

Sistem Minigenom Virus Penyakit Newcastle (NDV) AF2240 Sebagai Sistem Pengekspresan Gen Sel Mamalia (Minigenome System for Newcastle Disease Virus (NDV) AF2240 as a Gene Expression System for Mammalian Cells)

SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN*, ROSLINA SHAMSUDIN, NURUL ATIKAH AHMAD & ZULKIFLIE ZAMROD

ABSTRAK

Sistem minigenom telah digunakan untuk mengkaji replikasi dan transkripsi virus RNA tidak bersegmen. Objektif kajian ini adalah untuk membina sistem minigenom bagi virus NDV strain tempatan, AF2240 serta bagi mengkaji mekanisme transkripsi dan replikasi virus ini. Bagi tujuan ini lima plasmid digunakan iaitu pMGNDV, pCITENP, pCITEP, pTriEX-T7, dan pGEML. Kesemua plasmid diekstrak secara berskala besar dan dimendakkan menggunakan polietilena glikol. Hasil ekstrak ini digunakan untuk transfeksi ke dalam sel. Translasi in vitro dilakukan dengan menggunakan pCITENP, pCITEP, dan pTriEX-T7 untuk memastikan kesemua konstruk ini berfungsi. Hasil pemblotan western menunjukkan protein bersaiz ~100 kDa (T7), ~53 kDa (NP), ~53 dan 55 kDa (P) berjaya diekspreskan. Protein CAT diperoleh apabila plasmid yang mengekodkan minigenom NDV ditransfeksi bersama plasmid yang mengekodkan protein nukleokapsid (NP), fosfoprotein (P) dan subunit besar polimerase (L) ke dalam sel BHK-21. Dianggarkan 55 pg protein CAT berjaya diperoleh menggunakan kit CAT ELISA. Hasil pemblotan western turut menunjukkan protein CAT bersaiz 25 kDa dihasilkan. Kesimpulannya, sistem minigenom ini berupaya untuk berfungsi dan mampu mengekspreskan gen asing di dalam sel mamalia BHK-21.

Kata kunci: Pengekspresan gen; sistem minigenom; sistem pengepresan sel mamalia; transfeksi; virus penyakit Newcastle

ABSTRACT

The minigenome system has been used as a model for studying transcription and replication for nonsegmented RNA viruses. The objective of this study was to develop a minigenome system for NDV local strain AF2240 and also to study the mechanism of replication and transcription of this virus. For this purpose, five recombinant plasmids; pMGNDV, pCITENP, pCITEP, pTriEX-T7 and pGEML were used. Transfection of all plasmids was carried out following large scale extraction and polyethylene glycol precipitation of plasmids. In vitro translational was performed by using pCITENP, pCITEP and pTriEX-T7 to ensure the constructs are functional. Western blot analysis showed that protein with approximate molecular weights of 100 kDa (T7), 53 kDa (NP), 53 and 55 kDa (P) was successfully detected. CAT protein was detected when plasmid encoding the NDV minigenome was cotransfected into BHK-21 cells with plasmid encoding nucleocapsid (NP), phosphoprotein (P) and large polymerase subunit (L) protein. Approximately, 55 pg CAT protein was successfully quantified by CAT ELISA. Western blot analysis also showed that the CAT protein with the size of 25 kDa was successfully obtained. In conclusion, this study showed that the system was functional and able to express foreign gene in mammalian cells BHK-21.

Keywords: Gene expression; mammalian cell expression system; minigenome system; Newcastle disease virus; transfection

PENGENALAN

Penyakit Newcastle (NDV) yang disebabkan oleh virus boleh menyebabkan kejatuhan ekonomi yang teruk dalam industri penternakan ayam di serata dunia. Ia terjadi di kebanyakan negara dan menyebabkan kesan yang buruk kepada penghasilan ternakan secara komersial (Spradbrow 1988). Di Malaysia, penyakit Newcastle dikenali sebagai penyakit sampar ayam. Agen penyebab penyakit ini ialah virus penyakit Newcastle (NDV). NDV AF2240 merupakan strain tempatan yang dipencil pada tahun 1996 di Institut Penyelidikan Veterinar, Ipoh (Kho et al. 2000).

NDV tergolong dalam famili *Paramyxoviridae* dan dikelaskan dalam genus *Avulavirus* (Marcos et al. 2005; Mayo 2002). Secara amnya, strain NDV dikelaskan mengikut tahap kepatogennya terhadap ayam; lentogenik; mesogenik dan velogenik (Alexander 1997; Seal et al. 2000). Lentogenik yang dipencilkan jarang menyebabkan penyakit pada ayam dewasa dan kurang virulen. Virus pertengahan virulen dan menyebabkan penyakit pernafasan dikenali sebagai mesogenik manakala virus virulen yang menyebabkan bilangan kematian yang tinggi dikenali sebagai velogenik (Seal et al. 2000). NDV

AF2240 tergolong dalam kumpulan velogenik. NDV AF2240 mempunyai genom RNA bebenang negatif yang terdiri daripada 15192 bes nukleotida dan mengekodkan enam struktur protein iaitu nukleokapsid (NP), protein fosfo (P), matriks (M), fusion (F), haemagglutinin-neuraminidase (HN) dan protein major (L) (de Leeuw & Peeters 1999; Mayo 2002; Steward et al. 1993). Dua protein tambahan (V dan W) dihasilkan daripada pengeditan RNA semasa transkripsi gen P (Locke et al. 2000; Peeters et al. 2004; Steward et al. 1993).

NDV bebenang negatif yang tidak bersegmen mempunyai struktur genom serta mekanisme transkripsi dan replikasi yang sama. Salah satu ciri menarik bagi RNA bebenang negatif ialah genom RNA virus sahaja tidak mampu menginfeksi kerana salinan RNANYA (genom atau antigenom) tidak boleh digunakan sebagai mRNA untuk terus mensintesis protein virus. Ini berbeza dengan virus RNA bebenang positif seperti retrovirus dan virus DNA di mana genom atau salinan perantara replikasinya boleh memulakan infeksi tanpa kehadiran virus protein lain (Garcia-Sastre 1998). Kompleks ribonukleoprotein (RNP) yang terdiri daripada protein NP, P, dan L memainkan peranan penting untuk memulakan sintesis RNA dan akhirnya membenarkan replikasi berlaku. Kompleks ini merupakan templat aktif bagi transkripsi dan replikasi genom virus (Peeters et al. 2000).

Meskipun banyak sistem minigenom telah dibina seperti pembinaan sistem minigenom virus NDV daripada angsa, namun kajian spesifik terhadap strain ini masih belum dilakukan (Zhang et al. 2005). Hasil penjujukan menunjukkan kawasan pengekor NDV AF2240 hanya mempunyai 70% identiti berbanding strain NDV lain. Perbezaan ini mungkin menyumbang kepada ciri yang unik bagi strain ini memandangkan kawasan pengekor terlibat dalam replikasi virus (promoter antigenom). NDV AF2240 dipilih sebagai bahan kajian kerana ia merupakan strain paling virulen dan sering menyebabkan 100% mortaliti terhadap ayam yang dijangkiti (Lai 1985). Sel yang dipilih untuk pengekspresan gen NDV AF2240 dalam kajian ini adalah sel mamalia BHK-21 daripada tisu ginjal anak hamster. Selain daripada itu, kajian lanjut boleh dilakukan ke atas sel mamalia lain seperti sel stem yang telah dipencilkan daripada darah periferi mencit (Intan Zarina et al. 2008, 2010; Muhammad Dain et al. 2010; Shahrul Hisham et al. 2010) dan manusia (Nurul Atikah et al. 2011; Ruzanna et al. 2011). Objektif utama kajian ini adalah untuk menghasilkan sistem pengekspresan gen bagi sel mamalia untuk kajian seterusnya seperti kajian penghasilan vaksin rekombinan atau menggantikan sistem retrovirus yang terdapat secara komersial. Antara kajian yang boleh dijalankan ialah kajian transfeksi gen Oct4 (faktor transkripsi 4 pengikat oktamer), gen Sox2 (gen SRY-kawasan kotak 2), KLF4 (faktor transkripsi 4 keluarga kruppel 4) dan cMyc dalam program semula sel somatik kepada sel stem melalui penghasilan titisan sel iPSC (*Induced Pluripotent Stem Cell*) (Rodríguez-Piza et al. 2009).

BAHAN DAN KAEDAH

PENGEKSTRAKAN PLASMID BERSKALA BESAR

Plasmid yang diperoleh ditransform dalam sel kompeten dan dikultur dalam agar LB yang mengandungi 50 µg/mL ampisilin. Koloni tunggal plasmid yang hendak diekstrak secara berskala besar diinokulasi ke dalam 5 mL kaldu LB yang mengandungi 50 µg/mL ampisilin. Kultur dibiarkan semalaman dengan goncangan pada 220 rpm dengan suhu 37°C. Sebanyak 125 µL kultur yang telah disahkan membawa plasmid rekombinan yang betul dimasukkan ke dalam 12.5 mL medium LB dengan 50 µg/mL ampisilin dan dieram pada suhu 37°C selama 8 jam dengan goncangan pada 250 rpm (Shel Lab). Kemudian hasil kultur ini sekali lagi dipindahkan ke dalam 250 mL medium LB berampisilin lalu dieram semalaman.

Pengekstrakan DNA plasmid dilakukan secara kaedah lisis beralkali. Sebanyak 250 mL kultur dipindahkan ke dalam tiub GSA dan diempar pada kelajuan 5000 g selama 5 minit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet diampai dalam 18 mL larutan I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glukos, pH 8.0) sejuk. Lisozim (≥4 unit/µL) ditambah sebanyak 2 mL dan dibiarkan pada suhu bilik selama 10 minit. Seterusnya, 40 mL larutan II NaOH/SDS (0.2M NaOH, 1% (w/v) SDS) yang disediakan segar ditambah ke dalam tiub dan dicampurkan dengan menterbalikkan tiub 4-5 kali sebelum dieram dalam ais. Campuran ini direndam dalam ais sehingga menjadi jernih. Sebanyak 20 mL larutan III (3M kalium, 5M asetat) sejuk dimasukkan dan campuran ditebalikkan 4-5 kali. Tiub dibiarkan dalam ais selama 15 min. Selepas itu, campuran diempar pada kelajuan 2700 g selama 15 min pada suhu 4°C.

Supernatan yang terhasil dipindahkan ke tiub pengumpul yang baru dan ditambah dengan 6 isipadu 100% (v/v) isopropanol serta dibiarkan pada suhu bilik selama 10 min. Campuran ini kemudian diempar pada kelajuan 20000 g selama 10 min. Pelet yang diperoleh dikeringkan dan dilarutkan dalam 3 mL TE (pH8). Larutan dipindah ke tiub khas bagi rotor Sorvall SS34 dan 3 mL 70-80% etanol sejuk ditambah. Setelah dibiarkan selama 5 min dalam ais, campuran diempar sekali lagi pada suhu 4°C dengan kelajuan 20000 g selama 10 min. Supernatan yang diperoleh dipindah ke tiub pengempar yang baru. Sebanyak satu isipadu 100% (v/v) isopropanol ditambah dan diempar pada kelajuan dan masa yang sama.

Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam 500 µL penimbal TE pH 8 dan dipindahkan ke tiub 1.5 mL. Sebanyak 1 µL RNase (2.1 unit) ditambah dan tiub dieram pada suhu bilik selama 30 minit. Kemudian 500 µL penimbal 5 ditambah dan tiub diempar pada suhu 4°C dengan kelajuan 12000 g selama 10 minit. Pelet sekali lagi dilarutkan dalam 400 µL penimbal TE. Penulenan DNA dengan fenol dilakukan dengan menambah fenol-kloroform-isoamilalkohol (25:24:1) yang ditambahkan

pada isipadu yang sama dengan supernatan. Seterusnya tiub divorteks seketika sebelum diempar pada kelajuan 13000 g selama 2 min. Fasa akueus dipindahkan ke tiub baru dan kloroform-isoamilalkohol (24:1) ditambah pada isipadu yang sama, divorteks serta diempar pada kelajuan yang sama selama 5 min.

Fasa akueus ini kemudian dipindahkan ke tiub baru dan sebanyak 0.1 isipadu 3M Natrium Asetat pH5.5 serta dua isipadu 100% (v/v) etanol sejuk ditambah ke dalam fasa akueus tadi. Campuran ini kemudiannya divorteks seketika dan dimasukkan ke dalam -20°C semalaman. Selepas itu, pengemparan dilakukan pada suhu 4°C, 15000 g selama 20 min. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 1 mL 70% etanol, divorteks dan diempar pada kelajuan 13000 g selama 5 min. Seterusnya supernatan dibuang dan pelet dibiarkan kering sebelum dilarutkan dengan 1000 µL air suling steril. Elektroforesis gel agaros 1% (w/v) dijalankan untuk menentukan kualiti dan kepekatan DNA. Plasmid yang tulen berada dalam julat ketumpatan optik 260/230 antara 1.32 hingga 2.29 dan julat ketumpatan optik 260/280 antara 1.52-1.74.

PENYEDIAAN SEL BHK-21 UNTUK TRANSFEKSI

Sel BHK-21 dikultur di dalam flask T25 dalam medium DMEM yang mengandungi 10% (v/v) FBS. Flask yang mengandungi medium dan serum dieram dalam kebuk pengeraman CO₂ (Forma Scientific) pada suhu 37°C sehingga mencapai konfluensi 90-100% konfluensi. Medium DMEM dikeluarkan dan sel yang telah mencapai konfluensi 90-100% dibilas dengan PBS 1X pH 7.2 sebanyak 3 kali. Proses tripsinasi dilakukan untuk menanggalkan lapisan sel daripada permukaan flask dengan menggunakan Accutase (ICT, USA). Setelah kesemua sel ditanggalkan dari permukaan flask, medium tersebut dipindahkan ke dalam tiub lalu diempar dengan kelajuan 200 g selama 5 min. Pelet sel dilarutkan semula dalam 5 mL medium kultur (DMEM, 10% (v/v) FBS). Sampel yang telah dilarutkan kemudian dikira jumlah sel dalam sampel tersebut dengan menggunakan haemasitometer. Sebanyak 3.5×10^5 sel dimasukkan ke dalam plat enam telaga yang mengandungi 3 mL medium kultur. Sel dieram semalaman pada suhu 37°C sebelum digunakan untuk proses transfeksi.

TRANSFEKSI

Transfeksi dilakukan ke atas sel BHK-21 yang mencapai konfluensi 90%. Setiap telaga dimasukkan sebanyak 1 µg pTriEX-T7, 2 µg pCITENP, 1 µg pCITEP, 0.4 µg pGEM1 dan 1-5 µg plasmid minigenom (pMGNDV). Plasmid yang bakal digunakan dicairkan dengan 250 µL Opti-MEM®1. Sebanyak 10 µL kompleks lipofectamine 2000 (Invitrogen) ditambah dengan 250 µL OptiMEM. Kedua-dua campuran dibiarkan pada suhu bilik selama 20 min. Kompleks DNA-lipid ini dimasukkan ke dalam sel dan dieram pada suhu 37°C selama 4-6 jam. Selepas tempoh pengeraman yang dinyatakan, sel tersebut boleh digantikan dengan medium

kultur atau dibiarkan dengan medium transfeksi. Sel tersebut perlu dieram selama 48-72 jam sebelum analisis pengekspresan CAT boleh dilakukan.

PENGEKSPRESAN GEN DARIPADA SEL BHK-21

Sel tertransfeksi yang telah dieram selama 48-72 jam dicuci dengan larutan PBS sejuk sebanyak 5 kali. Sebanyak 500 µL Cell Lytic M (Sigma, USA) dimasukkan ke dalam sel yang telah dibilas. Sel tersebut dibiarkan pada suhu bilik selama 20 min dengan penggoncangan secara perlahan. Sel yang telah tertanggal ini dikumpulkan dalam tiub eppendorf 1.5 mL dan diempar pada suhu 4°C dengan kelajuan 12000 g selama 15 min. Kemudian supernatan dipindahkan ke dalam tiub 1.5 mL baru yang disejukkan terlebih dahulu. Tiub ini disimpan dalam -80°C sehingga digunakan untuk analisis protein.

PENENTUAN PROTEIN DENGAN KAEDAH ASID BISIKONINIK

Kaedah asid bisikoninik (BCA) (Smith et al. 1985) digunakan untuk menentukan kepekatan protein dalam sampel. Reagen yang digunakan adalah campuran larutan asid bisikoninik dan kuprum (II) sulfat dengan nisbah 100 kepada 2 bahagian. Campuran ini menghasilkan larutan yang berwarna hijau. Sampel sebanyak 100 µL (10 µL sampel ditambah dengan 90 µL air suling) dimasukkan ke dalam 2 mL reagen hijau yang telah disediakan untuk membaca dan menentukan kepekatan sampel pada gelombang 562 nm dengan spectrometer Biophotometer (Eppendorf, Jerman). Campuran tindak balas dieram selama 30 minit pada suhu 37°C. Kepekatan sampel protein ditentukan dari lengkung piawai yang telah disediakan. Julat kepekatan lengkung piawai ialah 0 µg hingga 100 µg protein BCA dengan penyerapan pada 562 nm.

PENGUJIAN TITER SERA MELALUI IMUNOASAI ENZIM Kloramfenikol Asetiltransferase

Pengasaan aktiviti kloramfenikol asetiltransferase (CAT) dilakukan dengan menggunakan kit imunoasai enzim CAT (CAT ELISA) (Roche, USA) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 150 ng protein bagi setiap sampel dimasukkan ke dalam setiap plat telaga mikro. Plat ini kemudiannya dieram pada suhu 37 °C selama 2 jam. Selepas pengeraman, sampel dikeluarkan dan dibilas dengan penimbal pembasuh sebanyak 5 kali. Sebanyak 200 µL anti-CAT-digoxigenin (anti-CAT-DIG) dimasukkan dan plat dieram semula selama 1 jam. Plat telaga mikro diulangi cucian dengan penimbal pembasuh sebanyak 5 kali. Setelah itu, 200 µL antibodi kepada digoksigenin yang berkonjugasi dengan peroksidase (anti-DIG-POD) ditambah dan plat dieram semula selama 1 jam lagi. Langkah cucian sebanyak 5 kali diulangi setelah plat dikeluarkan. Kemudian 200 µL substrat POD ditambah kepada setiap telaga dan dieram selama 30 minit. Bacaan penyerapan pada jarak gelombang 405 nm diambil dengan menggunakan MRX Microtiterplate

Reader (Dynex Technologies, USA). Kepekatan sampel protein diperoleh berasaskan graf piawai yang dibina melalui beberapa siri pencairan enzim CAT.

PEMBLOTAN WESTERN

Pemblotan western dilakukan berdasarkan kaedah Towbin et al. (1979). Protein yang diasingkan melalui SDS-PAGE diblotkan ke atas membran nitroselulosa dengan menggunakan sistem EC-140 Miniblot (E-C Apparatus Corporation, USA). Pemblotan dijalankan pada 120 mA selama 90 min. Selepas pemblotan, membran dieram dalam 5% (w/v) susu skim semalaman pada 4°C.

Membran seterusnya dibasuh dengan PBS selama 5 min sebanyak lima kali. Membran dieram dalam 5% (w/v) susu skim yang mengandungi antibodi anti-CAT-DIG (pencairan 1:1000) pada suhu bilik selama 1 jam. Kemudian, membran dibasuh dengan PBS selama 5 min sebanyak 5 kali lagi sebelum reagen pengesan ECL daripada kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA) disebar padanya. Membran didedahkan kepada filem X-ray (Kodak, USA) dalam bilik gelap selama 15 minit atau dibiarkan semalaman.

Selepas itu, filem dikeluarkan dari bilik gelap dan direndam dalam larutan pembentuk (Kodak, USA) dengan goncangan selama 1 min. Ini diikuti dengan pembasuhan dengan air suling selama 1 min dan seterusnya filem dipindahkan ke dalam larutan penetap (Kodak, USA) selama 1 min. Filem dibasuh dengan air suling selama 1 min dan dibiarkan kering.

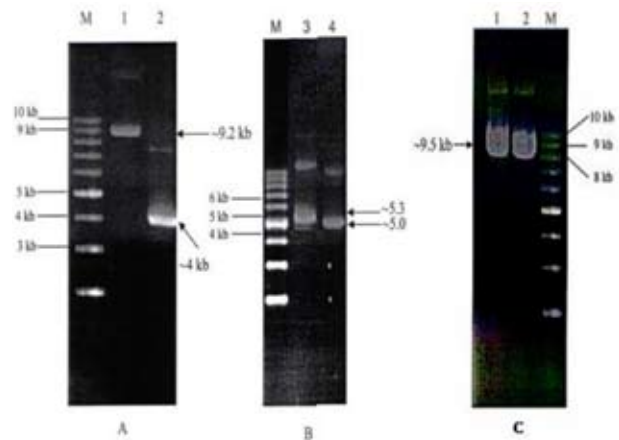
HASIL DAN PERBINCANGAN

PENYEDIAAN PLASMID BERSKALA BESAR

Plasmid yang digunakan dalam sistem genetik berbalik diekstrak secara berskala besar. Plasmid DNA yang telah dilisis seterusnya ditulenkan dengan menggunakan kaedah polietilena glikol (*polyethylene glycol*, PEG). Pemendakan menggunakan PEG berbeza dengan penulenan menggunakan kolum kromatografi atau ultra-pengemparan dalam kecerunan CsCl-etidium bromida. Kaedah ini tidak mengasingkan molekul bulatan tertakik dan molekul bulatan tertutup dengan efisien. Kedua kaedah tersebut lebih sesuai untuk plasmid yang bersaiz besar (>15 kb). Walau bagaimanapun, plasmid DNA yang dimendakan menggunakan PEG/MgCl₂ sesuai untuk semua tindak balas enzim yang kerap digunakan dalam pengklonan molekul termasuk penjujukan DNA dan boleh digunakan dalam transfeksi ke atas sel mamalia dengan lebih berkesan (Lis 1980).

Saiz plasmid yang diperoleh adalah mempunyai saiz sebenar plasmid rekombinan iaitu pMGNDV, pCITENP, pCITEP, pGEML dan pTriEX-T7 (Rajah 1). Jumlah keseluruhan plasmid yang telah disediakan adalah di antara 270 hingga 650 µg. Tiada kontaminasi RNA dalam semua sediaan plasmid kerana tiada lumuran RNA yang dikesan pada hujung lorong gel. Nisbah A_{260}/A_{280} sediaan plasmid

mempunyai bacaan di antara 1.61-2.29 menunjukkan kontaminasi protein dalam sediaan plasmid adalah rendah.



RAJAH 1. Hasil pemencilan plasmid skala besar. Hasil elektroforesis gel agarosa 1% (w/v) ke atas pemencilan plasmid berskala besar. (A) Hasil pemencilan plasmid pTriEX-T7 dan pMGNDV. Telaga M: penanda supergegelung (Promega); 1: pTriEX-T7; 2: pMGNDV. (B) Hasil pemencilan plasmid pCITENP dan pCITEP. Telaga 3: pCITENP; 4: pCITEP; M: penanda supergegelung (Promega). (C) telaga 1-2: Hasil pemencilan plasmid pGEML

TRANSFEKSI KOMPONEN SISTEM GENETIK BERBALIK KE ATAS SEL BHK-21

Analisis transkripsi sistem minigenom genetik berbalik ini dilakukan dengan menggunakan sel BHK-21. Sebanyak enam set transfeksi yang masing-masing berbeza dari jenis plasmid yang ditransfeksi dijalankan dalam plat enam telaga (SPL Life Science) bagi menguji kebolehan sistem ini berfungsi (Jadual 1). Plasmid pTriEX-T7, pCITENP, pCITEP, pGEML dan pMGNDV ditransfeksi ke dalam sel vero. Konstruksi minigenom yang digunakan ini mematuhi peraturan enam seperti yang dicadangkan oleh Halphin et al. (2004).

Kajian ke atas minigenom menunjukkan replikasi virus NDV bergantung kepada peraturan enam (Peeters et al. 2000). Terdapat enam gen utama dalam urutan 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' yang mengkodkan sekurang-kurangnya lapan protein. Enam daripadanya merupakan protein struktur iaitu NP, P, M, F, HN dan L (Lamb & Kolakofsky 1996; Yusoff & Tan 2001) manakala dua lagi merupakan protein bukan struktur iaitu V dan W. Protein V dan W ini terhasil semasa pengeditan transkripsi mRNA gen P (Locke et al. 2000; Peeters et al. 2004; Steward et al. 1993). Gen ini diapit oleh jujukan kawasan 3' pemimpin (Kurilla 1985) dan 5' pengekor (Krishnamurthy & Samal 1998).

Protein diekstrak selepas 48-72 jam transfeksi dilakukan. Ujian ELISA dilakukan ke atas sampel protein yang diekstrak untuk menguji sama ada sistem ini berfungsi. Transfeksi dilakukan ke atas sel yang mencapai kurang daripada 70% konfluensi. Hasil kajian mendapati konfluensi sel BHK-21 menurun sebanyak 40-70% lagi

JADUAL 1. Set transfeksi yang digunakan untuk menguji hasil transkripsi sistem minigenom NDV AF2240 dan kepekatan protein yang terhasil.

Set	MG	T7	NP	P	L	Kepekatan Protein	Protein CAT
Transfeksi 1	✓	✓	✓	✓	✓	365 µg/mL	+
Transfeksi 2	–	✓	✓	✓	✓	–	–
Transfeksi 3	✓	–	✓	✓	✓	–	–
Transfeksi 4	✓	✓	–	✓	✓	–	–
Transfeksi 5	✓	✓	✓	–	✓	–	–
Transfeksi 6	✓	✓	✓	✓	–	–	–

MG: pMGNDV; T7: pTriEX-T7; N: pCITENP; P: pCITEP dan L: pGEML. Tanda (✓) menunjukkan kehadiran plasmid manakala tanda (–) menunjukkan ketiadaan plasmid. Simbol (+) menunjukkan kehadiran protein CAT.

dalam tempoh 24 jam transfeksi dilakukan. Selepas 24 jam, kultur kawalan tanpa transfeksi (kultur dalam media lengkap) meningkat dengan purata peningkatan sebanyak 80% (n=4). Penurunan tahap konfluensi sel ini mungkin disebabkan oleh penyerapan plasmid yang ditransfeksi ke dalam sel. Ini mengakibatkan sesetengah sel mengalami kerosakan seterusnya mengakibatkan kematian sel. Kajian lain turut mendapati sel yang ditransfeksi boleh mencapai konfluensi dalam tempoh 48-70 jam setelah menjalani penurunan selepas 24 jam transfeksi (Halphin et al. 2004; Peeters et al. 2000; Peeples & Coolins 2000).

Dalam kajian ini, kesemua plasmid yang ditransfeksi adalah di bawah kawalan gen polimerase RNA T7 kecuali pTriEX-T7. Plasmid tersebut tidak mempunyai promoter bagi pengekspressan di dalam sel mamalia. Ini bertujuan bagi memastikan bahawa pengekspressan plasmid tersebut hanya dikawal oleh polimerase RNA T7 yang terhasil daripada pengekspressan plasmid pTriEX-T7. Plasmid ini mempunyai promoter CMV yang bertindak sebagai promoter pengekspressan dalam sel mamalia. Plasmid ini berperanan sebagai sumber utama polimerase RNA T7 yang mengekspreskan gen NP, P dan L NDV masing-masing daripada plasmid pCITENP, pCITEP dan pGEML. Pengekspressan polimerase RNA T7 dan transkripsi gen NP, P dan L serta minigenom NDV berlaku dalam sitoplasma sel. Oleh itu, sel yang telah mencapai konfluensi 95-100% diekstrak dan ujian ELISA dilakukan ke atas ekstrak protein.

PENGASAIAAN KLORAMFENIKOL ASETILTRANSFERASE

Penentuan kepekatan protein dilakukan dengan kaedah asid bisikoninik (BCA). Hasil kajian mendapati kepekatan protein yang diperolehi daripada satu telaga pada plat enam telaga ialah di antara 0.4-1.5 µg/µL dalam isipadu 500 µL. Protein sel BHK-21 yang diekstrak seterusnya digunakan dalam ujian ELISA untuk menentukan kehadiran protein CAT dalam hasil kajian. Didapati protein CAT hanya dapat dikesan pada Transfeksi 1 (Jadual 1). Protein CAT tidak dapat dikesan pada hasil pengekstrakan protein daripada set Transfeksi 2-6. Keputusan ini menunjukkan bahawa sistem genetik berbalik yang dibangunkan adalah berfungsi. Sistem genetik berbalik merupakan sistem sintetik yang menjalankan proses transkripsi dan translasi virus RNA

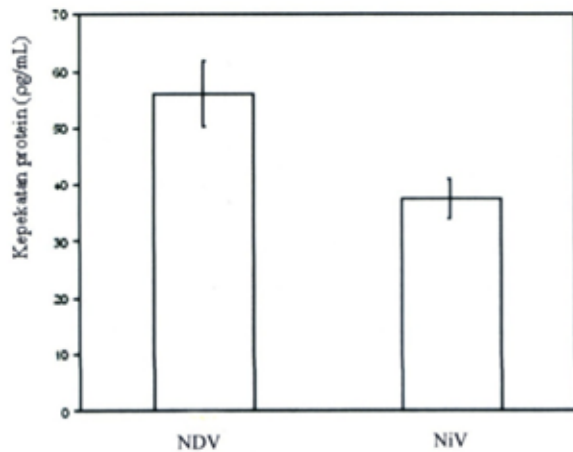
bebenang negatif secara *in vitro* di dalam sel mamalia. Dalam kajian ini, genom RNA membentuk kompleks ribonukleoprotein dengan penglibatan 3 gen virus iaitu NP, P dan L. Ketiga-tiga gen ini merupakan komponen minimum yang diperlukan bagi sistem genetik berbalik dan dikawal oleh polimerase RNA T7.

Dalam kajian ini, Transfeksi 2 dan 3 merupakan kawalan negatif. Transfeksi 2 dilakukan di mana konstruk minigenom NDV yang mengandungi gen CAT tidak ditransfeksi ke dalam sel BHK-21 bersama plasmid lain. Oleh itu, pada Transfeksi 2, protein CAT tidak dapat dikesan. Ini menunjukkan bahawa gen CAT hanya hadir dalam konstruk minigenom dan tidak terdapat pada mana-mana plasmid lain yang digunakan. Transfeksi 3 dilakukan tanpa mentransfeksi plasmid pTriEX-T7 ke dalam sel. Plasmid ini membawa jujukan polimerase RNA T7 yang bertanggungjawab untuk mengekspreskan polimerase RNA T7.

Plasmid pTriEX-T7 merupakan satu-satunya plasmid yang dikawal oleh promoter CMV iaitu promoter konstitutif bagi pengekspressan di dalam sistem mamalia. Plasmid ini merupakan sumber polimerase RNA T7 utama dalam sel BHK-21 untuk mengekspreskan plasmid pCITENP, pCITEP dan pGEML bagi menghasilkan protein masing-masing. Selain itu, ia juga bertanggungjawab memainkan peranan dalam proses transkripsi peringkat awal RNA minigenom yang di bawa oleh plasmid pMGNDV yang berada di bawah kawalan promoter T7. Ketiadaan plasmid pTriEX-T7 menyebabkan kesemua plasmid tersebut tidak dapat ditranskripsi dan mengekspreskan protein masing-masing seterusnya menyebabkan protein CAT tidak dapat diekspreskan.

Transfeksi 4, 5 dan 6 tidak menghasilkan protein CAT kerana gen N, P dan L merupakan komponen utama yang diperlukan dalam proses replikasi dan transkripsi virus RNA bebenang negatif. Ketiadaan salah satu komponen ini mengakibatkan kegagalan virus untuk melakukan proses transkripsi dan replikasi seperti yang dinyatakan oleh Howley et al. (1999) dalam kajian beliau ke atas virus *Measles*.

Ketiadaan gen N mengakibatkan konstruk minigenom yang telah ditranskripsi pada peringkat awal oleh polimerase RNA T7 tidak dapat mengkapsidasi. Plasmid pCITENP bertanggungjawab dalam menghasilkan protein



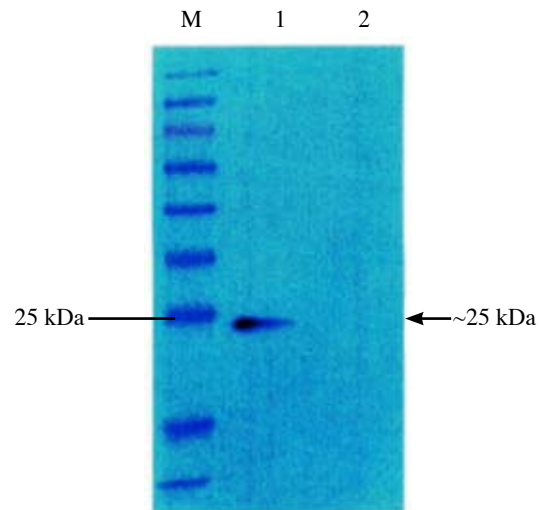
RAJAH 2. Pengekspresan protein CAT. Rajah menunjukkan pengekspressan protein CAT daripada dua eksperimen berbeza dengan duplikat. Sel ditransfeksi dengan plasmid yang membawa T7, MG, NP, P dan L. Lisat sel disediakan selepas 72 jam transfeksi. Kepekatan CAT dalam sitoplasma sel diukur dengan CAT ELISA (Roche). Data yang diperolehi merupakan purata \pm sisihan piawai (bar pada graf). NDV: Virus Penyakit Newcastle; NiV: Virus Nipah

N dalam sel BHK-21 di bawah pengawalan polimerase RNA T7. Gen N bertanggungjawab melakukan enkapsidasi terhadap genom virus RNA bebenang tunggal negatif untuk membentuk kompleks ribonukleoprotein (RNP) (Howley et al. 1999; Khattar et al. 2001). Ketiadaan gen ini menyebabkan konstruk minigenom tidak dapat menghasilkan kompleks RNP.

Dalam Transfeksi 5, kehadiran plasmid pCITENP yang menghasilkan protein N masih gagal melakukan pengekspressan protein CAT di dalam sel BHK-21. Ini kerana proses enkapsidasi perlu dibantu oleh polimerase virus yang dihasilkan oleh gen L dan P NDV. Menurut Kim et al. (2002), produk gen P memainkan peranan sebagai subunit virus. Oleh itu, ketiadaan plasmid pCITEP yang menghasilkan protein P menyebabkan proses transkripsi dan replikasi tidak dapat dilakukan dengan lengkap. Ini mengakibatkan pengekspressan protein CAT dihalang.

Kehadiran protein CAT turut gagal dikesan dalam Transfeksi 6. Ini disebabkan oleh ketiadaan gen L yang menghasilkan protein polimerase L yang berfungsi sebagai polimerase virus. Dalam sistem genetik berbalik, gen L dan P merupakan komponen utama polimerase yang akan melakukan transkripsi gen CAT dan replikasi minigenom virus (De et al. 2000). Dalam kajian ke atas HPIV3, protein L itu sendiri tidak berupaya untuk menambat pada templat N-RNA untuk memulakan sintesis RNA. Penambatan protein L pada templat N-RNA hanya akan berlaku dengan cekap setelah membentuk kompleks L-P (De & Benerjee 1984).

Terdapat beberapa faktor yang penting bagi mentranskripsi dan replikasi NDV. Peters et al. (1999) telah melaporkan bahawa NDV NP, P dan L adalah perlu dan mencukupi bagi transkripsi dan replikasi virus ini secara efisien seperti para mixovirus yang lain kecuali RSV. Analisis nukleokapsid SeV (genus Respirovirus)



RAJAH 3. Hasil pembloatan western minigenom NDV. Hasil pembloatan western ekstrak sel bagi menentukan kehadiran protein CAT. Telaga M: penanda protein 'Precision Plus' dwi-warna (BioRad, USA); 1: pMGNDV; 2: kawalan negatif (tanpa gen L)

melalui mikroskop elektron menunjukkan bahawa subunit NP berhubung secara tepat dengan enam nukleotida RNA genom (Egelman et al. 1989). Kajian ke atas minigenom SeV ini dan partikel DI menjurus kepada penemuan replikasi virus RNA yang efisien, panjang nukleotida RNA mestilah boleh dibahagi enam dan ia merupakan satu keperluan yang dikenali sebagai peraturan enam (Calain & Roux 1993).

Kajian ini juga dilakukan dengan membezakan hasil pengekspressan protein CAT antara NDV dan NiV (Virus Nipah) bagi memastikan sistem genetik berbalik NDV yang dibangunkan ini berfungsi. Berdasarkan lengkung piawai yang dibina, didapati 55 μ g enzim CAT diperolehi daripada NDV manakala 37 μ g protein CAT diperolehi daripada NiV (Rajah 2). Sampel dianalisa menggunakan gel SDS-PAGE 12% tetapi jalur yang jelas tidak kelihatan disebabkan oleh kepekatan sampel yang rendah. Hasil analisis pembloatan western mengesahkan bahawa protein yang diperolehi ialah protein CAT (Rajah 3).

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, satu konstruk minigenom yang berfungsi dan bersaiz 1172 pb telah berjaya dibina. Sistem yang dibina ini melibatkan lima komponen utama iaitu minigenom NDV, plasmid yang membawa gen NP, P, L dan polimerase RNA T7. Hasil kajian menunjukkan bahawa plasmid rekombinan yang dibina berjaya menghasilkan protein CAT apabila ditransfeksi ke dalam sel mamalia BHK-21. Kehadiran protein CAT bersaiz 25 kDa ini sekaligus membuktikan bahawa plasmid rekombinan L yang digunakan adalah berfungsi. Kejayaan pembangunan sistem minigenom NDV AF2240 ini berguna untuk kajian seterusnya iaitu penghasilan vaksin rekombinan baru terhadap penyakit Newcastle di Malaysia.

PENGHARGAAN

Segulung penghargaan dirakamkan atas dana penyelidikan UKM-OUP-KPB-33-17012010 dan 09-05-MGI-GMB002.

RUJUKAN

- Alexander, D.J. 1997. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections Dlm. Calnek, B.W (pnyt). *Disease of poultry*. Ed. Ke-10. Ames: Iowa State University Press.
- Calain, P. & Roux, L. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *Journal of Virology* 67: 4822-4830.
- De, B.P. & Benerjee, A.K. 1984. Specific interaction of Vesicular Stomatitis virus L and NS protein with heterologous genome ribonucleoprotein template lead to mRNA synthesis *in vitro*. *Journal of Virology* 51: 628-634.
- De, B.P., Hoffman, M.A., Choudhary, S., Huntley, C.C. & Benerjee, A.K. 2000. Role of NH₂- and COOH- terminal domains of the P protein of human parainfluenza virus type 3 in transcription and replication. *Journal of Virology* 74: 5886-5895.
- de Leeuw, O. & Peeters, B. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *Journal of General Virology* 80: 131-136.
- Egelman, E.H., Wu, S.S., Amrein, M., Portner, A. & Murti, G. 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *Journal of Virology* 63: 2233-2243.
- Garcia-Sastre, A., Gabezas, J.A. & Villar, E. 1998. Protein of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochemical et Biophysica Acta* 999: 171-175.
- Halpin, K., Bankamp, B., Harcourt, B.H., Bellini, W.J. & Rota, P.A. 2004. Nipah virus confirms to the rule of six in a minigenome replication assay. *Journal of General Virology* 81: 1927-1932.
- Howley, P.M., La Font, B., Daniele, K., Billeter, M.A. & Dailien, R. 1999. A functional Measles virus replication and transcription machinery encoded by the Vaccinia virus genome. *Journal of Virological Methods* 79: 65-74.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Sahidan, S. & Zaidah, Z.A. 2008. Osteoclast and osteoblast development of *Mus musculus* haemopoietic Mononucleated Cells. *Journal of Biological Science* 8(3): 506-516.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Zaidah, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2010. Keupayaan pembezaan tiga jenis sel primitif daripada hasil pembezaan tempoh proliferasi darah mencit. *Sains Malaysiana* 39(2): 305-313.
- Khattar, S.K., Yunus, A.S., Collins, P.L. & Samal, S.K. 2001. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of Bovine Respiratory Syncytial virus that affect transcriptional, RNA replication and interaction with the nucleoprotein. *Virology* 285: 253-269.
- Kho, C.L., Mohd Azmi, M.L., Arshad, S.S. & Yusoff, K. 2000. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *Journal of Virological Methods* 86: 71-83.
- Kim, G.N., Choi, W.Y., Parks, M. & Kang, C.Y. 2002. Replication and transcription of viral RNAs by recombinant L proteins of New Jersey serotype of Vesicular Stomatitis virus. *Virus Research* 90: 347-364.
- Krishnamurthy, S. & Samal, S.K. 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic region of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *Journal of General Virology* 79: 2419-2424.
- Kurilla, M.G., Stone, H.O. & Keene, J.D. 1985. RNA sequence and transcriptional properties of the 3' end of the Newcastle disease virus genome. *Virology* 145: 203-212.
- Lai, C.H. 1985. A study of velogenic vicerotropic Newcastle disease virus *in vitro* and *in vivo*. Disertasi Ph.D, Universiti Pertanian Malaysia. (tidak diterbitkan)
- Lamb, R.A. & Kolakofsky, D. 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Dlm. *Field Virology*, Fields B.N. et al. Ed. Ke-3. Philadelphia: Lippincott-Raven Press.
- Lis, J.T. 1980. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods in Enzymology* 65: 347-353.
- Locke, D.P., Sellers, H.S., Crawford, J.M., Schultz-Cherry, A., King, D.J., Meinersmann, R.J. & Seal, B.S. 2000. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cell. *Virus Research* 69: 55-68.
- Marcos, F., Ferreira, L., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, T., Garcia-Sastre, A. & Villar, E. 2005. Mapping of the RNA promoter of Newcastle disease virus. *Virology* 331: 369-406.
- Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology* 147(8): 1655-1663.
- Muhammad Dain, Y., Shahrul Hisham, Z.A., Sahidan, S., Mohammad Abdul Razak & Rohaya, M.A.W. 2010. determination of the differentiation capacities of murine primary mononucleated Cells and MC-3T3 Cells. *Cancer Cell International* 10(42): 1-12.
- Nurul Atikah, A., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Mohamad Abdul Razak & Sahidan, S. 2011. Kesan β-gliserofosfat terhadap ampaian sel mononukleus daripada darah periferi manusia. *Sains Malaysiana* 40(6): 613-621.
- Peebles, M.E. & Collins, P.L. 2000. Mutations in the 5' trailer region of a respiratory syncytial virus minigenome which limit RNA replication to one step. *Journal of Virology* 74: 146-155.
- Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology* 73(6): 5001-5009.
- Peeters, B.P., Gruijthuisen, Y.K., de Leeuw, O.S. & Gielkens, A.L., 2000. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule of six. *Archives of Virology* 145: 1829-1845.
- Peeters, P., Verbruggen, P., Nelissen, F. & de Leeuw, O. 2004. The P gene of Newcastle disease virus does not encode an accessory X protein. *Journal of General Virology* 85: 2375-2378.
- Rodríguez-Pizà, I., Richaud-Patin, Y., Vassena, R., González, F., Barrero, M.J., Veiga, A., Raya, A. & Belmonte, J.C.I. 2009. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free condition. *Stem Cells* 28(1): 36-44.
- Ruzanna, A.K., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Sahidan, S. & Fahrul Zaman, H. 2011. Differentiation potential of human suspension mononucleated peripheral blood cells. *African Journal of Biotechnology* 10(52):10756-10764.
- Shahrul Hisham, Z.A., Intan Zarina, Z.A., Muhammad Dain, Y., Rohaya, M.A.W. 2010. Differentiation analyses of adult

- suspension mononucleated peripheral blood cell of *Mus musculus*. *Cell Communication and Signalling* 8(29):1-7.
- Seal, B.S., King, D.J. & Sellers, H.S. 2000. The avian response to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 24: 257-268.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Groeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Spradbrow, P.B., Samuel, J.L. & Ibrahim, L. 1988. Serological response of chickens to oral vaccination with Newcastle disease virus. *Veterinary Microbiology* 16: 255-262.
- Steward, M., Vipond, I.B., Millar, N.S. & Emmerson, P.T., 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *Journal of General Virology* 74: 2539-2547.
- Towbin, H., Staehelin, J. & Gordon, J. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some application. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 74: 4350-4354.
- Yusoff, K. & Tan, W.S. 2001. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* 30: 439-455.
- Zhang, Y.M., Liu, Y.L., Huang, Y., Jia, L.J. & Liu, X.F. 2005. Construction of minigenome of Newcastle disease virus of goose origin and its preliminary application. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45(1): 72-76.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor D.E., Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@cgat.ukm.my

Diserahkan: 7 Jun 2011
Diterima : 19 September 2011