

SIĞIR VEBASI VIRUSU RBOK AŞI SUŞU MATRİKS GENİNİN AÇIKLANMASI*

Ahmet Kürşat AZKUR¹

Mehmet Ziya DOYMAZ²

Yusuf BOLAT¹

¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.10.2002

Expression of Matrix Gene of Rinderpest Virus (RPV) RBOK Vaccine Strain

Summary

The aim of this study was to investigate expression of matrix (M) gene of RBOK vaccine strain of rinderpest virus (RPV) in eucaryotic cell. The M gene was cloned into TOPO XL cloning vector. The recombinant plasmid was cut with *EcoRI* and *SalI* enzymes to obtain the M gene. Then, the M gene was transferred into pCI-neo mammalian expression vector. So, the resulting recombinant plasmid was named as pCI-neo Matrix. Afterwards, the pCI-neo Matrix vector was transiently transfected into Vero cells. The presence of the Matrix proteins was showed by Western Immunoblotting Assay demonstrating that Vero cells expressed a 38 kDa protein reacting with anti-M antibody.

Key Words: Rinderpest, matrix gene, protein expression

Özet

Bu çalışmanın amacı sığır vebası (SV) virusu RBOK aşı suşı matriks (M) geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılmasıdır. Matriks geni pTOPO XL klonlama vektöründe klonlandı. Elde edilen plasmid *EcoRI* ve *SalI* enzimleriyle kesilerek M geni pCI-neo açıklama vektörüne yerleştirildi. pCI-neo Matrix vektöründe M geninin varlığını teyit etmek amacıyla PZR-T ve enzim kesim deneyleri yapıldı. Oluşturulan rekombinant plazmid, pCI-neo Matrix vektörü olarak adlandırıldı. Sonrasında, rekombinant pCI-neo Matrix plazmidi Vero hücrelerine geçici olarak transfecte edildi. Matriks proteinin varlığı Vestern immunoblotlama ile gösterilerek Vero hücrelerinin anti-M antikoruya reaksiyonuna giren 38 kDa'luk bir proteini açıkladığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Sığır vebası, matriks geni, protein açıklaması

Giriş

Sığır vebası (SV) virusu Doğu Afrika, Ortadoğu ve Güney Asya başta olmak üzere dünyanın birçok yerinde, evcil ve vahşi gevş getirenlerde ekonomik yönden büyük kayıplara sebep olmaktadır (2,21). Dünya Gıda Örgütü (DGÖ) tarafından 2010 yılına kadar hastalığın eradikasyonu için çalışmalar planlamıştır. Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Yeni Zellanda ve Avustralya'da görülmemesine rağmen hastalık bu ülkelerde tehdit etmektedir. Herhangi bir salgının ise bugüne kadar yapılan tüm çabaları boş bırakacağı aşikardır (8). Sığır vebası hastalığının etkeni Mononegavirales süper ailesinin, *Paramyxoviridae* ailesi Morbillivirus cinsi içerisinde yer alan SV virusudur. Sığır vebası virusu RBOK aşı suşı 15882 nükleotid uzunluğunda negatif anlamlı RNA virusudur. Diğer morbillivirüslerde olduğu gibi üst üste gelmeyen (non-overlapping) 6 gen bölgesi vardır. Bu genler 3' N-P-M-F-H-L 5' şeklinde dizilmiştir (7,14).

Hastalığın morbiditesi %100 mortalitesi ise yüksek virülense sahip viruslarla infekte olan duyarlı hayvanlarda %100'dür. Akut veya subakut seyredebilen hastalık, 42°C'ye varan yüksek ateş, dış etleri, dil ve yanaka şiddetli doku kayıpları, gözyaşı akıntısı, kanlı ishal ve lökopeni ile karakterizedir (2,7,9,16,20,21).

Sığır vebası virusu RBOK aşı suşı ile aşılanan hayvanlarda M proteinine karşı gelişen CD4+ T hücre cevabının, virusun nükleoprotein (NP), füzyon (F), hemaglutinin (H) proteinlerine karşı gelişen CD4+ T hücre cevabı ile aynı seviyede olduğu bildirilmiştir (16). Bu gibi sebeplerden dolayı SV virusu M geninin infekte hayvanların bağımlılık sisteminde, patojenitesinde biyolojisinde oynadığı rolün daha iyi anlaşılmasına için çalışmalar devam etmektedir (1,9,16).

Rekombinant DNA teknolojisi gen üzerinde yapılmak istenilen müdahaleleri kolaylaştırarak, bir çok

* Bu çalışma, doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜBAP (Proje No: 615) tarafından desteklenmiştir.

genin yapısal ve fonksiyonel özelliğinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Aynı zamanda istenilen miktarda ve farklı özelliklere sahip proteinlerin üretilmesine de olanak vermiştir (3,4,5,6).

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi kullanarak, SV RBOK aşısı suşu M geni kodlama yapan bölgesinin pCI-neo ökaryotik plazmidinde klonlanmasından sonra hücre kültüründe geçici olarak M proteininin açıklatılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre: Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero), %10 fotal sığır serumu (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.), 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da üretildi.

Virus: Çalışmada virus olarak Etlik Araştırma Enstitüsünden temin edilen hücre kültürüne adapte SV virusu RBOK aşısı suşu kullanıldı (15,17).

Toplam RNA İzolasyonu: Yirmibeş cm²'lik hücre kültür kabının yaklaşık %60-70'i Vero hücreleri ile kaplandıktan sonra, Vero hücreleri SV RBOK aşısı suşu adsorbsiyona bağlı metoda göre inokule edildi (17). İnokulasyonun 5. gününde hücrelerin yaklaşık %80'inde sitopatik etki (CPE) olduğu dönemde toplam RNA TRI-Reagent (Sigma) kullanılarak yapıldı.

Tersine Transkripsiyon (TT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Primerler oluşturulurken gen bankası X76186 SV RBOK aşısı suşu M geninin protein kodlama bölgesi göz önünde tutuldu. Primer 1, *EcoRI* kesim enzim bölgesi 5'-ggg aat tcc cac cat ggc aga aat t -3' (P1) dizilimini, primer 2 ise *Sall* ve *HindIII* kesim enzim bölgesini ve 5'-gga agc ttc cgt cga ccc tta cag gac ctt-3' (P2) dizilimini içerecek biçimde oluşturuldu (13,22).

Tersine transkripsiyon için, SV virusu RBOK aşısı suşu ile infekte edilmiş Vero hücrelerinden elde edilen toplam RNA kalıp olarak kullanıldı. Tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ile kopya DNA (cDNA)'lar elde edildi. Her bir örnekte 2 µl cDNA, 2 µl 10 pmol P1-P2 primer, 4 µl 1,25 mM dNTP (Promega), 5 µl 25 mM MgCl₂ (Promega), 5 µl 10X PCR buffer (Promega), 1 µl 2 U Taq DNA polimeraz (Promega) ve 31 µl dH₂O kullanıldığı 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 95°C'da 2 dk ön ısıtmayı takiben, 95°C'da 1 dk, 55°C'da 1 dk, 72°C'da 3 dk, 35 döngü ve 72°C'da 8 dk son uzatma ile sonlandırılan PZR programı uygulandı ve ürünler elektroforez işlemi 150 volt (V) akımda 40 dakika yapıldı. PZR ürünleri agaroz jelde ultraviole (UV) ışık kaynağından bakılarak belirlendi (18,12, 22).

Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidinin oluşturulması: Rekombinant pTOPO XL Matriks ve pCI-neo (Promega) plazmid DNA'ları *EcoRI* ve *Sall* kesim enzimleri ile kesildi. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmid DNA'sından çıkarılan M geni ve pCI-neo plazmidi agaroz jelende saflaştırıldı. Aynı yapışkan uçlara sahip olan 0.5 µl içerisinde yaklaşık 100 ng pCI-Neo ve 1 µl içerisinde yaklaşık 200 ng M geni, bakteriyofaj T4 DNA ligaz (MBI Fermentas) yardımı ile 16°C'de 17 saat ve +4°C'de bir gün bekletilerek ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında rubidyum klorid (RbCl) metoduna göre hazırlanan *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetan DH5α hücrelerine ligasyon ürünlerinin transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon işlemi için karışım 30 dk buzlu su içerisinde bekletildi. Buradan alınan hücreler 42°C'de ki su banyosunda 2 dk tutuldu ve ardından tekrar buzlu su içerisinde 80 saniye bekletildi. Rekombinant pCI-Neo Matrix plazmidlerinin seçimi öncelikle, PZR tarama (PZR-T) metodu ile yapıldı. Bu deneye pozitif olarak bulunan kolonilerin plazmid DNA'ları alkali lizis metoduyla elde edildi ve enzim kesim deneyleri uygulandı (11,22).

Rekombinant pCI-neo Matrix plazmid DNA'sının Vero hücrelerine transfeksiyonu: Vero hücrelerine, pCI-neo ve rekombinant pCI-neo Matrix plazmid DNA'ları Transfast™ Transfection Reagent (Promega) kullanılarak geçici olarak transfekte edildi. 18 µl transfast ve 6 µg plazmid DNA'sı içeren 30 µl solüsyon 1.5 ml'lik mikrosanritüp tüpüne konuldu ve vortekslendikten sonra oda ısısında 15 dk bekletildi. Bu arada %80'i Vero hücreleriyle kaplı 25 cm² lik hücre üretme kabındaki vasat boşaltılarak hücreler steril fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS) ile iki kez yıkandı. DNA-transfast karışımı 1 ml vasat içerisinde hücre üretme kabına ilave edildi ve 37°C'ye tekrar kaldırıldı. Yaklaşık 1 saat sonra 3.5 ml vasat ve 0.5 ml fotal sığır serumu ilave edilen hücre üretme kabı 37°C'deki etüvde 3 gün inkübe edildi (19).

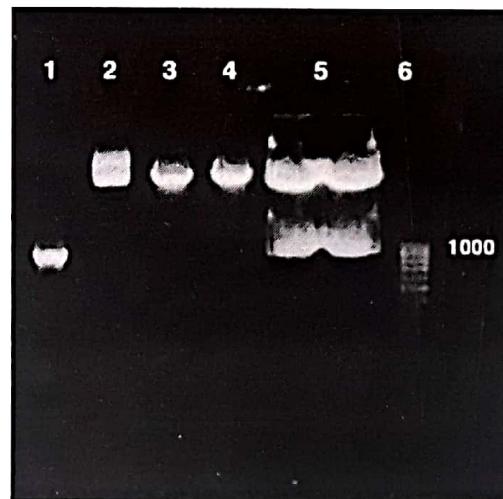
Sodium-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE): pCI-neo, rekombinant pCI-neo Matrix plazmidlerinin transfekte edildiği Vero hücreleri ile pozitif ve negatif kontrollerin bulunduğu hücre üretme kaplarındaki vasat döküldü. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücre-PBS karışımı plastik bir kazıcıyı yardımı ile kazındı. Hücre-PBS karışımı 13000 rpm +4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 1X sodiumdodesil sülfat yükleme tamponu ile sulandırıldı. Böylece transfekte hücrelerin parçalanması gerçekleştirildi (22).

Transfekte Vero hücrelerinin protein analizini yapmak amacıyla SDS-PAGE gerçekleştirildi. Bu amaçla elektroforez kasetinin içerisinde 50 ml %10'luk ayrıştırma jeli (resolving gel) döküldü. Jelin üzerinde, hava ile teması keserek yüzey gerilimini azaltıp polimerizasyonu kolaylaştırmak amacıyla, 2 ml bütanol (Sigma) döküldü. Jel bu şekilde 30 dk polimerizasyona bırakıldı. Daha sonra üzerindeki bütanol döküllererk, jel birkaç kez dH₂O ile yıkandı. Bu sırada 20 ml %5'lik yiğinlayıcı jel (stacking gel) hazırlandı. Kasete tarak takılarak yiğinlaştırıcı jel döküldü. Polimerizasyon için jel 30 dk bekletildi. Elektroforez kaseti soğutmalı elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler ve moleküler ağırlık markeri içerisinde %0.01 oranında dithiothreitol (DTT) eklenmiş 2X yükleme tamponu ile 3/1 oranında sulandırıldı. Örnekler 3 dk, ağırlık markeri ise 20 sn kaynayan suda bekletildi. Kuyucuklara örnekler 40 µl, moleküler ağırlık markeri 5 µl olmak üzere yüklendi. Elektroforez işlemi 150 V akımında 8 sa. tamamlandı (21).

Western Immunoblot Deneyi: SDS-PAGE sonrası elektroforez kaseti içerisindeki yiğinlama jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Ayrıştırıcı jel ile aynı büyüklükte nitroselüloz membran ve 6 adet kurutma kağıdı kesildi. Kurutma kağıtları, anot I (0.3 M Tris pH 10.4, %20 metil alkol), anot II (0.0025 M Tris pH 10.4, %20 metil alkol), katod tamponu (0.025 M Tris pH 9.4, %20 metil alkol) içeren kaplara 2'şer adet olmak üzere konuldu. Nitroselüloz membran (Sigma,) ise dH₂O içeren bir kaba bırakıldı. Kağıtlar ve membran 10 dk bekletildi. Bu arada jel anot tamponu ile ıslatıldı. Transfer işlemi semi-dry sisteminde 10 miliamperde 2 saat uygulandı. Transfer işlemi sonrasında bloklama amacıyla sulandırma solüsyonu (%00.2 Tween 20 içeren 1X PBS) içerisinde %5'lik yağsız süt tozu hazırlandı. Nitroselüloz membran %5'lik yağsız süt tozu içerisinde konuldu ve +4°C'de sallayıçı üzerinde 1 gece bekletildi. Süt tozu içerisinde alınan membran, yıkama solüsyonu (%0.1 Tween20 içeren 1X PBS) ile birkaç kez yıkandı. Primer serum 1/50 oranında sulandırılma solüsyonu ile sulandırıldı. Bu oranda sulandırılmış serumu içeren kaba membran konuldu. Membran sallayıçı üzerinde 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra yıkama solüsyonu ile 5 dk olmak üzere 5 kez yıkandı. Membranı içeren kaba sulandırma solüsyonu ile 1/1000 oranında sulandırılan anti-bovine immunoglobulin G peroksidaz (Sigma) eklendi. Sallayıçı üzerinde 37°C'de 1 saat bekletildi. Yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandı. Membran ışık geçirmeyen bir kapta kromojen DAB solüsyonu içerisinde birkaç dakika bekletildi. Görüntü oluştuktan sonra membran su ile yıkanıp kurutma kağıdı içerisinde kurutuldu (22).

Bulgular

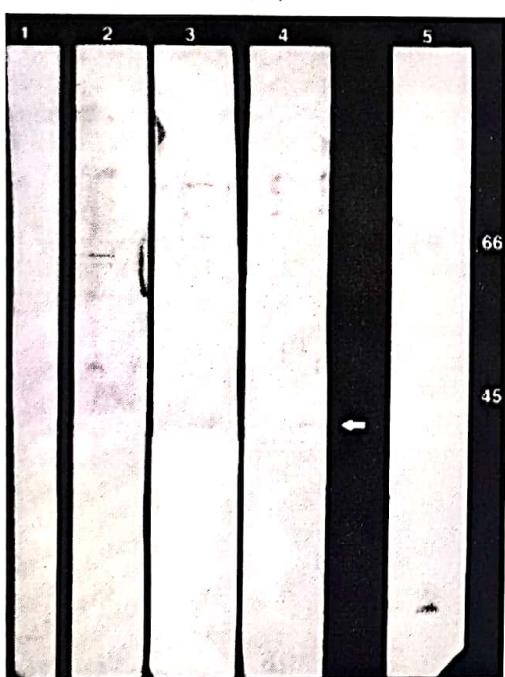
Matriks geninin elde edilebilmesi için Vero hücreleri SV RBOH aşısı suyu ile inokule edilen Vero hücreleri tersine mikroskopta gözlandı. İnokulasyonun 5'inci gününde Vero hücrelerinin yaklaşık %80 oranında CPE oluşurken, kontrol grubunda CPE gözlenmedi. Bu aşamada infekte Vero hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve tersine transkripsiyon gerçekleştirildi. Elde edilen kopya DNA'lar ve M genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR neticesinde yaklaşık 1038 bazlık M geni %1.5'luk agaroz jelde etidium bromid boyama ile görüntülendi. Ardından SV M geni pTOPO klonlama vektöründe klonlandı. Rekombinant pTOPO Matriks vektörü *EcoRI* ve *Sall* enzimleriyle kesildi ve %1'luk agaroz jelde yürütülen kesim ürünlerini saflaştırıldı. Aynı enzimlerle kesilen pCI-neo plazmid DNA'sı ile M genine ligasyon işlemi yapılarak *E.coli* hücrelerine transforme edildi. Ampisilinli katı besi yerinde üreyen kolonilere PZR tarama deneyi yapılarak pozitif koloniler belirlendi ve pozitif kolonilerin plazmid DNA'ları kesim deneyi için kullanıldı. Rekombinant pCI-neo Matrix geni *EcoRI-Sall* enzimleri ile kesilerek M geni çıkarıldı (Şekil 1 Hat 6). Yeni oluşan rekombinant pCI-neo Matrix vektörü yaklaşık 6512 baz uzunluğunda olup PZR tarama ve kesim enzim deneyleri ile pCI-neo Matrix geninin klonlandığı teyit edildi. Aynı zamanda oluşturulan rekombinant vektör pCI-Neo Matrix olarak adlandırıldı.



Şekil 1. %1.5'luk agaroz jelde rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün kesim enzimleriyle doğrulanması.

Hat 1; SV M geni PZR ürünü, Hat 2; Kesilmemiş rekombinant pCI-neo Matrix vektörü, Hat 3; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *Sall* enzim kesimi, Hat 4; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *EcoRI* enzimi ile kesimi, Hat 5; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *EcoRI-Sall* kesim enzimleri ile kesimi, Hat 6; 100 baz'lık ladder DNA.

Açıklama vektörüne yerleştirilen M geninin Vero hücrelerinde açıklatılması amacıyla rekombinant pCI-neo Matrix vektörü Vero hücrelerine geçici olarak transfekte edildi. Elde edilen hücre lizatları %10'luk poliakrilamid jel de yürütüldü ve nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfekte Vero hücrelerinin M proteinini açıkladığını göstermek amacıyla Western Immunoblotlama deneyi yapıldı. Sonuç olarak rekombinant Vero-pCI-neo Matrix hücrelerinde, SV pozitif serumlarla yapılan deneyde 38 kDa ağırlığına sahip proteinin varlığı tespit edildi (Şekil 2 Hat 4). Aynı ağırlığa sahip olan protein SV infekte edilmiş Vero hücre lizatlarında da görüldü (Şekil 2 Hat 3). Fakat bu bantlara Vero ve rekombinant Vero-pCI-neo hücre lizatlarında rastlanmadı (Şekil 2 Hat 1, 2).



Şekil 2. Rekombinant SV matriks proteininin Vestern blotlama ile gösterilmesi

Hat 1; Vero, Hat 2; pCI-neo transfekte edilmiş Vero hücre lizatı, Hat 3; SV-infekte Vero hücre lizatı, Hat 4; Recombinant pCI-neo Matrix transfekte edilmiş olan Vero lizatı, Hat 5; Marker , Ok; yaklaşık 38 kDa'luk Matriks protein.

Kaynaklar

1. Baron MD, Goatley L, Barrett T. Cloning and sequence analysis of the matrix (M) protein gene of rinderpest virus and evidence for another bovine morbillivirus. *Virology* 1994; 200: 121-129.
2. Bolat Y, Doymaz, MZ. *Paramyxoviridae Ailesi*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ders Notları, Fırat Üniversitesi Yayınları Elazığ 1998; 302-304.
3. Bos L. 100 years of virology: from vitalism via molecular biology to genetic engineering. *Trend in Microbiology* 2000; 8: 82-87.
4. Bulut Y. Hepatit B virusu HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ 2001; 4-5.

Tartışma

Barett ve arkadaşları SV M proteinini göstermek için yaptıkları çalışmalarla immunopresipitasyon deneyleri ile M proteinin varlığını göstermişlerdir. Kızamık virüsü M proteinini 35. ve 48'inci amino asitlerine karşı oluşturulan serumları ve SV tavşan hiperimmun serumlarını kullanmışlardır (1).

Sığır vebası tanısında N ve H proteinleri önemli yer tutmaktadır. *Paramyxoviridae* ailesinin avian pneumovirusunun prokaryotik hücrelerden elde edilen M proteinini tanıda çok olumlu yanıt vermiştir (10). Bununla birlikte SV M proteininin Balb/c farelerinde düşük immun yanıt oluşturduğu rapor edilmiştir (23). Matriks genini içeren memeli açıklatma vektörleri ile herhangi bir DNA çalışması da bildirilmemiştir. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidinde DNA aşılama çalışmalarında farklı sonuçlar ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışma ile rekombinant pCI-neo Matrix'i içeren farklı ökaryotik hücrelere stabil transfeksyonu düşünülmektedir. Affiniti kromotografik tekniklerle SV virusu M proteinin büyük miktarlarda elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Böylelikle SV virusu M proteinine karşı monoklonal antikor elde edilmesi kolaylaşacaktır. Oluşturulan rekombinant pCI-neo Matrix vektörü ile DNA immunizasyon çalışmalarının yapılması için olanak sağlanmıştır. Elde edilecek olan SV virusu M proteininin tanıda vereceği cevabın değerlendirilmesi önemli görülmektedir. Sığır vebası virusunun tomurcuklanması esnasında oynadığı rolün tam anlamıyla ortaya çıkarılması açısından SV M geninin klonlanması önemlidir. Bu gibi gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara temel oluşturması bakımından yapılan bu çalışma büyük önem arz etmektedir.

5. Doymaz MZ, Kılıç AO, Bulut H, Ozdarendeli A, Bolat Y. Cloning and prokaryotic expression of hemagglutinin gene of rinderpest virus. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2000; 14: 189-195.
6. Elseth DG, Baumgardner DK. Principles of Modern Genetics. West Publishing Company St. Paul, MN USA 1995; 134-140.
7. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. *Paramyxoviridae* Veterinary Virology, Academic Press California 1993; 471-487.
8. Goodman S. More funding needed to wipe out rinderpest. Nature 2001; 411: 403.
9. Grubman MJ, Mebus C, Dale B, Yamanaka M, Yilma T. Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus infected cells. Virology 1998; 163: 261-267.
10. Gulati BR, Cameron KT, Seal BS, Goyal SM, Halvorson AD, Njenga MK. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. J Clinical Mic 2000; 38: 4010-4014.
11. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmid. S Mol Biol 1983; 5: 557-580.
12. Innis AM, Gelfold DH, Sninsky JJ. PCR Strategies. Academic Press, London 1995.
13. Kamata H, Sugiyama M, Kamata Y, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. Nucleotide sequence of cDNA to the rinderpest virus mRNA encoding the nucleocapsid protein. Virus Genes 1991; 5: 1-5.
14. Kingsbury DW. *Paramyxoviridae* and Their Replication. Fields Virology.(Fields BN, Knipe DM, Chacon RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, eds.) 2nd Ed., Raven press , New York 1990; 945-955.
15. Kobune F, Sakata H, Sugiyama M, Sugiura A. B95a, marmoset lymphoblastoid cell line, as a sensitive host for rinderpest virus. J Gen Virol 1991; 72: 687-692.
16. Lund BT, Tiwari A, Galbraith S, Baron MD, Morrison I, Barrett T. Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4⁺ T cell responses with broad viral antigen specificity J Gen Virol 2000; 81: 2137-2146.
17. Mahy WJB, Kangro OH. Virology Methods Manual. Academic Press Limited Oval Road, London 1996.
18. Promega Product Information Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase M170. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D. 2000.
19. Promega technical bulletin TransfastTM Transfection Reagent. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D. 2000.
20. Rey Nores JE, McCullough KC. Relative ability of different bovine leukocyte populations to support active replication of rinderpest virus. J Virol 1996; 70: 4419-4426.
21. Rweyemamu MM, Cheneau Y. Strategy for the global rinderpest eradication programme. Vet Mic 1995; 44: 369-376.
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York 1989.
23. Sugiyama M, Minamoto N, Kinjo T, Hirayama N, Sasaki H, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. Characterization of monoclonal antibodies against four structural proteins of rinderpest virus. J. Gen. Virol 1989; 70: 2605-2613.