

SIĞIR VEBASI VİRUSU RBOK AŞI SUŞU NÜKLEOPROTEİN (NP) GENİNİN AÇIKLANMASI*

Şükrü TONBAK¹

Aykut ÖZDARENDELİ²

Yusuf BOLAT¹

¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.10.2002

Expression of Nucleoprotein Gene (NP) of Rinderpest Virus (RPV) RBOK Vaccine Strain

Summary

In the present study, expression of nucleoprotein (NP) gene of rinderpest virus (RPV) RBOK vaccine strain in eucaryotic cells was performed. The NP gene of RPV-RBOK vaccine strain was cloned into a pGEM-3Zf (-) vektor. The recombinant plasmid was cut with *NheI* and *SalI* enzymes to obtain the NP gene. Then, the NP gene was placed into pCI-neo mammalian expression vektor. The resulting recombinant plasmid was named as pSV-NP. pSV-NP was transiently transfected into Vero cells. The presence of the NP proteins was analaysed by Western Immunoblotting demonstrating that Vero cells express a 60 kDa protein reacting with anti-NP antibody.

Key Words: Rinderpest virus, nucleoprotein gene, protein expression

Özet

Bu çalışmada, sığır vebası virusu RBOK aşı suşu (SV-RBOK) nükleoprotein (NP) geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması amaçlanmıştır. Sığır vebası RBOK aşı suşu NP geni pGEM-3Zf (-) vektörüne klonlandı. Nükleoprotein genini elde etmek için rekombinant plazmid *NheI* ve *SalI* enzimleri ile kesildi. Daha sonra NP geni pCI-neo memeli açıklama vektörüne yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmid pSV-NP olarak isimlendirildi. pSV-NP geçici olarak Vero hücrelerine transfekte edildi. Vero hücrelerinin 60 kDa'luk NP proteinini açıklaması anti-NP antikorları kullanılarak Western immunblotting deneyi ile incelendi.

Anahtar Kelimeler: Sığır vebası virusu, nükleoprotein geni, protein açıklatılması.

Giriş

Sığır vebası yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden akut ve perakut seyirli viral bir hastalıktır. Hastalık solunum ve sindirim sistemi mukozalarında nekroz ve erozyonlara neden olmaktadır (2,14).

Sığır vebası virusu, *Paramyxoviridae* familyasının morbilli virus sınıfında bulunan tek iplikli, segmentsiz, negatif polariteli 15-16 kilobaz uzunluğunda bir RNA genomuna sahiptir. Tek bir serotipi olan sığır vebası virusu morbilli virus sınıfında bulunan kızamık, köpek gençlik hastalığı ve küçük ruminantlarda vebaya neden olan virus ile antijenik yakınlık göstermektedir (1,2,7). Sığır vebası virusunun nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), matriks (M), füzyon (F), hemaglutinin (H), large (L) olmak üzere altı tane yapısal, iki tanede yapısal olmayan V ile C proteinini bulunmaktadır (3,4).

Sığır vebası virus nükleoproteini sadece nükleokapsid oluşumunda değil aynı zamanda transkripsiyon ve replikasyonda da görev almaktadır.

Polimeraz enzimi, çiplak genom RNA'yi kopyalayamamakta ve sadece nükleoprotein tarafından kapsidlenen RNA viral RNA sentezi için kalıp olarak görev yapmaktadır (3,17). Nükleoprotein geni 1668 nükleotid uzunlığında olup 65 kDa moleküler ağırlığa sahip olan NP proteinini açıklamaktadır. Bu gen 1575 nükleotid uzunlığında 525 amino asit kodlayan bir açık okuma bölgesine (ORF) sahiptir. Nükleoprotein geninin 3 ucu translasyona uğramayan bölgesinde 53 nükleotid, 5 ucu translasyona uğramayan bölgesinde ise 40 nükleotid bulunmaktadır (1,5,7).

Viral genlerin klonlanması ve farklı sistemlerde geçici (transient) olarak açıklatılması bu proteinlerin fonksiyonlarını belirlemeye hızlı bir yoldur. Geçici süreyle açıklanan gen üzerindeki transkripsiyon kontrol ve RNA işlenimi görevlerini yürüten regülatör elementlerin daha kısa zamanda belirlenmesi kolaylaşmıştır (8,16,17).

* Bu çalışma doktora tezinin bir bölümünden özet olup, FÜBAP (Proje No: 645) tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmada, sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu nükleoprotein geninin memeli açıklama vektöründe yerleştirilmesi ve ökaryotik hücrelerde geçici olarak açıklatılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü ve virus: Afrika yeşil maymun böbrek 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 Etlik Araştırma Enstitüsünde üretilen hücre kültürüne adapte sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu kullanıldı.

Toplam RNA izolasyonu: Yirmi beş santimetrekarelük hücre kültür kabının yaklaşık %70-80'i Vero hücreleri ile tek tabaka olduktan sonra sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu ile infekte edildi. İnfeksiyonun 5. gününden hücrelerin yaklaşık %80'inde sitopatolojik etki (CPE) görüldüğünde toplam RNA izolasyonu, TRI-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) ile üretici firmanın protokölüne göre yapıldı (13).

Tersine Transkripsiyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Nükleoprotein genine özgün primerlerin oluşturulmasında EMBL gen bankası X68311 sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu gen diziliminden yararlanıldı. Bu gen dizilimine göre, ileriye doğru olan primer (NP1: 5' GG AAG CTT CCG CTA GCC CAC CAT GGC TTC TCT C 3') ve geriye doğru olan primer (NP2: 5' GGG TCG ACT CAG TTG AGA AT 3') oluşturuldu. Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu ile infekte Vero hücrelerinden izole edilen toplam RNA'lardan gen spesifik primer ile cDNA'lar elde edildi. Bu cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı 10 pmol primer, 1.25 mM dNTP (Promega), 25 mM MgCl₂ (Promega), 10X PCR bufer (Promega), 2U Taq DNA Polimeraz (Promega), 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 95°C'de 2 dakika ön ısıtmadan sonra, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 44°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 5 dakika uzatma ile 32 döngüden oluşan ve 72°C'de 15 dakika son uzatma ile sonlanan amplifikasyon işlemi yapıldı. PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid varlığında incelendi (12).

Nükleoprotein geninin klonlanması ve rekombinant pSV-NP plazmidinin oluşturulması: Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu NP geni pGEM-3Zf (-) vektörune HindIII ve SalI enzimleri ile yerleştirilerek klonlandı. NP geni bu vektörden NheI ve SalI enzimleri kullanılarak çıkarıldı ve aynı enzimler ile pCI-neo açıklama plazmidine T4 DNA

ligaz enzimi ile gen/vektör oranı 3:1 olacak şekilde ligasyonu yapıldı (12).

PZR tarama ve kesim enzimleri ile doğrulama: Rekombinant plazmidleri belirlemek için PZR-tarama (PZR-T) deneyi yapıldı (9). Steril kürdan ucu numaralandırılmış kolonilere değerlendirildi ve bir başka ampisilinli katı besi yerine aktarıldı. Kürdan ucu tekrar koloniye dokundurularak 2µl 25mM MgCl₂ (Promega), 2µl 10X PCR buffer (Promega), 3µl 1.25mM dNTP, 4µl 10pmol/µl nükleoprotein genine özgül primer ve 4µl dH₂O içeren karışımla temas ettirildi. 95°C de 10 dakika ön ısıtma tutuldu. Kısa bir santrifüjden sonra 1 IU Taq polimeraz (Promega) eklendi ve mineral yağ damlatıldı. PZR-T programı 95°C 5 dakika ön ısıtma, 94°C 1 dakika ayılma, 55°C 1 dakika bağlanma, 72°C 1 dakika uzatma olacak şekilde 25 siklus olarak düzenlendi. PZR ürünler %1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi.

Vero hücrelerine geçici (transient) transfeksiyon: Vero hücrelerine rekombinant pSV-NP plazmidinin geçici transfeksiyonu Transfast™ Transfection Reagent kullanılarak yapıldı. Rekombinant plazmid DNA'sı ve Transfast™ Transfection Reagant karıştırılarak 15 dakika oda ısısında bekletildi. Hücre üretme kaplarımdaki vasat boşaltıldı ve hücreler steril fosfatla tamponlanmış Phosphate Buffer Saline (PBS) ile yıkandı. Daha sonra transfeksiyon karışımı hücrelere ilave edildi. Hücreler 37°C'de 1 saat bekletilerek hücre üretme vasatı ilave edildi. Transfekte hücreler 72 saat 37°C'de bekletildi (10). Tek tabaka oluşturan Vero-pSV-NP doku kültür kaplarındaki vasat döküllerken hücreler PBS ile yıkandı. Doku kültür kabına 5 ml steril PBS ilave edilerek hücreler steril bir hücre kazıcı ile kaldırıldı. Karışım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı alınarak hücre peletinin üzerine 200 µl jel yükleme solüsyonu eklendi (12).

SDS-Page: Plazmidlerle transfekte Vero hücrelerinde protein sentezini belirlemek için SDS-Page yapıldı. Elektroforez kasetine %10'luk çözücü jel hazırlandıktan sonra üzerine polimerizasyon gerçekleştiğinden sonra %5'lik yoğunlayıcı jel döküldü. Örnekler 1X SDS yükleme solüsyonu (50 mM Tris.Cl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol [DTT], %2 SDS, %0.1 bromophenol blue, %10 glycerol) ile sulandırıldı ve 100°C'de 3 dakika kaynatıldıktan sonra kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 150 Volt akımda 8 saatte gerçekleştirildi (12).

Western immunoblotting: SDS-Page aşamasından sonra çözücü jel ile aynı büyüklükte olan kurutma

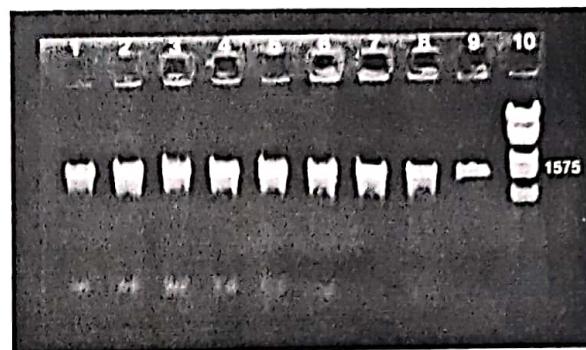
kağıtları anot I, anot II ve katot solüsyonlarında 10 dakika bekletildi. Nitroselüloz membrana (Sigma, USA) proteinlerin transfer işlemi Semi-Dry sisteminde (IMM-Semi-Dry Blotter, W. E. P., Comp., USA.) 10 mA'de 2 saatte gerçekleştirildi. Transfer işleminden sonra membran 4°C'de bir gece %5'lük yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran, yıkama solüsyonu (%0.01 Tween-20 içeren PBS) ile 5 defa yıkandı ve 1/50 oranında sulandırılmış sığır vebası pozitif primer serumla 37°C'de 1 saat bekletildi. Membran yıkandıktan sonra anti-bovine IgG-peroksidaz konjuge serumda 37°C'de 1 saat bekletildi. Yıkama işlemi tekrarlanarak membranlar karanhık bir ortamda 15 ml kromojen-substrat eriyiğinde 10 dakika bekletildi. Reaksiyon distile su ilavesi ile durduruldu ve görüntüleme yapıldı (12).

Bulgular

Sığır vebası virusu RBOK aşısı suyu ile infekte edilen Vero hücrelerinde infeksiyonun 5. gününde paramiksoviruslara özgün sitopatolojik değişiklik olan sinsityaların hücrelerin %70-80'inde belirgin olduğu görüldü. Bu infekte hücrelerden elde edilen toplam RNA'lar ile NP geninin geriye doğru özgül primeri kullanılarak tersine transkripsiyon (TT) ile cDNA'lar elde edildi ve PZR yöntemiyle çoğaltıldı. PZR sonrası yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğunda NP geni pGEM-3Zf (-) vektörüne ligasyonu yapılarak pGEM-SV-NP plazmidi oluşturuldu.

Nükleoprotein geni pGEM-SV-NP plazmidinden *NheI* ve *SalI* enzimleri ile çıkarılarak pCI-neo memeli açıklama vektörüne aynı enzimler kullanılarak ligasyon yapıldı. *Escherichia coli* hücrelerine transformasyondan sonra elde edilen rekombinant plazmidleri belirlemek için polimeraz zincir reaksiyon-tarama (PZR-T) deneyi yapıldı (Şekil 1). PZR-T ile pozitif olarak belirlenen rekombinant plazmid DNA'sı alkali lizis yöntemi ile elde edilerek NP geninin varlığı enzim kesim deneyleri ve PZR ile teyit edildi (Şekil 2). Oluşturulan rekombinant plazmid pSV-NP olarak isimlendirildi.

pCI-neo ve rekombinant pSV-NP plazmidi geçici olarak Transfast™ Transfection Reagent kullanılarak Vero hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra transfekte hücreler parçalanarak SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE ile elde edilen jele sığır vebası pozitif antikorun kullanıldığı western immunoblotlama deneyi yapıldı. Negatif kontrol olarak kullandığımız pCI-neo transfekte hücrede SV-RBOK'a ait protein bandı gözlenmedi. Rekombinant pSV-NP plazmidinin transfekte edildiği hücrelerde ise yaklaşık 60 kDa moleküler ağırlıkta NP proteini belirlendi (Şekil 3, hat 5).

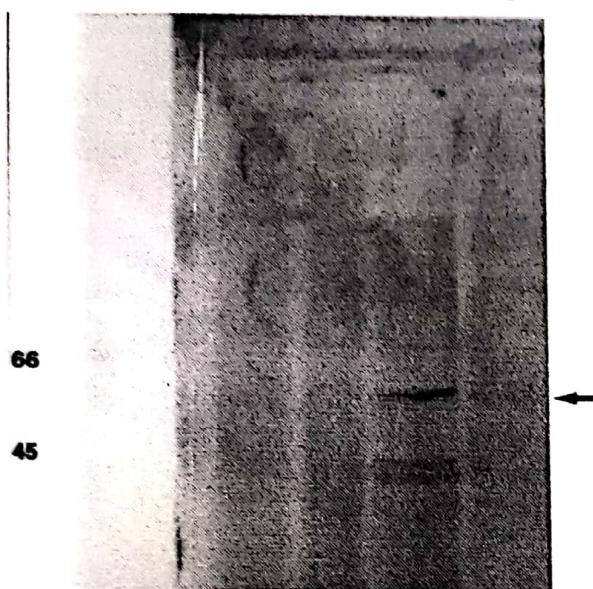


Şekil 1. %1.5'lük agaroz jelde PZR-T sonuçlarının görünümü
Hat 1,2,3,4,5,6,7,8 PZR-T ile pozitif kolonilerin görünümü.
Hat 9: Pürifiye sığır vebası virusu RBOK aşısı suyu nükleoprotein geninin görünümü. Hat 10: Lambda DNA *EcoRI/HindIII* marker



Şekil 2. %1.5'lük agaroz jelde rekombinant plazmid pSV-NP enzim kesim deneyleri ve PZR ile doğrulanması
Hat 1: Pürifiye SV-RBOK-NP geni. Hat 2: pSV-NP plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR ile çoğaltılan nükleoprotein geninin görünümü. Hat 3: pSV-NP plazmid DNA'sının *NheI* ve *SalI* enzim kesimleri. Hat 4: Rekombinant pSV-NP plazmidinin görünümü. Hat 5: Lambda DNA *EcoRI/HindIII* markeri

1 2 3 4 5



Şekil 3. Vero-pSV-NP hücre proteinlerinin Western immunoblotlama ile gösterilmesi

Hat 1: Renkli marker. Hat 2: Vero hücresi. Hat 3: Vero-pCI-neo. Hat 4: İnfekte Vero hücresi. Hat 5: Vero-pSV-NP hücresi.

Tartışma

Bu çalışmada sığır vebası virusu RBOK aşı suşu NP geninin ökaryotik hücrelerde açıklatılması amaçlanmıştır. Nükleoprotein virusların bir internal proteini olup viral infeksiyonlara karşı hücresel immunitenin uyarılmasında önemli bir yere sahiptir (5,6). Ayrıca NP proteinin belirlenmesi viral hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. Sığır vebası hastalığının etkili bir şekilde kontrolü ve eliminasyonu için infekte ve aşılı hayvanların serolojik olarak ayırt edilmesi önemli bir adımdır (15). Son yıllarda sığır vebası hastalığı ile etkili bir mücadelede rekombinant aşıların kullanımı gündeme gelmiştir (11). Fakat bu aşılar ile aşılamalarda aşılı hayvan ile infekte hayvan ayırt edilememektedir. Bununla beraber nükleoprotein ile hazırlanan teşhis amaçlı kitlerde rekombinant aşı ile aşılanmış ve hasta hayvanların birbirinden ayırt edilmesi kesin bir şekilde yapılmaktadır (5,6).

Bu çalışmada SV-RBOK nükleoproteini ökaryotik açıklama vektörüne yerleştirilerek geçici olarak açıklatılması sonucu yaklaşık 60kDa moleküler ağırlığındaki NP proteini western immunoblotting deneyi ile ortaya konuldu. İleriki aşamalarda NP proteinin memeli hücrelerinde seçiciliği belirleyen genetisin antibiyotiğe içeren ortamda devamlı açıklatılması sağlanarak, elde edilen proteinin pürifiye edilip tanı amaçlı ELISA kiti geliştirilmesi çalışmaları yapılabilir.

Kaynaklar

- 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. *Veterinary Microbiology* 1995; 44: 175-186.
- Bolat Y, Doymaz MZ. Veteriner Viroloji Ders Notları. 1998; 302-304.
- Fooks AR, Schadeck E, Liebert UW, Dowsett AB, Rima BK, Steward M, Stephenson JR, Wilkinson GWG. High-level of the measles nucleocapsid protein by using a replication-deficient adenovirus vector: Induction of an MHC-1 restricted CTL response and protection in a murine model. *Virology* 1995; 210: 456-465.
- Grubman MJ, Mebus C, Dale B, Yamanaka M, Yilma T. Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. *Virology* 1988; 163: 261-267.
- Ismail T, Ahmad S, D'souza-ault M, Bassiri M, Saliki J, Mebus C, Yilma T. Cloning and expression of the nucleocapsid gene of virulent Kabete O strain of rinderpest virus in baculovirus: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 1994; 198: 138-147.
- Kamata H, Ohkubo S, Sugiyama M, Matsuura Y, Kamata Y, Tsukiyama-Kohara K, Imoaka K, Kai C, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. Expression in baculovirus vector system of the nucleocapsid protein gene of rinderpest virus. *Journal of Virological Methods* 1993; 43: 159-166.
- Kamata H, Tsukiyama K, 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: 5-15.
- Marriott AC, Easton AJ. Reverse genetics of the paramyxoviridae. *Advanced in Virus Research* 1999; 53: 321-340.
- Özdarendeli A, Toroman ZA, Kuk S, Tonbak §, Bulut Y, Kalkan A. Polimeraz zincir reaksiyonu ile transforme bakteriyel kolonilerin belirlenmesi (PZR-Tarama). F.Ü. Tıp dergisi (basımda).
- Promega, Technical Bulletin Transfast Transfection Reagent. No: 260.

11. Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology* 1994; 204: 425-429.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork. 2001.
13. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. TRI Reagent. 1995; No 205.
14. Tatar N. Değişik ısı derecelerinde farklı sürelerde tutulan sığır vebası aşısının vero hücrelerinde aktivite kontrolü. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1994; 4: 5-25.
15. Walsh EP, Baron MD, Rennie LF, Monaghan P, Anderson J, Barrett T. Recombinant rinderpest vaccines expressing membrane-anchored proteins as genetic markers: Evidence of exclusion of marker protein from the virus envelope. *Journal of Virology* 2000; 74: 10165-10175.
16. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. Second Edition. 1992; 213-234.
17. Wertz WG, Perepelitsa PV, Ball LA. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95: 3501-3506.