دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفتم، شماره ۱، صفحه ۱- ۱۰ (شهریور۱۳۸۳)

القاء پاسخ ایمنی هومورال علیه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با به کار گیری گلیکوپروتئین نوترکیب D ویروس در موش های BALB/C

دکتر حوریه سلیمانجاهی*[۱]، دکتر محمدحسن روستایی[۲]، دکتر محمدجواد رسایی[۳]، ، دکتر انوشیروان کاظم نژاد[۴]، دکتر زهرا مشکات[۵]، دکتر کیوان زندی[۶]

[۱] استادیارگروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] استاد گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۴] دانشیار گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۵] دانشجوی دکتری ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۶] استادیار ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

چکیده :

یکی از مهمترین گلیکو پروتئین های سطحی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک(HSV-1) ، گلیکو پروتئینD (gpD) است که با داشتن ویژگی آنتی ژنیسیتی و ایمیونوژنیسیتی بالا, باعث القاء پاسخ ایمنی در بدن میزبان می شود. با توجه به شباهت زیادی که بین زنجیر نوکلئوتیدهای ژن کد کننده gpD بین این ویروس و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲(HSV-2) وجود دارد، بنابر این کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن ریکامبیننت محسوب می شود. در این پژوهش برای تولید gpD نوترکیب ابتدا با کیولوویروس حاوی ژن کامل gpD در یاخته های(Spodoptera frugiperda) Sf9 تکثیر داده و ۴-۵ روز پس از انکوباسیون، یاخته های آلوده جمع آوری وتحت عمل سونیکاسیون قرار گرفت. پس از اندازه گیری مقدار پروتئین موجود در شیرابه سلولی، در کنار شیرابه حاصل از یاخته های شاهد SDS-PAGE و آنگاه با محلول کوماسی بلو رنگ آمیزی و الگوی الکتروفورز پروتئین ها تعیین شد. در مرحله بعد با انتقال پروتئین های الکتروفورز شده از روی ژل به کاغذ نیتروسلولز و با استفاده از به ترتیب آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی، آنتی بادی ضد ایمنوگلوبولین های انسان نشاندار، و سوبسترای مناسب روش وسترن بلاتینگ انجام و صحت وجود gpD نوترکیب تأیید شد. به منظور بررسی ویژگی ایمن زایی gpD نوترکیب تولیدی اقدام به تزریق داخل عضلانی به یک گروه ۷ تایی از موش های BALB/c سه هفته ای شد. ضمناً همین تعداد موش نیز برای گروه شاهد و گروه ویروس که به ترتیب با PBS و ویروس حاد مورد تلقیح قرار گرفته بودند, مورد استفاده قرار گرفت. جمعاً ۳ تزریق با فواصل ۲۱ روز انجام شد و ۲۱ روز بعد از آخرین تزریق از تمام موش ها خونگیری به عمل آمد. آزمایش خنثی سازی ویروس حاد با استفاده از سرم خون موش های گروههای سه گانه انجام شد و نتایج نشان داد که gpD نوترکیب توانسته بود تا در موش های تزریق شده باعث ایجاد آنتی بادی های خنثی کننده ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک شود.

واژگان کلیدی : گلیکوپروتئین D، ایمنوژنیسیتی، هرپس سیمپلکس تیپ یک با کیولوویروس، تست خنثی سازی ویروس

* تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ویروس شناسی، صندوق پستی ۱۱۱- ۱۴۱۱۵

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1) از عوامل مهم بیماری زا در انسان است (۲،۱). این ویروس دارای ژنوم متشکل از DNA دو رشته ای، کپسید بیست وجهی، یک پوشش پروتئینی بی شکل به نام تگومنت[1] در اطراف کپسید و یک پوشش دو لایه لیپوپروتئینی در خارجی ترین بخش ویروس است که حداقل ۱۱ گلیکوپروتئین در آن وجود دارد که پنج تا از آنها برای ورود ویروس به یاخته میزبان و شش تا نیز برای انتشار ویروس بین سلول ها به کار گرفته می شود(۳). ویروس توسط ترشحات آلوده که از بینی یا دهان افراد آلوده خارج می شود باعث ایجاد آلودگی در افراد سالم حساس می شود. این ویروس طیف وسیعی از عوارض را در میزبان به وجود می آورد که از عفونت های بدون علایم تا کراتیت منجر به کوری و آنسفالیت مرگبار در تغییر است (۴). با توجه به اینکه اغلب گلیکوپروتئینهای سطح ویروس باعث تحریک سیستم ایمنی می شوند (۵) بنابراین دو بازوی ایمنی هومورال و ایمنی سلولی علیه ویروس راه اندازی می شود و ویروس برای فرار از آنها در عقده های عصبی تریژمینال بدون اینکه تکثیر نماید به صورت خفته در می آید و هر زمان که در اثر فشارهای فیزیکی یا فیزیولوژیکی سیستم ایمنی ضعیف شود فعالیت مجدد ویروس که همراه با بروز علایم بالینی است مجدداً آغاز می شود (۶).

با توجه به روند بیماریزایی HSV-1 و انتشار فراوانی که بین انسانها دارد تلاش های فراوانی به منظور تولید واکسن مؤثر جهت پیشگیری از بروز بیماری و در صورت امکان جلوگیری از خفتگی HSV-1 به عمل آمده است که اغلب با عدم موفقیت همراه بوده است. از جمله واکسن هایی که مورد توجه محققین قرار دارد DNA واکسنها و واکسن های نوترکیب هستند که در آنها ژن و یا ژنهای مسئول کددهی یک یا چند گلیکوپروتئین سطح ویروس وجود دارد. یکی از مهمترین ایمنوژن های ویروس گلیکوپروتئین D (gpD) ویروس است، که نقش اساسی در ورود ویروس به یاخته های حساس پستانداران ایفا مـی کند (۹-۷). این گلیکوپروتئین به مولکولهای مختلف یاخته میزبان که از نظر ساختمانی به سه خانواده مولکولی مجزا شامل: TNF [2]، فوق خانواده ایمونوگلوبولین[3] و هپاران سولفات[4] تعلق دارند متصل می شود و از این طریق به کمک گلیکوپروتئین های دیگر ویروس نظیر gpB و gpC که با هپاران سولفات پروتئوگلیکان ها[5] اتصال می یابند رفته و در نتیجه بین ویروس و رسپتورهای سطح یاخته ارتباط محکمی برقرار می شود (۱۴-۱۰). با توجه به ویژگی های gpD و توانایی آن در تحریک سیستم ایمنی میزبان، به عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن زیر واحدی[6] مورد توجه قرار گرفته است، زیرا که هدف مناسبی برای ایمنی هومورال و سلولی به حساب می آید (۲۰-۱۵).

در این پژوهش سعی گردید تا با استفاده از باکیولو ویروس حاوی ژن gpD از HSV-1، و تکثیر آن در یاخته های Sf9 ، اقدام به تولید مقدار قابل ملاحظه ای از گلیکوپروتئین D و استخراج آن بشود. سپس gpD تولیدی به موشهای BALB/c حساس تزریق و توانایی آن در القاء ایمنی هومورال در این موشها بررسی و با نتایجی که از گروههای شاهد به دست آمد مقایسه شد. نتیجه این پژوهش نشان داد که اگر سیستم باکیولو ویروس، که برای تکثیر آن باید از یاخته های اوکاریوتیک استفاده شود، به عنوان یک ناقل بیان کننده به خوبی به کار گرفته شود تولید پروتئین نوترکیب در حد قابل قبولی خواهد بود. نکته بسیار مهم این است که در این سیستم پروتئین نوترکیب تولیدی دارای فولدینگ و گلیکوزیلاسیون صحیح خواهد بود و تغییرات پس از ترجمه که در سیستم پروکاریوتیک به درستی انجام نمی شود، در این سیستم بسیار بهترصورت می پذیرد و گلیکوپروتئین تولید

[1] . Tegument

[2] . Tumor necrosis factor
[3] . Immunoglobulin superfamily
[4] . heparan sulfate
[5] . Heparan sulfate proteoglycans
[6] . Subunit vaccine

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

شده بسیاری از خواص گلیکوپروتئین طبیعی را خواهد داشت(۲۴-۲۱).

مواد و روشها

باکیولو ویروس ابراز کننده گلیکوپروتئین D مربوط به HSV-1

باکیولو ویروس نوترکیب حاوی ژن کدکننده gpD ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک توسط پروفسور غیاثی از UCLA آمریکا در اختیار پژوهندگان قرار گرفت. این ویروس فقط در دوبالان آفت گیاهان ایجاد بیماری می کند و هیچ خطری برای جمعیت انسانی یا دامی ندارد و به همین دلیل کار کردن با آن بسیار آسان است.

ویروس حاد HSV-1

ویروس از مایع وزیکول های هرپسی روی لب یکی از مراجعین به گروه ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس جدا و با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی تعیین هویت شده بود.

یاخته های Sf9 و محیط کشت

یاخته های sf9 از یک کلون از یاخته های تخمدان لارو[1] حشره اسپودوپترا فروجیپردا[2] (۲۱) منشاء گرفته که بهترین دما برای رشد آنها ۲۶-۲۷ درجه سانتی گراد است و بستر بسیار مناسبی برای تکثیر ویروس باکیولو می باشند. با توجه به اینکه درصد ترشح پروتئین در این یاخته ها بالاست. بنابر این از آنها برای تولید پروتئین نوترکیب می توان بخوبی استفاده کرد. این یاخته در زمان تهیه از مؤسسه پاستور ایران به صورت معلق بود که در این پژوهش با پاساژهای مکرر و تغییراتی که در شرایط کشت ایجاد شد کشت یک لایه و مناسب برای کار از آنها تهیه گردید. برای رشد و تکثیر این یاخته از محیط کشت سلول گریس[3] که با لاکتالبومین و عصاره مخمر غنی شده به علاوه ۱۰٪ سرم جنین گاو استفاده گردید. برای جلوگیری از آلوده شدن یاخته ها به عوامل باکتریال مقدار ۵۰ میکروگرم جنتامایسین به هر میلی لیتر محیط اضافه شد.

زیاد سازی با کیولو ویروس نوترکیب

برای تولید بذر ویروسی ابتدا یاخته های Sf9 با MOI[4] برابر ۰/۱ تا ۱ ویروس تلقیح شدند. سپس برای تولید پروتئین نوترکیب ویروس به ۶-۷ برابر MOI فوق الذکر افزایش داده شد. برای تولید بذر ویروسی فقط مایع رویی یاخته های تلقیح شده جمع آوری شد ولی برای تولید gpD نوترکیب از یاخته های تلقیح شده استفاده گردید.

یاخته های BK

برای تکثیر ویروس حاد هرپس از یاخته های BK استفاده شد. این یاخته ها از کلیه نوزاد گوساله توسط خدمتی و همکارانش در موسسه سرم و واکسن سازی رازی حصارک تهیه شده است (۲۵). این یاخته ها در محیط DMEM حاوی ۵-۱۰ درصد سرم استریل و حرارت دیده گوساله همراه با ۱۰۰ میلی گرم پنی سیلین، ۱۰۰ میلی گرم استرپتومایسین و ۱۰۰ میلی گرم کانامایسین در هر میلی لیتر کشت داده شد.

تولید انبوه گلیکوپروتئین HSV-1-gpD

برای این کار کشت یک لایه از یاخته های Sf9 با MOI ۷ ویروس نوترکیب با کیولو حاوی ژن gpD و به مدت ۴-۵ روز در ۲۶-۲۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس یاخته های آلوده جمع آوری و پس از افزودن آنتی پروتئاز، در داخل یک ظرف تحت عمل سونیکاسیون

[1] . Pupal ovarian line
[2] . Spodoptera frugiperda
[3] . Grace's medium
[4] . Multiplicity of Infection

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

قرار گرفت و محتویات آنها خارج گردید. به موازات این کار از یاخته های سالم نیز کشت و به عنوان شاهد تیمار فوق خارج نمودن محتویات در موردشان انجام شد. آنگاه میزان پروتئین موجود در شیرابه یاخته های آلوده و شاهد اندازه گیری شد.

SDS-P پروتئینهای یاخته های آلوده

به منظور آنالیز پروتئینهای موجود در لیز یاخته های آلوده و یاخته های سالم، روش SDS-PAGE در مورد آنها اعمال شد. این کار در ژل پلی آکریل آماید (w/v) ۲۹ درصد و در کنار استاندارد وزنی پروتئین ها انجام شد.

وسترن بلاتینگ برای بررسی gpD

پس از انجام SDS-PAGE، ابتدا کاغذ نیتروسلولز دارای منافذ کمتر از ۰/۴۵ میکرون بر روی ژل قرار داده و سپس در داخل تانک مخصوص به مدت ۲ ساعت در معرض جریان برق با ولتاژ ۸۰ قرار داده شد. آنگاه کاغذ نیتروسلولز با استفاده از ژلاتین ۰/۵ درصد بلاک و پس از آن آنتی بادی پلی کلونال ضد HSV-1 به کاغذ اضافه و پس از انکوباسیون و شستشو با TBS-T [1] ، آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولینهای انسان، که با آنزیم پراکسیداز کونژوگه شده بود، به آن افزوده شد. پس از طی مرحله انکوباسیون و شستشو، سوبسترای مخصوص(DAB) [2] به کاغذ اضافه و ۵-۱۵ دقیقه بعد در آب مقطر شستشو شد و نتیجه کار مورد بررسی قرار گرفت.

تلقیح gpD نوترکیب به موشها

به منظور بررسی ایمنی زایی gpD نوترکیب تولیدی از موشهای BALB/c با سن ۲۱ روز استفاده شد. این موشها از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی تهیه و در گروههای ۷ تایی و در قفس های جدا نگهداری شدند. موشها به ۳ گروه: تحت آزمایش، شاهد با تزریق ویروس حاد، و شاهد با تزریق PBS تقسیم شدند. به هر گروه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ماده مورد نظر به طور عضلانی تزریق و این کار با فواصل ۲۱ روز، سه بار تکرار شد. در نهایت، ۲۱ روز بعد از آخرین تزریق از موشها خونگیری شد.

بررسی وجود آنتی بادیهای ضد ویروس در موشها

به منظور بررسی پاسخ ایمنی هومورال موش هایی که با گلیکوپروتئین D نوترکیب تلقیح شده بودند آزمایش خنثی سازی ویروس حاد HSV-1، با استفاده از سرم خون موش های تلقیح شده، در کنار سرم خون موش های شاهد مثبت و منفی انجام شد. برای انجام این آزمایش از روش سرم متغیر و ویروس ثابت استفاده و مقادیر ثابت از رقت های متفاوت هر سرم که ابتدا در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ حرارت داده شده بود ویروس حاد HSV-1 قرار داده شد. مخلوط سرم و ویروس به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس به یاخته های BK تلقیح شد. به موازات این کار شاهدهای مثبت و منفی نیز به کار گرفته شد.

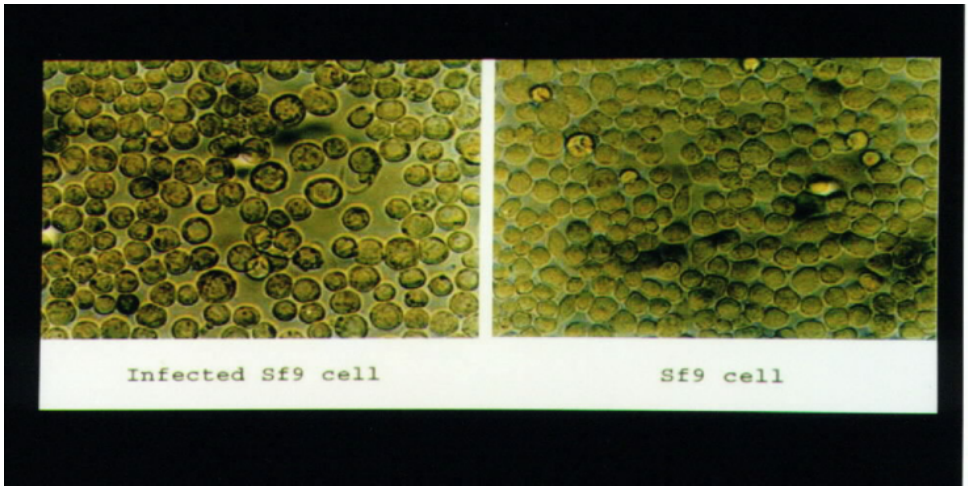
نتایج

در شکل ۱ به ترتیب یاخته های سالم و آلوده Sf9 در سمت راست و چپ نشان داده شده است. همانطور که در اشکال ملاحظه می شود یاخته های سالم Sf9 به تکثیر خودشان در محیط غذایی گریس ادامه می دهند و پس از طی ۴۸-۷۲ ساعت به صورت یک لایه یکنواخت از سلول های تقریباً یک شکل در می آیند، در صورتی که توانایی تکثیر یاخته های آلوده به ویروس نوترکیب باکیولو تقلیل پیدا نموده و بسیاری از آنها بزرگتر از اندازه طبیعی می شوند (شکل ۱).

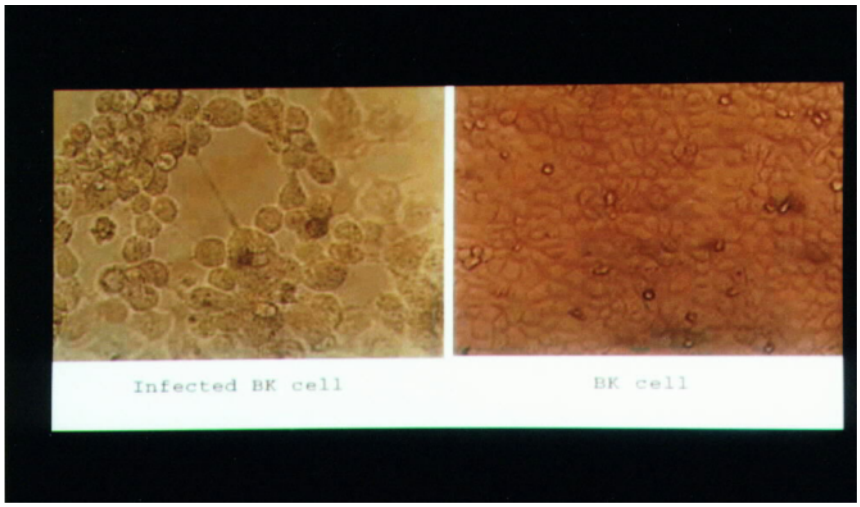
در شکل ۲، تک لایه سالم یاخته های کلیه گوساله که در محیط DMEM حاوی ۵-۱۰ درصد سرم حرارت دیده گوساله کشت شده است، در کنار یاخته های آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک دیده می شود.

[1] . Tris Buffered Saline-Tween
[2] . Diaminobenzidine

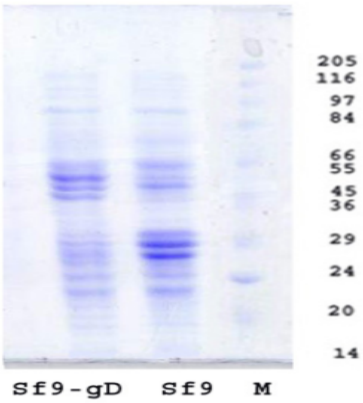
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]



شکل ۱ : یک لایه سلولی Sf9 سالم (سمت راست) و آلوده به ویروس باکیولو نوترکیب (سمت چپ)



شکل ۲ : تک لایه سلول BK سالم (سمت راست) و آلوده به ویروس HSV-1 (سمت چپ)



شکل شماره ۳ : نتیجه الکتروفورز سلولهای حاوی پروتئین gD-1 (Sf9-gD) و فاقد gD-1 (Sf9)

شکل شماره ۴: نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ جهت تایید تولید پروتئین gD-1

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

جدول ۱: بررسی عیار آنتی بادیهای خنثی کننده در سه گروه از موشهای مورد آزمایش

نوع ماده تزریق شده / شماره موش	پروتئین	>MLD50**
۱*	$\frac{۱}{۱۲۸}$	$\frac{۱}{۱۲۸}$
۲	$\frac{۱}{۶۴}$	$\frac{۱}{۳۲}$
۳	$\frac{۱}{۱۲۸}$	$\frac{۱}{۶۴}$
۴	$\frac{۱}{۶۴}$	$\frac{۱}{۳۲}$
۵	$\frac{۱}{۱۲۸}$	$\frac{۱}{۱۶}$
۶	$\frac{۱}{۱۲۸}$	$\frac{۱}{۱۶}$
۷	$\frac{۱}{۳۲}$	$\frac{۱}{۱۶}$

* براي تمام موش هاي مورد آزمايش عيار مربوط به PBS صفر بوده است

** Minimum Leathal Dose

همانطوری که ملاحظه می شود، در یاخته های آلوده، آثار مرگ ناشی از تکثیر ویروس به شکل یاخته های گرد و تجمع یافته مشهود است. (شکل۲ سمت راست سلول غیر آلوده ، سمت چپ سلول آلوده) نتیجه الکتروفورز عصاره تهیه شده از یاخته های Sf9 آلوده به ویروس نوترکیب در شکل شماره ۳ مشهود می باشد. همانطوری که ملاحظه می شود در محل مربوط به پروتئین ۵۰Kd، که نشان دهنده وزن ملکولی گلیکوپروتئین D ویروس است، یک باند کاملاً واضح در الگوی حاصل از SDS-PAGE عصاره یاخته های آلوده در مقایسه با یاخته های شاهد دیده می شود که بیانگر تولید پروتئین مورد نظر در یاخته های فوق است (شکل ۳).

برای حصول اطمینان از اینکه باند فوق متعلق به gpD است، آزمایش وسترن بلاتینگ با بهره گیری از آنتی سرم پولی کلونال انجام شد که نتیجه آن در شکل شماره ۴ منعکس شده است. همانطوری که دیده می شود پروتئین D با آنتی سرم اختصاصی واکنش نشان داده که باند مربوط در الگوی وسترن بلاتینگ انجام شده در مورد عصاره یاخته های آلوده به ویروس وجود دارد، ولی در الگوی مربوط

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

به یاخته های سالم دیده نمی شود. محل تشکیل باندها با پیکان نشان داده شده است (شکل ۴).

بررسی عیار آنتی بادیهای خنثی کننده HSV-1 در سرم موشهای واکسینه

در جدول شماره ۱ نتیجه حاصل از آزمایش خنثی سازی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک نشان داده شده است. در این آزمایش سه گروه موش BALB/c به ترتیب با گلیکوپروتئین نوترکیب D، PBS، و ویروس حاد با مقدار کمتر از MLD50 تلقیح و پس از گذراندن دوره مربوط، از آنها خونگیری و آزمایش خنثی ستازی ویروس با هر کدام از آنها انجام شد. با توجه به این جدول سرم موش های تحت آزمایش و موش های تلقیح شده با ویروس حاد در مقایسه با موش های شاهد، واجد آنتی بادی های خنثی کننده ویروس بودند.

بحث

اولین واکسن ضد یکی از بیماریهای ویروسی انسان در سال ۱۷۶۹ توسط ادوارد جنر علیه بیماری آبله به کار گرفته شد. اگر چه از سالیان قبل از آن چینی ها با روش مایع کوبی[1] افراد سالم اقدام به ایمن سازی آنها می کردند، ولی با توجه به اینکه آنها از ویروس گرفته شده از زخم های آبله این کار را انجام می دادند با خطراتی توأم بود. در سال ۱۹۳۸ ماکس تیلر اولین واکسن حاوی ویروس تخفیف حدت یافته را که علیه بیماری تب زرد تولید کرده بود به بازار عرضه نمود که این واکسن بدون تغییر تا امروز مصرف می شود و میلیون ها نفر را از ابتلا به بیماری و مرگ ناشی از آن محافظت کرده است. بعد از آن واکسن های ویروسی دیگری از قبیل پولیو، سرخک، سرخجه و آنفلوآنزا به بازار عرضه گردید که همه آنها حاوی ذره کامل ویروسی است (۳).

آنجا که به ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک مربوط می شود، ویروس HSV-1 در آزمایشگاه باعث مرگ یاخته های آلوده شده و در بدن انسان بعد از ایجاد طیفی از علائم بیماری به صورت خفته در می آید. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی HSV-1 باعث پیدایش جراحات در صورت و ایجاد عفونت در چشم و گاهی موجب آنسفالیت در نوزادان می شود که با مرگ و میر بالایی همراه است. بیش از سه دهه است که تلاش های گسترده ای برای تولید واکسن مؤثری به منظور پیشگیری از بروز عفونت و اختفای ویروس در بدن انسان انجام شده و در نتیجه واکسن های متفاوتی به بازار عرضه شده است. این واکسن ها شامل انواعی هستند که از آن جمله می توان به واکسن های واجد ذره کامل ویروس، زیر واحدهای پروتئینی، پروتئین های نوترکیب و واکسن های DNA دار اشاره کرد.

یکی از واکسن هایی که مصرف آن در مدلهای آزمایشگاهی با موفقیت همراه بوده است واکسن حاوی گلیکوپروتئین نوترکیب D است. این گلیکوپروتئین از جمله فرآورده های ویروس است که دارای آنتی ژنیسیته و ایمیوژنیسیته بسیار خوبی است. لذا با توجه به ویژگی های آن در القاء ایمنی در بدن میزبان، تصمیم گرفته شد تا از آن به عنوان واکسن حاوی پروتئین نوترکیب استفاده شود. اگر چه تولید gpD در سیستم های پروکاریوتیک با موفقیت همراه بوده است، ولی به علت عدم توانایی این سیستم ها در ایجاد تغییرات بعد از ترجمه و همچنین انجام گلیکوزیلاسیون، پروتئین نوترکیب تولیدی در آنها فاقد ایمن زایی بالا است. به همین دلیل در این پژوهش از سیستم باکیولو ویروس از نوترکیب واجد gpD که در یاخته های Sf9 که از جمله یاخته های یوکاریونیک است تکثیر می نماید، استفاده شد.

برای نشان دادن پروتئین های نوترکیب فوق روش های متعددی وجود دارد که در این پژوهش از روش های SDS-PAGE ، وسترن بلاتینگ و ارزیابی کیفیت پروتئین تولید شده در القای ایمنی از موش استفاده شد. در این

[1] . Variolation

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

مطالعه با بهینه سازی زمان برداشت یاخته آلوده به ویروس نوترکیب و بررسی بیان پروتئین در زمان های مختلف از روش SDS-PAGE استفاده گردید (۲۱-۱۹). همچنین برای بررسی جایگاه انباشته شدن پروتئین از مایع رویی کشت یاخته های آلوده و رسوب آنها استفاده شد. بعد از بررسی های متعدد زمان برداشت یاخته های آلوده و آماده سازی آنها بعد از ۴ روز و در رسوب یاخته ها تشخیص داده شد. از روش های یخ زدن و ذوب کردن مکرر و سونیکاسیون برای ترکاندن یاخته های حاوی پروتئین در کنار یخ و آنتی پروتئاز استفاده شد که روش توأم بهترین روش تشخیص داده شد. روش های مختلفی برای تزریق فرآورده های پروتئینی به حیوانات به منظور تولید آنتی بادی مورد استفاده قرار می گیرد که روش تزریق زیر جلدی و عضلانی به همراه ادجوانت کامل فروند برای تزریق اول و ادجوانت ناقص فروند در تزریق مرتبه دوم و سوم استفاده گردید (۵، ۷، ۱۸، ۱۹، ۲۶ و۲۷). عیار آنتی بادی های تولید شده به صورت گروهی با روش استاندارد VNT مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی عیار آنتی بادی ها وجود عیار قابل توجهی از آنتی بادی خنثی کننده را بعد از تزریق دوم نشان داد. نکته ای که باید به آن توجه شود این است که اگر چه ویروس نوترکیب حاوی ژن gD-1 از سویه KOS استاندارد در

اختیار محققین قرار گرفته بود ولی القاء آنتی بادی در موشهای تلقیح شده با گلیکوپروتئین نوترکیب فوق در برابر تزریق ویروس حاد HSV-1 ایزوله شده در بخش ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس مقاومت نمود و عیار آنتی بادی های خنثی کننده نشان داده شده در جدول در مقابل ویروس حاد انجام گردیده است. همانطور که ملاحظه می شود برای مقایسهٔ میانگین عیار آنتی بادی از آزمون آماری تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد. این آزمون با $P<۰/۰۰۱$ اختلاف معنی داری را در میانگین عیار آنتی بادی در گروهها نشان داد. برای اینکه ببینیم آیا گروهها با هم اختلاف دارند یا نه، از روش مقایسهٔ چندگانه LSD استفاده شد. این آزمون نشان می دهد که گروه ۱ با گروه ۲، با$p<۰/۰۲۵$ وگروه۱ با ۳، با $P<۰/۰۰۱$ و گروه ۲ و ۳، با $P<۰/۰۰۱$ در میانگین عیار آنتی بادی اختلاف معنی دار دارند. همین نتایج را آزمون مقایسهٔ چندگانه دانت (Dunnett) نیز تأیید نمود.

References :

1. Handler CG, Eisenderg RJ, Cohen GH. Oligomeric structure of glycoproteins in herpes simplex virus typel. J Virol 1996; 9: 6067-75.

2. Cleator GM, Klapper PE. Herpes simplex. In: Principles and practice of clinical virology. 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons LTD, 2000, 23-45.

3. Roizman B, Knipe DM. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fundamental virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1123-83.

4. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical microbiology. 22nd ed. Stanford: Lang Medical Books/Mc grow-Hill, 2001,523-623.

5. Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. Vaccination with a coctail of seven recombinantly expressed HSV-1 glycoproteins protects against ocular HSV-1 challenge more efficiently than vaccination with any individual glycoprotein. Vaccine 1996; 14: 107-12.

6. Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus. J Gen Virol 2000; 81: 1-19.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

7. Sisk WP, Bradley JD, Leipold RJ, et al. High-level expression and purification of secreted forms of HSV-1 glycoprotein gD synthesized by Baculovirus-infected insect cells. J Virol 1994; 68: 766-75.

8. Johnson DC, Ligas MW. Herpes simplex viruses lacking glycoprotein D are unable to inhibit virus penetration: quantitative evidence for virus specific cell surface receptors. J Virol 1988; 62: 4605-12.

9. Spear PG. Membrane fusion induced by herpes simplex virus. In: Bentz J. Viral fusion mechanisms. Boca Raton: CRC Press, 1993, 201-32.

10. Herold BC, WaDann D, Soltys N, et al. Glycoprotein D of HSV-1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. J Virol 1991; 65: 1090-8.

11. Johnson DC, Burke R, Gregory T. Soluble forms of HSV-glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. J Virol 1990; 64: 2569-76.

12. Montgomoery RI, Warner MS, Lum BJ, et al. Herpes simplex virus type-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell 1996; 87: 427-36.

13. Geraphy RJ, Kummenacher C, Cohen GH. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. Science 1998; 280: 1618-20.

14. Shukla D, Liu J, Blaiklock P. A novel role for 3-0-Sulfated heparan sulfate in HSV-1 entry. Cell 1999; 99: 13-22.

15. Huang T, Campadelli Fiume G. Anti idiotypic antibodies mimicking glycoprotein D of herpes simplex virus identify a cellular protein required for virus spread from cell to cell and virus-induced polykaryocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1836-40.

16. Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculovirus as expression vectors for insect and mamalian cells. Curr Opin Biotechnol 1999; 10: 428-433.

17. Sisk WP, Bradley JD, Leipold RJ, et.al. High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 Glycoproteing D synthsized by Baculovirus-infected insect cells. J Virol 1994; 68: 766-75.

18. Ghiasi H, Kaiwar R, Nesburn AB, et al. Expression of seven herpes simplex virus type 1 glycoproteins (gB, gC, gD, gE, gG, gH, and gI), comparative protection against lethal challenge in mice. J Virol 1994; 68: 2118-26.

19. Cremer RJ, Mackett M, Wohlenberg C, et al. Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevent latent herpes in mice. Science 1982; 228: 737-40.

20. Krishna S, Blacklaws BA, Overton HA, et al. Expression of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 in a recombinant baculovius: protective response and T cell recogntion of the recombinant infected extract S. J Gen Virol 1989; 70: 1805-14.

21. Kidd IM, Emery VC. The use of baculoviruses as expression vectores. Appl Biochem Biotechnol 1993; 42: 137-59.

22. Hoss A, Moarefi I, Scheidtmann KH, et al. Phosphorylation pattern of simian virus 40 T antigen expressed in insect cells by using a basculovirus vector. J Virol 1990; 64: 4799-807.

23. Kuroda K, Veit M, Klend HD. Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. Virol 1991; 180: 159-65.

24. Francois B. Recombinant protein expression in *Escherichia coli.* Curr Opin Biotechnol 1999; 10: 411-21.

25. Khedmati K, Masoudi S, Roostaee MH, et al. Razi-Khedmati (R-K-BK) continuous cell line preparation from primary bovine kidney cell culture. 1st Iranian congress on virology. 2002 Feb. 216, Tehran,Iran.

26. Jognson RM, Lancki DW, Fitch FW, et al. herpes simplex virus glycoprotein D is recognized

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]

herpes simplex virus type 2 in human by use of a recombinant glycoprotein D Vaccine. J Infect Dis 1993; 167: 1045-52.

27. Straus SE, Savarese B, Tigges M, et al. Induction and enhancement of immune responses to as antigen by $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes from infected mice. J Immunol 1990; 148: 702-10.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-11-24]