

Hypoderma bovis ve *Przhevalskiana silenus* Somatik Antijenlerinin SDS-PAGE ile Tanımlanması

Sami ŞİMŞEK, Armağan Erdem ÜTÜK, Ergün KÖROĞLU, Cem Ecmel ŞAKİ

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ

ÖZET: Bu çalışma, *Hypoderma bovis* ve *Przhevalskiana silenus*'un üçüncü dönem larvalarından elde edilen larval antijenleri sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezis (SDS-PAGE) metoduyla analiz etmek amacıyla yapılmıştır. SDS-PAGE deneyinde, %12'lik ayırıcı (separating) ve %5'lik toplayıcı (stacking) jel kullanılmıştır. Bu işlemin sonucunda *Hypoderma bovis*'in üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin, moleküler ağırlığı 6 ile 66 kDa arasında değişen 11 farklı polipeptid bandı oluşturduğu, *Przhevalskiana silenus*'un üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin ise moleküler ağırlığı 6 ile 100 kDa arasında değişen 19 farklı polipeptid bandı oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: SDS-PAGE, *Hypoderma bovis*, *Przhevalskiana silenus*

Determination of *Hypoderma bovis* and *Przhevalskiana silenus* Somatic Antigens using SDS-PAGE

SUMMARY: The aim of this study was to examine larval antigens obtained from the third instar larvae of *Hypoderma bovis* and *Przhevalskiana silenus* using the sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. SDS-PAGE separation was performed using 12% separation gel and 5% stacking gel. At the end of the SDS-PAGE examination, 11 and 19 different polypeptide bands were detected between 6-66 kDa and 6-100 kDa in the third instar larvae antigen of *H. bovis* and *P. silenus*, respectively.

Key Words: SDS-PAGE, *Hypoderma bovis*, *Przhevalskiana silenus*

GİRİŞ

Hypoderma bovis'in larval safhası sığırların paraziti olup, nadiren insan ve atlarda da görülebilmektedir. Sığır hypodermosisinin kuzey yarımküredeki birçok ülkede önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (11). Son yıllarda yapılan kontrol çalışmalarına rağmen (ilaçlama, steril sinek üretimi ve aşılama denemeleri) hastalık halen Amerika, Afrika ve Avrupa'da oldukça yaygındır (10). Türkiye'de ise sığır hypodermosisinin %5-68 (Kasım-Şubat) oranında yaygın olduğu bildirilmiştir (9, 13).

Hypoderma larvalarının varlığı, ilkbahar ve yaz aylarında sığırların sırt kısmının elle palpasyonu veya kesim sonrasında yapılan karkas muayenesiyle anlaşılmaktadır. Serolojik tanı amacıyla ise yaygın olarak ELISA kullanılırken son yıllarda Western blot testi de kullanım alanı bulmuştur (12, 15). Anti-hypoderma antikorları enfekte sığırlarda üçüncü dönem larvaların toprağa düşmesinden sonra yaklaşık 3-4 ay kadar kanda bulunmakta ve antikor seviyesi Kasım-Mart döneminde en üst

seviyeye çıkmaktadır. Bu nedenle serolojik testler için en uygun zamanın bu dönemler olduğu bildirilmiştir (3).

Keçi hypodermosisinin sığırlardaki gibi Türkiye'de ve diğer ülkelerde bir sorun olduğu bilinmektedir. *Przhevalskiana silenus*, keçilerde hypodermosisine neden olan önemli türlerden biri olup, ülkemizde özellikle kıl keçilerinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (8).

Hypodermosisde derinin en değerli kısmı olan sırt bölgesinde oluşan tahribat neticesinde önemli ekonomik kayıplar şekillenmektedir. Bunu önlemek amacıyla ya bütün hayvanlar, larvaların bacak ve karın bölgesinde bulunduğu Ekim-Kasım aylarında sistemik insektisitlerle ilaçlanmalı veya sadece enfekte hayvanlar erken dönemlerde serolojik testlerle tespit edilerek ilaçlanmalıdır. Hastalığın önlenmesindeki en ekonomik yol, enfekte olmadığı halde ilaçlanan hayvanlarda hem ilaç masrafı hem de oluşan ilaçlama stresini önlemek amacıyla serolojik testlerin yapılmasıdır (5, 12).

Protein yapısındaki antijenlerin analizinde elektroforetik yöntemlerin değişik modifikasyonları uygulanmaktadır. Bunların içerisinde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi; proteinlerin tanımlanmasında, karşılaşt

Geliş tarihi/Submission date: 25 Kasım/25 November 2004

Düzeltilme tarihi/Revision date: 14 Şubat/14 February 2005

Kabul tarihi/Accepted date: 28 Şubat/28 February 2005

Yazışma /Corresponding Author: Sami Şimşek

Tel: (+90) (424) 237 00 00 / 6454 Fax: (+90) (424) 238 81 73

E-mail: ssimsek@firat.edu.tr

tırılmasında ve sayısal olarak elde edilmesinde kullanılan, pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. SDS-PAGE, ayrıca özellikli tanı yöntemlerinin başında gelen Western blot'ın ilk aşaması olması bakımından da önem arz etmektedir (1, 2).

Bu çalışma ile *H. bovis* ve *P. silenus*'un üçüncü dönem larvalarından elde edilen larval antijenlerin SDS-PAGE ile tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

H. bovis ve *P. silenus* Üçüncü Dönem Larval Antijenlerinin

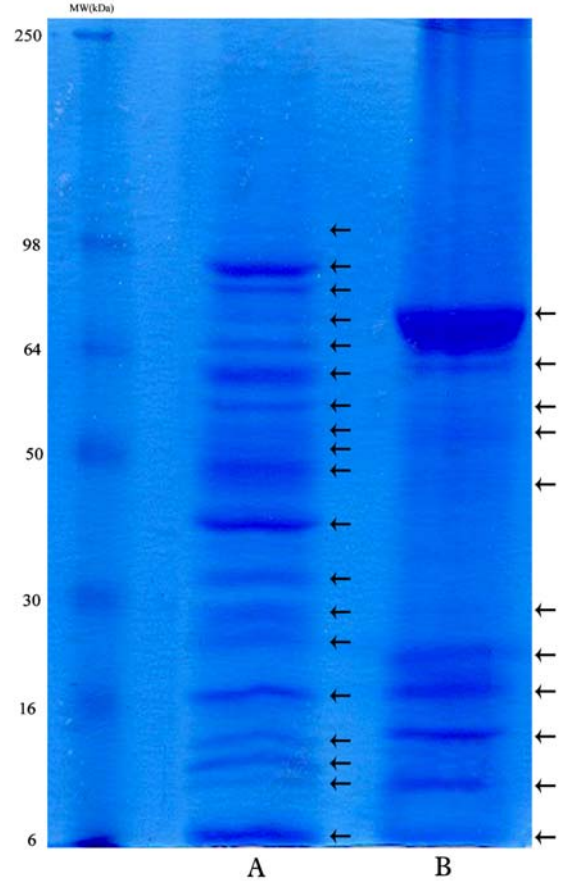
Elde Edilmesi: *H. bovis* ile doğal enfekte bir sığırdan sırt derisi altında bulunan üçüncü dönem larvalar, derinin parmak yardımıyla sıkılmasıyla dışarı çıkarılmış ve petrilere konularak laboratuvara ulaştırılmıştır. *P. silenus*'un üçüncü dönem larvaları ise bölgemizde bulunan yerel bir mezbahanedeki kesimi yapılan kıl keçilerinden, kesim takip edilerek sırt derisinin altından toplanmış ve petrilere konularak laboratuvara nakledilmiştir. Aynı ayrı kaplara konulan larvalar 4 kez 5'er dakika 0.01 M fosfat tamponu içinde oda ısısında yıkanmıştır. Daha sonra 0.1 M karbonat tamponu (pH=9.6) içinde elektrikli karıştırıcıda homojenize edilmiş (her larva için 2 ml) ve bir gece +4°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 16.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve *H. bovis* ve *P. silenus* antijeni içeren üstteki kısım ayrılarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır (12).

Polipeptid Analizi: *Hypoderma bovis* ve *P. silenus*'un üçüncü dönem larvalarından elde edilen larval antijenler %12'lik ayrıştırıcı (separating) ve %5'lik toplayıcı (stacking) jel sisteminde SDS-PAGE yöntemiyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Ayrıştırma amacıyla her bir antijen fraksiyonundan 15 µl alınıp 15 µl SDS örnek tamponu (50 mM Tris-Cl (pH=6.8), 100mM dithiothreitol, %2 SDS, %0.1 bromophenol blue, %10 glycerol) ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Ayrışan proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla da bir kuyucuğa moleküler ağırlık belirleyicisi (marker) (Oncogene Research Product, Prestained Protein Molecular Weight Markers, Cat No: MW03) konulmuş ve örnekler 200 V sabit akımda ayrışmaya tabi tutulmuştur. Yürütülen proteinler jelin dip kısmına ulaşınca akım kesilip jel çıkartılmış ve 30 dakika fizyasyon solusyonunda (%50 metanol, %10 glacial asetik asit, %40 distile su) bekletilmiştir. Bunu takiben %5 Coomassie mavisi (5 ml %1 coomassie mavisi, 20 ml %95'lik metanol, 5 ml glacial asetik asit, 20 ml distile su) ile bir gece oda ısısında boyanmıştır. Ertesi gün boya solusyonundan çıkarılan jel, bantlar belli olana kadar açma solusyonunda (% 30 metanol, %10 glacial asetik asit, %60 distile su) bekletilmiştir. Bantlar tamamen ortaya çıkınca bu solusyondan çıkarılan jel, tarayıcıdan geçirilip görüntüsü alınmıştır (7).

BULGULAR

Hypoderma bovis'in üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin SDS-PAGE yöntemiyle analizi ve coomassie mavisi ile yapılan boyaması neticesinde moleküler ağırlığı 6 ile 66

kDa arasında değişen 11 farklı polipeptid bandı tespit edilmiştir (Şekil 1B). Bu bantlar içerisinde 66 kDa'luk olanın en belirgin bant olduğu belirlenmiştir. *Przhevalskiana silenus*'un üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin aynı yöntemle analizi neticesinde ise moleküler ağırlığı 6 ile 100 kDa arasında değişen 19 farklı polipeptid bandı tespit edilmiştir (Şekil 1A).



Şekil 1. *Przhevalskiana silenus* (A) ve *Hypoderma bovis*'in (B) üçüncü dönem larval antijenlerinin protein bantları. (MW: Moleküler ağırlık markeri)

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar sığırlardaki hypodermosis etkenlerinin *H. bovis* ve *H. lineatum*, keçilerdekinin ise *P. silenus* olduğunu ortaya koymuştur (6). Önceleri farklı türler olarak bilinen *P. silenus*, *P. crossi* ve *P. aegagri*'nin (5), aslında tek tür olduğu yapılan filogenetik araştırmalar ile belirlenmiştir (6). Türkiye'de de sığır ve keçilerde oldukça yaygın olan bu iki türün önemli ekonomik kayıplara (et ve süt verimi kaybı, deri kaybı, ilaç masrafları vs.) yol açtığı bildirilmektedir (13).

Hypoderma bovis, *H. lineatum* ve *H. sinense*'nin üçüncü dönem larval proteinlerinin SDS-PAGE ile analizinde *H. bovis* ile *H. sinense*'nin birbirine yakın olduğu, *H. lineatum*'un ise bun-

lardan farklı olduğu bildirilmiş ancak çalışmada birinci dönem larval yapı ile ilgili bir veriye rastlanmamıştır (4).

Hypoderma bovis'in birinci dönem larvasından hazırlanan Hypodermin A antijeninin elektroforetik analizinde elde edilen 22-24 kDa'luk bantların antijenik özelliğinin yüksek olduğu yapılan Western blotting uygulamasıyla ortaya konulmuştur (14).

Bu çalışmada da *H.bovis* üçüncü dönem larvalarından elde edilen antijenin SDS-PAGE ile analizinde tespit edilen en belirgin bant 66 kDa olup, 22-24 kDa'luk bantlar da belirgin olarak elde edilmiştir.

Bu çalışma, yapılan araştırmalar neticesinde ortak antijenik epitoplarının olduğu belirlenen *Hypoderma* sp. ve *P.silenus*'un (6) üçüncü dönem larvalarının antijenik analizinin yapıldığı bir ön çalışma olup, adı geçen parazitlerin birinci dönem larvalarının elde edilip özellikle Hypodermin C antijeninin purifikasyonu ve hypodermosisin serolojik tanısında kullanılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Altıntaş N, 1991. SDS-Polyacrilamide gel elektroforezi ile proteinlerin separasyonu. *T Parazit Derg*, 15 (2): 119-129.
2. Altıntaş N, Yolasığmaz A, 1997. Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE. Özcel MA, Altıntaş N. ed. *Parazit Hastalıklarında Tanı*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15. İzmir. s.321-341.
3. Boulard C, 1975. Evolution des anticorps circulants chez les bovins traités contre l'hypodermose. *Ann Rech Veter*, 6:143-154.
4. Huang XB, Jiang XS, SongYJ, He SM, Yang XN, Yang RHX, Luo XL, 1997. Comparison of protein electrophoresis and acid phosphatase, alkaline phosphatase activities of the third period larvae of *H.bovis*, *H.lineatum*, and *H.sinensis*. Proceedings of the Second Int Cong of Yak, Xining, P.R. China, 1-6 September, 251-252.
5. Mimioglu M, 1973. *Veteriner ve Tıbbi Arthropodoloji*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 295, Ankara.
6. Otranto D, Stevens JR, 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int J Parasitol*, 32:1345-1360.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. Molecular cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, New York, USA.
8. Sayın F, Meriç İ, Köseoğlu H, Dinçer Ş, Güler S, 1976. Ankara keçisi hypodermosisi ile ilgili savaş metotları üzerinde araştırmalar. *FÜ Vet Fak Derg*, 3 (1):1-18.
9. Sayın F, Kalkan A, Karaer Z, 2000. Türkiye'de sığır hypodermosisi üzerine epidemiyolojik araştırmalar. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 4 (1): 115-127.
10. Scholl PJ, 1993. Biology and control of cattle grub. *Ann Rev Entomol*, 15: 360-365.
11. Soulsby EJJ, 1982. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Seventh Ed., Bailliere and Tindall, London.
12. Webster KA, Giles M, Dawson C, 1997. A competitive ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. *Vet Parasitol*, 68: 155-164.
13. Zeybek H, 1988. Ankara yöresi sığır ve tiftik keçilerinde *Hypoderma* spp. (nokra)'nın yayılışı. *Etlik Vet Mikrob Derg*, 6(2): 45-56.
14. Ziomko I, Cencek T, 2001. Development of the ELISA kit for the detection of *Hypoderma bovis* antibodies in cattle. I. Development of components. *Wiad Parazyt*, 47(3): 497-503.
15. Ziomko I, Cencek T, 2001. ELISA kit for the detection of *Hypoderma bovis* antibodies in cattle. *Bull Vet Inst Pulawy*, 45(2): 205-210.