٧-٨ ديوان مخ
أخاري

بسم الله الرحمن الرحيم

١٩٥٨

۸۷/۱/۱۰۹۲۳۱
۸۷/۱۲/۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی

# بررسی اثر زمانبندی تزریق وکتور بیانی ژنlight در نوع پاسخ ایمنی القا شده با DNA واکسن دارای ژنHSV-1 gB در موش BALB/c

نگارش
سمیه پویان فرد

استاد راهنما:
دکتر طراوت بامداد

استاد مشاور:
دکتر مسعود پارسانیا

۱۳۸۷/۱۱/

شهریور ۱۳۸۷

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
۱۰۹۰۵۸

**فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»**

**بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد** خانم سمیه پویان فرد **رشته: ویروس شناسی گرایش:**
**تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.**

**نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:**

دکتر طراوت بامداد (استاد راهنما)

دکتر مسعود پارسانیا ( استاد مشاور )

دکتر فاطمه فتوحی (استاد ناظر)

دکتر مهرداد روانشاد (استاد ناظر)

دکتر فرزانه صباحی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

## آئین نامه پایان نامه (رساله ) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله ) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله )ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه ) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته ..مهندسی شناسی... است که در سال ....۱۳۸۷.. دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر حمایت یامداد ، مشاوره دکتر مسعود یاوری سابا..... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب سمیه پویان فرد..... دانشجوی رشته مهندسی شناسی... مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی سمیه پویان فرد

تاریخ و امضا

۸۷/۸/۱۲

## دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
## دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

**ماده ۱-** حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

**ماده ۲-** انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

**ماده ۳-** انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

**ماده ۴-** ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

**ماده ۵-** این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

۱۳۸۷/۱۱/۱۵

نام و نام خانوادگي . سید یدان نژاد
تاریخ و امضاء
۸۷/۸/۱۲

تقدیم به

پدر و مادرم

## تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خدای را عز و جل که طاعتش موجب قربت است و به شکراندرش مزید نعمت است.

اکنون که به لطف ایزد منان، مراحل انجام پایان نامه فوق به اتمام رسیده است، مراتب سپاس و تشکر خود را از افراد ذیل ابراز می دارم:

استاد راهنمای عزیز و محترم سرکار خانم دکتر طراوت بامداد که در تمامی مراحل در کمال فروتنی مرا در انجام این پایان نامه راهنمایی نمودند.

جناب آقای دکتر مسعود پارسانیا، استاد مشاور محترم که در انجام پایان نامه از نقطه نظرات ظریف علمی ایشان استفاده کردم و از پشتیبانی های بی شائبه ایشان برخوردار بودم.

استاد عزیز و گرامی سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که مشفقانه حضور وی را همیشه در کنار خود احساس می کردم و در تمام دوران تحصیل از حمایت ایشان برخوردار بودم.

اساتید محترم سرکار خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی و جناب آقای دکتر مهرداد روانشاد که در طول دوران تحصیل همیشه از راهنمایی های ایشان بهره مند بودم.

دانشجویان محترم گروه ویروس شناسی جناب آقایان دکتر عباس جمالی ، دکتر یونس حسینی که با در اختیار قرار دادن علم و تجربیات عملی خود در پیشبرد انجام کار مرا یاری نمودند.

از دوستان بسیار خوبم سرکار خانم ها معصومه گرگیان محمدی، زهرا خانلری، ندا یاهو، مریم فاضلی، مهدیه فرزانه پور و جناب آقایان حمیدرضا هاشمی، اصغر عبدلی کولانکوه، کاظم باعثی، سید حسین موسوی فرد که همگی در این مسیر پرفراز و نشیب در کنار من بودند.

همچنین جناب آقای سید کیوان قاضی میر سعید، کارشناس محترم گروه ویروس شناسی.

## چکیده

واکسیناسیون یکی از مهم ترین و مقرون به صرفه ترین روشها در جهت جلوگیری از بیماری های عفونی می باشد. استفاده از واکسنهای DNA ازجدیدترین شیوه هایی است که برای واکسیناسیون ارائه شده است. تلقیح پلاسمید حاوی CDNA مربوط به آنتی ژن پروتئینی، قادر است که پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی طولانی مدت را برانگیزد. عقیده بر این است که پاسخ دائمی و طولانی مدت ایمنی هومورال و سلولی که بعد از ایمنی زایی با واکسنهای DNA ایجاد می شود، بستگی به اعمال نظارتی پوست و بافتهای لنفاوی مرتبط با پوست دارد. از آنجائیکه سلولهای عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای، به ندرت در محل تزریق واکسن وجود دارند، استراتژیهای مختلفی در جهت جذب و به کارگیری این سلولهای عرضه کننده آنتی ژن وجود دارد تا در نتیجه جذب و به کارگیری بهتر آنها، خاصیت ایمونوژنیسیتی واکسنهای DNA افزایش یابد. از میان استراتژیهایی که باعث ارتقاء خاصیت ایمونوژنیسیتی آنتی ژن کد کننده توسط واکسنهای DNA می شوند، می توان به استفاده از سایتوکاین ها اشاره کرد. تحقیقات اخیر در مورد به کارگیری ژن سایتوکاین light نشان دهنده افزایش بلوغ سلول های DC و القاء پاسخ های ایمنی سلولی می باشند. لذا به نظر میرسد که استفاده از ژن Light برای افزایش پاسخهای ایمونولوژیک در واکسیناسیون موثر باشد. در این پژوهش تاثیر این ژن در کارایی واکسن DNA واجد ژن بیان کننده gB ویروس HSV-۱ در موش های BALB/c مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این ، نوع پاسخ ایمنی (سلولی و یا هومورال) به زمان تزریق ادجوانت نسبت به DNA واکسن وابسته است. لذا در این پژوهش ۳، گروه مورد بررسی قرارگرفت: گروهی که ۳روز قبل از تزریق واکسن،ادجوانت دریافت میکنند.گروهی که واکسن و ادجوانت را با هم دریافت میکنند.گروهی که ۳ روز بعد از تزریق واکسن،ادجوانت دریافت میکنند و در نهایت ۵ روز پس از آخرین تزریق، فعالیت سیتم ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان می داد که گروهی که ۳ روز قبل از تزریق DNA واکسن، ادجوانت را دریافت کرده بود پاسخ ایمنی سلولی قوی تری نسبت به سایر گروه ها ایجاد کرده بود.



واژگان کلیدی: DNA واکسن gB-۱ ، هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱، Light، الایزا.

عنوان | فهرست مطالب | صفحه


۱- فصل اول :مقدمه

مقدمه ---------- ۲

۲- فصل دوم :کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۲-۱ طبقه بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک ---------- ۵

۲-۲ ساختار ویروس ---------- ۵

۲-۳ پروتئینهای ویروس ---------- ۶

۲-۳-۱ ویژگی گلیکوپروتئین gB(gB) ویروس ---------- ۶

۲-۳-۲ ویژگی سایر گلیکوپروتئینهای ویروس ---------- ۷

۲-۴ نحوه تکثیرویروس ---------- ۸

۲-۵ نهفتگی ویروس ---------- ۸

۲-۶ بیماریزایی ---------- ۹

۲-۷ اپیدمیولوژی ---------- ۱۰

۲-۸ تشخیص آزمایشگاهی ---------- ۱۱

۲-۹ پاسخ ایمنی میزبان در عفونتهای ناشی از HSV ---------- ۱۱

۲-۱۰ کنترل عفونتهای HSV ---------- ۱۳

۲-۱۰-۱ پیشگیری ---------- ۱۳

۲-۱۰-۲ درمان ---------- ۱۴

۲-۱۰-۳ واکسیناسیون ---------- ۱۴

۲-۱۰-۳-۱ واکسنهای ویرون غیر فعال شده ---------- ۱۵

۲-۱۰-۳-۲ واکسنهای ساب یونیت ---------- ۱۶

۲-۱۰-۳-۳ واکسنهای ژنتیکی تخفیف حدت یافته----------۱۷
۲-۱۰-۳-۴ واکسنهای متشکل از وکتورهای زنده بیان کننده ژنهای ویروسی---------۱۷
۲-۱۰-۳-۵ واکسنهای DNA----------۱۸
۲-۱۱ اصول واکسنهای DNA ----------۱۹
۲-۱۱-۱ مزایای واکسنهای DNA ----------۲۰
۲-۱۱-۲ معایب واکسنهای DNA ----------۲۱
۲-۱۱-۳ مکانیسم های القاء پاسخهای ایمنی در واکسنهای DNA ----------۲۲
۲-۱۲ روشهای افزایش کارآیی واکسنهای DNA ----------۲۴
۲-۱۲-۱ استفاده از روشهایی که منجر به بیان بیشتر آنتی ژن می گردد----------۲۴
۲-۱۲-۲ بهینه سازی نحوه تزریق واکسنهای DNA ----------۲۵
۲-۱۲-۳ استفاده از روشهایی که منجر به افزایش ایمونوژنسیتی واکسنهای DNA می‌شوند--۲۹

## ۳- فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ وسایل و دستگاه های عمومی مورد نیاز برای تهیه وکتور بیانی Light----------۳۵
۳-۲ محیط های کشت باکتری----------۳۶
۳-۳ محلول ها و بافرهای مورد نیاز----------۳۷
۳-۴ محلولهای مورد نیاز برای استخراج DNA به روش لیزقلیائی----------۳۸
۳-۵ طرز تهیه آنتی بیوتیک آمپی سیلین----------۳۹
۳-۶ پلاسمیدهای مورد استفاده دراین پژوهش----------۴۰
۳-۷ کشت ، مستعد کردن[1] و ترانسفورم کردن باکتری[2]----------۴۲
۳-۷-۱ تهیه سلول مستعد باکتری----------۴۲
۳-۷-۲ ترانسفورم کردن باکتری یا انتقال پلاسمید به درون سلول باکتری----------۴۳

۳-۷-۳ گزینش باکتری ترانسفورم شده----۴۴
۳-۸ استخراج پلاسمید در مقیاس کم با روش لیز قلیایی[1]----۴۴
۳-۹ بررسی پلاسمید استخراج شده در ژل آگارز----۴۵
۳-۱۰ تایید وکتور حاوی ژن مورد نظر----۴۶
۳-۱۱ خالص سازی ژن Light----۴۷
۳-۱۲ تعیین غلظت DNA----۴۸
۳-۱۴ آماده سازی وکتور بیانی pcDNA3----۴۸
۳-۱۴-۱ تایید وکتور مورد نظر----۴۹
۳-۱۴-۲ خطی کردن وکتور بیانی----۴۹
۳-۱۴-۳ دفسفریلاسیون وکتور به واسطه آنزیم آلکالن فسفاتاز----۴۹
۳-۱۵ Ligation----۵۰
۳-۱۶ بررسی کلونی های ترانسفورم شده----۵۱
۳-۱۷ بررسی بیان ژن در آزمایشگاه----۵۲
۳-۱۷-۱ منشاء سلول مورد استفاده در این پژوهش----۵۲
۳-۱۷-۲ ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۲۰۰۰----۵۳
۳-۱۷-۳ بررسی بیان در سطح RNA ----۵۳
۳-۱۷-۳-۱ فرایند حذف RNase ----۵۴
۳-۱۷-۳-۲ استخراج RNA از سلولهای HeLa----۵۵
۳-۱۸ واکنش پلی مراز معکوس(RT)----۵۶
۳-۱۹ فرایند PCR----۵۶
۳-۱۹-۱ واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)----۶۱
۳-۲۰ کشت یاخته----۶۳
۳-۲۰-۱ وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز برای کشت یاخته----۶۳

۳-۲۰-۲ مواد مورد نیاز برای کشت یاخته---۶۴
۳-۲۰-۳ شستشوی وسایل مورد نیاز برای کشت یاخته---۶۴
۳-۲۰-۴ آماده کردن محیطهای کشت یاخته---۶۵
۳-۲۰-۵ تهیه محیط کشت---۶۵
۳-۲۰-۶ افزودن آنتی بیوتیکها---۶۶
۳-۲۰-۷ استریل کردن محیط کشت یاخته---۶۶
۳-۲۰-۸ آماده سازی و افزودن سرم---۶۶
۳-۲۰-۹ روش تهیه PBS[1] بدون کلیسم و منیزیم---۶۷
۳-۲۰-۱۰ محلول تریپسین ـ ورسن[2] ---۶۷
۳-۲۰-۱۱ نگهداری یاخته ها---۶۸
۳-۲۰-۱۲ پاساژ یاخته---۶۸
۳-۲۰-۱۳ انجماد یاخته ها---۶۸
۳-۲۰-۱۴ پاساژ یاخته های منجمد---۶۹
۳-۲۰-۱۵ منشاء یاخته های مورد استفاده---۶۹
۳-۲۰-۱۶ تهیه کشت سلولی HeLa---۶۹
۳-۲۱ تکثیر ویروس HSV-1 سویه KOS. در سلول HeLa---۷۰
۳-۲۲ تعیین عیار ویروس به روش $TCID_{50}$---۷۱
۳-۲۳ کار با مدل آزمایشگاهی---۷۲
۳-۲۳-۱ موش‌های BALB/c ---۷۲
۳-۲۳-۲ تزریق به موش‌های BALB/c ---۷۳
۳-۲۴ آزمایش خنثی سازی ویروس (VNT)[1]---۷۴
۳-۲۵ سنجش ایمنی سلولی ناشی از تلقیح پلاسمیدهای ایمنی زا ---۷۶
۳-۲۵-۱ برداشت طحال موش به منظور جداسازی و کشت از لنفوسیتهای آن---۷۶

۳-۲۵-۲ تهیه کشت اولیه [1] از لنفوسیتهای طحال ----------۷۷

۳-۲۶ اندازه گیری فعالیت ایمنی سلولی با استفاده از کیت الایزای گرانزیم B----------۷۹

۳-۲۶-۱ اندازه گیری قدرت ایمنی سلولی با استفاده از کیت الایزای گرانزیم B-------۸۱

۳-۲۶-۱-۱ آلوده سازی کردن سلول های هدف (WEHI164) با ویروس----۸۱

۳-۲۶-۱-۲ مجاور نمودن سلولهای عامل و هدف----------۸۱

۳-۲۶-۱-۳ مراحل آزمایش :----------۸۲

۳-۲۶-۱-۴ انجام تست الایزا----------۸۲

۳-۲۷ آنالیز آماری----------۸۳

## فصل چهارم: نتایج

۴-۱ نتیجه حاصل از تایید وکتور pBS-KS(+)-mLIGHT توسط هضم آنزیمی---------۸۵

۴-۲ نتیجه حاصل از هضم آنزیمی وکتور pBS-KS(+)-mLIGHT به منظور خالص سازی ژن Light----------۸۶

۴-۳ نتیجه حاصل از خطی کردن وکتور بیانی pcDNA3 ----------۸۷

۴-۴ نتیجه حاصل از استخراج ژن Light از ژل آگارز و وکتور بیانی pcDNA3 بعداز دفسفریلاسیون ----------۸۸

۴-۵ نتیجه حاصل از استخراج پلاسمید های نوترکیب پس از عمل Ligation ----------۸۹

۴-۶ نتیجه حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید های نوترکیب به منظور تایید قرار گیری ژن درون وکتور بیانی pcDNA3----------۹۰

۴-۷ نتایج حاصل از تعیین جهت قرار گرفتن ژنLight ----------۹۱

۴-۸ نتایج حاصل از تایید بیان توسط RT-PCR ----------۹۲

۴-۹ نتیجه حاصل از کشت سلول **HeLa**----------۹۳

۴-۱۰ نتیجه حاصل از تکثیر HSV-1 سویه KOS در کشت سلولی HeLa----------۹۴

۴-۱۱ نتیجه حاصل از اندازه گیری عیار **HSV-1** تکثیر یافته به روش تعیین تیتر عفونی ویروس در سلول ( $TCID_{50}$ )----------۹۵

۴-۱۲ نتایج حاصل از آزمون*VNT*----------۹۷

۴-۱۳ نتایج حاصل از CTL Assay----------۱۰۰

فصل پنجم: بحث و جمع بندی----------۱۰۳

فصل ششم: منابع----------۱۱۲

# فصل اول

## مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ از اعضای خانواده هرپس ویریده می باشد. ویروس های این خانواده دارای DNA دو رشته ای به طول ۱۵۲ کیلو جفت باز هستند. این ویروس از بزرگترین ویروس های انسانی است و انسان تنها مخزن آن به شمار می رود. ویروس هرپس سیمپلکس در اثر تماس مستقیم از یک شخص به شخص دیگر منتقل می شود. این ویروس ها عامل بسیاری از ضایعات مخاطی در قسمت دهان، بینی، پوست و مجاری تناسلی می باشند. همچنین قادر به ایجاد عفونت های شدید منتشر، کراتیت و انسفالیت در کودکان و افراد دچار نقص ایمنی می باشند. عفونت اولیه معمولاً درسنین کودکی رخ می دهد و بدون علامت می باشد. بسیاری از افراد تا سن بلوغ به HSV-1 آلوده خواهند شد. این ویروس دارای انتشار بسیار وسیعی در سطح جمعیت بوده و در جوامعی با وضعیت اقتصادی – معیشتی پایین، تا ۹۰ ٪ افراد به آن آلوده هستند. از ویـژگیهای منحصر به فرد این ویروس، نهفتگی و ایجاد عفونت ماندگار در بدن می باشد. پس از عفونت اولیه، ویروس در گانگلیون سه شاخه و یا خاجی نهفته می شود و سپس در اثر عوامل مختلف مانند تب، سرما، UV، فشارهای عصبی و غیره فعال شده و از طریق گانگلیون حسی، مجدداً خود را به سطح اپیتلیال رسانده و ایجاد عفونت راجعه می کند.

مطالعات ایمنی شناسی دال بر این است که هرچند هر دو بازوی سیستم ایمنی؛ یعنی ایمنی هومورال و سلولار، در جلوگیری و محدود کردن عفونت ناشی از HSV-1 موثر می باشد، ولی در این میان ایمنی سلولی و سلول های CTL ازنقش کلیدی برخوردار هستند.

به دلیل خصوصیت نهفتگی، عود مجدد و مشخص نبودن دقیق چگونگی وقوع این پدیده و نیز موثر نبودن درمان های دارویی، خصوصاً در جلوگیری از نهفتگی و عود ویروس، به نظر می رسد که راه مناسب برای مهار این ویروس استفاده از واکسن باشد.

تاکنون واکسن های زیادی برای مقابله با این ویروس مورد مطالعه و آزمایش قرار گرفته اند. از این میان میتوان به واکسن های غیر فعال ، واکسن های ضعیف شده از نظر ژنتیکی، واکسن های ساب یونیت، وکتورهای بیان

کننده ژ ن های ویروسی و DNA واکسن ها اشاره کرد. تلقیح پلاسمید حاوی cDNA مربوط به آنتی ژن پروتئینی، قادر است که پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی طولانی مدت را برانگیزد. ویژگی منحصر بفرد واکسن های DNA آن است که برای القاء پاسخ قدرتمند لنفوسیت های T سیتوتوکسیک، نیاز به وکتورهای زنده ندارند، زیراکه cDNA پروتئین هایی را رمزدهی می کند که در سیتوزول سلولهای الوده ساخته می شوند. از مزایای DNA واکسن ها همچنین می توان به امکان تولید سریع و ارزان، سادگی نقل و انتقال و نیز تحریک ایمنی سلولی اشاره کرد.

سابقه استفاده از ژن gB ویروس HSV-1 به عنوان واکسن، به دهه ی ۸۰ میلادی باز می گردد، که همگی دال بر اثر مثبت استفاده از ژن کامل gB و یا بخش هایی از آن در جلوگیری از عفونت ماندگار و راجعه و نیز مرگ و میر ناشی از دوزهای بالای ویروسی می باشد.

از میان استراتژی هایی که باعث ارتقاء خاصیت ایمونوژیسیتی آنتی ژن کد کننده توسط واکسن های DNA می شود، می توان به مواردی مثل استفاده از سایتوکاین ها اشاره کرد. هدف از این پژوهش به کار گیری سایتوکاین Light می باشد که با توجه به خاصیت منحصر بفرد خود در القاء پاسخ های ایمنی، به نظر می رسد نقش بسزایی در افزایش ایمنی زایی واکسن داشته باشد.

هدف از انجام این پژوهش ، تولید وکتور بیانی ژن Light به عنوان ادجوانت می باشد . علاوه بر این ، روش های ایمونولوژیک برای سنجش ایمنی سلولی و هومورال ایجاد شده در بدن حیوان آزمایشگاهی مورد آزمایش و نیز بررسی اثر زمان بندی تزریق ادجوانت نسبت به DNA واکسن بر روی میزان افزایش پاسخ ایمنی می باشد تا بدین وسیله ابزاری مناسب جهت بررسی ایمنی سلولی و هومورال ایجاد شده توسط هرگونه کاندید واکسن علیه این ویروس در اختیار باشد .

# فصل دوم

## کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

## ۲-۱ طبقه بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک متعلق به خانواده هرپس ویریده [1]می باشد. خانواده هرپس ویریده، به سه زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه [2]، بتا هرپس ویرینه [3] و گاما هرپس ویرینه [4]طبقه بندی می شود.

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه قرار دارد. ویروسهای زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه محدوده میزبانی وسیع داشته و بشدت سیتولیتیک می باشند. این ویروسها چرخه تکثیر کوتاه داشته، در کشت سلول انتشار سریعی داشته و همچنین تمایل به ایجاد عفونت نهفته در سلولهای عصبی دارند. ویروسهای این زیر خانواده به دو جنس سیمپلکس ویروس [5] و واریسلوویروس [6] تقسیم می شود. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در جنس سیمپلکس ویروس قرار دارد [۱].

## ۲-۲ ساختار ویروس

ویروس هرپس سیمپلکس دارای کپسید بیست وجهی شامل ۱۶۲ کپسومروژنومی متشکل از DNA دو رشته ای خطی می باشد. کپسیدویروس توسط پوشش لیپیدی (انولوپ) در بر گرفته می شود که حاوی ۱۲ گلیکوپروتئین می باشد. مابین کپسیدوانولوپ یک ماده بدون شکل و غیر متقارن وجود دارد که اصطلاحاً تگومنت [7] نامیده می شود. اندازه ویرون که شکل پوشش دار ویروس است حدود ۱۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر می باشد، در حالیکه قطر متوسط کپسید ویروس حدود ۱۰۰ تا ۱۱۰ نانومتر است[۲،۱].

---

1. Herpesviridae
2. Alphaherpesvirinae
3. Betaherpesvirinae
4. Gammaherpesvirinae
5. Simplexvirus
6. Varicellovirus
7. Tegument

ژنوم HSV حدوداً ۱۵۰۰۰۰ جفت باز طول دارد و دارای دو قسمت (short)s و (Long)L می باشد که به صورت کووالان به هم متصل شده اند، و از ویژگی های مهم ژنوم این ویروس می توان به وجود توالی های معکوس تکراری[1] اشاره کرد، که به واسطه این توالی ها، قادر به تشکیل ایزومرهای مختلف می باشد [۳،۱].

## ۲-۳ پروتئینهای ویروس

بیش از ۳۰ پروتئین متمایز در ویریون وجود دارد که از این تعداد حداقل ۱۲ پروتئین در انولوپ جای دارند و حدود ۶ پروتئین در نوکلئوکپسید و حدود ۱۰-۲۰ پروتئین در تگومنت قرار دارند. حداقل ۱۰ پروتئین سطحی ویروس به صورت گلیکوزیله می باشند که هر کدام دارای ویژگی های خاصی هستند[۱].

### ۲-۳-۱ ویژگی گلیکوپروتئین gB(gB) ویروس

gB یک گلیکوپروتئین ضروری برای ویروس می باشد و عهده دار وظایف مختلفی مثل اتصال به پروتئوگلیکانهای سطح سلول، شرکت در ادغام انولوپ ویروس با غشاء سیتوپلاسمی سلول میزبان و نیز گسترش سلول به سلول ویروس، می باشد [۵،۴].

بدین ترتیب gB نقش مهمی در عفونتزایی و بیماریزایی ویروس داشته و همچنین بعنوان یک ایمونوژن مهم ویروسی برای راه اندازی پاسخهای سلولی و هومورال مطرح می باشد، به طوری که منجر به القاء آنتی بادیهای خنثی کننده شده و از طرفی باعث تحریک لنفوسیتهای T کمکی و تولید سایتوکاینها می گردد، همچنین اپی توپهایی را در بر دارد که هدف لنفوسیتهای T سیتوتوکسیک قرار می گیرند [۷،۶،۵]. چنین خصوصیاتی منجر به آن شده که gB بعنوان یکی از پروتئینهای مناسب ویروس جهت واکسیناسیون در واکسنهای طراحی شده علیه HSV قرار گیرد [۸].

1. Inverted Repeat Sequance