

摘要

假性狂犬病毒隸屬於阿爾伐泡疹病毒亞科的一員。泡疹病毒 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein; DBP) 除了為病毒複製所必須，也可能參與病毒基因體的重組。為了探討假性狂犬病毒 DBP 的特性，我們進行假性狂犬病毒 DBP 基因的選殖、定序、表現及特性分析。由實驗室之前對於假性狂犬病毒 cDNA 定位的實驗結果顯示 DBP 基因位於病毒基因體 0.17 map unit 的位置；由定序結果推測假性狂犬病毒 DBP 基因轉譯區長 3531 核 酸，可轉譯出 1177 個氨基酸、約 125,000 道爾頓的蛋白質，其氨基酸序列和單純泡疹病毒一型的氨基酸序列具有 58.5% 的相似性。將此段基因的完整轉譯序列架接於表現載體 pET-28c(+), 在大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 細胞中大量表現。在經 refresh 至 OD₆₀₀ 為 0.6、IPTG 濃度為 0.1 mM 的誘導狀態下，可以大量表現出分子量約 125,000 道爾頓的重組 DBP，和預期的重組蛋白質分子量相符。此大量表現的重組蛋白質，在其 N 端帶有來自表現載體的六個 histidine 標記，故可以金屬親合性色層分析法，純化假性狂犬病毒 DBP。進一步以重組假性狂犬病毒 DBP 探討其特性，首先以 DNA 電泳移動分析偵測 DBP-DNA 複合物形成的情形，結果證實 DBP 具有結合 DNA 的能力，不論是單股 DNA 或雙股 DNA 都可當做假性狂犬病毒 DBP 的受質。以競爭性結合分析 DBP 對鹼基的偏好性，發現假性狂犬病毒 DBP 對鹼基偏好性依次為 G、C、T、A。在

本實驗中，也證實了假性狂犬病毒 DBP 具有使互補的單股 DNA 再黏合為雙股 DNA 的功能；而參與重組的蛋白質，例如噬菌體 T4 gp32 蛋白質及噬菌體 的 蛋白質也具有這項功能，因此假性狂犬病毒 DBP 是否參與病毒基因體的重組，仍需進一步探討。

Abstract

Pseudorabies virus (PRV) is a member of *Alphaherpesvirinae*. Herpesvirus DNA-binding protein (DBP) is essential for viral DNA synthesis. Several researches also suggested that DBP might play a role in the process of recombination. To study the biochemical properties of PRV DBP, we cloned and sequenced the PRV DBP gene. PRV DBP gene has an open reading frame of 3531 nucleotides, capable of coding a 1177-amino-acid polypeptide of 125-kDa, and the amino acid sequences share a 58.5% similarity with herpes simplex virus 1. In order to characterize the PRV DBP, this protein was expressed in *Escherichia coli* with the use of a pET expression vector to produce an N-terminal fusion with six histidine residues. The bacteria were induced with 0.1 mM IPTG when the OD₆₀₀ reached to 0.6 and a 125-kDa recombinant protein was observed in SDS-PAGE. The recombinant protein was further purified by nickel-affinity chromatography to homogeneity. The recombinant DBP exhibited a DNA-binding property by electrophoretic mobility shift assay, and it bound to both single-stranded and double-stranded DNA. The base preference of DBP was evaluated by competitive binding assay and showed that the binding preference was listed in the order G, C, T, A. Moreover, PRV DBP could promote the renaturation of complementary single strands of DNA, indicated that PRV DBP possessed a similar function as bacteriophage T4 gp32 protein and phage protein, two proteins involved in DNA recombination. Thus, the PRV DBP involved in viral DNA recombination was suggested in this study and the role of PRV DBP in the process of DNA recombination that occurred during PRV infection will be further elucidated.

第一章 前言

第一節 假性狂犬病毒簡介

假性狂犬病毒之分類及形態

假性狂犬病毒(pseudorabies virus) , 正式學名為豬泡疹病毒一型(suid herpesvirus 1) , 隸屬於泡疹病毒科(*Herpesviridae*)、阿爾伐泡疹病毒亞科(*Alphaherpesvirinae*)、水痘病毒屬(*Varicellavirus*)。與假性狂犬病毒同亞科的病毒 , 包括單純泡疹病毒一型、二型(herpes simplex virus 1、2)、帶狀泡疹病毒(varicella-zoster virus)、馬泡疹病毒一型(equine herpesvirus 1)、牛泡疹病毒一型(bovine herpesvirus 1)等(Roizman, 1996)。

完整的假性狂犬病毒顆粒 , 是由核蛋白衣(nucleocapsid)、tegument 及外層的封套(envelope)所組成 , 封套上帶有糖蛋白突起(spike) , 直徑約 150-186 nm。蛋白衣內含一條長約 140 kbp 的雙股直線形 DNA 基因體 , 其分子量約為 95×10^6 道爾頓(Daltons)(Ben- Porat et al., 1979)。

假性狂犬病毒基因體的結構

假性狂犬病毒基因體是由直線形、大小約 140 kbp 的雙股 DNA 所組成的。基因體是由單短區(unique short region)、單長區(unique long region) 及兩個反轉重覆區(inverted repeat)所構成。單短區被中間反轉重覆區(internal repeat)及末端反轉重覆區(terminal repeat)所包圍。假性狂犬病毒

和單純疱疹病毒一型(herpes simplex virus 1)不論在基因體的大小、結構和排列都非常相似(Ben-Porat et al., 1985)。單純疱疹病毒一型的單長區和單短區都可透過重組而反轉(inversion)，而產生四種異構分子(isomer)。位於反轉重覆區的 *a* 序列，對於單純疱疹病毒一型基因體單長區和單短區的反轉扮演一個重要角色，由缺少中央反轉重覆區 *a* 序列的病毒缺損株中，發現缺少 *a* 序列無法使病毒基因體反轉(Jenkins et al., 1986)。假性狂犬病毒只有單短區可以反轉，而產生兩種具感染力的異構基因體。大部份的反轉發生於假性狂犬病毒基因體的 0.1 至 0.4 map units 處(Davison et al., 1983)。假性狂犬病毒基因體上有兩個複製起始點，兩者分別位於單長區的最左端(Kupersmidt et al., 1991)及中央區域(Wu et al., 1986)。

假性狂犬病毒基因體的分子量約為 95 ± 10^6 道爾頓，含有約 74 莫耳百分比的鳥糞 吟及胞嘧啶(Roizman et al., 1993)。

第二節 假性狂犬病毒的複製週期

在感染細胞後，疱疹病毒基因體的轉錄會以瀑布型(cascade-like fashion)的方式調控進行(Feldman et al., 1979)，由即發性早期基因、早期基因及晚期基因依序表現，由上游調控下游基因的表現。

第一群轉錄的基因為即發性早期基因，這群蛋白質的合成在感染後 2 至 4 小時達到高峰，即發性早期蛋白質會誘導早期基因的表現。早期

基因的轉錄發生在 DNA 被複製之前，在感染後第三小時即可被偵測到，但在感染後 5 至 7 小時達到高峰。早期基因能轉譯成與 DNA 複製及核苷酸代謝有關的蛋白質。最後表現的基因為晚期基因，這群基因大多轉譯出和病毒組裝有關的結構蛋白(Roizman et al., 1996)。

假性狂犬病毒基因體的複製

泡疹病毒感染細胞後，病毒 DNA 會聚集在細胞核，此時直線形的基因體會進行環狀化，以環形化的基因體當作複製的模版，經過複製之後再進入滾環狀(rolling circle)複製，產生頭尾連接的連接體(head-to-tail concatemers) (Roizman et al., 1996)。

假性狂犬病毒基因體的切割及包裝

在病毒基因體複製後，頭尾連接的直線形子代病毒基因體會累積在細胞核中，形成長鏈的結構(Ben-Porat et al., 1981)。這些基因體末端的連結，會形成切割/包裝訊號，而切割成直線單一長度的分子，進而被包裝到新形成的蛋白衣中(Wu et al., 1986)。包含病毒基因體的蛋白衣由細胞核內脫離至細胞質中，在高基氏體獲得雙層膜且含有成熟而經修飾後醣蛋白的封套，最後雙層膜封套的外膜與細胞膜融合，釋放出成熟具感染力的病毒顆粒(Whealy et al., 1991)。

參與泡疹病毒 DNA 複製的蛋白質

目前已知一群單純泡疹病毒一型的蛋白質，參與病毒 DNA 在滾環狀複製過程中領先(leading)股及落後(lagging)股的合成(Skaliter, 1994)。這一群蛋白質是 7 種病毒基因的產物(Boehmer and Lehman, 1997)，分別是：

(1) 起始點結合蛋白質(origin-binding protein)

起始點結合蛋白質是單純泡疹病毒 UL9 基因的產物，分子量為 83×10^3 道爾頓，它會辨識病毒複製的起始點，並與之結合，進而將富含 AT 的序列扭開(Elias et al., 1988)，吸引其他和 DNA 複製有關的蛋白質，啟動 DNA 的複製。

(2) 單股 DNA 結合蛋白質(single-strand DNA-binding protein)

為病毒 UL 29 基因的產物，又稱為 ICP8(Infected Cell Polypeptide 8)，分子量為 128,342 道爾頓。單股 DNA 結合蛋白質是單純泡疹病毒在 DNA 複製時，主要的 DNA 結合蛋白質。

(3) 解螺旋酵素-引子合成酵素複合物(Helicase-primase complex)

為病毒 UL5、UL8 及 UL52 基因的產物，這種蛋白質複合物具有 ssDNA-dependent ATPase、5'-3' DNA helicase 及 DNA primase 等活性(Crute et al., 1991)。

(4) DNA 聚合酵素(DNA polymerase)

為病毒 UL30 基因之產物，分子量約 140,000 道爾頓，除了具有 DNA

polymerase 活性外，還具有 3'-5' 外核酸分解酵素(exonuclease)活性(Crute and Lehman, 1989)。

(5) DNA 聚合酵素輔助蛋白質(DNA polymerase accessory protein) 為病毒 UL42 基因之產物，分子量約 62,000 道爾頓，會與單純泡病毒 DNA 聚合酵素形成異二聚體，而增加 DNA 聚合酵素之活性(Gottlieb et al., 1990)。

第三節 單股 DNA 結合蛋白質的研究

單股 DNA 結合蛋白質被定義為對 DNA 偏好性大於 RNA、對單股 DNA 偏好性大於雙股 DNA 的特性。單股 DNA 結合蛋白質會緊密且協同性的結合到 DNA 上，且不會催化相關的酵素活性(Kornberg and Baker., 1992)。除了單純泡疹病毒外，帶狀泡疹病毒、Epstein-Barr 病毒、人類巨細胞病毒、腺病毒、馬泡疹病毒一型的單股 DNA 結合蛋白質也陸續被証實(Anders et al., 1986 ; Tsurumi et al., 1998 ; Anders et al., 1996 ; Ward et al., 1998 ; Bell et al., 1993)。

單股 DNA 結合蛋白質會協同性的結合到 DNA 上，且沒有特殊的序列特異性 (Chase and Williams., 1986)，不論在原核、真核細胞或病毒，單股 DNA 結合蛋白質對於 DNA 的代謝及複製可能都很重要。

單純泡疹病毒單股 DNA 結合蛋白質又名 infected-cell polypeptide 8

(ICP8), 是主要的 DNA 結合蛋白質, 單純疱疹病毒 ICP8 最早是由被病毒感染的細胞以親合性色層分析分離出來 (Bayliss et al., 1975)。研究 ICP8 基因缺損的突變株發現, ICP8 基因缺損會導致病毒無法複製(Littler et al., 1983), 故證明 ICP8 是病毒複製所必須的。當單純疱疹病毒的 DNA 開始複製前, ICP8 是分佈在前複製區 (prerpliation site), 吸引其他參與 DNA 複製的蛋白質進入到前複製區, 為 DNA 複製做準備 (Bush et al., 1991 ; Knipe, 1989)。ICP8 會吸引 helicase-primase complex、起始點結合蛋白至前複製區, 接著再吸引 DNA 聚合酵素, 形成完整的前複製區結構 (Lauren et al., 1996)。此外, ICP8 可以藉由刺激起始點結合蛋白質 (origin-binding protein) DNA 聚合酵素及 helicase-primase 複合物的活性, 而促進病毒 DNA 的複製。

ICP8 與起始點結合蛋白質之間的作用, 最早是由親合性色層層析得知 (Boehmer et al., 1993), ICP8 可以促進起始點結合蛋白質的 DNA helicase 及 DNA-dependent ATPase 的活性(Lee et al., 1997 ; Boehmer et al., 1998), 以電子顯微鏡觀察 ICP8 與起始點結合蛋白質作用的情形, 發現 ICP8 會附著在被起始點結合蛋白質解旋的 DNA 上(Makhov et al., 1996)

而起始點結合蛋白質 C 端的 10 個氨基酸, 是和 ICP8 作用的重要區域 (Lee et al., 1999), 由這些觀察推測 ICP8 與起始點結合蛋白質的作用對於位於起始點的複製是非常重要的, 當起始點結合蛋白質將 DNA 解旋

時, ICP8 會附著於解開的雙股 DNA 上, 使 DNA 維持單股的構形, 避免打開的雙股 DNA 又自行黏合, ICP8 藉由這種方式而促進起始點結合蛋白質的解旋能力 (Boehmer and Lehman., 1997)。

ICP8 除了可刺激起始點結合蛋白質的活性外, 也具有刺激 helicase-primase 的功能。單純疱疹病毒一型的 helicase-primase 複合物是三種基因的產物 (UL5、UL8、UL52) 所組成的複合物, 其中 UL5 及 UL52 蛋白質分別具有 helicase 及 primase 活性, UL8 蛋白質則具有刺激 UL5 及 UL52 蛋白質活性的功能, 此外, UL5/52 蛋白質需經由 UL8 蛋白質和 ICP8 作用; 在 ICP8 存在的情況下, UL5/52 蛋白質的活性會增加 3 倍 (Gac et al., 1996; Falkenberg et al., 1997)。

此外, ICP8 也會刺激 DNA 聚合酵素的活性, 而促進 DNA 的合成 (Ruychan et al., 1984; O' Donnell et al., 1987)。

單純疱疹病毒 ICP8 是多功能的蛋白質, 除了參與病毒 DNA 的複製外, 可能還與單純疱疹病毒基因體的重組有關。ICP8 可以降低寡核酸的黏合溫度而促進兩個互補的單股 DNA 重新黏合回來 (Dutch and Lenman, 1993), 而 ICP8 也被發現具有對雙股不穩定的功能, 能造成股的置換 (Boehmer and Lehman, 1993)。在生物功能方面, 單純疱疹病毒 ICP8 除了為病毒複製所必須外, 也參與病毒基因表現的調節, 使晚期基因表現量下降 (Chen and Knipe, 1996)。

以 Circular Dichroism 分析單純疱疹病毒 ICP8 的二級結構,發現 ICP8 的氨基酸有 34.5% α -helix、8.6% 非平行的 β -sheet、6.8% 平行的 β -sheet、16.1% 轉角,而有 23.4% 氨基酸是隨機的構形(Spatz et al., 1999)。

單純疱疹病毒 ICP8 已被證實參與病毒 DNA 的複製,也可能參與病毒基因體的重組;基於單純疱疹病毒和假性狂犬病毒的相似性,故我們有興趣想瞭解,假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質是否也具有類似 ICP8 的功能,所以我們進行了假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的選殖、表現及特性分析。

第二章 材料及方法

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因之選殖及載體之構築

在實驗室以往對假性狂犬病毒 cDNA 的研究中,發現假性狂犬病毒

DNA 結合蛋白質基因位於 0.17 map unit 之間，相當於假性狂犬病毒基因體以 *Kpn* I 切割後的第二片段 (Ho et al., 1996)。因此將假性狂犬病毒基因體以 *Kpn* I 切割後，回收一 15 kb 的片段，將之架接於 pUC18 上，架接好的質體再以 *Hinf*I 切割，回收一長度為 3.7 kb 的片段，利用 T4 DNA 聚合酵素補齊(去除 5' overhang)，再將此片段架接到 pBluescript[®] II KS(+) 的 *Sma* I 位置後，製作成質體命名為 pBKS/DBP，這個 3.7 kb 的片段含有完整的 DNA 結合蛋白質基因。進一步將 pBKS/DBP 以 *Bam* HI 及 *Eco* RI 切割，所得的片段再架接到以 *Bam* HI 及 *Eco* RI 切割的表現載體 pET-28c(+) (Novagen)，此表現載體命名為 pET/DBP (圖 1)。pET/DBP 經表現後會形成 N 端融合六個 histidine 的融合蛋白質。

以電穿孔 (electroporation) 轉形(transformation)大腸桿菌

將接合完的質體 DNA，經 phenol 萃取，酒精沈澱後，以去離子水溶解乾燥的 DNA。取其中的 1 μ l 與 40 μ l 的大腸桿菌勝任細胞(competent cell) 混合好，放入電穿孔專用的 cuvette 中，將 cuvette 放在冰上。電穿孔的條件為 25 μ F、電壓 1.25 V、電阻 600 Ω 。電穿孔後，取 1 ml 冰冷的 Luria-Bertani 培養液，與電穿孔後的細胞混合，再將細胞吸出，放入微量離心管中，於 37 $^{\circ}$ C 以 200 rpm 轉速，振盪培養一小時，最後將細菌塗在含 0.2 μ M ampicillin 的 Luria-Bertani 培養基上，在 37 $^{\circ}$ C 培養直到

菌落出現。

質體 DNA 之製備

將含質體 DNA 的大腸桿菌接種於含 0.2 μ M ampicillin 的 40 ml Luria-Bertani 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 以 250 rpm 振盪培養過夜。細菌以 5000 g 離心 5 分鐘收集後，再以 1 ml 的溶液 I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, [pH8.0] 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozyme) 使菌體懸浮。再加入 2 ml 新鮮配置的溶液 II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 在冰上作用 10 分鐘，加入 1.5 ml 的溶液 (3 M potassium acetate [pH5.0]) 在冰上作用 10 分鐘。反應結束後，以 15,000 g 離心 15 分鐘，去除細菌殘渣及染色體，將上清液移至新的離心管，進行 Leader phenol (Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol=25 : 24 : 1) 萃取直到界面澄清後，加入等體積的絕對酒精及 1/10 體積的 3 M sodium acetate (pH5.2)，混合均勻置於-70 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘，以 15,000 g 離心 15 分鐘使 DNA 沈澱，再以 70 % 酒精洗去管壁鹽類，以 15,000 g 離心 5 分鐘，將 DNA 以真空乾燥，利用 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, [pH8.0], 1 mM EDTA) 溶解，存放-20 $^{\circ}$ C 備用。質體 DNA 的吸光值以 DU 640i spectrophotometer (Beckman) 偵測。

DNA 定序 (DNA sequencing)

利用 TaqTrack[®] Sequencing System (Promega) 進行 DNA 的定序。首

先取 8 μg (約 40 pmol) 的質體 DNA,加入 4 μl 含 2 M NaOH 及 2 mM EDTA 的溶液,補去離子水到 40 μl ,於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 5 分鐘,使雙股質體 DNA 變性。作用完成後,立刻放在冰上,同時加入 14 μl 的 3 M sodium acetate (pH 5.2)、14 μl 的去離子水及 150 μl 的絕對酒精,放入-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱至少 15 分鐘,接著進行酒精沈澱並烘乾變性 DNA。將乾燥 DNA 溶解於 13.5 μl 去離子水、2.5 μl 的 formamide、2 μl 1.5 μM 適當引子、5 μl 的 *Taq* DNA 聚合酵素 5 倍緩衝液 (250 mM Tris-HCl [pH 9.0], 50mM MgCl_2) 及 2 μl 的 Extension/Labeling Mix (7.5 μM each of dGTP、dTTP、dCTP),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,進行 30 分鐘引子黏合反應。然後加入 1 μl 的 *Taq* DNA 聚合酵素(5 U)及 1 μl 的 ^{-32}P [dATP] (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 5 分鐘,之後分裝 6 μl 到分別含有 1 μl 的 d/ddATP、d/ddGTP、d/ddCTP 或 d/ddTTP 的微量離心管中,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下,作用 15 分鐘,最後加入 4 μl 的終止容液(100 mM NaOH, 95 % formamide, 0.05 % xylene cyanol),保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 。DNA 定序以 6 % 聚丙烯醯氨含 7 M 尿素的膠體分析。在填裝 DNA 前,DNA 先以 80 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 分鐘,立刻放在冰上,再填裝在膠體的樣品槽中,以 1,900 V 進行電泳分析。電泳完畢後,將膠體移到 3MM 濾紙上,利用膠片乾燥機乾燥膠體,再藉 X 光片曝光,判讀。

重組假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質之表現

(1) 以熱休克 (heat shock) 轉形至大腸桿菌

將構築好的 pET/DBP 表現載體，取 1 μ l 加入 100 μ l 的勝任細胞，此勝任細胞為大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS。將 DNA 與細菌置於冰上 30 分鐘，輕敲微量離心管管壁，增加兩者接觸的機率。將混合好的菌液置於 42 $^{\circ}$ C 水浴，精確的作用 90 秒後，置於冰上二分鐘，再加入 900 μ l 冰的 Luria-Bertani 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 以 200 rpm 振盪培養一小時，最後將菌液塗在含有 0.03 μ M kanamycin 的培養基中，於 37 $^{\circ}$ C 培養到菌落出現。

BL21(DE3)pLysS 這一株大腸桿菌內帶有一個嵌在染色體上的 T7 RNA 聚合酵素基因，其表現受到 *lac operator* 控制，因此可用 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 誘導 T7 RNA 聚合酵素表現，進而轉錄 pET 質體上所帶的基因，產生異源蛋白質。

(2) 表現 DNA 結合蛋白質的最佳 OD 值

將帶有 pET/DBP 表現載體的大腸桿菌接種至 1 ml 含 0.03 μ M kanamycin 的 Luria-Bertani 培養液中，經 37 $^{\circ}$ C，250 rpm 振盪培養隔夜後，以 1 : 50 的比例接種到 5 ml 含 kanamycin 的 Luria-Bertani 培養液中，置於 37 $^{\circ}$ C 振盪培養，在培養後 40-160 分鐘，每隔 20 分鐘在可見光波長 600 nm 測其 OD，並在同時間加入 IPTG 至終濃

度為 0.5 mM，再振盪培養二小時。將細菌離心收集下來，以 10% SDS-聚丙烯醯氨膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分析。

(3) 表現 DNA 結合蛋白質的最佳 IPTG 濃度

在上述相同條件下，當細菌生長到表現外源蛋白的最佳 OD 值時，加入 IPTG 至終濃度分別為 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM。蛋白質以 10 % SDS-聚丙烯醯氨膠體電泳分析。

大腸桿菌細胞萃取液之製備

(1) 不可溶性蛋白質之萃取

將經過 IPTG 誘導的細菌以 5000 g 離心 5 分鐘收集，再把細菌懸浮於 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA 中，加入 lysozyme 至終濃度為 100 μ g/ml, 再加入 1/10 體積的 1 % Triton X-100, 混合均勻後，置於 30 °C 水浴作用 10 分鐘。作用完後將微量離心管置於冰上，以針頭抽吸的方式利用機械性破壞細菌染色體，直到溶液不再黏稠。在 4 °C 離心 12,000 g, 15 分鐘，收集沈澱的部分即為不可溶之蛋白質，結果以 10 % SDS-PAGE 分析。

(參照 Novagen pET 系統操作手冊)

(2) 可溶性蛋白質之萃取

在上述相同條件下，最後一次離心時，收集上清液的部分，即為可溶性之蛋白質，結果以 10 % SDS-PAGE 分析。

SDS-聚丙稀醯氨膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)

蛋白質以 SDS-PAGE 進行分析，首先將 10 % 分離膠 (separating gel, 375 mM Tris-HCl, [pH 8.8], 10 % acrylamide/ bis [29:1], 0.1 % SDS, 0.05 % ammonia persulfate, 0.05 % TEMED) 灌注於組裝好的兩片玻璃之間，再加入去離子水壓平膠面，待膠面凝固後吸除去離子水，再將配製好 5 % 堆積膠 (stracking gel, 125 mM Tris-HCl, [pH 6.8] 5 % acrylamide/ bis [29:1], 0.1 % SDS, 0.05 % ammonia persulfate, 0.1 % TEMED) 灌注於玻璃間，並插上 comb，待堆積膠凝固後，將 comb 拔起，用水將氣泡移除，再將樣本注入 well 中以進行電泳。電泳時的緩衝液為 1X SDS-PAGE running buffer (25 mM Tris base, 0.1 % SDS, 205 mM glycine)。當電泳結束將膠片以 wash solution (45 % methanol, 10 % acetic acid) 搖動洗 10 分鐘，再以 BLUPRINT™ Fast-PAGE Stain Solution (BRL) 染色 20 分鐘，再以脫色液 (10 % acetic acid) 脫色，最後用收縮液 (60 % methanol, 1 % glycerol) 收縮膠片，再用玻璃紙封住膠片，並將膠片風乾。

重組假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質之純化

(1) 細胞萃取液的製備

將帶有 pET/DBP 表現載體的大腸桿菌菌液經隔夜培養後，以 1 : 50 的比例接種到 100 ml 的 Luria-Bertani 培養液中，在 37 °C，250 rpm 搖晃培養，直到細菌生長至表現外源蛋白的最佳 OD 值，此時加入 IPTG 至終濃度為 0.1 mM，再持續搖晃培養二小時。以下步驟皆在 4 °C 進行。細菌以 5,000 g 離心 5 分鐘收集，再以 1X phosphate buffered saline (pH 7.2), (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄)清洗一次後，保存在-70 °C。當細菌解凍後，將菌體懸浮在 10 ml 含 20% (w/v)蔗糖及 1 mg/ml 溶解酵素的 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, [pH 8.0], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))中，在冰上作用 20 分鐘後，進行一次冷凍-解凍(-70 °C ~37 °C)，再利用超音波處理，每振盪 20 秒停 10 秒，共重複 3 次，接著以 20,000 g 離心 10 分鐘。將沈澱物懸浮於含 1 % (v/v) Triton X-100 的 lysis buffer 中，置於冰上 15 分鐘，再以 20,000 g 離心 10 分鐘，把沈澱物懸浮於含 8M 尿素的 binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9])中，於室溫下緩慢混合二小時。最後以 20,000 g 離心 10 分鐘後，收集上清液並存放於-70 °C。

(2) 親合性色層分析

利用鎳-親合性色層分析 (nickel-affinity chromatography) 純化蛋白

質，所有的純化步驟均在 4 進行。首先進行 His Bind resin (Novagen)的前處理，將 2.5 ml 的 resin 置於 JA-20 離心管，於 1,000 g 離心 3 分鐘去除上清液，接著分別加入 3 倍體積的去離子水、5 倍體積的 charge buffer (50 mM NiSO₄) 及 3 倍體積的 binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 8 M urea, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9])處理 resin。加入處理好的大腸桿菌細胞萃取液，在 4 和 His Bind resin 緩慢混合，使帶有 6 個 His-tag 的重組蛋白質可和 resin 結合，接著以 10 倍體積含有 8 M 尿素的 binding buffer 清洗 resin，再以 6 倍體積的含 8 M 尿素的 wash buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9])清洗，最後以含 8 M 尿素的 elution buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9])沖洗出重組蛋白。

(3) 透析

純化完的蛋白質是變性的，因此必須以漸層式透析的方法，使變性的蛋白質復原。純化的 DBP 必須先用 renaturing buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA, 10 μM ZnCl₂, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 0.5 M NaCl, 6 M urea)稀釋成 100 μg/ml，稀釋後的 DNA 結合蛋白質以 renaturing buffer A 透析過後，再依序更換透析液，分別是 renaturing buffer B (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA,

10 μ M ZnCl₂, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 0.5 M NaCl, 4 M urea)、renaturing buffer C (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 μ M ZnCl₂, 0.1 mM PMSF, 0.5 M NaCl)、renaturing buffer D (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 μ M ZnCl₂, 0.1 mM PMSF, 15 % (v/v) glycerol)、renaturing buffer E (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 μ M ZnCl₂, 0.1 mM PMSF, 25 % (v/v) glycerol) , 最後 DNA 結合蛋白質再透析於 storage buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 μ M ZnCl₂, 0.5 mM DTT, 20 % (v/v) glycerol, 0.1 mM PMSF, 0.2 % (v/v) NP-40)。經過兩次 storage buffer 透析後 , 將 DNA 結合蛋白質分裝保存於-70 中。蛋白質利用 SDS-聚丙烯醯氨膠體電泳分析 , 以 Bio-Rad protein assay reagent 定量。

重組假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質特性分析

1. DNA- DNA 結合蛋白質複合物之偵測

(1) DNA 受質製備

將 20 pmol 合成的寡核 酸、10U 的 T4 polynucleotide kinase、5X T4 polynucleotide kinase buffer 及 50 μ Ci 的[-³²P]ATP 置於 37 、 1 小時 , 使寡核 酸的 5' 端可黏上[-³²P]ATP , 再置於 68 、 10 分鐘使反應終止。將黏合完的產物通過 Chroma Spin-10 Column (Clontech) , 以除去沒有黏上 DNA 的放射線同位素。本實驗所使用的 DNA 受質之序列及長度如下 :

ORF5M2 (27-mer): 5' -CCTTCTCGACCGTGCTGTCATGAC-3'

TATAInrP(53-mer):5' -GATGATCCGCTATAAAAGCGATGAATTCGA
GCTCGGCCCTCATTCTGGAGACGGAC-3'

TATAInrP-TATAInrM(53-mer): 和 TATAInrP 互補的雙股。

Homooligomer: poly d(A)₂₀、 poly d(T)₂₀、 poly d(C)₂₀、 poly d(G)₂₀

(2) 電泳移動分析 (electrophoretic mobility shift assay)

將配製好的 6 % 聚丙烯醯氨膠(6 % acrylamide/ bis [19:1], 0.25 X TBE, 0.05 % ammonia persulfate, 0.05 % TEMED) 灌注於已組裝好之電泳槽 (EC175, E-C Apparatus), 再插上 comb , 待膠乾後 , 以 200 V 預跑 20 分鐘。為了要偵測 DNA 結合蛋白質和 DNA 形成複合物的情況 , 10 μ l 的反應液中含有 0.5 pmol ³²P 標示的 DNA、不同量的 DNA 結合蛋白質及 DNA-binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 mM EDTA, 125 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 % glycerol) , 於 25 反應 20 分鐘。把反應完成的產物注入 well 中 , 以 200 V 電泳 1.5 小時 , 電泳完後把膠片置於 3MM 濾紙 , 以膠片乾燥機烘乾膠片 , 最後將膠片置於壓片匣 , 以 X 光片曝光顯影。

2. 競爭性結合分析 (competitive binding assay)

為了要瞭解 DNA 結合蛋白質對四種鹽基的偏好性 , 將人工合成的 20 個鹽基的寡核 酸 , 以 T4 polynucleotide kinase 及[-³²P]ATP 標示其

5' 端。首先將未標示放射線同位素含有 20 個鹽基的競爭者 DNA，以高於 DNA 受質 100 倍濃度的量加入反應中，再加入 1 μg 純化 DNA 結合蛋白質和 DNA-binding buffer，整個反應體積為 10 μl ，混合均勻後先置於 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘，再加入放射線同位素標示的 DNA 受質 0.5 pmol，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 20 分鐘。結果以 6 % 聚丙烯醯氨膠體電泳分析(測定的方法如前所述)。

3. DNA 再黏合分析 (DNA renaturation assay)

(1) DNA 受質的製備

以 Qiagen midi plasmid purification kit 純化 pUC19 質體 DNA，先將 pUC19 DNA 以 *Eco* RI 切割成直線形，再以鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 去除 5' 端的磷酸，接著再以 T4 polynucleotide kinase 及 [^{-32}P]ATP 標示其 5' 端 未黏上 DNA 的放射線同位素以 Chrom Spin Column 去除。

(2) Renaturation assay

實驗方法參考自 Dutch 及 Lehman(1993)。pUC19 DNA 在使用前置於 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸騰 5 分鐘，煮完後立刻將 DNA 置於冰上，使其維持單股。DNA 再黏合試驗，總反應體積為 10 μl ，含有單股 DNA 受質 2 nM、不同濃度 DNA 結合蛋白質及 Buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM DTT, 10 % glycerol, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA)，將之置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 分

鐘，反應結束後立刻加入 2.5 μ l 終止反應液 (6 % SDS, 10 % glycerol, 0.25 % bromophenol blue)以終止反應。接著以 1.5 % 1X TAE agarose gel (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA) 進行電泳，電泳結束後將膠片用膠片乾燥機烘乾，以 X 光片曝光顯影。為了瞭解單股 DNA 在反應過程中重新黏合為雙股 DNA 的情況，於反應進行中的第 0, 10, 15, 20, 25, 30 分鐘，分別收集檢體，分析的方法如前所述。

第三章 結果

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因的定序及序列分析

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因的定序片段全長為 3957 個核甘

酸，這個片段的第 354 至 3884 核 酸之間含有完整的 DNA 結合蛋白質基因之開讀架 (open reading frame)。將這段序列以電腦分析，推測有一個 TATA box 位於 DNA 結合蛋白質基因轉譯區上游第 151 個核 酸的位置，一個高度保留性的 polyadenylation signal (AATAAA)位於 DNA 結合蛋白質基因轉譯區下游的第 43 個核 酸的位置。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因全長為 3531 個核 酸，可轉譯出 1177 個氨基酸，約 125,000 道爾頓的蛋白質。DNA 結合蛋白質基因的轉譯起點是位於第 354 個核 酸，轉譯出的氨基酸序列見圖 2。用 GCG 軟體的 PileUp 程式分析，發現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的氨基酸序列和單純疱疹病毒一型 ICP8 具有 58.5%相似性。推測在假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質氨基酸序列的第 496 到 509 個殘基 (residue)，有一個 zinc-finger motif，這在所有阿爾伐疱疹病毒都具有高度保留性。而第 784 到 830 個氨基酸具有 DNA-binding motif，在阿爾伐疱疹病毒的 DNA 結合蛋白質都含有一段具保留性的鹼性及環狀氨基酸，這些區域可能和 DNA 結合蛋白質的功能有關。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的表現

將假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因架接在 pET 表現載體內，送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 表現。經過 IPTG 誘導下，將細菌粗萃取物

用 SDS-PAGE 分析。為了要尋找 DNA 結合蛋白質表現量最大時細菌生長的 OD 值，細菌以 1 : 50 的比例接種，於培養的第 40 至 160 分鐘，每隔 20 分鐘加入 IPTG 誘導蛋白質的表現，發現蛋白質表現量會隨所加入 IPTG 誘導的時間不同而有變化（圖 3）。由結果中得知以 OD₆₀₀ 為 0.6 左右時，加入 IPTG 誘導可得到最高的 DNA 結合蛋白質表現量。為了要瞭解 IPTG 的濃度是否會影響 DNA 結合蛋白質的產量，在細菌生長達到 OD₆₀₀ 為 0.6 時，分別加入不同濃度的 IPTG (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mM) 誘導蛋白質的表現，結果發現 IPTG 濃度對 DNA 結合蛋白質產量沒有顯著影響（圖 4），即使 IPTG 濃度低至 0.1 mM，其蛋白質產量仍和其他不同濃度 IPTG 誘導者相當。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的純化

將架接好的 pET/DBP 送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 表現，經 IPTG 誘導下，可以觀察到在經誘導的萃取物中，和不經誘導的控制組比較，出現一個 125,000 道爾頓的蛋白質產物。而觀察 DNA 結合蛋白質表現的狀態時，發現 DNA 結合蛋白質幾乎都存在於不可溶的部分（圖 5），故必須以變性物質將不可溶的產物溶解，使其變成可溶的狀態。因為重組 DNA 結合蛋白質都帶有六個 histidine 序列，故可將變性的蛋白質以親合性色層分析法加以純化，經過這樣的方式可以得到純化但為變性的蛋白

質。為了要使蛋白質回復活性，利用漸層式透析將變性物質慢慢從 DNA 結合蛋白質溶液中移除，而在除去變性物質的過程中，DNA 結合蛋白質也會慢慢回復其原來的構型。在進行透析前，必須將純化的 DNA 結合蛋白質稀釋成 100 $\mu\text{g/ml}$ ，以免在變性物質去除過程中蛋白質又聚集成不可溶的物質。通常經過這樣的流程，大約可自 100 ml 的培養液中，純化出 500 μg 的假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與 DNA 結合的能力分析

將純化且復性的 DNA 結合蛋白質和 DNA 混合，以 DNA 電泳移動分析的方式偵測 DNA 結合蛋白質-DNA 形成複合物的情形。使用的 DNA 受質均以 ^{32}P 標示，分別為 27-mer 的 ORF5M2、53-mer 的 TATA InrP 及雙股 53-mer 的 TATA-InrP TATA InrM，這幾種受質長度較短，DNA 結合蛋白質較易與之飽和，而且這些受質都是四種鹼基分配較平均的。Poly dI dC 是用於抑制非特異性的結合，因為所使用的 DNA 結合蛋白質是純化過的，故反應中並未加入 Poly dI dC。當反應完成後，以電泳分析蛋白質-DNA 複合物，可以發現當 DBP/ DNA 結合蛋白質比例增加後，DNA 移動會變慢而有 band 出現。假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質可結合到 27-mer 及 53-mer 的單股寡核 酸 (圖 6(A), 6(B))，而且隨著 DNA 結合蛋白質濃度愈高，DNA 移動上去的比例愈高，而剩餘的 DNA 受質則

愈少，故 DNA 與 DNA 結合蛋白質的結合具有劑量依賴性的關係 (dose-dependent manner)。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質除了可結合到單股寡核 酸上，也可結合到 53-mer 雙股寡核 酸 (圖 6(C))，同時具有劑量依賴性的關係。故假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質不論對單股或雙股寡核 酸都具有親合性。為了分析 DNA 結合蛋白質對單股或雙股 DNA 具有較高親合性，比較在相同濃度 DNA 結合蛋白質和 DNA 形成複合物的比例(圖 6(D))，發現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對單股 DNA 親合力大於雙股 DNA。

在偵測 DNA 結合蛋白質-DNA 複合物之形成，發現移動上去的 band 有不同的型態，推測可能是假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質和 DNA 結合時之飽和度不同所致。當單純泡疹病毒 ICP8 與 poly d(T)₅₀ 結合時，會出現兩種不同型態的 band，亦為蛋白質與 DNA 飽和度不同之故 (Spatz et al., 1999)。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對鹽基的偏好性

為了研究假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對四種鹼基的偏好性，以競爭性結合分析。事先將 DNA 結合蛋白質與競爭者 DNA 作用一段時間，再加入 ³²P 標示的 DNA 受質與 DNA 結合蛋白質結合。若 DNA 結合蛋

白質對競爭者 DNA 的親合性大於對 DNA 受質時，則移動上去的 DNA band 愈不明顯（圖 7）。由結果顯示假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對四種鹼基的偏好性依序為： $\text{poly d(G)}_{20} > \text{poly d(C)}_{20} > \text{poly d(T)}_{20} > \text{poly d(A)}_{20}$ 。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對 DNA 再黏合的效應

將假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與單股直線形的 pUC19 質體 DNA 在 37 反應，觀察 DNA 受質由單股再黏合回雙股的情形。

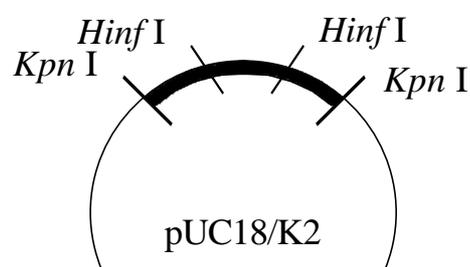
利用 2 nM 標示 ^{32}P 的 DNA 受質與不同量 DNA 結合蛋白質混合，發現未加 DNA 結合蛋白質的 DNA 在作用 30 分鐘內幾乎沒有再黏合的情形，而加入 DNA 結合蛋白質的組別，則隨蛋白質濃度提高，單股 DNA 再黏合為雙股 DNA 之比例也會增加（圖 8）。

為了瞭解在 DNA 結合蛋白質存在下，單股 DNA 再黏合為雙股 DNA 的情況，於反應第 0, 10, 15, 20, 25, 30 分鐘收集檢體，以電泳分析結果，顯示於反應開始第 20 分鐘，大部分的單股 DNA 都已回復為雙股 DNA（圖 9）。

故假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質具有使 DNA 再黏合的功能，當 DNA 結合蛋白質濃度提高，單股 DNA 回復為雙股 DNA 比例也會提高，且在反應第 20 分鐘時，大部分單股 DNA 都會回復為雙股 DNA。

此外於本實驗結果觀察到，DNA 結合蛋白質存在的組別中有一些 DNA 殘存在 well 內及電泳的軌跡上，推測可能是 DNA 結合蛋白質在促使 DNA 黏合時形成很大的網狀結構，而使得 DNA 無法完全跑下來。

Saccharomyces cerevisiae 的 strand-exchange 蛋白質也具有使 DNA 再黏合的功能，於 DNA 再黏合的反應中，同樣也會產生大量的 protein-DNA 凝集物而卡在 well 內，這些再黏合反應的產物經由電子顯微鏡觀察，發現大部分都是雙股 DNA (Heyer et al., 1988)。



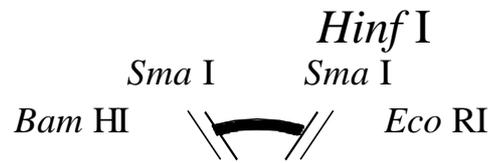


圖 1 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因之載體構築。

圖 2 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因的核 酸及氨基酸序列。

DNA 結合蛋白質的轉譯區自第 358 至 3884 核 酸之間，預測的

TATA box 及 polyadenylation signal 以粗體字表示，zinc-finger motif

以底線表示。

圖 3 SDS-PAGE 分析大腸桿菌表現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質之最佳時間。蛋白質 marker (lane M) 的分子量標示在左邊。

Lane 1: 未經 IPTG 誘導的控制組。 Lane 2: refresh 40 min, OD_{600} :0.15 。 Lane 3: refresh 60 min, OD_{600} :0.18 Lane 4: refresh 80 min, OD_{600} :0.28。 Lane 5: refresh 100 min, OD_{600} :0.4。 Lane 6: refresh 120 min, OD_{600} :0.6。 Lane 7: refresh 140 min, OD_{600} : 0.84。 Lane 8: refresh 160 min, OD_{600} : 1.1。

箭頭指示為 IPTG 誘導所產生之蛋白質。

圖 4 SDS-PAGE 分析大腸桿菌表現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質之最佳 IPTG 濃度。蛋白質 marker (lane M) 的分子量標示在左邊。

Lane 1: 未經 IPTG 誘導的控制組。 Lane 2: IPTG 終濃度 0.1 mM。

Lane 3: IPTG 終濃度 0.25 mM, Lane 4: IPTG 終濃度 0.5 mM, Lane 5: IPTG 終濃度 0.75 mM。 Lane 6: IPTG 終濃度 1 mM。箭頭指示為 IPTG 誘導所產生之蛋白質。

圖 5 SDS-PAGE 分析大腸桿菌表現的假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質。

蛋白質 marker (lane M) 的分子量標示在左邊。 Lane 1: 未經 IPTG 誘導的控制組。 Lane 2: 經 IPTG 誘導的粗萃取液。 Lane 3: 可溶部分的蛋白質。 Lane 4: 不可溶部分的蛋白質。 Lane 5: 純化的蛋白質。箭頭指示為 125 kDa 的表現蛋白質。

(A)

(B)

圖 6 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與 DNA 結合功能分析。

(A) 以聚丙烯醯氨膠電泳分析 DNA 結合蛋白質-DNA 複合物之形成。0.5 pmol 合成的單股寡核 酸 ORF5M2 (27-mer) 與 0 μ M (lane 1) λ 0.2 μ M (lane 2) λ 0.4 μ M (lane 3) λ 0.8 μ M (lane 4) λ 1 μ M (lane 5) 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。

(B) 0.5 pmol 合成的單股寡核 酸 TATAInrP (53-mer) 與 0 μ M (lane 1) λ 0.2 μ M (lane 2) λ 0.4 μ M (lane 3) λ 0.8 μ M (lane 4) λ 1 μ M (lane 5) 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。

(C)

(D)

續圖 6 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與 DNA 結合功能分析。

(C) 0.5 pmol 合成的雙股寡核 酸 TATAInrP-TATAInrM (53-mer)與 0 μ M (lane 1) 0.2 μ M (lane 2) 0.4 μ M (lane 3) 0.8 μ M (lane 4) 1 μ M (lane 5) 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。

(D) 0.5 pmol 合成的單股寡核 酸 TATAInrP (lane 1, 2) 及雙股寡核 酸 TATAInrP-TATAInrM (53 bp) (lane3, 4)與 0 μ M (lane 1, 3) 及 1 μ M (lane 2, 4) 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。

(A)

(B)

(C)

(D)

圖 7 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對四種鹼基的偏好性。

0.5 pmol 5' 端標示的 DNA 受質、50 pmol 未標示的競爭者 DNA 與 1 μ g 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。Lane -: 無競爭者 DNA , Lane A: 競爭者 DNA 為 poly d(A)₂₀ , Lane T: 競爭者 DNA

為 poly d(T)₂₀ , Lane C: 競爭者 DNA 為 poly d(C)₂₀ , Lane G: 競爭者 DNA 為 poly d(G)₂₀。 (A) DNA 受質為 5' 端標示的 poly d(A)₂₀ 。 (B) DNA 受質為 5' 端標示的 poly d(T)₂₀ 。 (C) DNA 受質為 5' 端標示的 poly d(C)₂₀ 。 (D) DNA 受質為 5' 端標示的 poly d(G)₂₀ 。

圖 8 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的 DNA 再黏合作用。

2 nM 5' 端標示的單股直線形 pUC19 DNA 分別與 0 μ M (lane 3)、
0.2 μ M (lane 4)、0.4 μ M (lane 5)、0.8 μ M (lane 6)、1
 μ M (lane 7) 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應。Lane 1 為
雙股 pUC19 之控制組，Lane 2 為單股 pUC19 之控制組。

圖 9 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的 DNA 再黏合作用。

2 nM 5' 端標示的單股直線形 pUC19 DNA 與 1 μ M 假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質混合反應，分別作用 10 分鐘(lane 4)、15 分鐘(lane 5)、20 分鐘(lane 6)、25 分鐘(lane 7)、30 分鐘(lane 8)。Lane 1 為雙股 pUC19 之控制組，Lane 2 為單股 pUC19 之控制組，Lane 3 為不加 DNA 結合蛋白質之控制組。

第四章 討論

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因位於假性狂犬病毒基因體的 0.17 map unit 位置，DNA 結合蛋白質基因轉譯區長 3531 核 酸，可轉譯出 1177 個氨基酸，約 125,000 道爾頓的蛋白質。假性狂犬病毒 DNA

結合蛋白質和其他阿爾伐泡疹病毒 DNA 結合蛋白質具有高度相似性。在假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質第 496 到 509 個氨基酸，預期有一個 zinc-finger motif，這在所有的阿爾伐泡疹病毒都是具有高度保留性的序列 (CXLCX₄RX₂CXH)。假性狂犬病毒和單純泡疹病毒一型 ICP8 之間的 lysine 及 tyrosine 殘基具有高度保留性，而鹼性及環狀氨基酸可能參與 DNA 結合蛋白質和單股 DNA 之間的作用，例如噬菌體 T4 及大腸桿菌的 tyrosine 及 tryptophan 腺病毒的 phenylalanine 及 lysine 均為參與 DNA 結合的關鍵氨基酸。(Doan et al., 1984 ; Khamis et al., 1987 ; Neale and Kitchingman.,1990)

利用基因工程技術，使微生物能大量表現異源蛋白質，必須有適當的宿主-載體系統才得以進行。目前所使用的表現系統大致可分為原核、酵母菌、昆蟲及哺乳類動物細胞之表現系統。以原核表現系統表現異源蛋白質，優點為產量高，但常常形成包涵體，重組蛋白此時是不可溶的，其生物活性也跟著消失，因此蛋白質需 refolding，才能恢復活性，此外，原核表現系統缺乏 posttranslational modification，因此無法表現此類蛋白質。真核表現系統可用來表達需要經過 posttranslational modification 的蛋白質，包括糖基化作用、磷酸化作用等，而糖基化在真核表現系統之間又有所不同，酵母菌會進行 N-糖化作用常會加上許多 mannose 在蛋白質上，昆蟲及哺乳類細胞表現系統也具有 N-糖化及 O-糖化作用。真核表現

系統不會形成包涵體，但產量少成本高。(Cleland and Craik, 1996)

為了要瞭解假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的特性,以大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量表現。本實驗選用 pET 表現系統，將假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質基因架接在 T7 啟動子下游，進行重組蛋白質的表現。以 IPTG 誘發下，可以看見大量蛋白質產物的出現，分子量符合預期的 125,000 道爾頓。在細菌生長的不同時期，加入 IPTG 誘導，發現細菌在生長至 OD₆₀₀ 為 0.6 左右時,以 IPTG 誘導可以得到最大量的蛋白質，而不同濃度的 IPTG (0.1 mM~1 mM) 對蛋白質產量無明顯影響。以大腸桿菌表現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質，雖然可誘導大量蛋白質表現，但表現出的蛋白質幾乎都形成不可溶的包涵體 (inclusion body), 為了解決這個問題，以變性物質溶解包涵體，再以親合性色層層析純化蛋白質。因為重組 DNA 結合蛋白質的 N 端帶有 6 個 His tag，故可以和親合性樹脂之二價陽離子結合，而達到快速純化的目的。在蛋白質的複性過程中，主要是利用透析將變性物質自溶液中去除，使蛋白質慢慢回復原來的構形。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與 DNA 結合的能力可用 DNA 電泳移動的方式分析。由此實驗證明 DNA 和 DNA 結合蛋白質會形成複合物，即假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質具有結合到 DNA 的能力；亦即 DNA 結合蛋白質經變性、純化、透析、再復性的步驟，可以回復結合

DNA 的能力。

不論是單股或雙股 DNA 都可為假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質的受質，但 DNA 結合蛋白質對單股 DNA 的親合力大於對雙股 DNA 的親合力，而 DNA 結合蛋白質同時也會結合 27-mer 及 53-mer 的單股 DNA。因此推測，當病毒 DNA 複製時，假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質可能會結合到被解旋成單股 DNA 的複製起始點上。

以競爭性結合測試假性狂犬病毒對四種鹽基偏好性，發現假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對四種鹽基的偏好性依序為 poly d(G)₂₀ > poly d(C)₂₀ > poly d(T)₂₀ > poly d(A)₂₀。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質對 GC 有較高的偏好性，可能是假性狂犬病毒基因體 GC 的含量高達 74 莫耳百分比。但實驗結果發現以 poly d(G)₂₀ 及 poly d(C)₂₀ 當作受質時，會有大量的 DNA 殘留在 well 內，可能是 G、C 較易形成二級結構，當 DBP 與之結合時會形成巨大結構，無法隨電流泳動下來。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質具有使互補的單股 DNA 再黏合的功能，在本實驗中得到證明。其他物種的 DNA 結合蛋白質，例如單純疱疹病毒 ICP8、大腸桿菌 SSB 及噬菌體的 gp32 蛋白質也具有促進再黏合的作用(Dutch and Lehman, 1993; Christiansen and Baldwin., 1977; Alberts and Frey., 1970)，這些物種 DNA 結合蛋白質在促進再黏合反應時不需要

ATP，但極需要鎂離子。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質執行再黏合的功能時，並不需要鎂離子的幫助，以電泳分析終產物時，發現會有 DNA 殘留在 well 內及泳動的軌跡上。而單純疱疹病毒 ICP8 進行 DNA 再黏合的產物，則並沒有觀察到殘留在 well 上。事實上，幾乎所有的可促進 DNA 再黏合的蛋白質，其產物幾乎都會形成大量的蛋白質-DNA 凝集物。*Saccharomyces cerevisiae* 的 strand-exchange 蛋白質，具有促進 DNA 再黏合之功能 (Heyer et al., 1988)，同樣也有大量蛋白質-DNA 凝集物產生，將這些產物從 well 中回收，以電子顯微鏡分析，發現大部分均為雙股 DNA。雖然假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質與單純疱疹病毒 ICP8 具有 58.5% 的相似性，但假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質執行再黏合的過程中，鎂離子需求及電泳結果和單純疱疹病毒 ICP8 並不完全相同，推測可能是這兩種蛋白質執行再黏合的機制不同之故。

假性狂犬病毒 DNase 具有內核酸分解酵素(endonuclease)、5' 外核酸分解酵素(5' -exonuclease)及 3' 外核酸分解酵素(3' -exonuclease)的活性，將假性狂犬病毒 DNase 與其他已知多功能核酸分解酵素的切割模式比較，發現 DNase 的切割模式與大腸桿菌 RecBCD 相似 (Hsiang et al., 1998)，而 RecBCD 已被證實與重組有關。大腸桿菌 RecBCD 在接近 chi site 時會切割雙股 DNA 的其中一股而產生單股 DNA，之後 RecA 會與這個單股

DNA 的尾端結合，而進行同源性 DNA 交換作用。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質具有使兩個互補的單股 DNA 再重新黏合回雙股 DNA 的功能，比較假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質和其他已知功能的單股 DNA 結合蛋白（表 1），已知與重組有關的蛋白質如噬菌體 T4 gp32 及噬菌體 的蛋白質，也具有單股 DNA 的再黏合作用。此外，單純疱疹病毒 ICP8 也具有同源 DNA 的配對及兩股的交換功能（Bortner et al., 1993），而 ICP8 可以與單純疱疹病毒 DNase 結合（Thomas et al., 1992），因此推測 ICP8 可能參與單純疱疹病毒基因體之重組。疱疹病毒基因體重組，是否以類似大腸桿菌 RecBCD 重組機制（Hsiang et al., 1998），其中 DNase 類似 RecBCD，而 ICP8 類似於 RecA 的角色，值得進一步探討。至於假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質是否參與病毒基因體重組過程，可以參考試管內重組模式進一步探討，在適當的緩衝液中，加入可能與重組有關的蛋白質，觀察重組反應的發生。

單純疱疹病毒 DNA 結合蛋白質參與病毒基因表現的調節，而使晚期基因表現量下降（Chen and Knipe, 1996），利用 DNA 結合蛋白質這種特性，進行單純疱疹病毒缺損株的構築，同時將複製缺損株應用到疫苗的使用上，發現這種缺損株無法進行病毒 DNA 的合成，所以送到宿主體內後也無法產生子代病毒，進一步經由動物實驗，也證明 DNA 結合蛋白質缺損株可以保護小白鼠免於受到單純疱疹病毒的攻擊（Costa et al.,

1997)。故可能可以進一步構築假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白缺損病毒株，將此複製缺損株應用到疫苗的使用上。

Loregian 等 (1999) 利用大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位，攜帶一段單純疱疹病毒 DNA polymerase 的 peptide，而降低 DNA polymerase 的活性。大腸桿菌的忌熱性腸毒素有 5 個 B 次單位及 1 個 A 次單位，B 次單位可結合到細胞表面的 glycosphingolipid，故 B 次單位可當作攜帶者而進入細胞。單純疱疹病毒的 DNA polymerase 必須和 DNA polymerase 輔助蛋白質作用，而促進病毒 DNA 合成，利用蛋白質-蛋白質之間作用的特性，選擇 DNA polymerase C 端 27 個氨基酸，和大腸桿菌忌熱性腸毒素架接成為融合蛋白，這 27 個氨基酸為 DNA polymerase 和 DNA polymerase 輔助蛋白的作用區域，且含有 nuclear localization signal，故可進到細胞核。經過這種方式架接的融合蛋白，可藉由破壞 DNA polymerase 及 DNA polymerase 輔助蛋白之間的作用，而達到抑制 DNA polymerase 活性的效果。

假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質亦為病毒複製所必須，故可找尋 DNA 結合蛋白質和其他蛋白質的作用關鍵區域，並將之與大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位成為融合蛋白，可能可以提供一抗病毒的點。

由本實驗結果證明了假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質可以結合到單股及雙股 DNA 上，而且對單股 DNA 的親合性大於對雙股 DNA。假性

狂犬病毒 DNA 結合蛋白質分別可以結合至 53-mer 及 27-mer 的單股 DNA 上。假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質在鹽基的偏好性上則是 poly d(G)₂₀ > poly d(C)₂₀ > poly d(T)₂₀ > poly d(A)₂₀。此外，假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質也具有使互補的單股 DNA 再黏合為雙股 DNA 的功能，其他參與重組的蛋白質，例如 bacteriophage T4 gp32 蛋白質也具有同樣的功能，因此假性狂犬病毒 DNA 結合蛋白質是否參與病毒基因體的重組仍需進一步探討。

表 1 假性狂犬病毒 DBP 及其他已知功能的 DNA 結合蛋白質的比較

	<u>Binding</u> dsDNA ssDNA		<u>Binding</u> ssDNA > dsDNA	Base preference	Renaturation	Helix-destabili zing
PRV DBP	+	+	+	G>C>T>A	+	?
HSV-1 ICP8	+	+	+	?	+	+

E-B virus DBP	+	+	+	?	?	+
Adenovirus DBP	+	+	+	?	?	+
T4 gp32	+	+	+	T>G>C>A	+	+
phage protein	-	+	+	?	+	+
<i>E. coli</i> SSB	+	+	+	?	+	+

“+” 表示蛋白質具有此項特性或功能

“-” 表示蛋白質不具有此項特性或功能

“?” 表示尚未發現蛋白質具有此項特性或功能

參考文獻：

Albert, B. M., and Frey, L. 1970. T4 bacteriophage gene32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. *Nature*. 227: 1313-1318.

Anders, D. G., and McCue, L. A. 1996. The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology*. 39: 378-388.

Anders, D.G. ,Irmiere, A., and Gibson, W. 1986. Identification and characterization of a major early cytomegalovirus DNA-binding protein .

J. Virol. 58: 251-262.

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.

Bayliss, G. J., Marsden, H. S., and Powell, K. L. 1983. Herpes simplex virus non-structural proteins. . Function of the major DNA-binding protein. *J. Virol.* 64: 983-995.

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., and Kaplan, A. S. 1981. Organization and replication of pseudorabies virus DNA. In Y, Becker(ed.), *Herpesvirus DNA*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London.

Ben-Porat, T., and Kaplan, A. S. 1985. Molecular biology of pseudorabies virus, p.105-173. In Roizman, B. *The herpesviruses*, vol. . Plenum Press, New York.

Ben-Porat, T., Rixon, F. J., and Blankenship, M. L. 1979. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. *Virology* 95:285-294.

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. Bio. Chem.* 273:2676-2683.

Boehmer, P. E., and Lehman, I. R. 1993. Herpes simplex virus 1 ICP8 : helix-destabilizing properties. *J. Virol.* 67: 711-715.

Boehmer, P. E., and Lehman, I. R. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 347-384.

Bortner, C., Hernandez, T. R., Lehman, I. R., and Griffith, J. 1993. Herpes simplex virus 1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) will promote homologous pairing and strand transfer . *J. Mol. Biol.* 231: 241-250.

Bryant, F. R., and Lehman, I. R. 1985. On the mechanism of renaturation of complementary DNA strands by the recA protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 82: 297-301.

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-strand DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu. 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.

Christiansen, C., and Baldwin, R. L. 1977. Catalysis of DNA reassociation by the *Escherichia coli* DNA binding protein: a polyamine-dependent reaction. *J. Mol. Biol.* 115: 441-454.

Cleland, J. L., and Craik, C. S. 1996. Protein engineering principles and practice. A John Wiley and sons, Inc., publication. New York. P. 101-218.

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.

Crute, J. J., and Lehman, I. R. 1989. Herpes simplex-1 DNA polymerase . Identification of an intrinsic 5' to 3' exonuclease with ribonuclease H activity. *J. Bio. Chem.* 264: 19266-19270.

Crute, J. J., and Lehman, I. R. 1991. Herpes simplex virus-1 helicase-primase physical and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 226; 4484-4488.

Davison, A. J., and Wilkie N.M. 1983. Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 64:1927-1942.

Doan, L. T., Toulme, J. J., 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.

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.

Elias, P., and Lehman, I. R. 1988. Interaction of origin binding protein with an origin of replication of herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2959-2963.

Falkenberg, M., Bushnell, D. A., Elias, P., and Lehman, I. R. 1997. The UL8 subunit of the heterotrimeric herpes simplex virus type 1 helicase-primase is required for the unwinding of single strand DNA-binding protein (ICP8) –coated DNA substrates. *J. Bio.Chem.* 272: 22766-22770.

Feldman, L., Rixon, F. J., Hojean. J., and Ben-Porat, T. 1979. Transcription of the genome of pseudorabies virus is strictly controlled. *Virology.* 97: 316-327.

Gac, N. T. L., Villani, G., Hoffmann, J. s., and Boehmer, P. E. 1996. The UL8 subunit of the herpes simplex virus type-1 DNA helicase-primase optimizes utilization of DNA templates covered by the homologous single –strand DNA-binding protein ICP8. *J. Bio. Chem.* 271:21645-21651.

Gottlieb, J., Marcy, A. I., Coen, D. M., and Challberg, M. D. 1990. The herpes simplex virus type 1 UL42 gene product : a subunit of DNA polymerase that function to increase processivity. *J. Virol.* 64: 5976-5987.

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.

Heyer, W. D., Evans, D. H., and Kolodner, R. D. 1988. Renaturation of DNA by a *Saccharomyces cerevisiae* protein that catalyzes homologous pairing and strand exchange. *J. Bio. Chem.* 263: 15189-15195.

Ho, T. Y., Hsiang, C. Y., and Chang, T. J., 1996. Analysis of pseudorabies virus gene by cDNA sequencing. *Gene.* 175: 247-251.

Jenkis, F. J., and Roizman, B. 1986. Herpes simplex virus type 1 Recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J. Virol.* 59: 494-499.

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.

Knipe, D. M. 1989. The role of viral and cellular nuclear proteins in herpes simplex virus replication. *Adv. Virus. Res.* 37: 85-123.

Kornberg, A., and Baker, T.A. 1992. DNA replication. W. H. Freeman and company, New York. p 323-353.

Lee, S. S. K., and Lehman, I. R. 1997. Unwind of the box I element of a herpes simplex virus type 1 origin by a complex of the viral origin binding protein, single-strand DNA binding protein, and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2838-2842.

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. Bio. Chem.* 274: 18613-18617.

Lehman, I. R., and Boehmer, P. E. 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J. Bio. Chem.* 274: 28059-28062.

Liptak, L. M., Uprichard, S. L., and Knipe, D. M. 1996. Functional order of assembly of herpes simplex virus DNA replication proteins into prereplicative site structures. *J. Virol.* 70: 1759-1767.

Littler, E., Purifoy, D., Minson, A., and Powell, K. L., 1983. Herpes simplex virus non-structural proteins. . Function of the major DNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* 64: 983-995.

Loregian, A., Papini, E., Satin, B., Marsden, H. S., Hirst, R., and Palu, G. 1999. Intranuclear delivery of an antiviral peptide mediated by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5221-5226.

Makhov, A. M., Boehmer, P. E., Lehman, I. R., and Griffith, J. D. 1996. Visualization of the unwinding of long DNA chains by the herpes

simplex virus type 1 UL9 protein and ICP8. *J. Mol. Biol.* 258:789-799.

Monaghan, A., Webster, A., and Hay, R. 1994. Adenovirus DNA binding protein: helix destabilizing properties. *Nucleic acid research.* 22: 742-748.

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.

O' Donnell, M. E., Elias, P., Funnell, B. E., and Lehman, I. R. 1987. Interaction between the DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein (infected cell protein 8) of herpes simplex virus 1. *J. Bio. Chem.* 262: 4260-4266.

Roizman, B., and Sears, A. E. 1996. In *Fields virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds) p.2231-2295. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

Roizman, S., Witley, R. J., and Lopez, C. 1993. *The human herpesviruses*, P. 4. Raven Press, New York.

Ruyechan, W. T., and Weir, A. C. 1984. Interaction with nucleic acid and stimulation of the viral DNA polymerase by the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein. *J. Virol.* 52: 727-733.

Skaliter, R., and Lehman, I. R. 1994. Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10665-10669.

Spatz, M., Ali, S. A., Auer, M., Graf, C., Eibl, M., and Steinkasserer, A. 1999. Circular Dichroism analysis of insect cell expressed herpes simplex virus type 1 single-stranded DNA-binding protein ICP8. *Protein expression and purification.* 16:40-46.

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: 1152-1161.

Tsurumi, T., Kishore, J., Yokoyama, N., Fujita, M., Daikoku, T., Yamada, H., Yamashita, Y., and Nishiyama, Y. 1998. Overexpression, purification and helix-destabilizing properties of Epstein-Barr virus

ssDNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* 79: 1257-1264.

Ward, P., Dean, F. B., O' Donnell, M. E., and Berns, K. 1998. Role of adenovirus DNA-binding protein in *In Vitro* adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol.* 72: 420-427.

Whealy, M. E., Card, J. P., Meade, R. P., Robbins, A. K. and Enquist, L. W. 1991. Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J. Virol.* 65: 1066-1081.

Wu, C., Haper, L., and Ben-Porat, T. 1986. Cis function involved in replication and cleavage / encapsidation of pseudorabies virus. *J. Virol.* 59: 318-327.