

---

# Hepatit B Virüsü HBsAg Geninin Açıklama Vektörüne Yerleştirilmesi<sup>#</sup>

Aykut ÖZDARENDELİ\*, Neslihan KELEŞTEMUR\*

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

## ÖZET

Bu çalışmada, hepatit B virüsü (HBV)'nün yüzey antijeni geni (HBsAg), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltıldı ve bir ekspresyon vektörü içine klonlandı. Öncelikle kronik HBV'li bir hastanın serumundan HBV DNA'sı elde edildi. Daha sonra, HBsAg geni pcDNA3.1/V5 His-TOPO vektörü içine yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmid, *Escherichia coli* hücrelerinin transformasyonunda kullanıldı. Vektör içindeki HBsAg geninin varlığı, PCR tarama deneyi (PCR-T) ile tespit edildi. Ayrıca, aynı amaç için restriksiyon enzim kesim deneyi yapılarak HBsAg geninin bir ekspresyon vektörü içerisine yerleştirildiği teyit edildi.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüsü, Polimeraz zincir reaksiyonu, Klonlama

## SUMMARY

### Cloning of HBsAg Gene of Hepatitis B Virus in to an Expression Vector

In the present study, the surface antigen (HBsAg) of HBV was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into an expression vector. For this purpose, HBV DNA was obtained from a patient with chronic HBV infection. Then, the PCR product of HBsAg gene of HBV was cloned into pcDNA3.1/V5 His-TOPO vector. The resulting recombinant plasmid, termed pFHBsAg, was transformed into JM109 competent bacterial cells. The presence of the HBsAg gene was confirmed by PCR screening assay. Moreover, enzyme digestion assay was also performed for the same purpose. Both assays indicated that HBsAg gene of HBV was placed into the expression plasmid.

Key Words: Hepatitis B virus, Polymerase chain reaction, Cloning

<sup>#</sup> Bu çalışma, XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (1-5 Ekim 2002)'nde poster olarak sunulmuştur.

Hepatit B virüsü (HBV), karaciğerde akut ve kronik hepatite sebep olan ve dünyada henüz kontrol altına alınamamış en önemli hastalık ajanlarından biridir<sup>[1]</sup>. Dünyada yaklaşık 400-500 milyon kişinin kronik taşıyıcı olduğu ve her yıl 1 milyondan fazla insanın HBV ile ilişkili hepatoselüler karsinoma (HCC)'dan dolayı hayatını kaybettiği kabul edilmektedir<sup>[1-4]</sup>.

HBV, yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda negatif anlamlı sarmalla 1700-2800 nükleotid uzunluğunda pozitif anlamlı sarmaldan oluşan, kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA'ya sahiptir<sup>[2,5-7]</sup>. HBV'nin S bölgesi, S geni ile pre-S bölgelerinden oluşmakta ve üç ayrı viral zarf proteinini kodlamaktadır. Temelde tek bir gen tarafından kodlanan bu proteinlerdeki farklılıklar sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır<sup>[8-10]</sup>. L proteinini pre-S1, pre-S2 ve S; M proteinini pre-S2 ve S; S proteinini ise sadece S geni tarafından kodlanır.

HBV'ye karşı koruyucu aşılama öncelikli hedef protein virüsün S gen bölgesi tarafından kodlanan yüzey antijenidir (HBsAg)<sup>[10-14]</sup>.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün, bütün dünyada yeni hepatit B olgularının önlenmesine yönelik global stratejisinde, bütün kan ve kan ürünlerinin HBsAg açısından test edilmesi ve toplumdaki HBV taşıyıcılarının belirlenmesine özel bir önem verilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır<sup>[10]</sup>.

Medikal tedavisi kısıtlı olan hepatit B infeksiyonlarının tanınmasında veya immünizasyonda kullanılacak antijenin hazırlanması amacıyla HBV'nin üretilmesi mümkün olmadığından, daha basit ve ucuz yolla elde edilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Söz konusu yöntemlerden en önemlisi rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, HBV yüzey antijeninin çeşitli sistemlerde açıklatılması yoluyla çok miktarlarda elde edilmesidir.

Günümüzde henüz etkin bir tedavisinin olmaması nedeniyle, hepatit B infeksiyonundan aşı ile korunma yolu önemini korumaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşılar halen başarıyla uygulanmakta ve yeterli koruma sağlamaktadır<sup>[15]</sup>.

Bu bilgilerin ışığı altında yapılan bu çalışmada, tanısal veya korunma amaçlı olarak daha sonraki çalışmalara temel oluşturması amacıyla HBsAg gen bölgesinin klonlanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### HBsAg Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürününün Hazırlanması

HBsAg gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler Gen Bank'tan elde edilen AJ344117 dizisi temel alınarak hazırlandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için, Fırat Üniversitesi Araştırma-Uygulama Hastanesi'ne başvuran hastalardan, Quantiplex bDNA deney sistemi kullanılarak HBV ile infekte olduğu tespit edilen bir hastanın kan serumundan elde edilen HBV DNA'sı kullanıldı. PCR ile HBsAg gen bölgesinin çoğaltılması için, 0.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne, elde edilen HBV DNA'nın 10 µL'si ile 2 µL 20 pmol P1-P2 primer (P1: 5'-G ATG GAG AAC ATC GCA TCA GG-3', P2: 5'-GG TCA AAT GTA TAC CCA AAG-3'), 4 µL 1.25 mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 5 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 5 µL 10XPCR buffer (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 0.5 µL 2U Taq DNA polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, ABD) ve 2.5 µL sıgır serum albumini (Promega, Co, Madison, WI, ABD), ilave edilerek toplam 50 µL'lik PCR karışımı hazırlandı. HBsAg geni, 95°C'de bir dakikalık ön ısıtmayı takiben, 95°C'de 30 saniye, 55°C'de bir dakikalık, 72°C'de 1.5 dakikalık 32 döngüden oluşan PCR işlemi ile çoğaltıldı. Elde edilen 681 bp uzunluğundaki HBsAg gen bölgesi pürifiye edilerek plazmide klonlamak için "TOPO TA Cloning Kit" (in vitro) kullanıldı.

### HBsAg Geninin pcDNA3.1/V5His-TOPO Vektörüne Yerleştirilmesi ve Kompetan *Escherichia coli*'ye Transformasyonu

Jelden pürifiye edilmiş HBsAg geninin 4 µL'si ile 1 µL pcDNA3.1/V5His-TOPO vektöründen (in vitro) hazırlanan karışım mikrosantrifüj tüpüne konularak oda ısısında beş dakikalık ligasyon için bekletildi. Bu süre sonunda 1 µL 6XTOPO durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Önceden hazırlanan kompetan JM109 hücreleri kullanılarak transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Transforme hücreler 60 µg/mL ampisilin içeren LB katı besiyerine ekildikten sonra 37°C'de bir gece bekletildi.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tarama Deneyi (PCR-T)

Transformasyon sonrası elde edilen bakteriyel koloniler kullanılarak PCR-T deneyi yapıldı. Bu amaçla, 0.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 2 µL 10XPCR buffer, 2 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µL 1.25 mM dNTP, 4 µL 20 pmol primer 1-primer 2 ve 4 µL steril dH<sub>2</sub>O'dan oluşan ve toplam 15 µL olan karışım bırakıldı. Daha sonra bir kürdan yardımıyla pleytdeki koloniden bir miktar alınarak hazırlanan karışımın içine ilave edildi ve 95°C'de 10 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda her bir tüpe 1 µL Taq DNA polimeraz enzimi eklenerek reaksiyona bırakıldı. 95°C'de beş dakikalık ön ısıtmadan sonra 94°C'de bir dakika, 55°C'de bir dakika ve 72°C'de bir dakikalık 25 döngüden oluşan PCR işlemi ile çoğaltıldı.

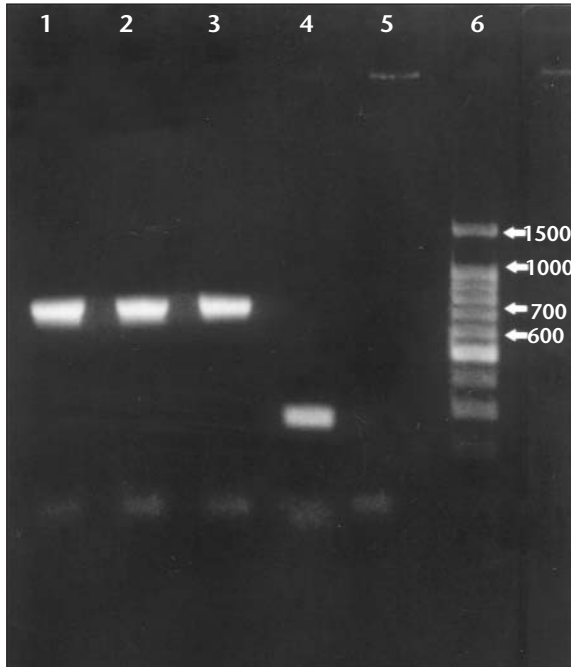
### Restriksiyon Enzim Kesim Deneyleri

pcDNA3.1/V5His-TOPO vektörü içine HBsAg gen bölgesinin yerleştirilmesi ile oluşturulan rekombinant plazmid DNA'sı, alkali lizis metodu ile elde edildikten sonra XbaI restriksiyon enzimi ile kesildi<sup>[16]</sup>. Enzim kesimi için 0.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 5 µL DNA solüsyonu, 5 µL 1X restriksiyon enzim solüsyonu, 10 ünite/µL konsantrasyondaki XbaI enziminden 5 µL ve 35 µL steril dH<sub>2</sub>O ilave edildi. Hazırlanan karışım kesim için 37°C'de 16 saat bekletildi.

### BULGULAR

#### HBV HBsAg Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

HBV ile infekte olan bireylerin serumlarından izole edilen DNA'nın PCR'si sonucunda 681 bç uzunluğundaki HBsAg gen bölgesi çoğaltılmış ve bu gen bölgesi %1.5 agaroz jele yapılan yükleme sonucunda belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışmada PCR'nin kontrolü amacıyla HBV'nin HBsAg gen bölgesinin 259 bç'lik bir gen bölgesini çoğaltan özgül primerler kullanılmıştır.



Şekil 1. Hepatit B virüsü ile infekte bireylerin kan serumlarından izole edilen DNA'nın HBsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan HBsAg gen parçasının %1.5 agaroz jelde görüntülenmesi. 681 bç'lik HBsAg geni (hat 1-3), 259 bç'lik HBsAg gen parçası (hat 4), negatif kontrol (hat 5), 100 bç'lik DNA marker (hat 6).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tarama Deneyi (PCR-T)

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

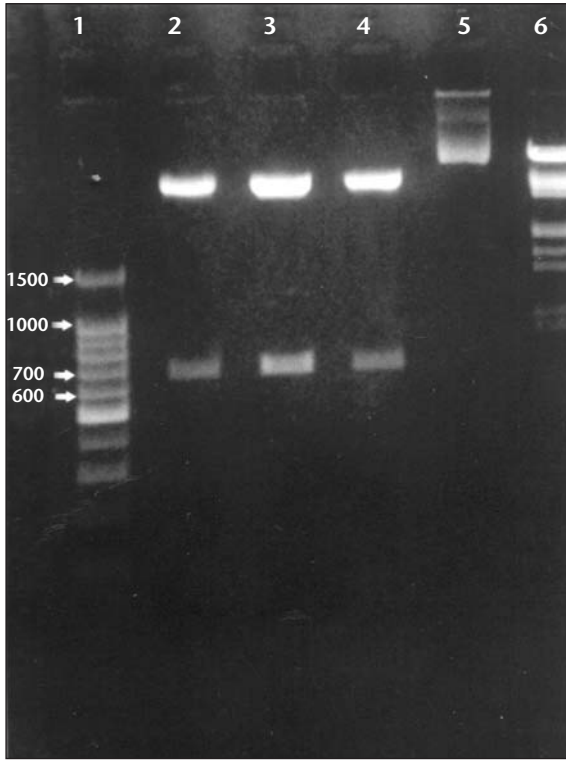
Bu amaçla, transformasyon işlemi sonucunda elde edilen ve rekombinant plazmid içeren bakteriyel hücre kolonileri kalıp olarak kullanılarak, PCR sonucunda çoğaltılan HBsAg gen bölgesi şekilde gösterilmiştir (Şekil 2). PCR'nin kontrolü amacıyla HBsAg gen bölgesinin 259 bç'lik bölgesine özgül primerler kullanılmış ve bu gen bölgesi de PCR-T deneyi sonucunda tespit edilerek görüntülenmiştir.

### Restriksiyon Enzim Kesim Deneyleri

Klonlama çalışmaları neticesinde, rekombinant plazmidin oluşturulduğu PCR-T deneyi ile doğrulanmıştır. HBsAg gen bölgesinin vektör içine hangi yönelimde yerleştiğini tespit etmek amacıyla rekombinant plazmid DNA'sı, XbaI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. HBsAg gen bölgesi ve pcDNA3.1/V5/His-TOPO vektörü nükleotid dizilimlerinde birer tane XbaI restriksiyon enzimi kesim bölgesi içerdiğinden, kesim deneyi sonucunda 632 bç'lik ve 4891 bç'lik iki farklı uzunlukta DNA parçası elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak pcDNA3.1/V5/His-TOPO-HBsAg rekombinant plazmid kullanıldı. Kesim deneyi sonucunda hedef gen bölgesinin doğru yönelimde yerleştiği tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. HBsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR-T deneyi sonucunda çoğaltılan ürünün %1.5 agaroz jelde gösterilmesi. Pozitif PCR-T ürünü (hat 1-8), pozitif kontrol olarak kullanılan 681 bç'lik HBsAg PCR ürünü (hat 9), negatif kontrol (hat 10), 259 bç'lik HBsAg gen parçası (hat 11), 100 bç'lik DNA marker (hat 12).



**Şekil 3.** Rekombinant plazmidin varlığının ve hedef gen bölgesinin doğru şekilde (oryantasyonda) yerleştiğinin, XbaI restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim deneyi sonucunda %2 agaroz jelde görüntülenmesi. 100 bç'lik DNA marker (hat 1), XbaI restriksiyon enzimiyle kesilen rekombinant plazmid DNA ürünü (hat 2-4), pozitif kontrol olarak kullanılan rekombinant plazmid DNA'sı (hat 5), Lambda DNA/EcoRI + Hind III ağırlık markeri (hat 6).

### TARTIŞMA

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir. Bölgeler arasındaki bu farklılığı yaratan önemli etkenlerden biri ülkelerin sosyoekonomik durumları ve bunun eğitim ve sağlık sistemlerine olan etkisidir. Kısıtlı kaynaklara sahip ülkelerde kan ve kan ürünlerinin etkin bir şekilde denetlenebilmesinin önündeki en önemli engelin, bu amaçla kullanılacak malzemenin satın alınması için gereken maddi kaynağın bulunmayışı olduğu belirtilmektedir.

Türkiye, HBV yüzey antijeni pozitifliği %2-10 arasında değişen orta düzeydeki endemik bölgede yer almaktadır. Yurdumuzda 1972 yılından bu yana yapılmış olan birçok çalışmada, bölgeler arası farklar bulunmakla beraber Türkiye'deki HBsAg seroprevalansının %3.9-12.5 olduğu ve 4 milyon civarında taşıyıcı bulunduğu bildirilmektedir<sup>[10]</sup>.

Bugün HBV'ye yönelik yapılan çalışmalar çoğunlukla tanısal amaçlıdır ve bu amaca yönelik olarak serum, tükürük, asit sıvısı, semen gibi vücut sıvılarında viral antijen veya antikorların belirlenmesi için kullanılan temel ölçüm yöntemleri, serolojik-immünolojik tanı yöntemleri ile PCR taramalarıdır.

Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak HBV'nin HBsAg gen bölgesi PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise çoğaltılan gen bölgesinin klonlanması amacı ile pcDNA3.1/V5/His-TOPO plazmidini kullanılmıştır.

HBV'nin konakçı spektrumu insan ve şempanzelerle sınırlıdır. Bu nedenle HBV'nin genom yapısı, replikasyonu ve nükleotid diziliminin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda HBV DNA'sının klonlanması yöntemi sıklıkla kullanılmıştır. HBV S geninin klonlanması ve ayrıca bu genin kodladığı proteinin açıklanması amacıyla prokaryotik ve ökaryotik sistemler ile maya hücrelerinin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır<sup>[15-17]</sup>. Bu amaçla, ilk olarak *E. coli* olmak üzere prokaryotik hücreler sık olarak kullanılmıştır. Ancak, bu şekilde elde edilen antijen tanısı amaçlar için uygun olsa bile aşı hazırlanmasında uygun bulunmamıştır. Çünkü ökaryotik metabolizmalarda, yapılan proteinler sentez sonrası da bazı değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler de proteinin fonksiyon, antijenite, stabilite gibi bazı özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle özellikle tedavi amaçlı ürün elde edilmesinde, prokaryotik sistemler yerine mayalar ve hücre kültürleri gibi ökaryotik sistemlerde ekspresyon çalışmaları yapılmıştır<sup>[9,12]</sup>.

HBV'ye yönelik tanısal amaçlı gerçekleştirilen serolojik testler ve PCR taramaları, bu virüsün ülkemizde de oldukça yaygın bir enfeksiyon ajanı olduğunu göstermiştir. Ancak virüsün yapısal unsurlarının, proteinlerinin anlaşılmasına ve tedavi amaçlı üretilmesine yönelik çalışmalar bu konuda henüz tam anlamıyla yeterli olamamaktadır.

Bu çalışmada, HBV'nin HBsAg geninin bir açıklama vektörüne klonlanması başarılmıştır. Gelecekte, ökaryotik bir vektöre klonlanan HBsAg geninin açıklanması ve gen ürününün elde edilmesine yönelik çalışmalar planlanmaktadır. Ülkemizde bu konuda pek çok öncü çalışma yapılmıştır. Ancak yapılan bu çalışmaları takiben en uygun ve etkili aşı oluşturma çalışmalarının ve ayrıca ülkemizin farklı bölgelerinde en sık görülen subtipleri belirleme çalışmalarının artırılmasında fayda görülmektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Rev Microbiol Mol Biol 2000;64:51-68.
2. Blumberg BS. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:7121-5.
3. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. Rev Clin Microbiol 1999;12:351-66.
4. Moradpour D, Wands JR. Understanding Hepatitis B Virus Infection. Massachusetts General Hospital Cancer Center, Charlestown MA 02129 1995;332:1092-3.
5. Brown AL, Francis MJ, Hastings GZ, et al. Foreign epitopes in immunodominant regions of hepatitis B core particles are highly immunogenic and conformationally restricted. Vaccine 1991;9:595-601.
6. Burrell CJ, MacKay P, Greenaway PJ, Hofscheider PH, Murray K. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. Nature 1979;279:43-7.
7. Delos S, Villar MT, Hu P, Peterson DL. Cloning, expression, isolation and characterization of the pre-S domains of hepatitis B surface antigen, devoid of the S protein. Biochem J 1991;276:411-6.
8. Bulut Y. Hepatit B Virüsü HBcAg Geninin Klonlanması ve Ökaryotik Hücrelerde Açıklanması (Doktora Tezi). Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2001.
9. Kıyan M. HBV Enfeksiyonu "Viral Hepatit '98". Viral Hepatit Savaşım Derneği, 1998:65-94.
10. Tayşi BN. Hepatit B Virüs Yüzey Antijeninin (HBsAg) Saptanmasına Yönelik HBsAg-ELISA Tanı Kiti Yapılması ve Değerlendirilmesi (Doktora Tezi). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1999.
11. Jorge SAC, Hera C, Spina AMM, Moreira RC, Pinho JRR, Menck CFM. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in mammalian cells using an Epstein-Barr-virus-derived vector. J Microbiol Biotechnol 1996; 46:533-7.
12. Schmitt S, Glebe D, Alving K, et al. Analysis of the pre-S2N and O-Linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. J Biol Chem 1999; 274:11945-57.
13. Weber B, Bayer A, Kirch P, Schluter V, Schlipper D, Melchior W. Improved detection of hepatitis B virus surface antigen by a new rapid automated assay. J Clin Microbiol 1999;37:2639-47.
14. Xu Z, Bruss V, Yen TSB. Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. J Virol 1997;71:5487-94.
15. Yapar M, Güney Ç, Saraçlı MA, Kılıç A, Kubar A. HBsAg gen bölgesinin böcek (*Trichipilusia ni*) hücre kültüründe ekspresyonu. Flora 2001;6:108-13.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), 1989:1.25-8.
17. Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider-2 cells. J Virol Methods 1999;79:205-17.

**Yazışma Adresi:**

Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı

23119, ELAZIĞ

Makalenin Geliş Tarihi: 25.10.2002

Kabul Tarihi: 13.06.2003