Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال ششم، شماره ۱، صفحه ۷-۱ (شهریور ۱۳۸۲)

ارزیابی واکسن DNA ترکیبی حاوی ژن گلیکوپروتئین‌های نوترکیب B-1 و D-1 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

محمد آقاابراهیمیان[۱]، دکتر محمدحسن روستایی[۲*]، دکتر حوریه سلیمانجاهی[۳]، دکتر کیوان زندی[۴]

[۱] کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] استاد گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۴] استادیار ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

چکیده:

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی (HSV-1) عامل ایجاد بیماری‌های مهمی در انسان می‌باشد. با توجه به افزایش شیوع ویروس هرپس در جامعه و ظهور مستمر سویه‌های جدید مقاوم به درمانهای جاری، لازم است تا برای پیشگیری از ابتلاء افراد حساس و بروز بیماری در آنها اقدام به تولید یک واکسن مؤثر شود. برای این کار واکسنهای متفاوتی تولید شده‌اند که واکسنهای حاوی DNA از جمله کاندیداهای مناسب برای این مقصود می‌باشند. در این پژوهش با استفاده از کلونهای حاوی ژن کد کننده گلیکوپروتئینD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (pcDNA3-gD-1) یا ژن کد کننده گلیکوپروتئین B این ویروس (pcDNA3-gB-1) و با ترکیبی از این دو کلون اقدام به ایمن‌سازی موشهای BALB/c حساس و سپس ارزیابی پاسخ ایمنی موشها شد. برای این کار سه گروه از موشهای BALB/c به ترتیب با: pcDNA3-gD-1 یا pcDNA3-gB-1 ، یا ترکیبی از این دو کلون مورد تلقیح قرار گرفتند. هر گروه مجموعاً ۳ بار و هر بار به فاصله ۲۱ روز با کلونهای مربوط تلقیح شدند و قبل و بعد از هر تزریق از آنها خونگیری به عمل آمد. ضمناً به یک گروه مجزا از موشها به عنوان شاهد مثبت، سویه استاندارد KOS از ویروس هرپس تیپ یک (HSV-1) تزریق شد، حال آنکه به دو گروه مجزا نیز که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بودند به ترتیب PBS و پلاسمید فاقد ژن تلقیح شد. بیست و یک روز پس از آخرین تزریق، موشهای مربوط به گروههای ٦ گانه با تزریق ویروس وحشیHSV-1 مورد چالش قرار گرفتند. ضمناً آزمایش خنثی سازی 100 $TCID_{50}$ ویروس هرپس با رقتهای دو برابر از هر کدام از نمونه خونهای تهیه شده انجام پذیرفت. یافته‌های به دست آمده از این پژوهش بیانگر این است که کلونهای فوق بتنهایی و یا به طور توام توانستند سیستم ایمنی موشها را تحریک و ضمن ایجاد آنتی‌بادی خنثی کننده ویروس حاد در آنها، باعث پیدایش مقاومت در موشها برابر ویروس چالش شوند. تولید آنتی‌بادی پس از سومین تزریق به حداکثر مقدار خود رسید. موشهایی که به آنها ترکیبی از دو کلون تلقیح شده بود دارای عیار بالاتری از آنتی‌بادیهای خنثی کننده ویروس در مقایسه با دو گروهی که فقط یک کلون به آنها تزریق شده بود شدند، در حالی که در گروههای شاهد منفی آنتی‌بادی تولید نشد. در عین حال موشهای واکسینه در مقایسه با موشهای شاهد منفی توانستند مقاومت واضحی علیه ویروس چالش نشان دهند.

واژگان کلیدی :واکسن، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، گلیکوپروتئین BوD، کلون pcDNA3-gD-1، کلون pcDNA3-gB-1

*تهران - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱۵

تلفن: ۸۰۱۱۰۰۱-۳۵۸۱، نمابر: ۸۰۱۳۰۳۰، پست الکترونیک : rustaimh @ modares. ac. ir

Archive of SID

مقدمه:

ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک HSV-1 و HSV-2 باعث طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی می‌شوند که شامل عفونت‌های سیستمیک در نوزادان و افراد دارای ایمنی ناقص، عفونت‌های موضعی مانند استوماتیت التهاب قرنیه، عفونت در ارگان‌های تناسلی(Genitalis)، انسفالیت و عفونت‌های احشایی در میزبان با ایمنی سازشکار Immunocompromisedمی‌باشد(۳-۱). هر دو ویروس فوق توانایی منحصر به فردی در ایجاد خفتگی پس از عفونت اولیه در گانگلیون‌های افراد آلوده دارند. بنابراین همیشه این افراد در معرض خطر بیماری راجعه قرار دارند. علیرغم کوشش بسیار طی سالیان متمادی، واکسن پیشگیری کننده مؤثری علیه عفونت‌های HSV وجود ندارد (٤). مطالعات اخیر حکایت از آن دارد که ایمنی هومورال Humoral Iimmunity (HMI) و ایمنی با واسطه سلولی Cell Mediated Iimmunity (CMI) از جمله مکانیسم‌های ایمنی مربوط به کنترل بیماری HSV هستند(٥).

گرچه واکسن ویروس زنده تخفیف حدت یافته (Live attenuated virus vaccine) می‌تواند HMI و CMI را القاء کند ولی نگرانیهایی در مورد مصرف این واکسن وجود دارد که از آن جمله می‌توان به توانایی ویروس واکسن در ایجاد خفتگی، فعال شدن مجدد یا تلفیق با ویروس بیماری‌زا، و پتانسیل انکوژن بودن تعدادی از ژن‌های HSV اشاره کرد. واکسن‌های ساب یونیت Subunit vaccines بی‌خطر هستند ولی نسبت به واکسن‌هایی که دارای ارگانیسم‌های تکثیر شونده هستند کارایی کمتری در القای CMI دارند.

واکسن‌های DNA ای کاندیدای دیگری برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از HSV هستند. ایمن‌سازی با واکسن DNA ای که حاوی DNA پلاسمیدی کد کننده ژن‌های ویروسی تحت کنترل پروموتر قوی یوکاریوت است، بیان داخل سلولی پروتئین‌ها را به همراه دارد (٦).

در این پژوهش از هرکدام از کلونهای pcDNA3-gD-1 یا pcDNA3-gB-1 که به ترتیب حاوی ژن کد کننده گلیکوپروتئین D یا B از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) بود به طور مجزا و یا توام به عنوان کاندیدا جهت ایمن‌زایی موش‌های BALB/c حساس استفاده شد. برای انجام این کار گروههای مختلف موشها به طور مجزا با هرکدام از کلونهای فوق و مخلوطی از آنها تزریق و نتیجه حاصل از این کار با نتایج به دست آمده از تزریق گروههای شاهد مثبت یا منفی که به ترتیب با سوش استاندارد ویروس HSV-1 به نام KOS ، یا PBS یا پلاسمید فاقد ژن تزریق شده بودند مقایسه گشت. در پایان تمام گروههای ٦ گانه موش با ویروس حاد HSV-1 چالش شدند که نتیجه کار نشان دهنده توانایی کلونها در القاء ایمنی علیه ویروس حاد بود.

مواد و روشها:

موشها

موشهای BALB/c ماده با سن هشت تا دوازده هفته از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری و در شرایط مطلوب نگهداری شدند.

سلول

در این پژوهش برای تکثیر ویروس از رده سلولهای پایدار کلیه گوساله استفاده شد. منشاء این سلولها از کلیه سالم یک گوساله نر ۱۰ روزه بوده است که توسط دکتر خدمتی در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با پاساژهای منظم و مکرر به رده پایدار تبدیل شده است.

Archive of SID

ویروس

ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ ۱ از یک بیمار مبتلا به ضایعات جلدی- مخاطی در صورت جدا و تعیین هویت شده بود. برای کار با ویروس استاندارد نیز از سویه KOS استفاده شد. هر کدام از این ویروسها به طور مجزا دریاخته‌های پایدار کلیه گوساله تکثیر داده شد و پس از تعیین $TCID_{50}$ آنها، در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

محیط کشت سلول

از محیط DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم حرارت دیده گوساله برای تکثیر یاخته‌ها استفاده شد. پس از آلوده‌سازی یاخته‌ها با ویروس، مقدار سرم در محیط به ۲ درصد تقلیل داده شد.

باکتری

از سویه $DH5\alpha$ باکتری E.coli برای تکثیر پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش بهره‌گیری شد. این باکتری در محیط L.B فاقد آمپی‌سیلین رشد و تکثیر داده شد.

پلاسمیدها

از دو کلون pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1 که به ترتیب واجد ژن کد کننده گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و ژن کد کننده گلیکوپروتئین B این ویروس بودند استفاده شد. هرکدام از این کلونها دارای پروموتور اولیه ویروس سیتومگال Cytomegalovirus (CMV) هستند که ژن مربوط در پائین دست آن جایسازی شده و هر دو کلون دارای ژن ایجاد مقاومت برابر آمپی‌سیلین می‌باشند. برای تکثیر این کلونها از سویه $DH5\alpha$ باکتری E.coli استفاده و باکتری میزبان با روش شوک حرارتی ترانسفورم گشت. سپس هرکدام از باکتریهای ترانسفورم شده به طور مجزا در محیط آگاردار L.B دارای $50\ \mu g/ml$ آمپی‌سیلین تکثیر داده شد.

ازدیاد پلاسمیدها، تعیین غلظت و هضم آنزیمی با BamHI

به منظور استخراج و تخلیص کلونهای pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1 در مقیاس کم از روش جوشاندن (Boiling Minipreparation) و در تولید انبوه از روش لیز قلیایی (Alkaline Lysis Maxipreparation) استفاده و غلظت DNA پلاسمیدی استخراج شده با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری تعیین شد (۸-۷). به منظور تأیید وجود ژن‌های gD-1 و gB-1 در پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3-gD-1 و pcDNA3-gB-1، محصولات مینی‌پرپ و ماکسی‌پرپ هریک از این پلاسمیدها به طور جداگانه تحت هضم آنزیمی با BamHI قرار و فراورده‌های حاصل از آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گشت.

تعیین MLD_{50}

(50 Percent Mouse Lethal Dose) MLD_{50} با استفاده از روش کربر (Karber) تعیین شد.

ایمن‌سازی موشهای BALB/c و خونگیری

موشهای BALB/c سالم و حساس در ۶ گروه ده‌تایی تقسیم و به هریک از گروه‌ها یکی از مواد به شرح و میزان زیر تزریق شد:

الف) پلاسمید بیان کننده ژن gD-1 به میزان ۹۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

Archive of SID

ب) پلاسمید بیان کننده ژن gB-1 به میزان ۹۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

ج) ترکیبی از هر دو پلاسمید نوترکیب فوق به میزان ٤٥ میکروگرم از هر فراورده پلاسمیدی در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

د) ویروس استاندارد HSV-1 ، سویه KOS با عیار 3000 $TCID_{50}$ ذره ویروس در ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون ویروسی

هـ) pcDNA3 فاقد ژن به میزان ۹۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS

و) PBS به میزان ۱۰۰ میکرولیتر

ویروس استاندارد KOS از راه داخل صفاقی تزریق و بقیه مواد فوق از راه داخل عضلانی تلقیح شد. از همه موشها قبل از تلقیح خونگیری به عمل آمد و آزمایش خنثی سازی ویروس با پلاسمای آنها انجام شد.

هر یک از گروهها تحت سه تزریق به فاصله بیست و یک روز از هم قرار گرفتند و قبل از تزریق اول و بیست و یک روز پس از هر تزریق، از موشها خونگیری و جهت ارزیابی عیار آنتی‌بادی خنثی کننده ویروس در آنها مورد آزمایش قرار گرفت. برای این کار ابتدا هر یک از نمونه‌های پلاسما به مدت ۳۰ دقیقه در ٥٦ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند و سپس رقت‌های دو برابر از هر پلاسما با حجم مساوی از $TCID_{50}$ ۱۰۰ ویروس وحشی هرپس سیمپلکس تیپ یک مخلوط و پس از حرارت‌دهی در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، به یاخته‌های پایدار کلیه گوساله تلقیح شد.

چالش موشهای BALB/c با ویروس وحشی HSV-1

هر یک از گروههای ٦ گانه مذکور با ۱/۶۵ MLD_{50} از ویروس وحشی HSV-1 با تزریق داخل صفاقی چالش شدند.

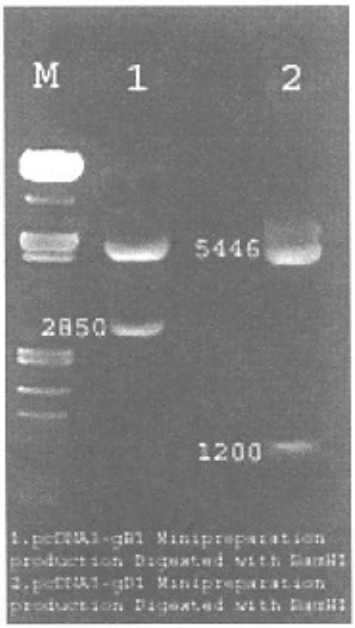
نتایج:

در شکل ۱ نتیجه الکتروفورز محصولات مینی‌پرپ کلنی‌های واجد pcDNA3-gB-1 و pcDNA3-gD-1 پس از هضم آنزیمی با BamHI نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود هضم ژنوم هر کلون منجر به پیدایش دو قطعه DNA شده است. در ستون M استاندارد وزن ملکولی DNA و در هرکدام از ستونهای 1 و 2 دو باند مشاهده می شود. باندهای ستون 1 شامل قطعه pcDNA3 با طول ٥٤٤٦ و قطعه مربوط به ژن gB-1 با طول حدود ۲۸۵۰ نوکلئوتید و باندهای ستون 2 شامل قطعه مربوط به pcDNA3 با طول ٥٤٤٦ و باند مربوط به ژن gD-1 با طول حدود ۱۲۰۰ نوکلئوتید است.

همچنین نتایج حاصل از آزمایش خنثی سازی ویروس با نمونه‌های پلاسمای به دست آمده از موش‌های گروه تست و کنترل نشان داد که هر یک از ساختارهای DNA ای اعم از pcDNA3-gB-1 ، pcDNA3-gD-1 یا ترکیب توأم آنها قادر به القاء پاسخ آنتی‌بادی خنثی کننده در حیوانات تزریق شده هستند.

قبل از هر گونه تزریق، آزمایش نمونه‌های پلاسما در رقت $\frac{1}{2}$ نشان داد که کلیه نمونه‌ها فاقد آنتی‌بادی اولیه ضد HSV-1 بودند. سطح آنتی‌بادی موجود در پلاسمای حیوانات بیست و یک روز پس از اولین، دومین و سومین تزریق pcDNA3-gB-1 به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{1}{8}$، بین $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{64}$ ، و بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$. این سطح از آنتی‌بادی در پلاسما پس از سه تزریق pcDNA3-gD-1 به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{1}{8}$ ، بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$، و بین $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{128}$. در حالی که حیوانات دریافت کننده ترکیب توام این کلونها عیار بالاتری از آنتی‌بادی خنثی

Archive of SID



شکل ۱ ـ نتیجه الکتروفوز محصولات مینی پرپ کلنی های واجد pcDNA3-gB-1و pc DNA A3-gD-1 پس از هضم آنزیمی با BamHI
M : استاندارد وزن ملکولی DNA 1: pcDNA3-gB-1 هضم شده با آنزیم BamHI 2: pcDNA3-gD-1 هضم شده با آنزیم BamHI

را نشان دادند که به ترتیب برابر بود با: کمتر از $\frac{۱}{۸}$، بین $\frac{۱}{۶۴}$ تا $\frac{۱}{۱۲۸}$، و بین $\frac{۱}{۶۴}$ تا $\frac{۱}{۲۵۶}$. گروه موشهای تزریق شده با ویروس استاندارد HSV-1 (سویه KOS) بالاترین سطح از آنتی‌بادی را تولید کردند که بعد از دومین و سومین تزریق به ترتیب بین $\frac{۱}{۱۶}$ تا $\frac{۱}{۱۲۸}$، و بین $\frac{۱}{۱۲۸}$ تا $\frac{۱}{۵۱۲}$ بود. گروههای (هـ) و (و) فاقد آنتی‌بادی ضد HSV-1 قابل ردیابی در پلاسما بودند.

بیشترین تغییر در عیار آنتی بادی های حاصل از تزریق دُزهای یادآور اول و دوم مربوط به گروه دریافت کننده HSV-1 (سویه KOS) بوده و گروه دریافت کننده واکسن توام که پس از تزریق اولین دُز یادآور بالاترین عیار آنتی‌بادی را داشت پس از تزریق یادآور دوم، در رتبه دوم از لحاظ افزایش مقدار عیار آنتی‌بادی قرار گرفت.

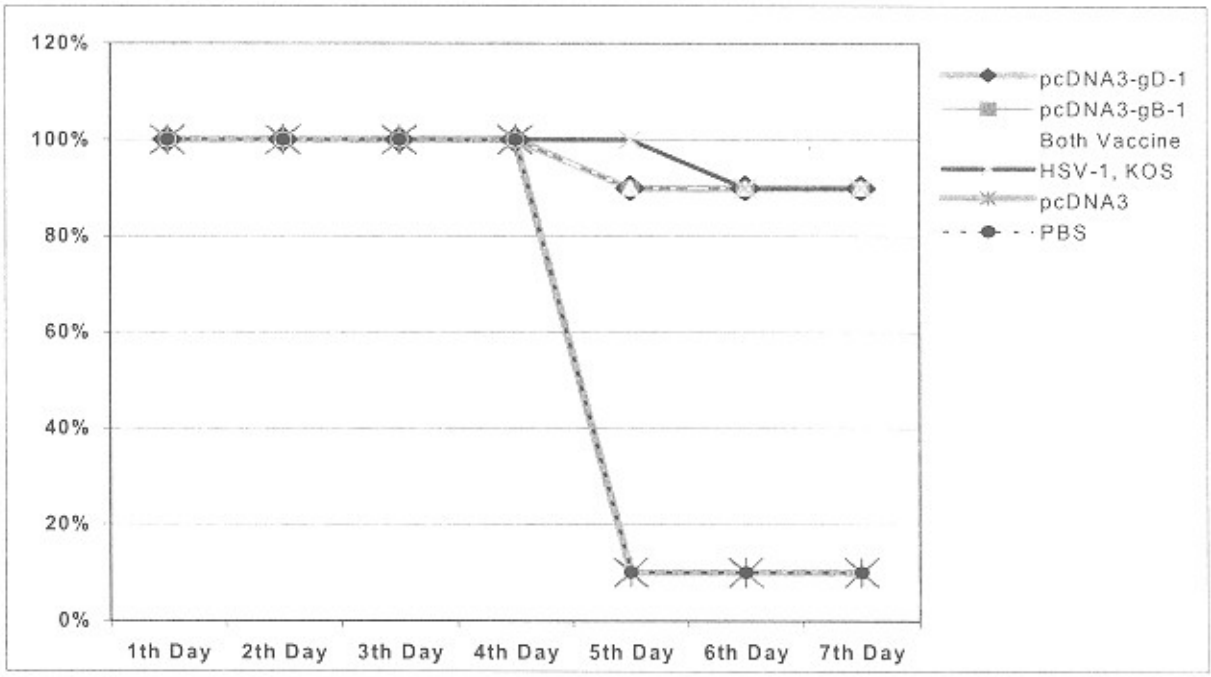
همچنین پس از چند آزمایش مشخص شد که MLD50 ۲/۲ برابر بود با: ۲۰۰۰۰۰۰ $TCID_{50}$.

در راستای بررسی حفاظت موشهای BALB/c ایمن شده، برابر چالش با دُز کشنده ویروس وحشی،بیست و یک روز پس از آخرین تزریق، همه گروههای موشی با 1.65 MLD50 از ویروس وحشی HSV-1 چالش شدند. همانطور که در نمودار۱ مشاهده می شود در حالی که ۹۰ درصد از موشهای گروه‌های (الف) تا (د) در گروههای آزمایش و شاهد مثبت تا هفت روز پس از چالش با ویروس حاد HSV-1 زنده ماندند، فقط ۱۰ درصد از حیوانات گروههای (هـ) و (و) در گروههای شاهد منفی توانستند برابر ویروس چالش مقاومت

لازم به ذکر است که در اکثر موارد علایم فلج پاهای عقب قبل از مرگ حیوان ظاهر شد

Archive of SID

نمودار ۱، درصد موشهای تزریق شده که پس از چالش با ویروس وحشی HSV-1 تا هفت روز زنده ماندند کنند.



در انتها، ویروس HSV-1 از نمونه‌های مغز، ریه، غدد لنفاوی، ماهیچه‌ها، کبد و مغز موشهای تلف شده پس از چالش جدا شد.

بحث:

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک دارای حدود ۱۳ پروتئین در پوشینه خود است که از این میان حداقل ۱۰ پروتئین به صورت گلیکوزیله می‌باشند که هرکدام وظیفه‌ای را برای فعالیت‌های تکثیری ویروس به عهده دارند. گلیکوپروتئین‌های D و B در مراحل اولیه اتصال و ورود ویروس HSV به سلول میزبان نقش دارند (۱ و ۹) و ژن‌های این گلیکوپروتئین‌ها در HSV-1 و HSV-2 بسیار حفاظت شده‌اند (۱۰). با توجه به اهمیت افزونتر gD-1 و gB-1 در ایجاد عفونت در یاخته‌های حساس و القاء تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس عفونی (۱۴-۱۱) ، در این پژوهش از فراورده‌های نوترکیب حاوی ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها برای راه‌اندازی پاسخ ایمنی در موشهای حساس BALB/c استفاده شد. در این تحقیق پس از آزمایشهای دقیق و تکرار این آزمایشها نشان داده شد که ایمن‌سازی با هر یک از پلاسمیدهای کد کننده ژن‌های gD یا gB ویروس HSV-1، منجر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس وحشی HSV-1 می‌شود ولی ایمن‌سازی با ترکیب توام این ساختارها مؤثرتر است. چنانکه متوسط عیار آنتی‌بادی در پلاسمای موشهای دریافت کننده واکسن توام پس از دومین تزریق بالاتر از گروههای واکسینه دریافت کننده هریک از ساختارهای DNA ای فوق بتنهایی بود، ولی این عیار در هیچیک از گروهها به آنچه که در گروه دریافت کننده ویروس استاندارد و فعال HSV-1 (سویه KOS) پس از سومین تزریق به دست آمد نرسید، زیرا در این گروه ویروس در یاخته‌های حساس موش تکثیر کرده و انبوهی از گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس تولید گشته بود. این یافته حاکی از آن است که وجود بیش از یک القاءکننده سیستم ایمنی میزبان می‌تواند

Archive of SID

در پیدایش و افزایش آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس حاد مؤثر باشد که با توجه به اینکه محققین دیگر، از جمله قیاسی و همکاران توانسته‌اند با استفاده از بیش از دو گلیکوپروتئین باعث تولید بیشتر آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در خون موشهای تحت آزمایش شوند بنابراین این نظریه تأیید می‌شود. نتایج حاصل از چالش موشهای ایمن شده نشان داد که در مقایسه با موشهای شاهد منفی، موشهای دریافت کننده کلونها و یا ویروس استاندارد توانستند مقاومت کاملاً آشکاری را برابر دُز کشنده ویروس وحشی HSV-1 از خود نشان دهند. این یافته‌ها بیانگر این واقعیت است که هریک از گلیکوپروتئین‌های نوترکیب gD-1 یا gB-1 و یا مجموع آنها که در بدن موش تولید شده‌اند، قادرند بدن را وادار به تولید ایمنی محافظت کننده برابر چالش با دُز کشنده نمایند. ولیکن در تحقیقات بیشتر باید دید که آیا تزریق یک دُز واکسن باز هم برای ایجاد حفاظت در موشها کافی است.

تشکر و قدردانی:

از آقای پروفسور همایون قیاسی، استاد UCLA و آقای دکتر کمال‌الدین خدمتی به ترتیب به خاطر تأمین کلونها و یاخته‌های پایدار BK سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES:

1. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields Virology. 4th ed U.S.A: Lippincott Raven Publisher, 2001, 2399 - 2509.
2. Baghian A, Chouljenco VN, D'Auvergne O, et al. Protective immunity against lethal HSV-1 challenge in mice by nucleic acid-based immunization with herpes simplex virus type-1 genes specifying glycoproteins gB and gD. J Med Microbiol 2002; 51: 350 - 7.
3. Horsburgn BC, Chen SH, Hu A, et al. Recurrent acyclovir-resistant herpes simplex in an immunocompromised patient: Can strain differences compensate for loss of thymidine kinase in pathogenesis? J Infect Dis 1998; 178: 618 - 25.
4. Deshpande SP, Kumaraguru U, Rouse BT. Why do we lack an effective vaccine against herpes simplex virus infections? Microbes Infection 2000; 2: 973 - 8.
5. Bernstein DI, Stanberry LR. Herpes simplex virus vaccines. Vaccine 1999; 17: 1681 - 9.
6. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 1983; 166: 557 - 80.
7. Karcher SJ. Mol Biol - A Project Approach. U.S.A: Academic Press, 1995,605.
8. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. U.S.A: John Willy and Sons,1995,505.
9. Plummer G. Review of the identification and titration of antibodies to herpes simplex viruses type I and II in human sera. Cancer Res 1973; 33: 1469 - 76.
10. Kosovsky J, Vojvodova A, Oravcova I, et al. Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) strain HSZP Glycoprotein B Gene: Comparison of mutations among strains differing in virulence. Virus Genes 2000; 20: 27 - 33.
11. Ghiasi H, Nesburn AB, Kaiwar R, et al. Immunoselection of recombinant baculoviruses expressing high levels of biologically active herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. Arch Virol 1991; 121: 163 - 178.
12. Nesburn AB, Burke RL, Ghiasi H, et al. Vaccine therapy for ocular Herpes Simplex Virus (HSV) infection: Periocular vaccination reduces spontaneous ocular HSV type 1 shedding in latently infected rabbits. J Virol 1994; 68: 5084 - 92.
13. Domingo C, Gadea I, Pardeiro M, et al. Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. Vaccine 2003; 21: 3565 - 74.
14. Bourne N, Milligan GN, Schleiss MR, et al. DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. Vaccine 1996; 14: 1230 - 4.