دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۸۱
تیر ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۲/۲۰
اصلاحات: ۸۸/۳/۲۴
پذیرش: ۸۸/۴/۱

طراحی و ساخت نانو زیست ذرات فاژی نوترکیب به عنوان کاندیدای حامل واکسن ژنی- خوراکی

نویسندگان: امیر قائمی[۱]، دکتر حوریه سلیمان‌جاهی[۲*]، پوریا گیل[۳]، دکتر زهیر محمدحسن[۴] و دکتر فرزین روحوند[۵]

۱. دانشجوی دکتری گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشجوی دکتری گروه نانوبیوتکنولوژی دانشکده علوم‌پایه دانشگاه تربیت مدرس
۴. استاد گروه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۵. دانشیار گروه هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران

نویسنده مسئول: *E-mail: Soleim_h@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: حاملین باکتریوفاژی اخیرا به عنوان ابزار حمل ژن و ارائه واکسن مورد توجه قرار گرفته‌اند، که عمده دلایل این موضوع به پایداری فیزیکی، بی‌خطری و قیمت پایین چنین حاملینی مربوط می‌شود. از آن‌جا که در ارتباط با انتقال ژن به درون میزبانان یوکاریوتیک، اطلاعات اندکی در دست است. بنابراین به منظور تعیین قابلیت انتقال ژن این حاملین، مجموعه‌ای از مطالعات در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین منظور با استفاده از سازه Lambda ZAP با قابلیت بیان در سلول‌های جانوری، اقدام به ساب کلون کردن ژن‌های مختلف از جمله EGFP به عنوان کنترل مثبت و PBR322 به عنوان کنترل منفی به داخل ناقل مزبور شد. با به‌کارگیری لیزات باکتریوفاژی، سازه نوترکیب فاژی بسته‌بندی گردید. به منظور ارزیابی کاربردی بودن باکتریوفاژهای تولید شده، ذرات باکتریوفاژی EGFP به کشت سلول‌های یوکاریوتی افزوده شد و بعد از ۳۶ ساعت قابلیت بیان ژن در زیر میکروسکوپ فلورسانت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: مشاهده نشانه‌های فلورسانت ناشی از پروتئین فلورسنت سبز، به معنای عملکرد بیانی حاملین مورد نظر در سیستم‌های یوکاریوتی است. پایداری فاژهای نوترکیب به عنوان حامل واکسن خوراکی در شرایط مشابه مجرای گوارشی (pH و آنزیم‌های مخرب) مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش پایداری، نشان از قابلیت به‌کارگیری حامل فاژی به عنوان واکسن خوراکی را دارد.

واژه‌های کلیدی: نانو زیست ذرات، فاژ لامبدا، واکسن، بیان ژن، EGFP

مقدمه

به‌کارگیری واکسن به روش خوراکی، هم از نظر ایمنولوژیک و هم از نقطه نظر راحتی در به‌کارگیری، دارای اهمیت است. ایمنی‌سازی خوراکی واکسن، امکان واکسیناسیون عمومی را امکان‌پذیرتر می‌کند. به‌علاوه این‌که، در این روش نشان داده شده است که واکسیناسیون قادر است تا پاسخ‌های ایمنی سیستماتیک و مخاطی را به نحو مطلوبی القا سازد. نواحی مخاطی روده دارای طیف وسیعی از سلول‌های دندریتیک می‌باشند که به عنوان عرضه‌کنندگان شاخص پادگن شناخته شده‌اند. با این حال،

تاکنون واکسن پولیو تنها واکسن شناخته شده برای این منظور به حساب می‌آید که در حجم انبوه مورد استفاده قرار گرفته است [۱و۲].

طیف وسیع آنزیمی و شرایط فیزیکی- شیمیایی دستگاه گوارش، سبب ایجاد محیطی نامناسب برای بسیاری از واکسن‌های خوراکی است. از این‌رو به‌کارگیری حاملین ژنی مقاوم به شرایط نامساعد دستگاه گوارش دارای اهمیت بسیار زیادی هستند [۳].

استفاده از حاملین ژنی باکتریوفاژی، به جای استفاده مستقیم از DNA واکسن، به عنوان ابزاری کارا برای حمل ژن به شمار می‌رود؛ که عمده دلایل آن قیمت پایین [۴]، سهولت تولید [۵] و ناتوانی آن‌ها در ایجاد بیماری در سیستم‌های یوکاریوتیک [۶] است. بنابراین به نظر می‌رسد که باکتریوفاژها را می‌توان به عنوان عاملی مؤثر در ارتقای پاسخ‌های ایمنی به‌کار برد [۷].

فناوری نمایش فاژی و توانایی کلون کردن قطعاتی از DNA خارجی در درون ژنوم فاژی، باکتریوفاژها را به کاندیدی خارق‌العاده برای واکسیناسیون تبدیل کرده است [۸]. زیرا با استفاده از آن‌ها می‌توان منبعی از آنتی‌ژن‌ها (با منشأ داخلی یا خارجی) را فراهم ساخت. طبیعت ایمنی‌شناختی ذرات فاژی نیز می‌تواند به عنوان یک عامل کمکی (ادجوان) طبیعی در ایمن‌سازی عمل کند [۵]. در بیش‌تر مواردی که از فاژها به عنوان ابزار حمل ژن استفاده شده است، فاژهای میله‌ای به کار رفته‌اند [۹]. در تعدادی از مطالعات از فاژها برای نمایش پپتیدها یا پروتئین‌ها بهره گرفته شده است و این مسأله نشان داده است که هم باکتریوفاژهای میله‌ای و هم دم‌دار- که توان نمایش پپتیدها و پروتئین‌های آنتی‌ژنی را در سطح شان دارند- می‌توانند القاءکنندگان مناسبی برای ایجاد ایمنی هومورال در برابر آنتی‌ژن‌های نمایش داده شده باشند [۹و۱۰].

این مطالعه در نظر دارد تا بعد از تأیید قابلیت بیانی باکتریوفاژ لامبدا نوترکیب حاوی ژن GFP، قابلیت تحمل این حامل را در برابر شرایط نامساعدی چون pH و آنزیم‌های مخرب- که نقش مهمی در غیرفعال کردن واکسن‌های خوراکی و ناموفق بودن این واکسن‌ها در مطالعات پیشین داشته‌اند- بررسی کند.

مواد و روش ها

حامل

از حامل لامبدا ZAP-CMV شرکت استراتاژن (Stratagene, USA) در این پروژه به منظور ساخت باکتریوفاژهای نوترکیب استفاده شده است. به‌کارگیری آغازگر ویروس سیتومگال سبب بیان حامل در سیستم‌های جانوری می‌شود. از سویه‌های اشرشیاکلی XL1-Blue MRF´ RecA$^-$ و VCS257به منظور تکثیر و تیتراسیون فاژها در این پروژه بهره گرفته شد و سویه DH5α باکتری اشرشیاکلی به منظور ازدیاد و آماده‌سازی پلاسمید استفاده گردید. کشت باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط LB (Gibco BRL) و با اضافه کردن ۵۰μg/ml آمپی‌سیلین انجام شد. در مواردی‌که محیط LB به مکمل نیاز داشته باشد می‌توان از maltose (Merck) 2% (w/v) و ۱۰mM $MgSO_4$ به عنوان مکمل استفاده نمود.

تهیه پلاسمید

سویه باکتریایی DH5α توسط پلاسمید pEGFP-C1 حامل ژن EGFP (BD Biosciences Clontech) ترانس فرم شد و در محیط Luria-Bertani (LB) انکوبه گردید و با به‌کارگیری کیت تخلیص(QIAGEN, Hilden, Germany) اقدام به استخراج پلاسمید از باکتری‌های مورد نظر شد. خلوص پلاسمیدهای مورد نظر با استفاده از ژل الکتروفورز به صورت کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ساخت حامل EGFP-λZAP-CMV

برای ساخت EGFP-λZAP-CMV اقدام به ساب کلون کردن ژن EGFP از حامل pEGFP-C1 در سازه حاملی لامبدا Zap-CMV کردیم و بدین منظور از پرایمرهای زیر در مرحله PCR استفاده شد:

eGFP- forward: 5`- GTAGAATTC(EcoRI) ATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3`
eGFP-reverse: 5`-GACCTCGAG(XhoI) TTACTTGTACAGCTCGTCC-3`

محصول PCR به دست آمده پس از هضم آنزیم به داخل موقعیت مناسب خود در حامل λ ZAP-CMV ساب‌کلون گردید.

اتصال قطعات ژنی

نسبت‌های مولی یکسانی از ژن مورد نظر و حامل λ ZAP-CMV استفاده شد و با به‌کارگیری آنزیم T4DNA ligase (Fermantas)، ژنEGFP به داخل حامل- در حجم نهایی ۲/۵ µl – به همراه ۲ واحد آنزیمT4 DNA ligase و 10 mM ATP (pH 7.5) برای مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به عنوان کنترل مثبت در این مرحله از ژن pBR322 در اتصال قطعات ژنی استفاده شد.

بسته‌بندی سازه‌های ژنی

۱ میکروگرم از DNA حامل Lambda-ZAP ساخته شده به یک ویال از عصاره بسته‌بندی‌کننده (حاوی پروتئین‌های تولید شده باکتریوفاژ لامبدا) افزوده شد. بعد از پیپت کردن و مخلوط کردن آرام محتوای لوله به دست آمده، برای مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. جهت متوقف کردن واکنش از بافر فاژی SM (8 g NaCl, 2.0 g MgSO4·7H2O, 50.0 ml 1M Tris–HCl (pH 7.5), 5.0 ml 2% (w/v) gelatin) استفاده شد. در نهایت 20 µl کلروفرم به این مجموعه افزوده شد. باکتریوفاژهای تولید شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تأیید وجود سازه ژن EGFP در باکتریوفاژ تولیدی

برای تأیید وجود ژن EGFP در محصولات فاژی به‌دست آمده، بر روی DNA استخراج شده از باکتریوفاژها آزمایش PCR (با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن EGFP) انجام شد (جدول ۱). برای انجام PCR، ۴۰۰ نانوگرم از DNA تخلیص شده باکتریوفاژی، ۲/۵ میکرولیتر X PCR buffer ۱۰، ۰/۵ میلی‌لیتر از dNTPs l0mM، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای اختصاصی، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase استفاده شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد آنالیز قرار گرفت.

تیتراسیون محصول بسته‌بندی و خالص‌سازی باکتریوفاژ

با بهره‌گیری از دو سویه XL1-Blue MRF´ و VCS257 اشرشیاکلی و محیطNZY agar (Sigma) واحد ایجادکننده پلاک فاژ به ازای هر میلی‌لیتر (PFU/ml) فاژها تعیین تیتر گردید. بدین منظور بعد از تهیه سریال‌هایی از فاژ- باکتری

جدول ۱: برنامه PCR انجام شده برای شناسایی قطعه ژنی EGFP در باکتریوفاژهای نوترکیب

مرحله	دما (بر حسب °C)		زمان
دناتوراسیون اولیه	۹۴		۷ دقیقه
سیکل ۳۰ تایی	دناتوراسیون	۹۴	۳۰ ثانیه
	اتصال پرایمرها	۶۵	۴۰ ثانیه
	طویل‌سازی	۷۲	۴۵ ثانیه
طویل‌سازی نهایی	۷۲		۷ دقیقه

بر روی محیط ذکر شده، آگار رویی با دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به صورت لایه‌ای بر روی این مجموعه قرار گرفت. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و پلاک‌های فاژی بعد از ۱۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

پلاک‌های فاژی انتخاب شده در حجم انبوه باکتری‌های کشت شده، در محیط مایع LB زیاد شدند. در نهایت فاژها از کشت‌های لیز شده با پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰ درصد (PEG, Sigma Ltd., UK) با انجام سانتریفوژ دور بالا، تخلیص شدند.

آلوده کردن رده سلولی COS-7 با فاژهای نوترکیب

رده سلولی COS-7 (از منشا کلیه میمون) در محیط RPMI 1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله و ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد. نانوزیست ذرات فاژی حاوی ژن پروتئین فلورسانت سبز EGFP با MOI 10^6 (MOI: multiplicity of infection) به سلول‌های کشت داده شده اضافه گشت. بعد از سپری شده زمان انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای مجاورت فاژ با سلول (به همراه spinoculation)، محیط رویی سلول‌ها خارج گردید و در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعته، وجود نشان نوری EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت مورد ارزیابی قرار گرفت. فاژ حاوی ژن pBR322 در این مرحله به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی میزان مقاومت فاژهای تولیدی به شرایط اسیدی

۵۰ میکرولیتر از باکتریوفاژهای λ-Zap در محیط SM تهیه و در تاریکی نگهداری شدند. بافر SM با استفاده از 1M NaOH و یا 1M HCL در مقادیر pH ۲، ۲/۲، ۲/۴، ۲/۸، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۱ تنظیم گردید.

سوسپانسیون فاژی با تیتر اولیه pfu ۵×۱۰^{۱۱} از باکتریوفاژها با رقت 1/200 در داخل بافر فاژی SM با pH مشخص تهیه شد و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس تیتر فاژی با روش سنجش پلاک بر روی میزبان‌های باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی اثر DNase I روی بقای باکتریوفاژ لامبدا

اثر DNase I بر روی عملکرد فاژ لامبدا مورد بررسی قرار گرفت. این در حالی است که به طور موازی اثر DNase I روی ۵ میکروگرم از DNA استخراج شده از فاژ به عنوان کنترل مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش، آنزیم DNase I به تیتر اولیه pfu ۵×۱۰^{۱۱} از باکتریوفاژها افزوده شد و برای ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. به منظور تعیین تیتر فاژها از روش سنجش پلاک با بهره‌گیری از میزبان باکتریایی استفاده شد.

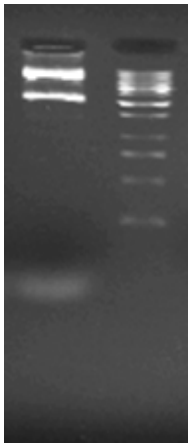
آنالیز آماری

منحنی‌های رگرسیون و محاسبه نیمه عمر و پایداری فاژها به‌صورت گراف‌هایی به‌وسیله نرم‌افزار اکسل نشان داده شد (تیتر log_{10} در برابر pH) و خط‌های رگرسیون طوری تنظیم شدند تا مقادیر R2 تقریباً برابر با ۱ باشد.

نتایج

تخلیص حامل پلاسمیدی pEGFP-C1 کدکننده ژن EGFP

باکتری‌های اشرشیاکلی DH5α مستعد شده، با pEGFP-C1 کدکننده ژنEGFP ترانس فورم شدند و بعد از انتخاب کلون‌های ترانس فورم شده با نشان‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین، کلون‌های انتخاب شده در حجم انبوه کشت داده شدند. با به‌کارگیری کیت کیاژن اقدام به تخلیص پلاسمید از باکتری‌های ترانس فورم شده گردید. شکل شماره ۲ نتیجه پلاسمید تخلیص شده را در کنار خط کش ژنی نشان می‌دهد که حکایت از تأیید وزن حامل مورد نظر و کیفیت استاندارد آن دارد.



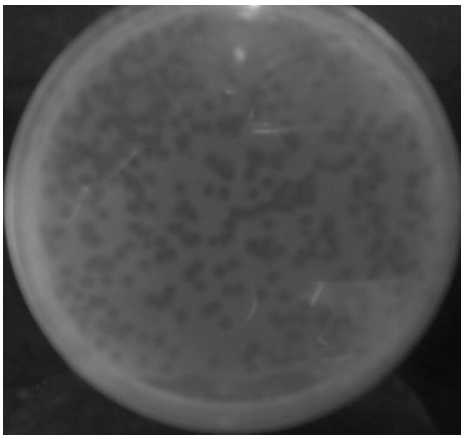
شکل ۱: محصول تخلیص پلاسمید pEGFP-C1 کدکننده ژنEGFP از باکتری‌های اشرشیاکلی DH5α با روش لیز قلیایی

بسته‌بندی ذرات فاژ لامبدا λ-ZAP

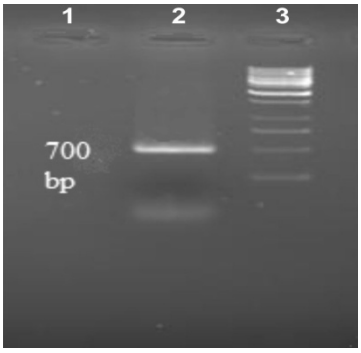
به منظور تأیید وجود فاژ در محلول بسته‌بندی‌کننده، فاژهای تولیدی بر روی چمن باکتریایی افزوده شد و پلاک‌های فاژی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۲ پلاک‌های باکتریوفاژی را بر روی کشت جامد باکتریایی نشان می‌دهد.

تأیید وجود سازه ژن EGFP در باکتریوفاژهای تولیدی با روش Plaque PCR

وجود ژن EGFP در باکتریوفاژهای نوترکیب با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن EGFP مورد ردیابی واقع شد. محصول‌های تولید شده از PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفت(شکل ۳).



شکل ۲: نمایی از پلاک‌های تشکیل شده توسط باکتریوفاژهای حاوی ژن EGFP بر روی محیط NZY آگار حاوی باکتری‌های XL1-Blue MRF´



شکل ۳: وجود باند ۷۰۰ جفت بازی ژن EGFP در فاژهای بسته‌بندی شده به‌وسیله PCR مورد تأیید قرار گرفت. چاهک شماره ۱ کنترل منفی و چاهک شماره ۲ وجود قطعه ژنی EGFP را کنار خط کش ژنی نشان می‌دهد.

قابلیت بیانی و حمل ژنی فاژهای نوترکیب در سلول‌های جانوری

قابلیت بیان سازه EGFP در فاژهای نوترکیب در رده سلولی COS-7 مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بعد از در اختیار قرار دادن زمان مناسب برای جذب فاژ و ورود فاژ به داخل سلول‌ها و سپس شستشوی فاژهای وارد نشده، پس از سپری شدن ۳۶ ساعت، وجود نشان‌های نوری سبز رنگ با استفاده از میکروسکپ فلورسانت مشاهده شد. نشان‌های فلورسانت، تأییدکننده توانایی بیانی حامل فاژی در این سلول‌ها دارد (شکل ۴).

اثر شرایط مختلف اسیدی بر قابلیت حیات باکتریوفاژها

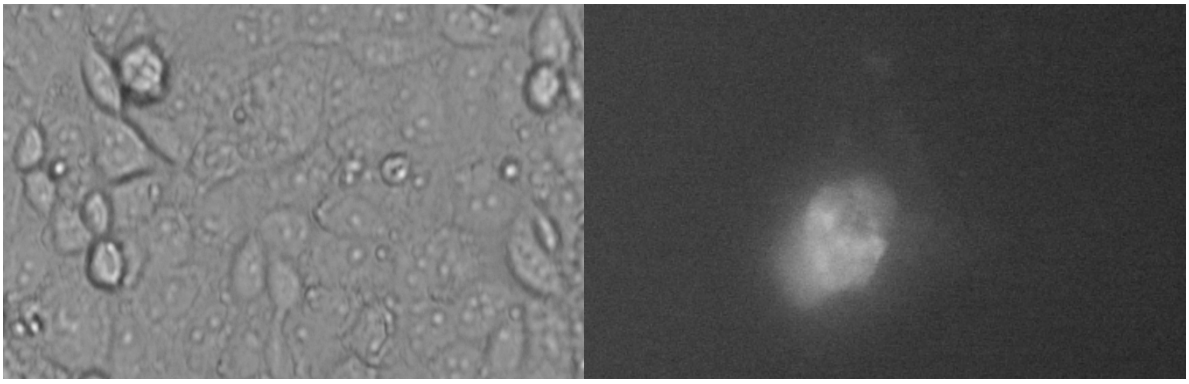
به منظور تعیین میزان حساسیت باکتریوفاژ لامبدا در برابر شرایط اسیدی دستگاه گوارش، به دنبال به‌کارگیری از طریق مسیر خوراکی، پایداری باکتریوفاژ در pHهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تیتر اولیه pfu 5×10^{11} بعد از تهیه رقت‌های ۱ به ۲۰۰ توسط بافر SM تحت pHهای متفاوت قرار گرفتند. سوسپانسیون‌های تهیه شده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. نتایج این مطالعه بعد از تیتراسیون فاژ بروی میزبان باکتریایی با روش سنجش پلاک نشان داد که فاژ، حتی قابلیت تحمل pH حدود ۲/۶ را به میزانی زیاد و بدون کاهش معنادار تیتردار است، درحالی که کاهش pH به ۲، سبب افت فاحش در تیتر فاژ می‌شود.

پایداری فاژ در برابر DNase I

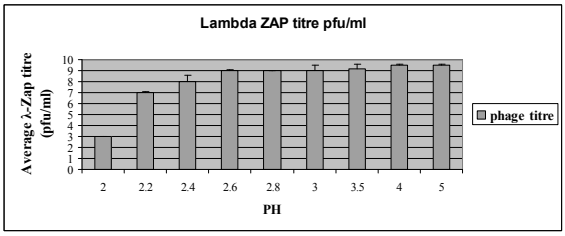
آنزیم DNase I به تیتر اولیه pfu 5×10^{11} از باکتریوفاژها افزوده شد و برای مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تعیین تیتر فاژها با روش سنجش پلاک نشان از عدم تأثیر آنزیم DNase I بر روی فاژ لامبدا را داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

باکتریوفاژ لامبدا نوید بخش یک سیستم حمل واکسن‌های ژنی در سال‌های اخیر بوده است. این مطالعات نشان می‌دهد ذرات فاژی برای حمل پادگن‌های سطحی ویروس هپاتیت B توانایی دارد و همچنین قابلیت حاملین فوق را در القای سیستم ایمنی هومورال مورد تأیید قرار داده‌اند [۱۰].



شکل ٤: وجود نشان‌های فلورسانت سبز به‌دلیل بیان ژن GFP در سلول‌های COS-7 آلوده شده با فاژهای نوترکیب EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت مورد مشاهده قرار گرفت. تصویر سمت چپ، سلول‌ها را با میکروسکوپ معمولی معکوس نشان می‌دهد. تصویر سمت راست، نشان فلورسانت سلولی با میکروسکوپ معکوس فلورسانت را نمایش می‌دهد.



شکل ۵: پایداری باکتریوفاژ λZAP پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در بافر SM در pHهای متفاوت

تاکنون از روش‌های مختلف مانند تزریق داخل ماهیچه‌ای و زیر پوستی، به منظور تجویز واکسن‌های فاژی مختلف (مانند فاژ T4) استفاده شده است [۱۱]. با این وجود، توانایی رساندن فاژهای حاوی DNA مورد نظر، از مسیر خوراکی به عنوان روشی ارزشمند شناخته می‌شود. مطالعات در انسان و حیوانات نشان داده‌اند که تیترهای بالایی از باکتریوفاژها در بافت‌هایی مثل طحال و کبد، به دنبال به‌کارگیری خوراکی فاژ یافت می‌شوند [۱۲،۱۳،۱۴و۱۵]؛ که این شواهد دال بر این است که به‌کارگیری خوراکی واکسن‌های فاژی، کاملاً محتمل خواهد بود؛ به‌ویژه این‌که، میزبان مناسبی مانند باکتری E. coli جزء ساکنین طبیعی دستگاه گوارشی محسوب می‌شود [۱۴]. این مسأله که عمده‌ی فاژها بعد از گذشت ۲۴ ساعت قادرند تا pH اسیدی را تحمل نمایند، پیش‌بینی‌کننده این مطلب است که ذرات فاژی می‌توانند پس از عبور از معده، همچنان زنده و کارا باقی بمانند.

جدا از پایداری بالا در محیط‌های اسیدی، وجود مزیت‌های دیگری چون محصور بودن DNA درون یک ماتریکس پروتئینی، سبب حفاظت محتوای اسید نوکلئیکی فاژی در برابر تخریب آن به‌وسیله نوکلئازها می‌شود. وجود ویژگی‌های فوق در کنار قابلیت بالای حمل ژن و عدم جهش‌زایی حاملین باکتریوفاژی، سبب شده است که طول‌های بزرگی از ژن تا حدود ۲۰ کیلو جفت باز به کمک این حاملین قابل انتقال باشد. ویژگی‌های منحصر به فرد این نانوزیست ذرات فاژی، آن‌ها را به عنوان حاملین ایده‌آل واکسن‌های ژنی مطرح می‌کند.

منابع

1. Sulakvelidze A AZ ,Morris JG Jr. Bacteriophage Therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001;3: 649–659.
2. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. Transplantation Proceedings 2003;35: 1385-1386.
3. Dabrowska K, Switała-Jelen, K, Opolski, A, Weber-Dabrowska, B, Gorski, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. J. Appl. Microbiol 2005;98: 7-13.
4. Catherine D, J. Clark, JB. March. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. Vaccine 2004;22: 2413-2419.
5. March J, Clark J. Genetic immunization against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles. vaccine 2004;22: 1666-1671.
6. Volcy K DS. Proteasome inhibitors enhance bacteriophage lambda (lambda) mediated gene transfer in mammalian cells. Virology 2009;384: 77-87.
7. Lankes H, CN. Zanghi, K. Santos, C. Capella, CM. Duke, S. Dewhurst. In vivo gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors. J. Appl. Microbiol 2007;102: 1337-1349.
8. Beghetto E, Gargano N, Ricci S, Garufi G, Peppoloni S, Montagnani F, Oggioni M, Pozzi G, Felici F. Discovery of novel Streptococcus pneumoniae antigens by screening a whole-genome lambda-display library. FEMS Microbiol Lett 2006;262: 14-21.
9. Larocca D, PD. Kassner. A. Witte, RC. Ladner, G.F. Pierce, A. Baird. Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. FASEB J 1999;13: 727-734.
10. March JB, Clark JR, Jepson CD. Genetic immunisation against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles. Vaccine 2004;22: 1666-71.
11. Bruttin AaB, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob. Agents Chemother 2005;49: 2874-2878.
12. Delmastro P, Meola A, Monaci P, Cortese R, Galfre G. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. Vaccine 1997; 15: 1276-1285.
13. Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997;94: 961-966.
14. Schubbert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. Molecular and General Genetics 1998;259: 569–576.
15. Larralde OG, Martinez R, Camacho F, Amin N, Aguilar A, Talavera A, Stott DI, EM P. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. J Virol Methods 2007;140: 49-58.