Archive of SID

Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Change in the Basic Structure of the Rabies Virus Glycoprotein by Reverse Genetics

Narges Miandehi [1], Seyed Kazem Bidoki [1], Mehdi Ajorloo [2], Alireza Gholami [*3]

1. *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payam-e Noor University, East Tehran Branch*
2. *Department of Clinical Laboratory Sciences, School of Allied Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran*
3. *Human Rabies Vaccine Department, Research Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

10.30699/ijmm.14.4.348

ABSTRACT

Background: Rabies is a deadly zoonotic disease that is caused by the rabies virus. The virus can infect and disrupt the central nervous system of a rabid patient. The rabies virus is a neurotropic single stranded RNA virus. Glycoprotein (G) is the most important protein that binds to the cellular receptors and also induces an immune response against the virus in the host. Using reverse genetics technology, the glycoprotein gene could be modified and a virus with higher immunogenicity or lower pathogenicity.

Materials & Methods: In this study, we designed a mutation in the sequence of glycoprotein gene using a software, on the main antigenic site II of the Pasteur virus strain at the position of 42-34 amino acids. Agene fragment in the cloning vector containing the rabies virus genome was replaced by the synthesized construct containing the altered gene by two restricted enzymes, and then cloned. The T7-BHK cell under the T7 phage promoter control was transfected to express the glycoprotein gene, along with the construct and vectors expressing the N, P, and L genes of the rabies virus as well as the full genome. After expressing and confirming viral genes, it was cultured and amplified in BSR cell.

Results: after cloning and expression of the recombinant virus in the target cell, the vector containing the mutated gene led to the rescue of the recombinant virus. The recombinant virus cultured and propagated in the BSR cells, then the genome was extracted and finally confirmed by sequencing.

Conclusion: The rescued recombinant virus can be used for research studies or in the vaccines manufacturing, provide that the antigenicity is maintained or increased.

Keywords: Rabies, Reverse genetics, Vaccine, Glycoprotein, Recombinant virus

Received: 2020/04/05; **Accepted**: 2020/06/02; **Published Online:** 2020/07/20

Corresponding Information: **Alireza Gholami,** Human Rabies Vaccine Department, Research Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Email: a.gholami@pasteur.ac.ir

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Miandehi N, bidoki K, Ajorloo M, Gholami A. Change in the Basic Structure of the Rabies Virus Glycoprotein by Reverse Genetics. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (4) :348-360

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks
Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Rabies is a deadly zoonotic disease caused by rabies virus, spread around the world and can infect all mammals, including humans. The virus infects the central nervous system and leads to disorders in central nervous system **(1)**, with horrible and acute neurological symptoms in the clinical stage. The rabies virus belongs to the rhabdovirus family and lyssavirus genus. Their genetic material is a single-stranded RNA with a negative polarity and a length of about 12kb. The genome of virus encodes five proteins (N, P, M, G, and L) **(2)**. The G protein (glycoprotein) binds to some specific cell's receptors and also provokes immune response against the virus in the host. Antigenic sites on G protein are essential roles in this regard. The antigenic site I carries linear and three-dimensional epitopes located between226-231 amino acid residues.

www.SID.ir

Archive of SID

Another major antigenic site II is located between the amino acids 34-42 (II_b) and 198-200 (II_a). The main antigenic site III is a continuous epitope located between the amino acids 330-338.Epitope IV consists of only one amino acid at position 251. The G1 (also called the antigenic site a) and G5 sub-antigenic sites are also in positions 342-343 and 261-264, respectively **(3)** (Figure 1).

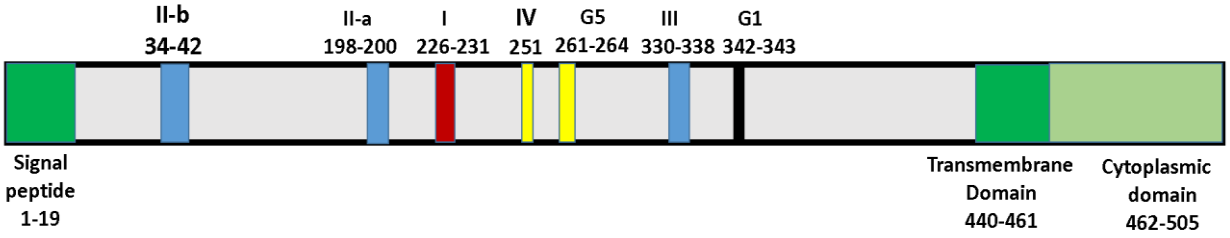


Figure 1. Schematic view of the glycoprotein structure of rabies virus. The main antigenic sites and the location of the amino acids associated with them.

The virus enters the cell via the endocytic pathway, and its replication and propagation cycle is entirely cytoplasmic **(5)**. Once the virus genome is released into the cytoplasm, its genome is used as mRNA to express viral proteins genes, as well as to synthesisantigenome (positive polarity) in order to amplify the virus genome. The rabies virus polymerase complex is consisted of phosphoprotein and the polymerase protein (P and L respectively), which is responsible for transcription and replication of the virus genome **(6)**. According to the above, in the construction of the recombinant rabies virus with reverse genetic technology, only N, P, and L proteins are necessary to form the virus-producing devices. Reverse genetics is a type of technology that manipulates and makes genetic changes in an organism in order to study the altered phenotype in the organism **(7)**.In order to rescue a recombinant and active RNA virus, the cDNA clone from the virus should be prepared and converted into an RNA molecule inside the host cell **(9)**.Genetic modification of the rabies virus toward improving its immunogenicity is one of the valuable applications of this technology. Accordingly, with the aim of establishing a suitable basis for this method in the country and using it in future research, genetic modification in the glycoprotein of rabies virus was done and its release of the active virus particle from the cell was shown.

Materials and Methods

Design and Manufacture of Mutated Glycoprotein

The genetic sequence of the rabies virus glycoprotein strain of Pasteur virus (PV) was obtained from the NCBI database. To generate the desired genetic mutation, the Mega4 software was used to change the genetic code from glycine (GGG) to glutamic acid (GAG) at the main antigenic site II_b, amino acid number 40.

Insertion of Mutated Glycoprotein into the Expression Vector

The mutated glycoprotein-carrying plasmid of the rabies virus was cut by the two restricted enzymes Nco I and SnaB I (Thermo Fisher) and the glycoprotein gene was removed and replaced in the expressing construct of the rabies virus (PV strain) genome instead of the original gene. After cloning in the Top 10 bacteria, PCR was performed and send to gene sequencing.

Animal Cell Culture

After transfection of the T7-BHK cell with expression vectors of N,P, L and modified G genes by lipofectamin 2000 (Invitrogen), the recombinant virus was rescued and inoculated to the BSR (Baby Syrian Related) cells.

Confirmation of Mutant Virus Sequence After Recovery

In order to compare the sequence of the mutated virus with other samples studied in this study, the cells of which were collected and RNA extraction was performed. cDNA was made from extracted RNA. The glycoprotein gene was then multiplied using PCR and specific primers and the PCR product was sent for sequencing.

Results

Confirmation of the Mutated Glycoprotein Gene Sequence in the Expression Vector

Mutated glycoprotein gene was transferred into the construct expressing the genome of the rabies virus by two restriction enzymes. The new cloned gene was generated by suitable PCR primers (Figure 2).

www.SID.ir

Archive of SID

Transfected T7-BHK Cell by Expression Plasmids Containing Virus Genes

The expression genes are depended on the T7-RNA polymerase promoter, produced in this cells. To ensure the correct function of the cells in polymerase expression, the cells were transfected with 4T7A construct and their presence of eGFP protein in microscopic evaluation was well confirmed (Figure 3).Transfection of the above cells with full genomes and expression constructs of virus (N, P, and L) confirmed the expression of viral proteins in T7-BHK cells after specific staining (Figure 4).

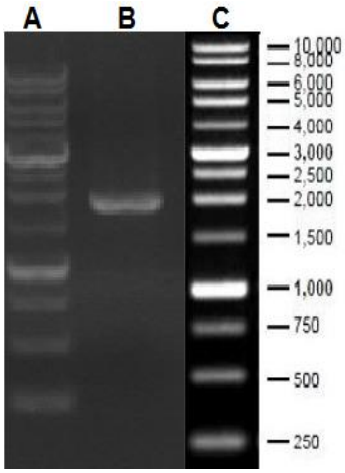


Figure 2. The PCR result on the mutated glycoprotein gene after cloning it into the expression vector. 1 kb marker (A), mutated glycoprotein gene (B), weight marker pattern used (C).

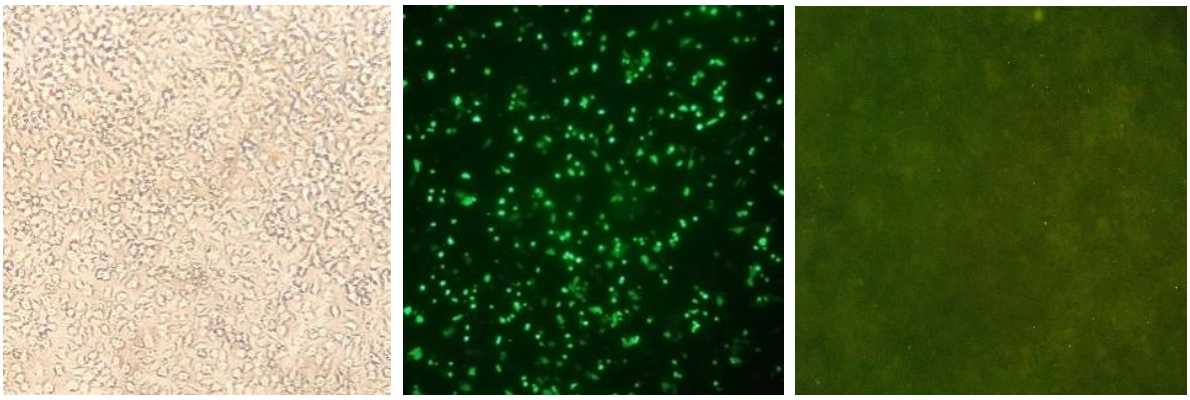


Figure 3. T7-BHK cells transfection results. T7-BHK cells (right), T7-BHK cells transfected with 4T7A structure to confirm T7 polymerase function (middle), the negative control cells with immunofluorescence staining (left).

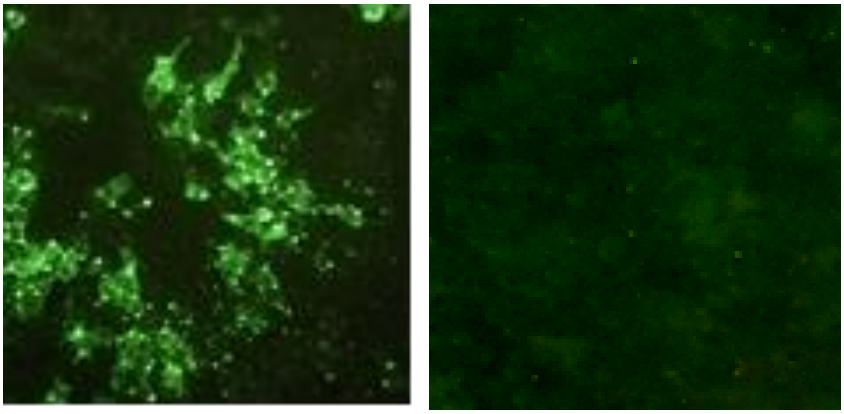


Figure 4. T7BHK cell transfected with expression plasmids. The cell containing the virus genome, with the expression vectors containing the L, P, and N genes of immunofluorescence staining with specific antibodies, shows the production of viral proteins (left). Negative control cells transfected with the same plasmids except L (right).

www.SID.ir

Archive of SID

Infectivity of Recovered Viruses in the BSR Cells

Microscopic observation of BSR cells after specific staining confirmed the ability of virus to infect the cells. It was also observed that the infectivity of the recovered virus improved during subsequent passages (Figure 5). RNA extraction was performed from the virus produced in the BSR cell and sequencing of the virus glycoprotein gene confirmed the presence of a mutation in the recovered virus (Figure 6).

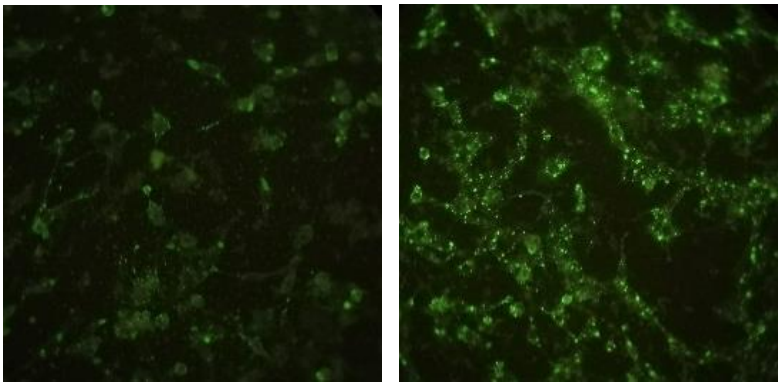


Figure 5. Increasing the virus's ability to infect during consecutive cultures: The left side of the virus-infected cells in the first passage of the virus, compared to the cells infected in the second passage of the virus (right).

Figure 6. Determination of glycoprotein sequence of non-mutated recovered virus (Rescued PV), control vaccine strain (PV) virus, mutated recovered virus (Rescued Modified PV). The location of the mutated nucleotide is shown in the figure with the arrow.

Discussion

In this study, using genetic engineering methods, molecular changes were created in the glycoprotein of rabies virus and the recombinant virus recovered. The virus has shown the ability to infect animal cell culture. In 2003, Nauto Ito et al. improved the recovery of rabies virus from cloned cDNA using reverse genetics without the vaccinia auxiliary virus **(18)**. In the present study, the recombinant rabies virus was recovered using a similar system, the desired change in glycoprotein gene was first altered and then transfected to T7-BHK cell with others viral proteins encoding genes. Rabies virus glycoprotein (RVGP) is the main antigen of the virus and is the only viral component of all new rabies vaccines available. Many new methods have been used since recombinant DNA technology became available for the expression of recombinant immunogenic viral glycoproteins (rRVGP). Recent studies on the development of rabies vaccines have focused on the expression of rRVGP in vivo by transferring the viral vectors into the body. This method is considered as the basis of biotechnology for the new generation of rabies vaccines **(27)**.

Conclusion

In this study, we tried to rescue the rabies virus by modifying the structure of the protein that is effective in the antigenicity and immunogenicity, so that it could be used in qualitative and quantitative tests required for rabies vaccine

Acknowledgment

This work was supported by the production and research complex of Pasteur Institute of Iran. Human rabies vaccine production department.

Conflict of Interest

www.SID.ir

Archive of SID

Authors declared no conflict of interests.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۴ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله پژوهشی

ایجاد تغییر در ساختار اولیه گلیکوپروتئین ویروس هاری و جایگزین کردن آن در ساختار ویروس هاری با روش ژنتیک معکوس

نرگس میاندهی[۱]، سید کاظم بیدکی[۱]، مهدی آجورلو[۲]، علیرضا غلامی*[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، تهران، ایران
۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳. بخش واکسن هاری انسانی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۷

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۵/۲۴

موضوع: ویروس شناسی پزشکی

نویسندهٔ مسئول:

علیرضا غلامی، بخش واکسن هاری انسانی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

ایمیل: a.gholami@pasteur.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: هاری یک بیماری زئونوز کشنده و عامل مولد آن ویروس هاری با ژنوم RNA تک‌رشته‌ای است. این ویروس می‌تواند سیستم اعصاب مرکزی فرد مبتلا به هاری را آلوده و مختل سازد. گلیکوپروتئین (G) مهمترین پروتئین در اتصال ویروس به گیرنده‌های سلولی و همچنین ایجاد پاسخ ایمنی بر ضد ویروس در میزبان است. با استفاده از فناوری ژنتیک معکوس می‌توان تغییراتی در ژن کدکنندهٔ گلیکوپروتئین ویروس ایجاد و ویروسی با توان ایمنی‌زایی بالاتر و یا بیماری‌زایی کمتر تولید کرد.

مواد و روش کار: در این پژوهش با کمک نرم‌افزار در توالی ژنتیکی گلیکوپروتئین ویروس هاری سویه پاستور جهشی در سایت آنتی‌ژنیک اصلی II، در موقعیت اسیدهای آمینه ۴۲-۳۴ طراحی گردید و پس از سنتز، ژن تغییر یافته تعیین توالی گردید و نوکلئوتید جهش‌یافته تأیید شد. سازه حاوی ژن تغییریافته بوسیله دو آنزیم محدودالاثر جایگزین ژن اصلی در ژنوم ویروس هاری شد و کلون گردید. سلول T7-BHK تحت پروموتر فاژ T7 برای بیان ژن گلیکوپروتئین، همزمان با سازهٔ ژنی و وکتورهای بیان کنندهٔ ژن‌های N, P و L ویروس هاری و فول ژنوم ترنسفکت شد. پس از بیان ژن‌های ویروسی و تایید آن، در سلول BSR کشت داده شد.

یافته‌ها: بازیابی ویروس نوترکیب حامل ژن جهش‌یافتهٔ گلیکوپروتئین، پس ازکلون شدن و ترنسفکت در سلول T7-BHK، در سلول BSR کشت و تکثیر پیدا کرد و پس از استخراج ژنوم آن از سلول، بوسیله تعیین توالی تأیید نهایی گردید.

نتیجه‌گیری: با بررسی بر روی توان ایمنی‌زایی یا کاهش قدرت بیماریزایی و همچنین حفظ یا افزایش آنتی‌ژنیسیتهٔ ویروس نوترکیب بازیابی شده می‌توان از آن جهت مطالعات تحقیقاتی در ساخت واکسن بهره جست.

کلید واژه‌ها: هاری، ژنتیک معکوس، واکسن، گلیکوپروتئین، ویروس نوترکیب.

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

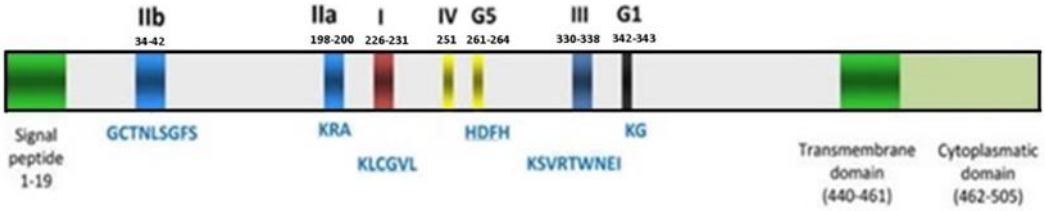
مقدمه

هاری یک بیماری زئونوز کشنده است که غالباً جوامع محروم را هدف قرار می‌دهد. عامل مولد بیماری هاری ویروس هاری است که در سراسر جهان منتشر بوده و می‌تواند تمام پستانداران از جمله انسان را مبتلا کند. این ویروس سیستم عصبی مرکزی را آلوده کرده و منجر به اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می‌شود (۱) که در مرحله بالینی با نشانه‌های هولناک و بروز علائم حاد عصبی در حیوانات و انسان همراه می‌گردد. ویروس هاری متعلق به خانواده رابدوویریده و جنس لیساویروس است. اعضای خانواده این ویروس مشتمل بر ۱۴ ژنوتیپ می‌شود. ژنوتیپ I شامل ویروس هاری کلاسیک است که عمده‌ترین و فراوان‌ترین عامل مرگ و میر بر اثر بیماری هاری در انسان و حیوانات به شمار می‌رود. ویروس هاری، ویروسی نوروتروپیک یا عصب دوست است که ماده ژنتیکی آن از نوع RNA تک‌رشته، با قطبیت منفی و طول حدود ۱۲kb است که پنج پروتئین (به نام‌های N، P، M، G و L) از روی آن ساخته

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود(۲). گلیکوپروتئین ویروس هاری (G) مهمترین پروتئین آن در اتصال به گیرنده‌های سلولی و همچنین ایجاد پاسخ ایمنی بر ضد ویروس در میزبان است. سایت‌های آنتی‌ژنیک بر روی این پروتئین دارای نقش‌های اساسی در این ارتباط هستند. سایت آنتی‌ژنیک I، حامل اپی‌توپ‌های خطی و سه بعدی است که در موقعیت اسیدهای آمینه ۲۳۱-۲۲۶ قرار دارد. سایت آنتی‌ژنیک اصلی دیگری به نام II، در موقعیت اسیدهای آمینه ۴۲-۳۴ (II_b) و ۲۰۰-۱۹۸ (II_a) قرار گرفته است. سایت آنتی‌ژنیک اصلی III، یک اپی‌توپ پیوسته است که بر روی اسیدهای آمینه ۳۳۸-۳۳۰ قرار دارد. اپی‌توپ IV تنها از یک اسیدآمینه در موقعیت ۲۵۱ تشکیل شده است. سایت‌های آنتی‌ژنیک فرعی G1 (یا a) و G5 نیز به ترتیب در موقعیت های ۳۴۳-۳۴۲ و ۲۶۴-۲۶۱ قرار دارند(۳) (شکل ۱). اسیدآمینه شماره ۳۳۳ به تنهایی در بیماری‌زایی ویروس نقش کلیدی ایفا می‌کند (۴).



شکل ۱. نمای شماتیک از گلیکوپروتئین و جایگاه‌های آنتی‌ژنیک ویروس هاری.

این ویروس از طریق مسیر آندوسیتوزی وارد سلول می‌شود و چرخه همانندسازی و تکثیر آن تماماً سیتوپلاسمی است (۵). ژنوم ویروس پس از آزاد شدن در سیتوپلاسم، الگوی ساخت mRNA برای بیان ژن‌های ویروسی و همچنین ساخت آنتی‌ژنوم (با قطبیت مثبت) برای تکثیر ژنوم ویروس قرار می‌گیرد. کمپلکس پلیمرازی ویروس هاری شامل فسفوپروتیین و پروتئین پلیمراز (P و L) است که وظایف نسخه‌برداری و همانندسازی را عهده‌دار هستند. در این فرایندها حضور نوکلئوپروتئین ویروس (N) نیز نقش حساس و حیاتی دارد. در مجموع، این سه پروتئین به همراه ژنوم ویروس برای تکثیر پنج پروتئین ویروس و همانندسازی آن در سلول میزبان ضروری هستند (۶). بر همین اساس است که در ساخت ویروس هاری نوترکیب با فناوری ژنتیک معکوس، فقط به پروتئین‌های N، P و L بعنوان دستگاه سازنده ویروس نیاز است. ژنتیک معکوس نوعی فناوری است که با دستکاری و ایجاد تغییرات ژنتیکی در یک ارگانیسم، به مطالعه فنوتیپ تغییریافته آن ارگانیسم براساس تغییرات ژنتیکی ایجاد شده می‌پردازد. یکی از جنبه‌های مهم و کاربردی این فناوری، ساخت ویروس‌های نوترکیب بهینه‌سازی شده جهت ساخت واکسن، با کاهش دادن یا از بین بردن قدرت بیماری‌زایی ویروس همزمان با حفظ آنتی‌ژنیسیته آن است (۷). استفاده از این فناوری به ویژه در مورد ویروس‌های RNA دار با قطبیت مثبت، به دلیل سهولت دستکاری آنها و دارا بودن ژنوم‌های تا اندازه‌ای کوچک، و همچنین تکثیر سریع آنها که منجر به پدیدار شدن سریع حالت فنوتیپی جدید در آنها می‌گردد، مفید بوده است (۸). برای بازیابی یک ویروس RNA دار نوترکیب و فعال باید کلون cDNA حاصل از ویروس تهیه و در درون سلول میزبان به مولکول RNA تبدیل شود (۹). فناوری ژنتیک معکوس برای نخستین بار در سال ۱۹۷۸ برای ساخت باکتریوفاژ Qβ (Qbeta) با موفقیت به کار گرفته شد. ویروس Qβ فاژی با ژنوم RNA تک رشته حلقوی با قطبیت مثبت است که باکتری‌های دارای pilus از جمله اشرشیاکلی را آلوده می‌کند(۱۰). این فناوری سپس حدود یک دهه بعد با استفاده از سیستم مینی‌ژنوم، بر روی ویروس‌های RNA دار ارزیابی شد. سیستم مینی‌ژنوم بر اساس رونویسی از توالی‌های انتهایی یک قطعه از ژنوم ویروس آنفلوانزا به همراه یک ژن گزارشگر بود که توسط نوکلئوپروتئین (NP) و پروتئین‌های پلیمراز ویروس (PA, PB1, PB2) پوشانده می‌شد و تشکیل یک ریبونوکلئوپروتئین (RNP) را می‌داد. ترانسفکت کردن سلول با این RNP نوترکیب به همراه ویروس آنفلوانزا، بعنوان ویروس کمکی، اجازهٔ رونوشت‌برداری وترجمه از ژن گزارشگر را می‌داد، به این ترتیب که ویروس کمکی پروتئین‌های مورد نیاز برای تکثیر این سازه را فراهم می‌کرد (۱۱). ساخت مینی‌ژنوم ویروس هاری توسط Conzelmann و Schnell در سال ۱۹۹۴ برای نخستین بار انجام شد (۱۲). در ایران نیز برای نخستین بار در سال ۲۰۱۶ ساخت مینی‌ژنوم ویروس هاری توسط آجورلو و همکارانش انجام شد (۱۳). در تمام این سیستمها پروتئینهای مورد نیاز برای کپسیده کردن، رونوشت برداری و تکثیر ویروس باید توسط پلاسمیدهای بیان‌کننده این پروتئین‌ها و یا

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس کمکی فراهم شوند (۹). تغییر ژنتیکی در ویروس هاری به منظور بهبود توان ایمنی‌زایی آن، یکی از کاربردهای ارزشمند این فناوری است. بر همین اساس و با هدف ایجاد بنیان مناسب برای این روش در کشور و به کارگیری آن در پژوهش‌های آتی، تغییر ژنتیکی در گلیکوپروتئین ویروس هاری ایجاد و ظهور آن در ذرهٔ ویروسی فعال اثبات شد.

روش پژوهش

طراحی و ساخت گلیکوپروتئین جهش‌یافته

ابتدا توالی ژنتیکی گلیکوپروتئین ویروس هاری سویه پاستور (PV) از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شد. برای ایجاد جهش ژنتیکی مورد نظر، بوسیله نرم‌افزار MEGA4 در محل سایت آنتی‌ژنیک اصلی II_b و در موقعیت اسید آمینه شماره ۴۰ گلیکوپروتئین، تغییر کد ژنتیکی گلایسین (GGG) به کد ژنتیکی گلوتامیک اسید (GAG) طراحی شد. توالی ژنتیکی گلیکوپروتئین جهش‌دار ویروس هاری، با روش سنتز ژنی (شرکت بیومجیک) تهیه و بر روی پلاسمید pUC57 دریافت شد.

وارد نمودن گلیکوپروتئین جهش‌یافته در وکتور بیانی

پلاسمید حامل گلیکوپروتئین جهش دار ویروس هاری بوسیله آنزیم‌های محدودالاثر *Nco* I و *Sna*B I (شرکت Thermo Fisher) برش داده شد و ژن گلیکوپروتئین از آن خارج و در سازه بیان کنندهٔ ژنوم ویروس هاری (سویه PV) به جای ژن اصلی جایگزین گردید. پس از استخراج سازه مذکور از باکتری Top 10 (اهدایی واحد واکسن هاری انسانی، انستیتو پاستور ایران)، برای ژن گلیکوپروتئین کلون‌شدهٔ جدید به وسیله پرایمرهای مناسب PCR انجام شد و برای اطمینان از وجود جهش مورد نظر تعیین توالی انجام شد (ژن فناوران، ایران). توالی ژنتیکی با استفاده از نرم افزار Mega4 بررسی شد.

کشت سلول‌های جانوری

تکثیر و تعیین عیار ویروس هاری بر روی سلول BSR (Baby Syrian Related) (کلونی از سلول BHK)، اهدایی واحد تولید واکسن هاری دامی انستیتو پاستور ایران، انجام شد. سازه ژنی بیان کننده‌ی ویروس هاری تحت پروموتر فاژ T7 قرار داده شده است که در نتیجه، برای بیان ژن گلیکوپروتئین از سلول T7-BHK استفاده شد. این سلول آنزیم T7 RNA Polymerase را به صورت پایدار بیان می‌کند. سلول مذکور از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت سلول از محیط DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) بهمراه ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS) استفاده شد و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵٪ گاز CO_2 انجام شد.

انتقال DNA به درون سلول با روش لیپوفکشن

وکتورهای بیان کنندهٔ ژن‌های N، P و L ویروس هاری در پژوهش‌های پیشین تهیه شده بود و برای ساخت ویروس هاری جهش یافته در اختیار این کار قرار داده شد (۱۳). این وکتورها بهمراه وکتور حامل گلیکوپروتئین تغییر یافته برای انجام ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفتند. برای اطمینان از صحت عملکرد T7 RNA Polymerase در سلول T7-BHK، ابتدا سلول‌ها با سازه 4T7A (۱۴) ترانسفکت شد که بیان کننده پروتئین فلورسنت EGFP تحت پروموتر T7 می‌باشد. مشاهده رنگ فلورسنت بیان آنزیم پلیمراز توسط سلول مذکور تایید می‌کند. پلاسمیدهای پیشگفت بوسیله لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) بطور همزمان و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به سلول T7-BHK منتقل شدند. بطور خلاصه، ۲ میکروگرم پلاسمید با ۴ میکرولیتر لیپوفکتامین در ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت سلول فاقد آنتی‌بیوتیک مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه به پلیت حاوی کشت تک لایه سلول T7-BHK افزوده شد. در روزهای دوم و سوم پس از ترانسفکشن، محیط کشت سلول برداشت و در حجم‌های کوچک جمع‌آوری و متعاقباً جهت وجود ویروس ارزیابی شد. تأیید بازیابی ویروس هاری نوترکیب و تعیین عیار آن با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت به کمک آنتی‌بادی اختصاصی انجام گردید. برای این کار، مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر از برداشت‌های ویروسی، به سلول‌های BSR کشت شده افزوده و یک روز بعد با استن سرد تثبیت و سپس توسط آنتی‌بادی فلورسنت ضد نوکلئوکپسید ویروس هاری (Bio-Rad) مجاور شد. در نهایت، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ ماوراء بنفش جهت وجود ویروس هاری بررسی شدند. وکتورهای بیانی ویروس اصلی نیز با همین روش ترانسفکت شدند.

تلقیح کشت سلول جانوری با ویروس نوترکیب

برای بررسی قابلیت آلوده‌کنندگی هر سه نوع ویروس مورد مطالعه (سویه واکسینال، ویروس بازیابی شده اصلی و سویه بازیابی شده جهش یافته) بطور جداگانه به سلول‌های BSR تلقیح شدند. جهت بهینه‌سازی و بدست آوردن نسبت مناسب بین سلول و ویروس، نسبت‌های مختلف بین ویروس و سلول (MOI, Multiplicity of Infection) بررسی و در نهایت MOI برابر ۱/۱۰ استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

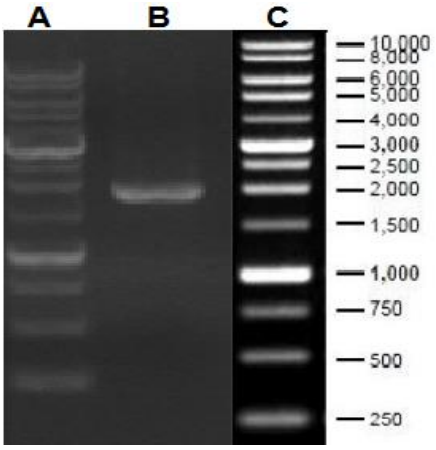
تأیید توالی ویروس جهش یافته پس از بازیابی

به منظور مقایسه توالی ویروس جهش‌یافته با سایر نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه، از هر گروه از سلول‌های BSR آلوده به ویروس، ۳ پاساژ مطابق شرایط گفته شده در قسمت روش‌ها انجام شد. در مرحله بعد سلول‌ها جمع‌آوری شدند و از آن‌ها استخراج RNA انجام شد (یکتا تجهیز آزما، ایران). بوسیله پرایمر Random Hexamer از RNAی استخراج شده cDNA ساخته شد (سیناژن، ایران). سپس با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن گلیکوپروتئین تکثیر و محصول PCR برای تعیین توالی ارسال گردید (زیست فناوری پیشگام، ایران).

یافته‌ها

تأیید توالی ژن گلیکوپروتئین جهش یافته در وکتور بیانی

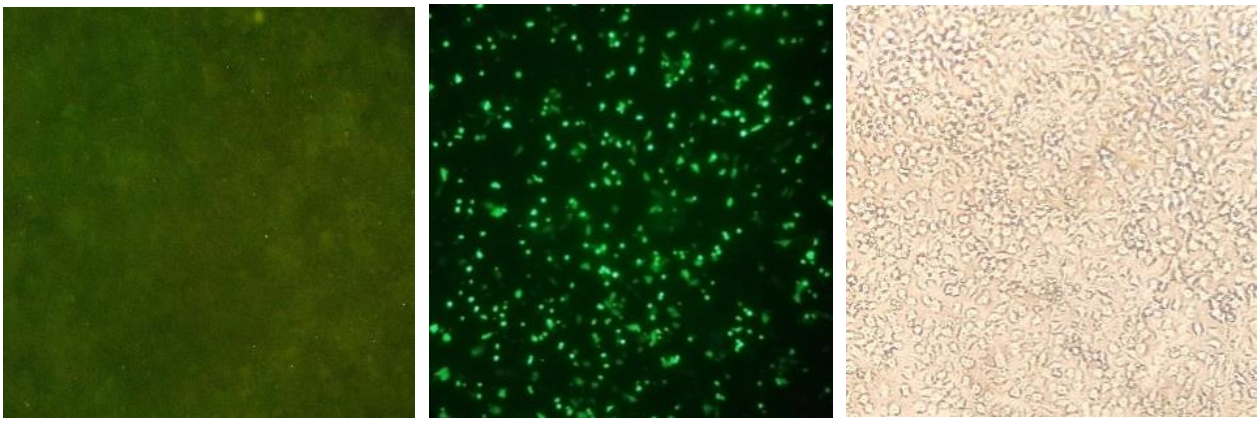
باکمک برش دو انتهای ژن گلیکوپروتئین هاری دارای جهش، توسط آنزیم‌های محدودکننده *Nco* I و *Sna*B I، انتقال این ژن به داخل سازه بیان کنندهٔ ژنوم ویروس هاری (سویه PV) انجام شد. از روی ژن کلون‌شدهٔ جدید به وسیله پرایمرهای مناسب PCR انجام شد (شکل۲). متعاقباً برای تأیید وجود جهش در سازه ژنی، از روی محصول PCR تعیین توالی صورت گرفت و بررسی توالی، جایگزینی اسیدآمینه گلایسین با گلوتامیک اسید را تأیید نمود.



شکل ۲. نتیجه PCR بر روی ژن گلیکوپروتئین جهش‌یافته، پس از کلون کردن آن در وکتور بیانی. مارکر ۱ کیلوبازی (A)، ژن گلیکوپروتئین PCR شده (B)، الگوی مارکر وزنی استفاده شده.

ترانسفکشن سلول T7-BHK برای بیان سازه‌های حاوی ژن ویروس

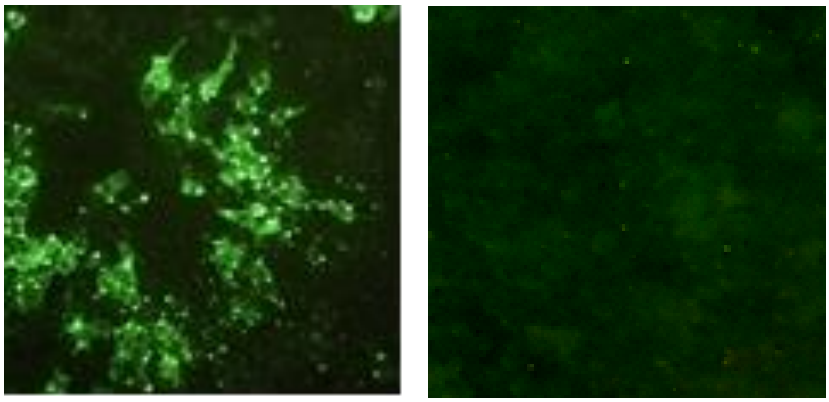
بیان ژن‌ها در سازه‌های بیانی ژن ویروس، برپایهٔ پروموتر آنزیم پلیمراز T7 استوار هستند که در سلول T7-BHK تولید می‌گردد. برای اطمینان از صحت عملکرداین سلول در بیان پلیمراز ذکر شده، سلول‌ها با سازه 4T7A ترانسفکت شدند و حضور پروتئین EGFP در آنها در ارزیابی میکروسکوپی به خوبی مورد تأیید قرار گرفت (شکل۳). ترانسفکشن سلول مذکور با سازه‌های ژنومی و سازه‌های بیان کنندهٔ ژن پروتئین‌های N، P و L ویروس هاری، بیان پروتئین‌های ویروسی در سلول T7-BHK را پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی تأیید نمود (شکل۴).



شکل ۳. نتایج ترانسفکشن سلول T7BHK . سلول T7BHK (راست)، سلول T7BHK ترانسفکت شده با سازه 4T7A برای تأیید عملکرد پلیمراز T7 (وسط)، همان سلول بدون ترانسفکشن با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت (چپ). نتایج نشان دهنده عملکرد آنزیم پلیمراز T7 برای بیان ژن پروتئین EGFP در سلول حاوی سازه 4T7A است.

www.SID.ir

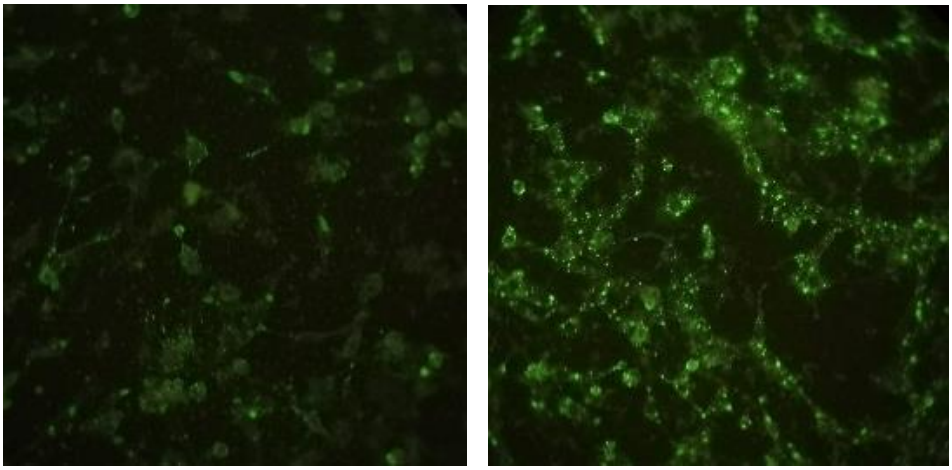
Archive of SID



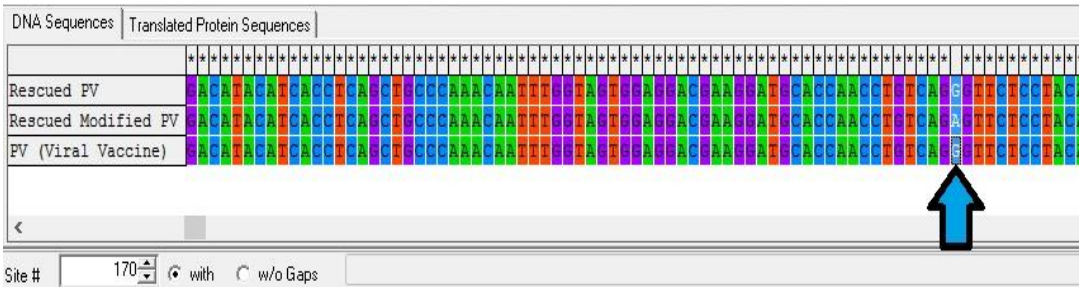
شکل ۴. سلول T7BHK ترانسفکت شده با پلاسمیدهای بیانی. سلول حاوی ژنوم ویروس، بهمراه وکتورهای بیانی حاوی ژن‌های L، P و N. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت با آنتی‌بادی اختصاصی، تولید پروتئین‌های ویروسی را نشان می‌دهد. (چپ). سلول کنترل منفی ترانسفکت شده با همان پلاسمیدها بجز L (راست).

عفونت‌زایی ویروس‌های بازیابی شده در سلول BSR

نتایج مجاور نمودن سلول‌های BSR با محیط کشت حاوی ویروس‌های بازیابی شده در مرحله قبل نشان داد که محیط کشت مذکور حاوی ویروس هاری با توان عفونی نمودن سلول‌های BSR بوده است. مشاهده میکروسکوپی سلول‌های BSR پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی این موضوع را تأیید کرد. همچنین مشاهده شد که توان آلوده سازی ویروس بازیابی شده در طی پاساژهای بعدی بهبود یافته است(شکل ۵). در مرحله بعد، از ویروس تولید شده در سلول BSR استخراج RNA انجام شد و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین ویروس وجود جهش در ویروس بازیابی شده را تأیید نمود (شکل ۶).



شکل ۵. افزایش توان آلوده‌سازی ویروس در طی کشت‌های متوالی: سمت چپ سلول‌های آلوده به ویروس در اولین پاساژ ویروس، در مقایسه با سلول‌های آلوده به پاساژ دوم ویروس (سمت راست) را نشان می دهد.



شکل ۶. تعیین توالی گلیکوپروتئین ویروس بازیابی شده بدون جهش (Rescued PV)، ویروس سویه واکسینال شاهد (PV)، ویروس بازیابی شده جهش‌یافته (Rescued Modified PV). محل نوکلئوتید جهش‌یافته در شکل با پیکان نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش، با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، تغییر مولکولی در گلیکوپروتئین ویروس هاری ایجاد و به‌کمک فناوری ژنتیک معکوس ویروس نوترکیب حاوی این گلیکوپروتئین بازیابی شد. ویروس بدست آمده توانایی عفونت‌زایی در کشت سلول جانوری را از خود نشان داد. در ۱۹۹۹ BEN P. H. PEETERS و همکاران از سیستم ژنتیک معکوس برای بازیابی ویروس نیوکاسل طبق سیستم توضیح داده شده و ویروسی کمکی برای تأمین RNA پلیمراز فاژ T7 استفاده کردند (۱۵). از سیستم فوق برای بازیابی گونه‌های ویروسی مختلف رشته منفی از نوع بیماریزا توسط Leeuw و همکاران در ۲۰۰۵، دورتمنس و همکاران در ۲۰۰۹، پیترس و همکاران در ۱۹۹۹ بطور کارآمد استفاده شده است (۱۶). در سال ۲۰۱۸ Ginés Ávila-Pérez و همکارانش ویروس Zika را که از خانواده فلاوی‌ویریده و مسئول اپیدمی اخیر در آمریکا بوده را با استفاده از ژنتیک معکوس بازیابی کردند تا به کمک آن بتوانند به برخی از سوالات در مورد بیولوژی ویروس زیکا پاسخ بدهند و همچنین با در نظر گرفتن علائم بالینی بیماری، توسعه ابزار و مواد برای مطالعه پاتوژنز ویروس زیکا و برای توسعه موارد درمانی جدید و نیازهای اورژانسی اقدام کنند (۱۷). در سال ۲۰۰۳ ناواتو ایتو و همکاران با استفاده از ژنتیک معکوس بدون ویروس کمکی واکسینیا، بازیابی ویروس هاری را از cDNA کلون شده بهبود بخشیدند (۱۸). در پژوهش حاضر با استفاده از سیستم ژنتیک معکوس مشابهی ابتدا تغییر مورد نظر در ژن گلیکوپروتئین ایجاد شد و سپس با ترنسفکت سلول T7-BHK، که RNA پلیمراز فاژ T7 را برای نسخه‌برداری ویروس فراهم می‌کند، با پلاسمیدهای حاوی ژن گلیکو پروتئین تغییر یافته و سایر ژن‌های کد کنندهٔ پروتئین‌های ویروسی، ویروس نوترکیب هاری بازیابی شد. سایت‌های آنتی‌ژنیک II و همچنین III گلیکوپروتئین، به ترتیب از اپی‌توپ‌های فضایی و خطی مهم ویروس هاری هستند. برخی از اسیدهای آمینه در میان این سایت‌های آنتی‌ژنیک گلیکوپروتئین ویروس هاری سویه‌های واکسینال وجود دارند که در بین سویه‌های مختلف ویروس هاری بسیار حفظ شده هستند، به نحوی که جهش در آنها باعث مقاومت در برابر آنتی‌بادی خنثی کننده می‌شود. ولی برخی دیگر در میان سویه‌های مختلف متفاوت هستند. با این وجود، ایمنی ایجاد شده توسط آن‌ها همه ویروس‌های ژنوتیپ ۱ هاری را پوشش می‌دهد. در سال ۱۹۸۸ Christophe Prehaud و همکاران بر روی ساختار جایگاه II آنتی‌ژنی گلیکوپروتئین ویروس هاری و نقش آن در شدت بیماریزایی ویروسی کار کردند. آن‌ها با استفاده از ۱۲ آنتی‌بادی مونوکلونال خنثی‌کننده، جایگاه II آنتی‌ژنی گلیکوپروتئین ویروسی را تعیین خصوصیت کردند. جهش‌های ایجاد کننده مقاومت به خنثی‌سازی توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی جایگاه II در ۲ مجموعهٔ خوشه‌ای قرار دارند، اولین مجموعه بین اسیدهای آمینه ۳۴ و ۴۲ و دومین مجموعه در بین اسیدهای آمینه ۱۹۸ و ۲۰۰ هستند. دو جهش دارای اهمیت متوسط نیز در موقعیت‌های ۱۴۷ و ۱۸۴ مشخص شده‌اند. تعداد ۴ جهش که موجب کاهش بیماریزایی ویروس در موش‌های بزرگسال می‌شد نیز شناخته شدند(۱۹). جهش نقطه‌ای ایجاد شده در پژوهش حاضر نیز در جایگاه آنتی‌ژنی II گلیکوپروتئین ویروس هاری قرار دارد که یکی از سایت‌های آنتی‌ژنی اصلی این پروتئین است. گلیکوپروتئین اولیه متعلق به سویه پاستور (PV) از ویروس هاری بوده و اسید آمینهٔ تغییریافته بر اساس تفاوت ژنتیکی در سایت آنتی‌ژنیک II_b بین PV با سویه پیتمن-مور (PM) انتخاب شد. هر دو این سویه‌های ویروسی در ساخت واکسن هاری بر روی کشت سلول جانوری مورد استفاده قرار می‌گیرند. ویروس هاری سویه PM در ایمنی‌زایی علیه هاری بیش از چند دهه در انواع واکسن‌های ضد هاری در انسان با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (۲۰). لذا جهش ژنتیکی در سایت II_b در موقعیت اسیدآمینه شماره ۴۰ بر همین اساس ایجاد و ویروس حمل‌کننده آن نیز با توان تکثیر در کشت سلول جانوری بدست آمده است. ایجاد تغییرات مولکولی در نوکلئوتیدهای ژن کدکنندهٔ اسیدهای آمینه گلیکوپروتئین ویروس جهت بررسی تغییرات آنتی‌ژنیسیته، بیماریزایی و ایمنی‌زایی با فناوری ژنتیک معکوس توسط محققین بکار گرفته شده است. در سال ۲۰۱۰ Lihong Tao و همکارانش بر روی اهمیت و تأثیر پلیمراز و جهش R333Q گلیکوپروتئین گونه‌های Flury LEP و HEP واکسن هاری در شدت بیماریزایی تحقیق کردند (۲۱). در ۲۰۰۵ Milosz Faber و همکاران با ایجاد تغییری واحد در اسیدآمینه ۳۳۳ گلیکوپروتئین ویروس هاری، آسپارتیک اسید یا گلوتامیک اسید بجای آرژینین، ویروسی را بازیابی کردند که برای موش‌های مستعد ایمنی حتی پس از تزریق داخل جمجمه‌ای غیربیماریزا بود (۲۲). گزارشات مختلفی نیز در حمایت از ویژگی‌های ایمنی‌زایی سویه‌های PM و PV منتشر شده است. در یک گزارش نشان داده شده است که سویهٔ PV توانایی بالاتری از سویه‌های PM و LEP در ایجاد ایمنی بر علیه ژنوتیپ‌های دیگر ویروس هاری از جمله DUV دارد (۲۳). مطالعات دیگر از ویژگی‌های بالای PM در ایمنی‌زایی ضد هاری حمایت نموده‌اند.

www.SID.ir

تحقیقات نشان داده که آنتی‌بادی‌های تک دودمانی برپایهٔ واکسیناسیون موش با سویه PM توانایی شناسایی شاخص‌های آنتی‌ژنیک فضایی (Conformational) بر روی گلیکوپروتئین ویروس و خنثی‌سازی آن را دارند (۲۴). در پژوهش دیگری نیز گزارش شده که ISCOM (Immune Stimulating Complex) های تهیه شده بر پایهٔ سویه‌های PM و CVS ایمنی کافی در مقابل دوزهای کشندهٔ ویروس هاری در حیوان آزمایشگاهی ایجاد نموده‌اند (۲۵). در پژوهشی که Okoh و همکاران در ایمنی‌زایی بر علیه ۵ واریانت وحشی هاری در نیجریه انجام دادند نشان داد که واکسن ساخته شده با PM توانست تنها بر علیه یکی از این واریانت‌ها ایمنی ایجاد کند در حالی که سویه LEP توانست بر علیه هر ۵ واریانت ایمنی ایجاد نماید (۲۶). البته سویه‌های ذکر شده از نظر توالی اسیدآمینه در جایگاه مورد بحث در مطالعهٔ حاضر باهم یکسان هستند. چنین مطالعاتی می‌توانند پیشنهاد کنند که تجمیع توان ایمنی‌زایی سویه‌های واکسن هاری برای بهبود در ایمنی‌زایی آن می‌تواند روشی امیدوار کننده در ساخت واکسن‌های موثرتر باشد. گلیکوپروتئین پوشش ویروس هاری (RVGP) آنتی‌ژن اصلی ویروس هاری است و تنها جزء ویروسی موجود در کلیه واکسن‌های جدید هاری است که ارائه می‌شود. از زمانی که تکنولوژی DNA نوترکیب برای بیان گلیکوپروتئین ویروسی نوترکیب ایمونوژنیک (rRVGP) در دسترس قرار گرفت، روش‌های بسیاری بکار گرفته شده است. جدیدترین مطالعات در زمینه توسعه واکسن هاری بر پایه بیان rRVGP درون تنی *(in vivo)* بواسطه انتقال وکتور ویروسی به داخل بدن متمرکز شده است. این روش به عنوان پایه زیست فناوری برای نسل جدید واکسن‌های هاری در نظر گرفته می شود(۲۷).

با در نظر گرفتن بی خطری سویه‌های ویروسی مبدأ و مقصد در مطالعه حاضر و محدود نمودن تغییر ایجاد شده در سایت آنتی‌ژنیک مورد نظر، از ظهور فنوتیپ مضر و ناخواسته پرهیز و اطمینان حاصل شد. براساس اظهارات کارشناسان سازمان جهانی بهداشت، موفقیت در کنترل هاری در هر منطقه یا کشور سه رکن اساسی دارد که عبارتند از ۱) مشارکت جامعه، ۲) آموزش، آگاهی عمومی و انجام واکسیناسیون انبوه سگ‌ها، ۳) در دسترس بودن درمان پس از مواجهه برای مردم. با توجه به اینکه هاری بیماری جوامع محروم است، وجود یک واکسن ارزان و در عین حال کارآمد، مؤثرترین راه برای کنترل بیماری است. یک نکته مهم در این خصوص این است که، ملاک اصلی درتعیین ایمنی‌زایی واکسن‌های ضد هاری تولید شده یک آزمون حیوانی پرهزینه و غیر انسانی است. این آزمون علیرغم اتلاف تعداد زیاد حیوانات آزمایشگاهی، هنوز با روش برون تنی *(in vitro)* معتبر جایگزین نشده است. علت اصلی این است که مطالعات گذشته نشان داده است که خواص ایمنی‌زایی ویروس زودتر از خواص آنتی‌ژنیک آن کاهش می‌یابند (۲۸ ، ۲۹). لذا چنانچه بتوان به کمک ژنتیک معکوس، سویه‌ای طراحی کرد که آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی آن از همبستگی خوبی برخوردار باشند، می‌توان امیدوار بود که آزمون حیوانی برای تأیید ایمنی‌زایی واکسن، جای خود را به آزمون‌های برون تنی سریع‌تر و کم هزینه‌تر بدهند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی شده با ایجاد تغییر در ساختار پروتئین موثر در آنتی‌ژنیسیتی و ایمونوژنیسیتی ویروس هاری سویه‌ای بازیابی شود که بتوان از آن برای طراحی آزمون‌های کیفی و کمی مورد نیاز واکسن هاری استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله، از تمامی اشخاصی که با ارائه نظرات ارزشمند، ما را یاری کردند قدردانی می‌کنیم.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Sudhi Ranjan Garg, Rabies in Man and Animals, Springer India, 2014.
2. Rabies - epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Veterinary quarterly, 2017 VOL. 37, NO. 1, 212-251 [DOI:10.1080/01652176.2017.1343516] [PMID]
3. Kuzmina et al., Conservation of Binding Epitopes for Monoclonal Antibodies on the Rabies Virus Glycoprotein. J Antivir Antiretrovir 2013, 5:2. [DOI:10.4172/jaa.1000061]
4. Lihong Tao et al., Molecular Basis of Neurovirulence of Flury Rabies Virus Vaccine Strains: Importance of the Polymerase and the Glycoprotein R333Q Mutation.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Virology. 2010, 9; 84, (17):8926-8936 [DOI:10.1128/JVI.00787-10] [PMID] [PMCID]

5. Le Blanc et al, Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. Nature Cell Biology, (2005). 7(7), 653-664. [DOI:10.1038/ncb1269] [PMID] [PMCID]
6. Andrés Ross B. et al, Rabies virus glycoprotein: structure, immunogenicity and role in pathogenesis. Rev Chil Infect. 2008; 25 (Suppl):S 14-S 18
7. Kibruyesfa Bayou, Current Techniques and Applications of Reverse Genetics: An overview. International Journal of Genetics. 2017, 7(2): 31-37.
8. Christopher C. Stobart and Martin L. Moore. RNA virus Reverse Genetics and Vaccine Design. Review, Viruses 2014, 6: 2531-2550. [DOI:10.3390/v6072531] [PMID] [PMCID]
9. Radecke F, Spielhofer P, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA. EMBO J. 1995; 14(23):5773-84. [DOI:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x] [PMID] [PMCID]
10. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. Qβ DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Qβ phage formation in the bacterial host. Nature. 1978; 274:223-8. [DOI:10.1038/274223a0] [PMID]
11. Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin J, Palese P. Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. Cell. 1989; 59:1107-13. [DOI:10.1016/0092-8674(89)90766-6]
12. Ghaderi M, Sabahi F, Sadeghizadeh M, Khanlari Z, Jamaati A, Nasab SDM, et al. Construction of a Minigenome Rescue System for Measles Virus, AIK-c Strain. Iran J Biotech. 2014; 12(2):e18002. [DOI:10.5812/ijb.18002]
13. Ajorloo M., Bamdad T., Gholami A., Azadmanesh K. Assessment the efficiency of the constructed minigenome of rabies virus using PV strain as helper virus. Arch Iran Med. 2016; 19(5):335 - 41.
14. Mostafa Ghaderi, et al,Construction of an eGFP Expression Plasmid under Control of T7 Promoter and IRES Sequence for Assay of T7 RNA Polymerase Activity in Mammalian Cell Lines. Iranian Journal of Cancer Prevention, 2014; 3:137-41.
15. Ben P. H. Peeters, Olav S. de Leeuw, Guus Koch, Arno L. J. Gielkens. Rescue of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence. 1999, JOURNAL OF VIROLOGY, June, p. 5001-5009. [DOI:10.1128/JVI.73.6.5001-5009.1999] [PMID] [PMCID]
16. Ben Peeters, Olav de Leeuw, A single-plasmid reverse genetics system for the rescue of non-segmented negative-strand RNA viruses from cloned full-length cDNA, Journal of Virological Methods 248 (2017) 187-190. [DOI:10.1016/j.jviromet.2017.07.008] [PMID]
17. Ginés Ávila-Pérez, Aitor Nogales, Verónica Martín, Fernando Almazán and Luis Martínez-Sobrido, Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. 2018, Viruses, 10, 597. [DOI:10.3390/v10110597] [PMID] [PMCID]
18. Naoto Ito, Mutsuyo Takayama-Ito, Kentaro Yamada, Junji Hosokawa, Makoto Sugiyama, and Nobuyuki Minamoto, Improved Recovery of Rabies Virus from Cloned cDNA Using a Vaccinia Virus-Free Reverse Genetics System. 2003, Microbiol. Immunol. 47(8), 613-617. [DOI:10.1111/j.1348-0421.2003.tb03424.x] [PMID]
19. Prehaud C, Coulon P, Lafay F, Thiers C, Flamand A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. J Virology. 1988, 1;62(1):1-7. [DOI:10.1128/JVI.62.1.1-7.1988] [PMID] [PMCID]
20. Fletcher MA. Hessel L., Plotkin SA. Human diploid cell strains (HDCS) viral vaccines. Dev Biol Stand. 1998; 93:97-107.
21. Milosz Faber, Marie-Luise Faber, Amy Papaneri, and et al. A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. 2005, JOURNAL OF VIROLOGY, Nov., p. 14141-14148. [DOI:10.1128/JVI.79.22.14141-14148.2005] [PMID] [PMCID]
22. Milosz Faber, Marie-Luise Faber, Amy Papaneri, and et al. A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. 2005, JOURNAL OF VIROLOGY, Nov., p. 14141-14148. [DOI:10.1128/JVI.79.22.14141-14148.2005] [PMID] [PMCID]
23. Lafon M (1), Bourhy H, Sureau P. Immunity against the European bat rabies (Duvenhage) virus induced by rabies vaccines: an experimental study in mice. Vaccine. 1988 Aug; 6(4): 362-8. [DOI:10.1016/0264-410X(88)90184-3]
24. Bunschoten H(1), Gore M, Claassen IJ, Uytdehaag FG, Dietzschold B, Wunner WH, Osterhaus AD. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. J Gen Virol. 1989 Feb; 70 (Pt 2):291-8. [DOI:10.1099/0022-1317-70-2-291] [PMID]
25. Fekadu M, Shaddock JH, Ekström J, Osterhaus A, Sanderlin DW, Sundquist B, Morein B. An immune stimulating complex (ISCOM) subunit rabies vaccine protects dogs and mice against street rabies challenge. Vaccine. 1992; 10(3):192-7. [DOI:10.1016/0264-410X(92)90011-8]
26. Okoh AE, Umoh JU, Ezeokoli CD, Addo PB. Vaccination challenge studies with variants of street rabies virus isolated in Nigeria. Vaccine. 1988 Feb; 6(1): 19-24. [DOI:10.1016/0264-410X(88)90008-4]
27. Renato Mancini Astray, Soraia Attie Calil Jorge, Carlos Augusto Pereira. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. 2016, Arch Virol.

www.SID.ir

28. Mayner RE, Needy CF. Evaluation of the single radial-immunodiffusion assay for measuring the glycoprotein content of rabies vaccines. J Biol Stand. 1987 Jan; 15(1):1-10. [DOI:10.1016/0092-1157(87)90011-4]

29. Lyng J, Bentzon MW, Ferguson M, Fitzgerald EA. Rabies vaccine standardization: International Collaborative Study for the Characterization of the fifth International Standard for Rabies Vaccine. Biologicals. 1992 Dec; 20(4): 301-13. [DOI:10.1016/S1045-1056(05)80051-X]

www.SID.ir