Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پنجم ، شمـاره ۱ ، صـفحه ۷-۱ (شهریور ۱۳۸۱)

تولید کلون ابراز کننده ژن گلیکو پروتئین G ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی

کیوان زندی[۱] ، دکتر محمد حسن روستایی [۲*]، دکتر مجید صادقی‌زاده[۳] ، دکتر محمد جواد رسایی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] دانشیار ویروس‌شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استادیار بیولوژی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
[۴] دانشیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

ویـروس هـرپس سیمپلکس تیپ یک انسان *(HSV_I)* عامل بروز تبخال در صورت، بویژه اطراف لب ها است که گاهی در دستگاه تناسلی نیز باعـث بـروز بـیماری مـی‌شود. این ویروس از عوامل مهم بروز کرائیت و آنسفالیت نیز می‌باشد. با توجه به وجود شباهت زیاد که بین سکانس نوکلئوتیدهای ژنوم این ویروس و ویروس هرپس انسانی تیپ ۲ که عمدتاً در دستگاه تناسلی ایجاد بیماری می‌نماید، برخی از آنتی‌ژنهای سطحی این دو ویروس شبیه به هم هستند و در نتیجه باعث بروز واکنشهای متقاطع در آزمایشهای سرم‌شناسی می‌شوند. آزمایشها نشان داده‌اند که قرابت آنتـی‌ژنیکی بین گلیکو پروتئین *G* این دو ویروس بسیار اندک است و به همین دلیل از این پروتئین می توان به عنوان آنتی‌ژن ویژه *HSV-1* در روشهای سرولوژیک بهره گرفت. در این پژوهش از ناقل *pAcgG-1* که حامل ژن گلیکو پروتئین *G(gG)* ویروس هرپس شماره یک انسان بود استفاده شد. پس از تکثیر ناقل در میزبان مربوط، *DNA* آن استخراج و تخلیص شد. سپس با بهره‌گیری از هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودگر *BamHI*، ژن *gG* از ناقل جدا و خالص گردید. در مرحله بعد این ژن در ژنوم یک ناقل ابراز کننده مناسب به نام *pTrc His2A* جایـسازی و کلـون مورد نیاز تهیه شد. ترانسفورم کردن میزبان مربوطه با این کلون نشان داد که ژن *gG* در محل صحیح در ناقل ابراز کننده جای سازی شده بـود. در آخریـن مـرحله اقـدام بـه بررسی مسیر ژن جای‌سازی شده در ناقل ابراز کننده گردید و کلون‌های حاوی ژن جای‌سازی شده در مسیر صحیح برای پژوهشهای بعد در راستای تولید پروتئین مربوطه انتخاب، تکثیر و خالص گردید.

واژگان کلیدی : گلیکو پروتئین *G*، *HSV-1*، کلون ابراز کننده، ژن

تهران دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده پزشکی بخش ویروس شناسی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسان (*HSV-1*) باعث پیدایش جراحات در مخاط دهان انسان می‌شود. این ویروس در سراسر گیتی گسترش دارد و پس از عفونت اولیه در افراد، در عقده‌های عصبی تریژمینال به صورت خفته در می‌آید. تحریک‌های مختلف می‌تواند باعث فعالیت مجدد ویروس خفته و عود بیماری شود (۱).

این ویروس دارای حداقل ۱۱ گلیکوپروتئین است که در پوشش لیپو پروتئینی آن جای‌سازی شده است. ویروس از این گلیکو پروتئین‌ها به منظور اتصال به رسپتورهای سطح یاخته‌های میزبان و الحاق پوشش خود با پرده سیتوپلاسم سلول و در نتیجه ورود به آن استفاده می‌کند (۲). ورود ویروس به بدن باعث القاء ایمنی با واسطه آنتی‌بادی و ایمنی با واسطه یاخته در بدن شخص مبتلا علیه این گلیکو پروتئین‌ها می‌شود. پاسخ ایمنی راه‌اندازی شده، می‌تواند شخص را در برابر *HSV-1* محافظت کند (۳). در طول عفونت، آنتی بادی‌های خنثی‌کننده می‌توانند ذرات ویروس آزاد را غیر فعال سازند، ولی نمی‌توانند از عفونتهای داخل یاخته‌ای جلوگیری کنند. بعلاوه، کارهای انجام شده نشان داده است که آنتی بادی‌ها در محل عفونت مخاطی برای پیشگیری از هجوم ویروس کافی نمی‌باشد و بنابراین ایمنی با واسطه یاخته به عنوان عامل اصلی در کنترل عفونت *HSV-1* مورد استفاده بدن قرار می‌گیرد(۳). تیپ دو این ویروس (*HSV-2*) عامل بیماری مخاط دستگاه تناسلی انسان است و معمولاً در عقده‌های ساکرال به صورت خفته در می‌آید. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و تیپ دو از نظر ژنتیکی بسیار شبیه هم هستند و به همین دلیل نیز واکنش متقاطع آنتی ژنیکی بین این دو ویروس گسترده است (٤). این واکنش متقاطع باعث شده است تا بسیاری از آزمایشات سرولوژیک فعلی قادر به تفکیک کامل این دو ویروس نباشند. با توجه به اینکه گلیکو پروتئین *G-1* (*gG-1*) در *HSV-1* (۵ و ٦) و گلیکو پروتئین *G-2* (*gG_2*) در *HSV-2* (۷و۸) هر کدام ویژه تیپ ویروس مربوطه می‌باشند. بنابراین روشهای دقیق سرولوژیک با بهره‌گیری از گلیکوپروتئینها، به منظور تشخیص صحیح ویروسهای هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ و آنتی بادیهای ضد آنها، راه‌اندازی شده است (۱۱-۹).

از روشهای الیزای غیر مستقیم و وسترن بلات برای نشان دادن آنتی بادیهای اختصاصی *IgM* و *IgG* علیه *gG1* و *gG2* استفاده شده و نتایج خوبی نیز بدست آمده است (۱۲ و ۱۳). آزمایشهایی که با استفاده از آنتی بادی‌های خالص شده ضد *gG-1* انجام شده است نشان می‌دهد که در برابر آنتی ژن *gG-2* هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند (۱۳). پژوهشهایی که از قبل در گروه ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است نشان می‌دهد، آلودگی به ویروسهای هرپس سیمپلکس تیپ یک و دو در ایران وجود دارد (١٤). با توجه به اینکه اکثر روشهای به کار گرفته شده در ایران برای تمایز بین دو ویروس نتیجه قطعی به دست نمی‌دهند، بنابراین سعی گردید تا در این پژوهش اقدام به تولید گلیکوپروتئین *G* ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، با استفاده از روش نو ترکیبی *DNA* شود، تا با استفاده از آن بتوان با قاطعیت بیشتری نسبت به نتایج آزمایشهای سرولوژیک مربوط به این ویروس قضاوت کرد.

مواد و روشها

ناقل حاوی ژن gG - 1:

این کلون متشکل از ناقل *pAc)Ac)* و ژن مربوط به گلیکوپروتئین *G* ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (*gG-1*) است و به *pAcgG-1* نشان داده می‌شود ، از آقای پروفسور غیاثی از *UCLA* آمریکا دریافت شد. این کلون حاوی دو محل برای اثر آنزیم *BamHI* که در دو پایانه ژن فوق تعبیه شده، و ژن ایجاد مقاومت برابر آمپی‌سیلین است (۱۵).

یاخته‌های باکتری:

در این پژوهش از سویه *DH5a* باکتری *E. coli*

www.SID.ir

Archive of SID

که میزبان مناسبی برای تکثیر کلون است استفاده شد.

ناقل ابراز کننده (Expression vector)

برای ابراز ژن *G-1* از ناقل *pTrc His2A* استفاده شد.

ابتدا با استفاده از یک کلونی منفرد از باکتری میزبان و تکثیرآن در محیط کشت *L.B (Louri broth)* فاقد آمپی‌سیلین، کشت کافی از آن تهیه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از این کشت در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه *L.B* فاقد آمپی‌سیلین به مدت ۲ تا ٤ ساعت کشت داده شد. در مرحله بعد مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از این کشت در چهار لوله سرد استریل تقسیم و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در یخ قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ محتویات لوله ها در ٦۰۰۰ دور در دقیقه، رسوب باکتریها در ۱۰ میلی لیتر محلول ۵۰ میلی مولار *CaCl2* استریل و سرد تعلیق و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ قرار داده شد. با سانتریفیوژ دوباره سوسپانسیون باکتریها، با روش بالا، رسوب آنها در ۳/٤ میلی لیتر از محلول استریل و سرد *CaCl2* ۵۰ میلی مولار تعلیق گردید و به آن ٦۰۰ میکرو لیتر گلیسرول استریل اضافه گردید. تعلیق باکتریهای فوق در ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از این یاخته‌ها به عنوان باکتری مستعد *(Competent bacteria)* برای زیاد کردن ناقلهای مورد نیاز استفاده شد.

برای زیاد کردن ناقل حاوی ژن مربوط، ابتدا مقدار ۲ تا ۳ میکرولیتر از *pAcgG-1* به ۵۰ میکرولیتر از تعلیق باکتری مستعد شده اضافه و بلافاصله به مدت ۲ دقیقه در حمام ٤۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس بلافاصله به ظرف حاوی یخ انتقال داده و به مدت ۲ دقیقه در آن نگهداری گردید. تعلیق باکتری ترانسفرم شده با روش بالا، در ۱ میلی لیتر محیط کشت *L.B* فاقد آمپی‌سیلین کشت شد و به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در حمام ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ٤ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده در محیط کشت *L.B Agar* واجد آمپی‌سیلین کشت داده و مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از هر کدام از کلونی‌های باکتری به طور مجزا در محیط کشت L.B حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شده و با روش *Minipreparation* ناقل‌های مربوط به کشت هر کلونی جدا گردید و پس از هضم با آنزیم محدودگر *BamHI* با الکتروفورز در آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت (۱٦).

تولید مقادیر فراوان از ناقل حاوی ژن:

برای این کار ابتدا ۳۰۰ میلی لیتر از باکتری میزبان، حاوی ناقل *pAcg G-1* به طور شبانه کشت داده شد. سپس با استفاده از روش سامبروک و راسل اقدام به جداسازی و تخلیص ناقل شد (۱٦).

انتقال ژن gG-1 به داخل ناقل ابراز کننده:

برای این کار ابتدا مقدار کافی از *pAcgG-1* و *pTrc His2A* به طور مجزا تولید و خالص شدند. سپس با استفاده از آنزیم *BamHI* اقدام به هضم کلون و خارج‌سازی ژن *gG-1* گردید. برای خارج کردن ژن مورد نظر از ژل آگارز از پودر سدیم ٦ مولار و ذرات *Glass Milk* استفاده شد. ناقل ابراز کننده نیز با آنزیم فوق هضم گردید و برای پیشگیری از تشکیل پیوندهای بازی بین پایانه‌های تک رشته‌ای حاصل از هضم ناقل ابراز کننده (*pTrc His2A*) با آنزیم *BamHI*، نیاز بود تا اقدام به حذف گروه فسفات در دو پایانه‌آزاد آن شود. این کار با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز روده گوساله *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)* انجام شد. سپس به نسبت ۳ به یک از ژن به ناقل ابراز کننده اضافه و با بهره‌گیری از آنزیم *DNA T4 Ligase* اقدام به جایسازی ژن مورد نظر در داخل ناقل ابرازکننده شد. این عمل به مدت یک شب در ۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محصول حاصل از جایسازی *(Ligation)* ژن در ناقل ابراز کننده، به داخل باکتری میزبان انتقال داده شد. باکتریهای ترانسفرم شده در محیط کشت *L.B Agar* حاوی آمپی سیلین کشت داده شد، و بر روی کلونهای حاصل از آن، عمل جداسازی و خالص‌سازی ناقل انجام پذیرفت. سپس

www.SID.ir

Archive of SID

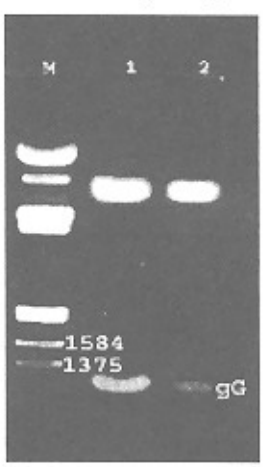
توسط هضم با آنزیم *BamHI* حضور ژن *gG-1* در ناقل ابراز کننده به اثبات رسید.

بررسی مسیر ژن جای‌سازی شده در ناقل ابراز کننده:

برای این کار با توجه به نقشه ژنتیکی ناقل و ژن مورد نظر، از آنزیم محدودگر *NarI* استفاده و ناقلین ابراز کننده‌ای که حاوی ژن مورد نظر در راستای صحیح بودند، پس از هضم آنزیمی، و با توجه به الگوی الکتروفورتیک بر روی ژل اکریل آمید که بسیار حساس‌تر از آگارز می‌باشد شناسایی شده تا برای مطالعات بعدی در راستای تولید پروتئین مربوطه بکار گرفته شوند.

نتایج

نتایج حاصل از ترانسفرم کردن سویه *DH5a* باکتری *E. coil* با کلون *pAcgG-1* نشان داد که این کلون در باکتریهای میزبان همانندسازی شد و بعلت ابراز ژن ایجاد مقاومت در برابر آمپی‌سیلین، زمینه رشد و تکثیر باکتریهای ترانسفرم شده در حضور آمپی‌سیلی را، در مقایسه با باکتریهای شاهد فاقد ناقل فراهم ساخت. هضم کلون *pAcgG-1* با آنزیم *BamHI* و الکتروفورز محصول به دست آمده نشان داد که این کلون واجد قطعه ۱۰۴۳ جفت نوکلئوتیدی مربوط به ژن gG-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بود(شکل ۱).



شکل ۱) M : استاندارد وزن مولکولی، ۱و۲ : pAcgG_1 هضم شده با آنزیم *BamHI*

با توجه به اینکه ناقل ابراز کننده نیز توسط *BamHI* هضم گردید بنابراین واکنش Self Ligation باعث تشکیل مجدد DNA حلقوی می‌شد، لذا از آلکالین فسفاتاز روده گوساله استفاده و دو پایانه ناقل ابراز کننده هضم شد تا از حلقوی شدن مجدد آن جلوگیری شود. نتایج به دست آمده نشان داد که روش به کار گرفته شده برای CIP کردن ناقلهای ابراز کننده با موفقیت توأم بود.

همچنین نتایج به دست آمده از استخراج ژن gG-1 از ژل آگارز نیز با موفقیت روبرو بود (شکل ۲)

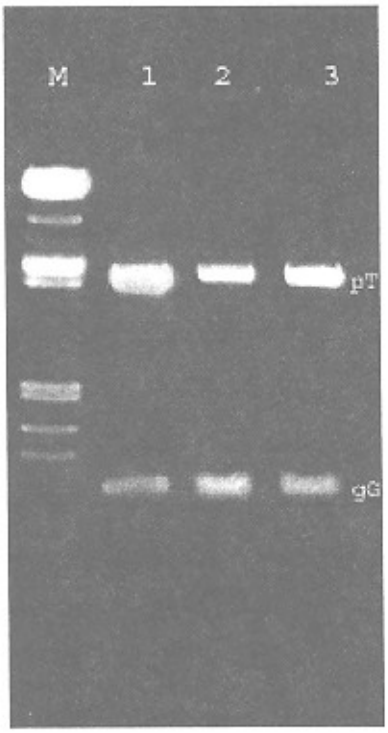
شکل ۲) استاندارد وزن مولکولی ، ۱ : pAcgG-1 هضم شده با آنزیم *BamHI* ، ۲: ارزیابی gG-1 استخراج شده از ژل اگارز

نتیجه حاصل از قرارگیری ژن در ناقل ابرازکننده *(Ligation)* با ترانسفرم کردن باکتریهای میزبان مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه باکتریهای ترانسفرم شده توانستند در محیط *L.B Agar* که حاوی آمپی‌سیلین بود تشکیل کلونیهای اختصاصی می‌دهند . حال آنکه باکتریهای شاهد فاقد ناقل در چنین محیطی رشد نکردند، بنابراین این نتیجه احتمالی بدست آمد که عمل قرارگیری ژن در ناقل و ترانسفورم شدن باکتریها بدرستی انجام شده بود.

در ادامه برای حصول اطمینان از صحیح بودن عمل فوق، کلونی های فوق تحت عمل *Minipreparation* قرار گرفتند و ناقلهای استخراج شده با آنزیم *BamHI* مورد هضم قرار گرفتند. نتایج حاصل از هضم مذکور با الکتروفورز بر روی ژل آگارز مؤید این نکته بود که قرارگیری ژن در ناقل صورت گرفته است (شکل ۳).

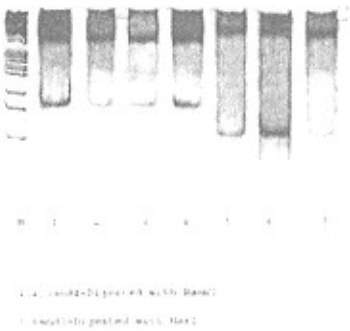
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: M: استاندارد وزن مولکولی، ۱ و ۲ و ۳: ناقلین ابراز کننده واجد ژن پس از هضم با آنزیم *BamHI*

با توجه به اینکه برای هضم ناقل ابراز کننده فقط از آنزیم *BamHI* استفاده شد و از طرفی همین آنزیم نیز برای خارج‌سازی ژن از کلون مربوط مورد استفاده قرار گرفت بنابراین ۵۰ درصد احتمال داشت که ژن در مسیر مخالف (*Wrong orientation*) در داخل ناقل ابرازکننده جای‌سازی شود. لذا از کلونی های مختلفی که در مرحله قبل وجود ژن در آنها اثبات شده بود ابتدا توسط روش *Minipreparation* ناقلین ژن استخراج و تخلیص گردیدند و سپس این ناقلین با آنزیم *NarI*، که دارای یک محل اثر در ناقل و یک محل اثر در داخل ژن می‌باشد هضم گردیدند و الکتروفورز محصول جدید بر روی ژل آکریل آمید نشان داد که برخی از کلونها واجد ژن گلیکو پروتئین *G* در مسیر صحیح هستند (شکل ٤).



شکل ٤: M: استاندارد وزن مولکولی، ۱و۲و۳ و ٤: نمونه‌های هضم شده با *BamHI*، ٥ و ٦ و ۷: نمونه‌های هضم شده با NarI دارای ژن gG-1 در راستای صحیح

بحث

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو از اعضاء خانواده هرپس ویریده، زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه، جنس سیمپل ویروس می‌باشند. ویژگی‌های این ویروس‌ها داشتن یک چرخه تکثیری کوتاه مدت ۱۸ تا ٢٤ ساعت است که منجر به مرگ یاخته میزبان می‌شود. انسان تنها میزبان این ویروسها می‌باشد و به همین دلیل است که این ویروسها در بدن انسانها به صورت خفته در می‌آیند تا بتوانند به بقایشان در طبیعت ادامه دهند. ژنومهای این دو ویروس حدود ۵۰ درصد با هم شباهت دارند ولی از نظر بیولوژیکی و آنتی‌ژنیکی متفاوت هستند. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک باعث پیدایش تبخال در صورت و ایجاد عفونت در چشم و مغز می‌شود حال آنکه تیپ دو این ویروس بیشتر در دستگاه تناسلی ایجاد بیماری می‌کند و میتواند در نوزادان نیز تورم مغز ایجاد کند (۱۷).

ویروسهای هرپس سیمپلکس دارای حداقل ۱۱ گلیکو پروتئین هستند که در پوشینه لیپوپروتئینی آنها جایسازی شده‌اند، و برای اتصال ویروس به گیرنده‌های اختصاصی موجود درسطح یاخته‌های میزبان و ورود به آنها، و همچنین انتشار ویروس از یاخته‌های آلوده به یاخته‌های سالم مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به شباهت حدود ۵۰ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

که بین ژنوم *HSV-1* و *HSV-2* وجود دارد، استفاده از روشهای سرولوژیک برای تمایز دادن این دو ویروس با مشکلاتی روبرو است. از بین گلیکو پروتئینهای یازده‌گانه سطح هر کدام از این دو ویروس، مهمترین گلیکوپروتئینی که می‌تواند به طور انحصاری باعث القاء پاسخ یاخته‌های *B* در برابر هر کدام از دو ویروس به طور مجزا شود گلیکوپروتئین *G* است. گلیکوپروتئین *G* در *HSV-1* دارای ۲۳۸ اسید آمینه است و بعنوان یک آنتی‌ژن ویژه تیپ برای انجام کارهای سرولوژیک پیشنهاد شده است (۱۸ و ۱۹)، و اخیراً به صورت تجاری و برای انجام روش الیزا به بازار عرضه شده است (۲۰). در عین حال گلیکوپروتئین *G* مربوط به *HSV-2* نیز بعنوان آنتی‌ژن اختصاصی تیپ مورد استفاده قرار گرفته است (۹،۱۲و۲۱). هر کدام از این گلیکوپروتئین‌ها شامل اپی توپهای ویژه تیپ ویروس هستند.

در این پژوهش سعی شد تا با انتقال ژن مربوط به *gG-1* از کلون *pAcgG-1* که حاوی این ژن است و توسط آقای پرفسور غیاثی در *UCLA* آمریکا ساخته شده بود، به یک ناقل ابراز کننده که *pTrc His2A* بود، اقدام به ساخت کلونی شود که توانایی تولید مقدار زیاد از فرآورده ژن *gG 1* را داشته باشد. با توجه به اینکه در دو پایانه ژن فوق محل اثر آنزیم *BamHI* تعبیه شده بود، و از طرفی در پایین دست پروموتری که در ناقل ابراز کننده وجود داشت چنین محلی بود بنابراین از آنزیم فوق برای جداسازی ژن از کلون حاوی آن و انتقالش به پایین دست پروموتر یاد شده در بالا استفاده گردید. با توجه به اینکه برای هضم ناقل ابراز کننده نیز از آنزیم *BamHI* استفاده شد، بنابراین احتمال اینکه پایانه‌های چسبیده حاصل از این هضم دو مرتبه بایکدیگر پیوند خورده و تشکیل ناقل حلقوی را بدهند، زیاد است. برای پیشگیری از تشکیل پیوندهای فوق لازم بود تا با استفاده از آنزیم فسفاتاز اقدام به حذف گروه فسفر از پایانه‌های ناقل هضم شده شود. این کار با آنزیم آلکالین فسفاتاز روده گوساله انجام شد. در این پژوهش برای هر میکروگرم *DNA* ناقل یک واحد آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مصرف شد که نتیجه مطلوب داشت. در این پژوهش نشان داده شد که برای جای‌سازی ژن مورد نظر در داخل ناقل ابراز کننده بهترین شرایط، استفاده از یک واحد آنزیم *T_4 DNA Ligase* برای یک میکروگرم *DNA* و انکوباسیون در ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب بود. نتایج حاصل از این پژوهش تولید یک کلون از ناقل ابراز کننده واجد ژن *Gg-1* از *HSV-1* بود که این ژن را با داشتن مسیر صحیح برای ابراز شدن در خود جای داد. آزمایشهای اولیه نشان داد که با استفاده از این کلون میتوان پروتئین مربوطه را تولید کرد.

REFERENCES:

1. Rogers JV, Hull BE, Fink PS, et al. Murine response to DNA encoding herpes simplex virus Type–1 glycoprotein D targeted the liver. Vaccine 2000; 18: 1522-30.

2. Oravcov A, Kudelova M, Bystricka M, et al. Charecterization of glycoprotein C of HSZP strain of herpes simplexvirus1. Acta Virologica 2000; 44: 99-108.

3. Flo J, Perez AB, Tisminetzky S, Baralle F . Superiority of intramuscular route and full length glycoprotein D for vaccination against herpes simplex 2. Enhancement of protection by the co-delivery of the GM-CSF gene. Vaccine 2000; 18: 3242-53.

4. Martinez DS, Pellett PE. Expression of HSV–1 and HSV-2 glycoprotein G in insect cells by using a

www.SID.ir

Archive of SID

novel baculovirus expression vector. Virolgy 1991; 182: 229-38.

5. Ackerman M, Longnecker R, Roizman B, et al. Identification, properties and location of a novel glycoprotein by herpes simplex virus 1. Virology 1986; 150: 207-20.

6. Richman DD, Buckmaster A, Bell S, et al. Identification of glycoprotein of herpes simplex virus type 1 and genetic mapping of gene that codes for it. Virology 1986; 57: 647-55.

7. Rouizman B, Norrils B, Chan C, et al. Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type counterpart. Virology 1984; 133: 242-47.

8. Marsden HS, Buckmaster A, Palfreman JW, et al. Charecterization of the 92000 dalton glycoprotein induced by herpes simplex virus type 2. J Virol 1998 ; 50: 547-54.

9. Lee FK, Coleman RM, Pereira L, Detection of herpes simplex virus type 2 – specific antibody with glycoprotein G. J Clin Microbiol 1985; 22: 641-44.

10. Nahmias AJ.Lee FK, Pereira L, et al. Monoclonal antibody immunoaffinity purified glycoprotein for the detection of herpes simplex type 1 and 2 specifc antibody in serum. In: Lopez C, Roizman B. Human herpes virus infections. 1st ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1986, 203-10.

11. Ashley RI, Militoni J. Lee FK, et al. Comparison of western blot (Immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera. J Clin Microbiol 1988; 26: 662-67.

12. Ho DWT, Field PR, Sjorgen – Jansson E. et al. Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G(gG-2). Virological Methods 1992; 36: 249-64.

13. Tunback P, Liljeqvist JA, Lowenhagen GB, et al. Glycoprotein G of herpes simplex virus type 1: identification of specific epitopes by human antibodies. J Gen Virology 2000; 23: 1033-40.

۱۴. ضیائیان م، بررسی عفونت هرپس ویروسهای انسانی تیپ ۱ و ۲ در بانوان باردار سه منطقه از تهران، پایان‌نامه، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۷.

15. Ghiasi H, Kaiwar R, Nesburn AB, et al. Baculovirus expressed glycoprotein G of herpes simplex virus type 1 partially protects vaccinated mice against lethal HSV-1 challenge. Virology 1992; 190: 233-9.

16. Sambrook J. Fritsch E.F, Miniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed. Philadelphia: Cold Spring Hardor Laboratory Press, 1989, 56.

17. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR. Principles and practice of clinical virology. 4 th Ed. California: John Wiley and Sons LTD, 2000, 202-50.

18. Lee EK, Pereara L, Criffim C, et al. A novel glycoprotein for virological methods. J Virol Methods 1986; 14: 111-15.

19. Sinchez – Mirtinez D, Schmi DS, Whittington W, et al. Evaluation of test best on baculovilus-expressed glycoprotein G for detection of herpes simplex virus type – specific antibodies. J Infect Dis 1991; 164: 1196-99.

20. Ashley RL, Wul L, Pickering JW, et al. Premarket evaluation of a commerciel glycoprotein G – based enzyme immunoassay for herpes simplex virus type specific antiboies. J Clin Microbiol 1998; 36: 294-95.

21. Svenerholm B, Olofasson S, Jeansson S, et al. Herpes simplex virus type – selective enzyme linked immnosorbent assay with helix pomatia lectin purified antigens. J Clin Microbiol 1984; 19: 26-29.

www.SID.ir