

SIĞIR VEBASI VİRUSU RBOK AŞI SUŞU NÜKLEOPROTEİN VE MATRİKS GENİNİN İN VITRO TRANSKRİPSİYONU*

Aykut ÖZDARENDELİ¹ Şükrü TONBAK² A. Kürşat AZKUR² Hakan BULUT²
İrem GÜLAÇTİ² Yusuf BOLAT²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE
²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE.

Gelis Tarihi: 15.10.2002

In Vitro Transcription of the Matrix and Nucleoprotein Gene of Rinderpest Virus (RPV) Vaccine Strain

Summary

In this study, *in vitro* transcription assay was performed using DNA templates for matrix (M) gene and nucleoprotein (NP) gene of rinderpest (RPV) RBOK vaccine strain. All kind of *in vitro* transcription of DNA into RNA is carried out with bacteriophage-encoded DNA-dependent RNA polymerases. The RNA polymerases recognise the spesific DNA region called promotor to transcribe of DNA into RNA. Thus, it was cloned both M and NP genes of RPV RBOK vaccine strain into pCI-neo and pGEM -3Zf (-) were cloned using vector containing T7 promotor site. After *in vitro* trancription assay, the RNA transcripts were obtained and visulized on agarose gel.

Key Words: Rinderpest, matrix and nucleoprotein genes, transcription

Özet

Bu çalışmada, sığır vebası (SV) virusu RBOK aşısı suyu nükleoprotein (NP) ve matriks (M) genlerinin kalıp olarak kullanılması ile *in vitro* transkripsiyon deneyi yapıldı. DNA'yi RNA'ya çeviren *in vitro* transkripsiyonun bütün çeşitleri bakteriyofaj tarafından kodlanan DNA'ya bağımlı RNA polimeraz tarafından yapılmaktadır. RNA polimeraz DNA'dan RNA yapan özgül DNA bölgesi olarak adlandırılan promotor bölgesini tanımaktadır. Bu çalışmada, SV virusu RBOK aşısı suşunun hem M hemde NP genleri, T7 promotor bölgesi içeren pCI-neo ve pGEM-3Zf (-) vektörlerinde klonlandı. *In vitro* transkripsiyon deneyinden sonra agoroz jelde görülebilen RNA transkriptleri elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Sığır yebası, matriks ve nükleoprotein genleri, transkripsiyon

Giris

Sığır vebası (SV) sığırlarda mortalite ve morbiditesi %95'den daha yüksek oranda seyreden viral bir hastalıktır. Bu hastalık ülkemizin de aralarında bulunduğu birçok ülkede etkin bir mücadele neticesinde tam olarak eradike edilmesine rağmen, pek çok ülkede hala sığır yetiştirciliğini tehdit etmektedir (4,6,9,15).

Paramyxoviridae familyasının morbilli virus sınıfı içerisinde yer alan sığır vebası virusu, tek iplikli, negatif anlamlı genomun 3' ucundaki tek promotordan açıklanan bir yapıya sahiptir. Sığır vebası virusu zarlı, helikal nükleokapsit ile küresel bir morfolojiye sahip olup altı tane yapısal proteinini vardır. Sığır vebası virus proteinleri large (L), fosfoprotein (P), hemagglutinin (H), matriks (M), nükleoprotein (NP) ve füzyon (F) olarak

isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise yapısal olmayan C ile V olarak isimlendirilen iki protein daha bildirilmiştir. Transkripsiyon haritalama yöntemiyle, viral genom üzerindeki yapısal proteinleri kodlayan genlerin dizilişi 3' yönünden 5' yönüne doğru N-P-M-F-H-L olarak belirlenmiştir (2,3,4).

Gen açıklanmasının ilk adımı olan transkripsiyon DNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNAP) tarafından yapılmaktadır. RNAP, DNA'nın tek ipliğini şablon olarak kullanmakta ve RNA sentezini gerçekleştirmektedir. Bu işlem, DNA'nın polimerizasyonuna benzemekle birlikte, iki polimerizasyon arasında başlıca iki fark bulunmaktadır. Farklılıkların birincisi RNAP polimerizasyonun primerlere ihtiyaç duymamasıdır,

* Bu çalışma 5. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji kongresinde tebliğ edilmiştir.

ikincisi ise yeni sentezlenen RNA zincirinin DNA şablonundan ayrılmıştır. Ayrıca RNA molekülleri de tersine transkriptaz (reverse transcriptase) enzimleri vasıtasiyla kopya DNA (cDNA) haline dönüştürülmektedir. Bu tür enzimlerin kullanılması ile reverse genetikte moleküler düzeyde araştırmalar yapılmaktadır (13,16).

Ribonükleik asitlerin (RNA), moleküler düzeyde yapı ve fonksiyon çalışmaları güncel bir konudur. Klonlama ve reverse genetik sayesinde *in vitro* şartlarda elde edilen RNA molekülleri ile, RNA-RNA, RNA-protein ilişkileri, gen regulasyon çalışmaları, RNA'nın ikili ve üçlü yapılarının fonksiyonları hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir. Çevresel koşullara çok hassas olan RNA molekülleri, cDNA formunda plazmidlere yerleştirilmekte ve *in vitro* transkripsiyon sayesinde tekrar RNA haline dönüştürülmerek çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda *in vitro* transkripsiyon sisteminin RNA çalışmalarında önemi büyütür (1,5,17).

Bu çalışmada sığır vebası virusu RBOK aşısı suşunun M ve NP genleri üzerinde *in vitro* transkripsiyon ve translasyona temel oluşturmak amacıyla, T7 promotor bölgesi bulunan plazmidlere klonlanarak M ve NP DNA'larından *in vitro* transkripsiyonla RNA elde edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü ve virus

Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücreleri (Vero) %10 fotal sığır serumu (Sigma St. Louis, MO, USA), 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da üretildi. Çalışmada virus olarak, Etlik Araştırma Enstitüsü'nde üretilen hücre kültürüne adapte SV RBOK aşısı suşi kullanıldı.

Total RNA izolasyonu

Hücre kültürü kabının yaklaşık %60-70'i Vero hücreleriyle kaplandıktan sonra SV RBOK aşısı suşi ile infekte edildi. Virusun sitopatik etkisi (CPE) mikroskopta gözlendi. İnfeksiyonun 5. gününde hücrelerin yaklaşık %80'inde CPE görüldüğünde total RNA izolasyonu steril şartlar altında TRI reagent (Sigma St. Louis, MO, USA) kullanılarak yapıldı (14).

Tersine transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Primerlerin dizayn edilmesinde gen bankası X76186 ve X68311 SV virusu RBOK aşısı suşi gen diziliminden yararlanıldı. Total RNA'lar SV virusu ile infekte Vero hücrelerinden elde edildi. Matriks ve

nükleoprotein genlerinin (M1: 5'- ggg aat tcc cac cat ggc aga aat t- 3' ve M2: 5' gga agc ttc cgt cga ccc ita cag gac ctt- 3'); (NP1: 5' gga agc ttc cgc tag ccc acc atg gct tct ctc-3' ve NP2: 5' ggg tcg act cag ttg aga at- 3') primerleri kullanılarak cDNA'ların üretilmesi sağlandı. Bu cDNA'lar M ve NP genine spesifik primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (12).

Kompetan hücrelerin hazırlanması

Kompetan *E. coli* JM109 hücreleri Luria Bertani (LB) katı besi yerine tek nokta ekimi yapıldı. Katı besi yeri 37°C'de bir gece bekletildi. Oluşan kolonilerden tek bir koloni alınarak 5 ml'lik LB sıvı besi yerine ekildi ve 37°C'de 2 saat çalkalanarak bekletildikten sonra 100 ml LB sıvı besi yeri eklendi. Spektrosometrede $OD_{600} = 0.5$ olana kadar bakteriler besi yerinde inkübe edildi. Besi yeri steril tüplere konularak 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pelet toplam 33 ml RF1 (100 mM rubidyum klorit, 50 mM mangan klorit, 30 mM potasyum asetat, 30 mM kalsiyum klorit ve %15 gliserol) ile süspansie edildi. Karışım buzlu su içinde 20 dk bekletildikten sonra 3000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet toplam 5 ml RF2 (10 mM OPS, 10 mM RbCl, %75 CaCl₂.2H₂O ve %15 gliserol) ile süspansie edildi. 10 dk buzlu suda bekletilen karışım steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µl olacak şekilde paylaştırıldı ve -80°C'de metanol içinde 10 dk inkübe edildikten sonra kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi (8,12).

Rekombinant plazmidin oluşturulması ve doğrulanması

Matriks geni ve pCI-neo vektörü (Promega, USA) *Eco*RI-*Sall* (Promega, USA) kesim enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri agoroz jelden, Wizard PCR Preps DNA Purification Systemi (Promega, USA) kullanılarak üretici firma önerisine göre saflaştırıldı ve ligasyon yapıldı. Nükleoprotein geni ve pGEM-3Z(-) vektörü (Promega, USA) *Hind*III-*Sall* (Promega, USA) kesim enzimleri ile kesilerek ligasyona tabi tutuldu ve rekombinant plazmidlerin doğrulanması PZR-tarama ve kesim enzimleri ile yapıldı (11,12).

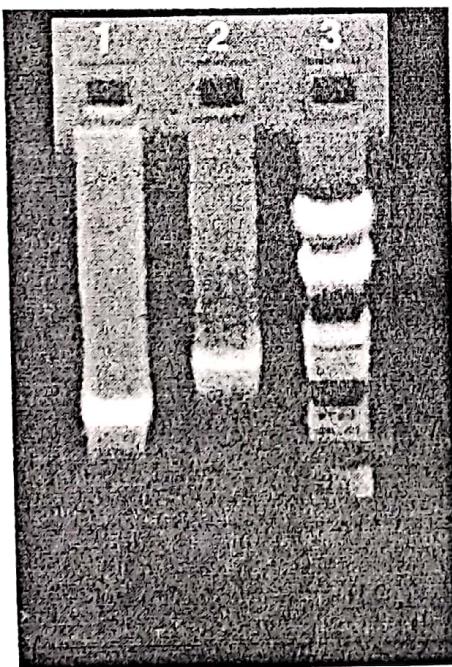
In vitro transkripsiyon

In vitro transkripsiyon, Riboprobe *In vitro* Transcription Systems (Promega, USA) kullanılarak yapıldı. Rekombinant plazmidlerin DNA'sı *Sall* kesim enzimiyle kesilerek agoroz jelden saflaştırıldı. DNA miktarı spektrosometrede belirlendi. *In vitro* transkripsiyon için 50 µl'lik transkripsiyon reaksiyonu [10 µl transkripsiyon buffer'i, 2.5 µl DTT, 5 µl RNasin, 10 µl rNTP (rATP, rCTP, rGTP ve rUTP'nin her birinden 2.5 µl), 10 µl DNA, 5 µl

T7 RNA Polimeraz ve 7.5 μ l distile su] hazırlandı. Bu karışım 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 50 μ l'lik transkripsiyon reaksiyonuna 5 μ l DNase eklendi ve 37°C'de 30 dk bekletildi. Karışma fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) eklendi ve 4°C'de 13500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Tüpe karışımın 1/10'u kadar 3 M sodyum asetat, 2 hacim soğuk etanol eklendi ve -80°C'de 30 dk bekletildi. 4°C'de 13500 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası elde edilen pelet 1 ml %70'lük etanol ile yıkandı. %1.5'luk agoroz jelde yürütülen RNA etidyum bromid varlığında ultraviolet (UV) ışığı altında gözlendi (Şekil 1 Hat 2,3).

Bulgular

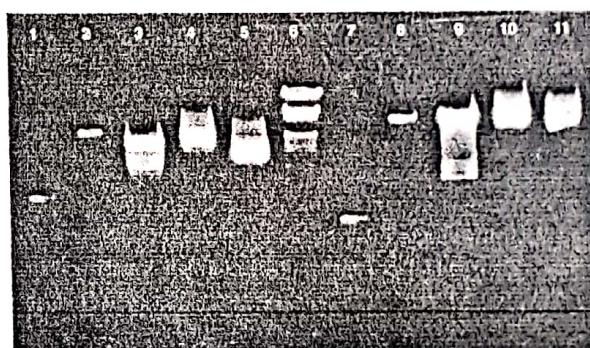
Virusun sitopatik etkisi mikroskopta incelediğinde infeksiyonun 5. gününde hücrelerin yaklaşık %80'inde CPE görüldüğünde toplam RNA izalosyonu yapıldı ve tersine transkripsiyonla M, NP genlerine özgü primerlerle cDNA'lar elde edildi. Bu cDNA'lar PZR ile çoğaltıldığında yaklaşık 1038 bazlık SV virusu RBOK aşı suyu M geni ürünü ve 1575 bazlık NP geni ürünü UV altında gözlendi (Şekil 1 Hat 2,3).



Şekil 1. %1.5'luk agoroz jelde SV virusu RBOK aşı suyu M ve NP genlerinden elde edilen PZR ürünleri
Hat 1; M geni, Hat 2; NP geni, Hat 3; EcoR I- Hind III Lambda DNA marker

Matriks geni pCI-neo vektörune *EcoRI-Sall* enzimleri ile, NP geni ise pGEM-3Zf (-) vektörune *HindIII-Sall* enzimleri ile yerleştirildi. Oluşturulan rekombinant plazmidler *E.coli* JM109 hücrelerine

transforme edildi. Transformasyon ürünlerini ampisilinli LB katı besi yerine ekildi. Koloniler katı besi yerinde gözlendi. Alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA'ları elde edildi. Rekombinant plazmidin varlığı enzim kesim deneyle yapılarak teyit edildi (Şekil 2 Hat 3,10). *In vitro* transkripsiyon için sirküler formda bulunan plazmid DNA'ları *Sall* enzim kesim bölgesi kullanılarak linear hale getirildi (Şekil 2 Hat 4,9). Sonrasında *in vitro* transkripsiyon deneyle yapılarak DNA'dan RNA elde edildi. *In vitro* transkripsiyon ürünleri %1.5'luk agoroz jelde görüntülendi (Şekil 2 Hat 1,8).



Şekil 2. %1.5'luk agoroz jelde rekombinant plazmidleri ve *in vitro* transkripsiyon ürünleri

Hat 1; NP transkript ürünü, Hat 2; pGEM-NP *Sall* enzim kesimi, Hat 3; pGEM-NP *Sall-NheI* enzim kesimi, Hat 4; pGEM-NP, Hat 5; pGEM3Zf (-), Hat 6; *EcoR I- Hind III* Lambda DNA marker, Hat 7; M transkript ürünü, Hat 8; pCI-neo Matrix *Sall* enzim kesimi, Hat 9; pCI-neo Matrix *EcoRI-Sall* enzim kesimi, Hat 10; pCI-neo Matrix, Hat 11; pCI-neo.

Tartışma

Bu çalışmada SV virusu RBOK aşı suşunun NP ve M genleri pGEM-3Zf (-) ve pCI-neo vektörlerinde klonlandı. Bu vektörlerin her ikisi de T7 RNA polimeraz bölgesi içermektedir. Vektörlerin bu özelliği kullanarak *in vitro* transkripsiyon yapıldı.

Daha önceki yapılan çalışmalarda pürifiye sığır vebası virusu ile birlikte ribonükleoprotein (RNP) kompleksi kullanılarak *in vitro* transkripsiyon gerçekleştirılmıştır. Ghosh ve ark. tarafından yapılan çalışmada pürifiye virus kullanımları nedeniyle bireysel gen transkriptlerinin sentezlenmesi ve miktarlarındaki farklılıklar gösterebilmiştir (7). Fakat yapılan bu çalışmada deterjanla muamele edilen pürifiye virus yerine sadece NP ve M genlerinin kullanılmasından dolayı iki gen transkripti arasında fazla bir fark bulunamamıştır (Şekil 2 Hat 1,8).

In vitro transkripsiyon ülkemizde veteriner virolojide ilk defa gerçekleştirilen bir çalışmadr. Bu

çalışma sayesinde daha sonraki aşamalarda RNA-protein, RNA-RNA ve RNA-DNA ilişkilerinin belirlenmesine ışık tutacaktır. Elde edilen RNA *in vitro* koşullarda yüksek miktarda protein elde etmeye

imkan sağlamasından dolayı bu transkripsiyon ürünleri ile *in vitro* translasyon çalışması yapılmasında yarar vardır

Kaynaklar

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. Third Edition. 1994; 291-332.
2. Baron MD, Barrett T. The sequence of the N and L genes of rinderpest virus, and the 5' and 3' extra-genic sequences: The completion of the genome sequence of the virus. *Vet Microbiol* 1995; 44: 175-186.
3. Baron MD, Kamata Y, Barras V, Goatley L, Barrett T. The genome sequence of the virulent Kabete 'O' strain of rinderpest virus: Comparison with derived vaccine. *J Gen Virol* 1996; 77: 3041-3046.
4. Bolat Y, Doymaz MZ. Veteriner Viroloji Ders Notları. 1998; 302-304.
5. Conzelmann KK. Nonsegmented negative-strand RNA viruses: Genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 123-162.
6. Food and Agricultere Organization. Rinderpest in Turkey. The Empres Transboundry Animal Disease Bulletin. 1999; 9: 4.
7. Ghosh A, Joshi VD, Shaila MS. Characterization of an *in vitro* transcription system from rinderpest virus. *Vet Microbiol* 1995; 44: 165-173.
8. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmid. *S Mol Biol* 1983; 5: 557-580.
9. Lund BT, Tiwari A, Galbraith S, Baron MD, Morrison WI, 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.
10. Promega Technical Bulletin Riboprobe In vitro Transcription System. 2001; No 16.
11. Promega Technical Bulletin. Wizard PCR Preps DNA Purification System. 2001; No 118.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Newyork. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
13. Severinov K. T7 RNA polymerase transcription complex: What you see is not what you get. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 5-7.
14. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. TRI Reagant. 1995; No 205.
15. Tatar N. Değişik ısı derecelerinde farklı sürelerde tutulan sığır vebası aşısının vero hücrelerinde aktivite kontrolü. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1994; 4: 5-25.
16. Temiakov D, Mentesana PA, Ma K, Mustaev A, Borukhov S. The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 14109-14114.
17. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. Second Edition. 1992; 213-234.