

慢病毒介导的HSV-2 gD2蛋白的表达及多克隆抗体的制备

康海仙¹, 任楚淇¹, 沈浩佳¹, 连澎烜¹, 黄伟胜¹, 欧阳清², 陈伟杰³

1. 广东医科大学基础医学院, 广东东莞 523808

2. 广州市第十二人民医院病理科, 广东广州 510420

3. 广东医科大学医学技术学院, 广东东莞 523808

摘要: **目的** 采用慢病毒介导293T细胞表达单纯疱疹病毒II型包膜糖蛋白2(HSV-2 gD2), 免疫新西兰兔制备高效价的gD2多克隆抗体, 为HSV-2病毒的检测及其基础研究提供便利。**方法** 将密码子优化的HSV-2病毒G Strain US6基因(MH790667.1)序列连接至慢病毒载体pLenti-CMV-gD2-6His中, 重组慢病毒感染正常293T细胞并筛选出稳转株, 从培养上清中收获分泌型gD2蛋白后采用Ni-NTA亲和层析纯化目的蛋白, 与弗氏佐剂1:1混合乳化后皮下注射免疫新西兰大白兔, 加强免疫1次, ELISA检测兔血清中gD2特异性抗体(纯化抗原包板)的效价, Western blot检测载体病毒中gD2抗原蛋白的表达。**结果** 构建的慢病毒重组质粒序列与理论设计一致, 稳转株表达的gD2-6His蛋白相对分子质量约为37 000, 电泳条带位于40 000~55 000(糖基化修饰), 二次免疫后兔血清中gD2特异性抗体滴度为1:204 800, 兔血清经1:500稀释后作为一抗孵育可检测到疫苗病毒中gD2抗原蛋白的表达, 条带特异。**结论** 成功表达高纯度分泌型gD2蛋白, 并制备了高效价的兔多克隆抗体, 便于后续HSV-2疫苗的研发。

关键词: HSV-2 gD2蛋白; 慢病毒; 多克隆抗体; 稳转株

DOI: 10.20227/j.cnki.2096-3610.2025.03.007

The expression of HSV-2 gD2 protein mediated by lentivirus and preparation of gD2-specific polyclonal antibodies

KANG Haixian¹, REN Chuqi¹, SHEN Haojia¹, LIAN Pengxuan¹, HUANG Weisheng¹, OUYANG Qing², CHEN Weijie³

1. School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

2. Department of Pathology, Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou 510420, China

3. School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Abstract: **Objective** The expression of secreted human herpes simplex virus 2 envelope glycoprotein gD (HSV-2 gD2) mediated by lentivirus, and the preparation of gD2-specific rabbit polyclonal antibody will provide convenience for subsequent ELISA and WB detection in HSV-2 vaccine development. **Methods** Codon-optimized sequences of the HSV-2 G Strain US6 gene (MH790667.1) were linked into the lentiviral vector pLenti-CMV-gD2-6His. The recombinant lentivirus and packing plasmids were co-transfected into 293T cells to harvest recombinant lentivirus, then the recombinant lentivirus-infected 293T cells were screened with puromycin for establishing stable cell lines. The secreted gD2-6His proteins were harvested from the culture supernatant of the screened stable cell lines. The target protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography technology. The purified gD2-6His protein mixed with an equal proportion of Freund's adjuvant was subcutaneously injected into New Zealand white rabbits, strengthening the immunization once. The titer of gD2-specific antibody in rabbit serum was detected by ELISA; the specificity and affinity of the rabbit serum antibody were verified by Western blot. **Results** The sequence of the lentiviral recombinant plasmid was consistent with the original design. The theoretical molecular weight of gD2-6His protein was about 37 000, and the electrophoretic migration band was positioned between 40 000 and 55 000 (glycosylation modification). The gD2-specific antibody titer

收稿日期: 2024-07-07

基金项目: 广东省基础与应用基础研究-区域联合基金青年基金(2023A1515110538), 广州市科学技术局市校(院)企联合资助项目(2024A03J0561), 广东医科大学校级大学生创新创业训练计划项目(GDMU 2023033, GDMU2023003)

作者简介: 康海仙, 博士, 讲师, E-mail: 571343709@qq.com

通信作者: 陈伟杰, 博士, 讲师, E-mail: cwj2826@gdmu.edu.cn

of rabbit serum was 1:204 800 by ELISA assay; the 1:500 dilution was useful for detecting the gD2 antigen protein expression of the vaccine virus. **Conclusions** High-purity gD2-6His protein has been successfully prepared; the efficient gD2-specified rabbit polyclonal antibody was verified by ELISA and western blot, which will provide great convenience for the subsequent development and testing of the HSV-2 vaccine.

Key words: HSV-2 gD2 protein; lentivirus; polyclonal antibody; stable cell lines

单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-2)为疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科成员,是引起生殖道疱疹的主要病原体,与HIV可相互增加感染风险,二者均为引起性传播疾病的病原体^[1-3]。HSV-2为大的线性双链DNA病毒,为世界上最流行的性传播疾病病原体,目前尚无上市的HSV-2疫苗^[4-8]。在HSV-2疫苗研发中所能使用的市售病毒蛋白及抗体等检测试剂来源单一,且售价较高,不适合应用于大量基础研究。糖蛋白2(gD2)为HSV-2疫苗研发中使用的主要病毒抗原,经高度糖基化修饰,可引发机体产生强大的体液免疫反应^[9-11]。gD2包膜糖蛋白全长393 aa,1~340 aa为胞外区,341~393 aa为跨膜区和胞内区^[12-13],目前市售的gD2蛋白主要为融合了GST标签的原核表达截断体(266~394 aa),然而gD2抗体价格昂贵且特异性和亲和力欠佳。原核表达载体缺乏蛋白质翻译后修饰系统,无法对目的蛋白进行复杂的糖基化修饰,而gD2为高度糖基化病毒膜蛋白,为了使蛋白的构象和抗原性更加接近天然蛋白,本项目采用慢病毒介导在293T细胞中表达分泌型gD2病毒蛋白(1~339 aa,保留了N端信号肽,去掉了C端跨膜区和胞内区),最大限度保留了糖蛋白胞外区用于制备兔多抗,制备的gD2纯化蛋白及血清抗体可用于后续ELISA及Western blot检测使用。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与药品

DH5 α 感受态(唯地生物)、LB培养基、Amp、Plenti-CMV-3Flag、pMD2.G、pSPAX2、omega质粒提取试剂盒、omega DNA纯化试剂盒、T4 ligase、50%甘油、胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司)、P/S、DMEM(赛默飞世尔科技有限公司)、胰酶、PBS、3 mol/L 醋酸钠溶液、灭菌水、DMSO、Lipo2000、opti-MEM、polybrene、puro、0.2 mol/L NaOH溶液、10 $\times$ DNA loading buffer、荧光染色剂、1 mol/L Tris、5 mol/L NaCl、1 mol/L 咪唑、生理盐水、弗氏完全佐剂(FCA, Sigma F-5881)、弗氏不完全佐剂(FIA, Sigma F-5506)及25%、50%、70%、75%、100%乙醇。

1.2 实验动物

健康雄性新西兰兔2只购买于广州乐晴生命科学有限公司,体质量分别为2.2、2.5 kg(广东医科大学实验动物伦理审查批准号:GDY2302235)。

1.3 实验仪器

生物安全柜(SPANSTAR, BSC-1300IIA2)、二氧化碳培养箱(Panasonic MCO-18AIC)、显微镜(Nikan ECLIPSE)、冰箱(Haier)、离心机(TGL20 MW)、凝胶成像系统(ChampGel 5000 Plus)、霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、高压蒸汽灭菌锅、移液枪、电泳仪、电泳槽、水平摇床、高速离心机、铁架台、移液枪、紫外检测仪、超净工作台、化学发光成像仪、倒置显微镜、恒温水浴箱、-80 $^{\circ}$ C冰箱、离心管架、PCR仪、分光光度计、水平摇床。

1.4 实验方法^[14]

1.4.1 构建pLenti-CMV-gD2-6His质粒 用SnapGene软件设计出外分泌型gD2表达载体序列,依据HSV-2病毒G Strain US6基因(MH790667.1)序列经密码子优化后在擎科合成基因模板。用BamH I、Sal I双酶切基因模板和Plenti-CMV-3Flag分别获取gD2-6His(1-339aa+6His)和线性载体,T4 DNA ligase连接,转化至DH5 α 感受态。扩增阳性重组质粒,DNA琼脂糖凝胶电泳初步验证质粒大小是否正确,将大小正确的质粒送去公司测序。

1.4.2 慢病毒包装与稳转株建立 采用醋酸钠法浓缩pLenti-CMV-gD2-6His、pMD2.G、pSPAX2质粒至1 g/L,提前复苏293T细胞,分为对照组和实验组,待到细胞汇合度到达50%~60%后,分别加入725 μ L opti-MEM和30 μ L Lipo2000到对照组和实验组的浓缩质粒中,轻轻吹打混匀,室温静置5 min后均匀加到两组的293T细胞,进行细胞转染。72 h后收集两组的病毒上清,4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min离心30 min,用0.45 μ m的滤膜进行过滤。重新复苏新的一批293T细胞,分成空载组和gD2-6His组,待到细胞汇合度到达50%后,加入病毒上清。感染48 h后,各组按照1:4传代,传代后细汇合度不超过30%,加入含10 g/L puro完全培养基,加药筛选,待空白组细胞死亡率达90%以上后,更换为无抗性新

鲜培养基,细胞恢复正常状态后,进行多轮加药筛选。

1.4.3 gD2-6His蛋白纯化 收集培养上清后,采用His标签蛋白Western blot检测稳转细胞株表达情况。成功表达后采用镍柱纯化目的蛋白。用1 mL洗涤液过柱,重复8~10次,1.5 mL离心管收集;1 mL洗脱液过柱,重复5次,收集洗脱液用于SDS-PAGE电泳检测纯化效果。

1.4.4 免疫新西兰兔 免疫前,兔耳中动脉取血3~4 mL。抗原制备:将纯化好的gD2-6His 1 mg与等体积FCA混匀,剧烈振荡使其充分乳化,振荡后,1 000 r/min离心1 min,如水相和油相不分层即可注射。初次免疫使用FCA+1 mg抗原,加强免疫使用FIA+500 μ g。从笼中取出兔子放在平坦处,分4个不同部位分别在背部及大腿内侧皮下注射约500 μ L抗原溶液。每2周注射1次,加强免疫后14 d抽血,ELISA检测兔血清中gD2抗体效价。

1.4.5 ELISA检测兔血清中gD2抗体效价(A_{450nm} 值大于免疫前2倍的最高稀释度) 包板:将纯化的gD2-6His蛋白用PBS稀释至2 mg/L包被96孔板,每孔加入100 μ L包被液,4 $^{\circ}$ C过夜;漂洗:次日吸弃孔内包被液,用PBST漂洗3次,每次3 min,拍干;封闭:先配制含0.5% Tween-20的PBST溶液,再用PBST配制含3%脱脂奶粉的封闭液,每个反应孔中加入100 μ L封闭液室温孵育1 h;一抗孵育:加入含3%脱脂奶粉的PBST溶液进行梯度稀释的兔血清(1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200、1:102 400、1:204 800)100 μ L置37 $^{\circ}$ C孵育1 h,漂洗步骤同上;加酶标二抗:各反应孔中,加入含3%脱脂奶粉的PBST稀释的酶标羊抗兔二抗(碧云天,货号A0208)100 μ L室温孵育1 h,漂洗步骤同上;TMB显色:二抗孵育完,漂洗拍干,按100 μ L/孔向96孔酶标板中加入TMB显色液,室温避光孵育10 min,待蓝色显现;终止显色及读数:按100 μ L/孔向显色的96孔酶标板中加入2 mol/L H_2SO_4 终止显色,450 nm的波长下检测样品吸光度。

1.4.6 Western blot检测兔血清中gD2抗体的有效性 用反式遗传学的方法在Vero细胞中拯救表达gD2的PIV5-gD2疫苗病毒(该疫苗病毒由广州思安信生物科技有限公司提供,是以PIV5为载体,生工合成gD2抗原,将gD2抗原基因插入至PIV5载体中),该病毒感染Vero细胞后可在上清中表达出分泌型gD2抗原蛋白,以未感染的Vero细胞培养上清为对照,检测2次免疫后的兔血清中相应

gD2抗体的有效性,即Western blot检测兔抗血清的特异性和亲和力。

2 结果

2.1 构建pLenti-CMV-gD2-6His重组慢病毒质粒

成功构建重组慢病毒质粒(图1)。经密码子优化的gD2-6His基因(1~339 aa)序列连接至pLenti-CMV-3Flag载体中的*Bam*HI、*Sal*I酶切位点之间,双酶切后的目的片段及载体片段见图1A;T4 DNA酶连接后转化DH5 α 大肠杆菌(图1C、D);挑取7个重组质粒进行鉴定,结果见图1E、F。

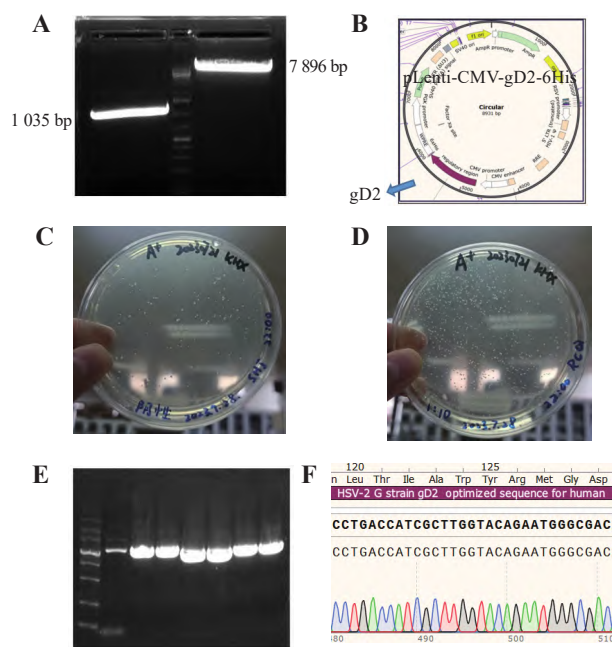


图1 重组慢病毒质粒的构建及鉴定

A. 左边条带为*Bam*HI、*Sal*I双酶切后的gD2-6His目的片段,长度1 035 bp,右边条带为*Bam*HI、*Sal*I双酶切后pLenti-CMV-3Flag空载体,线性长度7 896 bp,中间泳道为GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder(Thermo Scientific);B. 重组子pLenti-CMV-gD2-6His质粒图谱,全长8 931 bp,插入目的基因gD2为1 035 bp;C. 阴性对照转化板(空载);D. 实验转化板(空载+目的基因);E. 重组子质粒PCR电泳结果,长度1 035 bp,第1泳道为DL5000 DNA Marker;F. 测序峰图。

2.2 稳转株中目的蛋白的表达及纯化

上述重组慢病毒质粒包装293T细胞,获取重组慢病毒后感染正常293T细胞,经1 000 μ g嘌呤霉素筛选建立稳转株,分别收获细胞沉淀及培养上清蛋白样品,采用His标签抗体确定目的蛋白的表达(图2A),结果显示细胞内和上清中均有目的蛋白表达;经镍柱纯化(低浓度咪唑洗涤8次,200 mmol/L咪唑洗脱4次)后PAGE电泳检测纯化蛋白,结果显示纯化后的目的蛋白无杂带,纯度约大于95%(图2B红

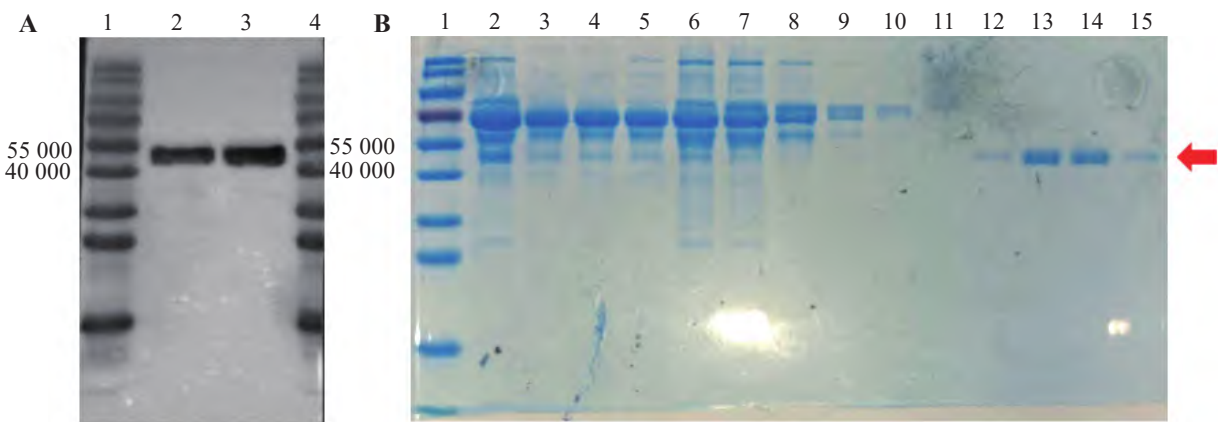


图2 稳转株细胞中gD2-6His目的蛋白的表达及纯化

A.His 标签抗体检测稳转株细胞中gD2-6His 目的蛋白的表达,第1、4泳道为 Prestained Protein Ladder(26616),第2泳道为稳转株细胞沉淀裂解物,第3泳道为稳转株细胞培养上清,gD2-6His 相对分子质量约为37 000,电泳迁移条带位于40 000~55 000,符合高度糖基化蛋白高迁移率的特点;B.培养上清中gD2-6His 目的蛋白的纯化,第1泳道为 Protein Ladder (26616),第2泳道为未纯化培养上清,第3泳道为流穿液,第4~11泳道分别为W1~W8的低浓度咪唑洗涤缓冲液样品,第12~15泳道分别为E1~E4高浓度咪唑洗脱样品,红色箭头指示为纯化后的目的蛋白条带。

色箭头示),可直接免疫动物。

2.3 ELISA 检测兔血清效价

再免后14 d抽血检测抗体效价(表1),结果显示ELISA 抗体效价在1:204 800 以上(计算标准为免疫后 $A_{450\text{ nm}}$ 值大于免疫前2倍的最高稀释度)。

表1 ELISA 检测兔血清抗体效价

血清	稀释比例	$A_{450\text{ nm}}$ 值(1号)	$A_{450\text{ nm}}$ 值(2号)
免疫前	1:1 600	0.001 4	0.001 6
	1:3 200	2.042 4	1.903 2
	1:6 400	1.768 2	1.489 7
	1:12 800	1.127 5	1.036 4
免疫后	1:25 600	0.995 9	0.641 2
	1:51 200	0.640 9	0.410 5
	1:102 400	0.457 8	0.289 6
	1:204 800	0.299 6	0.143 3

实验用了2只新西兰兔,兔抗ELISA 效价均在1:204 800 以上,后续实验选用效价较高的1只。

2.4 Western blot 验证兔血清抗体的特异性和亲和力

免疫后的兔血清按照1:500的比例作为一抗孵育待测样品,待测样品PIV5-gD2为阳性表达gD2蛋白的重组PIV5病毒,PIV5-RR2为表达其他非gD2蛋白的对照样品(均为广州思安信生物科技有限公司友好提供),结果显示在稀释度1:500的情况下,PIV5-gD2阳性样品中可检测到明显的目的蛋白条带,电泳迁移位置位于40 000~55 000;对照样品Vac-RR2中未曝出任何条带,表明gD2兔多抗已成功制备,可作为一抗用于Western blot检测目的蛋白的表达(图3)。

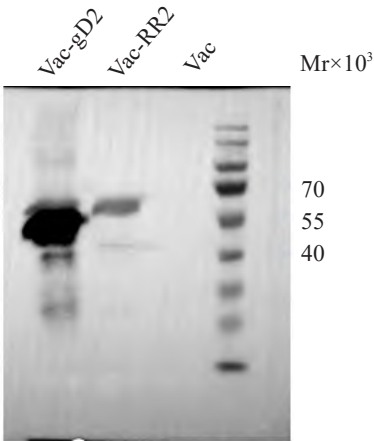


图3 Western blot 检测疫苗样品中gD2蛋白的表达

3 讨论

HSV-2 是一种经性传播的病原体,是全球生殖器溃疡疾病的主要病因^[15-16],且多为潜伏感染^[17],在亚临床脱落期间亦能传播^[18-19]。全球感染HSV-2的超5亿人,每年估计有2 300万新增感染^[20]。HSV-2的血清阳性率随年龄增长而增加,其中女性是男性的两倍^[21-22]。由于HSV-1和HSV-2具有相似的发病机理和宿主关系,感染HSV-2的人群可部分预防HSV-1的感染^[23]。HSV-2血清阳性人群中HIV-1感染风险升高3倍^[24]。HSV-2疫苗可预防、抵抗HSV-1感染的可能性增加其潜在价值,其免疫接种的最佳时间可能为幼儿期^[25]。感染HSV的女性在怀孕期间的传播感染风险最高^[26]。而感染HSV的新生儿通常会面临神经系统后遗症,并且病死率较

高^[27]。艾滋病毒感染风险增加的机制包括响应于生殖器黏膜中HSV-2复制的HIV靶细胞^[28]。因此,通过预防疫苗接种降低HSV-2易感性或重新激活,可显著降低HIV发病率^[29]。

HSV-2病毒主要通过侵犯女性生殖道黏膜建立初始感染,急性期后逆轴突运输至神经元胞体中建立潜伏感染,潜伏的病毒重新激活后会再次转移至阴道皮肤黏膜,引起临床或亚临床病毒脱落与疱疹病变。临床上,HSV-2感染导致的生殖道疱疹疾病主要依靠抗病毒药物进行治疗,如阿昔洛韦及其衍生物等^[1-2]。然而,抗病毒药物在消除甚至减少生殖道疱疹复发方面仍然面临极大挑战,抗病毒药物既不能预防新发感染或再激活,也不能清除潜伏于神经节的病毒,使用有效的HSV-2疫苗目前仍是预防和治疗生殖道疱疹疾病的主要策略^[8-9]。

HSV-2疫苗的开发在临床前及临床试验中均取得了许多进展,但目前仍没有一种疫苗通过临床Ⅲ期试验而成功上市。HSV-2包膜糖蛋白D由US6基因编码,为HSV-2中含量最丰富且诱导体液免疫最强的病毒包膜糖蛋白,但这种单一的体液免疫策略已被证明不成功,因此gD2抗原蛋白及其检测试剂的研发一直不被重视^[12]。目前HSV-2疫苗研发方向倾向于多种抗原联合免疫,gD2作为诱导最强体液免疫的抗原则必不可少,这就决定了gD2抗原蛋白及其抗体等基础检测试剂在HSV-2疫苗研发中需大量使用^[30]。目前gD2抗体生产厂家主要有Santa Cruz、LSBio等,生产的gD2抗体主要针对HSV-2病毒G株,市售的gD2抗原蛋白大多融合了GST标签,因此在ELISA、免疫因子分泌、ELISPOT检测中可能会影响其与抗体结合的特异性和对免疫细胞的刺激作用,导致在疫苗的免疫原性测试中结果出现偏差^[31]。鉴于此,HSV-2疫苗研发中所使用的gD2抗原蛋白及抗体大多由研发单位自己制备,这也导致了各研发单位间评价效果均有差异。

本项目通过慢病毒介导在293T细胞中表达gD2蛋白,纯化后的gD2-6His实际电泳迁移位置位于40 000~55 000(相对分子质量为37 000),这种特性符合高度糖基化蛋白高迁移率的特点,而目前市售的gD2蛋白无糖基化修饰,相对分子质量只有14 000左右。将该高度糖基化的gD2-6His蛋白免疫新西兰大白兔后表现出了良好的免疫原性,再免疫后14 d的血清原液抗体效价在1:204 800以上,未经纯化的血清原液可直接作为Western blot一抗(稀释比例1:500以上)使用,与直接购买价格昂贵

的gD2蛋白及抗体相比,该方法制备的gD2蛋白最大限度地保留了天然蛋白的免疫原性,由其诱导产生的一抗具有较高的效价和特异性,且成本低廉,可满足HSV-2疫苗研发的需要,为后续疫苗研发提供极大的便利。

参考文献:

- [1] GAVRANCIC T, STODDARD K, LEWIS J, et al. Herpes simplex virus type 2 hepatitis: an uncommon cause of persistent fever in a late post-transplant liver recipient[J]. *Am J Case Rep*, 2024, 25:e945140.
- [2] VAN WAGONER N, QUSHAIR F, JOHNSTON C. Genital herpes infection: progress and problems[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2023, 37(2): 351-367.
- [3] LISAC L, RACCAGNI A R, LOLATTO R, et al. Interest and expectations for a herpes vaccine among people diagnosed with genital HSV 1-2 infection: results from an italian survey[J]. *Viruses*, 2024, 16(11):1789.
- [4] TIAN J, CHEN S, LI X, et al. Prevalence of sexually transmitted infections (STIs) among first time visitors at STIs clinic in Hangzhou, China: assessing the influence of the COVID-19 pandemic[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2024, 12(9): e70009.
- [5] JOHNSTON C. Diagnosis and management of genital herpes: key questions and review of the evidence for the 2021 centers for disease control and prevention sexually transmitted infections treatment guidelines[J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 74 (Suppl_2): S134-S143.
- [6] PLUNKETT M, NEVILLE C T, CHANG J G. Genital herpes: rapid evidence review[J]. *Am Fam Physician*, 2024, 110(5):487-492.
- [7] OWEN E M, JAMA M, NAHAL B, et al. 20 years of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) research in low-income and middle-income countries: systematic evaluation of progress made in addressing WHO priorities for research in HSV-2/HIV interactions, HSV-2 control and mathematical modelling[J]. *BMJ Glob Health*, 2024, 9(7):e015167.
- [8] WIJESINGHE V N, FAROUK I A, ZABIDI N Z, et al. Current vaccine approaches and emerging strategies against herpes simplex virus (HSV)[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20(9): 1077-1096.
- [9] MAHANT A M, GUALDRON T J, HEROLD B C. Novel mouse model of recurrent sublethal herpes simplex virus infection recapitulates human antibody responses to primary and chronic infection[J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12(10): 1127.
- [10] HOOK L M, AWASTHI S, CAIRNS T M, et al. Antibodies to crucial epitopes on HSV-2 glycoprotein D as a guide to dosing an mRNA genital herpes vaccine[J]. *Viruses*, 2022,

- 14(3):540.
- [11] WAN M, YANG X, CHEN Z, et al. Comparison of effects of multiple adjuvants and immunization routes on the immunogenicity and protection of HSV-2 gD subunit vaccine [J]. *Immunol Lett*, 2023, 260:11-21.
- [12] AWASTHI S, ONISHI M, LUBINSKI J M, et al. Novel adjuvant s-540956 targets lymph nodes and reduces genital recurrences and vaginal shedding of HSV-2 DNA when administered with HSV-2 glycoprotein D as a therapeutic vaccine in guinea pigs[J]. *Viruses*, 2023, 15(5):1148.
- [13] WANG K, JORDAN T, DOWDELL K, et al. A nonhuman primate model for genital herpes simplex virus 2 infection that results in vaginal vesicular lesions, virus shedding, and seroconversion[J]. *PLoS Pathog*, 2024, 20(9):e1012477.
- [14] 卢晓晴,李蕊,陈浩明,等.pLKO.1-ZNF703 shRNA质粒的构建与鉴定[J]. *广东医科大学学报*, 2024, 42(2):152-156.
- [15] MERTZ K J, TREES D, LEVINE W C, et al. Etiology of genital ulcers and prevalence of human immunodeficiency virus coinfection in 10 US cities. The Genital Ulcer Disease Surveillance Group[J]. *J Infect Dis*, 1998, 178(6): 1795-1798.
- [16] PAZ-BAILEY G, RAHMAN M, CHEN C, et al. Changes in the etiology of sexually transmitted diseases in Botswana between 1993 and 2002: implications for the clinical management of genital ulcer disease[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(9): 1304-1312.
- [17] XU F, SCHILLINGER J A, STERNBERG M R, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988-1994[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(8): 1019-1024.
- [18] MERTZ G J, BENEDETTI J, ASHLEY R, et al. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes[J]. *Ann Intern Med*, 1992, 116(3): 197-202.
- [19] WALD A, ZEH J, SELKE S, et al. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(12): 844-850.
- [20] LOOKER K J, GARNETT G P, SCHMID G P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection[J]. *Bull World Health Organ*, 2008, 86(10): 805-812.
- [21] PAZ-BAILEY G, RAMASWAMY M, HAWKES S J, et al. Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries[J]. *Sex Transm Infect*, 2007, 83(1): 16-22.
- [22] CENTERS FOR DISEASE C PREVENTION (CDC). Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years--United States, 2005-2008[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2010, 59(15): 456-459.
- [23] BROWN Z A, WALD A, MORROW R A, et al. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant[J]. *JAMA*, 2003, 289(2): 203-209.
- [24] FREEMAN E E, WEISS H A, GLYNN J R, et al. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies[J]. *AIDS*, 2006, 20(1): 73-83.
- [25] FORD C A, ENGLISH A, DAVENPORT A F, et al. Increasing adolescent vaccination: barriers and strategies in the context of policy, legal, and financial issues[J]. *J Adolesc Health*, 2009, 44(6): 568-574.
- [26] BROWN Z A, SELKE S, ZEH J, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(8): 509-515.
- [27] KIMBERLIN D W, LIN C Y, JACOBS R F, et al. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era[J]. *Pediatrics*, 2001, 108(2): 223-229.
- [28] ZHU J, HLADIK F, WOODWARD A, et al. Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition[J]. *Nat Med*, 2009, 15(8): 886-892.
- [29] FREEMAN E E, WHITE R G, BAKKER R, et al. Population-level effect of potential HSV2 prophylactic vaccines on HIV incidence in sub-Saharan Africa[J]. *Vaccine*, 2009, 27(6): 940-946.
- [30] CAO H, ZHANG X, CHENG J, et al. A QS21 + CpG-adjuvanted trivalent HSV-2 vaccine and trivalent HSV-2 mRNA vaccine induce a strong immune response, protect against HSV-2 infection, and cross-protect against HSV-1 infection in mice[J]. *Vaccines (Basel)*, 2025, 13(5):497.
- [31] 王智豪,张冬莹,乔岩,等. 促伪狂犬病毒gD蛋白可溶性表达标签的筛选及融合蛋白生物学活性的检测[J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46(6):614-620.

(责任编辑:林加西)