino RV-Merah dengan panjang jujukan 263 asid amino	48
4.3 Pencarian tBLASTn jujukan asid amino RV-Merah	48



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
4.1 Sampel DNA genomik dari tujuh spesis ikan	37
4.2 Hasil amplifikasi PCR bagi tiga spesis ikan menghasilkan jalur yang mempunyai saiz berbeza	40
4.3 Purifikasi produk PCR bagi ikan Sebelah (H4)	41
4.4 Purifikasi produk PCR bagi ikan Mong (H0) dan ikan Merah (H5)	42
4.5 Piring kultur LB/amp/X-gal bagi sampel ikan Sebelah (H4) pada kepekatan 1X	43
4.6 Piring kultur LB/amp/X-gal bagi sampel ikan Sebelah (H4) pada kepekatan 2X	44
4.7 Piring kultur LB/amp/X-gal bagi sampel ikan Merah (H5)	44
4.8 Hasil analisa penghadaman enzim pembatasan menggunakan <i>EcoR</i> I ke atas sampel ikan Sebelah (H4)	45
4.9 Hasil analisa penghadaman enzim pembatasan menggunakan <i>EcoR</i> I ke atas sampel ikan Merah (H5)	46



SENARAI SIMBOL

M	Molar
mM	Milimolar
JMR	Jisim Molekul Relatif
nm	Nanometer
pmol	Piko mol
μ g	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
L	Liter
Rpm	Revolusi per minit
V	Volt
%	Peratus
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Darjah Celsius
DNA	Asid deoksiribonukleotida
PCR	Tindakbalas berantai polimerase
bp	Pasangan bes
UV	Cahaya ultraungu
ng	Nanogram
ml	Mililiter
A	Penyerapan cahaya
EDTA	Asid Ethylenediamin
TAE	Tris Asetat EDTA
U	Unit
A	Bes Adenina
C	Bes Sitosina
T	Bes Tiamina
G	Bes Guanina



BAB 1

PENDAHULUAN

Genom retrovirus terdiri dari dua salinan bebenang tunggal RNA direplikasi melalui tindakan enzim transkriptase berbalik. Setiap genom mempunyai gen *gag*, *pol*, dan *env* dan setiap gen ini berperanan dalam pembentukan poliprotein virus. Gen *gag* mengkodkan protein-protein struktur seperti kapsid dan nukleokapsid manakala gen *pol* mengkodkan protein-protein enzimatik. Gen *env* pula akan diterjemahkan kepada glikoprotein permukaan dan protein transmembran. Enzim transkriptase berbalik, yang dikodkan oleh gen *pol*, menggunakan bebenang heliks DNA sebagai perantara dalam proses replikasi. DNA retrovirus yang telah diintegrasikan bersama DNA perumah dikenali sebagai provirus dan provirus ini berperanan sebagai sebahagian daripada bahan genetik retrovirus itu sendiri.

Retrovirus endogenus dalam hos ikan merupakan satu cabang kajian yang kurang diterokai dan hakikat ini dapat dibuktikan dengan mudah apabila kurangnya terdapat bahan rujukan mengenai topik ini. Setakat yang diketahui, genus ini terdiri dari virus eksogenus Walleye iaitu virus sarkoma dermal Walleye (WDSV) dan virus hiperplasia epidermal Walleye jenis I dan II (WEHV I dan WEHV II) daripada ikan Walleye Perch



(*Stizostedion vitreum*) dan retrovirus Snakehead (SnRV) daripada ikan Striped Snakehead (*Ophicephalus striatus*). Berlainan pula kesnya dengan retrovirus endogenus pada hos-hos lain seperti manusia dan burung di mana terdapat penghasilan bahan-bahan kajian dalam kuantiti yang banyak mengenai retrovirus endogenus manusia (HERV) dan virus Rous Sarcoma (RSV).

Kesemua retrovirus mempunyai ciri morfologi dan sifat biokimia yang sama di mana persamaan ini membolehkan mereka tergolong di bawah satu famili iaitu *Retroviridae*. Famili ini terbahagi kepada tiga sub-famili iaitu *Oncovirinae*, *Lentivirinae* dan *Spumavirinae*. Perkataan *Onco* membawa erti tumor atau kanser dan ahli sub-famili ini merupakan punca penyakit sarcoma dan leukemia di dalam perumah. *Lenti* pula merupakan perkataan Greek yang bermaksud perlahan dan sifat ini merupakan ciri utama bagi sub-famili *Lentivirinae* yang mempunyai tempoh inkubasi yang panjang antara saat jangkitan dan pengeluaran simptom-simptom penyakit. *Spumavirinae* pula mendapat namanya dari sifatnya yang menghasilkan ciri-ciri berbentuk seperti bebuih dan vakuol pada sel yang dijangkitinya.

Di dalam kajian transkriptase berbalik ini, teknik molekular yang akan diaplikasikan adalah pengekstrakan DNA, pengukuran kepekatan DNA, gel elektroforesis, tindakbalas rantai polimerase, purifikasi produk tindakbalas rantai polimerase, serta teknik pengklonan, transformasi dan penjujukan DNA. Kajian berkenaan enzim transkriptase berbalik telah banyak dijalankan menggunakan teknik molekular bagi

mengenal pasti fungsi serta mekanismanya di dalam sel. Tujuan utama kajian ini dilakukan adalah untuk mengesan kehadiran gen transkriptase berbalik dan gen protease di dalam organisma yang berlainan. Selain itu, jujukan bagi gen transkriptase berbalik dan gen protease juga ingin dikenal pasti.

Tujuan kajian ini dijalankan adalah bagi mencari jujukan gen transkriptase berbalik (RT) dan gen protease (PRO) endogenous retrovirus dalam ikan marin Sabah. Kajian tentang retrovirus endogenous menarik dari sudut kajian perubatan kerana virus jenis endogenous ini dikatakan sebagai prekursor kepada retrovirus eksogenous. Bukti kepada kenyataan ini timbul apabila kajian menunjukkan tidak terdapat perbezaan yang ketara antara struktur protein dan jujukan DNA dari kedua-dua jenis virus ini. Spekulasi awal mengatakan bahawa retrovirus endogenous pada asalnya merupakan virus eksogenous yang telah memasuki genom perumah dan setelah melalui satu jangka masa yang panjang, integrasi ke dalam genom perumah menukarkan virus eksogenous ini kepada retrovirus endogenous.

Kajian ini diteruskan daripada kajian-kajian pelajar terdahulu bagi memastikan kehadiran gen transkriptase berbalik retrovirus di dalam ikan marin khususnya ikan marin Sabah. Ikan marin dipilih kerana industri perikanan merupakan salah satu industri besar di negara kita dan jangkitan retrovirus kepada ikan akan mengancam sumber pendapatan nelayan. Selain itu, tujuan kajian ini adalah untuk mengkaji penyebaran dan kepelbagaian retrovirus ikan marin secara umum.

1.1 Objektif kajian

Tujuan utama kajian ini dijalankan adalah untuk:

- i. Menjalankan pengekstrakan genomik DNA daripada sampel ikan iaitu ikan Mong (*Hilsa kelee*), ikan Basung (*Decapterus maruadsi*), ikan Tenggiri (*Scomberomorus commerson*), ikan Gelama (*Scraena bathytatos*), ikan Sebelah (*Cynoglossus lingua*), ikan Merah (*Lutjanus erythropterus*) dan ikan Blais (*Siganus javus*)
- ii. Mengamplifikasi gen transkriptase berbalik (RT) dan gen protease menggunakan teknik PCR
- iii. Menjalankan purifikasi produk PCR yang diperolehi dan seterusnya mengklon dan menjukkan gen transkriptase berbalik dan gen protease dari ikan marin Sabah

BAB 2

RUJUKAN PERPUSTAKAAN

2.1 Retrovirus

Pencirian retrovirus yang utama adalah penggunaan enzim transkriptase berbalik dalam proses replikasi bahan genetikanya. Enzim transkriptase berbalik bertindak sebagai DNA polimerase berarahkan RNA (*RNA-directed DNA polymerase*) dan berfungsi bagi menghasilkan salinan DNA virus tersebut. Transkriptase berbalik merupakan sejenis enzim di dalam sel virion yang matang dan kehadiran aktiviti enzim ini di dalam cecair supernatan kultur tisu digunakan sebagai penanda kewujudan retrovirus (Gifford dan Tristem, 2003).

Struktur asas bagi retrovirus adalah kehadiran kapsul luar yang terdiri dari membran plasma perumah, beberapa salinan protein kapsul yang berada dalam membran dwilapisan lipid, protein kapsid, dan dua molekul RNA (Vogt, 1997).



2.1.1 Genom Retrovirus

Genom bagi virion matang bersifat diploid yang terkandung dalam dua kompleks dimer 60-70S, bebenang tunggal RNA. Struktur genom bagi provirus dikenal pasti melalui jujukan berulang di kedua-dua belah hujung genom. Jujukan yang dikenali sebagai jujukan terminal berulang (LTR) ini memainkan peranan penting di dalam tindakan virus kerana jujukan ini mempunyai promoter dan elemen perangsang (*enhancer*). Genom bagi kesemua retrovirus yang mampu menjalani proses replikasi mempunyai tiga gen yang mengkodkan tiga protein struktur yang penting iaitu teras protein (*gag*), protein kapsul (*env*) dan polimerase serta lain-lain enzim (*pol*). Kesemua retrovirus mempunyai susunan genom LTR-*gag-pol-env*-LTR (Bruce, 2002).

LTR	MA	CA	NCR	PR	RT	IN	SU	TM	LTR
-----	----	----	-----	----	----	----	----	----	-----

Rajah 2.1 Susunan organisasi genom retrovirus. LTR= jujukan terminal berulang, MA= matriks, CA= kapsid, NCR= nukleokapsid, PR= protease, RT= transkriptase berbalik, IN= integrase, SU= protein membran, dan TM= protein trans-membran.

Sebagaimana yang tertera di rajah 2.1 di atas, genom retrovirus mempunyai jujukan terminal berulang (LTR) di setiap hujung. Jujukan ini memainkan peranan penting dalam proses transkripsi dan integrasi virus DNA. Semasa proses transkripsi, jujukan terminal berulang berperanan memungkinkan peningkatan kadar transkripsi manakala semasa

proses integrasi, jujukan ini membantu dalam proses integrasi DNA virus ke dalam DNA perumah bagi membentuk provirus (Swanstrom dan Wills, 1997).

Protein *gag* mengkodkan tiga protein berbeza iaitu matriks (MA), kapsid (CA) dan nukleokapsid (NCR). Matriks berfungsi melapisi sampul virus manakala kapsid melindungi teras virus dan nukleokapsid yang membentuk teras virus akan melindungi genom. Protein *pol* pula mengkodkan tiga enzim berbeza iaitu protease (PRO), transkriptase berbalik (RT) dan integrase (IN). Protein *pol* juga mengkodkan RNase H yang berfungsi mendegradasikan RNA. Protease bertindak memotong protein *gag* semasa replikasi, enzim transkriptase berbalik menukarkan bahan genetik yang terdiri dari RNA kepada DNA dan integrase berfungsi dalam kemasukan DNA virus ke dalam DNA perumah bagi membentuk provirus. Bagi protein *env* pula, ia mengkodkan protein membran (SU) dan protein trans-membran (TM). Protein membran berfungsi sebagai antigen virus utama manakala protein trans-membran membentuk bahagian dalam sampul glikoprotein (Swanstrom dan Wills, 1997).

2.1.2 Kitar Hidup Retrovirus

Retrovirus menjangkiti perumah melalui pelekatan kepada reseptor-reseptor spesifik pada permukaan sel. Bagi virus HIV, reseptor tersebut merupakan CD4. Selepas pelekatan, proses pengambilan masuk (*fusion*) akan berlaku sama ada di permukaan sel sepertimana yang berlaku pada *lentivirus*, atau melalui salur endositotik bagi retrovirus-retrovirus lain.



RNA retrovirus kemudiannya akan memasuki sitoplasma bersama protein-protein teras. Proses transkripsi berbalik berlaku di dalam sitoplasma dan berakhir di nukleus, di mana cDNA akan dihasilkan dan seterusnya diintegrasikan ke dalam kromosom sel perumah (Doerfler dan Bohm, 1993).

Bagi virus haiwan yang mempunyai bebenang RNA positif, RNA tersebut mulanya ditranslasikan kerana bagi RNA, protein replikasinya harus dihasilkan terlebih dahulu sebelum replikasi bermula. Walau bagaimanapun, partikel retrovirus membawa pelbagai molekul enzim yang berbeza untuk menjalankan proses replikasinya. Enzim utama yang diperlukan dalam proses replikasi adalah enzim transkriptase berbalik yang merupakan sejenis protein kecil, bersaiz di antara 60 hingga 70 kilo Dalton (kDa). Enzim ini mempunyai sekurang-kurangnya tiga aktiviti berbeza iaitu menghasilkan DNA yang komplementari kepada RNA virus. Enzim ini juga mempunyai aktiviti nuklease yang dipanggil ribonuklease H. Ribonuklease H ini mencerna hanya bebenang RNA daripada bebenang hibrid RNA/DNA. Kemudiannya, enzim transkriptase berbalik akan menjadikan DNA yang tinggal kepada bebenang ganda dua (Doerfler dan Bohm, 1993).

Dalam sesetengah retrovirus, endonuklease juga dikodkan oleh gen *pol*. Enzim ini bertindak dengan kehadiran primer dan ia juga mempunyai tapak pelekatan spesifik bagi tRNA yang spesifik. Dalam *Rous Sarcoma Virus* (RSV), primernya merupakan molekul triptofan yang terikat kepada tRNA. tRNA ini pula akan melekat pada kedudukan 38S di

RNA RSV melalui komplementari bes. Semua pelekatan ini berada pada kedudukan selepas nukleotid ke 101 dari hujung 5' (Doerfler dan Bohm, 1993).

Mekanisme transkripsi berbalik retrovirus melibatkan dua 'lompatan' yang dikawal oleh transkriptase berbalik virus di mana ia membolehkan pemindahan bebenang DNA yang sedang memanjang kepada jujukan yang serupa pada bebenang yang sama mahu pun jujukan pada bebenang RNA yang berbeza. Maka, satu salinan genom virus dalam bentuk bebenang DNA ganda dua atau cDNA akan terhasil. Salinan ini digelar provirus dan dari molekul provirus ini akan seterusnya dijalankan proses transkripsi. Proses ini menghasilkan bebenang RNA virus menggunakan molekul RNA polimerase II perumah yang berfungsi dengan kehadiran DNA (*DNA dependent*). Walau bagaimanapun, proses ini hanya mungkin berlaku selepas DNA virus yang terhasil diintegrasikan ke dalam genom sel perumah (Doerfler dan Bohm, 1993).

DNA virus ini kemudiannya menjadi '*supercoiled*' dan memasuki nukleus di mana dalam konformasi ini, DNA boleh diintegrasikan ke dalam satu tapak spesifik pada kromosom sel perumah. Semasa proses integrasi, hujung 3' DNA virus akan bercantum kepada hujung 5' DNA selular dan menghasilkan pengulangan empat pasangan bes dalam jujukan sasaran hos perumah sementara dua pasangan bes dari DNA virus akan terbang (Doerfler dan Bohm, 1993).

Pelekatan protein integrase kepada hujung DNA virus telah dikenal pasti sebagai satu bentuk kawalan proses integrasi. Kompleks yang terbentuk akan mulanya memotong satu bahagian pada DNA kromosomal sebelum memasukkan DNA virus. Integrasi DNA virus boleh berlaku secara rawak di mana-mana jujukan sepanjang bebenang DNA yang aktif bertranskripsi atau mempunyai struktur kromatin yang terbuka. Dalam jangka masa lima jam, kehadiran bebenang ganda dua DNA virus sudah boleh dikesan dan dalam masa sembilan jam, progeni virus sudah pun terhasil (Doerfler dan Bohm, 1993).

Transkripsi gen retrovirus dari DNA proviral dipengaruhi oleh kewujudan jujukan terminal berulang (LTR). LTR mempunyai beberapa ciri penting seperti kewujudan gen promoter, tapak pelekatan ribosom, tapak pelekatan protein selular, signal terminasi transkripsi dan juga signal bagi penambahan 3' poli(A). LTR juga mempunyai elemen-elemen yang menyerupai perangsang di dalam sel eukariotik di mana molekul ini berfungsi untuk meningkatkan transkripsi gen-gen berdekatan. Ia berfungsi dengan merangsang permulaan proses transkripsi pada promoter dan bagi membolehkan molekul perangsang ini berfungsi ia mestilah terletak pada molekul DNA yang sama dengan gen yang ingin dirangsang. Aktiviti molekul perangsang tidak bergantung pada kekutuban susunan gen perangsang, bermaksud bahawa ia boleh terletak sama ada sebelum atau selepas gen yang ingin dirangsang dan pada mana-mana bentuk orientasi (Doerfler dan Bohm, 1993).

RUJUKAN

- Bruce, A. V. 2002. *The Biology of Viruses*. 2nd Edition. McGraw Hill, New York.
- Cooper, G. M. & Hausman, R. E. 2004. *The Cell A Molecular Approach*. 3rd Edition. Washington D. C.
- Doerfler, W. & Bohm, P. (eds) 1993. *Virus Strategies, Molecular Biology & Pathogenesis*. VCH, Germany, ms. 115-125
- Gifford, R., Tristem, M. 2003. *The Evolution, Distribution & Diversity of Endogenous Retroviruses*. Kluwer Academic Publishers, Netherland, ms. 291-315
- Hart, D., Frerichs, G. N., Rambaut, A. & Onions, D. E. 1996. Complete Nucleotide Sequence & Transcriptional Analysis of the Snakehead Fish Retrovirus. *J. Virology* 70:3606-3616.
- Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M. & Veres, R. C. 2004. *Genetics From Genes to Genomes*. 2nd Edition. McGraw-Hill, United States of America.
- Herniou, E., Martin, J., Miller, K., Cook, J., Wilkinson, M. & Tristem, M. 1998. Retroviral Diversity & Distribution in Vertebrates. *J. Virology* 72:5955-5966.
- Holzschu, D. L., Martineou, D., Fodor, S. K., V. M. V., Bowser, P. R. & Casey, J. M. 1995. Nucleotide Sequence & Protein Analysis of a Complex Piscine Retrovirus Walleye Dermal Sarcoma Virus. *J. Virology* 72:5320-5331.

- Kambol, R. 2003. *Distribution & Evolution of Endogenous Retroviruses Within Amphibian & Piscine Host*, Unpublished PhD. Thesis. Department of Biological Science, Imperial College London, United Kingdom.
- Kambol, R., Kabat, P. & Tristem, M. 2003. Complete Nucleotide Sequence of Endogenous Retrovirus From the Amphibian, *Xenopus laevis*. *J. Virology* **311**:1-6.
- Kambol, R. 2004. *Xenopus* Endogenous Retrovirus (XEN) Posseses A Relatively Complex Retrovirus Sequence In Its Genome. *J. of Science and Technology* **17**: 11-33.
- Kambol, R. & Tristem, M. 2005. The Diversity and Distribution of Piscine Endogenous Retrovirus in Piscine Host. *Proc. of the 6th National Congress on Genetics. Beyond Genome: Harnessing the Potential*. 12-14 May 2005, Kuala Lumpur.
- Kambol, R. 2006. The Distribution of Piscine Endogenous Retrovirus in Malaysian Freshwater Fish. *Proc. of the 4th Genome to System Conference*. 22-24 March 2006, Manchester International Conference Centre. Manchester, United Kingdom.
- Kambol, R. 2007. *Pengklonan dan Penjujukan DNA Beberapa Fragmen Retrovirus Endogenous daripada Ikan Marin Sabah*. Laporan Akhir Penyelidikan Fundamental UMS Kod Projek B-103-01-ER/U103. Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu.
- Karp, G. 2002. *Cell & Molecular Biology*. 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- LaPierre, L. A., Holzschu D. L., Bowser, P. R., & Casey, J. W. 1999. Sequence & Transcriptional Analyses of the Fish Retroviruses Walleye Epidermal Hyperplasia Virus Types 1 & 2: Evidence for Gene Duplication. *J. Virology* **73**:9393-9403.

- Levi, Jay A., Frankel-Conrat, Heinz, & Owens, Robert A. 1994. *Virology*. 3rd Edition. Prentice Hall, United States of America, ms. 125- 143
- Lewin, B. 2004. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, ms. 493- 498
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganism*. 10th Edition. Pearson Education, Inc., United States of America.
- Martin, J., Herniou, E., Cook, J., O'Neill, R. W. & Tristem, M. 1999. Interclass Transmission & Phyletic Host Tracking in Murine Leukemia Virus-related Retroviruses. *J. Virology* 73:2442-2449.
- Meyers, R. A. 1995. *Molecular Biology & Biotechnology A Comprehensive Desk References*. Wiley-VCH Inc, Canada.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W. 1997. *Synthesis, Assembly & Processing of Viral Proteins*. J. M. Coffin, S. H. Hughes & H. E. Varmus (eds.) *In Retrovirus*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ms. 263-334
- Teich, N. 1984. *Taxonomy of Retroviruses*. Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. E. & Coffin, J. (eds) *In Molecular Biology of Tumor Viruses*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. 2000. *Virus Taxonomy: The Classification & Nomenclature of*

Viruses. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego.

Vogt, V. M. 1997. *Retrovirus Virions & Genomes*. Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (eds) *In Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ms. 27-69