

MORAXELLA BOVIS'İN TÜM HÜCRE PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK ANALİZİ

Jale ERDEĞER* Mehmet AKAN* K. Serdar DİKER**

Summary: Whole-cell proteins of ten field isolates of *Moraxella bovis* from cattle with bovine infectious keratoconjunctivitis were examined with SDS-PAGE technique. Seven isolates were hemolytic and hemagglutinating and three were non-hemolytic and non-hemagglutinating. Four major protein bands of 55, 37, 35, 19 kDa molecular weights were found in all *M. bovis* strains. Twenty-eight protein bands were identical in all *M. bovis* strains, but four additional protein bands with approximate molecular weights of 97, 63.5 and 22 kDa were detected in non-hemolytic strains. Five hemolytic and hemagglutinating field isolates from Turkey and two isolates from USA had 30 identical bands. Only two different protein bands of 22 and 18 kDa molecular weight were seen among hemolytic and hemagglutinating isolates from these two countries.

Özet: *Infeksiyöz keratokonjunktivitisi sığırlardan izole edilen 10 adet Moraxella bovis saha izolatının tüm hücre proteinleri SDS-PAGE tekniği ile incelendi. İzolatların yedisi hemoliz ve hemagglutinasyon pozitif, üçü hemoliz ve hemagglutinasyon negatifti. Elektroforetik analiz sonucunda tüm M. bovis suşlarında 55, 37, 35 ve 19 kDa ağırlığında majör protein bandları saptandı. M. bovis'in tüm suşlarında 28 protein bandı benzer bulunurken, hemoliz negatif suşlarda ayrıca 97, 92, 63.5 ve 22 kDa molekül ağırlığında 4 farklı protein bandı belirlendi. Türkiye'de izole edilen 5 ve Amerika Birleşik Devletleri'nde izole edilen hemoliz ve hemagglutinasyon pozitif suşlar arasında 30 ortak bant saptandı. Bu iki ülkeden izole edilen hemoliz ve hemagglutinasyon pozitif M. bovis suşlarında 22 ve 18 kDa molekül ağırlığında iki protein bandı farklı bulundu.*

Giriş

Moraxella bovis, sığırların infeksiyöz keratokonjunktivitisinin (IBK) primer etkenidir (4.13). Pilus ve hemolizin bu etkenin önemli virulens faktörlerindedir (11). *M. bovis*'in piluslu, otoagglutinasyon ve hemagglutinasyon özelliği gösteren suşları patojeniktir ve sığırlarda deneysel IBK oluşturmaktadır (1, 3, 6). *M. bovis*'in patojenitesi, beta hemolizin oluşmasıyla da ilgilidir. Etkenin hemoliz pozitif suşları patojenik, hemoliz negatif variantları ise patojenik değildir. Hemoliz negatif *M. bovis* suşları ile infeksiyon oluşturulamayan gözlerde, hemoliz pozitif suşların IBK oluşturduğu bildirilmiştir (10). *M. bovis*'in kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesine karşın antijenik yapısı hakkında sınırlı araştırma yapılmıştır. Sandhu ve White (12), *M. bovis*'in eks-

traselüler antijenlerini immunoelktroforetik olarak incelemişler ve Rough tip izolatların Smooth tip izolatlardan farklı spesifik iki antijene sahip olduğunu saptamışlardır. Michell ve Burrell (8), *Moraxella*'nın çeşitli türlerinin kültür süpernatantlarının 3-6 antijen içerdiğini ve bunlardan birinin tüm *Moraxella* türlerinde var olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *M. bovis*'in diğer *Moraxella* türleriyle antijenik yakınlığı immunodifüzyonla da belirlenmiştir. Ostle ve Rosenbusch (9), SDS-PAGE tekniği kullanılarak bu mikroorganizmaları diğer *Moraxella* türlerinden ayıran dış membran protein (OMP) profillerini saptamış ve 9 major protein bandı tanımlamışlardır. Aynı çalışmada, immunoblotting ile *Moraxella* türlerinin birbirlerine antijenik yakınlığı da araştırılmıştır. Ayrıca Horsnell ve Teale (5), farklı *M. bovis* izolatlarının dış membran protein profillerinin benzerlik

* Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

gösterirse de aynı olmadığını, sadece üç ayrı immunojenik proteinin tüm izolatlarda yaygın olduğunu saptamışlardır.

Bu araştırmada, sahadan izole edilen *M. bovis* suşlarının tüm hücre protien profillerinin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezis (SDS-PAGE) yöntemi ile saptanması ve suşların birbirlerine antijenik yakınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Moraxella suşları: Çalışmada Türkiye'deki IBK'li hayvanlardan izole edilen IBK2, IBK4, IBK16, IBK23, IBK26, IBK37, IBK41 ve IBK42 suşları kullanıldı. Suşların identifikasyonu Wilcox (14)'a göre yapıldı. Bu suşlardan IBK2, IBK37 ve IBK42 hemoliz ve hemaglutinasyon negatif, diğer suşlar hemoliz ve hemaglutinasyon pozitif özellikteydi (2). Ayrıca A.B.D.'de IBK'li hayvanlardan izole edilen ve D.G. Rogers'ten (National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, Iowa) sağlanan *M. bovis* Mac74 ve IBH63 suşları kullanıldı.

Poliakrilamid jelin hazırlanışı: Ayırıcı jel (%10) hazırlanması için, monomer solusyonu (akrilamid ve bisakrilamid), 4x ayırıcı jel buffer (pH: 8.8), SDS ve su karıştırıldı. Deaerasyon işlemi yapıldıktan sonra, karışıma amonyum persülfat (APS) ve TEMED ilave edilerek polimerizasyon işlemi başlatıldı. Karışım, önceden hazırlanan cam tabakalar (1.5 mm x 16 cm x 18 cm) arasına üstte yaklaşık 4 cm kalacak biçimde döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için 1-2 saat beklendi. Dizici jel (%4), monomer solusyonu, 4x dizici jel buffer (pH: 6.8), SDS ve su karıştırılarak hazırlandı. Deaerasyon işlemi yapıldıktan sonra APS ve TEMED eklendi. Jel solusyonu cam tabakaların tarak yerleştirilmiş boş kısmına döküldü. Polimerizasyon işleminin tamamlanması için birkaç saat beklendi.

Elektroforez için örneklerin hazırlanması ve jele yüklenmesi: Kanlı agarda 24 saatte üretilen *M. bovis* suşları 100 µl 2x lizis buffer (tris, SDS, gliserol, merkaptotanol) içinde 40-50 µg yaş ağırlık olacak şekilde süspanse edildi. Bu süspanسیونlar 100 °C'de 10 dakika kaynatıldı ve %001 oranında bromphenol blue izci boyası ilave edildi. Molekül ağırlık standartları (şişir albumini, 66 kDa; yumurta albumini, 45 kDa; gliseraldehid-3- fosfat dehidrogenaz, 36 kDa; karbonik anhidraz, 29 kDa; tripsinogen, 24 kDa; tripsin inhibitörü, 20.1 kDa; alfa laktalbümin, 14.2 kDa, Sigma) ve örnekler, çukurlara 20 µl olacak şekilde mikroenjektörle yüklendi.

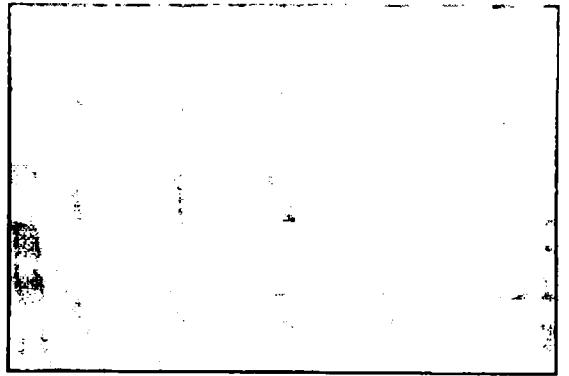
Elektroforez: Elektroforez işlemi tris, glisin, SDS içeren tank bufferda, 30 mA sabit amperde gerçekleştirildi. İşleme izci boya jelin sonuna gelinceye kadar (4 saat) devam edildi.

Boyama: Elektroforez işlemi bittikten sonra jel cam plaklardan çıkarılarak fiksatif boya (metanol, asetik asit, coomassie blue R.250) ile 4 saat boyandı. Daha sonra jel, boya giderici solusyon I'de bir saat, solusyon II'de zemin rengi açılıncaya kadar bekletildi.

Sonuçların değerlendirilmesi: Protein bantlarının molekül ağırlıkları, molekül ağırlık markerleri kullanılarak belirlenen Rf eğrisine göre hesaplandı.

Bulgular

Çalışmada kullanılan suşların, SDS-PAGE ile 118 ve 13.2 kDa arasındaki proteinleri saptanabildi. İncelenen *M. bovis* suşlarında toplam 47 protein bandı tespit edildi (Şekil 1). En az protein bandı IBK 2'de (32 protein), en fazla ise IBK 23'te (41 protein) belirlendi. *M. bovis* suşlarının tümünde, 55, 37, 35 ve 19 kDa ağırlığında majör protein bandları ortak olarak saptandı. *M. bovis*'in tüm suşlarında 28 protein bandı benzer bulunurken, hemoliz negatif suşlarda diğer suşlardan farklı olarak 4 band tespit edildi. Sadece nonhemolitik suşlarda bulunan bu bandların ağırlıkları 97, 92, 63.5 ve 22 kDa olarak belirlendi. ABD'den sağlanan *M. bovis* suşlarından IBH63'te 34, MAC74'te ise 37 protein bandı saptandı. Bu protein bantlarından 32'sinin benzer olduğu görüldü. Türkiye'de izole edilen 5 ve Amerika Birleşik Devletleri'nde izole edilen hemoliz ve hemaglutinasyon pozitif suşlar



Şekil 1. Çeşitli *M. bovis* suşlarının elektroforetik (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezis, SDS-PAGE) protein profilleri (MA, molekül ağırlık standartları: şişir albumini, 66 kDa; yumurta albumini, 45 kDa; gliseraldehid-3- fosfat dehidrogenaz, 36 kDa; karbonik anhidraz, 29 kDa; tripsinogen, 24 kDa; tripsin inhibitörü, 10.1 kDa; alfa laktalbümin, 14.2 kDa).

Figure 1. Electrophoretical (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) protein profiles of various *M. bovis* strains (MA, molecular weight standards: bovine albumine, 66 kDa; egg albumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; alpha lactalbumin, 14.2 kDa).

arasında 30 ortak bant saptandı. Bu suşlarda ortak olan bantlardan 22 ve 18 kDa molekül ağırlığında iki band, Türkiye'de izole edilen hemoliz ve hemaglutinasyon pozitif suşlarda saptanamadı.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Türkiye ve ABD'de IBK'lı sığırlardan izole edilen *M. bovis* suşlarının tüm hücre proteinleri elektroforetik olarak (SDS-PAGE yöntemi) incelendi. SDS-PAGE tekniği mikroorganizmaların protein profillerinin saptanması ve bireysel antijenik moleküllerinin analizi için sıkça kullanılmaktadır. Bu tekniğin günümüzde çok yaygın olarak kullanılan şekli Laemmli (7) tarafından geliştirilmiştir ve bakterilerin protein profillerinin saptanmasında ve numerikal taksonomisinde en çok kullanılan yöntemdir. Tekniğin en önemli yararı birçok fenotipik özelliğe esas olan proteinlerin kalitatif ve kantitatif analizinin yapılabilmesidir.

Bu çalışmada, tüm suşlarda ortak ve 55, 37, 35 ve 19 kDa molekül ağırlığında 4 majör protein bandı bulundu. Horsnell ve Teale (5), inceledikleri 10 *M. bovis* suşunda, 128, 55 ve 37 kDa molekül ağırlığındaki majör proteinlerin ortak olduğunu saptamışlardır. Ostle ve Rosenbusch (9) de, yaptıkları çalışmada *M. bovis* suşlarında ortak olan 37.1 kDa molekül ağırlığında majör protein bandı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar ile, diğer araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar arasında benzerlik bulunmaktadır. Horsnell ve Teale (5)'nin saptadıkları 55 ve 37 kDa ağırlığındaki protein bantları bu çalışmada aynı bulunurken, diğer majör bantlar bildirilmemiştir. Horsnell ve Teale (5), yaptıkları çalışmada teknik olarak radioizotop bir elementle (125I) işaretledikleri antijenleri kullanmışlar ve ayrıca immunoblotting ile aynı molekül ağırlığındaki protein bantlarını tespit etmişlerdir. *Moraxella* türleri ile yapılan çalışmalarda saptanan 55 ve 37 kDa ağırlığındaki proteinlerin immunojeniteye esas olduğu bildirilmektedir (5, 9). Bu çalışmada da, hem Türkiye hem de ABD orijinli suşlarda bu proteinlerin saptanması, *M. bovis* suşlarının immunojeniteye esas antijenik yapılarının aynı olduğunu ve aşı hazırlamada bu suşların kullanılabilirliğini gösterdi.

Çalışmada kullanılan ABD orijinli suşlar, antijenik olarak birbirlerine oldukça yakın bulundu. Bu suşlarda ortak olarak 32 protein bandı saptandı. Bu suşlarda ortak olan 22 ve 18 kDa ağırlığında iki protein bandı, Türkiye'deki IBK'lı sığırlardan izole edilen hemoliz ve hemaglutinasyon pozitif beş *M. bovis* suşunda saptanamadı. Bu farklılığına karşın, her iki ül-

keden izole suşlar arasında protein profilleri bakımından büyük bir benzerlik bulunmaktadır. Hemoliz ve hemaglutinasyon negatif *M. bovis* suşlarında, diğerlerinden farklı 4 protein bandı belirlendi. Farklı olan bu proteinlerin üç hemoliz ve hemaglutinasyon negatif suşta bulunması, hemolitik ve hemaglutinasyon pozitif suşlardan farklı antijenlere de sahip olduklarını göstermektedir. Bu konuda bildirilen bir çalışma olmadığından konuyu tartışmak mümkün olmadı.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Türkiye'de ve ABD'de IBK'lı sığırlardan izole edilen *M. bovis* suşlarının protein profillerinin birbirlerine yakın olduğunu ve bu suşların antijenik olarak benzerliklerini göstermektedir. İzolatların fiziksel karakterleri ile ortak antijenleri arasındaki immunolojik olarak homojenite derecesi aşı hazırlamada kullanılan suşların seçiminde önemlidir. Elde edilen sonuçlar, hayvanlarda önemli verim düşüklüğüne neden olan *M. bovis*'e karşı aşı hazırlanmasında, aşı suşlarının seçimine ışık tutacak niteliktedir.

Kaynaklar

1. Chandler, R.L., Baptista, P.J.H.P., Turfrey B. (1979). Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. J Comp Path, 89, 441-448.
2. Erdeğer, J. Aydın, N. (1989). Sığırlardan izole edilen *Moraxella bovis* suşlarının çeşitli özelliklerinin araştırılması. Doğa Tr J Vet and Animal Sci. 15, 140-147.
3. Gil-Turnes, C. (1983). Hemagglutination, autohemagglutination and pathogenicity of *Moraxella bovis* strains. Can J Comp Med, 47, 503-504.
4. Henson, J.B., Grumbles, L.C. (1960). Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Etiology. Amer J Vet Res, 21, 761-766.
5. Horsnell, J.M., Teale, C.M. (1987). Characterization of the outer membrane protein antigens of British field isolates of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol, 15, 181-189.
6. Jayappa, H.G., Lehr, C. (1986). Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. Amer J Vet Res, 47, 2217-2221.
7. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage J4. Nature, 227, 680-685.
8. Michell, P.O., Burrell, R.G. (1964). Serology of *Mima Herella* group and the genus *Moraxella*. J Bacteriol, 87, 900-907.
9. Ostle, A.G., Rosenbuch, R.F. (1986). Outer membrane protein antigens of *Moraxella bovis*. Amer J Vet Res, 7, 1419-1421.
10. Pugh, G.W., Hughes, D.E. (1968) Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *Moraxella bovis* infection: correlation of hemalytic ability and pathogenicity. Amer J Vet Res., 29, 835-839.
11. Punch, P.I., Slatler, D.H. (1984). A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Bull, 54, 193-207.
12. Sandhu, T.S., White, F.H. (1987) Infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Bull, 38, 349-360.
14. Wilcox, G.E. (1970) An examination of *Moraxella* and related Genera commonly isolated from the bovine eye. J Comp Pathol, 80, 65-74.