

Anticuerpos monoclonales contra proteínas de la nucleocápside del virus IBR y su evaluación por ELISA

Monoclonal antibodies against proteins of the IBR virus nucleocapside and their assessing by ELISA

Jeannette Navarrete O. , Víctor J. Vera** , Gloria Ramírez*** , Luis Carlos Villamil*****

RESUMEN

A partir de un aislamiento de una cepa de campo del virus de IBR, se produjeron clones productores de anticuerpos monoclonales (AcMo) contra componentes de su nucleocápside, para lo cual los inóculos para ser descargados en los ratones Balb/c fueron obtenidos del cultivo de la línea celular (MDBK), los cuales se purificaron y concentraron por centrifugación en gradiente continuo de sacarosa al 30% y posterior precipitación por métodos químicos. Las nucleocápsides obtenidas fueron sometidas a SDS-PAGE preparativas al 10%. Se empleó la técnica de ELISA directa como prueba de tamizaje para los sobrenadantes de los hibridomas positivos para la producción de los AcMo. Se obtuvieron ocho hibridomas positivos al virus de IBR por ELISA; cinco fueron positivos por prueba de seroneutralización y por inmunodot; realizada la selección clonal por medio del proceso de dilución límite, se obtuvieron 56 clones positivos al virus de IBR, que reconocen la proteína de 39.8 kDa; sus sobrenadantes fueron confirmados por las pruebas de ELISA, Dot y Western Blot. Con los AcMo, se normalizó una técnica de ELISA de captura, que permite detectar tanto la cepa de campo como la cepa de referencia Iowa.

Palabras clave: herpesvirus bovino-1, proteínas virales, inmunología, glicoproteínas, nucleocápside.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies were produced against the nucleocapside of a field IBR virus strain. The virus was grown in MDBK cell line. Viral components were purified and concentrated in a continuous 30% saccharose gradient followed by chemical precipitation. Nucleocapsides were run in a 10% SDS-PAGE gel. Positive hybridomas were tested using a direct ELISA developed in our laboratory. As a result eight ELISA positive clones were obtained, from these five were also positive to seroneutralization and immunodot. The clones recognize a 39.8 Kda protein. Additionally, a capture-ELISA was developed using the monoclonal antibodies from this research. This ELISA is useful to detect a reference as a field IBR virus strain.

Key words: bovine herpesvirus-1, viral proteins, immunology, glycoproteins, nucleocapside.

INTRODUCCIÓN

La rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) es una infección de origen viral del grupo de los herpes virus que afecta a los bovinos; su presentación y curso están influidos por factores ambientales. Los órganos que elige el virus principalmente para su manifestación son las mucosas de los aparatos genital y respiratorio. Los gérmenes provocan

cuadros típicos patológicos como vulvovaginitis, aborto, rinotraqueitis, trastornos nerviosos centrales consecuentes a meningoencefalitis, así como afecciones de los órganos digestivos y glándula mamaria (Gibbs *et al.*, 1997; Kahrs, 1977). Los miembros del género Herpes son reconocidos por la arquitectura del virión, los cuales con-

* Bacterióloga, M.Sc. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad Nacional de Colombia. e-mail: jeanavilla@yahoo.com

** M.V. M.Sc. Ph.D. Universidad Nacional de Colombia. e-mail: instituto_genetica@yahoo.com

*** M.V. M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. e-mail: dgcamire@veterinaria.unal.edu.co

**** M.V. M.Sc. Ph.D. Universidad Nacional de Colombia. e-mail: lcwillaj@bacata.usc.unal.edu.co

forman un gran grupo de virus ADN de 150-170 nm de diámetro. Poseen una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros formados por 12 pentámeros y 150 hexámeros, los cuales están unidos por lipopolisacáridos. Por tinciones negativas el virus ha demostrado tener dos cápsides designadas como media e interna (Fenner *et al.*, 1974; Fenner *et al.*, 1997; Virol Div., 1998). En los virus Herpes bovino tipo 1 y 2 se han caracterizado 33 popipéptidos estructurales, de los cuales 11 son de carácter glicoproteico, con pesos moleculares que oscilan entre 12-330 kDa. (Marshall *et al.*, 1986; Misra *et al.*, 1981; Van Drunen *et al.*, 1986). Se han identificado glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL y gM), las cuales están presentes en la superficie de las células infectadas, lo que indica que estas moléculas están involucradas en el reconocimiento y la citolisis inmune (Misra, 1981; Van Drunen *et al.*, 1985; Van Drunen *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 1998); en interacciones entre el virión y la célula huésped y entre las células infectadas y el sistema inmune (Misra *et al.*, 1981; Van Drunen *et al.*, 1984; Nakamichi *et al.*, 2002). Así mismo, son las que están involucradas en la producción de anticuerpos neutralizantes, en la adherencia del virus y la penetración del mismo en la célula huésped (Van Drunen *et al.*, 1985). Se ha observado que anticuerpos contra la gM reconocen, además, una proteína de 9 kDa asociada específicamente con una de 39 kDa con función aún desconocida (Wu *et al.*, 1998). Por medio de anticuerpos monoclonales se han podido evidenciar epitopes inmunodominantes, mejorar las pruebas diagnósticas y evidenciar las funciones de proteínas específicas de los virus (Ayers *et al.*, 1994; Van Drunen *et al.*, 1984).

El presente estudio describe el análisis proteico de cepas de campo y de referencia, con el fin de usar péptidos purificados para la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de la nucleocápside del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa. Con la normalización de una prueba de ELISA usando anticuerpos monoclonales para capturar partículas virales, se está ofreciendo la posibilidad de instaurar técnicas sencillas, de alta sensibilidad y especificidad, para detectar la presencia del virus IBR. Por las mismas características de los anticuerpos monoclonales (cultivos inmortales) se contará con una herramienta diagnóstica de acceso continuo, con la cual se podrán normalizar otro tipo de pruebas que detecten directamente el virus IBR en diversos tipos de muestra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus

Se realizaron cultivos de células de riñón bovino o Madin-Darby (MDBK) (ATCC CCL 22) en frascos roller, los cuales se mantuvieron en crecimiento por 72 horas a 37°C en medio esencial mínimo (SIGMA®) suplementado con suero bovino fetal al 7% (Laboratorios Hyclone). Con el cultivo de células MDBK se cosecharon partículas virales del pase No. 5 de una cepa campo de IBR, aislada en 1999, proveniente de un toro del ható de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. El virus diluido 1:10 en medio, fue absorbido durante 1 hora a 37°C. Con un efecto citopático del 80-100% de las células, el sobrenadante se clarificó centrifugándolo a 15.000 g (Centrífuga Beckman J21) por 20 min a 4°C y se conservó a -80°C (Goding, 1980).

Purificación del virus

La concentración y purificación viral de la cepa de campo del virus IBR se realizó por medio de gradientes continuos de sucrosa al 30% en buffer TEN (NaCl 0,15 M, EDTA 0,005 M, Tris 0,05 M), el cual se centrifugó a 100.000 g por 1 hora a 4°C (Ultracentrífuga Beckman SL50 Rotor SW30). El pellet del virus fue suspendido en buffer lisis (buffer TEN, 0,5% Nonidet P40, 2mM phenyl methyl sulfonil fluoride PMSF) e incubado 15 min a 4°C. El material viral lisado fue suspendido en gradientes continuos de sucrosa al 30% y se centrifugó a 100.000 g por 1 hora a 4°C, para obtener el pellet de las nucleocápsides virales (Israel *et al.*, 1992). Las proteínas de las nucleocápsides fueron concentradas por medio de precipitación etanólica (Deutscher, 1990).

Electroforesis PAGE-SDS

Se realizó una electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida PAGE-SDS como lo describió Laemly (1990). Las proteínas del virus de la cepa de campo aislada en 1999 fueron suspendidas en buffer muestra (2% de SDS, 1% de 2-β mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0,0001% de azul de bromofenol en Tris HCl 62,5 mM) y se separaron los péptidos en geles de acrilamida al 10%. Las proteínas se revelaron con la tinción de azul de Coomassie y nitrato de plata (Sambrook *et al.*, 1989).

Producción de los anticuerpos monoclonales

La línea de mieloma P3X63Ag8.653 (Goding, 1980) suministrada por el laboratorio de bioquímica del Instituto Nacional de Salud, se mantuvo en crecimiento en medio Dulbecco modificado con sales de Earles DMEM (Hibrimax SIGMA®), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Laboratorios Hyclone), solución de antibióticos al 1%, glutamina al 2% y beta mercaptoetanol 0,1% (SIGMA®); fueron incubadas a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Las proteínas virales de la cepa de campo purificadas, concentradas y separadas en SDS-PAGE preparativa al 10% y teñidas con azul de Coomassie (128,8; 89,1 y 83,1; 50,1 y 53,7; 39,8; 27,5 kDa) fueron cortadas del gel cuidadosamente, fraccionadas y maceradas en cortes de 1 cm por inóculo; posteriormente los fragmentos del gel se homogeneizaron en PBS pH 7,2 y luego se mezclaron con adyuvante completo o incompleto de Freund. Cada una de las bandas correspondientes a los péptidos se inocularon en ratones de cepa Balb/c (Bioterio Universidad Nacional de Colombia), hembras de seis a ocho semanas de edad, por vía intraperitoneal. Las fusiones se realizaron de acuerdo con el método de Kohler y Milstein, modificando los tiempos de incubación. La relación de las células de mieloma con referencia a las células de bazo de ratón inmunizados fue de 1:10, respectivamente. Como células alimentadoras se usaron leucocitos obtenidos del bazo de ratones no inmunizados a una concentración de 3x10⁷ cél/ml. Para lograr la fusión celular se adicionó Polyethylene glycol MW 3000-3700 (Hibrimax SIGMA®). El tiempo de la fusión fue de 5 min y se resuspendió en medio suplementado con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina HIBRIMAX SIGMA®). Las fusiones positivas se conservaron en medio con HAT por dos semanas, luego se cambió el medio por DMEM-HT (Hipoxantina, Timidina HIBRIMAX SIGMA®) y se mantuvo por una semana y posteriormente este último se sustituyó por DMEM al 15% de SBF. De los pozuelos donde hubo crecimiento de colonias, sus sobrenadantes fueron probados por ELISA, dot y seroneutralización (Marshal *et. al.*, 1986). Los híbridos fueron clonados por la técnica de dilución límite (Goding, 1980).

Inmunoensayo enzimático para IBR (ELISA)

Se usó como prueba de *screening* para detectar la producción de anticuerpos contra proteínas de la cepa de campo del virus IBR tanto en ratones inmunizados

como en los sobrenadantes de los híbridos fusionados productores de anticuerpos monoespecíficos. Se modificó el método inmunoenzimático sugerido por Vandrunen (1984). La cepa de campo se sonicó a 40 MHz por 60 a 4°C con intervalos de 30 por dos veces (Ultrasonic Homogenizer Cole Parmer Instruments 4710); el antígeno se diluyó en buffer carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,2 M pH 9,6). En placas de poliestireno Inmulon II, se adicionaron 100 ml del virus diluido y se incubaron una hora a 37°C y 24 horas a 4°C en cámara húmeda. Se procedió a lavar dos veces con PBS-tween-leche (buffer fosfato 0,15 M ph 7,2, 0,05% de Tween 20, 5% de leche descremada) y se bloqueó con esta misma. Luego se agregaron 100 ml a cada pozo de las diluciones del suero de los ratones 1:25, y el sobrenadante concentrado de los híbridos. Por último se adicionaron 100 µl de la proteína G marcada y se reveló con buffer citrato fosfato pH 5,0, ortophenilendiamina y H₂O₂. Se leyeron las absorbancias de cada pozo en un espectofotómetro a 492 nm. Como controles positivos se usaron sueros bovinos positivos por seroneutralización y por ELISA y un suero hiperinmune contra IBR obtenido en conejo; igualmente se utilizaron como controles negativos sueros bovinos negativos por ELISA y por seroneutralización.

Inmunodot

El inmunodot se usó como prueba confirmatoria para detectar anticuerpos producidos por los híbridos. En papel de nitrocelulosa se fijó el antígeno (cepa de campo fraccionada por sonicación), se bloqueó con TTBS-leche (Buffer Tris salino pH 7,5, 0,05% de Tween 20, leche descremada 5%), se adicionó el anticuerpo primario; se adicionó el conjugado (la proteína G marcada con peroxidasa) al que se le adicionó el sustrato (Buffer acetato, H₂O₂ y solución de aminoetilcarbazono en dimetil formamida) (Deutscher, 1990).

Western blot

La técnica de western blot de Burnett en 1981 se usó para analizar la reactividad de anticuerpos monoclonales producidos por híbridos fusionados. La cepa de campo fue sometida a fraccionamiento en dos ciclos de sonicación, y sus proteínas se concentraron por precipitación etanólica (Deutscher, 1990). Las proteínas se separaron por electroforesis PAGE-SDS al 10%. Los péptidos fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (Immobilon P) con el equipo Trans Blot de Biorad a 80

mAmp por 90 minutos. La inmunodetección de los péptidos transferidos se realizó con sueros positivos y negativos y con los sobrenadantes con anticuerpos monoclonales o producidos.

Seroneutralización

Por medio de la prueba de seroneutralización, se analizaron los sobrenadantes de los híbridos productores de anticuerpos contra las proteínas del virus de la cepa de campo en estudio. Se realizaron diluciones en base 2 con medio de los sueros bovinos positivos y negativos usados como sueros control, de los sobrenadantes de los hibridomas. Se adicionaron 50 µl de la suspensión del virus (dilución de trabajo) que contenía 100 DITC 50% del virus de la cepa de campo con la que se realizó este estudio. Las cajas se incubaron a 37°C durante una hora. Se adicionó la suspensión de células MDBK en todos los pozos de la caja. Las placas se sellaron e incubaron a 37°C por 72 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es bien conocida la importancia de los anticuerpos monoclonales en el desarrollo de métodos de diagnóstico, ya sea mediante su uso directo o como reactivos para la purificación de moléculas de interés; además, con pocas cantidades de antígeno una vez se logren producir, se obtiene un reactivo biológico inmortal. Todas estas propiedades hacen de ellos una herramienta ideal para la purificación y el estudio de proteínas. Como parte de una estrategia encaminada a la normalización de metodologías que permitan la producción de anticuerpos homogéneos contra el virus de IBR, y su uso en posteriores ensayos que faciliten la estandarización de pruebas diagnósticas para este agente viral, se produjeron anticuerpos monoclonales contra proteínas de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa.

Dentro de los procesos previos a la producción del inmunógeno, se ensayaron varios métodos de concentración y purificación de partículas virales, siendo el más efectivo la ultracentrifugación con colchones de sucrosa al 30%, lo cual coincide con lo reportado por Israel (1992). Por otra parte, se diseñó una estrategia para la obtención de nucleocápsides para obviar los potenciales riesgos de contaminación que se corren con el virus de diarrea viral bovina cepa no citopática, evitando la obtención de componentes estructurales externos del virus de IBR, siendo ésta la primera aproximación que se reporta en

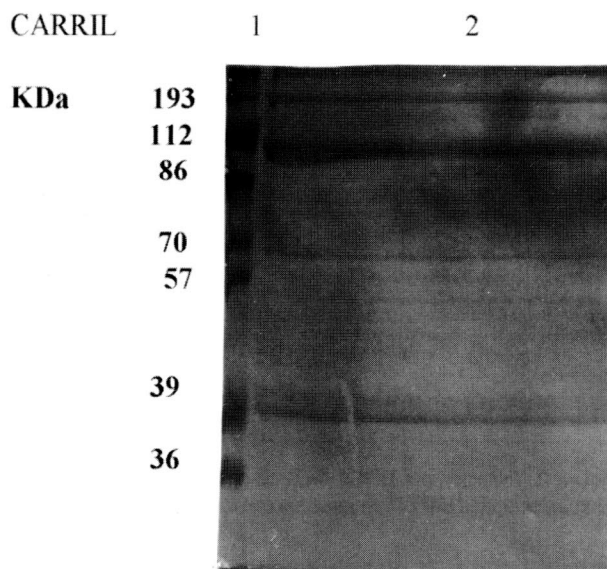


Figura 1. SDS-PAGE 10% preparativa de la cepa de campo del virus IBR teñida con azul de Coomassie. Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: péptidos virales separados.

la literatura, con relación a una probable contaminación con el virus de diarrea viral bovina.

Las proteínas de las nucleocápsides fueron concentradas por precipitación etanólica para ser sometidas a PAGE-SDS preparativa al 10%. El gel se coloró con azul de Coomassie para detectar proteínas en el rango de mg. Los péptidos virales de mayor concentración proteica fueron: 128,8; 89,1 y 83,1; 50,1 y 53,7; 39,8; 27,5 kDa (véase figura 1), seleccionándose para este estudio la proteína de 39,8 kDa, la cual evidenció diversos comportamientos en pruebas de seroneutralización, dot, western blot y ELISA, ya que en cada prueba, el antígeno se usó de manera diferente (denaturado, sonicado, virus completo con proteínas nativas).

La concentración aproximada de proteínas virales por cm de gel inoculado a cada ratón fue de 20 µg/ml; esto coincide con lo reportado por Goding, quien indica que una concentración óptima de antígeno debe estar entre 10 a 50 µg (Goding, 1980). De los ratones hembras inmunizados con las bandas se tomó muestra de sangre de la vena coxal antes de cada inmunización para observar la seroconversión detectada por ELISA. Se obtuvo una seroconversión hacia el día 14 de inmunización, y los anticuerpos se mantuvieron hasta el día del sacrificio (véase figura 2).



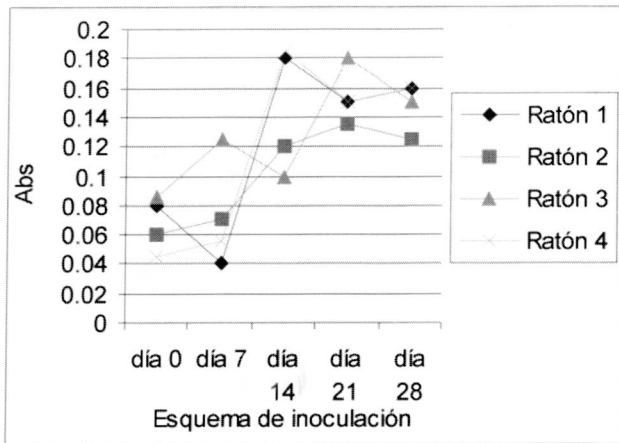


Figura 2. Titulación por ELISA de anticuerpos IgG anti IBR de los sueros de ratones Balb/c inmunizados con los péptidos del virus IBR.

Para la fusión celular se trabajó con la línea de mieloma X-63 Ag8653 por no producir anticuerpos propios y por su estabilidad. Las células de mieloma fueron fusionadas con las células de bazo de ratones inmunizados, y se seleccionaron usando como suplemento en el medio el HAT, produciéndose sobrenadantes ricos en anticuerpos que reconocen de manera diversa la proteína de 39,8 kDa (véase figura 3).

Se obtuvieron ocho híbridos positivos, que por dilución límite originaron 56 clones productores de anticuerpo monoespecífico. Los híbridos iniciales se seleccionaron de acuerdo con los resultados de la prue-

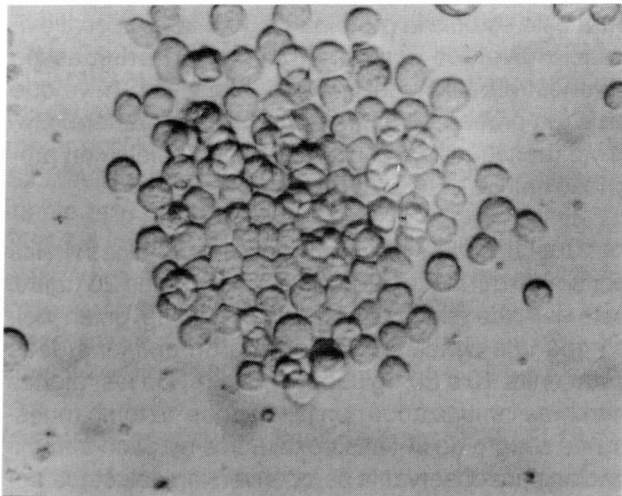


Figura 3. Híbridomas producidos por la fusión de las células de bazo de ratones inmunizados con proteínas de la cepa de campo del virus IBR y células de mieloma (10x).

ba ELISA, y además se probaron por inmunodot y seroneutralización. Los sobrenadantes de los hibridomas son positivos por inmunodot, y cuatro de ellos fueron positivos por seroneutralización (véase tabla 1). Lo anterior indica que los anticuerpos monoclonales producidos reconocen esta proteína de diversas formas, ya que en cada prueba el antígeno se usó de manera diferente (denaturado, sonicado, virus completo con proteínas nativas). En la seroneutralización, el anticuerpo monoespecífico reconoce la proteína viral nativa y no permite la penetración del virus en la célula huésped (MDBK); por tanto, hay reconocimiento del anticuerpo con la proteína, lo que permite sugerir, de acuerdo con los resultados de este trabajo, la posible presencia de estas proteínas en la envoltura del virus, ya que se han reportado proteínas de 9 kDa ligadas con una proteína no identificada de 39 kDa, las cuales están asociadas con la gM cuyo papel se relaciona con la penetración de la membrana y la fusión célula-célula (Wu, 1998).

Lo anterior indica que con estos monoclonales se podrían realizar estudios futuros sobre la función de esta glicoproteína M. Por western blot se detectaron cinco clones de los 56 que reconocen la proteína de 39,8 kDa (véase figura 4), lo que confirma la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos, los cuales pueden servir como instrumento para investigar el papel funcional de esta proteína viral y su relación con la célula infectada. Los anticuerpos monoclonales producidos reconocen el virus de IBR, ya que son específicos para una proteína (39,8 kDa) que la comparten el virus de referencia (Iowa) y la cepa de campo aislada en 1999.

Tabla 1. Identificación de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales positivos para la proteína de 39,8 kDa de la cepa del virus IBR.

Designación del híbrido	PRUEBAS		
	Elisa* (Abs)	Inmunodot	S. N. (Título)
1	0,344	(+)	Np
2	0,450	(+)	Np
3	0,533	(+)	Negativo
4	0,483	(+)	1/16
5	0,493	(+)	1/64
6	0,402	(+)	Negativo
7	0,439	(+)	1/64
8	0,623	(+)	1/128
C+	0,420	(+)	1/64
C-	0,028	(-)	Negativo

(Np: no procesado)

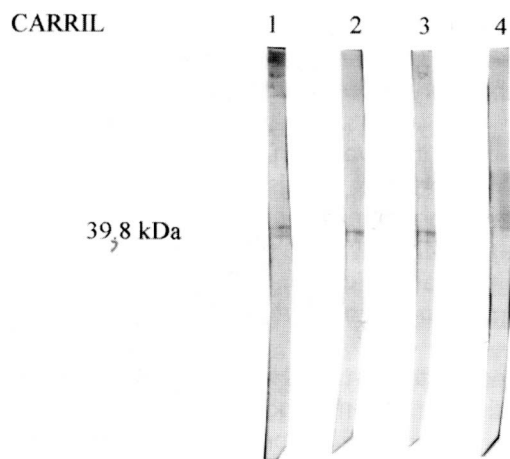


Figura 4. Identificación por western blot de la proteína de 39,8 kDa del virus IBR previa PAGE-SDS 12%. Carriles 1, 2, 3 y 4: reconocimiento de la proteína de 39,8 kDa por los anticuerpos monoclonales producidos.

Esto se confirmó mediante una prueba de ELISA de captura, donde se fijaron los anticuerpos monoclonales a la fase sólida; posteriormente se adicionó el virus. Este complejo Ag-Ac formado por los anticuerpos monoclonales y de forma independiente tanto con la cepa de campo como con la de referencia (Iowa), fue reconocido por un segundo anticuerpo bovino anti IBR, al que se le fijó la proteína G marcada con peroxidasa. Esto indica que los anticuerpos monoclonales pueden reconocer partículas virales de manera específica y permiten su recomendación como herramienta diagnóstica para detectar la presencia del virus IBR.

En conclusión, se logró normalizar una metodología para la obtención de nucleocápsides del virus de IBR; se seleccionó la proteína de 39,8 kDa por su particular respuesta observada en el desarrollo de diferentes procesos; se pudo establecer por pruebas serológicas (ELISA) el reconocimiento de la cepa de campo como de la cepa de referencia Iowa por los anticuerpos monoclonales producidos; la prueba de ELISA y el inmunodot son sensibles como pruebas de *screening* en la determinación de anticuerpos monoclonales contra péptidos del IBR. Por todo lo anterior, los anticuerpos monoclonales producidos contribuirán como una herramienta en el mejoramiento diagnóstico, gracias a las características que poseen los anticuerpos monoclonales como son su alta especificidad, homología y sensibilidad. Por tal razón, con estos anticuerpos se po-

drán normalizar técnicas de diagnóstico como ELISA, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, etc., técnicas que podrán ofrecer diagnósticos precisos que contribuyan con el control de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo de la Unidad Investigativa de la Universidad Nacional de Colombia (Dinain) en el concurso en categoría de trabajos de maestría, Dinain 2000, y dentro del programa de posgrado con la participación del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayers, V. K., Collins, J. K., Purdy, C. W. 1994. Epitope-specific antibody responses in market-stressed calves to bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*. 12(10):940-946.
- Baranowski, E., Dubuisson, J., Pastoret, P. P., Thiry, E. 1993. Identification of 108K, 93K and 42K glycoproteins of bovine herpesvirus 1 by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 133(1-2):97-111.
- Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112: 195-203.
- Deutscher M. P. 1990. *Guide to protein purification*. Vol. 182. Academic Press Inc., EUA.
- Fenner, F., McAuslan, B. R., Mims, C. A., Sambrook, J., White, D. O. 1974. *The Biology of Animal Viruses*. Academic Press, Inc. New York.
- Fenner, F., Bachman, P., Gibbs, P., Murphy, F., Studdert, M., White, D. 1992. *Virología Veterinaria*. Editorial Acribia S.A. España.
- Gibbs, E. P. J. M. Rweyemamu, M. M. 1997. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesviruses 1. *Vet. Bull.* 47:317-342.
- Goding, J. 1980. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 39:285-308.

- Israel, B., Herber, R., Gao, Y., Letchworth Iii, G. 1992. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus 1 replication in cattle. *Viol.* 183:256-264.
- Kahrs, R. F. 1977. Infectious Bovine Rhinotracheitis: A review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171:1055-1064.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Marshall, R. L., Rodriguez, L. L., Letchworth Iii, G. J. 1986. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.* 57(3):745-753.
- Misra, V., Blumenthal, M., Babiuk, L. A. 1981. Proteins specified by bovine Herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus). *J. Virol.* 40(2):367-378.
- Nakamichi, K., Matsumoto, Y., Otsuka, H. 2001. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. *Viol.* 279(2):488-98.
- Nakamichi, K., Kurok, D., Matsumoto, Y., Otsuka, H. 2002. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell to cell junctional adherenc among infected cells. *Viol.* 294(1):22-30.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2a. ed. 1989.
- Van Drunen, Little, Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. V., Gilchrist, J. E., Misra, V., Babiuk, L.A. 1984. Interactions of monoclonal antibodies and bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Viol.* 135:466-479
- Van Drunen, Littell, Van Den Hurk, S., Babiuk, L. A. 1985. Antigenic and immunogenic characteristics of Bovine Herpesvirus type 1 glycoproteins GVP3/9 and GVP 6/11a/16, purified by immunoadsorbent chromatography. *Viol.* 144:204-215.
- Van Drunen, Little, Van Den Hurk, S., Babiuk, L. A. 1986. Synthesis and processing of Bovine Herpesvirus 1 glycoproteins. *J. Virol.* 59(2):401-410.
- _____, Virology Division News. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123:425-440.
- Wu, S. X , Zhu, X. P, Letchworth, G. J. 1998. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J. Virol.* 72(4):3029-3036.