

Sığır Vebası Virüsü Rekombinant Hemagglutinin Proteininin Enzim İmmunoassayda Kullanımı

Hakan BULUT, Yusuf BOLAT

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

Yasemin BULUT, Aykut ÖZDARENDELİ, Mehmet Ziya DOYMAZ

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

Geliş Tarihi: 08.04.2002

Özet: Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un protein A bölgesiyle füzyon edilmiş şekilde *Escherichia coli*'de açıklanan ve IgG affinitisi kromatografisiyle saflaştırılan sığır vebası virüsünün (rinderpest virus; RPV) rekombinant hemagglutinin (rH) proteininin enzim immunoassayda (EIA) kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla, rH proteininin N'-ucunda bulunan protein A'ya özgül olmayan IgG bağlanmalarını engellemek için, rH bağlı EIA kapları önce insan serumuyla bloklanmıştır. Daha sonra, rH proteini ve RPV antijeni bağlı EIA kaplarında deneysel immunize fare serumlarına ait absorpsiyon değerleri kıyaslanmıştır. Çalışmanın sonuçları, çalışmamızda rapor edilen yöntemin stafilokokal protein A bölgesine sahip rH proteininin immünojenik deneylerde güvenilir bir şekilde kullanılma imkanı sağlandığını göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Sığır vebası virüsü, rekombinant hemagglutinin proteini, enzim immunoassay

The Use of Recombinant Hemagglutinine Protein of Rinderpest Virus in Enzyme Immunoassay

Abstract: In this study, Rinderpest virus (RPV) recombinant hemagglutinine protein (rH) fused with protein A region of *Staphylococcus aureus* was expressed in *Escherichia coli* and purified by IgG affinity chromatography. rH protein was also used to establish enzyme immunoassay. Therefore, to prevent IgG binding to the protein A the wells coated with the rH proteins were blocked by human serum. Afterwards, RPV antigens were added to the wells to evaluate this assay. To this end, serum from mice immunized with RPV was used for EIA. Our data indicated that the rH protein fused with protein A of *Staphylococcus aureus* can be reliably used for enzyme immunoassays.

Key Words: Rinderpest virus, recombinant hemagglutinine protein, enzyme immunoassay

Giriş

Sığır vebası hastalığı, ülkemizde uzun yıllardır devam ettirilen etkin savaşımın sonucunda eradike edilmiş olmakla birlikte, bazı Asya ve Afrika ülkelerinde eradikasyonu başaramadığı için, ülkemiz hayvancılığı için potansiyel tehdit oluşturmaktadır (1). Ancak, ülkemizde bu virüsle yapılan çalışmalar nispeten sınırlı kalmaktadır.

Sığır vebası virüsünün (RPV) bazı proteinleri değişik laboratuvarlarca klonlanmış ve açıklanmıştır (2,3). Daha önceki çalışmalarımızda, virüsün infekte edeceği hücreye bağlanma sırasında kullandığı ve en önemli antijenik proteini olan hemagglutinin (H) proteininin klonlanması ve *Escherichia coli*'de açıklanması gerçekleştirilmiştir (4). Bu proteinle ve proteini ökaryotik sistemlerde açıklama

kapasitesine sahip plazmidlerle yapılan immunizasyon çalışmaları devam etmektedir. Elde edilen protein, affinite kromatografisinde saflaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla, *Staphylococcus aureus*'un protein A bölgesiyle füzyon edilmiş şekilde açıklanmıştır. Dolayısıyla, mevcut formuyla bu protein, insan, fare, rat ve sığır gibi bazı türlerin IgG izotipi antikorlarına bağlanma özelliği taşımaktadır ve bu antikorları üzerinde taşıyan kolon kromatografisi ortamında kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Bu özelliğin dezavantajı ise, saflaştırılma sonunda elde edilen bu proteinin EIA ve immunoblot gibi deneylerde kullanılması durumunda, bu deneylerde kullanılan birincil ve ikinci antikorların bu proteine özgül olmayan bir şekilde bağlanmalarıdır (5). Bu durum sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Örneğin, H

proteinine özgül antikor içermeyen serum örnekleri de pozitif sonuç üretmektedir. Ayrıca, deneylerde görüntüleme aşamasında kullanılan etiketli antikorlar özgül olarak birincil antikorlara bağlanmak yerine katı fazda bulunan ve üzerinde IgG bağlanma bölgesini bulduran rekombinant H proteinine bağlanmaktadır.

İnsan IgG'sinin stafilokokal protein A'ya yüksek bağlanma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (6). Bu nedenle, *Staphylococcus aureus*'un protein A bölgesine sahip rekombinant proteininin teşhis amaçlı kullanımı ile ilgili yukarıda bahsedilen problemi aşmak için, bu çalışmada EIA'da insan serumu kullanılmıştır.

Bu çalışmada *Staphylococcus aureus*'un protein A bölgesiyle füzyon edilmiş şekilde *E. coli*'de açıklatılan ve IgG affinitisi kromatografisiyle saflaştırılan sığır vebası virüsünün rekombinant hemaglutinin (rH) proteininin enzim EIA kullanımı amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Rekombinant Hemaglutinin Proteininin Üretilmesi: Sığır vebası virüsünün H genini bulduran rekombinant pEZZ 18 vektörüyle (pRPVH4) transforme edilen *E. coli* hücrelerinde N'-ucunda *Staphylococcus aureus*'un protein A IgG bağlanma bölgesini taşıyan H proteininin açıklatılması daha önce belirtildiği gibi gerçekleştirildi (4).

Rekombinant H (rH) proteininin affinite saflaştırması için IgG bağlı sefaroze boncukları (IgG Sepharose, 6 Fast Flow, Pharmacia, Upsala, İsveç) kullanıldı. Elde edilen H proteini % 10'luk sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) göç ettirildi ve Coomassie Brilliant mavisıyla boyamasıyla görüntülendi (4).

Test Serumları: Bu çalışmada, RPV ve saflaştırılmış rH proteini ile immunize edilen fare serumları kullanıldı. Sığır vebası virüsü, RBOK aşısı suşuyla infekte edilmiş Vero hücrelerinden infeksiyonun 4. gününde alınan kültür üst sıvılarından elde edildi ve kısmen saflaştırıldı (7). Kısmen saflaştırılmış virüs ve affinite saflaştırılmış rH protein preparatlarının protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle tayin edildi (4). Affinite saflaştırılmış H proteini ve kısmen saflaştırılmış RPV ile immunizasyonlar (100 µg protein/fare, 100 µl volümde), 10'ar adet 6-8 haftalık dişi Balb/c farelerine intraperitoneal yolla yapıldı ve immunizasyonlar 15 gün aralıklarla 3 kez tekrarlandı. Son immunizasyondan 7 gün sonra, farelerden kan alınarak serumlar çıkartıldı ve kullanılıncaya kadar – 20

°C'de saklandı. Negatif test serumları aynı immunizasyon şeması kullanılarak 0,1 M fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS, pH 7,2) ile immunize edilen 5 fareden elde edildi (8).

Poliklonal antikorlara kıyasla özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle, H proteinine özgül bir monoklonal antikor (Mak) da pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Enzim İmmunoassay: Çalışmada 96 kuyulu EIA kapları (Costar, Corning Co., NY, A.B.D.) affinite saflaştırılmış rH veya EIA için uygun RPV antijeni (Hayvan Sağlığı Enstitüsü, Pirbright, UK) ile kaplandı. Bu amaçla her kuyucuğa 50 µg/ml konsantrasyonda sulandırılmış rH proteini veya viral protein içeren karbonat solüsyonu (0,05 M karbonat/bikarbonat pH 9,6) eklendi. Antijenlerin kuyucuklara bağlanması için, EIA kapları 4 °C'de bir gece bekletildi. Saflaştırılmış RPV antijenleriyle kaplı kuyucuklara 50 µl % 5 yağsız süt tozu içeren PBS, rH proteini bağlı kuyucuklara ise önce % 5 insan serumu ve daha sonra % 5 yağsız süt tozu içeren PBS eklenerek 37 °C'de birer saat inkube edildi. Bloklamaları takiben, kuyucuklara 50 µl 1/200 sulandırılan fare test serumları eklendi. Anti-H Mak ile test edilen kuyucuklara 1/2 oranında sulandırılan Mak üst sıvısı bırakıldı. İnsan serumu eklenen ve eklenmeyen rH bağlı kapların bazı kuyucuklarına ise, test serumları konmadan doğrudan etiketli antikorlar (peroksidaz ile işaretli tavşan anti-fare IgG, SIGMA Chemical Co., St Louis, MO., A.B.D) ilave edildi. Bu aşamadan sonraki adımlar daha önce belirtildiği şekliyle gerçekleştirildi (8). Kuyucuklardaki reaksiyonlar spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değeri olarak tespit edildi. Her örnek 2 ayrı kuyucukta test edilerek, her örnek için ortalama OD belirlendi.

Bulgular

Affinite saflaştırılmış rH proteini ve RPV antijeni bağlı EIA kaplarında test edilen fare serumlarına ve anti-H Mak ait ortalama absorbans değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre, insan serumuyla blokama yapılmayan rH proteini bağlı kuyucukların tümünde benzer absorbans değerleri oluşmuştur. Aynı kuyucuklara primer serumlar (fare test serumları) eklenmeden yalnızca sekonder serum (peroksidaz ile işaretli tavşan anti-fare IgG) eklenmesi halinde de yüksek OD değerleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, antijene özgül bağlanma olmaksızın, fare IgG'sinin ve sekonder serumdaki

Tablo 1. Enzim Immunoassay sonuçları. *Affinite saflaştırılmış rH proteini kaplı, insan serumuyla bloklanmamış (I) ve bloklanmış (II) EIA kapları ile RPV antijeni bağlı (III) EIA kaplarında teste edilen fare serumları ve anti-H Mak ait ortalama absorpsiyon değerleri.

	RPV imm. Fare	rH imm. fare	PBS imm. fare	Mak	Sekonder antikor
I*	0,87 ± 0,045	1,15 ± 0,070	0,76 ± 0,035	1,3 ± 0,050	0,65
II*	0,97 ± 0,060	1,23 ± 0,080	0,12 ± 0,040	1,35 ± 0,030	0,0
III	1,45 ± 0,120	0,78 ± 0,085	0,08 ± 0,030	0,95 ± 0,030	0,05

IgG'lerin protein A'ya bağlandığını göstermektedir. İnsan serumuyla bloklamadan sonra yapılan testte ise negatif fare serumları (PBS immun) $0,120 \pm 0,040$ ortalama OD değeri verirken, virüsle immun fare serumları $0,970 \pm 0,060$, rH proteini ile bağışıklanmış fare serumları $1,230 \pm 0,080$ ve anti-H Mak ise $1,570 \pm 0,030$ absorpsiyon değerleri vermiştir.

Çalışmada ayrıca, rH proteini ile elde edilen sonuçlarının kıyaslanması için pozitif katı faz antijeni olarak RPV antijeni kullanılmıştır. Bu antijenle bağlanan kuyucuklarda test edilen serumlara ait OD değerler de tabloda gösterilmiştir. Bu kuyucuklarda test edilen negatif serum örneklerinin ortalama $0,080 \pm 0,030$, RPV ile bağışık fare serumlarının ortalama $1,450 \pm 0,120$, rH ile bağışıklanmış fare serumlarının ortalama $0,780 \pm 0,085$ ve Mak'un ise ortalama $0,965$ OD ile tespit edilen tepkime verdikleri gözlenmiştir.

Tartışma

Bu çalışmanın sonuçları, insan serumu kullanılarak, rH proteini üzerindeki IgG bağlanma bölgelerinin kaplanabileceğini ve böylelikle füzyon proteini şeklinde üretilen rekombinant proteinin EIA'da kullanılabilir hale geleceğini göstermektedir. Söz konusu probleme en ideal çözüm, rekombinant proteinlerin doğal şekillerine olabildiğince yakın bir biçimde üretilmeleridir (9,10). Sığır vebası H proteini için bunun anlamı, proteinin füzyon proteini olarak değil, virionda bulunduğu şekliyle üretilmesidir. Ancak, doğal şekliyle üretilen proteinin sayı ve miktar olarak daha fazla olan bakteriyel proteinlerden ayrıştırılması gerekmektedir. Bu durumda, IgG bağlanma bölgesinin sağladığı avantajdan yararlanma zorunluluğu böyle bir klonlama metodunun seçilmesine yol açmıştır. Hemaglutinin proteinine özgü MAK'ların kullanıldığı bir affinite kromatografi dizaynı, bu problemin aşılmasını sağlayabilir. Bu yöndeki çalışmalarımız devam etmektedir. Bu tür bir kromatografinin kullanılması durumunda, H

füzyon proteini şeklinde değil, doğal H şekliyle açılarak, saflaştırılabilecektir. Histidin bağlanma protein gibi IgG bağlanma bölgesinin benzerleri, klonlama çalışmalarında kullanıla gelmiştir (10,11). Bu ligantlara eklenen rekombinant proteinlerin tek adımda saflaştırılması imkanı, araştırmacılar için pratik ve kolay bir metot olması itibarıyla tercih edilmiştir. Bu yöntemlerin dezavantajları ise meydana gelebilecek konformasyonel değişiklikler ve eklenen kısımların daha sonraki kullanım aşamasında proteinlerin işlevlerine müdahil olmasıdır. Rekombinant proteinlerin özellikle antijenitelerine olan etkiler önemli kabul edilmektedir. Daha önceki çalışmalarda, *Staphylococcus aureus* protein A IgG bağlanma bölgesinin, rekombinant proteinlerin antijenitesini etkilemediği gösterilmiştir (5,12). Bizim çalışmalarımızda da üretilen rH proteinin RPV virionları tarafından üretilen antikorlar ile tepkimeye girdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, bazı epitoplara değişikmiş olabileceği veya yeni epitoplara ortaya çıkmış olabileceği ihtimalini ortadan kaldırmamaktadır. Buna rağmen, doğal antijenik epitoplara en azından bazılarının korunduğu söylenebilir. Çalışmamızda üretilen rH proteini bakteriyel kaynaklı olması dolayısıyla glikozillenmemiş olarak kabul edilmektedir. Bu proteinin ayrıca hemaglutine edici işlevi de beklenmemektedir. Çünkü hemaglutinasyon virion üzerinde uygun biçimde glikozillenmiş ve trimer halindeki H proteininin bir işlevi olarak tanımlanmaktadır (13,14).

Bu çalışmada, test serumu olarak, sığır serumu yerine deneysel immun fare serumlarının kullanılmasının nedeni, ülkemizde 1999'dan beri sığır vebası aşılması yapılmamasıdır. Bu nedenle, mevcut EIA sisteminin sığırlarda aşı etkinliğinin tespiti amacıyla kullanımı gerçekleştirilememiştir. Bu amaca yönelik olarak, sığırlarda deneysel aşılama çalışmaları ve aşı etkinliklerinin mevcut rekombinant antijenlerle tespiti doğrultusunda çalışmalar devam ettirilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda rapor edilen yöntemle, RPV H proteininin immunolojik deneylerde güvenilir bir

şekilde kullanılma imkanı sağlanmıştır. Benzer problemlerle karşılaşılan test kurgularında da kullanılabilir bir yöntem olması nedeniyle, sonuçlar rapor edilmiştir.

Kaynaklar

1. Food and Agriculture Organization. Rinderpest Virus: Annual Animal Disease Status Handistatus II, 2000.
2. Yamanaka, M., Dale, B., Crisp, T., Cordell, B., Grubman, M., Yilma, T.: Sequence Analysis and Editing of the Phosphoprotein (P) Gene of Rinderpest Virus. *Virology* 1992; 190: 553-556.
3. Hsu, D., Yamanaka, M., Miller, J., Dale, B., Grubman, M., Yilma, T.: Cloning of the Fusion Gene of Rinderpest Virus: Comparative Sequence Analysis with Other Morbilliviruses. *Virology* 1988; 166: 149-153.
4. Doymaz, M.Z., Kılıç, A.O., Bulut, H., Özdarendeli, A., Bolat, Y.: Cloning and Prokaryotic Expression of Hemagglutinin Gene of Rinderpest Virus. *F. Ü. Sağlık Bil. Derg.* 2000; 14: 189-195.
5. Löwenadler, B., Jansson, B., Paleus, S., Holmgren, E., Nilsson, B., Moks, T., Palm, G., Josephson, S., Philipson, L., Uhlen, M.: A Gene Fusion System for Generating Antibodies Against Short Peptides. *Gene*. 1987; 58: 87-97.
6. Harlow, E., Lane, D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1985.
7. Barrett, T., Inglis, S.C.: *Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses. Virology, A Practical Approach*. Oxford, IRL Press. 119-150, 1991.
8. Doymaz, M.Z., Bulut, H., Özdarendeli, A., Bolat, Y.: Production and Characterization of Monoclonal Anti-Ovalbumin Antibodies. *Tr. J. Med. Sci.* 2000; 30: 411-416.
9. Brown, T.A.: *Gene Cloning: An Introduction*. London, Chapman & Hall. 1986.
10. Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M.: *Methods of Creating Recombinant DNA Molecules. Recombinant DNA*. New York, Scientific American Books. 63-75, 1992.
11. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
12. Nilsson, B., Forsberg, G., Hartmanis, M.: Expression and Purification of Recombinant Insulin-Like Growth Factors from *Escherichia coli*. *Meth. Enzym.* 1991; 198: 3-15.
13. Kingsbury, D.W.: *Paramyxoviridae Their Replication. Fundamental Virology*. New York, Raven Press. 507-526, 1990.
14. Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O.: *Paramyxoviridae. Veterinary Virology*. San Diego, Academic Press. 471-487, 1993.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan anti-H monoklonal antikor ile EIA'da kullanılan RPV antijeninin temininde yardımcı olan Dr. Nigar TATAR'a ve Dr. Sinan AKTAŞ'a teşekkür ederiz.