

Sığır Vebası Virüsü RBOK Aşı Suşu Matriks Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve TOPO® XL Klonlama Vektörüne Yerleştirilmesi*

Ahmet Kürşat AZKUR, Yusuf BOLAT

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

Mehmet Ziya DOYMAZ

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

Geliş Tarihi: 04.01.2002

Özet: Bu çalışmada sığır vebası virüsü (RPV) RBOK aşı suşu matriks (M) geni polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve TOPO® XL klonlama vektöründe klonlandı. Bu amaçla Vero hücreleri RPV aşı suşu ile infekte edilerek toplam RNA'lar elde edildi. Toplam RNA'lardan tersine transkripsiyonla M geni kopya DNA'ları (cDNA) çoğaltıldı. Matriks genine özgü primerler kullanılarak cDNA'lardan çoğaltılan M geni TOPO® XL klonlama vektörüne direkt yerleştirildi ve bu rekombinant DNA kompetan *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 hücrelerine transforme edildi. Rekombinant plazmid pTOPO XL'de M geninin bulunup bulunmadığını anlamak için, hem PZR tarama hem de enzim kesim deneyleri uygulandı.

Anahtar Sözcükler: Sığır Vebası, Matriks geni, Klonlama

Amplification of the Matrix Gene of RBOK Vaccine Strain of Rinderpest Virus (RPV) by Polymerase Chain Reaction and Cloning into TOPO® XL Cloning Vector

Abstract: In this study, the matrix (M) gene of the RBOK vaccine strain of rinderpest (RPV) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into TOPO® XL cloning vector. For this purpose, Vero cells were infected with the RBOK vaccine strain of RPV and total RNA was obtained from the infected cells. cDNA of the matrix gene was obtained by reverse transcription from the total RNA. Amplification of the cDNA with PCR was achieved by using the M gene specific primer and PCR products of the M gene were directly ligated into the TOPO® XL cloning vector and this recombinant plasmid DNA transformed into JM109 competent *E. coli* cells. To determine the presence of the M gene in the recombinant plasmid pTOPO XL, both PCR and restriction enzyme digestion assays were performed.

Key Words: Rinderpest, Matrix gene, Cloning

Giriş

Sığır vebası hastalığı sığırlarda mortalite ve morbiditesi % 95'den daha yüksek oranda seyreden viral bir hastalıktır. Hastalık ateş, kanlı ishal ve infekte hayvanların sindirim sistemi mukozasında erozyon ve ülserasyonla karakterizedir (1,2). Bu hastalık ülkemizin de aralarında bulunduğu birçok ülkede etkin savaşım neticesinde tam olarak eradike edilmesine rağmen, pek çok ülkede hala sığır yetiştiriciliğini tehdit etmektedir (3).

Paramyxoviridae ailesinin *morbillivirus* cinsi içerisinde yer alan sığır vebası virüsü (RPV), tek iplikli, negatif anlamlı genomun 3' ucundaki tek promotordan açıklanan bir yapıya sahiptir (1,4). Sığır vebası virüsü zarlı, helikal

nükleokapsit ile küresel bir morfolojiye sahip olup altı tane yapısal proteini vardır. Sığır vebası virüs proteinleri large (L), fosfoprotein (P), hemaglutinin (H), matriks (M), nükleoprotein (N), füzyon (F) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise virüsde yapısal olmayan C ve V olarak isimlendirilen iki protein daha bildirilmiştir (5). Transkripsiyon haritalama yöntemiyle, viral genom üzerindeki yapısal proteinleri kodlayan genlerin dizilişi 3' yönünden 5' yönüne doğru N-P-M-F-H-L olarak belirlenmiştir (2,5).

Matriks geni, 1457 nükleotid uzunluğunda olup yaklaşık 38 kDa ağırlığında M proteini sentezlemektedir. Glikolize olmayan M proteini nükleokapsid ve lipid

* Bu araştırma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimince (615 nolu proje) desteklenmiş olup, Ahmet Kürşat AZKUR'un doktora tezinin bir kısmında özetlenmiştir.

membran üzerinde bulunmaktadır. Matris proteinlerinin zarlı virüslerin tomurcuklanması ve kurgulanmasında önemli bir role sahip oldukları bilinmektedir (6,7). Paramiksovirüslerde M proteini viral RNA sentezi aşamalarını düzenlemekte, in vitro olarak hücresel aktin, viral nükleokapsid ve yüzey glikoproteinleriyle de etkileşmektedir (8,9). Bu sebeplerden dolayı M geni virüs patojenitesi ve virülensi üzerine etkilidir (6,8).

Klonlama çalışmaları gen manipülasyonlarına büyük kolaylık sağlamakla birlikte virüs biyolojisi, patojenitesi ve bağışıklık sistemi üzerindeki çalışmalara da imkan vermektedir (9-12).

Bu çalışmada, RPV ile infekte Vero hücrelerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak tersine transkripsiyon ve PZR ile RPV M gen bölgesinin çoğaltılması, çoğaltılan M geninin TOPO® XL klonlama vektörüne yerleştirilmesi, rekombinant vektörün *Escherichia coli* (*E. coli*) hücresine transforme edilmesi ve *E. coli* hücrelerinde M geninin klonlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre ve virüs: Yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero) % 10 fetal siğir 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 Etlik Araştırma Enstitüsünde üretilen hücre kültürüne adapte RPV RBOK aşı suşu kullanıldı.

Toplam RNA izolasyonu: Yirmibeş cm²'lik hücre kültür kabının yaklaşık % 60-70'i Vero hücreleri ile kaplandıktan sonra RPV aşı suşu ile infekte edildi. Virüsün sitopatik etkisi (CPE) her gün mikroskopta gözlemlendi. İnfeksiyonun 5. gününde hücrelerin yaklaşık % 80'inde CPE görüldüğünde, bu hücreler kullanılarak toplam RNA izolasyonu steril şartlar altında üretici firmanın önerisi doğrultusunda TRI reagent (Sigma) ile yapıldı (13).

Tersine Transkripsiyon ve PZR: Öncelikle toplam RNA'lar kullanılarak M geninin protein kodlama bölgesine özgü primerler (M1:5'-ggg aat tcc cac cat ggc aga aat t -3' ve M2 5'-gga agc ttc cgt cga ccc tta cag gac ctt-3') ve tersine transkriptaz (Promega) enzimi ile cDNA'lar elde edildi (14). Primerlerin dizayn edilmesinde gen bankası X76186 siğir vebası RBOK aşı suşu gen diziliminden yararlanıldı (6). Elde edilen cDNA'lar PZR'da kalıp olarak kullanıldı. Bu aşamada 2 µl cDNA, 2 µl 10 pmol primer, 4 µl 1,25 mM dNTP (Promega), 5 µl 25 mM MgCl₂

(Promega), 5 µl 10X PCR buffer (Promega), 1 µl 2U Taq DNA Polimerazın (Promega), kullanıldığı 50 µl PZR karışımı hazırlandı. PZR işlemi 95 °C'da 2 dakikalık inkübasyonun ardından, 94 °C'da 1 dakika, 55 °C'da 1 dakika, 72 °C'da 3 dakikada, 35 siklus gerçekleştirildi. PZR işlemi bitiminde reaksiyon tüpleri 72 °C'da 8 dakika inkübe edildi. PZR ile çoğaltılan M geni % 1,5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (12).

Matris geninin agaroz jelden pürifikasyonu: PZR ile çoğaltılan M geni % 1,5'lik agaroz jelde ultraviyole (UV) altında görüldü. Matris genini içeren agaroz jel bölgesi steril bisturi ile kesilerek mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip Wizard® PCR Preps DNA purification System (Promega) kullanılarak pürifiye edildi (15).

Matris geninin TOPO® XL klonlama vektörüne yerleştirilmesi ve *E. coli*'ye transformasyonu: Jelden pürifiye edilmiş M geninin 4 µl'si ile 1 µl pCR®-XL-TOPO® vektöründen (Invitrogen) hazırlanan karışım mikrosantrifüj tüpüne konularak 5 dakika ligasyon için inkübe edildi. Reaksiyon 1 µl 6X TOPO durdurma solüsyonu ilave edilerek sonlandırıldı. Önceden RbCl (Sigma) metoduna göre hazırlanan, kompetan JM109 hücrelerinin 100 µl'sine, 6 µl ligasyon ürünü ilave edildi ve yarım saat bekletildi (16). Bu inkübasyon periyodunun ardından 42 °C'da 2 dakikalık ısı şoku uygulanarak plazmidin *E. coli*'ye transformasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra hücre porlarını tekrar kapatmak için hücreler 4 °C'da 2 dakika bekletildi. Hücrelerin üzerine 400 µl Lurie-Bertani (LB) sıvı besiyeri ilave edilerek 1,5 saat 37 °C'da sallayıcı üzerinde inkübe edildi. Transforme hücreler 60 µg/ml kanamisin içeren LB katı besiyerine ekildi ve 37 °C'da 1 gece bekletilerek selekte edildi.

PZR tarama ve kesim enzimleri ile doğrulama: Miniprep öncesinde kolonilerin M genini taşıyıp taşımadığını öğrenmek için PZR tarama deneyleri yapıldı (17). Kanamisinli katı besiyerinde üreyen kolonilerin istenilen rekombinant plazmidler olup olmadığını belirlemek için öncelikle kolonilere steril kürdan değiştirilip, koloniler numaralandırılmış başka bir kanamisinli katı besiyerine ekildi. Daha önceden hazırlanan 2 µl 25 mM MgCl₂ (Promega), 2 µl 10X PCR buffer (Promega), 3 µl 1,25 mM dNTP (Promega), 4 µl 10 pmol/µl M genine özgü primerler ve 4 µl dH₂O içeren karışıma besiyerindeki koloni kürdan vasıtasıyla ilave edilip 95 °C'de 10 dakika tutuldu. Buradan mikrosantrifüj tüpleri kısa süreli santrifüj edildikten sonra içerisinde 0,3 IU Taq polimeraz bulunan (Promega) 5 µl dH₂O eklenip,

mineral yağ damlatıldı. Tüpler 95 °C'da 5 dakika, 94 °C'da 1 dakika, 55 °C'da 1 dakika, 72 °C'da 1 dakika 25 siklus PZR tarama uygulandı. PZR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülendi. PZR tarama sonuçlarına göre rekombinant plazmidleri içerdiği belirlenen kolonilerden plazmid DNA'ları alkali lizis metoduyla elde edildi (12). Ek bir doğrulama deneyi olarak rekombinant plazmidlerde M geninin varlığı *EcoRI-Sall*, *Sall*, *HindIII* enzim kesimleri ile teyit edildi (12).

Bulgular

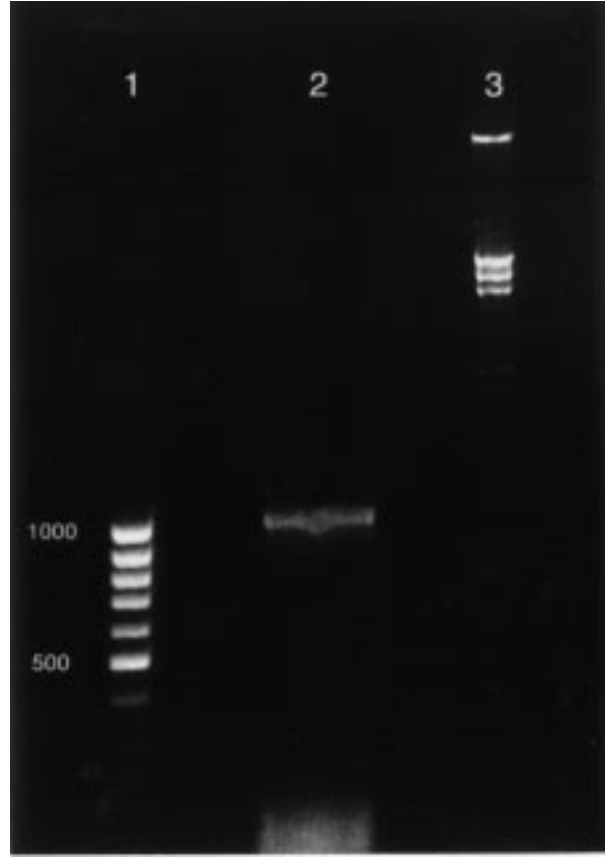
Bu çalışmada, sığır vebası virüsü ile infekte edilen Vero hücrelerinde infeksiyonun 5. gününde yaklaşık olarak % 80 oranında CPE gözlemlendi. Bu aşamada infekte hücrelerden toplam RNA'lar elde edildi ve M genine özgü primerlerle tersine transkripsiyon gerçekleştirildi. Bu cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PZR aşamasından sonra yaklaşık 1038 bazlık M geni elde edildi (Şekil 1 hat 2).

Matriks geninin TOPO vektörüyle ligasyona tabi tutulup kompetan *E. coli*'ye transformasyonundan sonra elde edilen rekombinant plazmidlerin belirlenmesi amacı ile öncelikle PZR tarama yapıldı (Şekil 2 hat 2,3,4). Aynı çalışmada ek doğrulama deneyi olarak rekombinant plazmidlerin *EcoRI-Sall* enzimleri ile kesilmesinden sonra istenilen 1038 bazlık M geni elde edildi (Şekil 3 hat 4).

TOPO klonlama vektöründe *Sall* enzim kesim bölgesi bulunmamasına rağmen rekombinant plazmid DNA'sında *Sall* kesim bölgesinin varlığı kesim deneyleri ile gösterildi (Şekil 3 hat 3). *HindIII* enzimi ile yapılan kesim deneylerinde ise yaklaşık 1100 bazlık M geni gösterildi (Şekil 3 hat 5). Aynı zamanda bu büyüklükte çıkan parça klonlama vektörüne M geninin doğru bir oryantasyonda yerleştiğini göstermektedir. TOPO vektörü 3519 bazlık olup M geninin yerleşmesiyle yaklaşık 4557 bazlık bir rekombinant vektör elde edildi (Şekil 3 hat 2). Bu vektör pTOPO XL Matriks diye isimlendirildi.

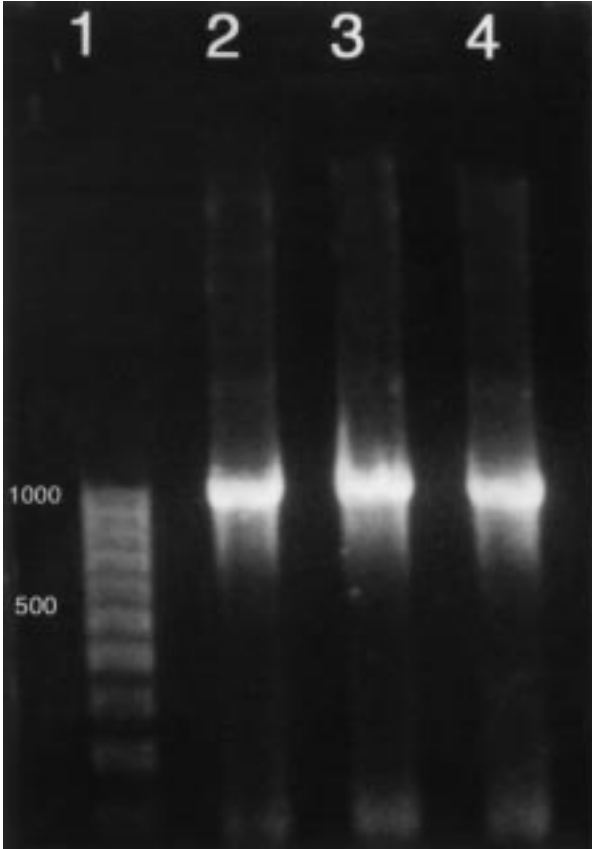
Tartışma

Paramyxoviridae ailesinin morbillivirüs cinsi içerisinde yer alan sığır vebası virüsünün kızamık, köpek gençlik hastalığı ve küçük ruminant vebası virüsleri ile antijenik yakınlığı olduğu bilinmektedir (1,18). Yapılan çalışmalarda M geninin morbillivirüslerde iyi derecede korunmuş olduğu bilinmektedir (6).



Şekil 1. % 1,5'lik agaroz jelde matriks geninin gösterilmesi. Hat 1; 100 baz'lık ladder DNA, Hat 2; Matriks geni, Hat 3; Lambda DNA *HindIII* marker.

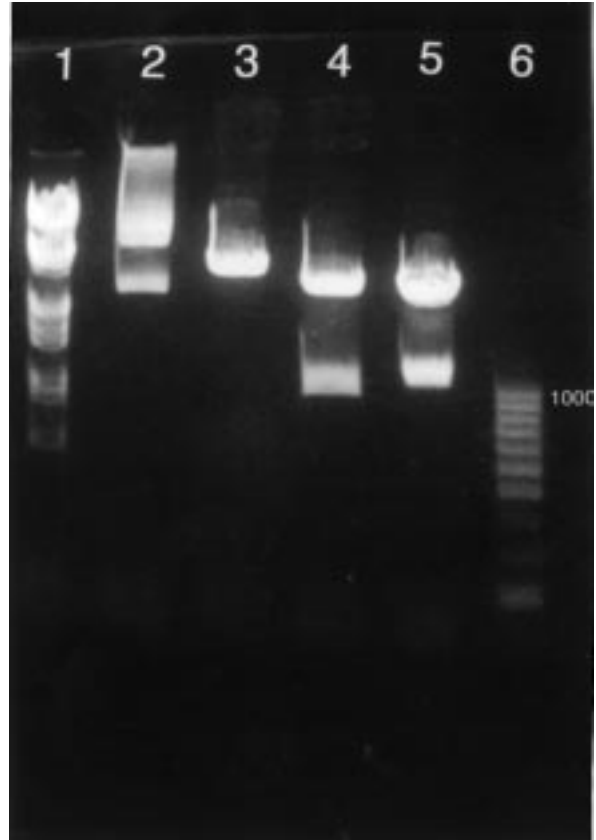
DNA topoizomerazlar prokaryotik ve ökaryotik hücreler içerisinde bulunan bir enzimdir. Bu enzimler DNA'nın kimyasal kompozisyonunda herhangi bir değişiklik yapmaksızın DNA'nın farklı topolojik izomerleri arasındaki değişimleri katalizlemektedir. Topoizomerazlar bir yada iki DNA molekülünü keser ve daha sonra çift heliks yapısını döndürerek yapıyı ya sıkıştırır yada gevşetir. Topoizomerazlar pozitif yada negatif süper sarmal yapıları bozabileceği gibi DNA molekülünü pozitif süper sarmal hale de getirebilir (19). Topoizomerazların bu özelliklerinden yararlanılarak direkt PZR ürünü yada pürifiye PZR ürününü klonlama vektörüne yerleştirmek mümkün olmaktadır. (C/T)CCTT dizisini tanıyan TOPO klonlama vektöründe Vaccinia virüsün topoizomeraz I enzimi kullanılmaktadır. Bu enzimle muamele edilen DNA kesilmekte ve 3' fosfotirozil bağ ile başka bir DNA molekülünün serbest 3' ucu birleşmektedir. Linear yapıda bulunan klonlama vektöründeki 3' ucuna asılı Timidin (T), 3' uçlarına Adenozin (A) eklenmiş PZR ürünleri ile birleşir (19,20).



Şekil 2. % 1,5'lik agaroz jelde PZR taramanın gösterilmesi.
Hat 1; 100 baz'lık ladder DNA, Hat 2, 3 ve 4; PZR tarama ile pozitif koloniler.

Bu özelliklerinden dolayı topoizomeraz klonlama vektörü, klonlama çalışmasında emek ve zaman açısından büyük kolaylık sağlamıştır.

Mevcut çalışmalarda primerleri oluştururken 5' ucuna *EcoRI* enzim kesim bölgesi, 3' ucuna ise *HindIII* ve *Sall* enzim kesim bölgeleri yerleştirildi. Böylece planlanan protein açıklanması çalışmalarında birçok memeli açıklama vektörünün kullanılmasına da olanak sağlanmıştır. Bu tür çalışmalar M geninde yapılacak manipülasyonlara ve mutasyon çalışmalarına da imkan



Şekil 3. % 1,5'lik agaroz jelde pTOPO XL Matriks'in kesim enzimleriyle doğrulanması.
Hat 1; Lambda DNA *EcoRI HindIII* marker, Hat 2; Kesilmemiş pTOPO XL Matriks, Hat 3; pTOPO XL Matriks'in *Sall* enzim kesimi, Hat 4; pTOPO XL Matriks'in *EcoRI-Sall* enzim kesimi, Hat 5; pTOPO XL Matriks'in *HindIII* enzim kesimi, Hat 6; 100 baz'lık ladder DNA.

vermektedir. Açıklama çalışmalarının devamında protein pürifikasyonları, monoklonal antikor elde edilmesi, DNA immunizasyonları çalışmalarının yapılması düşünülmektedir. Bununla birlikte bu çalışmada, M geninin klonlanması ülkemizde gen kütüphanesi oluşturma çabalarının bir parçası olarak da değerlendirilmelidir.

Kaynaklar

1. Bolat, Y., Doymaz, M.Z.: *Paramyxoviridae* Ailesi. Fırat Üniv. Vet. Fak. Viroloji Ders Notları, Fırat Üniv. Yayınları, Elazığ. 302-304, 1998.
2. Fenner F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O.: *Paramyxoviridae* Veterinary Virology, Academic Press, California. 471-487, 1993.
3. F.A.O.: Transboundary Animal Diseases Bulletin. 1999; 9: 1-25.
4. Grubman, M.J., Mebus, C., Dale, B., Yamanaka, M., Yilma, T.: Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus infected cells. *Virology*. 1988; 163(2): 261-267.
5. Baron, M.D., Barrett, T.: Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J. Virol.* 2000; 74(6): 2603-2611.

6. Baron, M.D., 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 (1): 121-129.
7. Garoff, H., Hewson R., Opstelten E.D.: Virus maturation by budding. *Mic. Mol. Bio. Res.* 1998; 62(4): 1171-1190.
8. Limo, M., Yilma, T.: Molecular cloning of the rinderpest virus matrix gene: Comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *Virology*. 1990; 175(1): 323-327.
9. Vincent, S., Gerlier, D., Manie, N.S.: Measles virus assembly within membrane rafts. *J. Virology*. 2000; 74(21): 9911-9915.
10. Conzelmann, K.K.: Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 1996; 77 (3): 381-389.
11. Bulut H., Doymaz M.Z., Bolat, Y.: Sığır vebası virüsünün füzyon geninin polimeraz zincir tepkimesiyle çoğaltılması ve bakteriyel klonlanması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2001; 25: 533-537.
12. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
13. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. TRI Reagent. No 205. 1995.
14. Promega Technical Bulletin. AMP Reverse Transcriptase. No 502. 1993.
15. Promega Technical Bulletin. Wizard PCR preps DNA purification system. No 118. 1999.
16. Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *S. Mol. Biol.* 1983; 166(4): 557-580.
17. Hofmann, M.A., Brain, D.A.: Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques*. 1991; 11(1): 30-31.
18. Sheshberadaran, H., Norrby, E., McCullough, K.C., Carpenter, W.C., Orvell C.: The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 1986; 67: 1381-1392.
19. Shuman, S.: Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(51): 32678-32684.
20. Brownstein, M.J., Carpten, J.D., Smith, J.R.: Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Bio. Techniques*. 1996; 20 (6): 1004-1010.