

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

豬泡疹病毒一型基因體重組機制之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-009-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學微生物學科

計畫主持人：項千芸

計畫參與人員：侯庭鏞，吳世祿

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 29 日

中文摘要

在筆者以往的研究中，證實豬疱疹病毒一型 (suid herpesvirus 1, SHV-1) 去氧核糖核酸分解酶 (deoxyribonuclease; DNase) 具有類似 RecBCD 的切割活性，同時定義出 SHV-1 DNase 負責酵素活性及 DNA 結合能力的功能區和關鍵胺基酸，其次也發現 SHV-1 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein, DBP) 具有類似 RecA 促進同源 DNA 配對及兩股交換的能力，這些結果顯示疱疹病毒基因體的重組機制可能是以類似於大腸桿菌 RecBCD pathway 的重組機制進行。因此，本計畫藉由試管內及細胞內重組模式的建立，探究 DBP 及 DNase 在疱疹病毒基因體重組及複製現象上所扮演的角色。本計畫已完成下列三部分實驗：(一) 分析 SHV-1 DBP 及 DNase 在重組過程中參與的角色。我們已建立 helix unwinding 及 homologous pairing 的試管內模式，並發現 DBP 確實具有 helix unwinding 及 homologous pairing 這兩項功能，此外，這兩項能力會隨濃度增加而上升。在最佳反應條件的測試下，發現 SHV-1 DBP 進行 homologous pairing 的最佳反應條件為 80 mM NaCl、20 mM MgCl₂、pH 7.0~7.8，且過程中不需 ATP 的存在。至於 helix unwinding 方面，SHV-1 DBP 進行 helix unwinding 時需要鎂離子的存在，但不需 NaCl 與 ATP。進一步探討 DBP 對 DNase 功能的影響，發現 DBP 會促進 DNase 核酸外切酶的活性，而且 DBP 是否具有結合 DNA 的能力，與是否會影響 DNase 的活性有關。(二) SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析。我們已建立細胞內重組模式，並證實在單純疱疹病毒一型及 SHV-1 感染後，可以成功地啟動重組的進行，顯示 SHV-1 可辨認來自於單純疱疹病毒一型的 *a* 序列，誘發重組的發生。(三) SHV-1 基因體重組複合物的分析。我們已利用 Biotinylated-ELISA 與 yeast two-hybrid system 求證 DNase 與 DBP 之間是否有直接作用。這兩項實驗都得到正面的結果，顯示 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction。因此，SHV-1 DBP 與 DNase 會互相作用，以影響彼此的作用。在未來，由對 SHV-1 DNase 及 DBP 在病毒重組的角色及功能上的了解，可使研究者對疱疹病毒的重組現象有更合理的推論及解釋，進而提供研究者從中尋求控制的方法。

關鍵字：豬疱疹病毒一型；DNase；DNA 結合蛋白質；重組

Abstract

The suid herpesvirus 1 (SHV-1) DNase is an alkaline exonuclease and endonuclease, which exhibits an *Escherichia coli* RecBCD-like catalytic function. The SHV-1 DNA-binding protein (DBP) promotes the renaturation of complementary single strands of DNA, which is an essential function for recombinase. To investigate the functional and physical interactions between SHV-1 DBP and DNase, these proteins were purified to homogeneity. SHV-1 DBP stimulated the DNase activity, especially the exonuclease activity, in a dose-dependent fashion. Acetylation of DBP by acetic anhydride resulted in a loss of DNA-binding ability and a 60% inhibition on the DNase activity, suggested that DNA-binding ability of SHV-1 DBP was required for stimulating the DNase activity. SHV-1 DNase behaved in a processive mode; however, it was converted into a distributive mode in the presence of DBP, implied that SHV-1 DBP stimulated the dissociation of DNase from DNA substrates. The physical interaction between DBP and DNase was further analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay, and a significant interaction was observed. Thus, these results suggested that SHV-1 DBP interacted with SHV-1 DNase and regulated the DNase activity *in vitro*.

Keywords: suid herpesvirus 1; DNase; DNA-binding protein; recombination

目錄

中文摘要-----	I
英文摘要-----	II
前言-----	1
研究目的-----	2
文獻探討-----	3
研究方法-----	7
結果與討論-----	10
參考文獻-----	13
計畫成果自評-----	19
圖表-----	20

前言

豬疱疹病毒一型 (suid herpesvirus 1, SHV-1), 隸屬於疱疹病毒科 (*Herpesviridae*)、阿爾伐疱疹病毒亞科 (*Alphaherpesvirinae*)、水痘病毒屬 (*Varicellavirus*), 為假性狂犬病 (pseudorabies) 的致病原 (Roizman, 1996) 與 SHV-1 同亞科的病毒, 包括單純疱疹病毒一型、二型 (herpes simplex virus 1, 2)、帶狀疱疹病毒 (varicella-zoster virus)、馬疱疹病毒一型 (equine herpesvirus 1)、牛疱疹病毒一型 (bovine herpesvirus 1) 等 (Roizman, 1996)。這些阿爾伐疱疹病毒之間, 在基因的種類、基因在基因體上的排列位置、基因的轉錄調節, 以及病毒 DNA 的複製機制都極為相似 (Ben-Porat et al., 1983), 因此筆者以 SHV-1 為模式, 研究阿爾伐疱疹病毒核酸重組與複製現象的機轉及參與的蛋白質。

研究目的

在筆者以往的研究中，證實SHV-1去氧核糖核酸分解酶（deoxyribonuclease, DNase）具有類似RecBCD的切割活性（Hsiang et al., 1998），隨後也定義出SHV-1 DNase負責酵素活性及DNA結合能力的功能區和關鍵胺基酸（Ho et al., 2000），同時也證實SHV-1 DNA結合蛋白質（DNA-binding protein, DBP）具有類似RecA促進同源DNA配對及兩股交換的能力（Wu et al., 1998）。這些初步的結果顯示發生在疱疹病毒基因體的重組機制，可能是以類似於大腸桿菌RecBCD pathway的重組機制進行。因此，本計畫擬藉由試管內及細胞內重組模式的建立，探究DBP及DNase在疱疹病毒基因體重組及複製現象上所扮演的角色。

文獻探討

豬疱疹病毒一型 (suid herpesvirus 1, SHV-1), 隸屬於疱疹病毒科 (*Herpesviridae*)、阿爾伐疱疹病毒亞科 (*Alphaherpesvirinae*)、水痘病毒屬 (*Varicellavirus*), 為假性狂犬病 (pseudorabies) 的致病原 (Roizman, 1996) 與 SHV-1 同亞科的病毒, 包括單純疱疹病毒一型、二型 (herpes simplex virus 1, 2) 帶狀疱疹病毒 (varicella-zoster virus) 馬疱疹病毒一型 (equine herpesvirus 1) 牛疱疹病毒一型 (bovine herpesvirus 1) 等 (Roizman, 1996)。這些阿爾伐疱疹病毒之間, 在基因的種類、基因在基因體上的排列位置、基因的轉錄調節, 以及病毒 DNA 的複製機制都極為相似 (Ben-Porat et al., 1983), 因此筆者以 SHV-1 為模式, 研究阿爾伐疱疹病毒核酸重組與複製現象的機轉及參與的蛋白質。在筆者以往的研究中, 證實 SHV-1 去氧核糖核酸分解酶 (deoxyribonuclease, DNase) 具有類似 RecBCD 的切割活性 (Hsiang et al., 1998), 隨後也定義出 SHV-1 DNase 負責酵素活性及 DNA 結合能力的功能區和關鍵胺基酸 (Ho et al., 2000)。同時也證實 SHV-1 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein, DBP) 具有類似 RecA 促進同源 DNA 配對及兩股交換的能力 (Wu et al., 1998; Ho et al., unpublished), 這些初步的結果顯示發生在疱疹病毒基因體的重組機制, 可能是以類似於大腸桿菌 RecBCD pathway 的重組機制進行。因此, 本計畫擬藉由試管內及細胞內重組模式的建立, 探究 DBP 及 DNase 在疱疹病毒基因體重組及複製現象上所扮演的角色。

基因重組是一個生物基本且必要的過程, 所有生物體皆需依賴基因重組來產生遺傳物質的多樣性、修復由外生性或內因性所造成損傷之 DNA 及確保在減數分裂時同源染色體能做適當分離並維持染色體的完整性。而重組所造成遺傳物質的交換, 不僅發生在動、植物身上, 在原核生物、病毒、質體甚至粒線體 DNA 均會發生。基本上, 重組可分為非同源性重組及同源性重組, 非同源性重組是指不同源的 DNA 產生的重組行為, 如: bacteriophage 的 site-specific recombination, 為在 lysogenic cycle 時, 使噬菌體 DNA 嵌入宿主 DNA 的一個主要行為 (Landy, 1989), 或是在真核生物中, 當末端 DNA 發生斷裂時, 所利用的 non-homologous end-joining 來修復 DNA (Paques and Haber, 1999)。而同源性重組, 目前在大腸桿菌的 RecBCD pathway 已被明確的證實, 因此在探討其他物種之重組機制時均以此作為模版。例如在真核生物方面, 酵母菌與人類的重組蛋白質已被證明與細菌的重組蛋白質具有同源性, 如: 酵母菌的 Rad51、人類的 hRad51 與大腸桿菌的 RecA 在 DNA 序列上及功能上具同源性 (Aboussekhra et al., 1992; Basile et al., 1992; Shinohara et al., 1992; Ogawa et al., 1995; Park, 1995)。

目前認為, 真核細胞之重組的起始, 是在 DNA 上造成了一個雙股 DNA 斷裂 (double strand break, DSB) (Orr-Weaver et al., 1981; Resnick and Martin, 1976), 而使重組蛋白可以在 DSB 處開始進行重組。DSB 是時常發生的現象, 例如當細胞暴露在 DNA-damaging agents (e.g. ionizing radiation) 複製叉的突然

停止 (Paques and Haber, 1999) 或是細胞遭遇到減數分裂欲發生重組時, 會有 DSB 的發生。倘若 DSB 不修復, 將會造成突變、基因移位及癌症, 而同源染色體的重組即是 DSB 的一個重要的修復方法。DSB 這重要的重組起點在原核生物的大腸桿菌也是相同的, 在 RecBCD enzyme 存在下, 發生重組的機率在 DSB 處高達 99% (Kowalczykowski and Eggleston, 1994; Arnold and Kowalczykowski, 1999), 所以當 DSB 形成後, 便正式展開重組。重組的機制可簡單的分為三個步驟: 在 presynaptic phase 時, 是由 DSB 的產生而開始的。在 DSB 的末端會有核酸分解酶結合在上面, 造成 5' 3'的水解而裸露出 3'端單股的 DNA (asymmetric nuclease activity)(Kowalczykowski, 2000)。之後進入 synaptic phase, 由一個單股 DNA 結合蛋白質結合在 3'端單股的 DNA 上, 協助將單股 DNA 插入到同源 DNA 處 (Kowalczykowski, 2000), 形成 D-loop 的結構, 即 Holliday junction structure。最後為 postsynaptic phase, Holliday junction structure 是一個四股 DNA 的結構, 為重組過程的一個中間產物, 可由 resolvasome complex(RuvA, RuvB and RuvC) 進行 branch migration 及 resolution (Hoess et al., 1987; Kitt and Nash, 1987; Nunes-Duby et al., 1987; Dressler and Potter, 1982; Kowalczykowski, 2000), 以完成重組過程。

本計畫主要藉助試管內及細胞內重組模式的建立, 尤其是 presynaptic phase 到 synaptic phase 的階段, 探討 DNase 及 DBP 參與的角色。以大腸桿菌為例, 參與大腸桿菌重組的因子有 site、single-stranded DNA-binding protein (SSB)、RecA、RecBCD、RecE、RecF、RecG、RecJ、RecN、RecO、RecQ 等十餘種, 但對於重組最重要的因子為 RecA、RecBCD、SSB 和 site。RecBCD 為一個 heterotrimer, 由 *recB*、*recC*、*recD* 基因的產物組成 (Amundsen et al., 2000), 是一個多功能的酵素, 具 3' 5'及 5' 3'外核酸分解酶活性, 可專一的辨認 DSB, 並緊密的結合在 dsDNA 的末端 (Roman and Kowalczykowski, 1989a)。RecBCD 為負責重組起始的蛋白質, 當辨認到 site 時, 會產生不對稱的核酸分解酶活性, 且具單向雙股 DNA 解旋功能 (Telander-Muskavitch and Linn, 1981; Smith, 1988; Taylor, 1988)。RecA 為單股 DNA 結合蛋白, 具同源 DNA 配對的功能且會促進兩股的交換並形成 Holliday junction structure (Kowalczykowski and Eggleston, 1994; Roca and Cox, 1997; Bianco and Kowalczykowski, 1999)。在 ATP 存在下, RecA 會結合在單股 DNA 處, 使被結合的那股插入到另一雙股 DNA 的同源區, 而產生 D-loop (Flory et al., 1984)。

當疱疹病毒基因體經rolling circle模式複製、產生頭尾相連的concatemer的同時, 會發生高頻率的重組現象 (Dutch et al., 1992)。基因體重組現象的發生在疱疹病毒是相當常見的。在Kintner等 (1995) 的研究中, 他們將兩株不具毒力的單純疱疹病毒一型同時進行角膜接種, 之後再自三叉神經節中進行病毒分離, 結果發現74% 的分離株都是重組株, 而Nishiyama等 (1991) 發現單純疱疹病毒一型的重組株可能會有毒力增強的現象發生。另外在Glazenburg等 (1994) 的研究中也發現, SHV-1突變株在接種到羊及豬之後, 都有重組現象的發生。當疱疹病毒

DNA複製時，其重組機率可增加高達十倍以上 (Dutch et al., 1995; Weber et al., 1988)，而且若病毒感染的細胞發生DSB，則會刺激重組的產生 (Sarisky and Weber, 1994)。疱疹病毒基因體發生高頻率重組現象的特性，對於臨床上，尤其是基因工程減毒疫苗及基因治療病毒載體的使用上，會造成相當大的困擾及困難。因為經過不同病毒株分子間或是分子內的重組作用，都有可能發生基因置換的現象，而使得不具毒力的疫苗株回復其毒力、增加抗原的變異性、或是疱疹病毒載體回復其致病性，而對患者造成危險性。因此，本計畫擬探討疱疹病毒基因體重組現象的機制、發生的時序性及參與的蛋白質，以便由對重組作用的了解，從中尋求控制的方法。

在筆者以往的研究中證實，SHV-1 DNase 具有內核酸分解酶、5'外核酸分解酶及 3'外核酸分解酶的活性，單股及雙股 DNA 都可以作為受質 (Hsiang et al., 1998)，此外利用一連串的系列缺損突變株及定點突變株，也定義出 SHV-1 DNase 負責酵素活性及 DNA 結合能力的功能區和關鍵胺基酸 (Ho et al., 2000)。若是將 SHV-1 DNase 與其它核酸分解酶的受質及切割模式作一比較，可以發現 SHV-1 DNase 的切割活性與大腸桿菌的 RecBCD 及 *Neurospora crassa* endo-exonuclease 相似，這兩種酵素都已被證實與重組作用有關 (Fraser et al., 1989; Smith, 1988)。大腸桿菌 RecBCD 所主導的重組機制已被研究得很詳細 (Taylor et al., 1985)，首先 RecBCD 在接近 site 時會對雙股 DNA 的一股進行切割及解旋而產生單股 DNA 的尾端，之後 RecA 會與單股 DNA 的尾端結合，形成 D-loop，而進行同源性 DNA 的交換作用。在筆者的研究中證實 SHV-1 DNase 具有類似 RecBCD 的切割活性 (Hsiang et al., 1998)，同時也證實 SHV-1 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein, DBP) 具有類似 RecA 促進同源 DNA 配對及兩股交換的能力 (Wu et al., 1998; Ho et al., unpublished)，這些初步的結果顯示發生在疱疹病毒基因體的重組機制，可能是以類似於大腸桿菌 RecBCD pathway 的重組機制進行，其中 DBP 類似於 RecA，而 DNase 類似於 RecBCD 的角色。雖然如此，可能仍有其它蛋白質也參與疱疹病毒的重組作用，因為單純疱疹病毒複製及重組的發生在時序及功能上都有關連 (Dutch et al., 1992)，因此負責複製的蛋白質可能也參與重組反應。所以，更進一步對 SHV-1 基因重組複合體的研究，將有助於了解病毒基因體重組作用與複製發生的時序性及機制。

單純疱疹病毒的 DBP，又名 infected-cell polypeptide 8 (ICP8) 或單股 DNA 結合蛋白質 (single-stranded DNA-binding protein) (Honest and Roizman, 1974)，為 UL29 的基因產物 (Weller et al., 1983)。DBP 最早是由 Bayliss 等 (1975) 以 DNA 親合性色層分析法，自病毒感染的細胞中分離出來。Littler 等 (1981) 及 Yeo 等 (1981) 利用胰蛋白酶分解法及免疫沉澱法證實疱疹病毒 (包括單純疱疹病毒、馬疱疹病毒、牛疱疹病毒等) 的 DBP 具有相似的抗原性及胺基酸序列。由缺損 DBP 基因的單純疱疹病毒突變株無法進行病毒 DNA 的複製顯示，DBP 為病毒複製所必須 (Littler et al., 1983)，此外 DBP 也是單純疱疹病毒在 DNA 複製時，主要的 DNA 結合蛋白，因此可以用它為標的，偵測細胞核內複製區間的

構造 (Quinlan et al., 1984)。當單純疱疹病毒的 DNA 開始進行複製前, DBP 是分布在核內被稱為前複製區 (prereplication sites) 的區域, 吸引其他參與 DNA 複製的蛋白, 尤其是 DNA 聚合酶, 進入到前複製區, 並加以組織, 為 DNA 複製作準備 (Bush et al., 1991)。此外, DBP 可以藉由刺激 DNA 聚合酶、helicase-primase complex 及起點結合蛋白質 (origin-binding protein) 的活性, 而促進病毒 DNA 的複製 (Boehmer, 1998; LeGac et al., 1998; Lee and Lehman, 1999)。另外, DBP 也被發現可以降低寡核苷酸的黏合溫度及促進兩個互補的單股 DNA 重新黏合回來, 顯示 DBP 可能與單純疱疹病毒基因體的重組有關 (Dutch and Lehman, 1993)。綜合這些研究指出, 單純疱疹病毒 DBP 應該類似大腸桿菌的單股 DNA 結合蛋白質及噬菌體 T4 gene 32 蛋白, 為一種典型的單股 DNA 結合蛋白質 (Chase and Williams, 1986)。在生物功能方面, 單純疱疹病毒 DBP 除了為病毒複製所必須外, 也參與病毒基因表現的調節, 使晚期基因的表現量下降 (Chen and Knipe, 1996)。因此 Costa 等 (1997) 利用這些特性, 進行單純疱疹病毒 DBP 缺損株的構築, 同時將這種複製缺損株應用在疫苗的使用上。他們發現, 這種缺損株無法進行 DNA 的合成, 所以在送到宿主體內後無法產生子代病毒, 但是卻可以表現與野外株等量的晚期蛋白質。進一步經由動物試驗, 也證明這種 DBP 缺損株可以成功地保護小白鼠免於受到單純疱疹病毒的攻擊。由這些結果, 可以提供研究者對於單純疱疹病毒 DBP 在應用方面的另一種思考方向。

除了單純疱疹病毒外, 帶狀疱疹病毒、馬疱疹病毒一型、牛疱疹病毒一型及人類巨細胞病毒等的 DBP 也陸續被證實 (Anders et al., 1986; Bell and Whalley, 1993; Davison and Scott, 1986; Hammerschmidt et al., 1988)。筆者在以往的研究中, 藉由 subtractive cDNA 基因庫的建立, 定位出 SHV-1 DBP 的位置 (Ho et al., 1996a), 進一步完成 SHV-1 DBP 的定序、表現及功能分析 (Wu et al., 1998)。由這些疱疹病毒及其它物種 (包括大腸桿菌、噬菌體 T4、腺病毒) DBP 的胺基酸序列比較中, 可以發現這些 DBP 都含有一段具保留性的鹼性及環狀胺基酸 (Wang and Hall, 1990), 其中噬菌體 T4 及大腸桿菌的 tryptophan 及 tyrosine、腺病毒的 phenylalanine 及 lysine 為參與 DNA 結合的關鍵胺基酸 (Doan et al., 1984; Khamis et al., 1987; Neale and Kitchingman, 1990)。至於 SHV-1 DBP 的功能區及關鍵胺基酸種類是否也如推測的結果呢? 除了參與疱疹病毒複製上的角色外, DBP 是否可以類似 RecA 的功能, 參與基因體重組的過程呢? 仍值得深入的研究。

研究方法

一、分析 SHV-1 DBP 及 DNase 在重組過程中參與的角色

(一) Homologous-pairing assay

將 pUC18 以 *EcoR* 切成線形當作受質，取 0.5 μg 的線形 DNA 於 100 μl 變性成單股後立刻置於冰上，加入反應緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM DTT, 10% Glycerol, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA) 以及 10 pmol 的 DBP，其總反應體積為 20 μl ，混合均勻後，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 5 分鐘，接著加入 2 μl 的 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protease K 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 10 分鐘，以 stop solution (1.2% SDS, 2% Glycerol, 0.05% Bromophenol blue) 終止反應，以 1.5% 瓊脂糖膠體進行電泳，經定量分析，其同源性配對能力的計算方式為 $\text{ssDNA}/(\text{dsDNA} + \text{ssDNA})$ 。

(二) Helix-unwinding assay

將 M13 forward primer 之 5'端標記 ^{32}P 當探針，取 1 pmol 的探針與 0.25 pmol 的 M13 ssDNA 在 TES buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) 下總體積為 20 μl ，於 65 $^{\circ}\text{C}$ 反應 10 分鐘，待冷卻至 35 $^{\circ}\text{C}$ 以下，使探針與 M13 ssDNA 雜合，接著用 centriflexTM gel filtration 750 xg 2 分鐘移除未黏合的探針，儲存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。將 0.0125 pmol 的雜合 DNA 加入 10 pmol DBP 與緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM DTT, 10% Glycerol, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA)，總反應體積為 20 μl ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 30 分鐘後，再加入 2 μl 的 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protease K 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 10 分鐘，以 stop solution (18 mM EDTA [pH 8.0], 1.2 % SDS, 6% Glycerol, 0.05% Bromophenol blue) 終止反應，以 1.0% 瓊脂糖膠體進行電泳，經烘乾壓片後分析。

(三) 離胺酸 (Lysine) 化學修飾法

將 0.5 ml 純化的 DBP 與等體積的飽和醋酸鈉 (saturated sodium acetate) (15 M) 混和，加入 10 μl 的無水醋酸 (acetic anhydride) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 分鐘，均分為五管，每管分別再加入第二次不同莫爾比 (molar ratio) 的無水醋酸反應 30 分鐘 (mol acetic anhydride/mol DBP = 0/1, 5/1, 10/1, 20/1, 50/1)，以硝基纖維濾紙結合試驗分析。

(四) 硝基纖維濾紙結合試驗 (nitrocellulose filter binding assay)

取 10 pmol SHV-1 DBP 野生株或缺損株與 0.05 μg 以 nick translation 標記 ^{35}S 的 pUC18 單股線狀 DNA (Koch 1986; Rigby 1977) 於 DNA 結合緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 mM EDTA, 125 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 % Glycerol) 中，總反應體積為 20 μl ，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 作用 20 分鐘，將反應混合物滴至以 0.5 M KOH 處理過的硝基纖維濾紙上，以 DNA-binding buffer A (10 mM Tris HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) 沖洗 4 次，待乾後，利用液態閃爍計數儀測定其 CPM 值。

(五) DNase 的內切酶與外切酶活性測定

將 0.5 μg 環形 pUC18 以 *EcoR* 切割成線型 pUC18 作為內切酶與外切酶的受質，加入純化的 DNase 與 DBP，在 DNase 緩衝液 (50 mM Tris-HCl [pH9.0], 2 mM MgCl_2 , 10 mM 2-Mercaptoethanol) 下 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘，其總反應體積為 10 μl ，最後以 40 % sucrose 與 Bromophenol blue 來終止反應，以 1.2 % 瓊脂糖膠體電泳分析。

(六) DNase processive mode 測試

利用標記 ^{35}S 的 DNA (hot DNA) 與未標記的 DNA (cold DNA) 當作受質參與反應。首先將 1 pmol DNase 與 hot DNA 反應於 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘，使 DNase 充分結合在 DNA 上後，再加入 50 倍的 cold DNA，其總反應體積為 100 μl ，反應數分鐘後，利用 100 μl 的 5 % TCA (trichloroacetic acid) 與 10 μl 的 5 mg/ml BSA 在冰上反應 10 分鐘後，以 12000 $\times\text{g}$ 10 分鐘將大片的 DNA 沉澱下來，而被水解的 DNA 會懸浮於上清液中，此時將上清液取出以液態閃爍計數儀分析結果。

二、SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析

(一) 受質的構築

細胞內重組模式所使用之受質為具有 *a* 序列之質體 DNA。其中 *a* 序列的選殖方法為在病毒感染下，產生頭尾相連的基因體形式後，再利用聚合酶連鎖反應，增殖 *a* 序列。之後在 *a* 序列兩端連結 *Bam*HI linker，架接進入 pRD107 中，以形成重組用質體 pRD105。pRD105 的結構見圖一。

(二) 細胞內重組模式的建立

細胞內重組模式參考自 Dutch 等 (1995) 的方法。將上述 pRD105 送入細胞中，以病毒感染後，抽取細胞內的質體 DNA，再送入 *E. coli* 中，最後將 *E. coli* 塗抹於 X-gal agar 上，藉由計算藍白菌落的數量，以評估重組的效率。pRD105 上含有兩個同方向的 *a* 序列，兩個 *a* 序列中含有一個完整的 *lacZ* 基因作為 reporter，當重組發生時，會產生兩個新的質體形式，其中一個具有 *lacZ* 基因但無複製起點 *ori*，另一個不具 *lacZ* 基因但具有複製起點 *ori* (見圖一)，因此在送入 *E. coli* 中，只有後者可以成功的複製，且在 X-gal agar 上出現白色菌落。所以，當重組發生時，白色菌落數會顯著的增加，而我們可藉由計算藍白菌落的數量，以評估重組的效率。

(三) 重組過程與病毒感染的關連

為了探究病毒感染時是否會增加重組的發生，我們將 pRD105 送入細胞後，再將細胞感染病毒，最後收集細胞內質體 DNA，利用上述方法計算重組的發生率。

三、SHV-1 基因體重組複合物的分析

(一) 生物素標記酶結合免疫吸附試驗 (Biotinylated enzyme-linked immunosorbent assay; Biotinylated-ELISA)

將 DNase 透析保存在 PBS 溶液中，取 20 倍 DNase 莫爾數比的生物素 (Sulfo-NHS-biotin) (1 μ g / μ l) 加入 DNase 中，放置在冰上兩小時，以 centricon-10 在 2000 xg 離心 20 分鐘兩次，去除未結合的生物素，保存於 4 $^{\circ}$ C，以此標記生物素之 DNase 進行酶結合免疫吸附試驗。首先將 0.5 μ g DBP 附著在孔上，接著以 100 μ l 0.5 % 脫脂奶粉滴入孔中在 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘，洗淨，甩乾，保存於 -20 $^{\circ}$ C，接著再加入標記生物素之 DNase 與附著在孔上的 DBP 反應，在 37 $^{\circ}$ C 下 60 分鐘後，洗淨、甩乾，加入標記過氧化酶的抗生物素 (avidin) 與生物素結合，以受質 ABTS 予以呈色，15 分鐘後測其波長 405 nm 之吸光值。

(二) Yeast two-hybrid system

將筆者以往所架構之 DBP 基因，殖入酵母菌表現載體中，利用 yeast two-hybrid system，探究與 DBP 結合的蛋白質。這一套系統是利用酵母菌為表現宿主，使用兩種融合蛋白質，分別是與 GAL4 DNA-binding domain 融合的 X 蛋白質及與 GAL4 activation domain 融合的 Y 蛋白質，以報導基因的活化與否，判定 X 及 Y 蛋白質是否具有關連性。因此在這個實驗中，我們擬以 DBP 基因為 X 基因，以 SHV-1 感染細胞後所建立的基因庫為 Y 基因，進行基因的搜尋，以便了解 DBP 可以與那一些蛋白質作用。

結果與討論

一、分析 SHV-1 DBP 及 DNase 在重組過程中參與的角色

在 *E. coli* 重組過程中，RecA 會造成雙股 DNA 的不穩定，使局部雙股分開 (helix unwinding)，而使其他同源單股 DNA 插入進行同源配對 (homologous pairing)，因此我們建立這兩項重組過程的試管內模式，探討 DBP 是否具有這兩項功能。圖二顯示 DBP 確實具有 helix unwinding 及 homologous pairing 這兩項功能，此外，這兩項能力會隨濃度增加而上升。在最佳條件的測試下，發現 SHV-1 DBP 進行 homologous pairing 的最佳反應條件為 80 mM NaCl 20 mM MgCl₂ pH 7.0~7.8，且過程中不需 ATP 的存在。至於 helix unwinding 方面，SHV-1 DBP 進行 helix unwinding 時需要鎂離子的存在，但不需 NaCl 與 ATP。

由於 SHV-1 的 DBP 與 DNase 可能參與 SHV-1 的重組過程，本實驗利用不同濃度之 DBP 探討對 DNase 活性之影響。SHV-1 DNase 具有核酸外切酶及核酸內切酶的功能，首先探討 SHV-1 DBP 是否對 DNase 的不同功能上有專一性的影響，在 DNA 受質方面以 pUC18 超螺旋 DNA 作為核酸內切酶功能測試之受質，*EcoR* 切成線型的 pUC18 作為核酸外切酶功能測試之受質，將 0.5 pmol 的 DNase、0.5 μg 超螺旋或線型 DNA 加入不同濃度的 DBP，在 37 °C 下反應 5 分鐘，分別進行核酸內切酶與外切酶之功能分析。圖三 A 為核酸內切酶，三 B 為核酸外切酶的功能測試，DBP 的量依序為 0、1、5、10 pmol，以瓊脂糖膠體電泳分析，經定量分析後，以 0.5 pmol DNase 水解 DNA 的量為 1 倍，結果顯示 SHV-1 DBP 對 DNase 的核酸內切酶活性並沒有顯著之影響，但對於 DNase 的核酸外切酶表現出有促進之影響，活性增加至 3.27 倍。此實驗可明顯證明 SHV-1 DBP 可專一性的促進 DNase 核酸外切酶的活性比內切酶高出 2.2 倍，故證實 DBP 會刺激 DNase 核酸外切酶的活性。

為了能顯著證實 DBP 對 DNase 核酸外切酶的影響，在預行試驗時，已將 DNase 的量調整為 0.5 pmol 為進行 DNA 水解的閾值以下，表此濃度無法進行水解。圖四 A 以單獨 0.5 pmol 的 DNase，圖四 B 0.5 pmol DNase 加上 10 pmol DBP，以 0.5 μg 線型 pUC18 為受質，在 37 °C 反應 0、1、3、5、10、15 與 20 分鐘後以電泳膠分析，經定量分析後，結果顯示當只有 DNase 時，水解 DNA 的量未有所改變，但加入 DBP 後會顯著刺激 DNase 核酸外切酶的活性，並證實 DBP 對 DNase 核酸外切酶活性的動態影響會隨著反應時間增加而活性不斷上升，且未有趨於緩和之現象。

SHV-1 DBP 為單股 DNA 結合蛋白質，而 DBP 會促進 DNase 之核酸外切酶作用，所以我們進一步研究 DBP 之 DNA 結合功能與 DNase 之核酸外切酶活性有無關連。本項實驗是利用已喪失 DNA 結合功能之 DBP 與 DNase 做核酸外切酶活性測試。將 SHV-1 DBP 以 acetic anhydride 針對離胺酸進行化學修飾，結果顯示當 DBP 在 5 倍莫爾比的無水醋酸修飾下損失約 90 % 的單股 DNA 結合功能，且已達離胺酸被修飾的極限，故認為離胺酸對 DBP 之 DNA 結合能力有絕

對性的影響(圖五)將 0.5 pmol DNase 0.05 μ g 35 S 標記的線型 DNA 與 10 pmol 野生株 DBP 或已失去 DNA 結合能力之 DBP,於 37 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘,切割下來的 DNA 片段利用 TCA 沈澱後,經液態閃爍計數儀分析,以單獨 DNase 水解 DNA 反應的量為 1 倍,結果顯示加入野生株 DBP 的 DNase 水解 DNA 反應高達 5 倍,但以 Lys-modified DBP 與 DNase 反應時其水解 DNA 的量降為 0.5 倍(圖六)。因此此實驗證明當 DBP 失去 DNA 結合功能時,無法促進 DNase 核酸外切酶的功能,所以 DBP 的 DNA 結合能力對刺激 DNase 的核酸外切酶的活性很重要。

進一步研究 DNase 在 DNA 上的移動模式,利用標記 35 S 與未標記的線型 pUC18 DNA 當作受質參與反應。首先將 DNase 與放射線標記的 hot DNA 反應於 37 $^{\circ}$ C 2 分鐘,使 DNase 充分站在 DNA 上,再加入 50 倍未標記的 cold DNA 做競爭者,於 37 $^{\circ}$ C 反應數分鐘,被切割下來的 DNA 片段經 TCA 沈澱後,取上清液利用液態閃爍計數儀分析被水解的 hot DNA,當 DNase 為 processive mode 時,加入 50 倍 cold DNA 並不會改變其產生 CPM 值的速率,若為 nonprocessive mode,加入 50 倍 cold DNA 後 CPM 值速率會下降。在圖七 A 為測試 DNase 的前進模式,2 分鐘後加入 cold DNA,反應時間為 0、2、5、10、20 分鐘,結果顯示 cold DNA 加入後並沒有改變其速率,故證實 DNase 為 processive mode,圖七 B 為 DNase、DBP 與 hot DNA 同時加入,2 分鐘後再加入 cold DNA,反應時間為 0、2、10、20、40、60 分鐘,結果顯示在加入 50 倍 cold DNA 後 DNase 不再水解 hot DNA,其水解速率下降,所以證實 DBP 會改變 DNase 的移動模式,由 processive mode 變為 nonprocessive mode,而此行為會造成 DNase 對受質無法一次水解完成,產生 DNA 斷端,因此推論此行為會造成高重組頻率的發生。

二、SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析

細胞內重組模式參考自 Dutch 等(1995)的方法。將 pRD105 送入 Vero 細胞中,以 10 m.o.i.的病毒量感染細胞,於 8 小時後抽取細胞內的質體 DNA,再送入 *E. coli* 中,最後將 *E. coli* 塗抹於 X-gal agar 上,藉由計算藍白菌落的數量,以評估重組的效率。pRD105 上含有兩個同方向的 *a* 序列,兩個 *a* 序列中含有一個完整的 *lacZ* 基因作為 reporter,當重組發生時,會產生兩個新的質體形式,其中一個具有 *lacZ* 基因但無複製起點 *ori*,另一個不具 *lacZ* 基因但具有複製起點 *ori*,因此在送入 *E. coli* 中,只有後者可以成功的複製,且在 X-gal agar 上出現白色菌落。所以,當重組發生時,白色菌落數會顯著的增加,而我們可藉由計算藍白菌落的數量,以評估重組的效率。由表一發現,單純疱疹病毒一型如同 Dutch 等(1995)的結果一般,可以顯著地驅動重組的發生,而 SHV-1 也可以成功的增加重組的機率,顯示 SHV-1 可辨認來自於單純疱疹病毒一型的 *a* 序列,誘發重組的發生。

三、SHV-1 基因體重組複合物的分析

在證實 DBP 會促進 DNase 核酸外切酶的功能後,我們利用

Biotinylated-ELISA 與 yeast two-hybrid system 求證 DNase 與 DBP 之間是否有直接作用。在 biotinylated-ELISA 方面，首先將 Biotin 標記在 DNase 上 (biotinylated-DNase)，充作為一次抗體，以過氧化酶標記的 avidin 作為二次抗體，來彌補先前 ELISA 過多蛋白質層的缺陷，圖八顯示，DNase 與 DBP 之間會有直接的 physical interaction，且呈劑量反應作用。在 yeast two-hybrid system 方面，也證實 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction。因此，SHV-1 DBP 與 DNase 會互相作用，以影響彼此的作用。

參考文獻

- Amundsen, S.K., Taylor, A.F., and Smith, G.R. 2000. The RecD subunit of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme inhibits RecA loading, homologous recombination, and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7399-7404.
- Anders, D.G., Irmiere, A., and Gibson, W. 1986. Identification and characterization of a major early cytomegalovirus DNA-binding protein. *J. Virol.* 58: 253-262.
- Arnold, D.A., and Kowalczykowski, S.C. 1999. RecBCD helicase/nuclease. In “*Encyclopedia of Life Sciences*”, Nature publishing group, London.
- Bayliss, G.J., Marsden, H.S., and Hay, J. 1975. Herpes simplex virus proteins: DNA-binding proteins in infected cells and in the virus structure. *Virology* 68: 124-134.
- Bell, C.W., and Whalley, J.M. 1993. Herpesvirus ICP18.5 and DNA-binding protein genes are conserved in equine herpesvirus-1. *Virus genes* 7: 219-228.
- Ben-Porat, T., Veach, R.A., and Ihara, S. 1983. Localization of the regions of homology between the genomes of herpes simplex virus type 1, and pseudorabies virus. *Virology* 127: 194-204.
- Bianco, P.R., and Kowalczykowski, S.C. 1999. RecA protein. In “*Encyclopedia of Life Sciences*”, Nature publishing group, London.
- Boehmer, P.E. 1998. The herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein, ICP8, increases the processivity of the UL9 protein DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 273: 2676-2683.
- Boehmer, P.E., and Lehman, I.R. 1993. Herpes simplex virus type 1 ICP8: helix-destabilizing properties. *J. Virol.* 67: 711-715.
- Bush, M., Yager, D.R., Gao, M., Weisshart, K., Marcy, A., Coen, D.M., and Knipe, D.M. 1991. Correct intranuclear localization of herpes simplex virus DNA polymerase requires the viral ICP8 DNA-binding protein. *J. Virol.* 65: 1082-1089.
- Chase, J.W., and Williams, K.R. 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 103-136.
- Chen, Y.M., and Knipe, D.M. 1996. A dominant mutant form of the herpes simplex virus ICP8 protein decreases viral late gene transcription. *Virology* 221: 281-290.
- Cooper, J. P., and Hagerman, P. J. 1987. Gel electrophoretic of the geometry of a DNA four-way junction. *J. Mol. Biol.* 198: 711-719.
- Costa, X.J., Bourne, N, Stanberry, L.R., and Knipe, D.M. 1997. Construction and characterization of a replication-defective herpes simplex virus 2 ICP8 mutant strain and its use in immunization studies in a guinea pig model of genital disease. *Virology* 232: 1-12.

- Davison, A.J., and Scott, J.E. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816.
- Doan, L.T., Toulme, J.-J., and Helene, C. 1984. Involvement of tryptophyl residues in the binding of model peptides and gene 32 protein from phage T4 to single-stranded DNA. A spectroscopic method for detection of tryptophan in the vicinity of nucleic acid bases. *Biochemistry* 23: 1202-1210.
- Dressler, D., and Potter, H. 1982. Molecular mechanisms in genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 727-761.
- Duckett, D.R., Alastair, I., Murchie, H., Diekmann, S., Kitzing, E.V., Kemper, B., and Lilley, D.M.J. 1988. The structure of the Holliday junction, and its resolution. *Cell.* 55: 79-89.
- Dutch R.E., Bianchi V., and Lehman R. 1995. Herpes simplex virus type 1 DNA replication is specifically required for high-frequency homologous recombination between repeated sequences. *J. Virol.* 69: 3084-3089.
- Dutch, R.E., and Lehman, I.R. 1993. Renaturation of complementary DNA strands by herpes simplex virus type 1 ICP8. *J. Virol.* 67: 6945-6949.
- Dutch, R.E., Bruckner, R.C., Mocarski, E.S., and Lehman, I.R. 1992. Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral *a* sequences. *J. Virol.* 66: 277-285.
- Flory, S.S., Tsang, J., Muniyappa, K., Bianchi, M., Gonda, D., Kahn, R., Azhderian, E., Egner, C., Shaner, S., and Radding, C.M. 1984. Intermediates in homologous pairing promoted by RecA protein and correlations of recombination *in vitro* and *in vivo*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49: 513-23.
- Fraser, M.J., Hatahet, Z. and Huang, X. 1989. The actions of *Neurospora* endo-exonuclease on double strand DNAs. *J. Biol. Chem.* 264: 13093-13101.
- Glazenburg, K.L., Moormann, R.J.M., Kimman, T.G., Gielkens, A.L.J., and Peeters, B.P.H. 1994. *In vivo* recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res.* 34: 115-126.
- Hammerschmidt, W., Conraths, F., Mankertz, J., Pauli, G., Ludwig, H., and Buhk, H.-J. 1988. Conservation of a gene cluster including glycoprotein B in bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Virology* 165: 388-405.
- Ho, T.Y., Wu, S.L., Hsiang, C.H., Chang, T.J., and Hsiang, C.Y. 2000 Identification of a DNA-binding domain and an active-site residue of pseudorabies virus DNase. *Biochem J.* 346: 441-445.
- Ho, T.-Y., Hsiang, C.-Y., and Chang, T.-J., 1996a. Analysis of pseudorabies virus genes by cDNA sequencing. *Gene* 175: 247-251.

- Ho, T.-Y., Hsiang, C.-Y., Wu, K., and Chang, T.-J. 1996b. Rapid screening of pseudorabies virus-specific cDNAs from a cDNA library. *J. Virol. Methods* 58: 187-192.
- Ho, T.-Y., Wu, S.-L., Hsiang, C.-H., and Hsiang, C.-Y. Characterization of pseudorabies virus DNA-binding protein in viral replication and recombination. In preparation.
- Hoess, R., Wierzbicki, A., and Abremski, K. 1987. Characterization of intermediates in site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 6840-6844.
- Honess, R.W., and Roizman, B. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14: 8-19.
- Hsiang, C.-Y., Ho, T.-Y., Hsiang, C.-H., and Chang, T.-J., 1998. Recombinant pseudorabies virus DNase exhibits a RecBCD-like catalytic function. *Biochem. J.* 330: 55-59.
- Khamis, M.I., Casas-Finet, J.R., Maki, A.H., Murphy, J.B., and Chase, J.W., 1987. Investigation of the role of individual tryptophan residues in the binding of *E. coli* single-stranded binding protein to single-stranded polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 262: 10938-10945.
- Kintner, R.L., Allan, R.W., and Brandt, C.R. 1995. Recombinants are isolated at high frequency following *in vivo* mixed ocular infection with two avirulent herpes simplex virus type 1 strains. *Arch. Virol.* 140: 231-244.
- Kitt, P.A., and Nash, H.A. 1987. Homology dependent interactions in phage lambda site-specific recombination. *Nature* 329: 346-348.
- Kowalczykowski, S.C. 1991. Biochemical and biological function of *Escherichia coli* RecA protein: behavior of mutant RecA proteins. *Biochemistry* 73: 289-304.
- Kowalczykowski, S.C. 2000. Initiation of generic recombination and recombination-dependent replication. *TIBS* 25: 156-164.
- Kowalczykowski, S.C., and Eggleston, A.K. 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 991-1043.
- Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombinations. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 913-949
- Lee, S.S.K., and Lehman, I.R. 1999. The interaction of herpes simplex type 1 virus origin-binding protein (UL9 protein) with Box I, the high affinity element of the viral origin of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 274: 18613-18617.
- LeGac, N.T., Villani, G., and Boehmer, P.E. 1998. Herpes simplex virus type-1 single-stranded DNA-binding protein (ICP8) enhances the ability of the viral DNA helicase-primase to unwind cisplatin-modified DNA. *J. Biol. Chem.* 273: 13801-13807.

- Li, X., Wang, H., and Seeman, N.C. 1997 Direct evidence for Holliday junction crossover isomerization. *Biochemistry* 36: 4240-4247.
- Lilley, D.M.J. 1997. All change at Holliday junction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9513-9515
- Lin, S.F., Hsu, T.Y., Liu, M.Y., Lin, L.S., Yang, H.L., Chen, J.Y., and Yang, C.S. 1995. Characterization of Epstein-Barr Virus DNase and its interaction with the major DNA binding protein. *Virology* 208: 712-722.
- Littler, E., Purifoy, D., Minson, A., and Powell, K.L., 1983. Herpes simplex virus non-structural proteins. III. Function of the major DNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* 64: 983-995.
- Littler, E., Yeo, J., Killington, R.A., Purifoy, D.J.M., and Powell, K.L. 1981. Antigenic and structural conservation of herpesvirus DNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 56: 409-419.
- Mcllwraith, M.J., Dyck, E.V., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. 2000. Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51, Rad52, and RPA protein. *J. Mol. Biol.* 304: 151-164.
- Mocarski, E.S., and Roizman, B. 1981. Site-specific inversion sequence of the herpes simplex virus genome: domain and structural features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7047-7051.
- Namsaraev, E.A., and Berg P. 1998. Branch migration during Rad51-promoted strand exchange proceeds in either direction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10477-10481.
- Neale, G.A.M., and Kitchingman, G.R., 1990. Conserved region 3 of the adenovirus type 5 DNA-binding protein is important for interaction with single stranded DNA. *J. Virol.* 64: 630-638.
- Nishiyama, Y., Kimura, H., Daikoku, T. 1991. Complementary lethal invasion of the central nervous system by nonneuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Virol.* 65: 4520-4524.
- Nunes-Duby, S.E., Matsumoto, L., and Landy, A. 1987. Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. *Cell* 50: 779-788.
- Ogawa, T., Shinohara, A., and Ikeya, T. 1995. A species-specific interaction of rad51 and rad52 proteins in eukaryotes. *Adv. Biophys.* 31: 93-100.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6354-6358.
- Paques, F., and Haber, J.E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349-404.
- Park, M.S. 1995. Expression of human RAD52 confers resistance to ionizing

- radiation in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270: 15467-15470.
- Quinlan, M.P., Chen, L.B., and Knipe, D.M. 1984. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* 36: 857-868.
- Resnisk, M.A., and Martin, P. 1976. The repair of double-stranded breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol. Gen. Genet.* 143: 119-145.
- Roca, A.I., and Cox, M.M. 1997. RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic Acid Res.* 56: 129-223.
- Roizman, B. 1996. Herpesviridae, p. 2221-2230. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), *Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Roman, L.J., and Kowalczykowski, S.C. 1989a. Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme using a novel helicase assay. *Biochemistry* 28: 2863-2873.
- Smith, G.R. 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 52: 1-28.
- Taylor, A.F. 1988. In *Genetic Recombination*. Eds. Kucherlapaati, R. & Smith, G. R., (Am. Soc. Microbiol., Washington), pp. 231-263.
- Taylor, A.F., Schultz, D.W., Ponticelli, A.S., and Smith, G.R. 1985. RecBC enzyme nicking at Chi sites during DNA unwinding: location and orientation-dependence of the cutting. *Cell* 41: 153-163.
- Telander-Muskavitch, K., and Linn, S. 1981. In *The Enzymes*, ed. Boyer, P. C. (Academic, New York), Vol. 14. pp. 233-250.
- Thomas, M.S., Gao, M., Knipe, D.M., and Powell, K.L. 1992. Association between the herpes simplex virus major DNA-binding protein and alkaline nuclease. *J. Virol.* 66: 1152-61.
- Wang, Y., and Hall, J., 1990. Characterization of a major DNA-binding domain in the herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein (ICP8). *J. Virol.* 64: 2082-2089.
- Weber, P.C., Challberg, M.D., Nelson, N.J., Levine, M., and Glorioso, J.C. 1988. Inversion events in the HSV-1 genome are directly mediated by the viral DNA replication machinery and lack sequence specificity. *Cell* 54: 369-381.
- Weller, S.K., Lee, K.J., Sabourin, D.J., and Schaffer, P.A. 1983. Genetic analysis of temperature-sensitive mutants which define the gene for the major herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein. *J. Virol.* 45: 354.
- Wu, S.-L., Hsiang, C.-Y., Ho, T.-Y., and Chang, T.-J. 1998. Identification, functional expression, and characterization of the pseudorabies virus DNA-binding protein gene and gene product. *Virus Res.* 56: 1-9
- Yeo, J., Killington, R.A., Watson, D.H., and Powell, K.L. 1981. Studies on

cross-reactive antigens in the herpesviruses. *Virology* 108: 256-266.

Zeng, Y. Middeldorp, J. Madjar, J.J., and Ooka, T. 1997. A major DNA binding protein encoded by BALF2 open reading frame of Epstein-Barr virus (EBV) forms a complex with other EBV DNA-binding proteins: DNase, EA-D, and DNA polymerase. *Virology*. 239: 285-95.

Zheng, S., and Seeman, N.C. 1994. Symmetric Holliday junction crossover isomers. *J. Mol. Biol.* 238: 658-668.

計畫成果自評

本年度計畫進度符合預期，並已完成以下三部份實驗：

一、分析 SHV-1 DBP 及 DNase 在重組過程中參與的角色

我們已建立 helix unwinding 及 homologous pairing 的試管內模式，並發現 DBP 確實具有 helix unwinding 及 homologous pairing 這兩項功能，此外，這兩項能力會隨濃度增加而上升。在最佳反應條件的測試下，發現 SHV-1 DBP 進行 homologous pairing 的最佳反應條件為 80 mM NaCl 20 mM MgCl₂、pH 7.0~7.8，且過程中不需 ATP 的存在。至於 helix unwinding 方面，SHV-1 DBP 進行 helix unwinding 時需要鎂離子的存在，但不需 NaCl 與 ATP。進一步探討 DBP 對 DNase 功能的影響，發現 DBP 會促進 DNase 核酸外切酶的活性，而且 DBP 是否具有結合 DNA 的能力，與是否會影響 DNase 的活性有關。

二、SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析

我們已建立細胞內重組模式，並證實在單純疱疹病毒一型及 SHV-1 感染後，可以成功地啟動重組的進行，顯示 SHV-1 可辨認來自於單純疱疹病毒一型的 α 序列，誘發重組的發生。

三、SHV-1 基因體重組複合物的分析

我們已利用 Biotinylated-ELISA 與 yeast two-hybrid system 求證 DNase 與 DBP 之間是否有直接作用。這兩項實驗都得到正面的結果，顯示 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction。因此，SHV-1 DBP 與 DNase 會互相作用，以影響彼此的作用。

表一 細胞內重組模式。

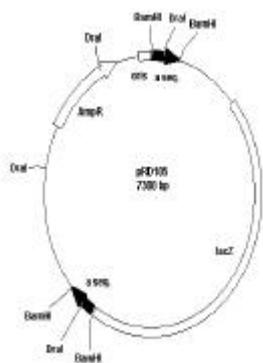
	Number of white colony	Number of blue colony	Number of total colony	Recombination efficiency (%) ^c
Control ^a	0	2	0	0
pRD105	783	17250	18033	4.34
pRD105/HSV-1 ^b	1214	10590	11804	10.30
pRD105/SHV-1 ^b	474	1858	2332	20.33

^a Control 為細胞不經任何處理的陰性對照組。

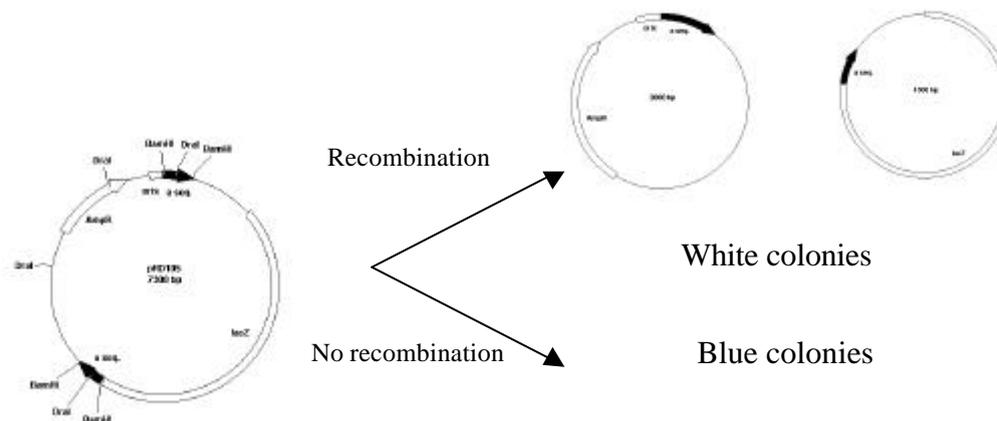
^b pRD105/HSV-1、pRD105/SHV-1 表示先將 pRD105 送到細胞後，再以 10 m.o.i. 的病毒量感染。

^c Recombination efficiency 為白色菌落數除以總菌落數的百分比。

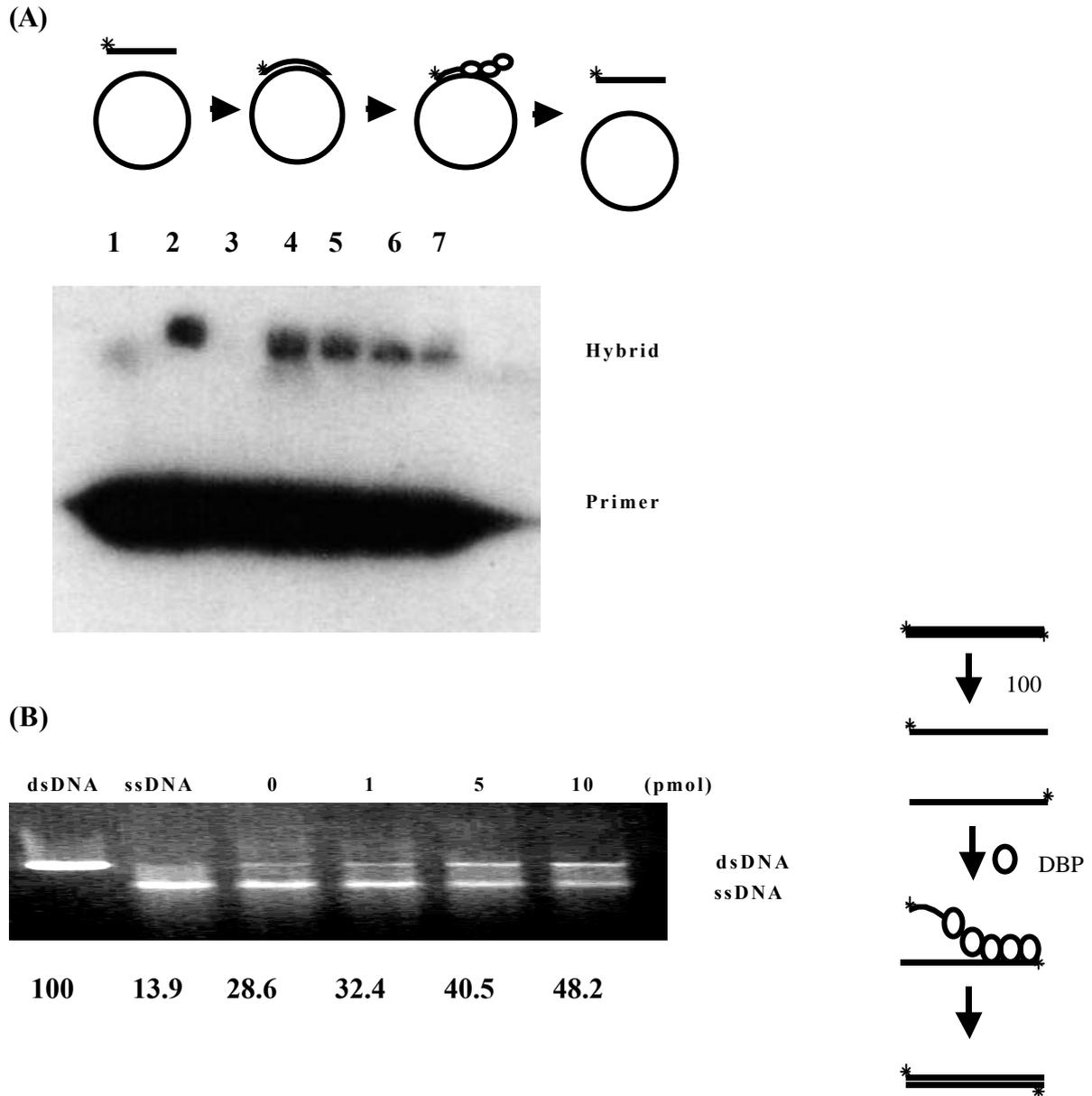
(A)



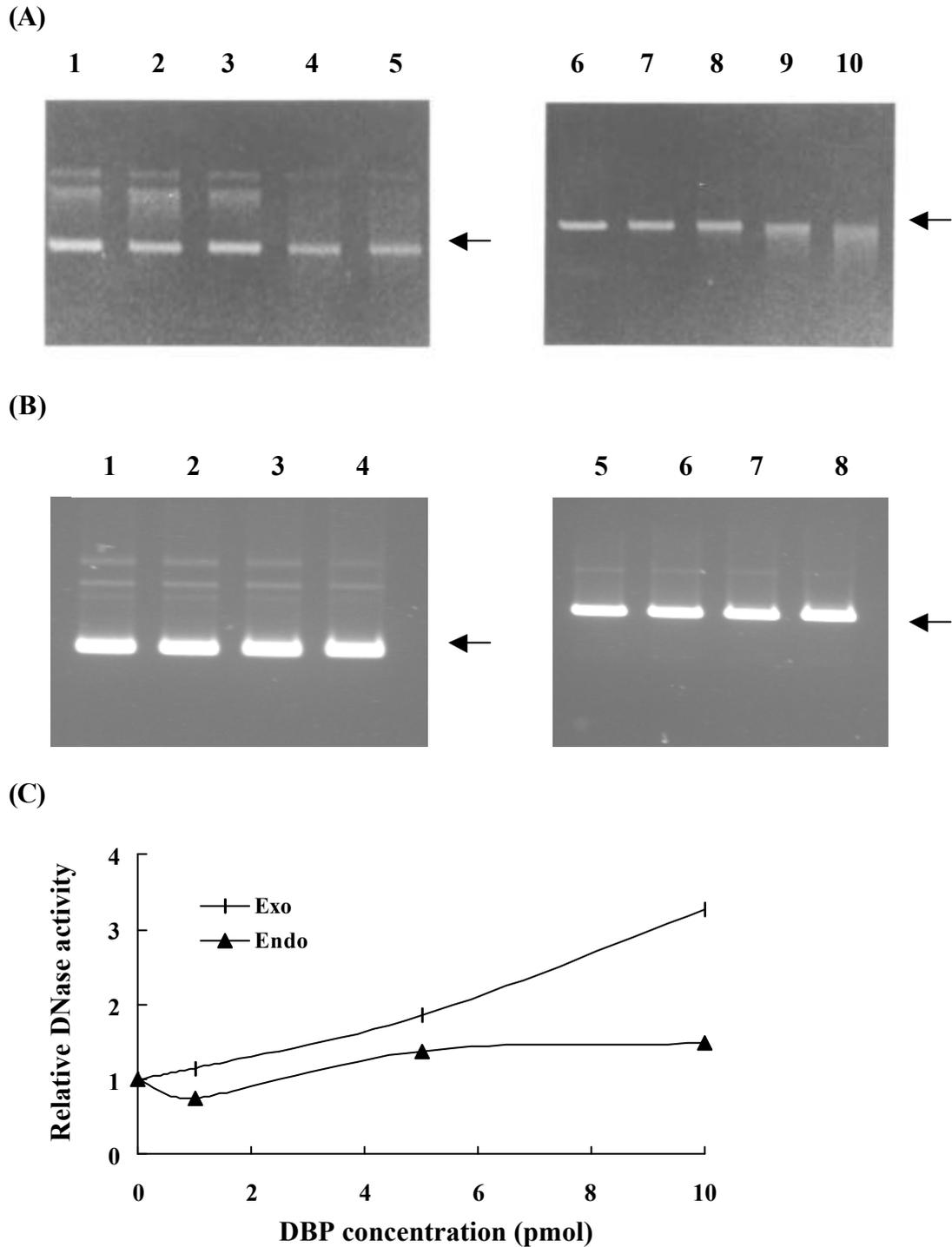
(B)



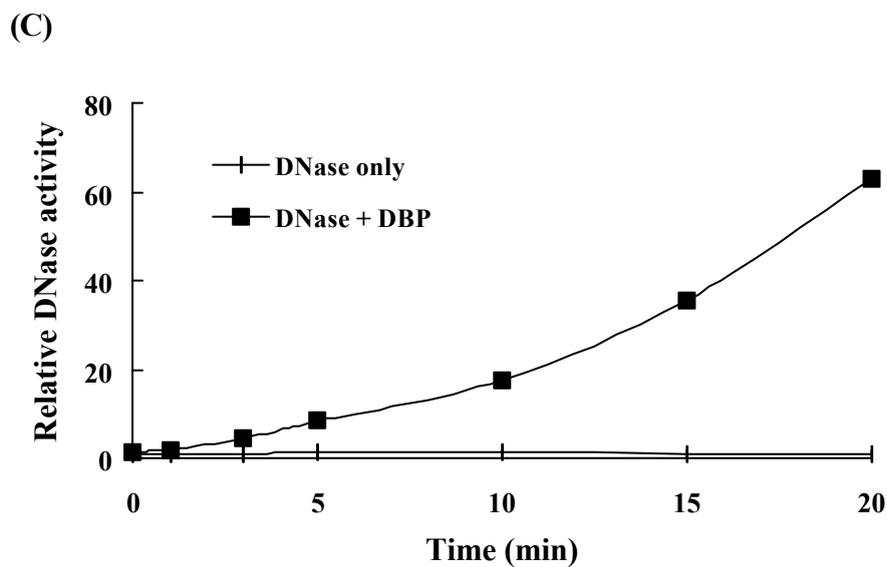
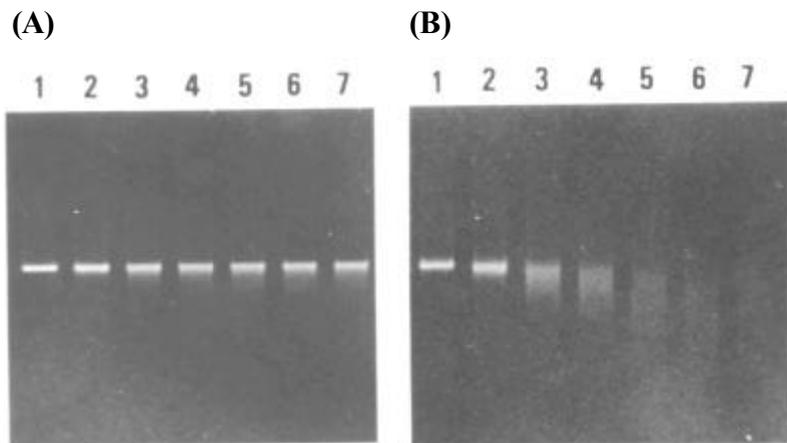
圖一 細胞內重組的模式圖。(A)pRD105 質體的架構。(B)細胞內重組模式的實驗流程。



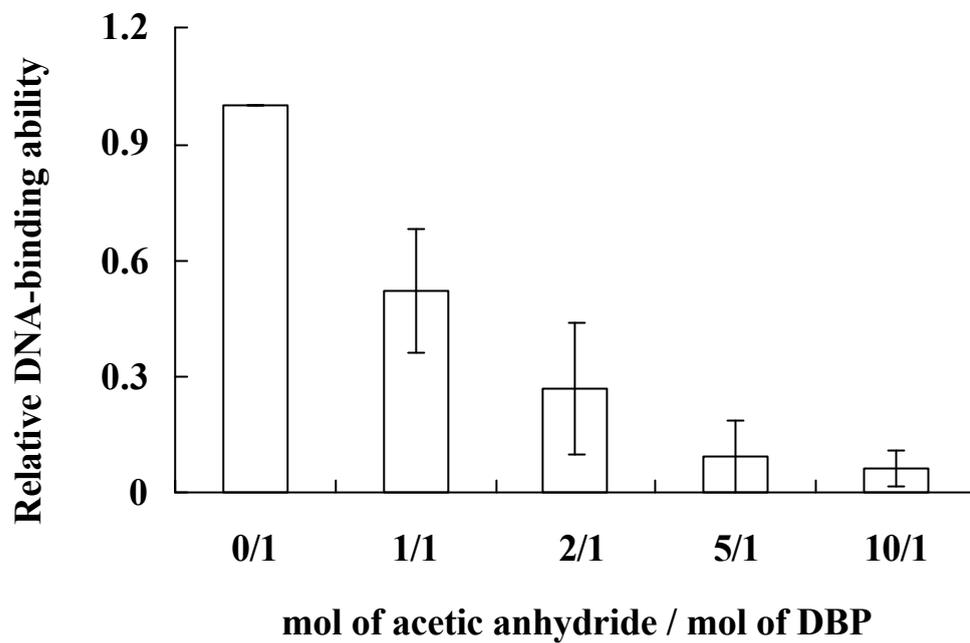
圖二 SHV-1 DBP 具有 **helix unwinding** 及 **homologous pairing** 的能力。(A) Helix unwinding。將不同濃度的 DBP 與 hybrid DNA 作用 30 分鐘後，以電泳分析。Lane 1 為 M13 primer，lane 2 為 hybrid，lane 3 為 100% 變性的 hybrid，lanes 4~7 分別為 0、1、5、10 pmol 的 DBP。箭頭部份為 hybrid 及 primer 的位置。(B) Homologous pairing。將 0.5 μ g 的 ssDNA 分別與 0、1、5、10 pmol 的 DBP 混合，於 37 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後，以電泳分析。Lane 1 代表 dsDNA，lane 2 代表 ssDNA，箭頭部份為 dsDNA 及 ssDNA 的位置。圖下方的數字代表同源性 DNA 配對的百分比，計算方式以 ssDNA 除以 dsDNA 與 ssDNA 總量的百分比。



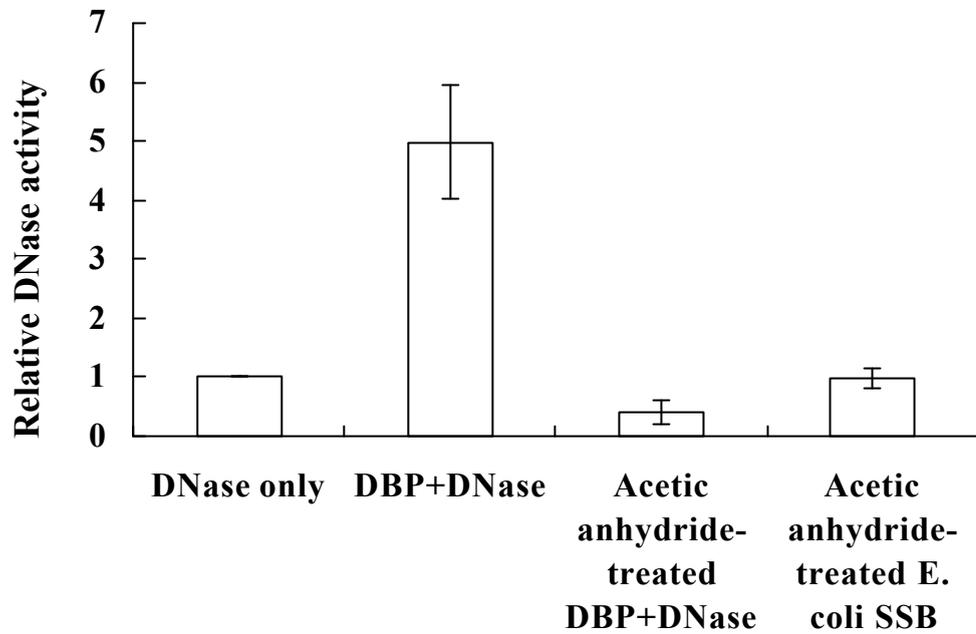
圖三 SHV-1 DBP對DNase活性的影響。(A)SHV-1 DBP對DNase內切酶及外切酶活性的影響。Lanes 1~5為利用supercoiled pUC18 dsDNA為受質，lanes 6~10為利用linear pUC18 dsDNA為受質。SHV-1 DNase (0.5 pmol)與0.5 μ g dsDNA和0 (lanes 2, 7)、1 (lanes 3, 8)、5 (lanes 4, 9) 或10 (lanes 5, 10) pmol SHV-1 DBP混合後，於37⁰C作用5分鐘。(B)SHV-1 DBP內切酶及外切酶的活性。組別同(A)，但反應中不加入DNase。(C)定量分析。



圖四 SHV-1 DBP 對 DNase 外切酶活性的影響。將 SHV-1 DNase (0.5 pmol)與 0.5 μ g linear pUC18 dsDNA 在不含(A)或含有(B) 10 pmol SHV-1 DBP 的情況下，於 37⁰C 作用 0 (lane 1)、1 (lane 2)、3 (lane 3)、5 (lane 4)、10 (lane 5)、15 (lane 6) 或 20 (lane 7)分鐘，再以 1.2% agarose gels 分析。(C)定量分析。

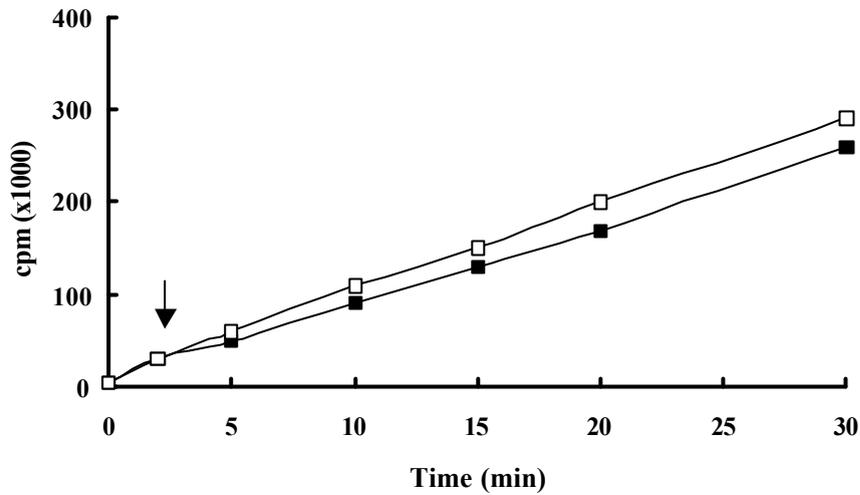


圖五 Acetic anhydride 對 SHV-1 DBP 結合 DNA 能力的影響。將 SHV-1 DBP 與不同莫爾比例的 acetic anhydride 混合後，於 4⁰C 作用 30 分鐘，再以硝基纖維濾紙結合試驗分析。

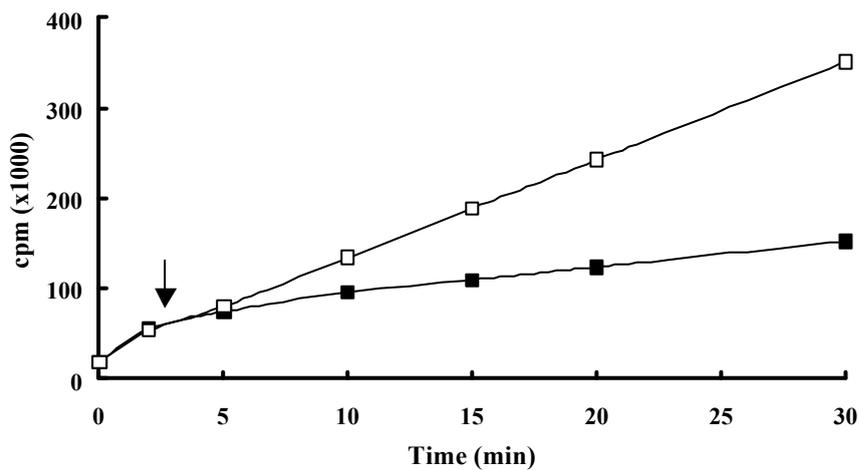


圖六 SHV-1 DBP DNA 結合能力對 DNase 活性的影響。將 DNase (0.5 pmol)與 50 ng ^{35}S -labeled pUC18 dsDNA 及 10 pmol DBP、10 pmol acetic anhydride-modified DBP 或 10 pmol of acetic anhydride-treated *E. coli* SSB 混合後，於 37°C 作用 15 分鐘，未切割的 DNA 以 TCA 沉澱後，再測定放射線強度。

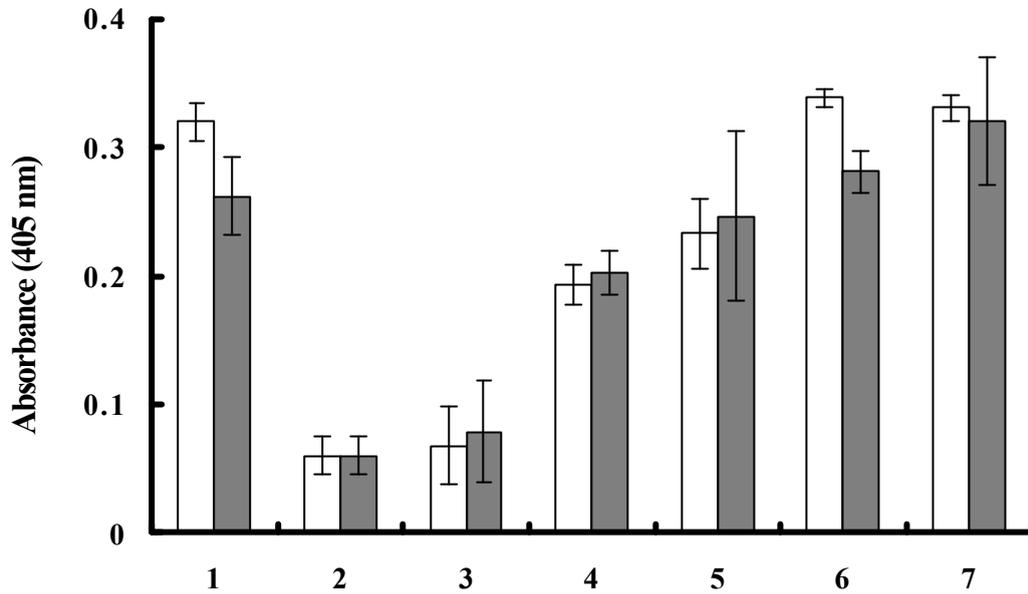
(A)



(B)



圖七 SHV-1 DBP 對 DNase processivity 的影響。將 SHV-1 DNase (0.75 pmol or 0.5 pmol) 與 0.5 μg of ^{35}S -labeled pUC18 dsDNA 在不含(A)或含有(B)10 pmol DBP 的條件下，作用 2 分鐘，再加入過量的 unlabeled pUC18 dsDNA，最後於 37°C 下作用 0、2、10、20、40 或 60 分鐘 (filled squares)。未切割的 DNA 以 TCA 沉澱後，再測定放射線強度。Open squares 為不加入 unlabeled pUC18 dsDNA 的組別。



First layer													
DNase	+		+		+		+		+		+		
DBP		+		+		+		+		+			
Second layer													
DNase (µg)	0	0	0	0	0.1	0	0.5	0	1	0	5	0	10
DBP (µg)	0	0	0	0	0.1	0	0.5	0	1	0	5	0	10
Third layer													
Anti-DNase Ab	+		+		+		+		+		+		+
Anti-DBP Ab		+		+		+		+		+		+	

圖八 利用 ELISA 測定 SHV-1 DBP 與 DNase 之間的交互作用。SHV-1 DNase (open bar)或 DBP (close bar)先吸附於 ELISA 平盤上，再加入不同濃度的 DBP 或 DNase。陽性對照組(column 1)為吸附 DNase 或 DBP 的 well 加入相對應的抗體。陰性對照組為吸附 DNase 或 DBP 的 well 加入對抗 DBP 或 DNase 的抗體。數值為三次實驗的平均。