



Şükrü TONBAK
Hasan ABAYLI

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 14.06.2016
Kabul Tarihi : 27.06.2016

Yazışma Adresi
Correspondence

Hasan ABAYLI
Fırat Üniversitesi, Veteriner
Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

habayli@firat.edu.tr

ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2016; 30 (3): 217 - 220
<http://www.fusabil.org>

Bovine Ephemeral Fever Virüsün Rekombinant G Proteininin İmmunoperoksidaz Metodu ile Belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı, bovine ephemeral fever virusun (BEFV) rekombinant glikoproteini (G) ile transfekte hücrelerin immunoperoksidaz (IP) yöntemi ile belirlenmesidir. Bu amaçla, BEFV G genini bulunduran rekombinant pcDNA4/HisMax (pcDNA4-G) vektörü Vero hücrelerine transfekte edilmiştir. Daha sonra, BEFV için spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen IP yöntemi ile G proteininin açıklatılmasının hücresel lokalizasyonu belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları IP yönteminin transfeksiyonun ve açıklatılmanın görüntülenmesi için ucuz, hızlı ve uygun bir yöntem olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Bovine ephemeral fever virüs, transfeksiyon, immunoperoksidaz

Detection of Recombinant G Proteins of Bovine Ephemeral Fever Virus by Immunoperoxidase Method

The aim of this study was detection of the cells that transfected with recombinant glycoproteins (G) of bovine ephemeral fever virus (BEFV) by immunoperoxidase (IP) method. For this aim, the recombinant vector pcDNA4/HisMax (pcDNA4-G) including BEFV G gene was transfected into Vero cells. Immunoperoxidase (IP) method was used to investigate the intracellular localization of G protein expression using the specific monoclonal antibody for BEFV G protein. According to our results, the IP method is affordable, rapid and suitable detection method for screening of transfections and expression.

Key Words: Bovine ephemeral fever virus, transfection, immunoperoxidase

Giriş

Üç gün hastalığı olarak da isimlendirilen bovine ephemeral fever hastalığı (BEF), sığırlar başta olmak üzere, bazı ruminant türünde görülen vektör kaynaklı akut bir hastalıktır. Hastalığın etkeni olan virus (Bovine ephemeral fever virus; BEFV) *Rhabdoviridae* virus ailesinin *Ephemerovirus* genusunda yer alır (1).

Bu virüs diğer memeli Rhabdovirusları ile benzer yapısal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Virüs yapısında tek iplikli, negatif anlamlı ve 14.900 baz uzunluğunda RNA genom mevcuttur. Viral genom tarafından beş yapısal protein kodlanmaktadır. Bunlar; nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks protein (M), glikoprotein (G), and large (L) proteinleridir. Bu yapısal proteinlere ilave olarak, viral genom tarafından yapısal olmayan proteinler de kodlanmaktadır (1-3).

Ülkemizde BEF ilk olarak 1985 yılında bildirilmiştir (4). Son yıllarda ülkemizde 2-4 yıl aralıklar ile BEF epidemileri bildirilmektedir (5-7). Özellikle verimli ırkların ülkemizde sayısındaki artışlara ve global iklim değişikliklerine paralel olarak bu hastalığın etkisi son yıllarda daha da hissedilir olmuştur. Türkiye’de bildirilen son iki BEF salgınları 2008 ve 2012 yıllarında rapor edilmiştir (6, 7). BEF 2008 olguları Türkiye’nin Suriye, Irak ve İran sınırına yakın Güney-Doğu bölgelerinde nispeten lokal salgınlar olarak kaydedilmiştir (8). Ancak, 2012 olguları bu bölgelere ilave olarak, Akdeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu ile birlikte Marmara, Ege ve Batı Karadeniz bölgesinin bazı illerinde de bildirilmiştir (6).

BEFV’nin yapısal proteinlerinden biri olan G proteini virüsün biyolojisinde esansiyeldir. BEFV G proteinleri virüs bağlanma aktivitesinin yanı sıra bu proteine karşı oluşan antikorların nötralizan olması bakımından oldukça önemlidir (9, 10). Bu nedenle BEFV’e karşı gerek koruyucu gerekse aşı amaçlı çalışmalarda öncelikli hedef G proteinidir. Viral etkenlere karşı tanısal test kitlelerinin geliştirilmesinde ve korunmada kullanılan viral proteinlerin *in vitro* sistemde fazla ve saf olarak üretilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada BEFV G proteininin *in vitro* olarak rekombinant teknolojiyle üretim aşamalarının en önemli adımlarından biri olan transfeksiyonun ve hücre protein açıklatılmasının gösterilmesine yönelik immunoperoksidaz yönteminin kullanımı amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): BEFV 2012 izolatında G geninin amplifikasyonu daha önceki çalışmaya göre gerçekleştirildi (6). Bu işlem sonucunda yaklaşık 1870 baz çifti uzunluğunda BEFV G geni amplifiye edildi.

Klonlama: Amplifiye G geninin protein açıklama vektörüne (pcDNA-4/HisMax-TOPO Vector) klonlanması daha önceki yayımlanan çalışmada modifikasyonlarla gerçekleştirildi (11). Kısaca, %1'lik agarozda yürütülen G geni PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Co, ABD) kullanılarak pürifiye edildi. Jelden pürifiye edilen G geninin vektöre yerleştirilmesinde ilk adım olarak ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla 1 µL plazmid vektör üzerine 2 µL pürifiye G geni, 3 µL dH₂O ve 1 µL salt solüsyonu ilave edildi ve karışım oda ısısında 5 dk inkübe edilerek rekombinant pcDNA4-G vektörü oluşturuldu. Transformasyon işlemi için 50 µL TOP10 kompeten hücre üzerine 6 µL ligasyon ürünü bırakıldı. Bu karışım buz üzerinde 30 dk bekletildi ve sonrasında önceden 42°C'e ayarlanmış su banyosu içerisine daldırılıp 90 sn tutularak rekombinant vektörlerin bakteri hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Bu süre sonunda karışım tekrar buz üzerine alındı. Karışım üzerine 400 µL antibiyotiksiz sıvı besi yeri (LB Medium) ilave edildi. Bu karışım 37°C'de 90 dk karıştırıcı üzerinde bekletildi. Bu süreyi takiben karışımın 100 µL'si antibiyotikli (Ampisillin 60 µg/µL) petri içindeki katı besi yerine (LB Agar) ekildi. Petri 15-16 saat 37°C'de inkübe edildi ve petride bakteriyel koloniler belirlendi.

Glikoprotein genini ihtiva ettiği PCR ile doğrulanan rekombinant vektörlerin (pcDNA4-G) bulunduğu transforme hücreler 15 mL'lik falcon tüp içerisinde 10 mL antibiyotikli (Ampisillin 60 µg/mL) sıvı besi yerine ekildi ve bir gece üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreyen rekombinant vektörlerin bulunduğu kompeten hücrelerden rekombinant plazmid DNA'sı ticari kit (PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit, Promega Co, ABD) kullanılarak elde edildi.

Transfeksiyon: Bu çalışmada transfeksiyon işlemleri Vero E6 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerle gerçekleştirilen zeosin (Invitrogen Co, ABD) duyarlılık testinde zeosin miktarının (60 µg/mL) 3. günden sonra hücrelerin büyük kısmını, 5. günden sonra ise tamamını öldürdüğü belirlendi. Bu nedenle BEFV G geni ile transfekte Vero E6 hücrelerinde seleksiyon amacıyla 60 µg/mL oranında zeosin kullanılmasına karar verildi.

Top-10 kompeten hücre içerisinde çoğaltılan ve PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit kullanılarak saf olarak elde edilen plazmid DNA'sı Nano-Drop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Lipofectamine 2000 kullanılarak Vero E6 hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon aşamasında ürün içerisindeki kullanım talimatı uygulandı (Invitrogen Co, ABD).

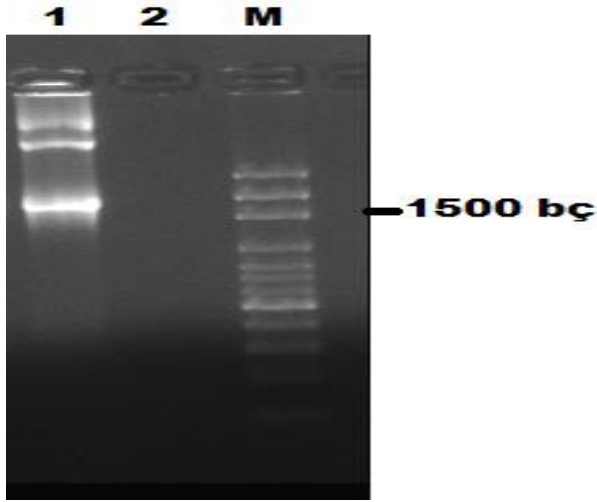
Bu aşamadan sonra her vasat değişiminde hücre kültür kaplarına 60 µg/mL zeosin içeren hücre kültür vasatı konuldu. Yirmibir gün bu işlem devam ettirildi. Bu işlem sonunda antibiyotiğe duyarlı olan normal hücrelerin öldüğü tersine mikroskopta gözlemlenir iken, transfekte olmuş ve zeosin dirençli geni (Rekombinant geni) taşıyan hücrelerin çoğalmaya devam ettiği görüldü.

İmmunoperoksidaz: İmmunoperoksidaz deneyi 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilen rekombinant vektörle transfekte edilen ve 21 gün 60 µg/mL zeosin ile seçilen Vero hücreleri ile kontrol Vero hücrelerinde gerçekleştirildi. Yöntem daha önceden tarif edilen yöntemden modifikasyonlarla gerçekleştirildi (12). Kısaca, 6 kuyucuklu kaplarda tek tabaka oluşturduktan sonra hücrelere önce fiksatif solüsyonu olarak %2 paraformaldehit ve %0.1 Triton X-100 ihtiva eden PBS eklendi ve hücreler bu solüsyonla 30 dakika muamele edilerek fikse edildi. Endojen peroksidaz ithimaline karşı hücreler %3 H₂O₂ ile bir saat muamele edildi. Daha sonra bu hücrelere, bloklama amacıyla, %5 bovine serum albumin eklendi ve 2 saat inkübasyon gerçekleştirildi. PBS ile yıkamaları takiben transfekte ve kontrol hücre kuyucuklarına PBS içinde 1/50 sullandırılan BEFV G proteini spesifik monoklonal antikor ilave edildi. Bu antikorlar BEFV antikor ELISA kitinde temin edildi (EMAI, Camden NSW, Avustralya). Oda ısısında 2 saat inkübasyon gerçekleştirildi. En az 10 kez PBS ile yıkamalar tekrarlandı. Kuyucuklara PBS içinde 1/1000 sullandırılan peroksidaz enzimi ile de işaretli tavşan anti-mouse IgG (Sigma Co, Almanya) eklendi ve inkübasyon tekrarlandı. Inkübasyonu takiben hücreler yine en az 10 defa PBS ile yıkandı. Yıkanan hücreler, karanlık ortamda kromojen solüsyonuyla (Diaminobenzidin 6 mg, 0.05 M Tris pH 7.6 10 mL, %3 H₂O₂ 1 mL) 15 dak. reaksiyona sokuldu. Hücreler, hematoksilin-eozin ile boyama ve etanolla yıkamayı takiben, mikroskopik olarak incelendi ve hücrelerin mikrografları alındı.

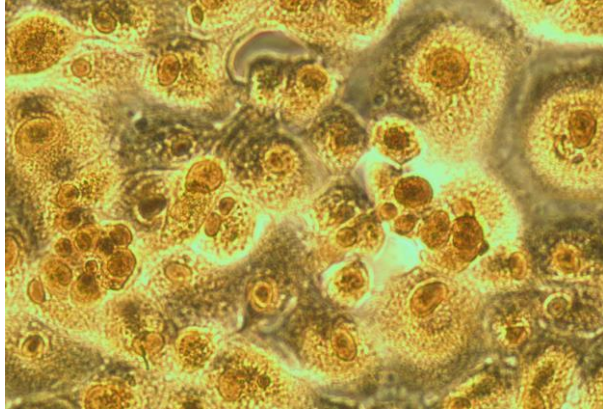
Bulgular

Rekombinant pcDNA4-G ile transfekte Vero hücrelerinde G geninin varlığı PCR taraması ile doğrulandı (Şekil 1, Hat 1). Aynı çalışmada transfekte edilmeyen Vero hücrelerinde gerçekleştirilen PCR'da ise her hangi bir amplifikasyon belirlenmedi (Şekil 1, Hat 2).

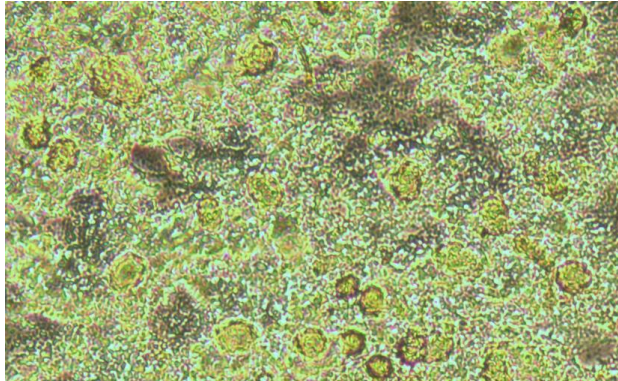
Rekombinant pcDNA4-G ile transfekte edilen ve 21 gün 60 µg/mL zeosin içeren hücre kültür vasatında tutulan Vero hücrelerinde hazırlanan preparatlarla gerçekleştirilen IP yöntemi neticesinde tüm hücrelerde kromojene özgü kahverengi boyamalar yoğun olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Kontrol Vero hücrelerinde gerçekleştirilen IP yönteminde ise kromojen boyamaların olmadığı görüntülenmiştir (Şekil 3).



Şekil 1. Rekombinant pcDNA4-G vektörle transfekte Vero ve kontrol Vero hücrelerinde elde edilen DNA örneklerinde G genlerinin varlığının PCR taraması ile doğrulanması. Hat 1; Transfekte Vero hücre örneği, Hat 2; Kontrol Vero hücre örneği, M; DNA ağırlık markeri.



Şekil 2. Rekombinant plazmid vektörle (pcDNA4-G) transfekte Vero hücrelerinde BEFV G spesifik monoklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilen IP deneyi (40 X).



Şekil 3. Transfeksiyonu yapılmamış kontrol Vero hücrelerinde BEFV G spesifik monoklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilen IP deneyi (100 X).

Tartışma

Virüslerin biyolojik olarak esansiyel proteinlerini içeren rekombinant vektörlerin oluşturulması veya bu proteinlerin saf olarak elde edilmesi teşhis ve koruma amaçlı oldukça önemlidir. Gerek ELISA geliştirilmesi gerekse DNA immunizasyonu amacıyla BEFV G genlerini hedef alan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların büyük bir kısmında G geni ve proteini hedef alınmıştır (10, 13-15). Mevcut çalışmada, öncelikle, BEFV virüsün G proteini açıklayan rekombinant vektör oluşturulmuştur. Daha sonraki adımda ise bu rekombinant vektörün transfeksiyonunun ve açıklanmasının gösterimi IP yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisinde üç temel adım bulunmaktadır (16-19). Bunlar rekombinant vektörün oluşturulması, oluşturulan bu rekombinant vektörün istenilen sistemlerde açıklanması ve açıklanan proteinlerin saf olarak elde edilmesidir. Birçok çalışmada ökaryotik veya prokaryotik sistemde açıklanma aşamalarının gösterimi hücre lizat veya üst sıvılarından elde edilen proteinlerin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforesis SDS-PAGE ve Western blotlama ile görüntülenmesiyle gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE ve Western blotlama yöntemi özellikle bant büyüklüğü düzeyinde sonuç vermesi ve açıklanan proteinin istenilen büyüklükte açıklanıp, açıklanmadığını belirlemesi nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedir (16, 17). Bu nedenle, bizler de SDS-PAGE ve Western blotlamayı özellikle protein üretiminin görüntülenmesinin son aşamasında kullanımını önermekteyiz. Ancak, IP gibi tek adımda gerçekleştirilen, uygulanması kolay ve ucuz bir yöntemle deneyin ilk aşamalarında ekspresyonun test edilmesi özellikle ekspresyonun olmaması durumunda uzun ve masraflı süreci engellemesi bakımından önemli olacağını düşünmekteyiz.

Immunoperoksidazla birlikte yaygın kullanımı olan diğer bir immunohistokimyasal deteksiyon yöntemi de immunofluoresans (IF) yöntemidir. Rekombinant vektörle transfekte hücrelerin gösterilmesi amacıyla IF yöntemi de kullanılabilir (20, 21). Ancak, IF yönteminde pahalı bir ekipman olan floresans mikroskoba ihtiyaç duyulması en önemli dezavantajdır. IP metodunda ise görüntülenme normal bir invert mikroskopa yapılabilir.

Mevcut çalışmanın devamı neticesinde saf olarak üretilen proteinlerin ELISA testi başta olmak üzere diğer tanısal testlerde kullanımı potansiyeli mevcuttur. Ayrıca, üretilen proteinlerin güvenli yeni nesil subunit viral aşı olarak kullanımı mümkündür. Bu kullanımlarına ilave olarak, saf proteinler özellikle monoklonal antikor üretilmesinde iyi birer aday antijenler olacaklardır.

Mevcut çalışmada rekombinant vektörle transfekte hücrelerde transfeksiyonun ve protein açıklanmasının başarısı IP yöntemi ile tek adımda belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları IP yönteminin transfeksiyonun ve açıklanmasının görüntülenmesi için ucuz, hızlı ve uygun bir yöntem olduğunu gösterdi.

Kaynaklar

1. Nandi S, Negi BS. Bovine ephemeral fever: A review. *Comp Immunol Microb* 1999; 22: 81-91.
2. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang YH. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 67-74.
3. Walker PJ, Wang Y, Cowley JA, McWilliam SM, Prehaud CJ. Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1889-1899.
4. Girgin H, Yonguç AD, Akçora A, Aksak A. Türkiye'de ilk bovine ephemeral fever salgını. *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi* 1986; 5: 5-14.
5. Tonbak Ş, Berber E, Çabalar M. Türkiye'nin bazı bölgelerinde 2008 yılında görülen bovine ephemeral fever virüs enfeksiyonlarının polimeraz zincir reaksiyonuyla belirlenmesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 2013; 27: 35-37.
6. Tonbak S, Berber E, Yoruk MD, et al. A large-scale outbreak of bovine ephemeral fever in Turkey, 2012. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 1511-4.
7. Oğuzoğlu TC, Ertürk A, Cizmeci SG, Koç BT, Akça Y. A report on bovine ephemeral fever virus in Turkey: Antigenic variations of different strains of EFV in the 1985 and 2012 outbreaks using partial glycoprotein gene sequences. *Transbound Emerg Dis* 2015; 62, e66-70.
8. Aziz-Boaron O, Klausner Z, Hasoksuz M, et al. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East--strong evidence for transmission by winds and animal transport. *Vet Microbiol* 2012; 158: 300-307.
9. Kato T, Aizawa M, Takayoshi K, et al. Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia. *Vet Microbiol* 2009; 137: 217-223.
10. Hertig C, Pye AD, Hyatt AD, et al. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not G (NS) glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. *J Gen Virol* 1996; 77: 631-640.
11. Özdarendeli A, Tonbak Ş, Azkur AK, ve ark. Sığır vebası virüsü rbok aşısı suşu nükleoprotein ve matriks geninin invitro transkripsiyonu. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 2003; 17: 77-80.
12. Bulut H, Bolat Y, Özdarendeli A, Doymaz MZ, Gürhan SI. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus antijenlerinin lokalizasyonunun immunoperoksidaz boyama ile gösterimi. *Tr J Vet Anim Sic* 1998; 22: 267-271.
13. Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, et al. Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G1 expressed in *Pichia pastoris*. *Vet J* 2010; 185: 211-215.
14. Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, et al. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. *Res Vet Sci* 2009; 87: 211-212.
15. Uren MF, Walker PJ, Zakrzewski H, St George TD, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine* 1994; 12: 845-850.
16. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, New York: Cold Spring Harbor, 2012.
17. Patten CL, Glick BR, Pasternak J. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington, D.C: ASM Press, 2009.
18. Brown T. *Gene Cloning and DNA analysis: An introduction*. Cambridge, MA: Blackwell Pub, 2006.
19. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan childhood hepatoma study group. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336: 1855-1859.
20. Pironcheva GL, Russev G. Immunofluorescent study after transient transfection of myoblast cells with the plasmid PSV40-beta-globin. *Cytobios* 1996; 86: 243-6.
21. Christiane R, Christian P, Bianca T, et al. Development of a recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay for the determination of autoantibodies against soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *Clin Dev Immunol* 2013; 24: 7-12.