



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2014; 28 (2): 63 - 66
http://www.fusabil.org

Yasemin BULUT
Şafak ANDIÇ

Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

TT Virusun ORF2b Geninin Klonlanması

Amaç: Transfusion-transmitted virus (TTV) ilk olarak 1997 yılında, kan transfüzyonunu takiben non-A-G hepatitli hastalarda belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı TTV'nin ORF2b gen kısımlarının genetik klonlanmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada TTV DNA pozitif hasta örneklerinden ORF2b gen kısmı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve pGEM®-T plasmid vektörde klonlandı.

Bulgular: ORF2b genleri bulunduran rekombinant vektörler restriksiyon enzim analizi ve PCR-tarama testleri ile belirlendi.

Sonuç: TTV'nin genlerin klonlanması ülkemizde viral gen kütüphanelerinin zenginleşmesini sağlayacaktır. Ayrıca, gelecek çalışmalarda bu rekombinant plasmidlerle açıklanacak hedef proteinler ELISA kitlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Transfusion-transmitted virus, TTV, klonlama, PCR.

Cloning of ORF2b Gene of TT Virus

Objective: Transfusion-transmitted virus (TTV) was first identified in patients with non-A to -G hepatitis following blood transfusion in 1997. The objective of this study is cloning of ORF2b gene fragments of TTV.

Materials and Methods: In this study, the ORF2b genes from TTV DNA positive samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pGEM®-T plasmid vector.

Results: The recombinant plasmid vectors including ORF2b gene were detected by PCR-screening test and restriction enzyme analysis.

Conclusion: The producing of the gene clones containing ORF2b gene of TTV will contribute the enrichment of the viral gene library of our country. Moreover, the target proteins produced from the recombinant clones in future studies will be used in terms of the development of ELISA kits.

Key Words: Transfusion-transmitted virus, TTV, cloning, PCR.

Giriş

Transfusion-transmitted virus, Torque teno virus yada TT virus (TTV) tek sarmallı, yaklaşık 3800 baz uzunlukta sirküler DNA'ya sahiptir. Bu virus *Circoviridae* ailesinin üyeleri olarak klasifiye edilmektedir. Bu virus aynı ailede yer alan SEN virus (SENV) ile birlikte non-A-G virus negatif post-transfüzyonlu hepatitlerden sorumlu tutulmaktadır (1-3). Yine *Circoviridae* ailesinin bir üyesi olan ve genotipik ve fenotipik olarak özellikle TTV ile benzer olan Simian TTV (s-TTV) ise primatlardan insanlara geçtiği ve sağlıklı bireylere kıyasla, hepatit vakalarında daha yüksek prevalansta olduğu belirlenmiştir (4, 5).

Transfusion-transmitted virus ilk olarak 1997 yılında kan transfüzyonu yapılan hepatitli hastalarında belirlenmiş ve bu nedenle de yeni bir posttransfüzyon hepatit etkeni olarak tanımlanmıştır (1). Daha sonraki çalışmalarda bu virusun bir çok ülkede, hepatitli hastalara ilave olarak sağlıklı bireylerde de yüksek prevalansı tespit edilmiştir. Ancak, karaciğer hastalarında oldukça yüksek prevalansı sebebiyle, bu virus varlığı ile hepatitler arasında ilişki olacağı kanısı güçlenmiştir (2, 6).

Moleküler biyoloji alanında, özellikle biyolojik ve fonksiyonel olarak önem arz eden bir gen bölgelerinin genetik klonları, hedef gen bölgesinin uzun süreli saklanması, daha sonraki aşamalarda dizilimlerinin çıkartılması ve ökaryotik veya prokaryotik sistemlerde açıklanması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (7, 8). Ayrıca, protein-gen ilişkisinin aydınlatılması için klonlanan gen bölgesinde nokta mutasyonları yaparak reverse genetik çalışmaları yapılabilmektedir. Genetik klonlamalar rekombinant DNA aşılama geliştirmesi için de başlangıç aşamasıdır (9).

Bu çalışmada, TTV genomunun üç açık okuma bölgesinden (ORF) biri olan ORF2b gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması ve daha sonra çoğaltılan bu gen bölgelerinin genetik klonlanması amaçlanmıştır.

Geliş Tarihi : 07.04.2014
Kabul Tarihi : 07.07.2014

Yazışma Adresi Correspondence

Yasemin BULUT
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
Elazığ-TÜRKİYE

ybulut@firat.edu.tr

Gereç ve Yöntem

DNA Örnekleri: Çalışmanın başlangıç materyalini daha önceki çalışmada TTV DNA pozitif olduğu tespit edilen ve Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında - 80 °C'de tutulan serum örnekleri oluşturmuştur (10). Bu serum örneklerinde DNA ekstraksiyonları klasik Fenol:Kloroform:Izoamil Alkol (25:24:1, v/v) metodu ile gerçekleştirildi (11).

İnzört Geninin Çoğaltılması: Spesifik primerler, TTV pozitif serumlardan elde edilen DNA örnekleri ve GoTaq® DNA polimeraz enzimi (Promega Co., USA) kullanılarak yaklaşık 580 baz çift (bç) uzunlukta inzört DNA'lar PCR ile sentez edildi. Bu çalışmada TTV'nin ORF2b bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primerler (ORF2b F; 5'-ATGGGCAAGGCTCTTAG-3 ve R; 5'-TTACTCGTCTGCCTCGATAGCGG -3) gen bankasında BLAST programında seçildi.

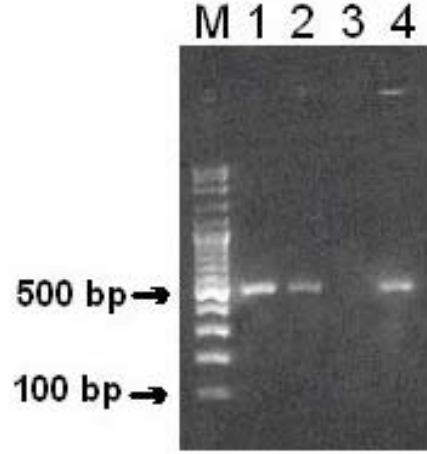
Polimeraz zinciri reaksiyonu ile çoğaltılan 580 baz çifti (bç) uzunlukta gen bölgesi (amplikon) %1'lik low-melting agaroz jelde, ultraviyole ışık kaynağı altında steril bistüri ile kesilerek mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Jeldeki uzaklaştırılan DNA'lar Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) ile temiz ürünler olarak elde edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçülerek kullanılabilecek kadar insertler -80 °C'de muhafaza edildi (11).

pGEM®-T Plazmid Klonlama: Amplifiye edilen gen ürünleri pGEM®-T (pGEM®-T Easy Vector Systems plazmid vektörü içinde, üretici firmanın (Promega Co., USA) önerileri doğrultusunda klonlandı. Kısaca, pürifiye edilen amplikonlar pGEM®-T vektöre 2X Rapid Ligation Buffer ve T4 DNA Ligase enziminin olduğu ortamda yerleştirildi. Ligasyonu yapılan bu plazmid DNA'ların transformasyonları soğuk CaCl₂ içeren ortamda high-efficiency competent *E. coli* DH5α hücrelerine gerçekleştirildi. Transforme hücreler ampisilin 100 µg/mL içeren LB agar pleytlerinde üretildi. Klonlama işlemini takiben rekombinant plasmid vektörlerin belirlenmesi β-galactosidase bağlı mavi-beyaz koloni seçim yöntemine ilave olarak PCR tarama metodu (PCR screening method) ve *Bst*ZI restriksiyon enzim kesmi kullanılarak doğrulandı (12).

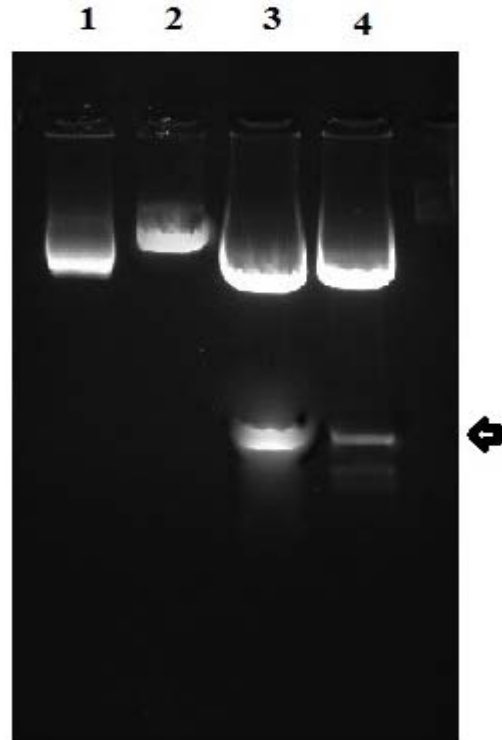
Bulgular

TTV pozitif serum örneklerinde TTV ORF2b gen bölgesine spesifik primerler ve GoTaq enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR neticesinde amplifiye edilen yaklaşık 580 bç uzunluğunda hedef gen % 1'lik agarose jelde ultraviyole ışık kaynağında görüntülendi (Şekil-1).

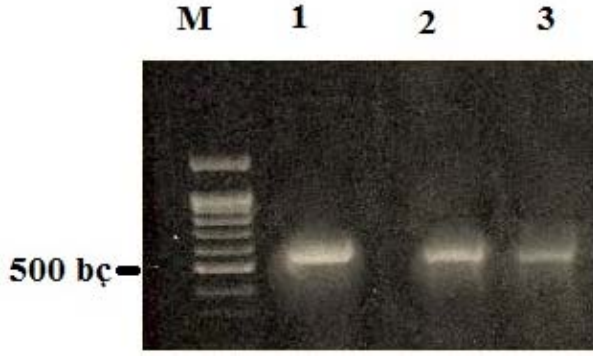
İnzört hedef gen içermeyen pGEM®-T vektör DNA'ları (Şekil-2, Hat 1) ve inzört gen içeren rekombinant vektör DNA'ları % 0.75'lik agarose jelde yürütüldü (Şekil-2, Hat 2). Ayrıca, rekombinant pGEM®-T vektör içinde spesifik gen bölgelerinin varlığının doğrulanması restriksiyon enzim analiz (Şekil-2, Hat 3 ve 4) ve PCR tarama testi (Şekil-3) metotlarıyla gerçekleştirildi.



Şekil 1. PCR ile çoğaltılan yaklaşık 580 baz çifti uzunluğundaki ORF2b gen bölgesinin % 1'lik agarose jelde görüntüsü. M; 100 baz çifti DNA marker, Hat 1, 2 ve 4; Serum örneklerde çoğaltılan ORF2b gen bölgesi, Hat 3; TTV negatif serum örneği.



Şekil 2. Rekombinant vektörde TTV ORF bölgesinin varlığının *Bst*ZI restriksiyon enzim analizi metotlarıyla doğrulanması. Hat 1; pGEM®-T vektör, Hat 2; Rekombinant pGEM®-T vektör, Hat 3 ve; Hat 4; *Bst*ZI enzimi ile kesilen rekombinant pGEM®-T vektör.



Şekil 3. Rekombinant vektörde TTV ORF bölgesinin varlığının PCR-tarama testi ile doğrulanması. M; 100 baz çifti DNA marker, Hat 1-3; ORF2b geni pozitif rekombinant pGEM®-T plasmid vektörler.

Tartışma

Hepatit vakaların viruslarla ilişkileri uzun yıllardır biliniyor olmasına rağmen, hepatit olgularının gerek patogenezi gerekse etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Her geçen gün, hepatitin etyolojik ajanı olabileceği ifade edilen yeni virusların varlığı belirlenmekte ve bu virusların klinik önemine yönelik pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir (6- 13). Bu çalışmada söz konusu olan TTV, klinik önemi ve patogenezi tam olarak ortaya konamamış olmalarına rağmen, hepatit oluşumunda sorumlu olabilecek viruslardan birisi olarak kabul görmektedir.

Kaynaklar

1. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
2. Bostan N, Amed N, Bokhari H. Current and future prospects of Torque teno virus. *Vaccines & Vaccination* 2013; 1: 1-9.
3. Kojima H, Kaita KD, Zhang M, Giulivi A, Minuk GY. Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res* 2003; 60: 27-33.
4. Inami T, Obara T, Moriyama M, Arakawa Y, Abe K. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: Evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 2000; 25: 330-335.
5. Iwaki Y, Aiba N, Tran HT, et al. Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatol Res* 2003; 25: 135-142.
6. Das K, Kar P, Gupta RK, Das BC. Role of transfusion-transmitted virus in acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure of unknown etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 406-412.
7. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008; 322: 881-888.
8. Zhou F, Gao SJ. Recent advances in cloning herpesviral genomes as infectious bacterial artificial chromosomes. *Cell Cycle* 2011; 10: 434-440.
9. Donati C, Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: Improvements over the original design. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1285: 115-132.
10. Toroman ZA, Bulut Y, Özdarendeli A, Kalkan A. Kronik hepatit B ve C virüs enfeksiyonlu olgularda transfusion transmitted virus (TTV) DNA'sının PZR ile belirlenmesi. *Firat Tıp Dergisi*, 2003; 8: 153-155.
11. Bulut Y, Doymaz MZ. Hepatit B virus core antijeni (HBcAg) geninin *Escherichia coli*'de klonlanması. *Mikrobiyol Bul* 2001; 35: 127-132.
12. Bulut Y, Doymaz MZ. Hepatit B virüsü HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde ekspresyonu. *Mikrobiyol Bul* 2003; 35: 183-191.
13. Koidl C, Michael B, Berg J, et al. Detection of transfusion transmitted virus DNA by real-time PCR. *J Clin Virol* 2004; 29: 277-281.
14. Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML, Mushahwar IK. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* 1999; 80: 1743-1750.

Yaklaşık 3800 nükleotit uzunlukta olan TTV tam genomlarının analizi neticesinde virusun en az üç açık okuma bölgesine sahip (ORF) olduğu tespit edilmiştir. Bu ORF'lerden en uzunları ORF1'dir ve bu ORF virusun kapsid proteinlerini kodlamaktadır. Kısa olan ve non-yapısal proteinleri kodlayan ORF2 ise ORF2a ve ORF2b olarak isimlendirilen iki kısma ayrılmıştır (14-16). TTV N22 gen bölgesinin analizine göre TTV'nin en az 30 genotipi tespit edilmiştir (16). ORF 2a gen bölgesi tüm genotipler arasında korunmuş iken ORF2b gen bölgesi oldukça değişkendir (14-16).

Gerek ORF2a ve gerekse ORF2b'ye karşı DNA pozitif bireylerde iyi immun yanıt şekillenmediği tespit edilmiştir. Bunun ise her iki proteinin virusun non-yapısal proteinleri olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (2, 16). Daha önce yapılan çalışmalarda amaca uygun olarak TTV'nin ORF bölgeleri bireysel veya tam genom olarak farklı vektörlerde klonlanmıştır (14-16). Yaptığımız taramalarda ülkemizde TTV'nin ORF bölgelerinin klonlanmasına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada TTV'nin belirlenmiş üç ORF bölgesinden biri olan ORF2b'nin klonlanması gerçekleştirilmiştir. Diğer ORF bölgelerinin klonlanması, bunların da ORF2b ile birlikte sekanslatılması ve açıklanması çalışmaları devam ettirilmektedir. Bu ve benzeri çalışmalar ülkemizde viral gen kütüphanelerinin zenginleşmesini sağlayacaktır. Ayrıca, gelecek çalışmalarda, uygun vektörlerde açıklanacak hedef proteinlerle tanılabilir ELISA kitleri dizayn edilecektir.

15. Kamahora T, Hino S, Miyata H. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Gen Virol* 2000; 74: 9980-9986.
16. Kakkola L, Hedman K, Vanrobaeys H, Hedman L, Söderlund-Venermo M. Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *J Gen Virol* 2002; 83: 979-990.