جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تولید کلون ابراز کننده ژن گلیکوپروتئین B(gB) ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(HSV-۱) به منظور بیان پروتئین در یاخته‌های پستانداران

طراوت بامداد[۱]، محمد حسن روستایی[۲*]، مجید صادقی‌زاده[۳]، فریدون مهبودی[۴]، حوریه سلیمانجاهی[۵]

۱- دانش آموخته دکترا، گروه ویروس‌شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- استاد گروه ویروس‌شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳- استادیار گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی ، انستیتوپاستور ایران
۵- استادیار گروه ویروس‌شناسی ، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

هدف: گلیکوپروتئین B ویروس HSV-۱ یکی از گلیکوپروتئینهای غشایی ویروس است که در عفونت زایی ویروس نقش عمده‌ای ایفا می‌کند و از اهداف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. به منظور دستیابی به وکتوری که قادر به بیان این پروتئین در سلولهای پستانداران باشد، پژوهش حاضر انجام گرفت.

مواد و روشها: ژن گلیکو پروتئین B، استرین KOS، از داخل پلاسمید pAc-gB خارج و به وکتور pcDNA۳ انتقال داده شد و تحت کنترل پروموتور قوی ویروس سیتومگال جاسازی شد.تعیین جهت صحیح جاسازی ژن نسبت به پروموتور با بررسی الگوی هضم آنزیمی وکتورهای حاصل انجام گرفت و سپس بیان پروتئین در سیستم یوکاریوت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: به منظور بررسی توانایی بیان ژن در سلولهای پستانداران، وکتور با استفاده از لیپوزوم به درون سلولهای COS-۷ ترانس فکت شد و بیان پروتئین پس از ۷۲ ساعت به وسیله روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی HSV-۱ تأیید شد.

بحث و نتیجه گیری: کارایی ترانس فکشن سلولهای COS-۷ در این پژوهش نمایانگر کارآیی وکتور تهیه شده در تولید پروتئین gB بود. همچنین واکنش پروتئینهای بیان شده در سطح سلول با آنتی‌بادی اختصاصی HSV-۱ نشان دهنده ساختار آنتی‌ژنیک مناسب پروتئین می‌باشد و می‌توان از آن در مطالعات ایمنی‌زایی استفاده نمود

کلید واژگان: ژن گلیکوپروتئین B ، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ ، بیان ژن ، کلونینگ ژن، وکتور پستانی.

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی، صندوق پستی ۱۱۱- ۲۰۱۴۱۱۵
Email:Rustamh@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱- مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ۱ (HSV-۱)[1] از شایعترین عوامل عفونتهای ویروسی در انسان است که تقریباً در سراسر دنیا انتشار دارد[۱] و به سبب سادگی راه انتقال هر سال به میزان قابل توجهی به تعداد افراد آلوده به آن افزوده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که حدود ۸۰٪ افراد دنیا به یکی از دو تیپ این ویروس آلوده هستند [۲]. ویروس HSV-۱ طیف وسیعی از بیماریها اعم از زخمهای دردناک ناحیه صورت و دهان تا حالتهای کشنده‌ای از آنسفالیت را ایجاد می کند [۳]. علاوه بر این HSV-۱ شایعترین عامل ویروسی عفونتهای چشمی و کوری در کشورهای توسعه یافته است[۲]. خاصیت نهفتگی ویروس در گانگلیونهای عصبی افراد آلوده و عودهای مکرر بیماری نه تنها به شیوع بیشتر ویروس کمک می‌کند، بلکه پیشگیری و درمان آن را با مشکلات عدیده‌ای روبرو می‌کند که تا امروز نیز دستیابی به راه حلی مناسب برای آن را ناممکن ساخته است. واکسیناسیون علیه HSV-۱ علاوه بر این که مشابه سایر عوامل عفونی، در پیشگیری از عفونت اولیه اهمیت دارد، بلکه از لحاظ درمانی و ممانعت از عود بیماری نیز مهم می‌باشد [۹] و در کنترل بیماری نقش ارزشمندی ایفا می‌کند .

در سالهای اخیر واکسنهای DNA و واکسنهای زیر واحدی افق جدیدی را در کنترل بیماریهای عفونی گشوده‌اند. گزارشهایی از ایمن‌سازی به وسیله این واکسنها که حاوی ژنها یا پروتئینهای مربوط به گلیکوپروتئینهای مختلف HSV-۱ می‌باشند، وجود دارد که بیانگر مؤثر بودن این قبیل واکسنها در کنترل عفونت ناشی از این ویروس است[۶،۵]. علاوه بر این نشان داده شده که همراه کردن DNA واکسنها با دوزهای یادآور واکسن، شامل همان پروتئین، پاسخهای ایمنی را تقویت می‌کند[۷]. ایمن‌سازی توسط DNA واکسنها یا پروتئینهای نوترکیب ویروسی مستلزم تهیه وکتور ابراز کننده مناسبی است که بتواند در سلولهای یوکاریوتی بیان شده و پروتئینی مشابه پروتئینهای ویروسی با گلیکوزیلاسیون مناسب تولید نماید، لذا تهیه چنین وکتوری در مطالعات واکسیناسیون کاربرد وسیعی دارد.

1. Herpes simplex virus type1

گلیکوپروتئین B(gB) ویروس HSV-۱ یکی از ۱۱ گلیکوپروتئین سطحی ویروس است که در عفونت زایی و پاتوژنز آن نقش مهمی دارد [۸]. gB مسؤول اتصال ویروس به رسپتورهای سطح سلول و فیوژن غشایی است، لذا از اهداف سیستم ایمنی محسوب می‌شود و می‌تواند به عنوان یکی از پروتئینهای مناسب برای واکسیناسیون استفاده شود [۲]. ژن gB دارای ۲۷۰۰ نوکلئوتید است که کدکننده یک پروتئین غشایی با ۶ محل گلیکوزیله شده می‌باشد[۹].

در پژوهش حاضر این ژن تحت کنترل پروموتورویروس CMV دروکتورpcDNA۳ جاسازی شد و پس از تأیید قرارگرفتن ژن با مسیر صحیح به ، بیان پروتئین در سلولهای COS-۷ با استفاده از روش ایمنوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

۲-مواد و روش کار

۲-۱- کلون حاوی ژن gB

کلون pAC-gB دارای ژن gB استرین KOS ویروس HSV-۱، از پروفسور غیاثی از اوکلا آمریکا، دریافت شد. وکتور pAC-gB از پلاسمید PUC۸ مشتق شده، و دارای ژن ایجاد مقاومت در برابر آمپی‌سیلین و دو محل برای اثر آنزیم *BamH۱* در دو پایانه ژن gB است[۱۰].

۲-۲ یاخته‌های باکتری

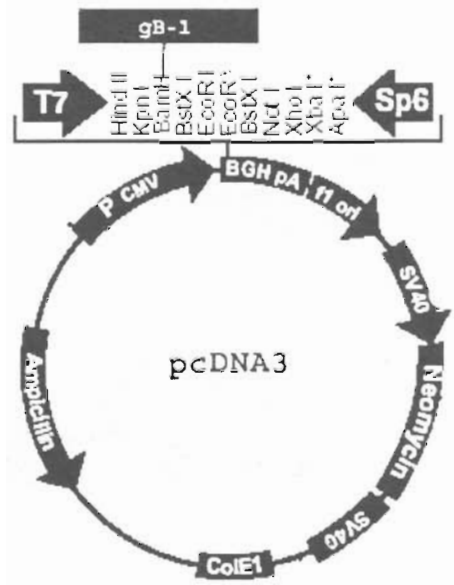
در این پژوهش از سویهTop۱۰F باکتری *E.coli* استفاده شد. این سویه وجد ژن مقاومت به تتراسیکلین می‌باشد، لذا به محیط کشت به میزان ۵۰μg/ ml تتراسیکلین اضافه شد.

۲-۳- ناقل ابراز کننده[2]

برای ابراز ژن gB در یاخته‌های پستانداران، از وکتور pcDNA۳ استفاده شد (شکل ۱).

2. Expression vector

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



شکل ۱طرح شماتیک وکتورpcDNA۳ و محل جاسازی ژن gB در آن

۲-٤- استخراج ژن gB

برای تکثیر پلاسمید حاوی ژن gB از یاخته‌های مستعد شده Top۱۰F´ استفاده شد. روش مستعد کردن باکتری مطابق روش معمول کلرید کلسیم[۱۱] با استفاده از کلرید کلسیم ۵۰mM انجام گرفت. به منظور انتقال DNA به درون باکتریها، مقدار µl ۳-۲ از پلاسمید به ۵۰ml تعلیق باکتری اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه قرار دادن نمونه در یخ، بلافاصله به حمام C ٤۲ منتقل شد و پس از ۲ دقیقه، مجدداً به ظرف حاوی یخ منتقل گردید. باکتری پذیرنده DNA در ml ۲-۱ محیط LB بدون آمپی‌سیلین تعلیق و در C ۳۷ به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت قرار داده شد تا باکتریها شد کرده و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک بیان شود، سپس رسوب باکتری در محیط کشت LB-agar دارای µg/ml ۱۰۰ آمپی‌سیلین رشد داده شد.

پس از انکوباسیون در C ۳۷ به مدت ۲٤ ساعت، تعدادی از کلنی‌های حاصل به طور جداگانه به منظور بررسی وجود پلاسمید درمحیط LB دارای آنتی‌بیوتیک تکثیر داده شد و استخراج پلاسمید به وسیله روش لیزقلیایی[۱۲] انجام گرفت. پلاسمیدهای حاصل در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد و با توجه به اندازه آنها در ژل، جهت تأیید وجود قطعه gB توسط آنزیم BamHI هضم شد. (شکل ۲).

یکی از نمونه‌های باکتری دارای وکتور pAC-gB ، برای تولید مقدار انبوه ژن، درml ۵۰۰ محیط LB تکثیر داده شد و تخلیص پلاسمید با استفاده از روش لیز قلیایی سامبروک- راسل [۱۱] انجام گرفت. وکتور حاصل به وسیله آنزیم *BamHI* هضم و پس از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪، قطعه ژل حاوی باند مورد نظر بریده شد و پس از انتقال به کیسه دیالیز، با ادامه عمل الکتروفورز، ژن gB از درون ژل خارج شد. سپس با استفاده از فنل و کلروفرم، نمونه DNA به دست آمده تیمار و خالص گردید.

۲-۵- آماده‌سازی وکتور بیان کننده

وکتور بیان کننده نیز مطابق روشهای فوق ابتدا تکثیر و خالص‌سازی شد. پس از هضم آن به وسیله آنزیم *BamHI* به منظور جلوگیری از تشکیل پیوندهای بازی بین پایانه‌های یکسان، حاصل از هضم آنزیم که به حلقوی شدن مجدد وکتور منجر می‌شود، فسفرانتهای ´۵ دو رشته به وسیله آنزیم آلکالن فسفاتاز حذف شد.

۲-٦- جاسازی ژن درون وکتور

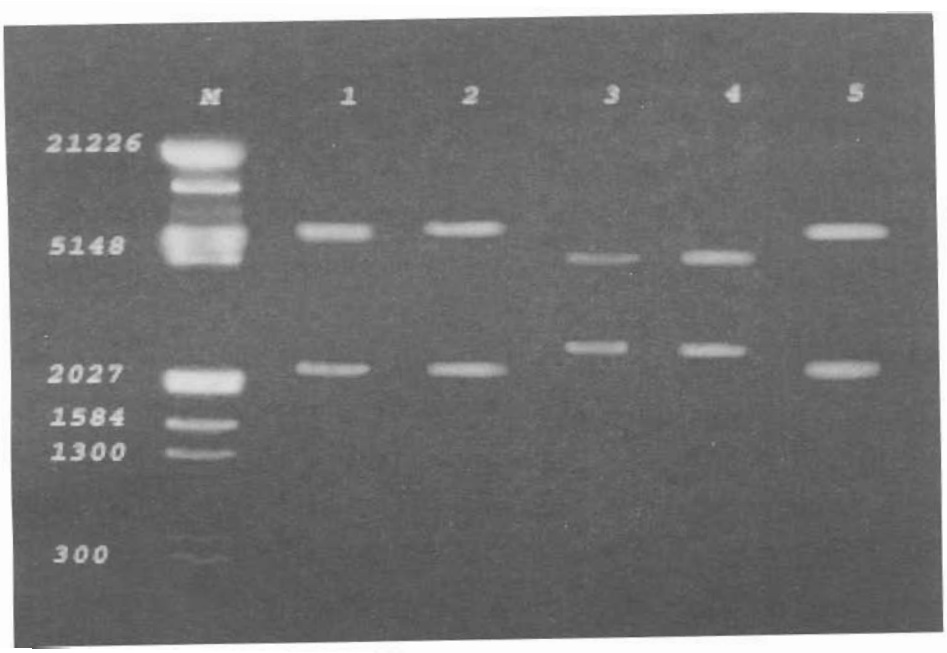
مقدار ng ۱۵۰ از وکتور آماده شدهٔ فوق به همراه ۳ برابر نسبت مولی از ژن gB و مقدار مناسب از آنزیم لیگاز T٤DNA در محیط بافری مناسب به مدت ۲٤ ساعت در C ٤ قرار داده شد.پس از طی این مدت وکتورهای حاصل به درون یاخته‌های باکتری منتقل و تعدادی از کلنی‌ها از نظر وجود وکتور دارای ژن gB بررسی شد.

۲-۷- بررسی صحت جاسازی ژن

وکتورهای استخراج شده، در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد و نمونه‌های مناسب برای هضم آنزیمی انتخاب شد. این نمونه‌ها ابتدا به وسیله آنزیم *BamHI* هضم شدند تا از وجود قطعه gB در درون آنها اطمینان حاصل شود. نمونه‌های واجد قطعه

شکل ۲ الکتروفورز پلاسمید pAc-gB در آگاروز ۱٪ قبل و بعد از هضم با آنزیم BamHI. (۲) پلاسمید هضم نشده- (۳) پلاسمید هضم شده و خارج شدن قطعه ۲۸۰۰ نوکلئوتیدی gB از درون پلاسمید

مربوط به ژن مورد نظر به منظور بررسی مسیر صحیح جاسازی ژن نسبت به پروموتر، به وسیله آنزیم *PvuI* که واجد یک محل اثر در وکتور و قطعه جاسازی شده بود، هضم و باتوجه به الگوی به دست آمده از الکتروفورز آنها در آگاروز ۱٪، وکتورهای مناسب (حاوی ژن جاسازی شده در مسیر درست) انتخاب شد(شکل ۳).



شکل ۳ الکتروفورز تعدادی از وکتورهای حاصل از عمل لایگیشن پس از هضم با آنزیم PvuI .

۲-۸- ترانس فکشن

سلولهای COS-۷ در میکروپلیتهای ٦ خانه بر روی لامل کشت داده شد و پس از تشکیل تک لایه‌ای با حدود ۷۰-٦۰ ٪ سلول، با استفاده از لیپوزوم DoTAP (۱۸۱۱۱۷، Roche) عمل ترانس فکشن مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به طور خلاصه، مقدار DNA ۵μg با ۳۰μl لیپوزوم در محیط بافری HBS(۲۰ mM Hepes, ۱۵۰ mM NaCl, pH ۷/۵) مخلوط و پس از انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای در دمای C ۲۵ به سلولها اضافه شد. علاوه بر این برای دستیابی به نمونه‌های کنترل منفی، سلولها به وسیله پلاسمید بدون ژن نیز ترانس فکت شدند.

۲-۹- ایمنوفلورسانس

پس از ۷۲ ساعت، سلولها از نظر تولید پروتئین gB بررسی شدند. به این منظور لاملهای دارای سلولهای ترانس فکت شده، پس از سه بار شستشوی ده دقیقه‌ای با بافر PBS (۲۰mM، NaH۲PO٤ ،H۲O ۵۰Na۲HPO٤ ،۷H۲ O mM) توسط متانول ۱۰۰٪ برای ۱۰ دقیقه در C ۲۰- تثبیت شدند. پس از سه بار شستشوی مجدد نمونه، رقت $^{1}/_{50}$ از سرم انسانی، دارای آنتی‌بادی ضد HSV-۱ ، به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ٤۵ دقیقه در اتاقک مرطوب در C ۳۷ قرار داده‌شد. عمل شستشو مطابق قبل انجام گرفت و آنتی‌بادی ثانویه متصل به فلورسئین ایزوتیوسیانات (بیوژن،BA-۱۱۸) با رقت $^{1}/_{100}$ به نمونه‌ها اضافه شد، مراحل انکوباسیون و شستشو مطابق قبل انجام شد. لاملها به وسیله محلول گلیسرین ۵۰٪ در بافر PBS و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد[۱۳].

۳- نتایج

نتایج حاصل از ترنس فرم کردن باکتری *E.coli* با وکتور pAcgB-۱ نشان داد که باکتری پذیرنده این وکتور توانایی تکثیر در محیط دارای آمپی‌سیلین را به دست آورده است. این وکتور حاوی ژن ۲۷۰۰ نوکلئوتیدی gB HSV-۱ است که در پایانه‌های آن سکانسهای محل اثر آنزیم *BamHI* اضافه شده است، لذا هضم آنزیمی وکتور با آنزیم مذکور و بررسی نتیجه حاصل در ژل آگاروز مؤید وجود ژن gB در درون وکتور بود.

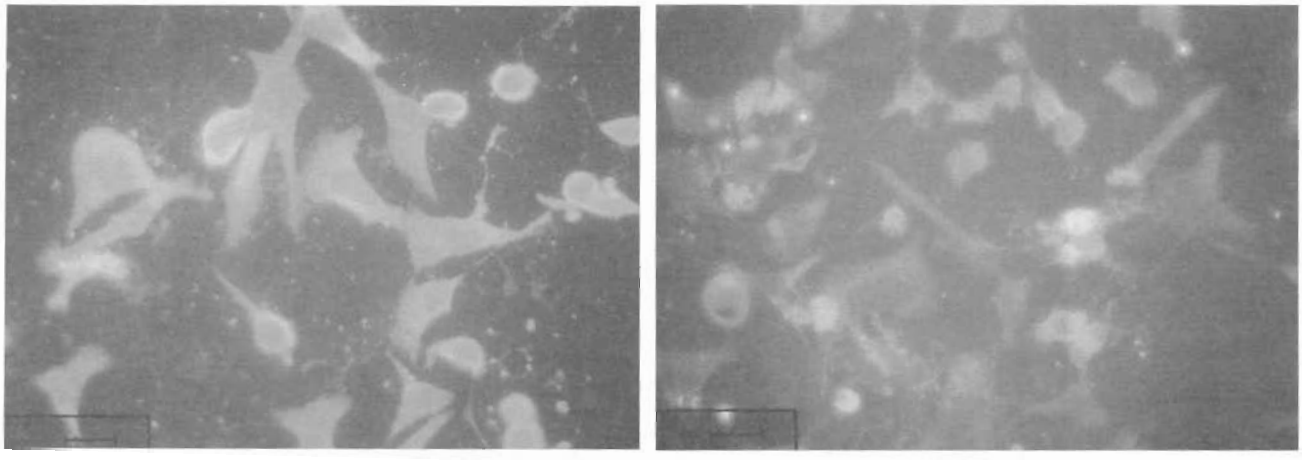
نتیجه هضم ناقلهای بیانی، که قطعه ژن gB در آنها جاسازی شده بود، با آنزیم *PvuI* و الکتروفورز قطعات به دست آمده، در شکل شماره ۳ آورده شده است. همانطور که در شکل نشان داده شده است دو نوع وکتور تولید گردیده که هضم یکی از آنها منجر به پیدایش قطعات دارای ٤۸٦۵ و ۳۳۸۱ جفت نوکلئوتید است. این وکتورها حاوی ژن هدف با مسیر جاسازی صحیح می‌باشد. نوع دوم متشکل از ناقلهایی است که پس از هضم و الکتروفورز، الگوی مربوط به قطعات ۵۹۰۷ و ۲۳۳۹ را ارایه داد، که بیانگر جاسازی ژن هدف در مسیر عکس پروموتر در این ناقلها است.

یکی از وکتورهایی که ژن gB با مسیر صحیح در آن جاسازی شده بود، برای ترانس فکت نمودن سلولهای COS-۷ به کار گرفته شد. ۷۲ ساعت پس از ترانس فکشن، بیان پروتئین در سطح غشاهای سلولی به وسیله آنتی‌بادی اختصاصی با استفاده از روش ایمنوفلور سانس غیر مستقیم بررسی شد. نتایج نشان دهنده ظهور فلورسانس در سطح درصدی از سلولهاست(شکل ٤).

٤- بحث

ویروس HSV-۱ عامل بیماریهای متنوعی در انسان است. این ویروس در دنیا انتشار وسیعی دارد اما متأسفانه تاکنون تلاشها برای تهیه واکسنی مؤثر علیه آن با موفقیت کامل همراه نبوده است[۲]. در سالهای اخیر استفاده از پروتئینهای نو ترکیب و واکسنهای DNA، به عنوان روشهای نوین واکسیناسیون، احتمال دستیابی به واکسنهای مؤثر برای پیشگیری از بیماریهای ویروسی را تقویت کرده است. هر چند چنین تحقیقاتی در مورد هرپس ویروسها نیز انجام گرفته که بسیاری از آنها نشان‌دهندهٔ کارآیی این واکسنهاست، لیکن هنوز هم تحقیقات فراوانی لازم است تا از آن به عنوان یک واکسن مؤثر استفاده شود.

بسیاری از پروتئینهای ویروس هرپس، قادر به تحریک سیستم ایمنی می‌باشند. در طی عفونت HSV-۱ آنتی‌بادیهای متعددی علیه پروتئینهای IcP-IcP٤-IcP٦-IcP۱٦ و همچنین تعدادی از گلیلو پروتئینهای سطحی ویروس و عمدتاً gE-gG-gB-gD-gC تولید می‌شود. از این میان گلیکوپروتئینهای C،B و D از نظر تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادیهای خنثی کننده



شکل ٤ ایمنوفلورسانس سلولهای Cos-۷ ترانس فکت شده با وکتور pcDNA-gB. (۱) سلول مثبت. (۲) سلول شاهد منفی.

ویروس حائز اهمیت است، و کاندیداهای مناسبی برای تهیه واکسن محسوب می‌شوند[۱۲]. gB مسؤول اتصال ویروس به پروتئوگلیکانهای سطح سلول بوده، علاوه بر این در فیوژن غشای ویروس و غشای سیتوپلاسمی در طی نفوذ ویروس به درون سلول نقش دارد، لذا فعالیت سیستم ایمنی علیه آن می‌تواند فعالیت ویروس را خنثی نماید[۱۵]. ژن gB محصول ژن $UL_{۲۷}$ ویروس است. پلی‌پپتید پیش‌ساز پروتئین دارای ۹۰٤ اسید آمینه است که ۲۹-۳۰ اسید آمینه بخش آمینی آن به صورت توالی علامتی از مولکول جدا می‌شود. فرم گلیکوزیله پروتئین در پوشینه ویروس و سطح سلولهای آلوده قابل ردیابی است[۱٦].

در این پژوهش سعی شد تا ژن gB در یک وکتور قابل بیان در سلولهای پوکاریوت کلون شود تا بتوان در آینده برای مطالعات مربوط به واکسیناسیون از آن استفاده کرد. پلاسمید تولید مورد استفاده، ژن مذکور با تغییر محلهای اثر آنزیم *BamH1* در پایانه‌های آن، جاسازی شده بود. لذا با هضم آنزیمی، ژن مورد نظر خارج و درون وکتور pcDNA۳ جاسازی شد.

هر چند بیان گلیکوپروتئین مذکور در سیستمهای پروکاریوتی گزارش شده است[۲۸] وجود ٦ محل گلیکوزاسیون در این پروتئین باعث می‌شود که تا چنین پروتئینهایی را نتوان در مطالعات واکسیناسیون مورد استفاده قرار داد. حذف کربوهیدراتها از ساختار یک گلیکوپروتئین ممکن است شکل فضایی آن را به نحوی تغییر دهد که قادر به اعمال خاصیت آنتی ژنسیته مشابه با فرم گلیکوزیله خود نباشد[۲۹] این تغییر در مورد گلیکوپروتئینهایی مانند gB که در بخشی از ساختمان خود دارای اپی‌توپهای ناپیوسته هستند [۳۰] بیشتر اهمیت می‌یابد [۲۹] . از طرف دیگر گلیکوزیلاسیون و پردازش پروتئینهای ویروسی به‌وسیله آنزیمهای سلولی صورت می‌گیرد، لذا گلیکوزیلاسیون در سیستمهای مختلف ممکن است دقیقاً از یک الگوی ثابت پیروی نکند. با توجه به این مسائل به نظر می‌رسد که بهترین سیستم جهت بیان پروتئین سیستمی است که تا حد امکان مشابه سلولهای انسانی عمل می‌کند.

به منظور بررسی بیان ژن و تولید پروتئین در سلولهای پستانداران، ترانس فکشن سلولهای COS-۷ با استفاده از وکتور حاصل انجام گرفت. ترانس فکشن با استفاده از روشهای مختلف انجام می‌گیرد که یکی از کارآمدترین آنها لیپوزومها هستند TAP D۰ یک لیپوزوم کاتیونی است که عدم سمیت برای سلولها، نیاز به DNA کم و کارآیی ترانس فکشن از جمله مزایای آن است. سلولهای COS-۷ نیز که از کلیه میمون منشأ گرفته و به وسیله

DNA ویروس SV_{40} ترانس فورم شده‌اند، سلولهای مناسبی برای تکثیر وکتورهای دارای SV_{40} ori از جمله pcDNA ۳ می‌باشند [۱۱].

کارآیی ترانس فکشن سلولهای COS-۷ علاوه بر تأیید ادعاهای فوق، نمایانگر کارآیی وکتور تهیه شده در تولید پروتئین gB بود. همچنین واکنش پروتئینهای بیان شده در سطح سلول با آنتی‌بادی اختصاصی HSV-۱ نشان‌دهنده ساختار آنتی‌ژنیک مناسب پروتئین است که می‌توان از آن در مطالعات ایمنی‌زایی استفاده کرد.

۵- منابع

[1] Berstain DI, Lawrence RS. Herpes simplexvirus vaccines.Vaccine 1999;17:1681-1689.

[2] Chiarantini L, Argnani R, Zucchini S. Red blood cells as delivery system for recombinant HSV-1 glycoprotein B: immunogenicity and protection in mice. Vaccine 1996, 15:276-280.

[3] Cunningham AL, Mikloska Z. The holy gril:immune control of human herpes simplex virus infection and disease.Herpes 2001; Supplement1:6A-9A.

[4] Caselli E, Balboni P, Incorvaia C, Rafaela A, Parmeggiani F, Cassai E,Manservigi R. Local and systemic inoculation of DNA or protein gB1s-based vaccines induce a protective immunity against rabbit ocular HSV-1 infection.Vaccine2001;19:1225-1231.

[5] Deshpade SP, Udayasankar K, Barry TR. Why do we lack an effective vaccine against herpes simplex virus infections? Microbes and infect 2000; 2:973-978.

[6] Esiri M. Potential for HSV-1 vaccine to reduce risk of HSV-1 encephalitis and /or Alzheimer disease? Neorobiology of Aging 2001; 22:711-713.

[7] Hwang YS, Spruance SL. The epidemiology of uncommon herpes simplex virus type 1 infections. Herpes 1999;6:16-19.

[8] Stanberry LR, Cunningham L, Mindel A, Scott L. Prospect for control of herpes simplex virus disease through immunization. Clin. Infect. Dis. 2000 ; 30 :495-566.

[9] StanberryLR.Herpesimmunization:-onthethreshold. Journal of European Academy of Dermathology and Vetereology 1996; 7:120-128.

[10] Caseli E, Balboni PG, Incorvaia C, Argnani R. Local and systemic inoculation of DNA or protein gB1s –based vaccines induce a protective immunity against rabbit ocular HSV 1 infection. Vaccine 2001; 19:1225-1231.

[11] Master JC,Twomey TA, Tepe ET, Bernstein DI. Immunity induced by DNA immunization with herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and C. Vaccine. 2000;18:875-883.

[12] Nass PH, Elkins KL,Weir JP. Protective immunity against herpes simplex virus generated by DNA vaccination compared

to natural infection. Vaccine 2001; 19:1538-1546.

[13] Pachuk AC, Higgins TJ, Bernstein DI. Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs. J Infec Dis 2000; 182:1304-1318.

[14] Eo SK,Gierynska M, Kamar AA, Rose BT. Prime-boost immunization with DNA vaccine :mucosal route of administration changes the rules. J Immunol 2001;166:5473-5479.

[15] Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. The Lancet 2001; 357:1513-1518.

[16] Knipe DM., Howley PM, editors. Fieds Virology,New York: Lippincott Willisms & Wilkins; 2001.

[17] McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. J GenVirol 1988; 69: 1531-1574.

[18] Bzik DJ ,Fox BA, Deluca NA, Person S. Nucleotide sequence specifying the glycoprotein gene , gB ,of herpes simplex virus type 1.Virology 1984; 133:301-314.

[19] Ghiasi H, Kaiwar R, Nesburn AB, Wechsler SL. Expressiion of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B in insect cells. Virus Res 1991; 22:25-39.

[20] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning –a laboratory manual,2nd ed. New York: Cold Spring Press; 2001.p. 1.116-1.118.

[21] Karcher SJ. Molecular biology-a project approach, California: Academic Press, 1995. p. 102-103.

[22] Doyle K. Promega, protocols and applications guide, New York: Promega Corporation; 1996, p. 45-46.

[23] McClements WL, Armstrong ME, Keys RD, Liu MA. The prophylactic effect of immunization with DNA encoding herpes simplex virus glycoproteins on HSV-induced disease in guinea pigs. Vaccins 1996; 15:857-860.

[24] Baghian A, Chouljeko VN, Dauvergne O, Newman MJ, Baghian S, KousoulasKG. Protective immunity against lethal HSV-1 challenge in mice by nucleic acid-based immunisation with herpes simplex virus-1 genes specifying glycoproteins gB and gD. J Med Microbio 2002; 51:350-357.

[25] Stanberry L. Genital and neonatal herpes. New York: Willey & sons1996.

[26] McClemnts WL, Armstrang ME, Keys RD, Liu MA. The prophylactic effects of immunization with DNA encoding herpes simplex virus glycoproteins on HSV-induced disease in guinepigs. Vaccine1996; 15:857-860.

[27] Kosovsky J,Vojvodova A, Oravcova I. Herpes simplex virus 1(HSV-1) Strain HSZP glycoprotein B gene: comparison of mutations among strains differing in virulence. Virus Gene 2000; 20:27-33.

[28] Person S, Warner SC, Bzik D J, Debory C, Fox BA. Expression in bacteria of gB

glycoprotein coding sequences of herpes simplex virus type 2.Gene 1985; 5:279-287.

[29] Manservigi R, Grossi MP, Gualandri R, Balboni PG. Protection from herpes simplex virus lethal and latent infection by secreted recombinant glycoprotein B constitutively expressed in human cells with a BK virus episomal vector. J Virol 1990; 64: 431-436.

[30] Qadri I, Gimeno C, Navarro D, Pereira L. Mutations in conformation dependent domains of herpes simplex virus 1 glycoprotein B affect the antigenic properties, dimerization , and transport of the molecule. Virology 1991; 180: 135-152.

[31]. Giese M. DNA antiviral vaccines : new evelopments and approaches-a review. Virus Genes1998;17:219-232.