

Sığır Vebası Virüsünün Füzyon Geninin Polimeraz Zincir Tepkimesiyle Çoğaltılması ve Bakteriyel Klonlanması*

Hakan BULUT

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

Mehmet Ziya DOYMAZ

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Yusuf BOLAT

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

Geliş Tarihi: 27.06.2000

Özet: Bu çalışmada polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) çoğaltılan sığır vebası virüsünün (rinderpest virus; RPV) füzyon (F) geninin klonlama vektörüne yerleştirilmesi ve rekombinant vektörün *Escherichia coli*'de klonlanması rapor edilmiştir. Bu amaçla; öncelikle RPV'in aşı suşu ile infekte edilen Vero hücrelerinden elde edilen viral RNA'lardan tersine transkripsiyon yöntemiyle cDNA kütüphaneleri oluşturuldu. Daha sonra, bu cDNA'lar ve füzyon genine özgül primerlerle gerçekleştirilen PCR ile RPV'in F geni çoğaltıldı. Çoğaltılan F geni ve klonlama vektörü olarak seçilen pUC19 plazmid *EcoRI-HindIII* enzimleriyle sindirildi. F geni T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak plazmid içerisine yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmid *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Transforme olan hücrelerin seçimi ve çoğaltılması ampisilin içeren Lurie-Bertani (LB) agar ile LB sıvı besi yerinde gerçekleştirildi. Rekombinant plazmidde (pUCF) F geninin varlığı, PCR ve enzim kesim yöntemleriyle doğrulandı.

Anahtar Sözcükler: Sığır vebası virüsü, füzyon geni, klonlama.

Amplification of the Fusion Gene of Rinderpest Virus by Polymerase Chain Reaction and Cloning in Bacteria

Abstract: In this study, amplification of the rinderpest virus (RPV) fusion (F) gene with polymerase chain reaction (PCR) and cloning of the F gene in *Escherichia coli* were reported. For this purpose, first total mRNA from Vero cells infected with vaccine strain of RPV was obtained and then cDNA from this mRNA preparation was acquired with reverse transcription. In PCR, cDNA from infected Vero cells and F gene specific primers were used and the F gene was amplified. Both the PCR product and the cloning vector pUC19 were cut with *EcoRI* and *HindIII* restriction enzymes. By using T4 DNA ligase, insert and vector were ligated. The resulting recombinant plasmid was used in the transformation of DH5 α competent *E. coli* cells. The transformed cells were inoculated onto Lurie-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin. The presence of the RPV-F gene in the recombinant plasmid pUCF was confirmed with both the PCR and restriction enzyme digestion assays.

Key Words: Rinderpest virus, fusion gene, cloning.

Giriş

Sığır vebası virüsü, ruminantlarda akut, ateşli, oldukça bulaşıcı ve yüksek oranda ölümle sonlanan hastalığın etkenidir. Hastalık sindirim sisteminin yaygın nekrozu ve erozyonu ile karakterize olup, hastalıkta klinik olarak kanlı ishal belirgindir (1). Etkin savaşım neticesinde, bu hastalık birçok ülkede tam olarak erdike edilmiştir. Ancak, hastalık ülkemizin de aralarında bulunduğu pek çok ülkede sığır yetiştiriciliğini tehdit eder durumdadır (2, 3).

Sığır vebası virüsü *Paramyxoviridae* ailesinin *Morbillivirus* cinsinde yer alır ve virüsün bu cinste bulunan insanlardaki kızamık (measles virus; MV), köpeklerin gençlik hastalığı (canine distemper virus; CDV) ve küçük ruminant vebası (peste des petits ruminants virus; PPRV) virüsleriyle yakın antijenik benzerliği bulunmaktadır. Bu nedenle, bu virüslere karşı oluşan antikorlar arasında çapraz tepkime oluşmaktadır (4, 5).

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) tarafından 127 nolu proje ile desteklenmiştir.

Paramyxoviridae ailesindeki virüsler genom olarak negatif anlamlı, tek iplikli RNA'ya sahiptirler. Viral genom tarafında en az 6 tane viral protein kodlanmaktadır. Bu proteinler; large (L), fosfoprotein (P), hemaglutinin (H), nükleokapsid (N), matriks (M) ve füzyon (F) proteinleridir (4, 5, 6).

Hemaglutinin ve F proteinleri paramiksoviruslerin zarında bulunan glikoproteinlerdir. Hemaglutinin proteini enfeksiyonun başlangıcında hedef hücre reseptörlerine virüsün bağlanmasını sağlamaktadır. Füzyon proteini ise virüsle hücre membranının kaynaşmasını sağlayarak virüsün hedef hücreye penetre olmasını temin etmektedir ve F proteini virüsün hücreden hücreye doğrudan geçişini sağlaması sebebiyle de persistan paramiksovirus enfeksiyonlarının oluşmasından sorumlu tutulmaktadır. Yukarıda belirtilen aktiviteleri sebebiyle, F proteini paramiksovirus enfeksiyonlarının oluşumunda gerekli bir proteindir (7, 8).

Virüsün endemilere sebep olduğu ülkelerde hastalıkla savaşmada en etkin yöntem koruyucu aşılamadır. Günümüzde, sığır vebası hastalığına karşı koruyucu amaçlı aşılamalarda yaygın olarak doku kültüründe zayıflatılmış canlı aşılar kullanılmaktadır ve bu aşıların immunizasyon etkinliği yüksektir. Ancak, üretiminin pahalı olması ve ısıya oldukça duyarlı bulunmaları bu aşıların dezavantajları olarak bilinmektedir (3). Özellikle mevcut aşıların ısıya duyarlılıkları, ülkemizin de aralarında bulunduğu ve hastalığın zaman zaman endemik olarak görüldüğü sıcak iklime sahip ülkelerde, aşılama programlarındaki aksama ve başarısızlıkların ilk sebebi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda RPV'ye karşı aşılamada kullanılmak üzere alternatif aşıların üretilmesi çalışmaları yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, çoğunlukla seçilmiş öncelikli hedefler RPV'nin H ve F proteinleridir (9, 10, 11, 12).

Bu çalışmada, RPV ile infekte Vero hücrelerinde elde edilen RNA'lar kullanılarak, tersine transkripsiyon ve PCR ile RPV'in F gen bölgesinin çoğaltılması, çoğaltılan F geninin pUC19 plazmidi içerisine yerleştirilmesi ve rekombinat plazmidle transforme edilen *E. coli* hücrelerinde F geninin klonlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre ve virüs; Yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero) % 10 fetal sığır serumu (Sigma, St. Louis, MO, ABD), 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin

içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da üretildi. Çalışmada virüs olarak RPV'in hücre kültürüne adapte aşısı suşu kullanıldı.

Toplam RNA izolasyonu; Tek tabaka oluşturan Vero hücreleri RPV aşısı suşu ile infekte edildi. Virüsün sitopatik etkisinin hücrelerin yaklaşık % 80'inde belirlendiği 3. günde infekte hücrelerde toplam RNA izolasyonu TRI reagent (Sigma) kullanılarak yapıldı (13).

Tersine Transkripsiyon ve PCR; RPV ile infekte Vero hücrelerinden izole edilen toplam RNA'lardan random heksanükleotitler kullanılarak RT kitiyle cDNA'lar elde edildi (14). Bu cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı ve F genine özgül ve enzim tanıma bölgelerini içeren primerlerle (F1; 5'-cau cau cau ccg aat tca cca tga aga tct tat tt-3' ve F2; 5'-cua cua cua cca agc ttc tac agt gac cgt ac-3') gerçekleştirilen 32 siklus PCR neticesinde, F geninin çoğaltılması gerçekleştirildi (15). Çoğaltılan F geni % 1,5'lük agaroz jelde etidyum bromid ile boyanarak belirlendi (16).

Füzyon Geninin Agarozda Purifiye Edilmesi; PCR ile çoğaltılan yaklaşık 1640 nükleotid uzunluğundaki F geni agaroz jelden purifiye edildi. Kısaca; PCR ürününün agaroz jelde elektroforezinden sonra UV ışık altında F bandı belirlendi. Bu bant kısmı kesildi ve kesilen jel kısmı 1,5 ml'lik tüplere bırakıldı. Tüpe jelin 5 katı volümde 20 mM Tris HCl (pH 8.0) ve 1 mM EDTA (pH 8.0) ilave edildi. Tüp 65 °C'ye ısıtıldı ve üstüne fenol-kloroform ilave edildi. Vorteksleme ve 4000 rpm'de 10 dak. santrifüjü takiben üsteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı. Sıvı fazın üstüne 10 M amonyum asetat ve etanol ilave edilip, tüp + 4 °C'de 1 gece beklemeden sonra 5000 rpm'de 20 dak. santrifüjle DNA elde edildi (16).

Füzyon Geninin pUC19 Vektörüne Yerleştirilmesi; Füzyon geninin klonlanmasında standart moleküler biyoloji yöntemleri kullanıldı (16). Klonlama vektörü olarak pUC19 plazmid ile çalışıldı. Plazmid, *E. coli* DH5α'ya CaCl₂ metoduyla transforme edildi. Bu amaçla, kompetan hücre olarak LB sıvı besi yerinde üretilen *E. coli*'nin DH5α suşu kullanıldı. Sıvı besi yerinde üretilen *E. coli* hücreleri CaCl₂'le kompetan hale getirildi ve bu hücrelerin üstüne agaroz jelde purifiye edilen pUC19 plazmid DNA'sı ilave edilip, hücreler 4 °C'de 30 dak. bekletildi. Daha sonra, hücreler 42 °C'de 45 sn tutularak, hücrelerin plazmid DNA'sı ile transformasyonu sağlandı. Bu işlemden sonra, hücreler 4 °C'de 2 dak. bekletilip, LB sıvı besi yerine daha sonra 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar pleytlerine ekildi ve transformasyona uğrayan *E. coli*

kolonileri tespit edildi. Bu kolonilerdeki hücrelerin ampisilin içeren LB sıvı besi yerinde üretilmesiyle plazmid DNA'ları elde edildi. Plazmid DNA'ları ve agarozda purifiye edilen F geni PCR ürünü *EcoRI-HindIII* enzimleriyle sindirildi. Restriksiyon enzimleriyle sindirimden sonra, hem insert hem de vektör DNA'sı agaroz jelde elektroforez edilip, saflaştırıldı. Füzyon geninin plazmid DNA'ya yerleştirilmesi, bakteriofaj T4 ligaz enzimi kullanılarak, 16 °C'de 12 saatte gerçekleştirildi.

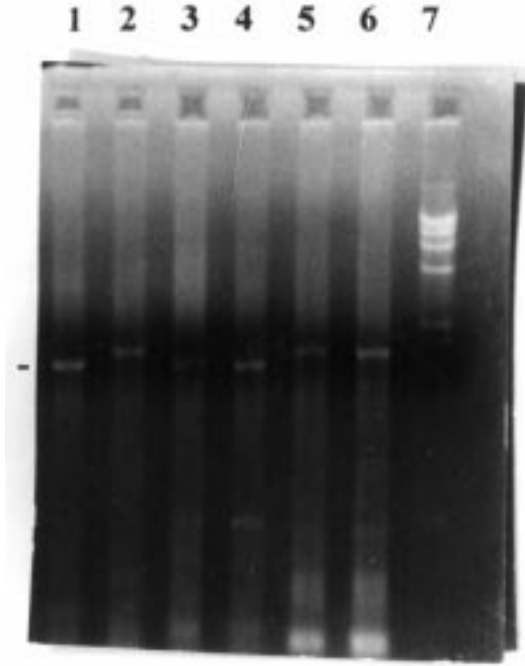
Rekombinant Plazmidin *E. coli*'ye Transformasyonu; Ligasyon işleminden sonra, elde edilen plazmidler $CaCl_2$ metoduyla *E. coli*'ye transforme edildi ve rekombinant plazmidle transformasyona uğrayan hücreler seçildi (16).

Rekombinant Plazmidde F Geninin Gösterilmesi; Ampisilinli besi yerinde çoğaltılan transforme *E. coli* hücreleri santrifüj edildi ve bu hücrelerdeki plazmid DNA'sı alkali lizis metoduna göre elde edildi (16). Rekombinant DNA'larda F geninin varlığı, ilk olarak bu DNA'ların *EcoRI-HindIII* enzimleriyle kesilmesinden sonra 1640 baz çifti (bp) uzunluğunda parçanın % 1,5'lük agaroz jelde gösterilmesiyle belirlendi. Ayrıca, rekombinant DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve F genine özgül primerlerle yapılan PCR sonucunda agaroz jelde 1640 bp DNA gösterildi. Rekombinant plazmid DNA'larda F geni bulunduğunu göstermek için ise ek bir doğrulama deneyi olarak, bu gen üzerinde tek tanıma bölgesine sahip olan *KpnI* enzimiyle de kesim yapıldı. F geni üzerinde tek bir *KpnI* enzimi tanıma bölgesi bulunmaktadır ve *KpnI* ile sindirilme sonunda 545 ve 1096 bp uzunluğunda iki parça elde edilmektedir.

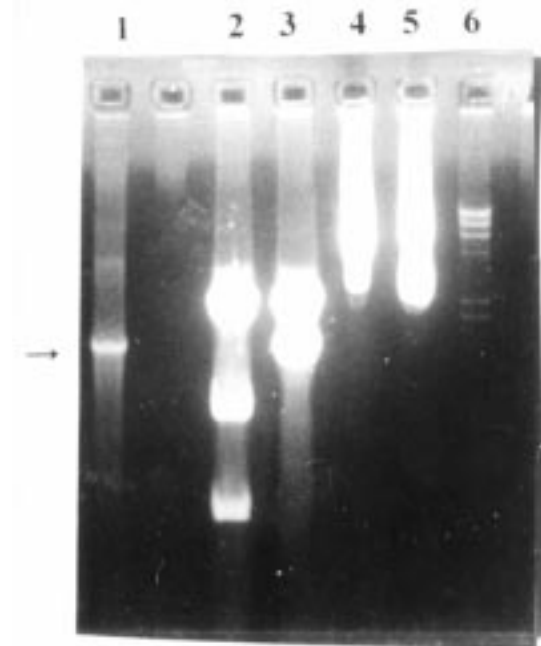
Bulgular

Sığır vebası virüsüyle infekte Vero hücrelerinden elde edilen toplam RNA'ların tersine transkripsiyondan sonra, füzyon genine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu neticesinde yaklaşık 1640 bp uzunluğunda F geni elde edilmiştir (Şekil 1).

Füzyon geninin pUC19'a ligasyonu ve bu ligasyon ürünlerinin *E. coli*'ye transformasyonundan sonra elde edilen rekombinant plazmid pUCF DNA'sı içinde F geninin varlığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen PCR ve restriksiyon enzimi kesim analizleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Rekombinant plazmid pUCF DNA'sıyla gerçekleştirilen PCR deneyinde yaklaşık 1640 bp gen segmenti agaroz jelde belirlenmiştir (Şekil 2, Hat 1).



Şekil 1. RT-PCR ürünlerinin % 1,5'lik agaroz jelde elektroforezi. **Hat 1-3 ve 4;** rinderpest virüs F geni, **Hat 2, 5 ve 6;** rinderpest virüs H geni. **Hat 7;** *HindIII* ile kesilmiş Lambda DNA markeri.



Şekil 2. pUCF'in F geni içerdiğinin PCR ve enzim kesim yöntemiyle gösterilmesi. **Hat 1:** 1640 bp'lik PCR ürünü. **Hat 2;** *EcoRI-HindIII* ve *KpnI*'le kesilen pUCF. **Hat 3;** *EcoRI-HindIII* ile kesilen pUCF. **Hat 4;** kesilmemiş rekombinant pUCF. **Hat 5;** kesilmemiş pUC19 plazmid DNA'sı. **Hat 6;** *HindIII* ile kesilmiş Lambda DNA markeri.

Rekombinant plazmid pUCF DNA'sının *EcoRI-HindIII* ve *KpnI* enzimleriyle kesilmesi neticesinde plazmid DNA'ya ilave olarak 545 ve 1095 bp uzunluğunda gen segmentleri elde edilmiştir (Şekil 2, Hat 2). Rekombinant plazmid pUCF DNA'sının *EcoRI-HindIII* enzimleriyle kesilmesinden sonra da 1640 bp'lik F geni saptanmıştır (Şekil 2, Hat 3). Polimeraz zincir tepkimesiyle çoğaltılan F geninin pUC19'a yerleştirilmesi sonucunda yaklaşık 4326 bp'lik rekombinant plazmid DNA'sı % 1,5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 2, Hat 4).

Tartışma

Füzyon proteini *Paramyxoviridae* ailesindeki virüslerin zarında bulunan ve virüs infeksiyonunun şekillenmesinde önemli olan bir glikoproteindir. Bu protein hücreye bağlanan virüsün hücre içerisine girmesini sağlamaktadır. Ayrıca, virüsün infekte hücrelerden komşu hücrelere doğrudan geçişi F proteininin fonksiyonu ile gerçekleşmektedir (7, 8). Virüs infeksiyonunun oluşmasındaki rolüne ilave olarak, füzyon proteini konakçıda koruyucu immun yanıtın şekillenmesinde de önemlidir. Bu proteine karşı oluşan antikorlar virüsü nötralize etme yeteneğindedir. Bu nedenle, RPV'üne karşı etkili bir immun yanıtın söz edebilmek için öncelikli olarak konakçıda H ve F proteinine özgül antikorların oluşması temin edilmelidir (4, 5, 7, 8, 17).

Gerek virüsün yaşam siklusundaki gerekse konakçı immun yanıtındaki önemi nedeniyle, F geninin klonlanması ve açıklatılması, rekombinant DNA yöntemleriyle elde edilen F proteinin subunit aşılarda kullanımlarıyla ilgili bir çok çalışma rapor edilmiştir (12, 16, 17, 18, 19).

Yapılan çalışmalarda, RPV'in F mRNA'sının birden fazla açık okuma bölgesine (open reading frame; ORF) sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, ikinci sinyalden başlayan 1640 nt'lik gen kısmının açıklanmasıyla 62 kDa moleküler ağırlığında bir ön proteinin (Fo) ortaya çıktığı ve bu yapısı ile bu proteinin fonksiyonel olmadığı belirtilmiştir. Sentezden sonra, bu protein hücresel proteazlarla fonksiyonel formlara (F₁ ve F₂) kesilmektedir (18, 20, 21, 22). Bu nedenle, bu çalışmada PCR için primerler seçilirken 1640 nükleotitlik Fo geninin çoğaltılması amaçlanmış ve bu kısmın klonlanması gerçekleştirilmiştir.

Mevcut çalışmada, PCR'la çoğaltılan ürünlerin klonlanması için pUC19 plazmidi kullanılmış ve F geninin klonlanması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Füzyon geninin açıklama plazmidine yerleştirilmesi ve açıklatılması çalışmaları devam etmektedir. Açıklatılması düşünülen F proteininin tanısal kitlerin hazırlanmasında ve immunizasyon çalışmalarında kullanımı öncelikli amaçtır.

Kaynaklar

1. Fenner, F. J., Gibbs, E. P. J., Murphy, F. A., Rott, R., Studdert, M. J., and White, D. O.: *Paramyxoviridae*. Veterinary Virology. Academic Press, California. 471-487, 1993.
2. Buharalyar, N., and Okay, G.: The Control of Rinderpest in Turkey. Cento Seminar on Viral Diseases. 35-38, 1972.
3. Scott, G. R., Taylor, W. P., and Rossiter, P. B.: Epizootiological Background. Manual on the Diagnosis of Rinderpest. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 3-7, 1986.
4. Chanock, R. M., and McIntosh, K.: Parainfluenzaviruses. Fields Virology. Raven Press, New York. 963-980, 1990.
5. Kingsbury, D. W.: *Paramyxoviridae* and Their Replication. Fields Virology. Raven Press, New York. 945-955, 1990.
6. Grubman, M. J., Mebus, C., Dale, B., Yamanaka, M., and Yilma, T.: Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. Virology. 1988; 163, 261-267.
7. Sugiyama, M., Minamoto, N., Kinjo, T., Hirayama, N., Asano, K., Tsukiyama-Kohara, K., Yoshikawa, Y., and Yamanouchi, K.: Antigenic and functional characterisation of rinderpest virus envelope proteins using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 1991; 72, 1863-1869.
8. Sugiyama, M., Minamoto, N., Kinjo, T., Hirayama, N., Sasaki, H., Yoshikawa, Y., and Yamanouchi, K.: Characterisation of monoclonal antibodies against four structural proteins of rinderpest virus. J. Gen. Virol. 1989; 70, 2605-2613.
9. Yamanaka, M., Hsu, D., Crisp, T., Dale, B., Grubman, M., and Yilma, T.: Cloning and sequence analysis of the hemagglutinin gene of the virulent strain of rinderpest virus. Virology. 1988; 166, 251-253.
10. Yilma, T., Hsu, D., Jones, L., Owens, S., Grubman, M., Mebus, C., Yamanaka, M., and Dale, B.: Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinants expressing the H or F gene. Science. 1988; 242, 1058-1061.
11. Hsu, D., Yamanaka, M., Miller, J., Dale, B., Gbubman, M., and Yilma, T.: Cloning of the fusion gene of rinderpest virus: Comparative sequence analysis with other *Morbilliviruses*. Virology. 1988; 166, 149-153.
12. Barrett, T., Belsham, G. J., Subbarao, S. M., and Evans, S.: Immunization with a recombinant vaccinia expressing the F protein protects rabbits from challenge with a lethal dose of rinderpest virus. Virology. 1989; 170, 11-18.

13. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. TRI Reagent. No 205. 1995.
14. Promega Technical Bulletin. AMP Reverse Transcriptase. No 502. 1993.
15. Evans, S., Baron, D., Chamberlian W., Goatley, L., and Barrett, T.: Nucleotide sequence comparisons of the fusion protein gene from virulent and attenuated strains of rinderpest virus. *J. Gen. Virol.* 1994; 75, 3611-3617.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.: *Plasmid Vectors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1.3-1.105, 1989.
17. Giavedoni, L., Jones, L., Mebus, C., and Yilma, T.: A vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus protects cattle against rinderpest and causes no pock lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88, 8011-8015.
18. Barrett, T., and Forsyth, M. A.: Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research.* 1995; 39, 151-163.
19. Bassiri, M., Ahmad, S., Giavedoni, L., Jones, L., Saliki, J. T., Mebus, C., and Yilma, T.: Immunological responses of mice and cattle to Baculovirus-expressed F and H proteins of rinderpest virus: Lack of protection in presence of neutralizing antibody. *J. Virol.* 1993; 67, 1255-1261.
20. Tsukiyama, K., Yasuhikawa, Y., and Yamanouchi, K.: Fusion glycoprotein (F) of rinderpest virus: Entire nucleotide sequence of the F mRNA, and several features of the F protein. *Virology.* 1988; 164, 523-530.
21. Kövamees, J., Blixenkron-Möller, M., Sharma, B., Örvell, C., and Norrby, E.: The nucleotide sequence and deduced amino acid composition of the haemagglutinin and fusion proteins of the *morbillivirus* phocid distemper virus. *J. Gen. Virol.* 1991; 72, 2959-2966.
22. Evans, S., Belsham, G. J., and Barrett, T.: The role of the 5' Nontranslated regions of fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *Virology.* 1990; 177, 317-323.