

T. C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİR HERPES VİRÜS 1 (BHV-1)  
PROTEİNLERİNİN İMMUNOPEROKSİDAZ,  
ELEKTROFOREZ ve VESTERN İMMUNOBLOT  
YÖNTEMLERİYLE ÇALIŞILMASI**

DOKTORA TEZİ

Araş. Gör. Hakan BULUT

F. Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ  
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yusuf BOLAT

88676

ELAZIĞ - 1999

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>1- ÖNSÖZ</b> .....	1
<b>2- GENEL BİLGİLER</b>	
2.1- Sığır Herpes Virüs 1	
2.1.1- Virüsün Genel Özellikleri.....	2
2.1.2- Viral Proteinler.....	3
2.2- İmmunoperoksidaz.....	5
2.3- Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel	
Elektroforez... ..	6
2.4- Vestern Blot.....	8
<b>3- MATERYAL ve METOT</b> .....	10
3.1- Hücreler.....	10
3.2- Virüs.....	10
3.3- Hücre Üretme Vasatı.....	10
3.4- Hiperimmün Fare Serumı.....	11
3.5- İnfekte Tavşan Serumı.....	11
3.6- İmmunoperoksidaz Testi İçin	
Gerekli Eriyikler .....	12
3.7- SDS-PAGE İçin Gerekli Eriyikler.....	13
3.8- Vestern Blotta Kullanılan Eriyikler.....	17
3.9- Hücre Kültürü.....	18
3.10- Virüs Üretimi.....	19
3.11- Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi .....	19
3.12- İmmunoperoksidaz.....	20
3.13- Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel	
Elektroforez.....	21
3.14- Vestern Blot.....	22

<b>4- BULGULAR</b> .....	23
4.1- ELISA ile Antikor Yanıtın Tespiti.....	23
4.2- BHV-1 Proteinlerinin İmmunoperoksidazla Çalışılması .....	24
4.3- BHV-1 Proteinlerinin SDS-PAGE ile Çalışılması.....	27
4.4- BHV-1 Proteinlerinin İmmunoblotla Çalışılması.....	28
<b>5- TARTIŞMA</b> .....	29
<b>6- KAYNAKLAR</b> .....	33
<b>7- ÖZET</b> .....	42
<b>8- SUMMARY</b> .....	43
<b>9- ÖZGEÇMİŞ</b> .....	44
<b>10- TEŞEKKÜR</b> .....	45



## ŞEKİLLER

	Sayfa
<b>Şekil-1;</b> BHV-1 immun fare ve tavşan serum antikollarının 492 nm'deki OD değerleri.....	24
<b>Şekil-2;</b> İnfekte edilmeyen kontrol MDBK hücrelerinin viral antijenlere sahip olmadıklarının immunoperoksidaz testiyle belirlenmesi (40 X) .....	25
<b>Şekil-3;</b> Anti-BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 3. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100X) .....	25
<b>Şekil-4;</b> Anti-BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 9. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100 X).....	26
<b>Şekil-5;</b> Anti-BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 14. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100 X).....	26
<b>Şekil-6;</b> BHV-1 infekte ve infekte olmayan MDBK hücrelerine ait proteinlerin, %10 Poliakrilamid jelde elektroforezinden sonra Coomassie mavi boyama ile belirlenmesi.....	27
<b>Şekil-7;</b> BHV-1 infekte hücrelerdeki immunojenik proteinlerin, immun tavşan serumu kullanılarak, Vestern blotta belirlenmesi.....	28

**KISALTMALAR**

**Akr./Bis.:** Akrilamid/Bisakrilamid

**APS:** Amonyum persülfat

**BHV-1:** Sığır Herpes Virüs 1

**CPE:** Sitopatik etki

**DAB:** Diaminobenzidine

**DBS:** Aralıklı Tampon Sistemi

**DKİD<sub>50</sub>:** Doku kültür infeksiyöz doz

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**DME/F-12:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F- 12

**ELISA:** Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi

**FBS:** Fötal Sığır Serumu

**g:** Glikoprotein

**IBR/IPV:** İnfeksiyöz Bovin Rhinotracheitis-İnfeksiyöz Püstüler Vulvovaginitis

**IP:** İmmunoperoksidaz

**IF:** İmmunofloresan

**ip:** İntraperitoneal

**kbp:** Kilobaz çifti

**kDa:** Kilodalton

**Log:** Logaritma

**M:** Molarite

**Mak:** Monoklonal antikor

**MDBK:** Sığır Böbrek Hücresi

**MW:** Moleküler ağırlık

**nm:** Nanometre

**OPD:** O-phenyldiamine

**OD:** Optik Dansite

**PBS:** Fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su

**RNA:** Ribonükleik asit

**RIA:** Radioimmunoassay

**SDS-PAGE:** Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez

**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametiletülenamin

**VERO:** Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi

**VHS protein:** Hücre metabolizmasını durdurucu protein

**VP 16:** Virion protein 16



## 1- ÖNSÖZ

Virüslerin temel yapısal komponentlerinden biri olan viral proteinler, virüs morfolojisini oluşturma ve viral nükleik asidi koruma fonksiyonlarına ilave olarak, virüs yaşam siklusunda etkin görev alan biyomoleküllerdir (31).

Viral proteinler, virüsün antijenik yapısını oluşturur ve viral infeksiyonlardan sonra konakçı vucudunda özgül antikor sentezi ve hücrel immun yanıt olgusu bu moleküllere karşı şekillenir (19, 47).

Bugüne kadar yapılan viroloji alanındaki çalışmalarda, yukarıda belirtilen özelliklerden dolayı, viral proteinler; gerek virüs morfolojisinin anlaşılmasına yönelik araştırmalarda gerekse virüslere karşı koruyucu aşuların hazırlanması ve viral infeksiyonların tedavi ve teşhisinde öncelikli hedefler olmuşlardır (9, 19, 54).

Viroloji çalışmalarında, işaretli antikorların immunokimyasal köprüler olarak kullanıldığı virolojik testler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testlerin başlıcaları; Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi (ELISA), Radioimmunoassay (RIA), İmmunofloresan (IF), İmmunoperoksidaz (IP) deneyleri ve Vestern blotlamadır (9, 43, 54).

Hem virüslerin identifikasyonları hem de virüse özgül antikor yanıtının belirlenmesi ve virüs yapı-işlev ilişkisinin gösterilmesi amacıyla sık kullanılan bu testlerdeki temel prensip; deneyin belirli bir aşamasında gerçekleştirilen, spesifik antijen-antikor bağlanmasıdır (9, 43, 54).

Bu çalışmada, Sığır Herpes Virüs 1 (BHV-1) proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE), Vestern blot ve İmmunoperoksidaz deneyleriyle çalışılması amaçlanmıştır.

## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1- Sığır Herpes Virüs 1 (BHV-1)

#### 2.1.1- Virüsün Genel Özellikleri

Sığırlarda; solunum, genital ve sinir sisteminde infeksiyonlara sebep olan önemli bir viral patojendir. İlk olarak solunum sisteminde izole edilen virüs (49), daha sonraki çalışmalarda püstüler vulvovaginitis (39), balonoposthitis (76), keratokonjunktivitis (1), ensefalitis (2) ve abort (58) vakalarında da belirlenmiştir.

Virüs, *Herpesviridae* ailesinin bir üyesi olup, alfaherpesvirinae alt ailesine mensuptur ve İnfeksiyöz Bovin Rhinotracheitis-İnfeksiyöz Püstüler Vulvovaginitis (IBR/IPV) virüsü olarak da isimlendirilir (19).

Virionun yapısında; 152 kbp uzunluğunda çift iplikli ve linear DNA, 160-162 kapsomerden oluşmuş ikosahedral morfolojiye sahip, yaklaşık, 100-110 nm çapında kapsid, kapsidi sıkıca çevrelemiş olan tegument tabaka ve en dışta ise virüs tarafında kodlanmış olan glikoproteinleri de ihtiva eden zarf bulunmaktadır (63, 64).

*Herpesviridae* ailesindeki virüslerin DNA yapısında olan genomları kovalent olarak bağlanmış iki ayrı komponentten (unique large; U<sub>L</sub> ve unique small; U<sub>s</sub>) oluşmuştur. Bu komponentlerden U<sub>L</sub> bölgesi içinde ab ve a'b', U<sub>s</sub> bölgesinde ise a'c' ve ca tekrar kısımları bulunur (3, 63, 64). Genomun yaklaşık 84 tane protein açıklama bölgesi (açık okuma bölgesi; open reading frame) bulundurduğu belirtilmesine rağmen, bu proteinlerin tamamı identifiye edilememiştir (3).



## 2.1.2- Viral Proteinler

Litik bir herpesvirüs infeksiyonu esnasında, viral proteinlerin görülme zamanı, sentez kinetiği ve bazı metabolik inhibitörlere karşı duyarlılıkları gibi kriterler dikkate alınarak, herpesvirüs proteinleri üç grupta sınıflandırılmıştır (35, 59, 64, 75).

İnfeksiyondan sonra ilk tespit edilen protein grubu en erken (immediate-early; IE ya da  $\alpha$ ) proteinlerdir. Bunların sentez miktarları infeksiyonu takip eden 2 ve 4. saatlerde pik noktaya ulaşır. Bu proteinler transaktivatör olarak bundan sonraki protein grubunun sentezini artırırken, konakçı hücre metabolizmasını yavaşlatmakta veya durdurmaktadır (59, 64).

İnfeksiyonu takiben oluşan ikinci grup proteinler ise erken (early ya da  $\beta$ ) proteinlerdir. Bunların miktarı 5 ve 7. saatlerde belirginleşir. Bu gruptaki proteinler, genellikle, viral genomun replikasyonundan sorumlu olan enzim aktivitesine sahip proteinlerdir. Bu proteinlerden bazıları; ribonükleotik redükdaz, DNA-bağlanma proteini, timidin kinaz ve DNA polimerazdır. DNA polimeraz enzimi, DNA replikasyonundan sorumlu olduğu için virüsün fonksiyonel birimidir ve herpesvirüslerin tedavisinde etkin olan acyclovir gibi antiviral ajanlar bu enzimi hedef alır. Diğer bir DNA replikasyon proteini timidin kinaz ise deneysel infeksiyonlarda fonksiyonel olmasına rağmen hücre kültüründe fonksiyonel değildir (59, 64, 75).

Viral DNA sentezi  $\beta$  proteinlerinin açıklanmasından kısa bir süre sonra başlar. Replike DNA'ya ait transkripler tarafında sentezlenen proteinler ise geç (late ya da gamma) protein sınıfını oluşturur (59). Bunlar, yeni virionlara ait yapısal proteinlerdir. Yapısal proteinlerin bir kısmı, infekte hücrenin sitoplazmasında sentezinden sonra, hücre nükleusuna gider ve burada nükleokapsidi oluşturur (67). Oluşan bu nükleokapsidler, nükleusun iç membranındaki viriona ait tegument ve zarf kısmını da alıp, endoplazmik

retikulumun sisternasından plazma membranına uzanan tubuler yapılar içinden hücreyi terk eder (15, 51, 52).

Purifiye herpesvirüs partikelleriyle yapılan Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) analizi neticesinde en az 33 tane yapısal protein tespit edilmiştir (10,14, 57 ). Bunlardan 5 tanesinin kapsid proteini olduğu bildirilmiştir (61). Ayrıca, kapsidin tipine göre de kapsid protein sayılarının ve kompozisyonlarının değiştiği saptanmıştır (63). Transkripsiyonu aktive edici faktör-Alfa (ya da VP 16 olarak isimlenir), konakçı hücre metabolizmasını durdurucu protein (VHS protein) ve viral genomun terminal (a) sequensine bağlanan proteinler ise tegument proteinler olarak virion yapısında bulunmaktadır (37, 68).

Sığır herpes virüs 1'in yapısal proteinlerinden 11 tanesinin ise, kimyasal olarak, glikoprotein yapısında olduğu yine SDS-PAGE analizle belirlenmiştir (10, 32, 34, 59).

Herpesvirüs glikoproteinleri, virionun zarf kısmında ve infekte hücrelerin plazma membranlarında bulunur (4). Bunlardan bir çoğu virionun temel komponentleridir. Bu glikoproteinlerden bazılarının fonksiyonu bugün için bilinmemesine rağmen, diğerlerinin virüsün hücreye adsorpsiyonu, penetrasyonu ve virüsün hücreden hücreye yayılımında etkin oldukları belirlenmiştir (8, 22, 44, 45, 49). Ayrıca bu glikoproteinler, virüse karşı konakçıda şekillenen hücrel ve sıvısal immun cevabın asıl determinantları olarak kabul edilirler (17, 47, 81).

Karbonhidrat-protein bağları bakımından glikoproteinler iki asıl grupta incelenir (71). Bunlar; N-glikozidik ve O-glikozidik bağlara sahip glikoproteinlerdir. Herpesvirüs glikoproteinlerinin çoğunda N-glikozidik bağlar mevcuttur (38, 79).

Glikolizasyonun kesintiye uğratılması durumunda N-glikozidik bağlanmaya sahip BHV-1 glikoproteinlerinin şekillenmemesinin, infeksiyöz virüs üretiminin durmasıyla sonuçlandığı tespit edilmiştir (79). Aynı çalışmada, glikoproteinlerin eksik işlenmesi halinde ise hücre içinde infeksiyöz virüs

partikellerinin oluştuğu fakat virüsün hücreden salınımlarının gerçekleşmediği belirlenmiştir.

## 2.2- İmmunoperoksidaz

İmmunoperoksidaz tekniğinin temel prensibi; peroksidaz enzimiyle işaretili raportör antikorum rehberliğinde doku ya da hücre kültürlerindeki antijenlerin varlığı ve lokalizasyonlarının belirlenmesidir (50, 73, 83).

İmmunoperoksidaz tekniği, tümör hücrelerinin diağnozunda, hücre alt gruplarının belirlenmesinde ve genellikle viral infeksiyonların patogenezinin aydınlatılmasında kullanılmaktadır (50, 73).

Monoklonal antikor (Mak) teknolojisinin geliştirilmesinden sonra, gerek hücre yüzey markerlerine gerekse viral proteinlere özgül antikorların saf ve fazla miktarda üretiminin başarılması, immunoperoksidaz tekniğinin duyarlılığını ve güvenirliliğini artırmıştır. Ayrıca, Mak'ların ticari olarak mevcudiyeti de immunoperoksidaz tekniğinin bir diağnostik test olarak yaygınlaşmasına katkıda bulunmuştur (73).

İmmunoperoksidaz testinin yapılışında 3 farklı aşama bulunmaktadır (50, 72, 83) . Bunlar; fikse edilen doku veya hücre kültür preparatlarının spesifik antikorlarla inkubasyonu, antijen-antikor bağlanma bölgelerinin immunodeteksiyon boyamalarla ortaya çıkarılması ve son olarak da preparatların mikroskopik olarak değerlendirilmesidir.

İmmunoperoksidaz tekniğinin direkt, indirekt ve üç adımlı olarak isimlendirilen farklı uygulanışı mevcuttur (50, 55, 73, 83). Her birinin, diğer metoda göre avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır.

İmmunoperoksidaz deneyinde güvenilir sonuçlar elde edebilmek ve sonuçları doğru değerlendirmek için, mutlaka, çalışılan doku veya hücrelerin ve primer antikorum negatif-pozitif kontrolleri kullanılmalıdır. Şüpheli bir sonuçla

karşılaştığında ise öncelikle kullanılan eriyikler yeniden hazırlanmalı ve deney tekrarlanmalıdır (42, 50).

İmmunoperoksidaz testi, her ne kadar hızlı ve güvenilir bir test olarak değerlendirilse de kullanılan kimyasalların kalitesi ve çalışmacının deneyimi testin başarısında çok önemli etmenlerdir.

İmmunoperoksidaz testinin, deneysel ve doğal infekte hayvanlardan alınan doku seksiyonlarında ya da hücre kültüründe IBR/IPV virüsünün identifikasyonunda etkin bir test olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu test, virüs-hücre ilişkisinin ve viral patogenezin aydınlatılmasında yararlanılan temel testlerden birisi olmuştur (13, 18, 62, 74).

## **2. 3- Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE)**

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez; proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden birisidir. SDS-PAGE ile proteinlerin tamamına yakınının analitik elektroforezleri mümkün olmaktadır (30, 65).

Çok güçlü anyonik deterjan olan SDS, sıcaklık ve uygun redükleyici ajanlarla birlikte kullanıldığında, iyi bir protein çözücüdür ve denatüre olan polipeptitlere bağlanma özelliği vardır. Bu deterjan, bağlanmış olduğu polipeptitlere negatif yük kazandırır. SDS'in proteinlere bağlanma miktarı polipeptidin molekül ağırlığıyla orantılı olup, polipeptitlerin amino asit dizilimiyle alakalı değildir (26, 65).

Protein parçalama tampon içeriğinde yer alan 2-merkaptöetanol ise proteinlerin yüksüz olan disülfüt bağlarını ortadan kaldırır (26).

Poliakrilamid jeller, polimerize akrilamidin zincir kompozisyonuna bisakrilamidin çapraz şekilde bağlanmasıyla oluşan destek tabakalardan

meydana gelmiştir. Çapraz bağlar jele ek bir sertlik ve esneklik sağlar. Ayrıca, SDS-PAGE'de göç olayının etkinliğini büyük ölçüde bu bağlar belirler. Çapraz bağlanma ile birlikte jelde oluşan porlar SDS-polipeptit kompleksinin jel içinde göçüne izin veren yapılardır (26, 30).

Poliakrilamid jel hazırlanırken kullanılan amonyum persülfat, polimerizasyonda serbest radikal olarak görev yapar. TEMED ise amonyum persülfatın katalizörlüğünde akrilamid ile bisakrilamidin polimerizasyonunu sağlar. TEMED eklenmesini takiben polimerizasyon başladığı için jel hazırlanırken en son bu madde eklenir ve jel bekletilmeksizin cam tabakalar arasına dökülür (26, 30, 65).

Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jelin taraklarına yüklenip, elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç ederler ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım gösterirler. Yapılan bu işleme **elektroforez** denilmektedir (26, 30, 65).

Elektroforez işlemi esnasında elektroforez tankında tampon olarak kullanılan Aralıklı Tampon Sistemi (Discontinuous Buffer System; DBS), Ornestein ve Davis 'in orjinal formülüne göre hazırlanır (26, 65).

Molekül ağırlığı fazla olan SDS-polipeptit komplekslerinin porlarda geçişleri yavaş olduğu için jelde ağır ilerleyerek, gerideki proteinleri meydana getirir. Molekül ağırlığı hafif olan proteinlerle SDS 'in kompleksleri ise jelde hızlı ilerler ve jel içinde tarağa uzak proteinleri şekillendirir (26, 30, 65).

Jeldeki protein bantlarının tespiti amacıyla, elektroforez işleminden sonra jel genellikle coomassie mavisiyle boyanır ya da deneyden önce radioaktif izotoplarla işaretlenmiş proteinlerin görüntülenmesi için jelin otoradyografları alınır. Aynı jelin bir tarağında koşulan protein ağırlık markerleriyle numunedeki proteinlerin kıyaslanması yapılarak proteinlerin tahmini molekül ağırlıkları tespit edilir (26, 30, 60, 65).

## 2.4- Vestern Blot

Vestern blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek tabaka olarak seçilen nitrosellülöz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metodlarla gösterimidir (6, 29).

Vestern blot tekniği, denatüre edilen DNA'nın nitrosellülöz membrana transfer edildikten sonra hibridizasyonla tespiti olan **Southern blot** tekniğinin modifikasyonudur (66).

Aynı temel prensiple RNA'nın nitrosellülöz membranda gösterimi ise **Northern blotlama** olarak tanımlanmıştır (66).

Bahsedilen iki teknik ile Vestern blot tekniğinin farkı, transferi gerçekleşen moleküllerin belirlenmesinde kullanılan işaretli problemlerin doğasıdır. Vestern blotta işaretli antikorlar kullanılırken diğer iki metotta işaretli oligonükleotitler kullanılmaktadır (66).

Vestern blotlama, viroloji alanında viral proteinlerin belirlenmesi, monoklonal ve poliklonal antikorların karakterize edilmeleri ile viral antijenlere karşı şekillenen antikor yanıtının ortaya konmasında kullanılan biyokimyasal testlerden birisidir (6).

Vestern blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitrosellülöz membrana aktarımı (**blotlama**), spesifik olmayan reaksiyonları minimize etmek için nitrosellülöz membranda protein bağlanmamış bölgelerin alakasız proteinlerle kaplanması (**bloklama**), özgül antikorlarla muamele ve en son adımda ise proteinlerin deteksiyonu aşamalarıdır (20, 66, 78).

Nitrosellülöz membrana transfer işlemi esnasında jel ile nitrosellülöz membran karşı karşıya getirilir ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp, proteinlerin transferi sağlanır (66).

Nitrosellülöz membranın özgül olmayan proteinle bloklanmasında ucuz, temini kolay ve etkin olması nedeniyle yağsız süttozu tercih edilir (28, 66).

Spesifik antikolar olarak poliklonal ya da monoklonal antikolar kullanılabilir. Monoklonal antikoların kullanımının avantajı, bunların yalnızca tek bir epitopa (antijenik determinant) özgül olmaları ve çok güçlü immunokimyasal köprüler oluşturmalarından kaynaklanır. Bu sebeple, Mak'lar antijene spesifik bir bağlanım gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitopik yapılar mevcut ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler belirlenebilir. Poliklonal antikolar kullanılması durumunda aynı sebeple şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir (20, 66).

Vestern blotta monoklonal antikoların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptit yapılarıdaki epitopların yıkımlanma olasılığıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun yıkımlanması durumunda ise Mak-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenle, Mak kullanılmasına durumunda, poliklonal antikolarla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artar (20).

Spesifik antikolarda raportör madde olarak genellikle radioaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak, alkalin fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilip, bunların kromojen maddeleri ve substratları birbirinden farklıdır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özeliği çözünmeyen (insoluble) renkli ürünler oluşturmalarıdır (7, 20, 66).

Protein transfer edilmiş membranların uzun süre muhafaza edilebilmesi özeliğinden faydalınarak, pek çok virüs için kullanıma hazır Vestern blot kitleri geliştirilmiştir. Ayrıca, Vestern blotta yalancı pozitifliği ihtimalinin oldukça zayıf olması ve enfeksiyonun seyri ile immun yanıtın gücü hakkında da bilgi sağlaması nedeniyle, bazı durumlarda Vestern blot tekniği ELISA'ya tercih edilmektedir (29, 84).

Vestern blot tekniği çalışılırken karşılaşılacak en önemli problem, proteinleri antijenik yapılarında SDS-PAGE ve transfer işlemleri esnasında Őekillenebilecek yıkımlanmalardır. Böyle bir durumda antijen-antikor bağlanması gerekleşmiyeceği için yalancı negatiflik Őekillenmektedir (29, 84).

### **3- MATERYAL ve METOT**

#### **3.1- Hücreler**

Çalışma suresince iki farklı devamlı hücre hattı kullanıldı. Virüs retimi, Sığır Böbrek (MDBK; American Type Culture Collection, MD, USA) ve Afrika Yeşil Böbrek (VERO; Őap Enstitüsü, Ankara) hücrelerinde gerçekleştirildi. İmmunoperoksidaz deneyi MDBK hücrelerinde yapıldı.

#### **3.2- Virüs**

Çalışmada, IBR/IPV virüsünün referans suşu olarak kabul edilen IBR-Colorado suşu (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi) kullanıldı.

#### **3.3- Hücre retme Vasatı**

Hücre kültürü esnasına % 10 Fötal Sığır Serum (FBS; SIGMA, F-2442)'u içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DME/F-12; SIGMA) vasatı kullanıldı.

Virüs retimi amacıyla ise % 1 FBS içeren DME/F-12 vasatından faydalanıldı.



Vasatların hazırlanması esnasında her ml vasat için 0,01 mg Streptomisin, 100 Unite penisilin (SIGMA) vasata ilave edildi.

### 3.4- Hiperimmün Fare Serumu

İmmünizasyonlar 6-8 haftalık dişi Balb/C farelere yapıldı (27). VERO hücrelerinde üretilen kısmi saflaştırılmış virüsün 100 µl'si 100 µl Freund Komple Adjuvant (SIGMA) ile emülsifiye edildi. Bu karışım, farelere intraperitoneal (ip) yolla uygulandı. İlk enjeksiyonu takiben 15 gün sonra aynı miktarda virüs, bu kez Freund Komple Olmayan Adjuvant (SIGMA) içinde emülsifiye edilmiş halde, ip olarak verildi. Son immünizasyon için adjuvantsız virüs, intravenöz yolla enjekte edildi. İmmünizasyonların bitimini takip eden 4. günde farelerden intraorbital yolla kan alınıp, serumu çıkartıldı. ELISA ile test edildi. Serumlar, kullanılıncaya kadar - 20 °C'de saklandı.

### 3.5- İnfekte Tavşan Serumu

Yetişkin beyaz tavşan (Viroloji Enstitüsü, Elazığ) temin edildi. Azot tankından çıkartılıp, çözdürülen DKİD<sub>50</sub>; Log 10<sup>6.25</sup> 0.1 ml titredeki virüsün 0.2 ml'si intravenöz yolla uygulanarak bir tavşanda infeksiyon başlatıldı (48). Bu tavşandan, virüs inokulasyonundan önce ve infeksiyondan 20 gün sonra kulak venasında kan alınıp, serum çıkartıldı. Serumlar kullanılıncaya kadar - 20 °C'de saklandı. Ayrıca, tavşanın beden ısısı ve infeksiyonun klinik bulguları günlük olarak kaydedildi.

### 3.6- İmmunoperoksidaz Testi İçin Gerekli Eriyikler

#### 3.6.1- Fosfatla Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su (PBS) (5)

NaCl	8 gr
KCl	0,2 gr
Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	1,15 gr
KH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	0,2 gr
Distile su	

Tartımı yapılan kimyasallar 1 lt. distile suda çözdürölüp, 0,22 µ filtrelerde süzölerek steril hale getirildi.

#### 3.6.2- Fiksatif Eriyiği (44)

Deneyden kısa süre önce % 2 paraformaldehit ve % 0,1 Triton X-100 ihtiva eden PBS'den hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

#### 3.6.3- Bloklama Tamponu (44)

İmmunoperoksidaz boyamada istenmeyen bağlanmaları minimal seviyeye düşürmek için % 3 at serumu içeren PBS hazırlandı.

### 3.6.4- Kromojen Eriyiği

Koyu renkli ve sağlam kapaklı k¼¼k ŐiŐede, O-phenylendiamine (SIGMA)'in 2 mg/ml miktarı 0.1 M sitrat-fosfat eriyiği içinde eritildi. En son olarak % 0.08 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi.

### 3.7- SDS-PAGE İçin Gerekli Eriyikler

#### 3.7.1- Protein Parçalama Tamponu (5)

1 M Tris, pH 6.8	0,625 ml
Gliserol	1 ml
% 0,2 Bromfenol blue	0,2 ml
0,2 M EDTA	0,15 ml
2-merkaptoetanol	0,4 ml
% 20 SDS	1 ml
Distile su	6,65 ml

#### 3.7.2- Stok Eriyikler (5)

##### 3.7.2.1- Tris, 1.5 M, pH 8.8

Tris baz	18,2 gr
Distile su	100 ml
Konsantre HCl	

Tris baz, 90 ml distile suda eritildikten sonra HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Bu eriyiğın hacimi 100 ml'ye tamamlanıp, + 4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.7.2.2- Tris, 1 M, pH 6.8

Tris baz	18,2 gr
Distile su	100 ml
Konsantre HCl	

Distile suyun 90 ml'sinde tris baz çözdürüldü. HCl ile pH 6.8'e düşürüldü. Daha sonra, eriyiğın hacimi 100 ml'ye tamamlanıp, + 4 °C'ye kaldırıldı.

### 3.7.2.3- % 10 Amonyum persülfat

Amonyum persülfat	0,1 gr
Distile su	1 ml

Amonyum persülfat, belirtilen miktarda hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

### 3.7.2.4- % 10 SDS

SDS	10 gr
Distile su	100 ml

SDS iyice eritildikten sonra oda ısısında saklandı.

**3.7.2.5- 5 X Elektrot Tamponu**

Tris baz	15,1 gr
Glisin	94 gr
% 10 SDS	50 ml
Distile su	

Kimyasallar önce 900 ml distile suda çözdürüldü ve distile suyla hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Eriyik, oda ısısında saklandı.

**3.7.2.6- % 30 Akr./Bis.**

Akrilamid	30 gr
Bisakrilamid	0,8 gr
Distile su	100 ml

**3.7.3- Çalışma Eriyikleri (65)****3.7.3.1- % 10 Ayırıcı Jel**

% 30 Akr./Bis.	10 ml
1,5 M Tris pH 8.8	7,5 ml
% 10 SDS	0,3 ml
% 10 APS	0,3 ml
TEMED	12 µl
Distile su	11,9 ml

**3.7.3.2- % 5 Yığımlayıcı Jel**

% 30 Akr./Bis.	0,83 ml
1 M Tris pH 6.8	0,63 ml
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl
Distile su	3,4 ml

**3.7.3.3- Elektrot Tamponu**

5 X Elektrot tamponu	100 ml
Distile su	400 ml

Elektrot tamponu, stok solüsyondan kullanım zamanı hazırlandı bir defa kullanıldı.

**3.7.3.4- Boyama Eriyiği**

% 1 Coomassie mavisi	5 ml
% 95 Etanol	20 ml
Glasiyal asetik asit	5 ml
Distile su	20 ml

Hazırlanan bu eriyik birden fazla boyamada kullanıldı.

**3.7.3.5- Boya Giderici**

Metanol	30 ml
Glasial asetik asit	10 ml
Distile su	60 ml

**3.8- Vestern Blotta Kullanılan Eriyikler (28)****3.8.1- Bloklama Tamponu**

Yağsız süt tozu	5 gr
PBS	100 ml

Süt tozunun PBS içinde iyice çözünmüş olmasına dikkat edildi. Taze hazırlanıp, bir kez kullanıldı.

**3.8.2- Yıkama Eriyiği**

PBS	1000 ml
Tween-20	1 ml

**3.8.3- Serum Sulandırma Eriyiği**

PBS	100 ml
Tween-20	20 µl

### 3.8.4- Kromojen Eriyiği (25)

Diaminobenzidin (SIGMA)	6 mg
0,05 M Tris pH 7.6	10 ml
% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 ml

DAB, Tris eriyiği içinde iyice eritildi. En son olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi. Kromojen eriyiği, koyu rekli ŐiŐe içinde muhafaza edildi.

### 3.8.5-Transfer Tamponu (IMM Semi-Dry Blotter, W.E.P. Comp)

Anot tampon 1; 0.3 M Tris, %20 metanol, pH 10.4

Anot Tampon 2; 0.025 M Tris, %20 metanol, pH 10.4

Katot Tampon; 0.025 M Tris, %20 metanol, pH 9.4

### 3.9- Hücre Kültürü

Sıvı nitrojende çıkartılan stok hücreler 37  C'de hızlı bir Şekilde zdrlp, 5 ml DMEM vasat içinde santrifüj edildi. Santrifüj tüpündeki st sıvı döküldü ve pelet hücreler 5 ml hücre üretme vasatında süspanse edildi. Hücreler, 25 cm<sup>2</sup> taban geniŐliđine sahip hücre kültür kaplarına aktarılıp, 37  C'deki etüve kaldırıldı. Kabın yüzeyine tutunmayan l hücreler 6 saat sonra yıkamayla uzaklaştırıldı. Kaba yeniden 5 ml hücre üretme vasatı eklendi. Hücreler tek tabaka olunca, tripsin versen ile kaldırılıp, bu kez 75 cm<sup>2</sup>'lik kaba, kap hacminin % 10 oranında hücre kültür vasatı içinde transfer edildi. Hücrelerin tek tabaka oluŐturması durumunda her seferinde bir önceki kabın



yüzey büyüklüğünün 3 katı fazla yüzeye sahip kaplara geçilerek, kültüre devam edildi (23).

### 3. 10 - Virüs Üretilmesi

Kısmi saflaştırılmış virüs elde etmek için 3 litre virüs infekte hücre üst sıvısı kullanıldı. Üst sıvı, önce +4 °C, 8000 rpm (Hettich, Tuttlingen, Germany)'de 20 dak. santrifüj edilerek hücre artıkları uzaklaştırıldı. Üst sıvının 5 ml'lik kısmı sıvı azota kaldırıldı. Azottan çıkartılan bu virüsün titresi hesaplandı (33). Kalan üst sıvı ise 40.000 rpm (Sorvall, RC 5B)'de 4 saat santrifüj edildi. Pelet virüs, PBS içinde sullandırılıp, - 20 °C'ye kaldırıldı.

SDS-PAGE ve Vestern blot deneylerinde viral proteinlerin incelenmesi amacıyla ikişer adet 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre üretme kabında MDBK ve VERO hücreleri üretildi. Hücreler tek tabaka oluşturulmasından sonra hücre üretme vasatı dökülüp, her hücreye 5 virüs düşecek şekilde 3 ml vasat içinde IBR virüs ekimi yapıldı. Kontrol hücreler ise serumsuz vasatta bekletildi. Virüs ekilen hücrelerde, inokulasyondan 30 dak. sonra, vasat dökülüp, hücreler yıkandı. Bu kaplara virüs üretme vasatı ilave edildi. Virüs inokulasyonunu takip eden 14. saatte infeksiyon + 4 °C'de durduruldu. Eş zamanlı olarak kontrol hücre kapları da + 4 °C'ye kaldırıldı. Kapların yüzeyi PBS ile yıkayıp, 5 ml PBS içinde yumuşak bir kazıyıcıyla hücreler kazındı. Hücreler 1200 rpm'de, 15 dak. santrifüj edilerek infekte ve kontrol hücre peletleri elde edildi (6).

### 3.11- ELISA

Hiperimmün fare ve IBR-Colorado infekte tavşan serumlarının test edilmesi için ELISA dizayn edildi (57). Karbonat tamponu içinde virüs bağlanan

ELISA pleytlerinde pozitif ve negatif serumların 1/100 dilusyonları daha önceden belirtildiği şekilde test edildi (12). Serumların 492 nm'deki adsorbans değerleri mikroeliza okuyucusunda ölçüldü ve kaydedildi.

### 3.12- İmmunoperoksidaz

İmmunoperoksidaz deneyi 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Greiner) ekilen MDBK hücrelerinde gerçekleştirildi. Hücreler tek tabaka oluşturduktan sonra ikişerli kuyucuklara birer saat arayla virüs ekimi yapıldı. Paralelinde her saat için iki adet infekte edilmeyen kontrol kuyucukları bırakıldı. İlk infeksiyonu takip eden 14. saatte hücrelerin lize olmaya başladıkları belirlendiğinden dolayı, bu saate kadarki infeksiyon sürecine bakıldı.

İnfeksiyonu durdurmak için hücreler 30 dak. + 4 °C'ye kaldırıldı. Fiksasyon ve bloklama işlemi gerçekleştirildi (44).

Her saatteki infekte ve kontrol hücre kuyucuklarının birer kuyucuğu PBS içinde 1/50 sulandırılan hiperimmün ve diğer kuyucukları ise 1/50 sulandırılan bağışık olmayan fare serumuyla 4 °C'de 1,5 saat muamele edildi. Hücreler yıkandı. Kuyucuklara 1/100 sulandırılmış peroksidazla işaretli keçi anti-fare IgG eriyiği (SIGMA) eklenip, inkubasyon ve yıkamalar tekrarlandı. Hücreler, karanlık ortamda kromojen solüsyonuyla 15 dak. reaksiyona sokuldu. Hücreler, hematoksilin-eozin ile boyama ve etanolla yıkamayı takiben, mikroskopik olarak incelendi ve hücrelerin mikrografları alındı.

### **3.13- Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez**

#### **3.13.1- Jellerin Dökülmesi**

Ayırıcı jel için daha önceden belirtildiği oran ve miktarda solüsyon hazırlandı. TEMED en son eklendi. TEMED eklendikten sonra ayırıcı jel SDS-PAGE cihazının cam tabakaları arasına döküldü. Ayırıcı jelin 30 dak. polimerizasyonu esnasında, yığımlayıcı jel belirtilen oran ve miktarında hazırlandı (65).

Yığımlayıcı jel döküldükten sonra tarak yerleştirildi ve polimerizasyon için oda ısısında 45 dak. beklendi.

#### **3.13.2- Protein Numunelerinin Hazırlanması**

Daha önceden belirtildiği gibi hazırlanan BHV-1 infekte ve kontrol hücreleri üzerine 250 µl protein parçalama tamponu ilave edildi (5).

Tavşan ve fare serumları ise, distile suyla 1/20 oranında sulandırıldı. Eşit miktarda protein parçalama tamponu ilave edildi.

Hazırlanan numuneler, kaynar suda 3 dak. tutuldu. Vortekslenerek, - 70 °C'ye kaldırıldı.

#### **3.13.3- Elektroforez İşlemi**

Yığımlayıcı jelin polimerizasyonu devam ederken - 70 °C'deki numuneler 37 °C'de çözdürüldü.

Polimerize olan yığımlayıcı jeldeki tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve cam tabaka arasındaki jel, elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst hazineleri elektroforez tampon ile dolduruldu.

Jeldeki tarakların her kuyucuğuna 20'şer µl numune yüklendi ve tankın elektrot bağlantıları yapıldı, numuneler 200 Volt'da 3,5 saat elektroforez edildi (65).

### **3.13.4- Coomassie Boyama**

Jelin, Coomassie mavi ile boyanacak kısmı keskin bir bistürü yardımıyla dikkatlice kesildi ve içinde Coomassie mavi eriyiği bulunan derin bir kaba bırakıldı. Otomatik sallayıcı üstünde 4 saat boyama yapıldı.

Boyanın giderilmesi için; Coomassie maviden alınan jel, derince bir kaptaki bulunan boya giderici içine atıldı ve otomatik sallayıcı üstünde jel berrak oluncaya kadar işleme devam edildi. Boya giderilmesi esnasında birkaç kez boya giderici eriyik değiştirildi. Daha sonra jelin fotoğrafı alındı (65).

### **3.14- Western Blotlama**

Bu teste, elektroforezle ayrıştırılan viral proteinler önce nitrosellülöz membrana transfer edildi. Daha sonra ise proteinlerin yeri antijen-antikor tepkimesi üzerine kurgulanan bir yöntemle (immunodeteksyon) tespit edildi.

Transfer işlemi, Semi-dry transfer cihazının elkitabında belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (IMM Semi-Dry Blotter Instruction Manual, W. E. P. Comp. Seattle, WA., U. S. A.)

Kısaca, transferi yapılacak jel, bekletilmeksizin, anot tampon 2'ye daldırıldı. Jelin ölçülerinde 3 tane filtre kağıdı ve 1 parça ise nitrosellülöz membran kesildi. Filtre kağıtları anot tampon 1, anot tampon 2 ve katot tamponda, nitrosellülöz membran ise distile su içinde 10 dak. bekletildi.

Transfer cihazına (IMM Semi-Dry Blotter, W.E.P., Comp., Seattle, WA., U. S. A.) sırasıyla; anot tampon 1 ve anot tampon 2 'de bekletilen filtre kağıtları, nitrosellülöz membran, jel ve en üste de katot tampon emdirilmiş filtre kağıdı dizildi. Transfer işlemi 0,3 Amperde, 45 dak. yapıldı.

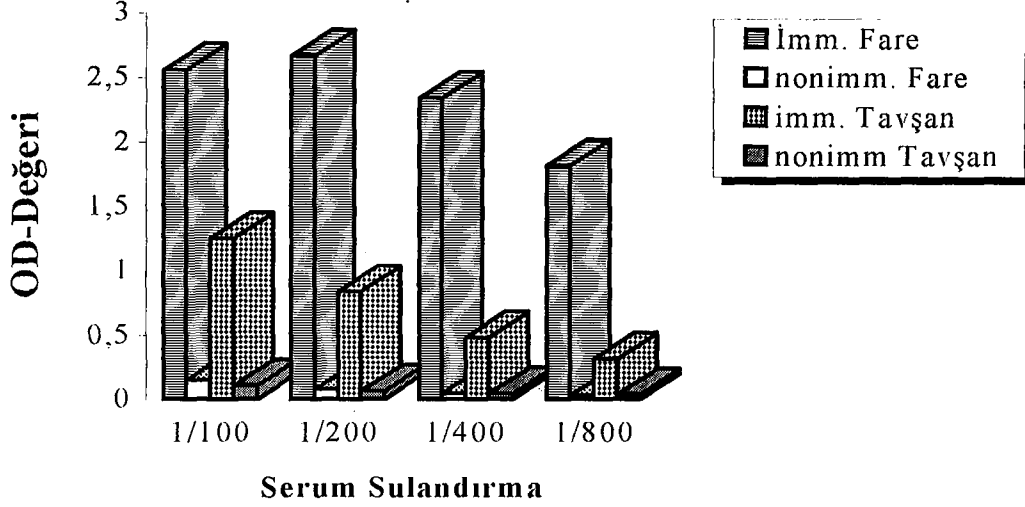
Transfer işlemi bitiminde nitrosellülöz membran, bloklama tampon içerisine bırakıldı ve oda ısısında, otomatik sallayıcı üstünde 2 saat bekletildi. Yıkama işlemini takiben, membran 1/100 sulandırılmış anti-BHV-1 tavşan serumu içine bırakıldı. Otomatik sallayıcıda 1 saat inkubasyon yapıldı. Yıkama tekrarlandı. Membran daha sonra biyotinle işaretlenmiş keçi anti-tavşan IgG eriyiği (DAKO Corp., Carpintera, CA., U. S. A.) içine bırakıldı. Otuz dakikalık bir inkubasyondan sonra yıkama tekrarlandı. Arkasından, avidinle bileştirilmiş at turpu peroksidaz enzimi eriyiği (DAKO Corp., Carpintera, CA., U. S. A.) eklendi ve 30 dak. inkubasyon ve yıkama tekrarlandı. Tepkimenin ortaya çıkarılması için kromojen-substrat eriyiği içerisine bırakılan nitrosellülöz membran karanlık ortamda, 10 dakika inkube edildi. Membran, distile suda yıkandı ve membranın fotoğrafı çekildi (28).

## **4- BULGULAR**

### **4.1- ELISA ile Antikor Yanıtın Tespiti**

Sığır herpes virüsle hiperimmün fare ve infekte tavşan serumlarının ELISA sonuçları şekil-1'de verilmiştir. Şekil-1'de görüleceği gibi, BHV-1'e özgül antikor titreleri ölçüldüğünde, hiperimmün fare serumunda antikor titresini, infekte tavşan serumundaki BHV-1 titresine kıyasla, daha yüksek bulundu.

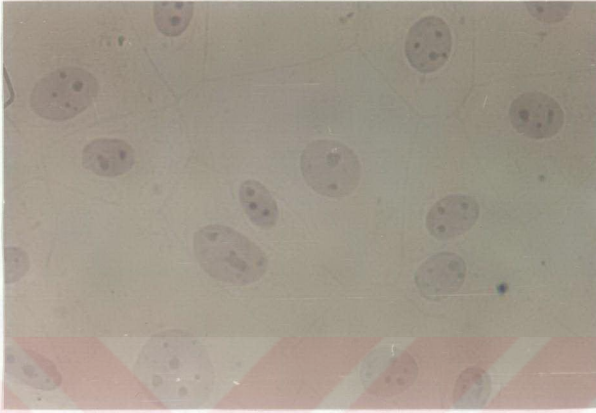
**Şekil-1;** BHV-1 immün fare ve tavşan serum antikorlarının 492 nm'deki OD değerleri.



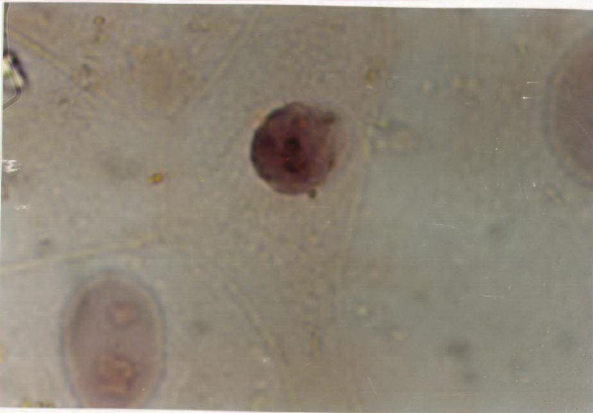
#### 4.2- BHV-1 Proteinlerinin İmmunoperoksidaz ile Çalışılması

İnfeksiyonun farklı saatlerinde yapılan immünoperoksidaz boyamalarda şu sonuçlar elde edildi. İnfekte edilmeyen hücrelerin BHV-1 bağışık fare serumuyla tepkimesinde pozitif reaksiyon gözlenmedi (Şekil-2). Ancak, infekte edilen hücrelerde, aynı serumla yapılan testlerde, enfeksiyonun 3. saattine infekte hücre çekirdeğinde BHV-1 proteinleri belirlendi (Şekil-3). İnfeksiyon ilerledikçe, özellikle nükleer membrana yakın olan sitoplazmik kısımlarda viral antijenlerin daha da belirginleştiği kaydedildi (Şekil-4). İnfeksiyonun 14. saatinde infekte hücre çekirdeğinin yıkımlandığı belirlendi (Şekil-5). İnfeksiyonun 14. saatinden sonra ise infekte hücrelerin bütünlüğü kaybolduğu ve hücreler kültür kabının yüzeyinde kalkmaya başladığı için bu hücrelerle immünoperoksidaz deneyi gerçekleştirmek mümkün olmadı.

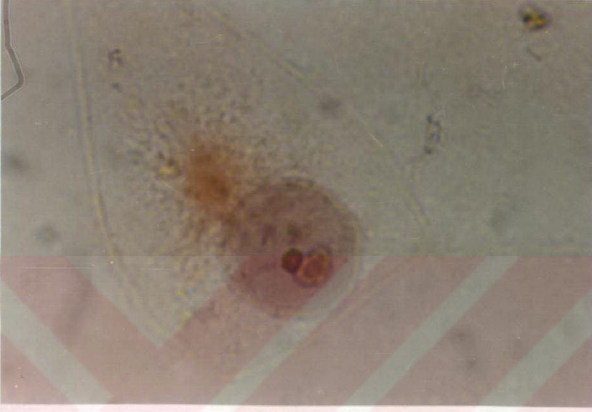
**Şekil-2;** İnfekte edilmeyen kontrol MDBK hücrelerinin viral antijenlere sahip olmadıklarının immunoperoksidaz testiyle belirlenmesi (40 X).



**Şekil-3;** Anti- BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 3. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100 X).



**Şekil-4;** Anti- BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 9. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100 X).



**Şekil-5;** Anti- BHV-1 fare serumu ve peroksidaz konjuge anti-fare IgG kullanılarak infekte MDBK hücrelerinde, infeksiyonun 14. saatinde, gerçekleştirilen immunoperoksidaz testi (100 X).



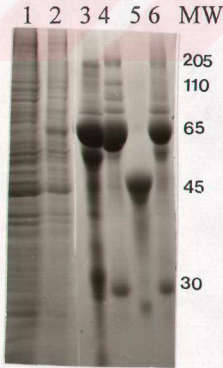


#### 4.3- BHV-1 Proteinlerinin SDS-PAGE ile Çalışılması

BHV-1 infekte ve kontrol MDBK hücrelerinde elde edilen proteinler % 10'luk SDS-PAGE'de incelendi. Coomassie maviyle boyamadan sonra infekte hücrelerde, yaklaşık olarak, 20 ile 300 kDa arasında büyüklüğe sahip 50 protein türü belirlendi. Kontrol hücrelerinde ise 20 farklı protein tespit edildi (Şekil-6).

Genel olarak, infekte hücrelerdeki protein türleri infekte olmayan hücrelerdeki protein türleriyle ortak bir elektroforez motifi sergilemektedir. Ancak, infekte hücrelerde belirgin olarak tespit edildiği halde kontrol hücrelerinde belirlenemeyen büyüklükleri yaklaşık olarak 150, 80, 70, 50 ve 45 kDa olan proteinler dikkat çekmiştir. Buna karşın, kontrol hücrelerindeki 60 ve 40 kDa ağırlığındaki proteinlerin infekte hücrelerde miktarlarının azaldığı kaydedilmiştir (Şekil-6).

**Şekil-6;** BHV-1 infekte ve infekte olmayan MDBK hücrelerine ait proteinlerin, %10 Poliakrilamid jelde elektroforezden sonra Coomassie maviyle boyamada belirlenmesi.



- 1; İnfekte MDBK
- 2; Kontrol MDBK
- 3; Fare Serumu
- 4; Tavşan Serumu
- 5; Ovalbumin
- 6; Sığır Serumu
- MW; Moleküler ağırlık (kDa)

#### 4.4- BHV-1 Proteinlerinin İmmunoblotta Çalışılması

İmmunoblotta BHV-1 immün tavşan serumu kullanılarak, infekte MDBK ve VERO hücrelerinde viral proteinler belirlendi (Şekil-7). BHV-1 ile infekte her iki hücrede de molekül ağırlıkları, yaklaşık olarak, 180, 75 ve 55 kDa olan üç protein türü belirlendi.

İmmün boyamada, bu proteinlerin her üçünün de MDBK hücrelerinde daha yoğun olarak buldukları tespit edilmiştir.

Yağsız süt tozuyla başarılı bir bloklayma sağlandı.

Şekil-7; BHV-1 infekte hücrelerdeki immunojenik proteinlerin, immün tavşan serumu kullanılarak, Vestern blotta belirlenmesi



MW; Moleküler ağırlık (kDa)

1; Tavşan serumu

2; BHV-1 inf. VERO

3; VERO

4; BHV-1 inf. MDBK

5; MDBK

## 5- TARTIŞMA

Herpesvirüslerde protein sentezinin düzenlenmesi ve sentezlenen proteinlerin hücre içinde lokalizasyonlarının belirlenmesiyle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (11, 35, 52, 59, 67, 79, 80). Bölüm 2.1.2'de detayı ile belirtildiği gibi, bu çalışmalarda, herpesvirüs mRNA transkripsiyonunun ve DNA replikasyonunun infekte hücrenin nükleusunda gerçekleştiği ortaya konmuştur. İnfekte hücrelerin plazma membranlarına lokalize olan bazı glikoproteinler hariç (41, 85), viral proteinlerin sitoplazmada sentez edilmelerini takiben nükleusa veya nükleer membrana aktarıldıkları belirlenmiştir (51, 52, 67).

Virüse özgül hiperimmün fare serumu kullanarak, MDBK hücrelerinde BHV-1 infeksiyonunun değişik saatlerinde virüs proteinlerinin lokalizasyonlarının gösterimi immunoperoksidaz testiyle çalışıldı. Bulgularımız, yukarıda genel hatlarıyla özetlenen herpesvirüs protein sentezinin düzenlenmesiyle ilgili verilerle uyum içindedir. Ayrıca, BHV-1 ve diğer herpesvirüslerle gerçekleştirilen immunohistokimyasal çalışmalara ait verilerle de benzer sonuçlar elde edildi (21, 36, 67, 77). Ancak, BHV-1 antijenlerinin intraselüler lokalizasyonlarının immunofloresan testiyle belirlenmesine yönelik yapılan bazı çalışmalarda, infeksiyonun erken saatlerinde viral antijenlerin nükleer membran kısmında toplandığı belirlenmiş fakat, intranükleer antijenler belirlenememiştir (36). Buna rağmen, infeksiyonun erken saatlerinde gerçekleştirilen hematoksilin-cozin boyamalarda infekte hücrelerin nükleusunda inklüzyon cisimcikleri belirlenmiştir. İnfeksiyonun ilerledikçe sitoplazmik viral antijenlerin miktarının arttığı immunofloresan testiyle de kaydedilmiştir. İnfeksiyonun geç saatlerinde ise viral antijenleri, nükleer membran bölgesinde yoğun olmakla birlikte, hücrelerin tamamını kapladığı gösterilmiştir (36, 77).

İnfekte hücrelerin hematoksilin-eozin boyamalarından sonra mikroskopik bakılarında ise; intranükleer inklüzyon cisimcikleri, sitoplazmik granüler

materyallerin artması, hücrenin yuvarlaklaşması ve şişmesi ile nükleus büyümesi gibi morfolojik değişimler kaydedilmiştir (36).

Son yıllarda, virüsle infekte hücrelerde gerçekleştirilen immunohistokimyasal çalışmalarda Mak'lar tercih edilmektedir. Bu antikörlerin özgülüğünden faydalınarak, çalışılan viral proteinin hücre içi lokalizasyonu ve sentez saatleri bireysel olarak gösterilmektedir (40, 41, 72).

Herpesvirüs proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi amacıyla yapılan çalışmalarda, çoğulukla, radioaktif izotoplarla işaretli esansiyel amino asitleri ihtiva eden vasat ortamında üretilen virüs proteinleri kullanılmaktadır. Bu çalışmalar ya saflaştırılmış virionlarla (11, 16, 59, 61, 69 ) ya da infekte hücre lizatlarıyla gerçekleştirilmiştir (14, 56, 59, 69, 70).

Bazı araştırmacılar, saflaştırılmış BHV-1 ile yaptıkları çalışmada, virionda molekül ağırlıkları 14 ile 330 kDa arasında değişen en az 25 tane yapısal protein bulunduğunu ve bu proteinlerden 11 tanesinin glikoprotein yapısında olduğunu belirtmişlerdir (59). Ayrıca, infekte hücre lizatının analizinde ise, 25 yapısal proteine ilave olarak, molekül ağırlıkları 32 ve 182 kDa arasında değişen, 15 tane yapısal olmayan virüs proteini tespit etmişlerdir (59). Buna karşın, bir diğer çalışmada, saflaştırılmış virionun yapısında, molekül ağırlıkları 11 ve 240 kDa arasında değişen, 20 tane yapısal proteinin bulunduğu bildirilmiştir (69).

Benzer bir çalışmada ise virionun yapısında 11 tanesi glikoprotein olan 32 tane yapısal protein rapor edilmiştir (4).

Herpesvirüs ailesinde bulunan diğer virüslere ait protein analizinde; equine herpes virus type 1'de 28 (61), cytomegalovirus'da 29 (11), Epstein-Barr virüsde 23 (16) tür yapısal protein tespit edilmiştir.

İnfekte ve infekte olmayan hücre lizatlarıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE çalışılmalarında şu bulgular elde edilmiştir. Elektroforezi yapılan her iki hücre numunesinde de hücreden kaynaklanan ortak proteinler belirlenmiş. Bu ortak proteinlere ilave olarak infekte hücrelerde pek çok farklı protein türünün varlığı bildirilmiştir (59, 69). Ayrıca, radioaktif izotoplar kullanılarak yapılan protein

işaretlemelelerinde infeksiyon ilerledikçe, virüs tarafında hücresel protein sentezinin tamamen durdurulması veya azalması söz konusu olduğu için, ortak hücresel proteinlerin bir çoğunun ortadan kalkacağı belirtilmiştir (59, 69). Ancak, Coomassie mavi ile yapılan boyamalarda infekte hücre numunelerindeki bazı hücresel proteinlerin sentezinin virüs tarafından durdurulmuş olduğunun belirlendiği, buna rağmen her iki numunede de hücreye ait proteinlerin tespit edildiği bildirilmiştir (59, 69).

İnfekte ve infekte olmayan hücreleriyle gerçekleştirilen bu çalışmadaki SDS-PAGE analizde, yukarıda belirtilen sonuçlara paralel veriler elde edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada, virüs proteinlerinin tam bir analizi yapılamamıştır. Ancak, infekte hücrelerdeki viral proteinlerin mevcudiyeti belirlenebilmiştir.

Herpesvirüslerin yapısında pek çok protein bulunmasına rağmen, bu proteinlerden ancak bazıları konakçı immün sistemi tarafından tanınmaktadır ve immunojenik proteinler olarak algılanmaktadırlar. Özellikle glikoproteinlerin, virüse karşı şekillenen hücresel ve sıvısal immün yanıtta önemli hedefler oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (17, 24, 53, 81).

Glikoproteinlere özgül monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 130, 71 ve 55 kDa'lık glikoproteinlerin virüs nötralizasyonunda ve komplemente bağlı lizide etkin olduklarını belirlenmiştir (82). Aynı araştırmacılar, bu glikoproteinlerin tavşanda nötralizan etkinliğe sahip antikorlar oluşturduğunu bir diğer çalışmada göstermişlerdir (80).

Monoklonal antikorlar kullanarak gerçekleştirilen bir diğer çalışmada 55, 69, 82, 96 ve 102 kDa'lık glikoproteinlerle haricinde 82 ve 92 kDa'lık glikolize olmayan proteinlerin de nötralizan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (12).

BHV-1'e karşı nötralizan edici aktiviteye sahip tavşan serumları kullanarak gerçekleştirilen immunopresipitasyon ve immunoblot deneylerinde ise, çalışılan serumların 69-75, 77-81, 82-92 ve 108-115 kDa'lık 4 tane glikoproteinle reaksiyon verdikleri gösterilmiştir (46).

BHV-1 ile infekte hayvanlardan, infeksiyonun nekahat döneminde alınan ve yüksek nötralizan antikor titresine sahip serumlarda gerçekleştirilen bir çalışmada ise, serumların tamamının 85 ve 70 kDa'lık ve bazılarının ise, bunlara ilave olarak, 150 kDa'lık glikoproteinlerle özgül tepkime verdikleri Western blot ile saptanmıştır (69).

Deneysel olarak infekte edilen sığır serumlarıyla yapılan çalışmada, BHV-1'in primer infeksiyonu esnasında sıvısal immün yanıtın g I, g III ve g IV (yeni nomenklatüre göre; g B, g C ve g D)'ye özgül olduğunu tespit etmiştir (53).

İmmunojenik proteinlerin tespiti amacıyla gerçekleştirilmiş olan Western blot testlerinde, gerek bu çalışmada gerekse daha önce yapılmış olan çalışmalarda farklı sayıda ve molekül ağırlığında proteinlerin belirlenmesinin değişik nedenlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Öncelikle, kullanılan poliakrilamid jel sistemlerinin farklılığının bunda etkin olabileceği kaydedilmiştir (46, 69). Ayrıca, infeksiyonun seyri ve immün yanıtın durumun da bir diğer etmen olabileceği ifade edilmiştir (53, 69).

## 6. KAYNAKLAR

1. Abinanti, F. R., and Plumer, G. J. (1961). The isolation of bovine infectious rhinotracheitis virus from affected with conjunctivitis observation on the experimental infection. *Am. J. Vet. Res.* 22; 13-17.
2. Barenfus, M., Delliquadri, C. A., McIntyre, R. W., and Schocder, R. J. (1963). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J.A.V.M.A.* 143; 725-728.
3. Boehmer, P. E., and Lehman, I. R. (1997). Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66; 347-384.
4. Bolton, D. C., Zee, Y. C., Ardans, A. (1983). Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 8; 57-68.
5. Burlison, F. G., Chambers, T. M., Wiedbrauk D. L. (1992). Media and solutions. *In "Virology, A Laboratory Manual"* p. 214-230. Academic Press, San Diego.
6. Burlison, F. G., Chambers, T. M., Wiedbrauk D. L. (1992). Western blot analysis of EMC virus proteins. *In "Virology, A Laboratory Manual"* p. 175-185. Academic Press, San Diego.
7. Burnette, W. N. (1981). Western Blotting; Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A. *Analytical Bioch.* 112; 195-203.
8. Bzik, D. J., Fox, B. A., Deluc, N. A., and Person, S. (1987). Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene; Mutations affecting rate virus entry and cell fusion. *Virology.* 137, 185-190.
9. Carstro, A. E. (1992). Isolation and identification of viruses. *In "Veterinary Diagnostic Virology"* (A. E. Castro, and W. P. Heuschele), p. 3-7. Mosby Years Book, St. Louis.

10. Cassai, E. N., Sarmiento, M., and Spear, P. G. (1975). Comparison of the virion proteins specified by herpes simplex virus type 1 and 2. *J. Virol.* 16; 1327-1331.
11. Chantler, J. K., and Hudson, J. B. (1978). Proteins of murine cytomegalovirus: Identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. *Virology.* 86; 22-36.
12. Collins, J. K., Butcher, A. C., Riegal, C. A., McGrane, V., Blair, C. D., Teramoto, Y. A., and Winston, S. (1984). Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus-1. *J. Virol.* 52; 403-409.
13. Collins, J. K., Jensen, R., Smith, G. H., Flack, D. E., Kerschen, R., Bennett, B. W., Jones, R. L., and Alexander, A. F. (1988). Association of bovine respiratory syncytial virus with atypical interstitial pneumonia in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49; 1045-1049.
14. Courtney, R. J., and Benyesh-Melnick, M. (1974). Isolation and characterization of a large molecular-weight polypeptide of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 62; 539-551.
15. Courtney, R. J., McCombs, M., and Benyesh-Melnick, M. (1971). Antigens specified by herpesviruses. II. Effect of arginine deprivation on the synthesis of cytoplasmic and nuclear proteins. *Virology.* 43; 356-365.
16. Dolyniuk, M., Pritchett, R., and Kieff, E. (1976). Proteins of Epstein-Barr virus. I. Analysis of the polypeptides of purified enveloped Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 17; 935-949.
17. Eberle, R., and Courtney, R. J. (1980). Preparation and characterization of specific antisera to individual glycoprotein antigens comprising the major glycoprotein region of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 35; 902-917.
18. Edwards, S., Chasey, D., White, H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: Comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Science.* 34; 42-45.



19. Fenner, F. J., Gibbs, E. P., Murphy, F. A., Rott, R., Studdert, M. J., and White, D. O. (1993). Immune response to viral infections. *In* "Veterinary Virology" p. 137-157. Academic Press, San Diego.
20. Fowler, S. J. (1995). Use of monoclonal antibodies for Western blotting with enhanced chemiluminescent detection. *In* "Monoclonal Antibody Protocols" (W. C. Davis ), p. 115-127. Humana Press, New Jersey.
21. Fugiwara, S., and Kaplan, A. S. (1967). Site of protein synthesis in cells infected with pseudorabies virus. *Virology*. 32; 60-68.
22. Fuller, A. D., and Spear, P. G. (1985). Specificities of monoclonal and polyclonal antibodies that inhibit adsorption of herpes simplex virus to cell and lack of inhibition by potent neutralizing antibodies. *J. Virol.* 55; 475-482.
23. George, V. G., Hierholzer, J. C., and Ades, E. W. (1996). Cell culture. *In* "Virology Methods Manual" (B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro). p. 3-7. Academic Press, San Diego.
24. Gregersen, J. P., Pauli, G., and Ludwig, H. (1985). Bovine herpesvirus 1. Differentiation of IBR and IPV viruses and identification and functional role of their major immunogenic components. *Arch. Virol.* 84, 91-103.
25. Harlow E., and Lane, D. (1988). Cell staining antibodies. *In* "Antibodies" p. 396-414. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
26. Harlow, E., and Lane, D. (1988). Electrophoresis. *In* "Antibodies" p. 635-656 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
27. Harlow, E., and Lane, D. (1988). Immunizing animal. *In* "Antibodies" p. 92-114. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
28. Harlow, E., and Lane, D. (1988). Immunoblotting. *In* "Antibodies" p. 471-504. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
29. Harper D. R., and Coles B. F. (1996). Western (immuno) blotting and radioimmunoprecipitation. *In* "Virology Methods Manual" (B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro), p. 261-266. Academic Press, San Diego.

30. Harper, D. R., and Coles, B. F. (1996). Gel electrophoresis. *In* "Virology Methods Manual" (B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro), p. 257-260. Academic Press, San Diego.
31. Harrison, S. C. (1991). Principles of virus structure. *In* "Fundamental Virology" (B. N. Fields, and D. M. Knipe), p. 37-61. Raven, New York.
32. Heine, J. W., Spear, P. G., and Roizman, B. (1972). Proteins specified by herpes simplex virus. VI-Viral proteins in the plasma membrane. *J. Virol.* 9; 431-439.
33. Hierholzer, J. C., and Killington, R. A. (1996). Virus isolation and quantitation. *In* "Virology Methods Manual" (B. WJ. Mahy, and H. O. Kangro), p. 35-41. Academic Press, San Diego.
34. Honess, R. W., and Roizman B. (1973). Proteins specified by herpes simplex virus. XI-Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell. *J. Virol.* 12; 1347-1365.
35. Honess, R., and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14, 8-19
36. Jasty, V., and Chang, P. W. (1969). Infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cell: Sequence of viral production, cellular changes, and localization of viral nucleic acid and protein. *Am. J. Vet. Res.* 30; 1325-1332.
37. Johnson, C. I., and Spear, P. G. (1983). O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell.* 32; 987-997
38. Jones, F. E., Smibert, C. A., and Smiley, J. R. (1995). Mutational analysis of the herpes simplex virus virion host shutoff protein: Evidence that vhs functions in the absence of other viral proteins. *J. Virol.* 69; 4843-4851.

39. Kendrick, J. W., Gillespie, J. H., and McEntee, K. (1958). Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell Vet.* 48; 458-495.
40. Khattar, S. K., Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Attah-Poku, S. K., Babiuk, L. A., and Tikoo, S. K. (1996). Identification and characterization of a bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BHV-1 glycoprotein gH. *Virology.* 219; 66-76.
41. Koga, J., Chatterjee, S., and Whitley, R. J. (1986). Studies on herpes simplex virus type 1 glycoproteins using monoclonal antibodies. *Virology.* 151; 385-389.
42. Leong, A. S. (1992). Commentary; Diagnostic immunohistochemistry-problem and solutions. *Pathology.* 24; 1-4.
43. Levy, J. A., Fraenkel-Contrat, H., Owens, R. A. (1994). Methods in virology. In "Virology" p. 409-412. Prentice-Hall, New Jersey.
44. Liang, X., Pyne, C., Li, Y., Babiuk, L. A., and Kowalski, J. (1995). Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD; An indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology.* 207, 429-441.
45. Littel, S. P., Jofre, J. T., Courtney, R. J., and Schaffer, P. A. (1981). A virion associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex type 1. *Virology.* 115; 149-160.
46. Lum, M. A., and Reed, D. E. (1986). Identification of bovine herpesvirus-1 polypeptides involved in serum neutralization. *Vet. Microbiol.* 11; 213-220.
47. Lupton, H. W., and Reed, D. E. (1980). Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 41; 383-390.
48. Lupton, H. W., Barnes, H. J., and Reed, D. E. (1980). Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet.*, 70; 77-95.

49. Madin, S. H., York, C. J., and McKercher. (1956). Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*. 124; 721-722.
50. Mao, S-Y., Javois, L. C., and Kent, U. M. (1994). Overview of antibody use in immunocytochemistry. *In* "Immunocytochemistry Methods and Protocols" (L. C. Javois), p. 3-9. Humana Press, New Jersey.
51. Mark, G. E., and Kaplan, A. S (1971). Synthesis of proteins in cell infected with herpesvirus. VII. Lack of migration of structural viral proteins to the nucleus of arginine-deprived cells. *Virology*. 45; 53-60.
52. Mark, G. E., and Kaplan, A. S. (1972). Synthesis of proteins in cell infected with herpesvirus. VIII. Absence of virus-induced alteration of nuclear membrane in arginine-deprived cells. *Virology*. 49; 102-111.
53. Marshall, R. L., Israel, B. A., Letchworth III, G. J. (1988). Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*. 165; 338-347.
54. Martin, S. J. (1976). Quantitative methods of assaying viruses. *In* "The Biochemistry of Virus" p. 21-27. Cambridge University Press.
55. Mason, D. Y., and Woolston R. E. (1982). Double immunoenzymatical labeling. *In* "Techniques in Immunocytochemistry" (G. Bullocks, and P. Petrusz), p. 135-152. Academic, London.
56. McCombs, R. M. (1974). Antigens specified by herpesvirus. III. Viral-induced nuclear polypeptides. *Virology*. 57; 448-458.
57. McCullough K. C., and Parkinson D. (1984). The standardization of a "spot-test" ELISA for the rapid screening sera and hybridoma cell product ; The determination of the optimum buffering systems. *J. Biol. Stand.* 12; 67-74.
58. McKercher, D. G., and Wada, E. M. (1964). The virus of infectious bovine rhinotracheitis. *J.A.V.M.A.* 144; 136-142.
59. Misra, V., Blumenthal, R. M., and Babiuk, L. A. (1981). Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.* 40; 367-378.

60. Ochs, D. C., McConkey, E. H., and Sammons, D. W. (1981). Silver stains for proteins in polyacrylamide gel; A comparison of six methods. *Electrophoresis*. 2; 304-309.
61. Perdue, M. L., Kemp, M. C., Randall, C. C., and O'Callaghan D. J. (1974). Studies of the molecular anatomy of L-M cell strain of equine herpes virus type 1: Protein of the nucleocapsid and intact virion. *Virology*. 59; 201-216.
62. Rodriguez, M., Suarez-Heilein, A., Ruiz, M., Metzler, A. E., and Schudel, A. A. (1989). Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immuoperoxidase method, using monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 50; 619-621.
63. Roizman, B. (1991). Herpesviridae. In "Fundamental Virology" (B. N. Fields, and D. M. Knipe), p. 841-845. Raven, New York.
64. Roizman, B., and Batterson, W. (1985). Herpesviruses and their replication. In "Fundamental Virology" (B. N. Fields, and D. M. Knipe), p. 497-504. Raven, New York.
65. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of protein. In "Molecular Cloning", p. 18.47-18.75. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
66. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Transfer of proteins from SDS-Polyacrylamide gels to solid supports; Immunological detection of immobilized proteins (Western Blotting). In "Molecular Cloning", p. 18.60-18.75. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
67. Schipper, I. A., and Chow, T. L. (1968). Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. *Can. J. Com. Med.* 32; 412-415.
68. Schmelter, J., Knez, J., Smiley, R., and Capone, J. P. (1996). Identification and characterization of a small modular domain in the herpes simplex virus host shutoff protein sufficient for interaction with VP16. *J. Virol.* 70; 2124-2131.

69. Scott, N. A., Whalley, J. M., Mattick, J. S., Underwood, P. A., Aboud, L., Williams, K. L., and Kirkland, P. (1988). Identification of major antigenic proteins of bovine herpesvirus-1 and their correlation with virus neutralizing activity. *Vet. Microbiol.* 109-121.
70. Seal, B. S., Martinez, J. D., Hall, M. R., and Jeor, S. C. (1988). Occurrence of bovine herpesvirus-1 DNA in nucleosomes and chromatin of bovine herpesvirus-1-infected cells: Identification of a virion-associated protein in chromatin of infected cells. *Arch. Virol.* 99; 221-236.
71. Sharon, N., and Lis, H. (1981). Glycoproteins; Research booming on long-ignored ubiquitous compounds. *Chem. Eng. News.* 59; 21-44.
72. Shi, S-R., Key, M. E., and Kalre, K. L. (1991). Antigen retrieve in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue; an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39; 741-748.
73. Shi, S-R., Prince, J. B., Jones, C. M., Kalra, K. L., and Tangon, A. K. (1995). Use of monoclonal antibodies for immunohistochemistry. *In* "Monoclonal Antibody Protocol" (W. C. Davis), p. 89-107. Humana Press, New York.
74. Smith, G. H., Collins, J. K., and Carman, J. (1989). Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J. Vet. Diag. Inv.* 1; 39-44.
75. Stinsky, M. F. (1978). Sequence of protein synthesis in cell infected by human cytomegalovirus; early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* 26; 686-701.
76. Studdert, M. J., Barker, C. A. V., and Sawan, M. (1964). Infectious pustular vulvovaginitis virus infection of bulls. *Am. J. Vet. Res.* 25; 303-314.
77. Theil, K. W., Mohanty, S. B., and Hetrick, F. M. 1971. Intracellular localization and sequential development of infectious bovine rhinotracheitis viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 32; 1955-62.

78. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose, procedure and some application, proceeding. *Natl. Acad. Sci. Biochemistry*. 76; 4350-4356
79. Van Drunen Littel-Van Den Hurk S., and Babiuk, L. A. (1985). Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport and maturation bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology*. 143; 104-118.
80. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., and Babiuk, L. A. (1985). Antigenic and immunogenic characteristics of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins GVP 3/9 and GVP 6/11a/16, purified by immunoadsorbent chromatography. *Virology*. 144; 204-215.
81. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. V., and Babiuk, L. A. (1985). Topographical analysis of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins: Use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*. 144; 216-227.
82. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. V., Gilchrist, J. E., Misra, V., and Babiuk, L. A. (1984). Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: Characterization of their biochemical and immunological properteis. *Virology*. 135; 466-479.
83. VanNoorden, S., and Polak, J. M. (1983). Immunocytochemistry today; Techniques and pratice. *In* "Immunocytochemistry, Practical Applications in Pathology and Biology" p. 11-42. Wright, Bristol.
84. Whetstone, C. A., and Seal, B. S. (1992). Molecular techniques for clinical diagnosis of viral infections. *In* "Veterinary Diagnostic Virology" (A. E. Castro, and W. P. Heuschele), p. 9-14. Mosby Year Book, St. Louis.
85. Zhu, Q., and Courtney, R. J. (1988). Chemical crosslinking of glycoproteins on the envelope of herpes simplex virus. *Virology*. 167; 377-384.

## 7- ÖZET

Sığır herpes virüs 1 (BHV-1) proteinleri üç farklı test ile çalışıldı. Öncelikle, BHV-1 infeksiyonunun farklı saatlerinde viral proteinlerin hücre içi lokalizasyonları immunoperoksidaz (IP) testiyle araştırıldı. Gerçekleştirilen IP testinde infeksiyonun ilk saatlerinde viral proteinler infekte hücrelerin nükleusunda belirlendi. İnfeksiyon ilerledikçe hücrenin sitoplazmasında viral proteinlerin miktarının arttığı kaydedildi.

Sığır herpes virüs 1 proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi amacıyla BHV-1 infekte MDBK ve kontrol MDBK hücre lizatları % 10'luk poliakrilamid jelde elektroforez edildi. Proteinlerin belirlenmesi için jelin Coomassie mavi ile boyaması yapıldı. Boyama neticesinde, infekte MDBK hücrelerinde 50 farklı protein tespit edilirken kontrol MDBK hücrelerinde 20 farklı protein belirlendi. Ancak, viral proteinlerin tam bir analizi yapılamadı.

Elektroforezleri yapılan infekte MDBK ve VERO hücre proteinleri immun tavşan serumu kullanılarak Vestern blotta da çalışıldı. Vestern blot neticesinde, molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 55, 75 ve 180 kDa proteinlerin BHV-1'in immunojenik proteinleri oldukları belirlendi.



## 8- SUMMARY

### **Study of Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) Proteins with Immunoperoxidase, Electrophoresis and Western Immunoblot Methods.**

Bovine herpes virus 1 (BHV-1) proteins were studied with three different methods. Initially, Immunoperoxidase (IP) test was used to investigate the intracellular localization of viral proteins at different stages of BHV-1 infection. Viral proteins were determined to be in the nucleus of infected cells at the early hours of infection. It was noted that, as the infection progressed, viral proteins started to accumulate in the cytoplasm.

In order to analyse BHV-1 proteins by SDS-PAGE, BHV-1 infected MDBK and control MDBK cell lysates were subjected to electrophoresis on 10 % polyacrylamide gel. After staining with Coomassie blue, 50 different proteins were determined in the infected MDBK cells, whereas only 20 different proteins were observed in the control MDBK cells. However, precise analysis of viral proteins could not be carried out.

Infected MDBK and VERO cell proteins, subjected to electrophoresis, were also examined by Western blot using immune rabbit serum. As a result, proteins at the molecular weights of approximately 55, 75 and 180 kDa were determined to be immunogenic proteins of BHV-1.

## 9- ÖZGEÇMİŞ

13. 11. 1969 tarihinde Malatya'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi bu ilde tamamladım. 1988 yılında A. Ü. Veteriner Fakültesini kazandım ve 1993 yılında Veteriner hekim olarak mezun oldum. Aynı yıl içinde, F. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı sınavda Veteriner Viroloji doktora programını kazandım. Halen Viroloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak bulunmaktayım.



## 10- TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora hocam Prof. Dr. Yusuf BOLAT'a bu konuyu çalışma imkanı sağladığından, Doç. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a bana harcadığı mesaisinden, Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye yardımlarından ve eşim Arş. Gör. Yasemin BULUT'a doktora süresince verdiği destekten dolayı teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) tarafından 161 nolu projeye desteklenmiştir. Çalışmaya sağlamış olduğu destekten dolayı FÜNAF'a teşekkür ederim.

