
Hepatit B Virüs Core Antijen Geninin Ökaryotik Açıklama Vektörüne Yerleştirilmesi

Yasemin BULUT, Aykut ÖZDARENDELİ, Mehmet Ziya DOYMAZ, Zülal AŞÇI TORAMAN

* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Bu çalışmada, hepatit B virüs (HBV) core antijeni (HBcAg) çoğaltılarak, ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir. Bu amaçla, HBcAg DNA'sı, HBV'nin HBcAg gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Daha sonra HBV'nin HBcAg gen bölgesine ait PCR ürünleri pcDNA 3.1/V5 His-TOPO ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir. PCR tarama deneyleri ile HBcAg geninin varlığını doğrulamıştır. Ayrıca enzim sindirim deneylerinden de bazı amaçlar için yararlanılmıştır. Sonuç olarak, HBV'nin HBcAg gen bölgesi ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüsü, HBV, HBcAg, Klonlama

SUMMARY

Cloning of the Core Antigen (HBcAg) Gene of Hepatitis B Virus into an Eucaryotic Expression Vector

In the presence of this study, the core antigen (HBcAg) of hepatitis B virus (HBV) was amplified and cloned into an eucaryotic expression vector. For this aim, HBcAg DNA was amplified with the primers specific to HBcAg gene of HBV by polymerase chain reaction (PCR). Afterwards, the PCR product of HBcAg gene of HBV was placed into pcDNA 3.1/V5 His-TOPO vector. PCR screening assay was performed to confirm the presence of the HbcAg gene. Furthermore, enzyme digestion assay was performed for the same purpose. In conclusion, the HBcAg gene of HBV was cloned into the eucaryotic expression vector.

Key Words: Hepatitis B virus, HBV, HBcAg, Cloning

Hepatit B virüsü (HBV), halk sağlığını tehdit eden en önemli ve yaygın viral etkenlerden birisidir. HBV'nin varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, virüs hakkında bugün bilinen birçok bilgi özellikle rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca, bu teknoloji ile teşhis ve korunma amaç-

lı kullanılan HBV'nin proteinlerinin fazla miktarda üretilmesi sağlanmıştır^[1,2].

HBV, 3200 nükleotid uzunluğunda, kısmen çift sarmallı ve sirküler bir DNA'ya sahiptir. Virüsün C gen bölgesi yaklaşık olarak 640 nükleotid uzunluğundadır. Bu bölge içinde iki farklı protein kodlan-

maktadır. Genin 550 baz çifti (bç) uzunluğundaki HBcAg gen bölgesi tarafından kodlanan protein, yaklaşık olarak 183 aminoasit uzunluğunda ve 22 kDa büyüklüğünde HBcAg proteinidir. Bu protein virüs açısından önemli biyolojik ve morfolojik özelliklere sahiptir^[3,4]. Ayrıca, konakçıda açıklanan bu proteinin miktarı ve proteine karşı konakçı immün yanıtının gücünün, hastalığın patogeneğinde önemli olduğu bilinmektedir. Bu bakımdan, konakçıda HBcAg'ye özgül immün yanıtın ölçülmesi hastalığın takibinde önemli görülmektedir^[1,4].

Bu çalışmada, kronik HBV'li hasta serumlarından çoğaltılan HBcAg gen bölgesinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pcDNA3-1/V5-His TOPO TA ökaryotik açıklama vektörüne yerleştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

HBcAg Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Kronik HBV bölgesinin çoğaltılması daha önceki bir çalışmaya göre gerçekleştirildi^[5]. Daha sonra, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünü Wizard pürifikasyon kiti (Promega) kullanılarak %1'lik agaroz jelden saflaştırıldı^[6].

Rekombinant HBc-TOPO Plazmidinin Oluşturulması

Rekombinant HBc-TOPO plazmidinin oluşturulması aşağıda tarif edilmiştir. Kısaca; PCR ile çoğaltılan HBcAg geni *EcoRI-HindIII* enzimleriyle kesilerek ve yaklaşık olarak 550 bç uzunluğundaki gen kısmı %1.5'lik agaroz jelden daha önce tarif edildiği gibi pürifiye edildi^[6]. Jelden pürifiye edilmiş HBcAg geninin 4 µL'si ile 1 µL pcDNA3-1/V5-His TOPO vektöründen (Invitrogen) hazırlanan karışım mikrosantrifüj tüpüne konularak oda ısısında beş dakika ligasyon için bekletildi. 1 µL 6XTOPO durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Kompetan JM109 hücreleri kullanılarak transformasyon işlemi gerçekleştirildi.

Transformasyon sonrası elde edilen bakteriyel koloniler kullanılarak PCR tarama (PCR-T) deneyi yapıldı^[5].

pcDNA3-1/V5-His TOPO vektörü içine HBcAg gen bölgesinin yerleştirilmesi ile oluşturulan rekombinant plazmid DNA'sı, alkali lizis metodu ile elde edildikten sonra *EcoRI-HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulama deneyleri gerçekleştirildi^[5].

Restriksiyon enzim kesim analizi; ampisilin içeren Luria-Bertani (LB) agar besiyerinde üreyen

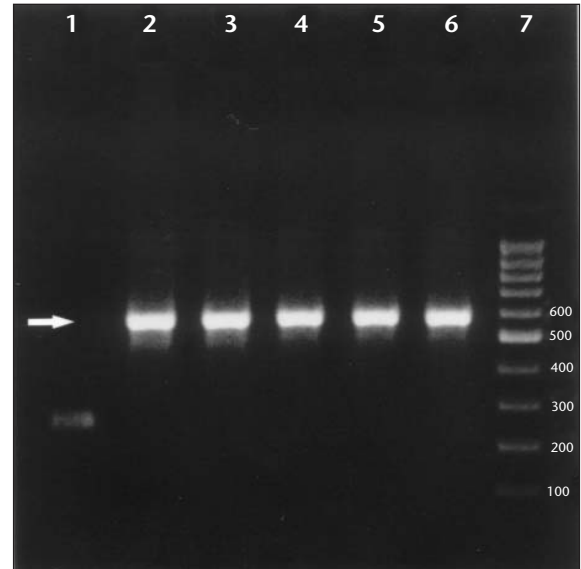
transforme hücre DNA'larında HBcAg geninin varlığının gösterilmesi amacıyla ek bir doğrulama deneyi olarak restriksiyon kesim analizi gerçekleştirildi^[5,6]. Bu amaçla, öncelikle, ampisilin içeren LB agar besiyerinde üreyen hücre kolonilerinden öze yardımıyla alınan hücreler ampisilin içeren 10 mL LB sıvı besiyerine ekildi. Hareketli zeminde bir gece üretilen hücreler santrifüjle elde edildi. Elde edilen hücrelerden miniprep DNA'lar hazırlandı. Miniprep DNA'larında *EcoRI-HindIII* enzimlerle kesim deneyleri daha önce belirtildiği gibi gerçekleştirildi^[5]. Kesim ürünleri %1.5'lik agaroz jelde görüntüldü.

Restriksiyon kesim analizi ve PCR-T deneyleri sonucuna göre, HBV'nin HBcAg genini içeren klonlardan elde edilen rekombinant plazmidler HBc-TOPO olarak isimlendirildi.

BULGULAR

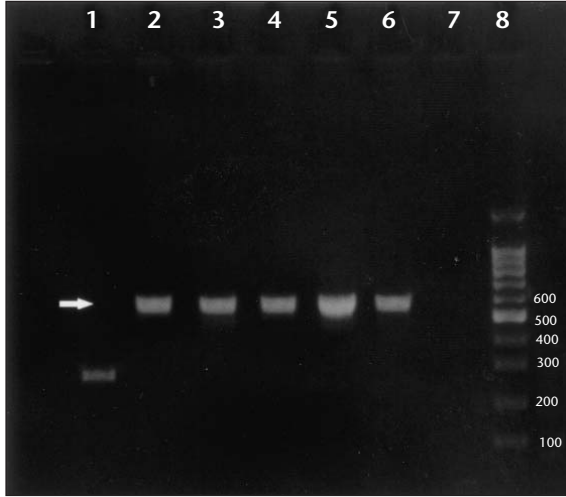
Kronik HBV infekte serum örneklerinden restriksiyon enzim tanıma bölgelerine de sahip primerlerle HBcAg gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda yaklaşık 550 bç'lik gen parçası agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 1).

HBV ile infekte bireylerin serum örneklerinden izole edilen HBV DNA'sı kullanılarak, HBcAg gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgenin pcDNA3-1/V5-His TOPO vektörüne yerleştirildiği PCR-T deneyi ile doğrulanmıştır.

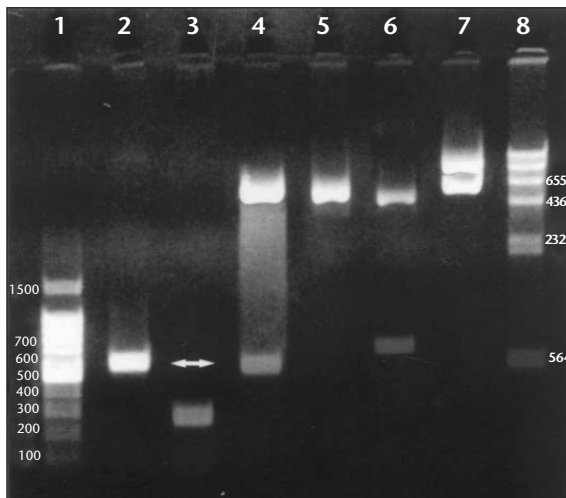


Şekil 1. Kronik HBV infekte serum örneklerinden çoğaltılan ve restriksiyon enzim tanıma bölgelerine de sahip olan 550 bç uzunluğunda HBcAg gen bölgesinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.

Bu amaçla, transformasyon işlemi sonucunda elde edilen ve rekombinant plazmidi içeren bakteriyel hücre kolonilerinin kalıp olarak kullanıldığı ve PCR reaksiyonu sonucunda HBcAg gen bölgesinin belirlendiği elektroforez sonuçları gösterilmiştir (Şekil 2). PCR reaksiyonunun kontrolü amacıyla HBsAg gen bölgesinin 259 bp'lik bölgesine özgül primerler kullanılmış ve bu gen bölgesi de PCR-T deneyi sonucunda tespit edilerek görüntülenmiştir.



Şekil 2. HBcAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR-T deneyi sonucunda çoğaltılan ürünün %2'lik agaroz jelde gösterilmesi. Pozitif PCR-T ürünü (hat 3-6), pozitif kontrol olarak kullanılan 550 bp'lik HBcAg PCR ürünü (hat 2), negatif kontrol (hat 7), 259 bp'lik HBsAg gen parçası (hat 1), 100 bp'lik DNA marker (hat 8).



Şekil 3. *EcoRI-HindIII* enzimlerle kesimi neticesinde rekombinant HBc-TOPO DNA'larında uzaklaştırılan 550 bp'lik HBcAg geninin %1.5'lik agaroz jelde görüntüsü.

Rekombinant vektörde HBcAg geninin varlığının gösterilmesi amacıyla ek bir doğrulama deneyi olarak restriksiyon kesim analizi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, rekombinant HBc-TOPO DNA'larının *EcoRI-HindIII* enzimlerle kesimi neticesinde yaklaşık 5500 bp uzunluğundaki vektör DNA'sına ilave olarak 550 bp'lik HBcAg geni %1.5'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3).

TARTIŞMA

Deneyel hayvan modellerinin çok sınırlı olması nedeniyle HBV replikasyonunun, genom yapısının ve nükleotid diziliminin anlaşılmasına yönelik çalışmalarda klonlanmış HBV DNA'sı kullanılmıştır^[4,7,8]. Ayrıca, bu çalışmalar klonlanmış gen ürününün fazla miktarda üretilmesi için de sıklıkla tercih edilmiştir^[7]. HBV için, klonlanmış gen ürünlerinin tanısal kitlerin hazırlanmasında ve immünizasyonda kullanımları son yıllarda vazgeçilmez olarak kabul edilmektedir^[7,9].

Ökaryotik hücrelerde HBcAg proteinin açıklanmasına yönelik önceki çalışmalarda viral promotör ve enhancerlara sahip farklı plazmid vektörler kullanılmıştır^[7-10]. pcDNA3-1/V5-His TOPO TA, PCR ürünlerinin direkt klonlanması ve memeli hücrelerde açıklanmasında kullanılan 5523 bp uzunluğunda bir vektördür^[11]. Bu vektör kullanılarak, klonlanacak PCR ürününün çok kısa sürede ve yüksek etkinlikte ligasyonu mümkün olmaktadır. Ayrıca, bu vektör rekombinant genin memeli hücrelerde yüksek oranda sentezine ve açıklanılan proteinin kolaylıkla pürifikasyonuna da imkan sağlamaktadır^[11].

Ülkemizde HBV'ye yönelik yapılan çalışmalar çoğunlukla tanısal amaçlıdır. Son yıllarda, HBV'nin yapısal unsurlarının anlaşılmasına, proteinlerinin tanısal ve tedavi amaçlı üretilmesine yönelik moleküler çalışmalar görülmeye başlamıştır^[5,12].

Sonuç olarak; bu çalışmada HBV'nin HBcAg geninin ökaryotik bir açıklama vektörü olan pcDNA3-1/V5-His TOPO TA vektörüne yerleştirilmesi ve bu vektörde klonlanması başarılmıştır. Böylece, elde edilen bu rekombinant DNA vektör kullanılarak HBcAg proteininin tanısal, tedavi ve teşhis amaçlı üretilmesi mümkün olacaktır. Ayrıca, bu rekombinant vektörün DNA tabanlı immünizasyonlarda kullanımları test edilebilecektir. Bu doğrultuda çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yamaki M, Ohori H, Onodera S, Ishida N, Maeda H. Circular dichroism and biochemical properties of the hepatitis B virus core antigen. *Biochim Biophys Acta* 1982; 706:165-73.
2. Pasek M, Goto T, Gilbert W, et al. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 1979;282: 575-9.
3. Lanford RE, Notvall LM, Dreesman GR, Harrison CR, Lockwood D, Burk KH. Expression and characterization of hepatitis B virus precore-core antigen in *E. coli*. *Viral Immunol* 1987;1:97-109.
4. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-51.
5. Bulut Y, Doymaz MZ. Hepatitis B virus core antijeni (HBcAg) geninin *Escherichia coli*'de klonlanması 2001; 35:127-32.
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
7. Takeshima H, Namiki M, Inokoshi J, et al. Stable expression of hepatitis B virus genome in a primate kidney cell. *Arch Virol* 1989;109:35-46.
8. Jean-Jean O, Levrero M, Will H, Perricaudet M, Rossignol JM. Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. *Virology* 1989;170:99-106.
9. Yeh CT, Ou JH. Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 1991;65:2327-31.
10. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6459-66.
11. Invitrogen, Eukaryotic TOPO TA Cloning Kit. Versiyon C (Kat. No K4800-01).
12. Yapar M, Güney Ç, Başustaoğlu A, Kubar A. Hepatit B "e" antijen gen bölgesinin *Escherichia coli*'de ekspresyonu. *Mikrobioloji Bülteni* 2001;35:273-8.

Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Yasemin BULUT

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Dekanlık Binası

23100, ELAZIĞ

e-mail: ybulut@firat.edu.tr

ygoncbulut@hotmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 05.02.2003

Kabul Tarihi: 28.04.2003