

## SDS-PAGE ve Western İmmunoblotting Teknikleri Kullanarak Türkiye’de İzole Edilen Çok Virulent İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Karşılaştırmalı Analizi

Olca TÜRE

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Fethiye ÇÖVEN

Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, 45040 Manisa-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.03.1997

**Özet:** Türkiye’de infeksiyöz bursal hastalığı (IBD) salgınlarından izole edilen bölgesel virusların (Ege:G34, G35; Marmara:G41; İç Anadolu:ETL3) yapısal protein profilleri ve antijenik ilişkileri serotip 1 grubu referens suşları (D78, E varyant) ile karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polycarylamide Gel Electrophoresis) ve Western immuoblotting teknikleriyle incelendi.

Pürifiye edilmiş 3 adet saha ve 1 adet referens virusun SDS-PAGE analizi, lokal virusların serotip 1 grubu referens virusu ile aynı protein profiline sahip olduğunu gösterdi. Coomassie mavisi ile boyanan jelde IBDV’ye ait VP2 (40K), VP3 (32K), VPX (48K) proteinleri saptandı. Hücresel kontaminant proteinler nedeniyle bu çalışmada diğer yapısal proteinleri (VP1 ve VP4) net olarak tanımak mümkün olmadı.

Western immunoblotting testinde kullanılan D78, E varyant G34, G41 poliklonal antiserumları homolog ve heterolog reaksiyonlarda VP2 ve VP3 olmak üzere iki yapı proteini ve VP3’un prekürsörü olduğu bildirilen 52K moleküler ağırlıktaki bir başka protein ile reaksiyon verdi. ETL3 antiserumu virusların VP2 proteini ile VP3’e göre daha kuvvetli reaksiyon verdi. G35 suşunun antiserumu sadece VP3 ve onun prekürsör proteini ile reaksiyon verdi ve VP2 proteini ile ayırt edilebilen bir reaksiyon göstermedi.

Sonuç olarak, referens ve bölgesel IBDV suşları arasında protein profilleri yönünden SDS-PAGE ile ortaya konabilen bir farklılık saptanmadı. Western immunoblotting çalışmasında, ETL3 ve G35 antiserumunun reaksiyonlarında bazı farklılıklar gözlenmekle beraber, incelenen virusların çoğunun antijenik olarak benzer olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Çok Virulent IBDV, Proteinler, Antijenik Karakterizasyon, SDS-PAGE, Western İmmunoblotting.

### Comparative Analysis of Highly Virulent Infectious Bursal Disease Viruses Isolated in Turkey Using the SDS-PAGE and Western Immunoblotting Techniques

**Abstract:** Structural protein profiles and antigenic relatedness of the regional viruses (Aegean:G34, G35; Marmara:G41; Central Anatolia:ETL3) isolated from the infectious bursal disease outbreaks in Turkey were examined comparatively with the serotype 1 classic (D78) and variant (E variant) strains using the SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and Western immunoblotting techniques.

SDS-PAGE analysis of 3 purified field (G34, G35, ETL3) and 1 reference (D78) viruses showed that local viruses had the same protein profiles with the serotype 1 reference strain. VP2(40K), VP3(32K) and VPX(48K) were the proteins identified in Coomassie blue stained gels. In this study, it was not possible to detect the other structural proteins (VP1 and VP4) clearly due to the cellular contaminant proteins.

The polyclonal antisera to D78, E variant, G34, G35, G41 and the ETL3 strains used in Western immunoblotting tests detected mostly three protein bands, VP2, VP3 and a 52K molecular weight protein which was reported to be the precursor of VP3 in homologous and heterologous reactions. The antisera to ETL3 showed stronger reaction with VP2 of the viruses comparison to the VP3. The antisera to G35 strain reacted only with the VP3 and its precursor protein and showed no detectable reaction with the VP2 protein.

In conclusion, no differences were found between the reference and the regional IBDV strains in terms of protein profiles as detected by SDS-PAGE. Western immunoblotting studies indicated that, although some differences were observed in case of ETL3 and G35 reactions, the majority of viruses tested in this study were antigenically similar.

**Key Words:** Highly Virulent IBDV, Proteins, Antigenic Characterization, SDS-PAGE, Western Immunoblotting.

### Giriş

İnfeksiyöz bursal hastalığı virusu (IBDV), piliçlerde primer lenfoid organ olan bursa Fabricius’ta (BF)

gelişmekte olan B lenfositleri yıkıma uğratarak, hayvanların enfekte olduğu yaşa bağlı olarak klinik veya subklinik semptomlarla seyreden, immunosupresif bir

hastalığa neden olur (1, 2, 3).

IBD, ilk rapor edildiği 1962 yılından bu yana dünyanın her yerinde yaygın olarak seyreden, tavukçuluk endüstrisine en çok zarar veren hastalıkların başında gelmektedir. Özellikle 1987 yılında Avrupa'da başlayan, Orta Doğu, Afrika ve Uzak Doğu ülkelerine hızla yayılan ve ülkemizde de etkili olan çok virulent IBDV'nin neden olduğu salgınlar broylerlerde %30, yumurtacı sürülerde %70'e kadar varan oranlarda mortaliteye neden olmuştur (4-12). Alınan koruyucu önlemlere ve yoğun aşılamalara rağmen IBD viruslarının patojenitelerinin çok yüksek olması, dış ortam koşullarına ve bir çok dezenfektana dayanıklı olmaları nedeniyle hastalık tamamen eradike edilebilmiş değilse de, ölüm oranlarında kayda değer düzeyde azalma olmuştur. Sahada yapılan mücadele yanında, ülkemize ait virusların özelliklerinin tanımlanarak kendi aşı viruslarımızın geliştirilmesi yaşanan salgınlardan sonra daha da önem kazanmış, bu çalışma da aynı amaca yönelik olarak gerçekleştirilmiştir.

İnfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının iki serotipi mevcuttur, ancak sadece serotip 1 grubu viruslar tavuklarda hastalık meydana getirmektedir (13, 14, 15). İnfeksiyöz bursal hastalığının etiyolojik etkeni olan virus (IBDV) *Birnaviridae* familyasında yer almaktadır (16). IBDV, 58-60 nm çapında, zarfsız-ikozahedral bir simetriye sahip olup, genomu çift segmentli (A ve B), çift sarmallı RNA yapısındadır (17, 18). IBDV, VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak isimlendirilen 4 yapı proteini içerir (19-22). Küçük segment B, 90K moleküler ağırlıkta VP1 proteinini kodlar (23). Büyük segment A, önce 110K büyüklüğünde bir prekürsör (ön ayrışma ürünü) poliprotein olarak sentezlenir ve proteolitik parçalanma ile VP2 (40K), VP3 (32K) ve VP4(28K) proteinlerine ayrışır (19-22). Ayrıca VPX olarak isimlendirilen 48K moleküler ağırlıkta VP2'nin prekürsörü olan bir başka proteinin varlığı gösterilmiştir (24). VP3 ve VP4 proteinleri için de benzer prekürsör protein ilişkileri rapor edilmiştir (19, 20, 25, 26). VP2 ve VP3 IBDV'nin temel yapı proteinleridir ve viral kapsidin sırasıyla %51 ve %40 oranını oluştururlar (17). Diğer proteinlerden VP4 %6, VP1 %3 oranında bulunur.

Fonksiyonları açısından değerlendirilecek olursa; IBD viruslarında nötralize edici antikorların oluşumundan sorumlu koruyucu antijen özelliği olan epitoplar VP2 proteini üzerinde bulunmaktadır (27-29). VP3 proteini nötralizasyon özelliği göstermeyen grup spesifik antijen olarak kabul edilmektedir (28), ancak son zamanlarda VP3 üzerinde iki bağımsız, çakışmayan (non-overlapping) epitopun varlığı ortaya konmuştur (30). Epitoplardan bir tanesi her iki serotipe ortak, diğeri serotip 1 ve 2'de farklı

bulunmuştur. VP4'un prekürsör poliprotein parçalanma sürecinde rol oynayan viral proteaz olduğu bildirilmiştir (21).

Serotip 1 ve 2 grubu virus proteinleri SDS-PAGE sisteminde kayda değer şekilde farklı uzaklıklarda göç ettiklerinden bu tekniğin virusların serotiplendirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (28, 31-33). Serotip 1 viruslarının proteinlerinin göç uzaklıkları arasında çok az farklar gözlenmiş, ancak bunların suşları birbirinden ayırdedici nitelikte olmadığı bildirilmiştir (33, 34). Western immunoblotting tekniği poliklonal, monoklonal veya monospesifik antikorlar kullanılarak virusların antijenik ilişkilerini *in vitro* olarak incelemede çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (26, 28, 35).

Bu çalışmada, Türkiye'de son yıllarda yaşanan çok virulent IBDV salgınlarından izole edilen virusların yapısal proteinlerinin elektrik alandaki göç özelliklerine göre SDS-PAGE tekniği ile teşhisi ve karakterizasyonu, ve bölgelerarası virusların proteinlerinin hem kendi aralarındaki, hem de referens viruslarla olan antijenik ve immunojenik ilişkileri katı faz sistemine dayanan Western immunoblotting tekniğiyle karşılaştırmalı olarak rapor edilmektedir.

## Materyal ve Metot

**Hücre Kültürü:** Virusların çoğaltılmasında, Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü spesifik-patojen-free (SPF) sürülerinden elde edilen 10 günlük embriyolu SPF yumurtalardan referenste açıklanan yöntemle göre hazırlanan civiv embriyo fibroblast (CEF) hücre kültürleri kullanıldı (36).

**Referens Viruslar:** SDS-PAGE ve Western immunoblotting çalışmalarında Dr.Y.M.Saif'ten (Food Animal Health Research Program, OARDC, Wooster, OH) sağlanan iki adet serotip 1 grubu virusu, D78 ve E varyant (Ev) suşları referens olarak kullanıldı.

**Antiserumlar:** Referens viruslara (D78, Ev) ve bölgeleri temsilen seçilmiş (G34, G35, G41, ETL3) saha viruslarına karşı antiserumlar izolatörde tutulan 3 haftalık SPF piliçlerde referens yöntemde açıklandığı şekilde hazırlandı (36).

**Virusların Çoğaltılması ve Pürifikasyonu:** Referens ve saha virusları 175 cm<sup>2</sup> lik cam boatlarda üretilen CEF hücre kültürlerinde çoğaltıldı. İnkübasyonun 5 ci gününde kültürler 3 kez dondurulup çözdürüldü ve supernatant 2500 rpm'de 20 dakika santrifuj edilerek hücre artıkları çöktürüldü. Viruslar, Dobos ve ark., tarafından kullanılan yöntemin bir bölümü uygulanarak aşağıda açıklandığı şekilde kısmi olarak pürifiye edildi (17). Pürifikasyona

yaklaşık 1 lt virus sıvısı ile başlandı. Virusar kültür sıvısından 0.4 g/ml oranda amonyum sülfat ve %1 oranında katılan yeni doğmuş buzağı serumu ile muamele edilerek presipite edildi ve Beckman Type 21 rotorda (Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, USA) 15.000 rpm'de 4°C'de 1 saat santrifuj edilerek konsantre edildi. Pelet TNE buffer (0.01M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.9) ile toplandı ve Servapor diyaliz tübü (Serva Feinbiochemica, GmbH Co., Almanya) içine konarak TNE buffer aralıklı olarak değiştirilmek suretiyle bir gece boyunca diyaliz edildi. Daha sonra eşit miktarda freon (1, 1,2-Trichlorotrifluorethan, Merck) ile muamele edilerek hücre artıkları uzaklaştırıldı ve 2500 rpm'de 30 dakika 4°C'de 3 saat santrifuj edildi. Peletler TNE buffer ile süspanse edildi, biraraya getirildi ve sonifikasyona tabi tutuldu. Düşük devirde santrifujden sonra supernatant %20 sukroz çözeltisi (w/v) üzerinden 3 saat, 4° de, SW40Ti rotorda 26.000 rpm'de santrifuj edilerek konsantre edildi. Pelet 400-500ul TNE buffer ile toplandı ve SDS-PAGE'te kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

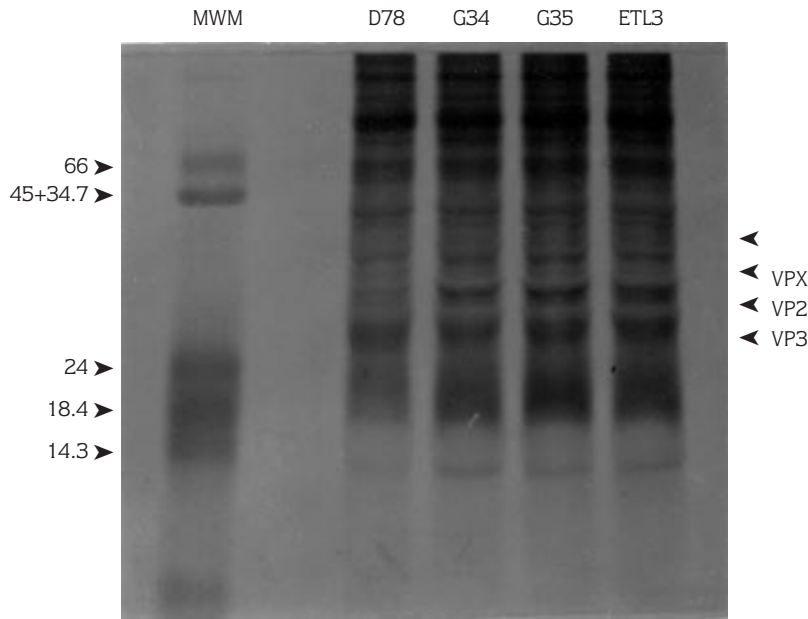
**SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Tekniği ile IBDV Proteinlerinin Analizi:** IBD viruslarının yapısal proteinleri Laemmli'nin (38) aralıklı (discontinuous) SDS-PAGE sistemi kullanılarak, %3.5 yığıcı (stacking), %12.5 ayırıcı (separating) jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılarak incelendi. Elektroforez işleminde Hoefer marka minijel ünitesi (SE-250, Mighty Small II Slab Gel Electrophoresis Unit, Hoefer Sci. Inc. San Francisco, CA) kullanıldı. SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları (MW-SDS-70 Kit, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve saflaştırılmış virus örnekleri Laemmli sample buffer (0.5M Tris-HCl, pH6.8, %10 Gliserol, %1 SDS, %0.05 bromfenol mavisi ve %2 2-merkaptolanol) ile eşit oranda karıştırılarak su banyosunda 2 dakika kaynatıldı. Minijel ünitesinin alt ve üst buffer tankları elektrod buffer (0.025M Tris, pH 8.3, 0.192M Glisin ve %0.1 SDS) ile doldurulduktan sonra Hamilton enjektörü ile jelde özel tarak ile oluşturulmuş gözlemlere virus örnekleri yüklendi. Elektroforez işlemi güç ünitesine (PS 500XT, Hoefer Sci. Inc) bağlı olarak, her jel için 15 mA kullanılmak suretiyle sabit akımda yaklaşık 1.5-2.0 saat sürede oda ısısında gerçekleştirildi. İşlem sırasında minijel ünitesi akar suya bağlanarak soğutuldu. İşaret boya olarak kullanılan bromfenol mavisi çizgisi jelin alt ucuna ulaştınca elektroforez işlemi durduruldu.

**Protein Bantlarının Gözlenmesi:** Elektrik alanda jelde göç eden proteinler Coomassie mavisi ile boyanarak gözlemlendi (39). Kısaca, jel Coomassie mavisi boya solusyonu (%0.125 Coomassie Blue R-250, %50 Metanol, %10 Asetik Asit) içinde bir gece hareketli

platform (Red Rocker, Hoefer Scientific Inc.) üzerinde boyandı. Bu işlemden sonra %50 Metanol, %10 Asetik Asit içeren solusyonda (Boya giderici I) 2 saat hafif çalkalanmak suretiyle boya uzaklaştırıldı. Daha sonra II ci solusyon (%5 Metanol, %7 Asetik Asit) eklendi ve zaman zaman değiştirilerek jelde istenmeyen mavilik giderilene ve protein bantları net görülünceye kadar çalkalanmaya devam edildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı çekildi.

**Western İmmunoblotting:** SDS-PAGE ile kombine olarak gerçekleştirilen Western immunoblotting çalışmasında, referens (D78, Ev) ve saha virusları (G34, G35, G41, ETL3) arasındaki antijenik ilişkiler aynı viruslara karşı hazırlanan poliklonal antikorlar kullanılarak araştırıldı. Saha viruslarından G34, G35 ve ETL3, referens viruslardan D78 suşları pürifiye edilerek SDS-PAGE ile proteinleri ayrıştırıldı. Bu virusların proteinleri kendilerine karşı oluşturulmuş antiserumların yanında, diğer saha suşu G41 ve referens Ev suşuna karşı hazırlanan antiserumlarla da Western immunoblotting testinde incelendi.

**1. SDS-PAGE/Jeldeki Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi:** SDS-PAGE daha önce açıklandığı şekilde uygulandı, ancak Laemmli Sample Buffer içinde denatüre edici etken olan 2-merkaptolanol kullanılmadı. Proteinlerin elektroforezi, nitroselüloz membrana transferi ve immunoblot aşamaları minimum denatüre edici koşullar altında gerçekleştirilerek polipeptidlerin doğal konformasyonlarını korumaları ve geri kazanmaları sağlanmaya çalışıldı (35). Ayrıca, protein transferinin etkinliğini ve göç durumlarını izleyebilmek için boyalı marker kit'i (Prestained SDS Molecular Weight Markers-SDS-7B, Sigma) kullanıldı. Jel elektroforez işlemi tamamlanmadan 15 dakika kadar önce derin bir küvete konan transfer buffer (25mM Tris pH 8.3, %5.5 glisin, %20 metanol) içine, jelin büyüklüğüne göre kesilmiş 0.45um gözenek büyüklüğü olan saf nitroselüloz membran (Sartorius AG. Gottingen, Almanya) ekilibasyon amacıyla batırıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra referens çalışmalarda belirtildiği şekilde bir sandviç hazırlandı (40, 41). Elektrottransfer işlemi TE 52 Transphor Electrophoresis Unit (Hoefer Sci. Inc.) üretici firmanın önerileri dikkate alınarak kullanıldı. Proteinlerin nitroselüloz membrana transfer işlemi 40V'luk sabit voltaj ile 4 saat süreyle cihazın muslukla bağlantılı soğutma sistemi çalıştırılarak, manyetik karıştırıcı üzerinde oda ısısında gerçekleştirildi. Transfer tamamlandıktan sonra membran spesifik olmayan reaksiyon odaklarının bloke edilmesi amacıyla PBS (pH 8.0) ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solusyonu içinde 4°C'de bir gece bekletildi.



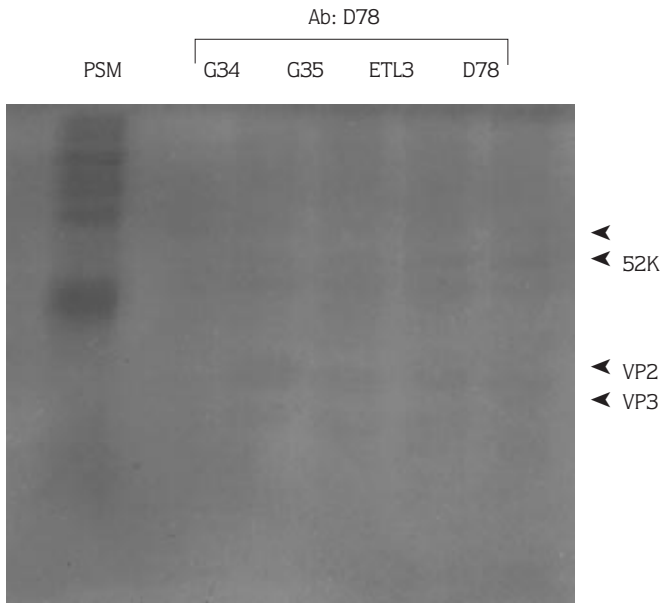
Şekil 1. Türkiye IBD saha virusları ve serotip 1 grubu referens suşu virus proteinlerinin SDS-PAGE analiz sonucu. MWM=Moleküler ağırlık marker'lar (1000X); D78=Referens IBD virusu; G34, G35, ETL3=Bölgesel IBD virusları; VPX, VP2, VP3 ve ► işaretli VP3 prekürsörü= Coomassie mavisi ile boyanmış jwelde teşhis edilebilen IBDV spesifik proteinler.

**2. İmmunoblot:** İmmunoblot işlemi daha önce uygulanan bir yönteme göre gerçekleştirildi (35). Spesifik olmayan reaksiyon odaklarının yağsız süt tozu ile bloke edilmesinden sonra, membran 3 kez 5 dakika %0.05 Tween-20 içeren PBS , pH 8.0 ile otomatik hareketli platform üzerinde yıkandı. D78, Ev, G34, G41 ve ETL3 viruslarına karşı hazırlanmış poliklonal antiserumlar %1 BSA (bovine serum albumin) içeren PBS, pH 7.4 ile sırasıyla 1:50, 1:50, 1:50, 1:25, 1:25, 1:25 ve 1:25 dilasyonlarda sulandırıldı ve primer antikör olarak membrana transfer edilen homolog ve heterolog virus proteinleriyle oda ısısında, otomatik sallayıcı üzerinde 2 saat reaksiyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membranlar PBS-Tween 20 %0.05, pH 8.0 ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Sekonder antikör olarak PBS-BSA %1 ile 1:2000 oranında sulandırılan peroksidaz konjugatlı tavşan-anti-tavuk IgG (H+L) (Sigma Chemical Co.) kullanıldı. Bir saat inkübasyondan sonra membran 3 kez 5 dakika PBS-Tween, 1 kez 5 dakika distile su, ve 2 kez 3 dakika reaksiyon geliştirici buffer (20 mM Sitrat, 10 mM EDTA, pH 5.0) ile yıkanarak ekilibre edildi. Bu işlemden sonra membran Sitrat-EDTA buffer solusyonunda bir gün önceden eritilerek hazırlanmış %1 dekstran sülfat solusyonu ile 30 dakika muamele edildi. Membran 2 kez 5 dakika Sitrat-EDTA buffer ile çalkalanmak suretiyle dekstran sülfat kalıntıları ortamdaki uzaklaştırıldı. Bu araştırmada antijen-antikör komplekslerinin renk reaksiyonu ile teşhisinde TMB (3,3',5,5' Tetramethylbendizine) substrat sisteminden yararlanıldı (42). TMB substratı (Table-5525, Sigma

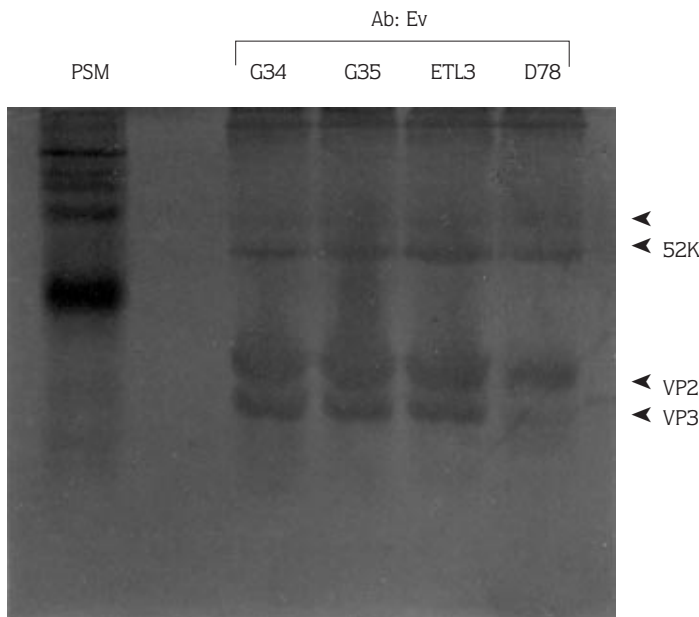
Chemical Co.) üretici firmanın önerileri doğrultusunda taze olarak hazırlandı. Substrat ilavesinden sonra reaksiyon, mavi-koyu gri renkte protein bantları oluşuncaya ve en uygun koyuluk sağlanıncaya kadar 2-3 dakika devam ettirildi. Membranın distile su ile yıkanmasıyla reaksiyon durduruldu ve derhal fotoğrafı çekildi. Mavi-koyu gri renkte protein bantlarının oluşumu test serumu ile virus proteinleri arasında antijenik ilişkinin varlığını ve spesifikliğini gösterdi.

## Bulgular

**IBD Virus Proteinlerinin SDS-PAGE Analizi:** Kısmi olarak pürifiye edilen D78, G34, G35 ve ETL3 viruslarının protein açılımları Coomassie mavisi ile boyanmış SDS-PAGE'te Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada incelenen saha viruslarında D78 virusunda da gözlenen IBDV'nin ana yapı proteinleri, VP2 (40K), VP3 (32K) ve VP2'nin prekürsör proteini VPX (48K) teşhis edildi. Analiz edilen virus örneklerinin kısmi saf olması ve CEF hücre proteinleriyle de karışık olması nedeniyle virus protein bantlarının yanında pek çok başka bantlar gözlemlendi. VP1 ve VP4 kontaminant proteinler arasında tesbit edilemedi. IBDV proteinlerinin moleküler ağırlıklarını tahmin etmek üzere kullanılan Sigma MW SDS 70 Moleküler Ağırlık Standart Kit'inde bulunan 6 marker'dan; bovine serum albumin (BSA 66K), ovalbumin (OVA, 45K), pepsin (34.7K), tripsinojen (24K), laktoglobulin (18.4K), lizozim (14.3K), sadece 5 adedi jelde gözlemlendi. Bu jelde gözlemlendiği gibi, MW-SDS-70 Kit kullanım kılavuzunda



Şekil 2. D78 antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab=D78 antiserumu; Antijenler=SDS-PAGE ile ayrıştırılarak nitroselüloz membrana transfer edilmiş virus proteinleri (referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları G34, G35, ETL3); VP2, VP3, 52K VP3 prekürsörü=tanınan spesifik IBDV proteinleri; ► non spesifik hücre proteinleri.

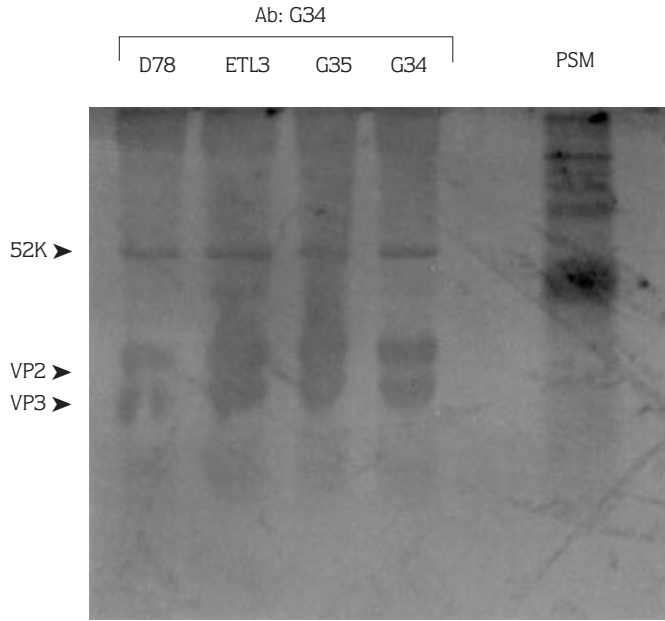


Şekil 3. E varyant antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab= Ev antiserumu; Antijenler = referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları-G34, G35, ETL3; VP2, VP3, 52K VP3 prekürsörü=tanınan spesifik IBDV proteinleri; ► non spesifik hücre proteinleri.

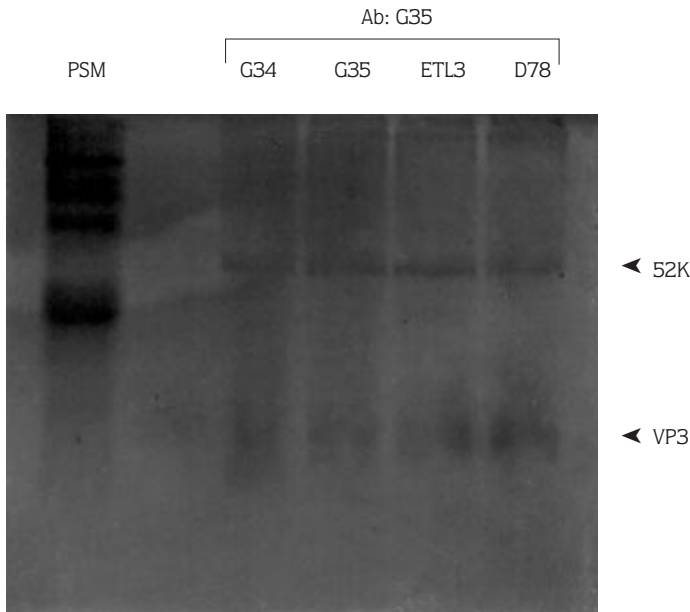
34.7K moleküler ağırlıktaki pepsinin Laemmli sisteminde 45K moleküler ağırlıktaki ovalbumin ile birlikte göç ederek anormal hareket ettiği ve daha yüksek MW olarak bant oluşturduğu bildirilmektedir.

**Western İmmunoblotting:** SDS-PAGE ile ayrıştırılarak nitroselüloz membrana transfer edilmiş 3 adet daha (G34, G35, ETL3) ve 1 adet referens (D78) virus proteinleri üzerinde poliklonal antikolar kullanarak Western immunoblotting analizi

gerçekleştirildi. Yukarıdaki virüslere ilave olarak Ev ve G41 antiserumlarıyla da immunoblot çalışması yapıldı. D78, Ev, G34, G35, ETL3 ve G41 antiserumlarıyla gerçekleştirilen Western immunoblotting sonuçları sırasıyla Şekil 2-7 arasında gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, serotip 1 ve saha referens virüslerine karşı hazırlanan poliklonal antikoların, suşlararası bazı farklılıklarla en az iki viral yapı proteinini, VP2, VP3 ve bir prekürsör proteini (52K, VP3 prekürsörü) tanıdığı görüldü. Anti-G35 serumunun, diğer suşlardan farklı olarak sadece VP3



Şekil 4. G34 antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab=G34 antiserumu; Antijenler = referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları-G34, G35, ETL3; VP2, VP3, 52K VP3 prekürsörü=taninan spesifik IBDV proteinleri; ► non spesifik hücre proteinleri.



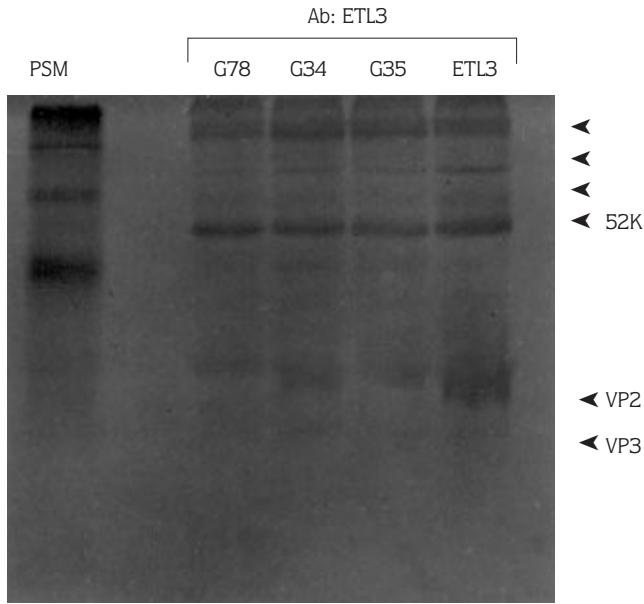
Şekil 5. G35 antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab=G35 antiserumu; Antijenler = referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları-G34, G35, ETL3; VP3 ve 52K VP3 prekürsörü=taninan spesifik IBDV proteinleri.

ve 52K moleküler ağırlıkta prekürsör proteinini ile kompleks oluşturduğu gözlemlendi. ETL3 antiserumu reaksiyonunda ise VP2 proteini VP3'e göre daha kuvvetli reaksiyon verdi. D78 suşu antiserumu ve antijeninin tüm testlerde diğer viruslara göre daha silik reaksiyon oluşturduğu gözlemlendi.

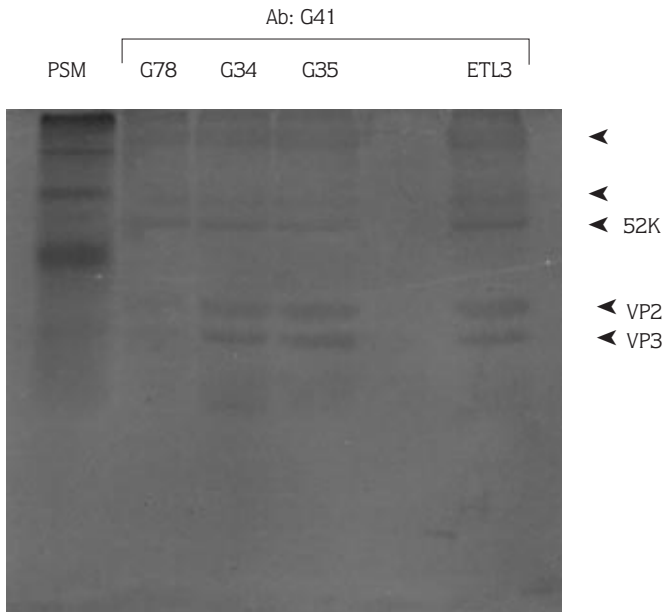
### Tartışma

Üç saha (G34, G35, ETL3) ve 1 referens (D78)

virusun incelendiği, Şekil 1'de gösterilen Coomassie mavisi ile boyanmış SDS-PAGE jelde işaretlendiği şekilde IBDV'nin 4 temel ve iki prekürsör proteininden (24, 32, 33), VP2 (40K), VP2 prekürsörü VPX (48K), VP3 (32K) ve onun 52K moleküler ağırlıkta olduğu bildirilen (27, 43) prekürsör proteinini teşhis edilmiştir. Özellikle VP2 ve VP3 proteinleri saha viruslarında belirgin olarak gözlenirken, D78 virusu VP2 proteinin çift bant ve daha az yoğun olarak göç ettiği görülmüştür. VP3'ün prekürsörü olarak işaretlenen protein daha sonra yapılan



Şekil 6. ETL3 antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab= ETL3 antiserumu; Antijenler = referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları-G34, G35, ETL3; VP2, VP3, 52K VP3 prekürsörü=tanınan spesifik IBDV proteinleri; ► non spesifik hücre proteinleri.



Şekil 7. G42 antiserumu ile Western immunoblotting testi sonuçları. PSM=prestained marker'lar; Ab=G41 antiserumu; Antijenler = referens D78 suşu, bölgesel IBD virusları-G34, G35, ETL3; GVP2, VP3, 52K VP3 prekürsörü=tanınan spesifik IBDV proteinleri; ► non spesifik hücre proteinleri.

Western immunoblotting çalışmasında poliklonal antikorlar tarafından tanınmış ve bu sonucun SDS-PAGE bulgularını destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Viral kapsidde az oranlarda bulunan 90K moleküler ağırlıktaki VP1 (%3) ile 28K moleküler ağırlıktaki VP4 (%6) proteinlerini bu jelde kontaminant hücre proteinleri arasında teşhis etmek mümkün olmamıştır. Virusların daha iyi saflaştırılması halinde bu sorunun ortadan kalkacağı düşünülmektedir.

Serotip 1 grubunda varyant veya klasik antijenik yapıda olan çeşitli aşı ve saha viruslarının proteinleri ile daha önceden yapılan SDS-PAGE çalışmalarında, serotip 1 grubu virusları arasında az farklılıklar saptanmakla beraber bunların suşları birbirinden ayırdedecek düzeyde olmadığı bildirilmiştir (33, 44, 45). Bu çalışmada da incelenen test viruslarının protein profillerinin serotip 1 grubu klasik virusu D78 suşu ile büyük benzerlik gösterdiği teşhis edilmiş ve çeşitli bölgelerden izole edilen

saha virusları arasında proteinlerin göç özellikleri yönünden herhangi bir fark gözlenmemiştir.

SDS-PAGE ile kombine olarak gerçekleştirilen Western immunoblotting çalışmasında D78, G34, G35 ve ETL3 virus proteinleri, aynı suşlara ek olarak E varyant ve G41 suşuna karşı hazırlanan poliklonal antiserumlar ile immunoblot reaksiyonlara sokularak suşlararası antijenik ilişkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Bu çalışmada Western immunoblotting tekniği suşların ortak özelliklerini bulmak ve virusları karakterize etmek üzere kullanılmıştır.

VP2 proteininin nötralize edici epitopları içeren koruyucu immunojen olduğu daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (28, 29). VP2 üzerinde en az üç adet konformasyon bağımlı, suş ve serotip-spesifik (46) ve bir adet sekans spesifik, suş ve serotiplere ortak antijenik determinantlar bulunmuştur (28, 46, 47). Konformasyon bağımlı olan epitoplar SDS ve ısı ile kolaylıkla denatüre olduğu için Western immunoblotting testinde reaksiyona girmemektedir (28). VP2 üzerinde monoklonal veya monospesifik antikorlarla saptanan diğer epitopun, proteinin nativ formunu gerektirmediği ve Western immunoblotting testinde reaksiyon verdiği bildirilmiştir (28, 37).

Bu çalışmada yer alan virusların Western immunoblotting testinde VP2 proteininin, homolog ve heterolog reaksiyonlarda, G35 antiserumu ile gerçekleştirilen test hariç diğer virusların antiserumları tarafından belirgin şekilde tanıdığı görülmüştür. Her ne kadar testler sırasında minimum denatüre edici koşullar uygulandıysa da denatürasyon oluştuğu, suşların literatürlerde belirtildiği gibi linear, proteinin nativ formunu gerektirmeyen ortak epitopları aracılığıyla reaksiyona girdikleri sanılmaktadır (35, 48). G35 suşu daha önce yapılan kros-VN çalışmasında az farklı bir antijenik alt tip olarak bulunmuştur (37). Bu sonuç, G35 suşu antiserumunun Western immunoblotting çalışmasında VP2 proteinini tanımayarak ortaya koyduğu sonucu destekler niteliktedir, ancak VN ve Western immunoblotting testlerinde reaksiyona giren epitoplar (konformasyon bağımlı veya değil) farklıdır, o nedenle G35 antiserumu ile virusların VP2 suşunun detaylı epitop analizi yapılarak antijenik farklılığının nedenini ortaya koymak gerekmektedir. VN sonucunun Western immunoblotting ile çakışmama olgusuna bir başka örnek, bu çalışmada yer alan ve antijenik yapı bakımından klasik viruslardan çok farklı olan E varyant antiserumunun Western immunoblotting testinde diğer virusların proteinleriyle ortaya koyduğu kuvvetli reaksiyondur.

Diğer yapı proteini VP3'ün önceleri virus nötralize

edici epitop olduğu sanılmış (26), fakat sonra ortak antijen olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (28). VP3'e karşı hazırlanan monoklonal ve monospesifik antikorların serotip ve subtipleri ayırdetmeksizin reaksiyona girdikleri çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (28, 35, 48). Son zamanlarda VP3 üzerinde serotiplerin ayırımına yarayacak bir epitopun varlığı ortaya konmuştur (30). Bu çalışmadaki virusların VP3 proteinleri ETL3 antiserumu hariç diğer virusların antiserumlarıyla kuvvetli ortak reaksiyon vermiştir. ETL3 antiserumunun IBD viruslarının ortak antijeni olarak kabul edilen VP3 proteini ile çok zayıf bir reaksiyon vermesinin nedeni bilinmemektedir, ancak diğer antiserumlarla olan reaksiyonlarda ETL3 virusunun VP3 proteini normal reaksiyon verdiği göre, olgunun bu testte kullanılan ETL3 antiserumu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. ETL3 antiserumunun genel reaksiyon grafiğine bakılacak olursa en kuvvetli reaksiyonun homolog virusunun VP2 proteini ile olduğu, diğerleriyle aynı derecelerde daha zayıf reaksiyon verdiği gözlenmiştir.

Bugüne kadar, IBDV ile yapılan SDS-PAGE çalışmalarında özellikle gümüş nitrat ile boyanan jellerde 4 ana proteinin yanında 50-60K civarında ekstra protein bantlarının gözleendiği (25, 31) ve bunların polipeptid parçalanması sırasında VP2, VP3 ve VP4'ün ön ayırma ürünleri olabileceği bildirilmiştir (20). Avustralya 17/80 suşunun 32K moleküler ağırlıktaki VP3 proteinine karşı hazırlanan monoklonal antikorlar ve A.B.D.'de VP3'e karşı olan monoklonal ve monospesifik antikorlar kullanılarak yapılan Western immunoblotting çalışmalarında standart veya varyant olan çeşitli suşlarda 52K proteinin VP3 ile olan immunolojik ilişkisi kesin olarak belirlenmiştir (26, 35). Bu araştırmadaki Western immunoblotting testlerinde diğer araştırmacılarca da gözlenen 52K moleküler ağırlıkta VP3 prekürsörü olduğu sanılan ek bir protein bandı poliklonal antikorlarca kros reaksiyonlarda tanınmıştır.

Western immunoblotting çalışmasında dikkati çeken bir başka nokta, D78 antiserum ve antijeninin tüm suşlarla verdiği reaksiyonun zayıflığıdır. Bu olay sadece bu çalışmada değil Amerikan suşları ile gerçekleştirilen bir başka çalışma da gözlenmiştir ve bu durumun nedeni henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (37).

Poliklonal antikorlarla gerçekleştirilen Western immunoblotting testinden şöyle bir genel sonuç çıkarılabilir; çalışmada yer alan tüm viruslar en az bir veya iki yapı proteini üzerindeki ortak epitopları aracılığıyla birbirlerini immunolojik olarak tanımaktadırlar, ancak viruslar arasındaki antijenik determinant ilişkisinin daha detaylı olarak monoklonal antikorlarla incelenmesi gerekmektedir.



Kros virus nötralizasyon testleriyle Türkiye IBD viruslarının antijenik benzerliklerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışmanın (37) devamı olarak SDS-PAGE ve Western immunoblotting teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemize ait bazı IBD viruslarının proteinlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Ülke viruslarıyla yapılan ön denemeler olarak tanımlanabilecek bu çalışmalardan ve elde edilen bilgilerden sonra, ülke tavukçuluğuna pratik anlamda yardımcı olabilmek için aşı virusu elde etme ve *in vivo* kros koruma çalışmalarının da başlatılması ve uygulamaya sokulması gerekir.

### Kaynaklar

- Allan, W.H., Faragher J.T., and Cullen G.A., Immunosuppression by the Infectious Bursal Agent in Chickens Immunized against Newcastle Disease, *Vet. Rec.*, 90: 511-512, 1972.
- Hirai K., Kunihiro K., and Shimakura S., Characterization of Immunosuppression in Chickens by Infectious Bursal Disease Virus, *Avian Dis.*, 24: 950-965, 1979.
- Kaufer I., and Weiss E., Significance of Bursa Fabricius as a Target Organ in Infectious Bursal Disease of Chickens, *Infect. and Immunity*, 27: 364-367, 1980.
- Chettle N.J., Stuart J.C., and Wyeth P.J., Outbreak of Virulent Infectious Bursal Disease in East Anglia, *Vet. Rec.*, 125: 271-272, 1989.
- Çöven F., Broyler ve Yumurtacı Tavuklarda Gumboro (Infectious Bursal Disease) Hastalığının İnsidensi ve Virus İzolasyonu, Doktora Tezi, 1995, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa.
- Du Perez J.H., Control of vIBD in South Africa, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, pp:17-18, 1994.
- Etteradossi N., Picault J.P., Drouin P., Guitet M., L'Hospitalier R., Bennejean G., Pathogenicity and Preliminary Antigenic Characterization of Six Infectious Bursal Disease Virus Strains Isolated in France from Acute Outbreaks, *J. of Veterinary Medicine, Series B*, 39: 683-691, 1992.
- Lasher H.N., IBD Prevention and Control in Asia, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, pp:26-29, 1994.
- Mohiuddin S.M., Infectious Bursal Disease in India, *Poultry International*, July, pp:56-57, 1994.
- Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Hiraga M., and Saito T., Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of Field Isolates in specific-Pathogen-Free Chickens, *Avian Dis.*, 36: 597-609, 1992.
- Tsai H.J., Lu Y.S., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in Taiwan in 1992, *J. of the Chinese Socie. of Vet. Science*, 19: 249-258, 1993.
- Türe O., Çöven F., Türkiye'de İzole Edilen İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Virus Nötralizasyon Testi ile Serotiplendirilmesi ve Antijenik Alt-Grupların Belirlenmesi, U.Ü., Vet. Fakültesi, Marmara Böl.İI Hayvancılık Kongresi, Bursa, p:71, 1995.
- Jackwood D.J., Saif Y.M., and Hughes J.H., Characteristics and Serologic Studies of two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in Turkey, *Avian Dis.*, 26:871-882, 1982.
- Lukert P.D., Jones S.M., Lee L.H., and Nusbaum K.E., Antigenic Variations of Several Strains of Infectious Bursal Disease Virus, *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 179: 269-270, 1981.
- McFerran J.B., McNulty M.S., McCillop E., Corner T.J., McCracken R.M., Collins D.S., and Allan G., Isolation and Serological Studies with Infectious Bursal Disease Viruses From Fowl, Turkeys and Ducks, Demonstration of a Second Serotype, *Avian Pathology*, 9: 395-404, 1980.
- Brown F., The Classification and Nomenclature of Viruses: Summary of Results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984, *Intervirology*, 25: 141-143, 1986.
- Dobos P., Hill B.J., Hallet R., Kells D.T.C., Becht H., and Teninges D., Biophysical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bi-segmented Double-Stranded RNA Genomes, *J. Virology*, 32: 593-605, 1979.
- Müller H., Scholtissek C., and Becht H., The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double Stranded RNA, *J. Virology*, 31: 584-589, 1979.
- Azad A.A., Barret S.A., and Fahey K.J., Characterization and Molecular Cloning of the Double-Stranded RNA Genome of an Australian Strain of Infectious Bursal Disease Virus, *Virology*, 143: 35-44, 1985.
- Hudson P.J., McKern N.M., Power B.E., and Azad A.A., Genomic Structure of the Large RNA Segment of Infectious Bursal Disease Virus, *Nucl. Acids Res.*, 14: 5001-5012, 1990.

### Teşekkür

Projeyi destekleyen TÜBİTAK-Veteriner Hayvancılık Araştırma Grubuna teşekkür ederiz. Enstitümüzün Doku Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında çalışan teknik ve yardımcı personele çalışmalarımıza olan yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

21. Jagdish M.N., Vaughan P.R., Irving R.A., Azad A.A., and Macreadie I.G., Expression and Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Polyprotein in Yeast, *Gene*, 95: 179-186, 1990.
22. Müller H., Nitsche R., The Two segments of the Infectious Bursal Disease Virus Genome are Circularized by a 90.000-Da Protein, *Virology*, 159:174-177, 1987.
23. Morgan M.M., Macreadie I.G., Harley V.R., Hudson P.J., and Azad A.A., Sequence of the Small Double-Stranded RNA Genomic Segment of Infectious Bursal Disease Virus and Its Deduced 90kDa Product, *Virology*, 163:240-242, 1988.
24. Dobos P., Peptide Map Comparison of the Proteins of infectious Bursal Disease Virus, *J. Virology*, 32: 1046-1050, 1979.
25. Azad A.A., Fahey K.J., Barret S.A., Emy K.M., and Hudson P.J., Expression in *Escherichia coli* of cDNA Fragments Encoding the Gene For the Host Protective Antigen of Infectious Bursal Disease Virus, *Virology*, 149: 190-198, 1986.
26. Fahey K.J., O'Donnel I.J., and Azad A.A., Characterization by Western Blotting of the Immunogens of Infectious Bursal Disease Virus, *J. Gen. Virology*, 66: 1479-1488.
27. Azad A.A., Jagdish M.N., Brown M.A., and Hudson P.J., Deletion Mapping and Expression in *Escherichia coli* of the Large Genomic Segment of Birnavirus, *Virology*, 161: 145-152, 1987.
28. Becht H., Muller H., and Muller H., Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease, *J. Gen. Virology*, 69: 631-640, 1988.
29. Fahey K.J., Emy K., and Crooks J., A., Conformational Immunogen on VP2 of Infectious Bursal Disease Virus that Induces Virus-Neutralizing Antibodies that Passively Protect Chickens, *J. Gen. Virology*, 70: 1473-1481, 1989.
30. Oppling V., Muller H., Becht H., The Structural Polypeptide VP3 of Infectious Bursal Disease Virus Carries Group and Serotype-Specific Epitopes, *Journal of Gen. Virology*, 72: 2275-2278, 1991.
31. Jackwood D.J., Saif Y.M., and Hughes J.H., Nucleic Acid Structural Proteins of Infectious Bursal Disease Virus Isolates Belonging to Serotype I and II, *Avian Dis.*, 28: 990-1006, 1984.
32. Kibenge F.S.B., Dhillon A.S., Russell R.G., Identification of serotype II Infectious Bursal Virus Proteins, *Avian Pathology*, 17: 679-687, 1988.
33. Türe O., Saif Y.M., Structural Proteins of Classic and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Dis.*, 36: 829-836, 1992.
34. Lukert P.D., Mazageriegos L.A., and Craft D.W., Antigenic, Biologic and immunosuppressive Comparisons of Standart and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Virus. Proc. 127th AVMA Meet., 1990, San Antonio, TX, p.105.
35. Türe O., Tsai H.J., and Saif Y.M., Studies on Antigenic Relatedness of Classic and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Dis.*, 37: 647-654, 1993.
36. Türe O., F. Çöven., Türkiye'de Enfeksiyöz Bursal Hastalığı Salgınlarından Çok Virulent Suşların İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, (TÜBİTAK, Turkish J. of Vet. and Anim. Sci. dergisine yayınlanmak üzere kabul edildi).
37. Türe O., F. Çöven., Türkiye'de Çeşitli Bölgelerden İzole Edilen Çok Virulent Enfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Antijenik Benzerlikleri (TÜBİTAK, Turkish J. of Vet. and Anim. Sci. dergisine yayınlanmak üzere kabul edildi).
38. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During the assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, 1970.
39. Harlow E., and Lane D., *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp:649, 1988.
40. Burnette W.N., "Western Blotting: Electrophoretic Transpher of Proteins from Sodium Dodecyl sulphate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A, *Analytical Bioch.*, 112:195-203, 1981.
41. Towbin H., Staehelin T., and Gordon J., Electrophoretic Transpher of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, *Proceedings Natl. Acad. Sci. Biochemistry*, 76: 4350-4354, 1979.
42. McKimm-Breshkin J.L., The Use of Tetramethylbenzidine for Solid Phase Immunoassays, *J. Immunol. Methods*, 135: 277-280, 1990.
43. Fahey K.J., O'Donnel I.J., and Bagust T.J., Antibody to the 32K Structural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Neutralizes Viral Infectivity in vitro and Confirms Protection on Young Chickens, *J. Gen. Virology*, 66: 2693-2702, 1985.
44. Reddy S.K., Silim A., Viral Proteins and Genome Analysis of Recent Canadian Isolates and American Variant Strain of Infectious Bursal Disease Virus, *Immunol. and Infectious Dis.*, 2:17-21, 1992.
45. Wang H.R., Lee L.H., Shieh H.K., Comparative Analysis of the Capsid Protein and Nucleic Acid of Infectious Bursal Disease Viruses Isolated in Taiwan, *Taiwan J. of Vet. Med. and Anim. Husbandary*, 56: 93-103, 1990.
46. Oppling V., Muller H., Becht H., Heterogeneity of the Antigenic Site Responsible for the Induction of Neutralizing Antibodies in Infectious Bursal Disease Virus, *Archives of Virology*, 119: 211-223, 1991.
47. Mahardika G.N.k., Schnitzler D., Muller H., Becht H., Mapping of Strain-Specific and Cross-Reactive Epitopes of IBDV Seotypes I and II. Proc. of Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia, Rauischholzhausen, Germany, pp: 40-452, 1994.
48. Fahey K.J., McWater P., Brown M.A., Emy K., Murphy V.J., and Hewish D.R., Virus Neutralizing and Passively Protective Monoclonal Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus of Chickens, *Avian Dis.*, 35: 365-373, 1991.