ERCİYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article
14(3), 149-156, 2017

Bovine Ephemeral Fever Virüsün Rekombinant Glikoprotein ve Nükleoproteinlerinin Üretilmesi*

Hasan ABAYLI[1], Şükrü TONBAK[1] , Ahmet Kürsat AZKUR[2], Hakan BULUT[1]

[1]Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ-TÜRKİYE
[2]Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Kırıkkale-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, bovine ephemeral fever virüsün (Üç gün hastalığı virüsü; BEFV) glikoprotein (G) ve nükleoproteinlerinin (N) rekombinant DNA tekniği ile üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye izolatlarından çoğaltılan BEFV G ve N genlerini taşıyan pcDNA4/HisMax-TOPO ökaryotik ekspresyon vektörleri oluşturulmuş ve elde edilen rekombinant vektörlerle transfekte edilen hücrelerde bu proteinlerin in vitro üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Geçici ve stabil transfekte hücrelerde RT-PCR ile mRNA düzeyinde genlerin transkripsiyonu doğrulanmıştır. Ayrıca, transfekte hücrelerden pürifiye edilen rekombinant proteinler Western blotlama deneyi ile gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda, BEFV teşhis ve korunmasında iki önemli proteinin üretimi ve pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu proteinlerin teşhis kitlerinin hazırlanması ve sub-ünit aşı olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: BEFV glikoprotein, BEFV nükleoprotein, bovine ephemeral fever, rekombinant DNA teknolojisi

Production of Recombinant Glycoprotein and Nucleoprotein of Bovine Ephemeral Fever Virus

Summary: This study is aimed to create a recombinant glycoprotein (G) and nucleoprotein (N) of bovine ephemeral fever virus (BEFV) by using DNA technology. For this purpose, G and N gene of BEFV Turkish isolate were cloned in to pcDNA4/HisMax-TOPO eukaryotic expression vector. Obtained recombinant vectors were transfected in Vero E6 cell line to produce recombinant protein. Presence of recombinant N and G gene of BEFV in Vero E6 was confirmed by using RT-PCR following transient transfection. Additionally purified recombinant N and G proteins of BEFV from Vero E6 were shown through Western blotting after stable transfection. With the help this study, we have achieved purification and in production of two recombinant proteins which play important role protection and diagnosis of BEFV. The obtained recombinant proteins will be used to create a sub-unit vaccine and to produce diagnosis kit for BEFV in future.

Key words: BEFV glycoprotein, BEFV nucleoprotein, bovine ephemeral fever, recombinant DNA technology

Giriş

Bovine ephemeral fever (BEF) veya üç gün hastalığı, ülkemiz dahil sıcak iklime sahip bir çok ülkede görülen, küresel ısınma ile yaygınlığı her yıl daha da artan ve önemli salgınlara sebep olan sığır ve mandaların vektör kaynaklı bir hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan virüsün (Bovine ephemeral fever virus; BEFV) en önemli vektörlerinden biri Culicoides sinekleridir (1,12,20). Hastalıkta klinik belirtiler özellikle yüksek verimli ırklarda ve genç hayvanlarda daha belirgin olup ekonomik kayıplar ve ölüm oranları da bu hayvanlarda daha yüksek seyretmektedir (11,12).

BEFV *Rhabdoviridae* ailesinin Ephemerovirus genusunda yer alan bir virüstür. Zarlı ve mermi veya koni şeklinde virion tek iplikli yaklaşık 15.000 nükleotit uzunluğunda negatif anlamlı RNA genoma sahiptir. Virion yapısında beş yapısal proteini (Nucleoprotein; N, phosphoprotein; P, matrix protein; M, large protein; L, glycoprotein; G) barındırır (12,21).

BEFV G geni tarafından sentezlenen G proteini virüsün hücreye bağlanmasını sağlamakta ve virüse karşı konakçıda oluşan nötralizan antikorlar da başlıca bu proteine karşı sentezlenmektedir. Bu nedenle, biyolojik ve immünolojik öneminden dolayı BEFV G proteini BEFV çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır (1,21,27). BEFV N proteini virüs ribonükleoprotein kompleksinin oluşumunda yer almasından dolayı virüs replikasyonu, transkripsiyonu ve kurgulanmasında görevlere sahiptir (22). Ayrıca, birçok rhabdovirüslerde N proteinine karşı oluşan im-

Geliş Tarihi/Submission Date : 06.09.2016
Kabul Tarihi/Accepted Date : 22.11.2016

*Bu çalışmanın verileri ARDEB 1001 projeleri kapsamında TÜBİTAK tarafından finansman olarak desteklenmiş (TOVAG-114O668) projenin bir bölümünden elde edilmiş ve çalışma 30 Ağustos-2 Eylül 2016 tarihinde Kapodokya-Nevşehir'de gerçekleştirilen XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

mun yanıt virüs patojenitesinde belirleyici olabilmektedir (3,4,7,13).

Gerek teşhis kitlerinin oluşturulmasında, gerekse yüksek mutasyon ihtimali bulunan rhabdovirüsler gibi RNA genomuna sahip virüslerde klasik aşılara alternatif olabilecek yeni nesil aşıların hazırlanmasında virüslerin biyolojik olarak temel olan proteinlerinin hedef alınması veya bu proteinlerin saf olarak elde edilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada Türkiye'de 2012 yılında bildirilen salgında izole edilen BEFV'nin G ve N genlerinin klonlanması ve rekombinant DNA tekniği ile bu proteinlerin üretilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Virüs

Çalışmada 2012 yılında güneydoğu illerimizde ortaya çıkan BEF salgınından elde edilen virüs izolatı (2012 TR ADYMN Genbank-KC788421.1 -KC688889.1) kullanıldı ve söz konusu izolatın laboratuvar şartlarında üretilmesi sırasında Vero E6 (ATCC, ABD) hücre hattından yararlanıldı (16).

Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)

BEFV Türkiye izolatları ile enfekte edilen Vero E6 hücre üst sıvılarından RNA izolasyonları ticari RNA izolasyon kiti (QIAamp Viral RNA Mini kit, ABD) kullanılarak, üretici firmanın (QIAGEN, ABD) önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA örneklerinin cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla random primerleri içeren cDNA sentez kiti (Roche Diagnostics, Almanya) kullanıldı. Her bir gen bölgesinin open reading frame (ORF) bölgesinin amplifikasyonu için kullanılacak primerler gen bankasında mevcut olan BEFV gen dizilimleri kullanılarak, iki programda (DNA Baser ve Fast-Primer) dizayn edildi.

cDNA'lardan PCR amplifikasyonları 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM Potasyum klorid, 15 mM Magnezyum klorid) içinde dNTP karışım 1.25 mM, 1 U *Taq* DNA polimeraz (Promega, Madison, Wisconsin, ABD), 10 pM primer F-R ile 3 µL cDNA içeren 50 µL karışımla gerçekleştirildi.

Klonlama

Klonlama aşaması Sambrook ve ark. (17)'nın belirttiği yöntemlere göre gerçekleştirildi. RT-PCR ile çoğaltılan ve %1'lik agarozda yürütülen istenilen büyüklükteki amplikonlar (G ve N genler) PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, ABD) kullanılarak pürifiye edildi. Elde edilen saf G ve N gen bölgesi cDNA klonlarının ökaryotik vektöre direkt ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla vektörün kullanım talimatı uyarınca 1 µL vektör üzerine 2 µL pürifiye ürün, 1 µL dH_2O ve 1 µL salt solüsyonu ilave edildi ve karışım oda ısısında 5 dk inkübe edilerek rekombinant pcDNA4-N ve pcDNA4-G vektörü oluşturuldu. Elde edilen ligasyon ürünleri transformasyonda kullanıldı.

Transformasyon işlemi için 50 µL TOP10 kompetan hücre üzerine 6 µL ligasyon ürünü bırakıldı. Bu karışım buz üzerinde 30 dk bekletildi ve sonrasında 42°C'de 90 sn. tutularak rekombinant vektörlerin bakteri hücrelerine kimyasal transformasyonu gerçekleştirildi. Bu süre sonunda karışım tekrar buz ürerine alındı. Karışım üzerine 400 µL antibiyotiksiz sıvı besi yeri (LB Medium) ilave edildi. Bu karışım 37°C'de 90 dk çalkalayıcı üzerinde bekletildikten sonra katı besi yerine (Ampisilin, 60 µg/mL) ekildi ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Tablo 1. Tam uzunlukta G ve N genlerinin çoğaltılması için kullanılan primerler.

Primer	Nükleotit Dizilimi	Ürün
BEF(ORF G) F	5' ATG TTC AAG GTC CTA ATA ATT ACC 3'	1874 bç
BEF(ORF G) R	5' TTA ATG ATC AAA GAA CCT ATC 3'	
BEF(ORF N) F	5' ATG TAC TGC ACA TTG AAT AAG 3'	1372 bç
BEF(ORF N) R	5' CTA AAC AAT TGA AGC TAA GTA 3'	

Bu genleri ihtiva eden rekombinant vektörleri içerisinde barındıran koloniler PCR taramasıyla belirlendikten sonra (pcDNA4-N ve pcDNA4-G) pozitif transforme koloniler 10 mL antibiyotikli (Ampisilin, 60 µg/mL) sıvı besi yerine ekilerek 37°C ortamda 200 rpm'de çalkalayıcı üzerinde bir gece çoğalmaya bırakıldı. Bir gece sonunda bu ürünlerden plazmid pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Rekombinant plazmid DNA'ları ticari pürifikasyon kiti (PureLink HiPure Plasmid Miniprep, Thermo Fisher Scientific Inc. Walt-

ham, ABD) kullanılarak elde edildi.

Zeocin duyarlılık testi

Transfeksiyon sonrası seleksiyon işleminden önce transfeksiyon işleminin gerçekleşeceği Vero E6 hücrelerinin Zeocin antibiyotiğine ne kadar süre dayanabildiği belirlendi. Bu amaçla dört adet hücre kültür kabında Vero E6 hücreleri üretildi. Kültüre edilen hücrelerden biri kontrol grubunu oluşturdu. Hücre üretme vasatı olarak her bir hücre kültür kabına %10 FBS (Gibco, ABD), 2.5 mL DMEM F-12 HAM (Sigma Co., ABD) ve antibiyotik grubuna ise bu vasata ilave olarak her birine sırayla 200-100 ve 60 µg/mL olacak şekilde Zeocin (Invitrogen Co., ABD) eklendi.

Dizin Analizi

Saf olarak elde edilen plazmidlerden vektörün kendi primerleri ve gen spesifik primerlerle PCR kuruldu. Elde edilen amplikonların dizin analizi (İontek Co., Türkiye) yapılarak vektör ve inzörtlerin yerleşimi incelendi. Ayrıca, dizin analizi sonrası ilgili gen bölgelerinde rastgele mutasyonlar sonucu oluşmuş stop kodonlarının var olup olmadığına bakıldı.

Transfeksiyon

Elde edilen plazmid DNA'sı Nano-Drop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Lipofektamin 2000 (Invitrogen Co., ABD) kullanılarak Vero E6 hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon aşamasında ürün içerisindeki kullanım talimatı birebir uygulandı. Bu amaçla; 12.5 cm^2'lik hücre kültür kapları %70-80 oranında Vero E6 hücresi ile kaplandı. Kaplardaki hücre üretme vasatı uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyi beş kez steril PBS ile yıkandı. 15 µL lipofektamin 150 µL DMEM ile eppendorf tüp içersinde karıştırıldı ve bu karışım 3.5 µg plazmid DNA'sı içeren 165 µL DMEM ile 1:1 oranında karıştırılarak, sonrasında 5 dk oda ısısında bekletildi. Bu sürenin ardından hazırlanan karışım %2 oranında FBS içeren 2.5 mL DMEM içine ilave edilerek hücre kültür kabına bırakıldı. Transfeksiyon sonrası 72. saate kadar mikroskop altında incelenen hücrelerin bir kısmından protein pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi (geçici transfeksiyon). Diğer grup hücrelerin vasatı değiştirilerek, Zeocin antibiyotik (60 µg/mL) ile selektivite testine tabi tutuldu (Stabil transfeksiyon). Seleksiyon işlemi ile yalnızca genomunda bu genleri içeren ve sürekli olarak bu gen bölgelerini açıklayan hücrelerin seçilmesi ve çoğaltılması amaçlandı. Stabil transfeksiyonda vasat üç günde bir değiştirildi ve aynı miktar antibiyotik konuldu. Bu işlem 21 gün süre ile devam ettirildi. Bu hücrelerin bir kısmı ile mRNA transkripsiyonunu belirlemek için RT-PCR gerçekleştirildi.

Transfekte hücrelerde RT-PCR

Bu aşamada gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde gösterilmesi amaçlandı. Transfeksiyon işleminin 72. saatinde hücre kültür kapları -80^oC ve ardından 37^oC'e kaldırılarak hücrelerin, hızlı dondurulup çözdürülme sonucunda parçalanması sağlandı. Sonrasında RNA ekstraksiyon kiti (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinde oligo-dT primerleri içeren cDNA sentez kiti (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, cDNA'lar elde edildi ve sonrasında gen spesifik primerlerle PCR adımı gerçekleştirildi.

Protein Pürifikasyonları

Transfekte hücre lizatından doğal şartlar altında protein pürifikasyonu ticari pürifikasyon sistemi (Qiagen Nİ-NTA Spin Kit, QIAGEN GmbH,Hilden, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, transfekte hücreler tripsin enzimi ile kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve 4^oC'de, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre peleti 700 µL lizis buffer (50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; %1 Triton X, pH 8.0) ile resüspanse edildi. Üzerine 3 ünite/mL benzonaz-nükleaz ($5x10^6$ hücre için 15 ünite) katıldı. Örnekler 15-30 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre lizatı 4^oC'de, 12.000 rpm'de 15-30 dk santrifüj edildi ve üst sıvı alındı. SDS-PAGE analizi ve pürifikasyon sonrası kıyaslama için 20 µL lizat ayrıldı. Ni-NTA spin kolon 600 µL lizis buffer ile ekülibre edildikten sonra 2900 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Ekülibre edilmiş Ni-NTA spin kolon üzerine 600 µL elde edilen lizat bırakıldı ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı. Ni-NTA spin kolon 600 µL yıkama buffer ile (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) iki kez 900 rpm'de 2 dk santrifüjle yıkandı. Kolon 300 µL elüsyon buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0) ile 2900 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki defa tekrarlandı. Elde edilen proteinin miktarı bovine serum albüminin standart protein olarak kullanıldığı Nano-drop 2000-C cihazında ölçüldü. Pürifikasyon sonrası nano-drop ölçümlerinde rekombinant pcDNA4-N ile transfekte 160

µg/mL protein belirlenirken, rekombinant pcDNA4-G ile transfekte hücrelerde 120 µg/mL protein tespit edildi. Proteinin saflığı ve pürifikasyonun başarısı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile belirlendi.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez

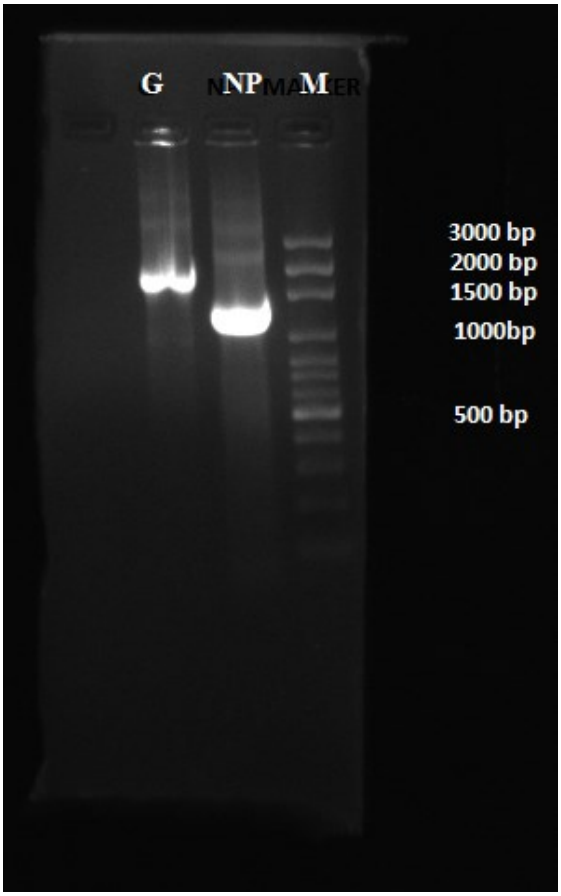
Bu çalışmalarda Mini-Protean Tetracell jel elekroforez ve Mini-Transblot sistemi (Bio-Rad Co., California, ABD) kullanıldı. SDS-PAGE aşaması için; %5'lik toplayıcı jel ve %10'luk ayrıştırıcı jel hazırlandı. Kalıcı transfeksiyonu yapılan transfekte ve kontrol Vero E6 hücreleri alınarak -80ºC'ye kaldırıldı. Hızlı çözdürme yapılarak hücreler parçalandı. Laemmli örnek yükleme bufferı (2x, Bio-Rad) elde edilen lizat ve pürifiye proteinlerle 1:1 oranda karıştırıldı. Tüm örneklerin denatürasyon işlemi 100^{o}C'de 5 dk bekletilerek gerçekleştirildi. Örnekler 130 Volt'da 120 dk yürütüldü. Süre sonunda akrilamid jellerden biri Comassie Brillant Blue R-250 (Bio-Rad) solüsyonu bulunan kaba bırakıldı. Oda ısısında çalkalayıcı üzerinde 90 dk bekletildi. Ardından Comassie boya, hazırlanan karışımla (%30 metanol %10 asetik asit %60 dH_2O) jeldeki bantlar belirgin hale ve arka plan boyası da şeffaf hale gelinceye kadar muamele edilerek uzaklaştırıldı. Bir diğer akrilamid jel ise Western blot analizinde kullanıldı.

Western blot

Jeldeki proteinlerin nitrosellüloz membrana transferleri mini-transblot transfer sistem kullanılarak gerçekleştirildi. Transfer işleminden sonra membran %0.2'lik PBST-20 içerisinde çözdürülmüş 5 g yağsız süt tozu içeren bloklama solüsyonunun 100 mL'sinde bir gece 4^{o}C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bloklamayı takiben, membran %0.01 Tween-20 içeren PBS içinde 1/100 oranında sulandırılan ELISA yüksek pozitif BEFV pozitif sığır serum (Cusabio Biotech Co., Avustralya) içinde oda ısısında iki saat bekletildi. Bu süre sonunda membran yedi kez % 0.2 Tween-20 içeren PBS ile yıkandı. Yıkamalardan sonra membran %0.01(v/v) Tween-20 içeren PBS içinde 1/1000 oranında sulandırılan HRP işaretli anti-bovine IgG konjugat (Sigma Co., Almanya) içinde 1 saat tutuldu. Yıkama tekrarlandı ve membran kromojen-substrat eriyiği (0.05 M Tris pH 7.2, 1 mg/mL diaminobenzidin ve %0.3 H_2O_2) içinde karanlık ortamda, 15 dk bekletildi. Membran, distile suda yıkandıktan sonra jelde belirlenen proteinlerin büyüklükleri moleküler ağırlık büyüklüğü (MW-SDS 200, Sigma Co., Almanya) ile karşılaştırıldı.

Bulgular

BEFV Türkiye 2012 ADYMN izolatı ile enfekte edilen Vero E6 hücre kültürü lizatından RT-PCR ile amplifiye edilen ürünlerin %1'lik low-melting agaroz jelde UV altında görüntülenmesi neticesinde beklenilen büyüklüklerde N (~1300 baz çifti) ve G (~1800 baz çifti) bantlar elde edildi.



Şekil 1. BEFV ile enfekte Vero E6 hücre kültürü üst sıvısından RT-PCR ile çoğaltılan G ve N genleri. M; Ağırlık markeri (Solis Biodyne, 100 baz çifti DNA ladder).

Katı besi yerine ekimler sonrası Ampisilin dirençli *E. coli* kolonileri belirlendi. PCR tarama ile kolonilerde N ve G genleri varlığı doğrulandı.

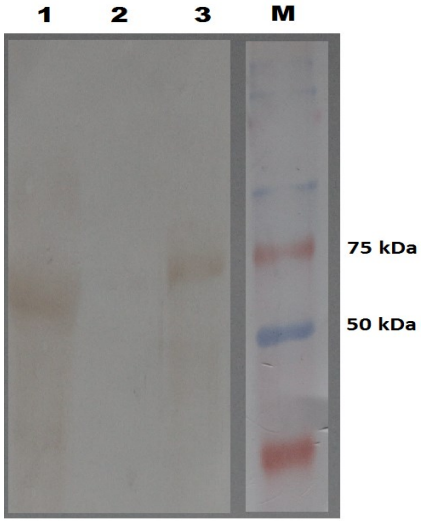
Vero E6 hücrelerinin Zeocin antibiyotik duyarlılık testinde her bir çalışma grubundaki hücrelerin bir süre sonra öldüğü gözlendi. Bu test ile gen ekspresyon düzeyini etkilemeyecek ancak transfekte olmayan hücreleri öldürecek düzeydeki minimum antibiyotik miktarı seçilmesi

amaçlandı. Yapılan test sonucunda 60 µg/mL düzeyindeki Zeocin'in üçüncü günde hücrelerin morfolojisini değiştirdiği ve beşinci günden sonra da hücreleri öldürdüğü gözlendi. Bu nedenle transfeksiyon sonrası seleksiyon işleminde kullanılacak Zeocin miktarı 60 µg/mL olarak belirlendi.

Dizin analizi sonrasında genlerin vektör içerisindeki yerleşimine ve genlerde istenmeyen stop kodonlarının şekillenmesine yönelik incelemede herhangi bir problemle karşılaşılmadı.

Geçici ve stabil transfeksiyon sonrasında hücrelerin parçalanması ile elde edilen RNA'lar RT-PCR testinde kullanılmış G ve N gen bölgelerine ait tam uzunlukta amplikonlar elde edildi.

Geçici ve stabil transfeksiyonu yapılan hücrelerden elde edilen hücre fraksiyonları ve pürifiye proteinlerin SDS-PAGE analizi sonrasında N proteini ~55 kDa büyüklüğünde ve G proteini ise



Şekil 2. Pürifiye G ve N proteinleri ve yüksek titreli BEFV infekte sığır serumuyla gerçekleştirilen Western blot sonuçları. M; Renkli protein marker, Hat 1; Pürifiye N proteini (~55 kDa), Hat 2; Kontrol Vero E6 hücre lizatı, Hat 3; Pürifiye G proteini (~75 kDa).

~75 kDa büyüklüğünde belirlendi.

Stabil transfekte hücre lizatın pürifiye edilmesi neticesinde elde edilen G ve N proteinlerinin BEFV yüksek pozitif sığır serumu ile Western blot çalışması neticesinde SDS-PAGE analizi sonuçları doğrulandı.

Tartışma ve Sonuç

Virüslerin biyolojik olarak esansiyel proteinlerini içeren rekombinant vektörlerin oluşturulması veya bu proteinlerin saf olarak elde edilmesi teşhis ve immunizasyon amaçlı oldukça önemlidir. Gerek ELISA geliştirilmesi gerekse DNA immunizasyonu amacıyla BEFV G ve N genlerini hedef alan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (8,10,23,25,26). Bu çalışmaların büyük bir kısmında G geni ve proteini hedef alınmıştır. Mevcut çalışma BEFV G ve N geninin açıklatılmasına yönelik yapılan sınırlı sayıda çalışmalardan biri olmakla birlikte, ülkemizde bu virüs ile alakalı ilk rekombinant protein üretim çalışmasıdır.

Yapılan çalışmada genlerin açıklatılma sonrasında sentezletilecek proteinlerin pürifikasyonları amacıyla etkinliği daha önceden bilinen affinite temelli His-işaretli sistem tercih edilmiştir. SDS-PAGE ve Western blot deneyleri sonucuna göre G ve N proteininin açıklatılması ve pürifikasyonunda başarı sağlandığı tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda N (50-55 kDa) ve G (75-81 kDa) proteinlerinin formlarına göre farklı büyüklüklerde elde edildiği rapor edilmiştir (10,12). Bu çalışmada da beklenilen büyüklükte proteinlerin varlığı önce SDS-PAGE'de belirlenmiş ve sonrasında spesifik antikorların varlığında Western blot ile doğrulanmıştır.

BEFV'e karşı canlı ve inaktif aşılar mevcuttur ve hastalığın görüldüğü Japonya, Avustralya ve Güney Afrika gibi bazı ülkelerde inaktif ve attenüe aşılar kullanılmaktadır (2,19,24). BEFV canlı aşılarında aşılama sonrası klinik belirtilerin görülmesi ile bu virüsün de diğer RNA virüslerinde olduğu gibi mutasyona açık olması gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır. İnaktif aşıların ise korunma deneylerinde uzun süreli ve yeterli koruma sağlamadığı ifade edilmektedir (2). BEFV G proteinine karşı oluşan antikorlar nötralizan olması sebebiyle korumada öncelikli hedeftir. Bu nedenle de BEFV rekombinant DNA aşı çalışmalarında ve protein aşı denemelerinde G proteinini hedef alan çalışmalar rapor edilmiştir (8,9,18,26). Ancak yapılan çalışmalarda, nötralizan antikor yanıtın özellikle saha şartlarında koruma ve virüsün eliminasyonunda yetersiz kaldığı belirlenmiştir (2,5,19). Ateş ve yangısal reaksiyonlar akut BEF olgularının en önemli belirtileri olarak ortaya çıkar. Yangısal sitokinlerin bu belirtilerin ortaya çıkmasında sorumlu olduğu düşünülmektedir (5,15). Aziz-Boaron ve ark. (2) yaptıkları çalışmada BEFV'e karşı immun korumada ve klinik tablonun hafif seyretmesinde virüs nötralizan antikorların varlığının tek başına belirleyici olmadığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, BEF enfeksiyonlarında klinik tablonun şiddeti, patogenezi ve virüsün

eliminasyonunda asıl belirleyici faktörün hücresel immün yanıtın gücü ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir. BEFV ile aynı ailede yer alan kuduz ve vesiküler stomatitis virüsler ile (VSV) yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (4,14). Bu virüse karşı canlı aşılardaki koruma potansiyelinin, G proteinine ilave diğer yapısal proteinlere karşı oluşan antikor yanıtından kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir. BEFV'nin N proteini, virüs RNA ile ilişkili olan ve nükleokapsit yapısını oluşturan yapısal bir proteindir. Gerek kuduz gerekse VSV çalışmalarında N proteininin virüs spesifik sitotoksik T hücreleri tarafından tanınan dominant antijenler oldukları ortaya konmuştur (4,6,7).

Sözkonusu çalışmada BEF virüsün G ve N genini açıklayan rekombinant vektör oluşturulmuş ve hedeflenen proteinlerin saflaştırılması denenmiştir. İn vitro ortamda gerçekleştirilen bu çalışmanın in vivo ortama uyarlanmasının rekombinant aşı niteliğinde olacağı öngörülmektedir. Yine kimyasallardan arındırılan saf proteinlerin sub-unit aşı amaçlı kullanımı denenebilir veya teşhis kitlerinde kullanılabilir. Gelecek çalışmalarda bu ürünlerin DNA ve sub-ünit aşı olarak geliştirilmesi planlanmaktadır.

Kaynaklar

1. Aziz-Boaron O, Klausner Z, Hasoksuz M, Shenkar J, Gafni O, Gelman B, David D, Klement E. Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East strong evidence for transmission by winds and animal transport. Vet Microbiol 2012; 158(4): 300-7.
2. Aziz-Boaron O, Gleser D, Yadin H, Gelman B, Kedmi M, Galon N, Klement E. The protective effectiveness of an inactivated bovine ephemeral fever virus vaccine. Vet Microbiol 2014; 173(2): 1-8.
3. Baranowska M, Hauge AG, Hoornaert C, Bogen B. Grødeland G. Targeting of nucleoprotein to chemokine receptors by DNA vaccination results in increased CD8(+)-mediated cross protection against influenza.Vaccine 2015; 33(49): 6988-96.
4. Barefoot BE, Sample CJ, Ramsburg EA. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing influenza nucleoprotein induces CD8 T-cell responses that enhance antibody -mediated protection after lethal challenge with influenza virus. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16(4): 488-98.
5. Barigye R, Melville LF, Davis S, Walsh S, Hunt N, Hunt R, Elliot N. Kinetics of pro-inflammatory cytokines, interleukin-10, and virus neutralising antibodies during acute ephemeral fever virus infections in Brahman cattle. Vet Immunol Immunopathol 2015; 168(4): 159-63.
6. Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. Rev Infect Dis, 1988; 4(2): 785-98.
7. Fujii H, Takita-Sonoda Y, Mifune K, Hirai K, Nishizono A, Mannen K. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. J Gen Virol 1994; 75(6): 1339-44.
8. Hertig C, Pye AD, Hyatt AD, Davis SS, McWilliam SM, Heine HG, Walker PJ, Boyle DB. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not G(NS) glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. J Gen Virol 1995; 77(4): 631-40.
9. Hsieh YC, Wang SY, Lee YF, Chen SH, Mak PO, Chu CY. DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovine ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever. J Vet Med Sci 2006; 68(6): 543-8.
10. Johal J, Gresty K, Kongsuwan K, Walker PJ. Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. Arch Virol 2008; 153(9): 1657-65.
11. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Rhabdoviridae. Maclachlan NJ. Dubovi EJ. eds. In: Fenner's Veterinary Virology. Fourth Edition. New York: Academic Press, 2011; pp. 338-49.
12. Nandi S, Negi BS. Bovine ephemeral fever:a review. Comp Immunol Microb 1999; 22(2): 81-91.
13. Nezam FS, Hosseini SM, Kheiri MT, Abdoli A. Memarnejadian A, Shenagari M, Gholami S, Sohani H, Rahmatollahi H, Jamali A. Suppressive effects of chronic stress on influenza virus protection after vaccination with plasmid DNA-encoded nucleoprotein. Neuroimmunomodul 2015; 22(5): 322-7.
14. Puddington L, Bevan MJ, Rose JK, Lefrançois L. N protein is the predominant antigen recognized by vesicular stomatitis virus-

specific cytotoxic T cells. J Virol 1986; 60 (2): 708-17.
15. St George TD, Murphy GM, Burren B, Uren MF. Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever. IV: A comparison with the inflammatory events in milk fever of cattle. Vet Microbiol 1995; 46(1-3): 131-42.
16. Tonbak S, Berber E, Yoruk MD, Azkur AK, Pestil Z, Bulut H. A large-scale outbreak of bovine ephemeral fever in Turkey. J Vet Med Sci 2013; 75(11): 1511-4.
17. Sambrook J, Russell DW, eds. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; p. 1-127.
18. Uren MF, Walker PJ, Zakrzewski H, St George TD, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. Vaccine 1994; 12(9): 845-50.
19. Vanselow BA, Abetz I, Trenfield K. A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A: a comparative study using adjuvants Quil A, aluminium hydroxide gel and dextran sulphate. Vet Rec 1985; 117(2): 37-43.
20. Venter GJ, Hamblin C, Paweska JT. Determination of the oral susceptibility of South African livestock-associated biting midges, Culicoides species, to bovine ephemeral fever virus. Med Vet Entomol 2003; 17(2): 133-7.
21. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang YH. Proteins of bovine ephemeral fever virus. J Gen Virol 1991; 72(1): 67-74.
22. Walker PJ, Wang Y, Cowley JA, McWilliam SM, Prehaud CJ. Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of bovine ephemeral fever virus. J Gen Virol 1994; 75(8): 1889-99.
23. Wallace DB, Viljoen GJ. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. Vaccine 2005; 23(23): 3061-7.
24. Yeruham I, Van Ham M, Bar D, Yadin H, Tiomkin D. Economic aspects of the 1999 outbreak of bovine ephemeral fever in dairy cattle herds in the Jordan Valley in Israel. Vet Rec 2003; 153(6): 180-2.
25. Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, Zhou JZ, Cao XA, Gong XW. Development and application of G1-ELISA for detection of antibodies against bovine ephemeral fever virus. Res Vet Sci 2009; 87(2): 211-2.
26. Zheng FY, Lin GZ, Qiu CQ, Zhou JZ, Cao XA, Gong XW Serological detection of bovine ephemeral fever virus using an indirect ELISA based on antigenic site G1 expressed in *Pichia pastoris*. Vet J 2010; 185(2): 211-5.
27. Zheng F, Qiu C. Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. Virol J 2012; 9 (4): 268-75.

Yazışma Adresi:
Prof. Dr. Hakan BULUT
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ, TÜRKİYE
GSM: + 90533 480 96 70
E-posta: hbulut1@firat.edu.tr