

Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü nükleoproteininin rekombinant olarak elde edilmesi ve ELISA'da kullanımı

Isolation of recombinant Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein and its usage in ELISA

Gonca Dönmez Ergün Pınarbaşı

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Öz

Amaç: Çalışmamızda hasta serum örneklerinde bulunan KKKAV (Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü) spesifik immunoglobulinlerini belirlemek üzere ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) kiti geliştirilmesini amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine başvuran, KKKA tanısı konan bireylerin serum örneklerinden ekstrakte edilmiş toplam RNA'lerden cDNA eldesi sağlandı. KKKAV Türk suşuna özgü primerler dizayn edildi, nested-PCR yöntemiyle cDNA'lerden hedef gen bölgesinin (nükleoprotein geni) amplifikasyonu sağlanarak PCR ürünü pQE30 plazmid vektörüne klonlandı. İlgili virüs proteininin üretilip üretilmediği virüs genini taşıdığı tespit edilen plazmid DNA'larının *E.coli* M15 suşlarına transformasyonu ve IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ile indüksiyonu sonunda ekspresyon düzeyi SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlendi. Protein saflaştırma işlemi nickel chelate affinity chromatography ve jel filtrasyonu yöntemine göre gerçekleştirildi. *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma) kullanılarak saflaştırılan proteinin konsantrasyonu hesaplandı ve ELISA plakları saflaştırılan rekombinant proteinle (antijenle) kaplanarak, hasta serumlarında spesifik antikorlar tarandı.

Bulgular: Klonlanan 363 baz çiftlik KKKAV fragmenti *E.coli* M15 hücrelerinde eksprese edilmiş ve rekombinant protein jel filtrasyonu yöntemi ile saflaştırıldı. Bir litrelik *E.coli* hücre kültüründen yaklaşık 2 mg/mL protein elde edildi. Bu protein İndirekt ELISA yönteminde 30 CCHFV RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) pozitif hasta serumu ile test edildi ve 24'ünün pozitif olduğu tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızda, KKKAV rekombinant proteinini elde edilerek ELISA testinde kullanılması sağlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü, nükleoprotein, klonlama, ELISA kiti.

Abstract

Aim: In this study, we aimed to develop an ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) kit to determine specific CCHFV (Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus) immunoglobulins in serum samples from patients.

Materials and Methods: cDNA has been obtained from total RNA extracted from serum samples of patients diagnosed with CCHF admitted to Infectious Diseases Outpatient Clinic of Sivas Cumhuriyet University Faculty of Medicine. Turkish CCHFV strain-specific primers were designed and amplification of the target region, the nucleoprotein gene, was performed by nested-PCR method. The PCR product has been cloned into the plasmid vector pQE30. To test whether the viral protein was produced, the plasmid DNA carrying the interested gene has been transformed to *E.coli* M15 strain. After induction with IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), protein expression level has been determined by SDS-PAGE. Protein purification has been carried out using nickel chelate affinity chromatography and gel filtration method. The purified protein concentration has been calculated using *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma). Purified recombinant protein coated ELISA plates have been used for screening specific antibodies in the sera of the patients.

Results: The cloned 363 base-pair CCHFV fragment has been expressed in *E.coli* M15 cells and the recombinant protein has been purified by gel filtration method. About 2 mg/ml protein has been obtained from one liter *E. coli* cell culture and has been tested with sera of 30 CCHFV RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) positive patients using indirect ELISA and 24 of them have been determined positive.

Conclusion: In our study, the CCHFV recombinant protein has been obtained and could be used in ELISA test.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Nucleoprotein, Cloning, ELISA Kit.

Yazışma Adresi: Gonca Dönmez
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı, Sivas, Türkiye

Geliş Tarihi: 21.08.2015 Kabul Tarihi: 24.11.2015

Giriş

KKKAV, *Argasidae* ve *Ixodidae* ailelerine ait 31 tür keneden izole edilmiştir. Virüsün ekolojisi ve epidemiyolojisi için Hyalomma cinsi oldukça önemlidir (1,2). *Bunyaviridae* ailesi, *Nairovirus* cinsi üyesi KKKAV üç parçalı (küçük (S), orta (M) ve büyük (L)), sırası ile viral nükleokapsid (N), membran glikoprotein öncülü (GPC) ve RNA-bağımlı RNA polimeraz (L) proteinlerini kodlayan negatif-yönlü tek zincirli RNA genomuna sahip zarflı bir virüstür (1-6).

KKKAV ile enfekte birçok omurgalı hayvanda enfeksiyon görülmesine karşın, insanlarda şiddetli kanamalı bir hastalık görülür. KKKA inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve iyileşme olmak üzere dört farklı fazda seyreder. Kısa inkübasyon süresinden sonra, yüksek ateş (39-41°C), şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, titreme, sırt, karın ve kas ağrısı, iştahsızlık ile karakterizedir. Bulantı, kusma, diare, nöropsikiyatrik ve kardiyovasküler değişimler ek semptomlar arasındadır. Hastalığın şiddetli seyrettiği hastalarda kanama belirtileri, hastalığın başlamasından 3-6 gün sonra gelişmektedir. KKKA mortalite oranı ortalama %30-50 arasındadır (1,2,6,7).

Asya, Afrika, Güneydoğu Avrupa ve Ortadoğu'da 30'dan fazla ülkede viral izolasyon ve/veya hastalık tespit edilmiştir. Her ne kadar Türkiye'de onlarca yıl önce serolojik kanıtlar KKKAV varlığını işaret etse de, klinik vakalar belgelendirilmemiştir. 2001-2003 yılları arasında ülkemizin Doğu Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğu kesimlerinde birçok hastada KKKA teşhis edilmiştir (1,8,9).

Giderek ülkemizde de artan sayıda KKKAV enfeksiyon vakaları araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu yönde yapılan araştırmalar hızla artmaya başlamıştır. Biz de çalışmamızda KKKAV'nin evrimsel süreçte korunan bölgelerinden (S-RNA segmentinde kodlanan N nükleokapsid bileşeni) bir bölümünü klonlayarak, rekombinant protein elde etmeyi ve KKKA hastalığının kolay teşhisini sağlayacak bir ELISA yönteminde kullanmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine başvuran, KKKA tanısı konan bireylerin serum örneklerinden toplam RNA *AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep* Kiti kullanılarak ekstrakte edilmiştir.

cDNA Sentezi

Toplam RNA örneklerinden *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis* kiti kullanılarak cDNA eldesi sağlanmıştır.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Çalışmamızda, klonlanmak istenilen nükleoprotein gen bölgesinin suşlar arasında korunmuş dizileri internet

ortamında araştırılmış ve bu dizileri amplifiye edecek şekilde primerler (*Forward2*, *Reverse2*, *Forward3* ve *Reverse3*) dizayn edilmiştir (Tablo-1). *Forward* primerlerinin 5' ucuna *Bam*HI, *reverse* primerlerinin 5' ucuna ise *Hind*III restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri eklenmiştir. *Nested-PCR* yöntemi ile cDNA'lardan hedef gen bölgesinin amplifikasyonu Tablo-3'de verilen PCR programı kullanılarak sağlanmıştır. PCR karışımı Tablo-2'de belirtilmiş olan miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo-1. PCR Yönteminde Kullanılan Primer Dizileri.

Forward primer 2	5'-GCGGATCCATGGATAAGTTTGTGTTCC-3'
Reverse primer 2	5'-CGGAAGCTTGACAAATTCYTCGCACCA-3'
Forward primer 3	5'-GCGGATCCATGCTTTATGAGCTCTTTGC-3'
Reverse primer 3	5'-CGGAAGCTGGCACTGGTGGCATTGCC-3'

Tablo-2. PCR Koşulları.

	I.PCR koşulları	II.PCR koşulları
dNTP (2 mM)	2.5 µl	5 µl
<i>Pfu</i> Pol. Buffer (1X)	2.5 µl	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.5 µl	3 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl	2 µl
Rewers Primer (10 pmol)	1 µl	2 µl
<i>Pfu</i> Polimeraz (2,5 u/µl)	0.5 µl	1 µl
ddH ₂ O	11 µl	15 µl
cDNA (50 ng/µl)	5 µl	---
I.PCR ürünü	---	2 µl

Tablo-3. PCR Programı.

Denatürasyon	95 °C'de 5 dk.	1 döngü
	95 °C'de 30 sn.	
Primer bağlanması	55 °C'de 30 sn	35 döngü
	72 °C'de 35 sn.	
Uzama	72 °C'de 5 dk.	1 döngü

Tablo-4. Ligasyon koşulları.

	Ligasyon	Negatif kontrol
PCR ürünü	7 µl	---
pQE30 vektörü	1 µl	1 µl
T4 ligaz enzimi	1 µl	1 µl
T4 ligaz tamponu	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	---	7 µl

Agaroz Jelinden DNA Elüsyonu ve DNA Ligasyonu

Çoğaltılan hedef gen ve plazmid vektörü (pQE30) ligasyon aşamasından önce *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endoükleaz enzimleri ile 37 °C'de bir gece süresince kesilmiştir. Kesim ürünleri agaroz jel

elektroforezinde 100 voltta 45 dakika yürütülmüş ve *QIAquick Gel Extraction* Kiti kullanılarak jelden ekstrakte edilmiştir. Böylece, ligasyon işleminde kullanılacak olan restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş PCR ürünü ve pQE30 vektörü elde edilmiştir. Ligasyon işlemi bir gece boyunca 4°C'de, Tablo-4'de verilen koşullarda yapılmıştır.

Competent hücre hazırlanması ve Transformasyon

CaCl₂ metodu kullanılarak (10) *E.coli* JM109 suşu hücreleri DNA'yı alabilen (*competent cell*) duruma getirilmiş hedef gen bölgesini taşıyan plazmid vektörün transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işleminden sonra hücrelerin, ampisilin (100µg/ml) eklenmiş katı besi ortamı içeren petri kaplarına yayma işlemi gerçekleştirilip, 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilerek hedef gene sahip plazmidi içeren koloniler çoğaltılmıştır.

Küçük Ölçekli DNA izolasyonu

İlgili plazmidi içeren transforme bakteri soyları (her bir koloninin içerdiği var sayılarak) 37 °C de bir gece boyunca ampisilin içeren 3-5 ml LB(*Luria Broth*) ortamında büyütülmüş, küçük ölçekli DNA izolasyonu *QIAGEN Plasmid Purification Kit* ile gerçekleştirilmiştir. *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri kullanılarak izole edilen plazmidlerin istenilen gen bölgesi ile birleşip birleşmedikleri kontrol edilmiştir. Klonlanan örneklerin doğrulanması DNA dizi analizi ile de sağlanmıştır.

Protein Ekspresyonu ve SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein indüksiyonu ve ekspresyonu için ilk önce *E. coli* M15 suşuna transformasyon sağlanıp, ampisilin (100 µg/ml) ve kanamisin (30 µg/ml) içeren katı besiyerinde büyütülmüş olan kolonilerden bir tanesinin ampisilin (100 µg/ml) ve kanamisin (30 µg/ml) içeren 5 µl sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve 37°C 170 rpm'de OD₆₀₀'de konsantrasyonu 0,6 olana kadar büyütülmüştür. Bu konsantrasyona ulaşıldıktan sonra IPTG (son konsantrasyon 1mM olacak şekilde) ile indüksiyon yapılmış ve pozitif kontrol olarak pQE40 plazmidi kullanılmıştır. 4 saatlik indüksiyondan sonra indüksiyon düzeyini belirlemek için %12' lik SDS-PAGE'de örnekler yürütülmüştür.

Protein Saflaştırılması

Protein ekspresyonu tespit edildikten sonra, büyük miktarlarda protein indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma nikel *chelate* afinite kromatografisi yöntemiyle pH gradienti ve imidazol gradientine göre gerçekleştirilmiştir. İmidazol gradientine göre protein saf olarak elde edilmiştir. Buna göre; Pellet 10 ml liziz tamponu ile resüspense edilmiş ve bir saat süre ile ara sıra yavaşça çalkalanarak buzda bekletilmiştir. Örnek 14000 rpm'de 4°C'de 20 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0.45 µm'lik filtre ile süzülmüş ve lizat 2 ml

Ni-NTA agaroz içeren kolona uygulanarak kolondan geçen lizat 15ml'lik santrifüj tüpünde toplanmıştır. 40 ml yıkama tamponu (60 mM imidazol içeren) ile kolon yıkama fraksiyonları toplanmıştır. 5 ml elüsyon tamponu (100mM imidazol içeren) ve ardından 2 ml elüsyon tamponu (250 mM imidazol içeren) ile protein elüe edilmiş ve fraksiyonlar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplanmıştır. Protein saflaştırma işleminden sonra fraksiyonlar %12'lik SDS-PAGE'de yürütülmüş ve protein bantlarının tam olarak saf olmadıkları gözlemlendiğinden, saf yakın olduğu belirlenen iki fraksiyon jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile tekrar saflaştırılmıştır. Elde edilen örnekler %12'lik SDS-PAGE'de yürütülmüştür. *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma) kullanılarak saflaştırılan proteinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

ELISA Test Sistemi

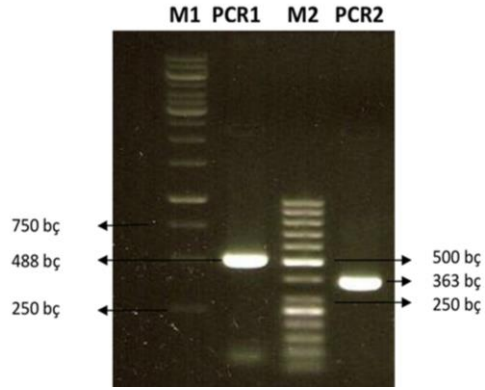
ELISA plakları saflaştırılan rekombinant proteinle kaplanarak, hasta serumlarında spesifik antikorlar taranmıştır. Sisteme göre; Plak kuyucukları %0.02 NaN₃ içeren PBS solüsyonu içerisinde her kuyucuğa 100 ng/kuyu olacak şekilde saflaştırılan protein kaplanmış ve bir gece boyunca bekletilmiştir. Plaklar her bir kuyucuğa 200 µl önce bloklama solüsyonu olacak şekilde 1 saat inkübe edilmiştir. Sonra 10 kez sulandırılmış serum içeren bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edilerek PBST solüsyonu ile kuyucuklar 3 kez yıkanmıştır. Alkalin fosfataz konjugeli antikor (Promega)(1/30,000 sulandırılmış) içeren bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde dağıtılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bağlanmamış konjugatlar PBST ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 mg/ml PNPP (Sigma-Aldrich) içeren 200 µl substrat solüsyonu eklenerek ELISA okuyucuda 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

Çalışmamızda herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılmamıştır.

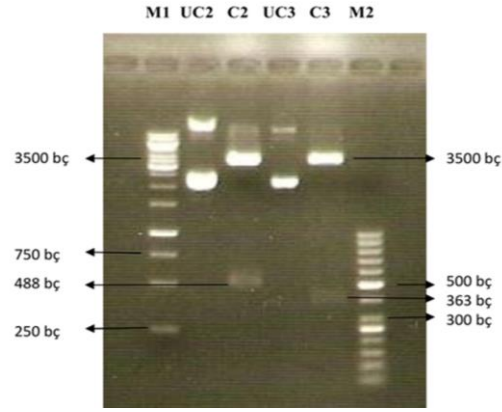
Bulgular

PCR ve Klonlama

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek 488 bç'lik ve 363 bç'lik DNA fragmentleri elde edilmiştir (Şekil-1). Ligasyon sonucunda plazmid vektörün PCR fragmentini içerip içermediği yine bu restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılarak ve %1'lik agaroz jelde kesim ürünleri yürütülerek saptanmıştır (Şekil-2). Klonlanan örneklerin doğrulanması DNA dizi analizi ile sağlanmıştır. Analiz sonucunda nükleokapsid proteini geninin toplam 851 (488+363 bç) bazlık bir kısmının Türk suşu için DNA dizisi belirlenmiştir (Ek-2).



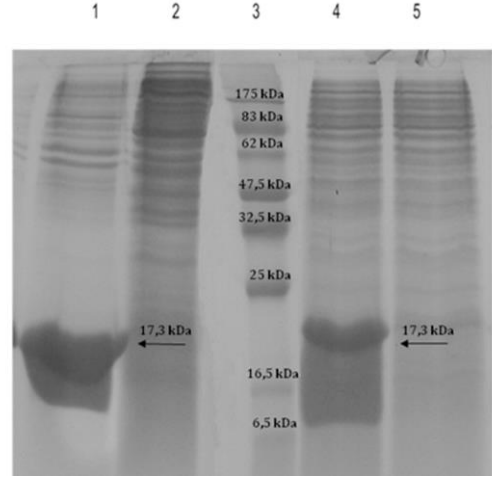
Şekil-1. KKKAV nükleoprotein fragmentlerinin PCR ile amplifikasyonu. B1: 1 kb'lık DNA belirteci (Thermo Scientific), PCR1: 488 bç'lik PCR ürünü, B2: 50 bç'lik DNA belirteci (Thermo Scientific), PCR2: 363 bç'lik PCR ürünü



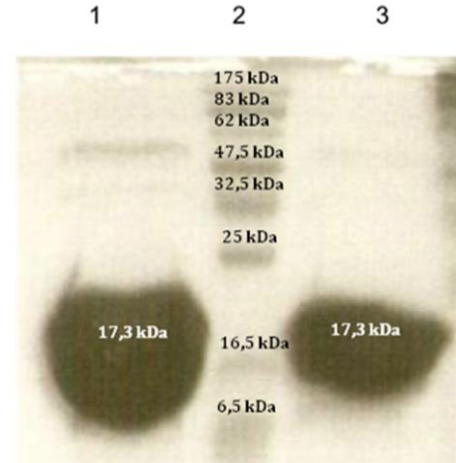
Şekil-2. KKKAV nükleoprotein fragmentlerinin pQE ekspresyon vektörüne klonlanması. B1: 1kb'lık DNA belirteç (Thermo Scientific), UC2: pQE30+488 bç'lik plazmid, C2: pQE30+488'in *Bam*HI ve *Hind*III kesim ürünü, UC3: pQE30+378 bç'lik plazmid, C3: pQE30+363'ün *Bam*HI ve *Hind*III kesim ürünü, B2: 50 bç'lik DNA belirteç (Thermo Scientific)

Protein Ekspresyonu ve Sıfırlanması

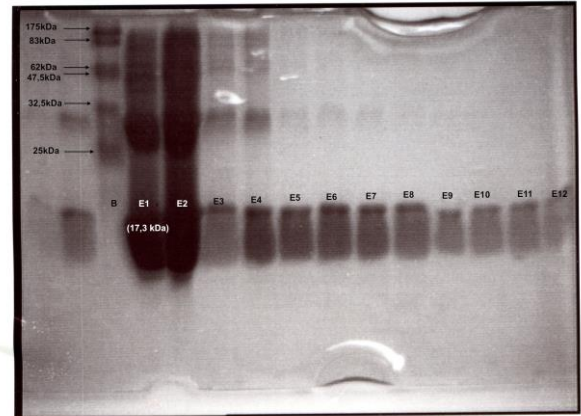
363 bç'lik KKKAV nükleoprotein gen fragmentiyle transforme edilmiş M15 hücrelerinden bir koloni seçilerek küçük ölçekli indüksiyonu 1mM IPTG kullanılarak sağlanmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile belirlenen proteinin (17.3 kDa büyüklüğünde) ekspresyon düzeyi Şekil-3'de gösterilmiştir. Protein ekspresyonu belirlendikten sonra büyük ölçekli indüksiyon gerçekleştirilmiştir. Dört saat 37°C'de indüklenmiş hücreler saflaştırılma işleminde [afinite kromatografi (Şekil-4) ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile (Şekil-5) kullanılmış ve saflık dereceleri SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiştir. 488 bç'lik fragment kullanılarak aynı çalışma yapılmış; ancak ekspresyon düzeyinin zayıf olduğu belirlendiğinden sonuçlar verilmemiş ve bir sonraki aşamalarda bu fragment kullanılmamıştır.



Şekil-3. KKKAV nükleoproteininin ekspresyonu. 1:indüklenmiş pellet, 2:indüklenmemiş pellet, 3:Prestained Protein Belirteci/6-175 kDa (NEB), 4:indüklenmiş süpernatant, 5:indüklenmemiş süpernatant.



Şekil-4. KKKAV nükleoproteininin afinite kromatografisi ile saflaştırılması. 1:ilk elüsyon, 2: *Prestained Protein Belirteci/ 6-175 kDa* (NEB), 3:ikinci elüsyon.



Şekil-5. KKKAV nükleoproteininin jel filtrasyonu ile saflaştırılması, B: *Prestained Protein Belirteci/ 6-175 kDa* (NEB), E: Elüsyon (1-11)

İnsan serumundaki KKKAV spesifik antikorları belirlemek için İndirekt ELISA sisteminin test edilmesi

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine başvuran, KKKA tanısı konan 30 bireylerin RT-PCR pozitif serumu ELISA plaklarına döşenen KKKAV antijeni (rekombinant KKKAV proteini) ile test edilmiştir. Bunun için 6 ELISA plağı 100ng/kuyucuk olacak şekilde rekombinant KKKAV proteini ile kaplanmıştır. Hasta ve kontrol örneğine ait serumlar 2 kez yüklenmiş, okunan iki değerlerin ortalaması alınarak değerlendirme yapılmıştır. Kontrol okumaları için sağlıklı bireylerden alınmış serum örneği ve rekombinant proteinle kaplanan ELISA plaklarına 1/10 oranında seyreltilerek eklenmiş ve bu değerler elde edildikten (Tablo-5) sonra relatif ELISA değeri serum örneğinin okunduğu absorbans (OD₄₅₀) değerinin ortalamasının negatif kontrolün absorbans ortalamasına bölünmesiyle elde edilmiştir. Kontrol serumlarından elde edilen en yüksek relatif değer 1.2 olduğundan relatif değeri 1.5 ve daha küçük olan değerler KKKAV negatif, 2.0 ve daha yüksek olan değerler ise KKKAV pozitif olarak değerlendirilmiştir. 6 ELISA plağının her birine 5'er hasta (2'şer kez) ve 5'er tane de kontrol serumları (2'şer kez yinelenecek biçimde) yüklenmiştir. Bu plaklardan elde edilen sonuçlar Tablo-6'da verilmektedir. Buna göre 30 hastadan 6 tanesi 1.5 relatif değerinin altında değer elde edildiğinden negatif olarak değerlendirilmiş 24'ü ise 2 ve daha yüksek relatif değere sahip olduğu için KKKAV pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tartışma

KKKAV'nün geniş coğrafik dağılımı, yüksek mortalite oranları ile şiddetli insan hastalığı oluşturabilme kabiliyeti, bir biyoterörizm ajanı gibi kasıtlı olarak kullanımı korkusu bu virüsü önemli bir insan patojeni yapmaktadır (11,12).

Ciddi bir sağlık problemi olmasından dolayı virüs enfeksiyonunun teşhisi oldukça önemlidir. Teşhiste moleküler metodlar kullanılmakta ve enfeksiyonunun hızlı laboratuvar tanısı için *reverse* transkriptaz PCR tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır (13). Bu yöntem yüksek derecede özgül, duyarlı ve hızlıdır (14). Ayrıca *Real-time assay'lar* düşük kontaminasyon oranı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, ayrıca klasik *reverse* transkriptaz PCR'den çok daha hızlı olmasından dolayı tercih edilmektedir (1,15). Türkiye'de hasta serumlarında ELISA testi de gerçekleştirilmektedir. Hastalığın başlamasından 7 gün sonra ELISA ve immüno Floresan *assay'ler* aracılığıyla IgM ve IgG antikorları belirlenebilmektedir (16). Spesifik IgM 4 aylık postenfeksiyon'dan sonra belirlenememekte, ancak IgG'ler en az 5 yıl süresince belirlenebilir durumda kalmaktadır. ELISA metodları spesifik ve hassastır (17). Son zamanlarda, rekombinant-nükleoprotein bazlı IgG ELISA kiti, KKKAV enfeksiyonlarının teşhisinde kullanım amaçlı geliştirilmiştir (18,19).

Tablo-5. Kontrol Örneklerine Ait ELISA Değerleri.

Örnek No	ELISA Değeri	Negatif kontrolün ELISA değeri	Relatif ELISA değeri
1	0.080	0.076	1.05
2	0.075	0.076	0.98
3	0.092	0.076	1.21
4	0.055	0.076	0.72
5	0.058	0.076	0.76
6	0.084	0.076	1.10
7	0.045	0.076	0.59
8	0.052	0.076	0.68
9	0.068	0.076	0.89
10	0.070	0.076	0.92
11	0.074	0.076	0.97
12	0.085	0.076	1.11
13	0.086	0.076	1.13
14	0.075	0.076	0.98
15	0.066	0.076	0.86
16	0.069	0.076	0.90
17	0.044	0.076	0.57
18	0.060	0.076	0.78
19	0.052	0.076	0.68
20	0.055	0.076	0.72
21	0.058	0.076	0.76
22	0.062	0.076	0.81
23	0.074	0.076	0.97
24	0.090	0.076	1.18
25	0.088	0.076	1.15
26	0.091	0.068	1.33
27	0.074	0.068	1.08
28	0.069	0.068	1.01
29	0.065	0.068	0.95
30	0.054	0.068	0.79
31	0.064	0.068	0.94
32	0.035	0.068	0.51
33	0.038	0.068	0.55
34	0.042	0.068	0.61
35	0.046	0.068	0.67
36	0.047	0.068	0.69
37	0.090	0.068	1.32
38	0.057	0.068	0.83
39	0.068	0.068	1.0
40	0.052	0.068	0.76
41	0.086	0.068	1.26
42	0.059	0.068	0.86
43	0.063	0.068	0.92
44	0.060	0.068	0.88
45	0.046	0.068	0.67
46	0.051	0.068	0.75
47	0.076	0.068	1.11
48	0.063	0.068	0.92
49	0.041	0.068	0.60
50	0.078	0.068	1.14

Tablo-6. Hasta ve kontrol örneklerine ait indirek ELISA sonuçları.

Örnek No	ELISA Değeri	Negatif kontrolün ELISA değeri	Relatif ELISA değeri	ELISA Sonucu
1	0.218	0.056	3.8	+
2	0.312	0.056	5.57	+
3	0.290	0.056	5.17	+
4	0.064	0.056	1.14	-
5	0.112	0.056	2.0	+
6	0.164	0.045	3.64	+
7	0.158	0.045	3.51	+
8	0.144	0.045	3.2	+
9	0.138	0.045	3.06	+
10	0.150	0.045	3.3	+
11	0.188	0.053	3.54	+
12	0.078	0.053	1.47	-
13	0.065	0.053	1.22	-
14	0.090	0.053	1.69	-
15	0.210	0.053	3.96	+
16	0.420	0.085	4.94	+
17	0.368	0.085	4.32	+
18	0.520	0.085	6.11	+
19	0.490	0.085	5.76	+
20	0.410	0.085	4.82	+
21	0.138	0.041	3.36	+
22	0.058	0.041	1.41	-
23	0.128	0.041	3.12	+
24	0.212	0.041	5.17	+
25	0.234	0.041	5.70	+
26	0.084	0.065	1.29	-
27	0.320	0.065	4.90	+
28	0.300	0.065	4.61	+
29	0.282	0.065	4.33	+
30	0.266	0.065	4.09	+

Hücre kültüründe izolasyon daha basit ve daha hızlıdır, fakat klasik yöntemlere göre daha az duyarlıdır (20). Virüs, LLC-MK2, Vero, DHK-21 ve sw-13'ü içeren hücre hatları kullanılarak izole edilebilmektedir (1). Virüs izolasyonu 2-5 günde başarılabilmekte; fakat hücre kültürleri duyarlı olmadıklarından genellikle sadece hastalığın ilk 5 günü süresince karşılaşılan nispeten yüksek viremi'nin belirlenmesine izin vermektedir. Virüs az sitopatik etki üretebilir ya da hiç üretmeyebilir; fakat spesifik monoklonal antikolar immüno Floresan assay testleri yapılarak belirlenebilmektedir (1). *Antijen-capture* ELISA da kullanılabilir. Duyarsızlığına rağmen, antiviral tedavisi gerektiren şiddetli vakaların belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada nükleoprotein bölgesi pQE vektör ailesinin bir Tip IV yapısı olan pQE30 vektörüne klonlanmıştır. Bu yapıda proteinin N-terminalinde 6xHis tag yer almakta ve üç okuma çerçevesinde de 3' ucunda stop kodonlarını içermektedir. Tip IV sayesinde diğer pQE yapılarına göre 2-4 kat fazla ürün ekspresyonu sağlanabilmektedir.

Çalışmamızda klonlama ve ekspresyon vektörü olarak pQE30'un seçilmesi, ilk restriksiyon enzim bölgesi *Bam*HI'nın başlama kodonu ile okuma çerçevesi içinde yer almasındandır. Plazmidin *multiple cloning* (çoklu klonlama) bölgesine uygun ve nükleoprotein bölgesinde internal *Bam*HI ve *Hind*III bölgeleri bulunmayan restriksiyon enzimleri için çeşitli izolatlardan nükleoprotein sekansı bilgisayar ortamında araştırılmıştır. Bu nedenle bu iki enzim genin uçlarına eklenmiştir. Tüm klonlama basamaklarında kullandığımız *E.coli* JM109 suşu mutant *lacI* promotörüne sahip olmasından dolayı lac represörü 10 kat fazla transkribe edilerek protein ekspresyonunu sıkı şekilde baskılamaktadır. Bu sıkı represyon protein ekspresyonu olmaksızın plazmidin çoğalmasına olanak sağlamakta ve bu basamaklar süresince ekspresyon mutantlarının seleksiyonunu inhibe etmektedir.

Klonlama işleminden sonra nükleoprotein M15 konukçu hücrelerinde eksprese edilmiştir. Tip IV vektörlerde eksprese edilen proteinler N terminallerinde 6xHistidin etiketleri içermektedir, Ni-NTA resinin Ni²⁺ iyonları ile etkileşecek olan bu etiket, proteinin diğer kısımları tarafından örtülmemelidir. Dolayısı ile proteinin denatürasyonu histidin etiketi ile Ni²⁺ iyonlarının etkileşimini artırmaktadır. Proteinin solübl kısmının saflaştırma işlemi Ni-NTA resin (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ni-NTA resine bağlanan 6xHis afiniteli etiket sadece ardışık histidin rezidularından oluşmaktadır. Küçük boyutundan dolayı proteine minimal düzeyde ekstra amino asit eklenmesi sağlamaktadır. Bugün, antikor assay sistemleri füzyon polipeptidleri ya da sentetik oligopeptidleri kullanılmaktadır. Füzyon polipeptidler füzyon partneri ile özgül olmayan reaksiyonlar sergileyebilmekte ve sentetik oligopeptidler antijenik epitopu sınırlayarak hassasiyeti azaltabilmektedirler. Ancak 6 histidin nonspesifik etkileşimler oluşması için oldukça kısa bir birimdir. Bu nedenle çalışmamızın klonlama ve ekspresyon aşamaları için bu vektör tercih edilmiştir. Elde edilen saf nükleokapsid proteini ELISA sisteminin oluşturulmasında kullanılmış, test edilen 30 hastanın 24'ü bu sistemde pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışmamızla tutarlı olarak rekombinant protein kullanımının, IgG ve IgM saptanmasında yararı ortaya konmuştur (21). Ayrıca doğal antijen olarak kullanılmaları açısından özgül ve hassastırlar (18,22).

Sonuç

Çalışmamız Türk suşu kullanılarak yapılan bir çalışma olması açısından önemlidir. Geliştirilmiş olan kitte kullanılan protein bölgesine ek olarak farklı protein bölgeleri rekombinant proteinin yapısına eklenerek kitin daha duyarlı olması sağlanabilir.

Açıklamalar

Çalışmamız Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu 2006-6/6 numaralı kararı ile onaylanmış ve Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından T-294 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004;64(3):145-60.
2. Papa A, Ma B, Kouidou S, Tang Q, Hang C, Antoniadis A. Genetic Characterization of the M segment of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains, China. *Emerg Infect Dis* 2002;8(1):50-3.
3. Arslan S, Engin A, Özbilüm N, Bakır M. Toll-like receptor 7 Gln11Leu, c.4-151A/G, and +1817G/T polymorphisms in Crimean Congo hemorrhagic fever. *J Med Virol* 2015;87(7):1090-5.
4. Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In Knipe DM, Howley P, editors (ed). *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2001:1581-602.
5. Papa A, Bozovi B, Pavlidou V, Papadimitriou E, Pelemis M, Antoniadis A. Genetic Detection and Isolation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis* 2002;8(8):852-4.
6. Ozdarendeli A, Canakoğlu N, Berber E, et al. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res* 2010;147(2):288-93.
7. Chinikar S. An overview of Crimean- Congo Hemorrhagic Fever in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2009;1(1):7-12.
8. Dunster L, Dunster M, Ofula V, et al. First Documentation of Human Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Kenya. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):1005-6.
9. Bakır M, Uğurlu M, Dokuzoğuz B, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical. *J Med Microbiol* 2005;54(4):385-9.
10. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(7):2172-5.
11. Bakır M, Elaldi N. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. *ANKEM Derg* 2006;20(Ek 2):227-31.
12. Guo Y, Wang W, Ji W, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(13):5046-51.
13. Drosten C, Kummerer BM, Schmitz H, Gunther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res* 2003;57(1-2):61-87.
14. Schwarz TF, Nsanze H, Longson M, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(2):190-6.
15. Drosten C, Gottig S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2323-30.
16. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 1989;11(Suppl 4):801-6.
17. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect* 1994;113(3):551-62.
18. Saijo M, Qing T, Niikura M, et al. Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1587-91.
19. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, et al. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol* 2005;75(2):295-9.
20. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 1986;24(4):654-6.
21. Dowall SD, Richards KS, Graham VA, Chamberlain J, Hewson R. Development of an indirect ELISA method for the parallel measurement of IgG and IgM antibodies against Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus using recombinant nucleoprotein as antigen. *J Virol Methods* 2012;179(2):335-41.
22. Garcia, S, Chinikar S, Coudrier D, et al. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J. Clin. Virol* 2006;35(2):154-9.