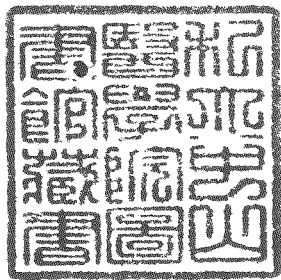


R
008.8
7513
88

中山醫學院生物化學研究所
碩士論文

人類多瘤性病毒 JCV 殼體內雙硫鍵鍵結
之研究

Investigation of Disulfide Linkage in
Human Polyomavirus JCV VP1 Capsid



指導教授：張德卿 教授
參考書恕不外借
研究生：陳碧蓮

中華民國八十八年七月



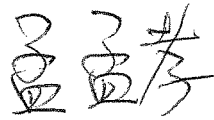
中山醫學院圖書館

C055232

本論文為中山醫學院授于理學碩士學位之必備
條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論
文考試委員會審查合格及口試通過。

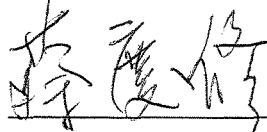
口試委員

中興大學農科所



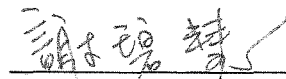
孟孟孝 副教授

中興大學遺傳工程中心



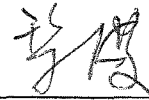
蔡慶修 副教授

中山醫學院生化所



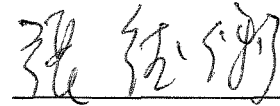
謝碧慧 助教授

成功大學分子醫學研究所



黎慶 副教授

中山醫學院醫學系微生物科
(論文指導教授)



張德卿 教授

中華民國八十八年七月

學生 陳碧蓮 論文題目為“人類多瘤性病毒 JCV 殼體內雙硫鍵鍵結之研究”，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審察合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：張德卿

簽名：

張德卿

中華民國八十八年七月 日

授權書 (博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在私立中山醫學院生物化學研究所八十七學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文名稱：人類多瘤性病毒 JCV 殼體內雙硫鍵鍵結之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號：)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：張德卿

研究生簽名：陳碧蓮
(親筆正楷)

學號：R86204

日期：民國八十八年七月十五日

本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室國科會科學技術資料中心 王淑貞。(電話:02-27377746)

本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。

本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

目 錄

頁次

誌謝	-----	1
中文摘要	-----	2
英文摘要	-----	3
前言		
人類多瘤性病毒背景介紹	-----	4
本研究相關背景介紹	-----	7
材料與方法	-----	9
結果	-----	19
討論	-----	26
參考文獻	-----	28
圖表	-----	34

誌謝

回首來時路，兩年點滴縈繞心頭。當了研究生後才知道什麼叫作“學術”，這兩年跟隨張德卿教授學習研究期間，感受到老師對學術研究的專注執著及宏觀的人生哲學。感謝老師在研究之路的啟蒙，平日在課業和研究上不厭其煩的敦敦教導及人生道理的循循指引。於論文撰寫期間，老師更是細心圈點眉批、詳加斧正，師恩浩蕩，永誌心頭。

從事研究期間，由衷感謝威志學長及梅林學姐在實驗上的教導及生活上的照應，俊蓓、惠生、浴伶同學、玉珍姐、啟信及嘉聲學弟所給予的幫助及相互照顧。一路走來，所有點滴，永憶心中。

感謝生化所所有老師在課業上的指導、陳凌雲老師在實驗材料上的資助；營養所李宗貴老師在技術和材料的幫忙；廖克剛老師及中興貴儀室珮琪小姐對電顯技術的幫助。

最後要感謝的是疼愛我的公婆及爸媽在物質生活和精神上的照顧及支持，尤其爸媽不計代價對小兒的悉心照料。最要感謝老公的包容體諒及鼓舞，讓我無後顧之憂，學業得以完成。感謝伴我這一路走來所有的家人及朋友給予的支持及鼓勵，致上我由衷的謝意。

陳碧蓮 謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

6.28.99

中文摘要

人類多瘤性病毒 JC 病毒主要殼體蛋白 VP1 基因已被選殖到酵母菌細胞表達，且 VP1 蛋白質在酵母菌細胞內可自我組裝為類似殼體構造(capsid-like particle)，可與人類 O 型紅血球細胞產生凝集。以 CsCl 密度梯度離心分析顯示此殼體構造含有類似完整病毒顆粒(virion-like pseudovirion)，密度 1.34 g/cm^3 及空殼病毒顆粒(empty capsid-like pseudocapsid)，密度 1.29 g/cm^3 的兩群蛋白質。以 10-30%蔗糖梯度離心可純化這兩群蛋白質。電子顯微鏡觀察外形則見 pseudovirion 及 pseudocapsid 兩種構造。核酸萃取分析顯示 pseudovirion 包含有 DNA 及 RNA。pseudocapsid 可攜帶外生性 DNA 到人類胎兒腎臟細胞。此外，VP1 蛋白質以 2D-PAGE 分析共有 6 個 species。為了探討雙硫鍵在 JCV 殼體內的存在性及角色，以 EGTA 及 DTT 同時處理 VP1 殼體，會使其瓦解為 capsomere。加入鈣離子會使 capsomere 部份重組成 capsid。若加入 EGTA 於再重組的 capsid，不需 DTT 即可使 capsid 再瓦解為 capsomere。先以 DTT 處理 capsid，再加入 EGTA，會使 capsid 完全瓦解為 capsomere；先 EGTA 再 DTT 處理則不會導致 capsid 瓦解。因此推測雙硫鍵可保護鈣離子被 EGTA 螯合，而鈣離子為形成殼體結構所必需。以 non-reducing SDS-PAGE 分析 VP1 殼體，發現 VP1 monomer、dimer 及 trimer 皆存在於殼體內且各占 VP1 分子的 45、40 及 15%，顯示一半的 VP1 蛋白質形成雙硫鍵鍵結。non-reducing SDS-PAGE 分析 DTT 處理的殼體，全部都是 VP1 monomer，以電顯圖觀察 DTT 處理的殼體，發現仍保有完整殼體結構但其殼體膨脹約 4.5%，可能因而喪失保護鈣離子被螯合的功能。non-reducing gel 分析 capsomere，只有 VP1 monomer 存在，顯示，capsomere 內並沒有雙硫鍵。diamine 處理 capsomere，會使 capsomere 的雙硫鍵再形成。顯示，capsid 內的雙硫鍵鍵結是存在於 capsomere 與 capsomere 之間。由這些結果推測，VP1 蛋白質的 dimerization 及 trimerization 係由 capsomere 之間 (Intercapsomeric) 的雙硫鍵鍵結而形成。雙硫鍵可穩定殼體構造且保護二價鈣離子，而鈣離子在 capsid 組裝扮演決定性角色。

英文摘要

The major capsid protein VP1 of human polyomavirus, JC virus, has been cloned and expressed in yeast cells. VP1 protein expressed in yeast was able to self-assemble into a capsid-like structure and cause hemagglutination. The capsid-like particles were comprised of virion-like and empty capsid-like particles with 1.34 and 1.29 g/cm³ of density respectively. Morphology of the particles has been observed by electron microscopy. The virion-like particles contained host DNA and RNA molecules. The empty capsid-like particles were able to package and deliver exogeneous DNA into human kidney 293 cell. JCV capsid could be disrupted into pentameric capsomeres in the presence of both EGTA and DTT but the roles of metal ion and disulfide in capsid are still not known. In this study, disulfide linkage was found in the VP1 capsid as demonstrated by non-reducing gel. Capsid treated with DTT remained structural integrity but the disulfide has been abolished. Subsequently, the DTT treated capsid could be dissociated into capsomeres by EGTA alone. In addition, capsomeres were able to re-assemble into capsid-like particle in the presence of calcium ions. The re-assembled capsid without disulfide could be disrupted into capsomeres by EGTA alone. These results indicate that calcium ion is essential for capsid formation and disulfide is crucial for keeping capsid integrity and presumably protects calcium ion from chelation.

前言

人類多瘤性病毒簡介

多瘤性病毒 (Polyoma virus) 是屬於乳多瘤病毒科 (Papovaviridae) 的一屬，其大小約 45 nm，不含套膜 (envelope)，外殼結構是二十面體 (icosahedron) 對稱結構，結構殼體 (capsid) 由七十二個次殼體 (capsomere) 組成，在結構蛋白內包裹了一環形 (circular) 雙股 DNA 基因組 (genome)，約有 5000 對核苷酸。多瘤性病毒又依不同宿主可分為 murine polyoma virus、SV40、JCV、BKV 及 BFDV 等 (60)，其中 murine polyoma virus 的宿主動物是鼠類，SV40 的天然宿主動物是恆河猴，JCV 和 BKV 的宿主動物是人類，而 BFDV 的天然宿主動物是鳥類。

人類多瘤性病毒包括 JCV 和 BKV。而 JC 病毒於 1965 年時，Silverman 等人用電子顯微鏡在進行性多病灶腦白質病 (progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) 病人的腦部組織觀察到 (58)。一直到了 1971 年才從進行性多病灶腦白質病病人的腦部組織中分離出 JC 病毒 (47)。同年 BK 病毒也從一位 39 歲的腎臟移植病人的尿液中分離出來 (28)。兩者皆依病人之姓名命名。1977 年 Padgett 等人廣泛篩檢不同動物的檢體，都沒有偵測到 JC 病毒的抗體，所以 JC 病毒完全是屬於人類感染的病毒 (45)。在多瘤性病毒中除了 SV40 外，JCV 及 BKV 都可使人類 O 型、雞及天竺鼠的紅血球產生血球凝集 (Hemagglutination ; HA) 的特性。

人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組 (Genome) 分析

人類多瘤性病毒 JC 病毒的基因組 (25) 是一約有 5000 個左右核苷酸的雙股環形 DNA，分子量約為 3×10^6 dalton，基因組包含了三個主要功能區：

(一). 早期區 (early region) : 在複製起始點近端，有二種基因產物，大腫瘤抗原 (large T antigen) 及小腫瘤抗原 (small t antigen)，大 T 蛋白質是種非結構性的多功能磷酸蛋白質，可調控早期基因的轉錄，所以可自我調控 (autoregulation)。除此之外，T 蛋白質為 DNA 複製起始所需，也控制基因表現從早期轉換到晚期，同時，也能引起細胞的惡性轉形。小 t 蛋白質的功能則尚未清楚。

(二). 晚期區 (late region) : 在複製起始點遠端，晚期基因順序與早期基因的方向相反，可決定 VP1, VP2, VP3 三種結構蛋白及少許病毒的 minichromosome (25)。VP1 是最主要結構蛋白，分子量為 40 KDa，約占殼體蛋白質的 75%，跟細胞吸附有關。VP2 及 VP3 是次要結構蛋白，約占殼體蛋白質的 10% (64)。分子量分別為 37，及 26 KDa (10)。VP3 是 VP2 的 C 端的三分之二 (32)。

(三). 調控區 (regulatory region) : 是介於早期及晚期基因之間的未轉錄區，其含複製起始點，起動子 (promoter)，及增強子 (enhancer)。

多瘤性病毒 JC 病毒所引發的 PML 致病機轉

多瘤性病毒 JCV 是一種人類的伺機致病原，會造成少見的髓鞘脫失疾病，即進

行性多病灶腦白質病 (progressive multifocal leukoencephalopathy ; PML) (61、62)。進行性多病灶腦白質病的特性是髓質病灶逐漸的變多與擴大。在大多數進行性多病灶腦白質病的病人其免疫功能受到抑制 (7、62)，由於免疫功能的缺失，可能導致 JCV 的伺機感染 (opportunistic infection)。JCV 會破壞寡突膠細胞，寡突膠細胞負責產生中樞神經系統的髓質，是一種中樞神經系統 (central nervous system) 退化的疾病 (63、68)。

大部份進行性多病灶腦白質病的病人會有細胞免疫缺陷，符合進行性多病灶腦白質病是 JCV 所造成的中樞神經系統伺機性感染的說法。由 Willoughby 等人 (68) 發現進行性多病灶腦白質病的病人會產生細胞免疫的缺陷及不完全的抗體免疫反應 (8)。大部分病人在病程時特异性 IgG 效價沒有提高，腦脊髓液也無特异性 (3)。進行性多病灶腦白質病在臨床上頗受注意，是因為患進行性多病灶腦白質病的病人在出現症狀後的十八個月內就會死亡，有 80% 在九個月內會死亡 (68)。若是患 AIDS 又同時患進行性多病灶腦白質病通常四個月就會死亡 (58)。

現在 PML 廣泛被接受的致病機轉是 JCV 破壞製造髓質的寡突膠細胞，而使腦部功能缺損，且 JCV 通常是伺機性感染，但 JCV 是如何在人與人之間傳播及 JCV 原發性感染是在腦部或是在腎臟仍是未知，且如何抵達腦部仍有待了解。

多瘤性病毒 JC 病毒致癌性

以前研究報告指出將 BKV、JCV 及 SV40 以皮下注射、靜脈注射、腦內及腹腔內等各種不同的方式送入倉鼠體內，經常會引發腫瘤。在細胞培養情況下，倉鼠腦細胞株可因 JCV 感染或因 JCV 的 DNA 轉感染而轉形 (transformation) (26)，而在這些被轉形的細胞，發現 JCV 基因體嵌入倉鼠基因，表現的 T 蛋白質會跟 p53 及 Rb 蛋白質結合 (40)。研究顯示，將 JCV 送入倉鼠腦內，則具有高致癌性，會引發多種組織不同的腦瘤 (65、70)。約 83% 的新生倉鼠經過六個月的病毒培養會長出腦瘤，其中 95% 的腦瘤是小腦髓質母細胞瘤 (70、71)。以不同方式培養 JCV，則會引發內臟肌瘤、週邊神經母細胞瘤及松果體細胞瘤等 (70)。到目前為止 JCV 是唯一被證實在非人類靈長類可誘發腫瘤的多瘤性病毒，若將 JCV 接種到猴子的大腦、皮下、或腹腔內，打入 predisone 使成免疫缺陷狀態，則產生大腦腫瘤或神經膠母細胞瘤。雖然 JCV 可在非人類靈長類誘發腫瘤，在 PML 病人曾發現神經膠瘤 (glioma)，但尚未有直接證據證實 JCV 跟人類腫瘤有關 (21)。

多瘤性病毒在臺灣感染的情形

這幾年我們實驗室研究人類多瘤性病毒 JCV 在臺灣感染的流行率 (14、15、16、17、18、19、59、67)，分別從免疫完全的健康人，短暫性免疫衰竭的孕婦及長期免疫抑制的自体免疫疾病病人，收集尿液檢體，以聚合酶連鎖反應 (PCR) 及南方墨點法 (Southern bolt)，偵測由尿液排放的病毒 DNA，並以 DNA 定序分析 DNA 調節區的基因型 (genotype)，發現在孕婦及自体免疫疾病病人存在四種 JCV strain，包括 CY，台灣一號 (TW-1)，台灣二號 (TW-2) 和台灣三號 (TW-3)；及兩種 BKV strain，分別是台中一號 (TC-1) 和台中二號 (TC-2) (14、15、16、17、18、19、67)。在這些不同的 JCV 及 BKV strain 中，發現它們的調節區分別產生了一些突變，而與原始種的 JC 及

BK 有些不同。台灣一號，台灣二號發生了 pentanucleotide-A(GGGAA)及/或 B(AAAGC)的缺失(deletion)；而台中一號有兩個核苷酸改變，台中二號有六個核苷酸改變的突變。我們實驗室的結果中發現有 13.3 % (10/75)的健康人，26 % (20/77)的孕婦及 37.5 % (18/48)的自体免疫疾病病人可偵測到尿液排放的 JCV DNA。而所有健康人都沒有偵測到 BKV DNA，但 3.9 % (3/77)的孕婦及 6.2 % (3/48)自体免疫疾病病人可偵測到 BKV DNA。此外，在所有尿液檢體中，24 % (48/200)是 JCV 陽性，只有 3% (6/200) BKV 陽性 (59)。而且 JCV 陽性的人只感染 TW-1(52%)及 CY(42%)兩種亞型，這些結果顯示：在台灣人類多瘤性病毒從尿液中排放的情形，免疫抑制的人高於健康人；同時，JCV 的流行率高於 BKV，此外，TW-1 及 CY 兩種 strain 是 JCV 在台灣族群中主要流行的亞型。

本研究相關背景簡介

到目前為止，對鼠類 (murine polyoma virus) 及猿猴類 (SV40) 多瘤性病毒研究較多，這些病毒外殼蛋白是屬 20 面體對稱。早在 1965 年研究發現 murine polyoma virus 外殼蛋白是由 12 個 five-coordinated 及 60 個 six-coordinated capsomere 所組成 (35)，而最近的 X-ray 繞射研究卻推測組成 murine polyoma virus 外殼蛋白的 72 個 capsomere 全都是 VP1 pentamer (1)，同時這些 protein subunit 的接觸是不相等的 (49)。這些 pentamer 的聚集可能是處於一個變異的鍵結狀態，1983 年時 Klug (35) 指出這些變異可能是 VP1 蛋白在不同環境狀況下的化學修飾或是因為與外殼蛋白中少數的 VP2，VP3 結構蛋白交互作用所造成。在自然狀態下，病毒顆粒(virion)的組裝過程中，VP1 與 VP1 的交互作用，離子鍵或金屬離子所扮演的角色，一直還為研究人員所探討。

在早期的研究，已經瞭解鼠類 polyomavirus(24、31、41a)，SV40(36)，monkey B-Lymphotropic papovavirus (BLPV; 48)，人類 JCV(9)，這些病毒的主要結構蛋白 VP1，可以在昆蟲細胞中表達，而且能夠自己組裝成殼體的構造(capsid-like particle)。此外，鼠類 polyomavirus(51)，avian polyomavirus，budgerigar fledgling disease virus(BFDV; 50)的 VP1 及 papillomavirus L1 蛋白質(38)，也可在 *E.coli* 表達，而且可分離出 pentameric capsomere，這些 capsomere，當出現鈣離子時，可組裝成殼體構造(capsid-like particle)。但並沒有報告指出它們可以在 *E.coli* 中自我組裝(self-assemble)成殼體構造(capsid-like particle)。而人類 JCV 主要殼體蛋白 VP1，也已被證明可在 *E.coli* 中表達並自我組裝成 capsid-like particle(44)，而這些 particle 經密度梯度離心純化及電子顯微鏡分析，可分為含核酸的 pseudovirion 及不含核酸的 empty pseudocapsid，後者可運送外來 DNA 到人類胎兒腎臟細胞中，做為基因治療的載體(44)。

在 SV40，鼠類 polyomavirus，及相關的 polyomavirus 的研究中，由破壞病毒顆粒(virion)的實驗，初步說明雙硫鍵及鈣離子對殼體穩定度的重要性(4、5、6、9、20、66)，而 in vitro 這些病毒重組的 VP1 蛋白質自我組裝的研究也說明鈣離子及離子鍵在 capsid 形成的重要性(51、52、69)。在 1991 年，Liddington 等人提出的 SV40 三度空間結晶體構造(39)中指出：在 VP1 monomer 或 pentamer 的層次，並沒有看到雙硫鍵；而他們用 CH_3HgNO_3 去標定構造中的 7 個 cysteines，只有見到 4 個 cysteines，暗示有 3 個 cysteines 在 VP1 分子中形成共價聯結(covalent linkages)。這些發現，他們認為雙硫鍵可能有穩定鄰近的 capsomere 的作用。Sapp 等人研究人類 papillomavirus type 33(HPV33)(55)，Doorbar 及 Gallimore(22)對 HPV type 1 virion 的研究中發現，還原劑(DTT)會使得 VLPs disassembled，顯示雙硫鍵在 HPV capsomere 形成 capsid 過程中扮演重要角色。另外，在 bovine papillomavirus(BPV) 研究發現(37)：用 DTT 處理 BPV L1 蛋白質可使 trypsin 切割 L1 的 C 端，同時使得 capsid 擴張，很可能是 capsid 瓦解為 capsomere 的前驅產物，顯示 intercapsomere 雙硫鍵在 papillomavirus capsid 組裝及 disassembly 的重要性。但對於雙硫鍵是存在 VP1 monomer、capsomere 或 capsid 的層次，仍舊不清楚。

1995 年，Ghafakhanian 等人(29)，在兔子網狀紅血球(reticulocytes)的轉錄連結轉譯(transcription-linked translation)蛋白質系統中發現 SV40 VP1 分子會自我組裝

成 postpentameric 12S 複合物，同時透過雙硫鍵而穩固這個複合物。經由 reducing 及 non-reducing SDS-PAGE 分析，在 10 mM 還原劑 DTT 作用下，VP1 會解離為 45 kda monomer，而無 DTT 存在時，大部分 VP1 分子大於 400 kda。他們認為雙硫鍵是參與在病毒組裝過程的 postcapsomeric 時期。

1998 年，Sapp 等人(56)，在昆蟲細胞的系統中，研究人類 papillomavirus，利用其病毒殼體(virus-like particle；VLPs)探討它的構造及組裝機轉，發現主要殼體蛋白質 L1 中有兩個高度保留(conserved)的 cysteine 能夠阻止 VLPs 的組裝，而其它突變對 VLP 組裝沒有影響。這兩個 cysteine 形成 capsomere 間的雙硫鍵 (intercapsomeric disulfites)，產生了一個 L1 trimer，而此 trimer 約只佔所有 L1 分子的一半。他們認為 L1 的 trimerization 使得 capsomere 連結而保持 papillomavirus 殼體的穩定度是絕對必要的。

雖然在 SV40(20)、鼠類 polyomavirus(5、6、20、39)及人類 JCV(9)的研究已說明 Ca^{2+} 及雙硫鍵對 VP1 殼體穩定的重要性；而且在人類 papillomavirus(56)，bovine papillomavirus(37)的研究也証實雙硫鍵穩定 L1 殼體。而到目前為止在所有多瘤性病毒殼體組裝過程中，雙硫鍵及鈣離子對病毒殼體的組裝及穩定性所扮演的角色仍不清楚。本篇研究我們利用生化學方法以金屬螯合劑(EGTA)及還原劑(DTT)處理 VP1 殼體，偵測其血液凝集特性的有無，作為 capsid 是否完整或瓦解的指標，以釐清雙硫鍵及 Ca^{2+} 在 VP1 自我組裝為殼體的過程中可能扮演的角色。並以 non-reducing SDS-PAGE 來觀察雙硫鍵在 VP1 capsid 中的存在性及探討它存在 VP1 capsomere or capsid 的層次，另外藉由 DTT 的氧化還原反應及電子顯微鏡觀察，探討雙硫鍵對殼體穩定性及完整性的影響。最後，利用定位點突變把 VP1 分子中的六個 cysteine 突變為 glycine，以了解 capsid 中的那一些 cysteine 與 capsid 組裝有關。

材料及方法

構築重組的質體 DNA:

本實驗所用的重組質體 DNA，由東歐立陶宛的 Kestas Sasnauskas 教授將台灣三號(Taiwan-3)(10、12) JCVP1 DNA 選殖(cloning)入載體(pFX7)的 Spe I 及 XbaI 位子，而命名為 pFX7-JCVP1。pFX7 載體含有 GAL10-PYK1 融合的啟動子(promoter)，可被半乳糖(galactose)誘發(induction)，而在酵母菌細胞表達 JCV VP1 蛋白質。同時，這個載體含有細菌的 pUC19 全部 DNA 序列，上面含有抗 Ampicillin 的選擇性標記，可供在 *E.coli* 複製時，當作選擇性的標準。及一段 FDH1 基因，是來自 *Candida maltosa* 的基因，它是含有 formaldehyde-resistance 的基因，可供在酵母菌細胞中當作選擇性的標記。另外，還有 PGK1 基因，是 transcription terminator sequence 及 2m 基因為 yeast 2-micron DNA 的一部分，含有複製的起始點(replication origin)。整個載體約 7,500 bps 長。

酵母菌 *S.cerevisiae*-INVSC1 的質體轉殖(transformation)

DNA 轉殖入酵母菌乃依據 Gietz 等人(30)的 lithium acetate(簡寫成 LiAc)轉殖法。酵母菌 INVSC1 以 LiAc 處理後，質體以經過 100°C 沸水處理的單股鮭魚精子(herring sperm DNA)攜帶下(57)，可直接轉殖進入酵母菌菌體。

一. Competent cells 的製備:

將 50 μ l 隔夜培養的酵母菌 INVSC1 接種入 50 ml YPD 液體培養基(其成分為 1% yeast extract, 2% peptone 及 2% glucose)，於 30 °C，200 rpm 轉速振盪培養至隔夜。第二天，取 30 ml 種到 300 ml YPD (1:10)，繼續培養直到 OD₆₀₀ 達 0.4-0.6，約 2-3 小時，此數值表酵母菌生長速率正好達 mid-log phase。之後，於室溫以 1000 x g 離心 5 分鐘，去掉上清液，以 1.5 ml TE/LiAc [(成分為：0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA 及 1 M LiAc, pH 7.5);(在使用前新鮮泡製:8 ml ddH₂O + 1 ml 10X LiAc + 1 ml 10X TE)] 懸浮菌體，即為 yeast competent cell。

二. 轉殖(transformation):

取 150 μ l competent cell 放入 1.5 ml 離心管，加入 50 μ l (5 ug)的質體 DNA 及 10 μ l (1 μ g)單股鮭魚精子 DNA，然後加入 600 μ l 的 PEG / LiAc [(成分為 40% PEG4000, 0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 M LiAc, pH 7.5);(使用前新鮮泡製:8 ml 50% PEG 4000 + 1 ml 10X TE + 1 ml 10X LiAc)]。混合均勻後，置於 30 °C，200 rpm 振盪 30 分鐘，接著放入 42 °C 水浴熱休克 15 分鐘，冰浴 5 分鐘，隨後以 14,000 rpm 離心 15 秒鐘，倒去上清液，以 1 ml YPD 清洗菌體，再懸浮在 1 ml YPD，於 30 °C 振盪培養 10-15 小時，使菌體先活躍起來，再塗 200 μ l 於含有 formaldehyde (30 μ l/100 ml) 的 YPD 平板培養基上，置於 30 °C 培養箱直到菌落生長。

抽取轉殖酵母菌(*Saccharomyces. cerevisiae*-INVSC1)的質體 DNA

抽取轉殖酵母菌後的質體 DNA 是使用 glass beads and phenol-chloroform extraction 的方法(54)。挑選單一菌落的轉殖酵母菌，接種到含有 formaldehyde (30 μ l/100 μ l) 的 YPD 液體培養基中，於 30 °C 振盪培養 (200 rpm) 24 小時。然後取 1.5 ml 菌液置入微量離心管中，離心 (12,000 rpm) 1 分鐘，倒掉上清液後，加入 30 μ l 懸浮緩衝液 (suspension buffer) [其成分為：0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 unit/ μ l lyticase (Sigma, USA), 過濾使之無菌]，懸浮菌體後，置於 37 °C 振盪培養 30 分鐘，加入 170 μ l lysis buffer[其成分為：0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100, 過濾使之無菌]，再加入 0.3 g 玻璃珠 (glass beads)(Sigma, USA)，然後加入 200 μ l phenol / chloroform / iso-amyl alcohol (25:24:1)，劇烈混合 5 分鐘後，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上層液到新的 1.5 ml 離心管，加入 8 μ l 3M sodium acetate 及 500 μ l 冰溫的絕對酒精，置於 -70 °C，1 小時，使質體沉澱，再離心 (14,000 rpm) 10 分鐘，倒掉上清液，用 speed-Vac 使沉澱物乾燥，最後懸浮於 20 μ l 已滅菌的二次水。

聚合酶連鎖反應 (PCR) 及轉殖到 *E.coli* 偵測由 INVSC1 抽取的質體 DNA

(1) 聚合酶連鎖反應 (PCR) :

取 1 μ l 由酵母菌抽取的質體 DNA 當模板(template)，加入 5 μ l 10 倍稀釋的 pro-Taq 緩衝液，4 μ l 的材料 dNTP，及分別為 1 μ l 的 JCVP1 S1G, JCVP1 AS1G 兩股引子 (primer)，0.5 μ l 聚合酶 (pro-Taq polymerase) (Promega, USA) 及 37.5 μ l 滅過菌的二次水，混合均勻後，覆蓋一層 30 μ l 的礦物油進行基因的放大，於 95 °C，2 分鐘之後，95 °C，45 秒，denature；55 °C，1 分鐘，annealing；72 °C，1 分鐘，extension。共 40 個循環，接著 72 度 °C，4 分鐘，1 個循環，使未作用完的聚合酶反應完，然後跑 1% 的瓊脂膠(agarose gel) 電泳。

(2)轉殖到 *E.coli*:

因為由酵母菌抽取的質體 DNA，直接於 1% 的瓊脂膠(agarose gel) 看不到任何東西。所以將它轉殖到 *E.coli*。19 μ l 由酵母菌抽取的質體 DNA，加入 200 μ l 的 *E.coli* competent cells (JM109)，混合均勻後，於冰浴上 30 分鐘，接著 42 °C，3 分鐘，進行熱休克，然後立刻置於冰上 5 分鐘，加入 200 μ l L broth，培養於 37 °C，1 小時，使菌體活躍起來，再塗於含 Ampicillin (100 μ g/ml) 的平板培養皿上，於 37 °C 隔夜培養。第二天挑選單一菌落，接種在含有 100 μ g/ml Ampicillin 的 5 ml L broth，37 °C，200 rpm 轉速，隔夜培養。用 Wizard™ Minipreps DNA purification kit (Promega, USA) 純化質體，然後進行 restriction mapping，在乾淨的 1.5 ml 離心管加入 4 μ l 已滅菌的二次水，再加入 4 μ l 純化的質體 DNA 及 1 μ l 10 X buffer，1 μ l (10 unit) 限制酶 Sac I，混合均勻後，於 37 °C 的水浴作用 2 小時，之後，加入 2 μ l 的 6 X loading dye 終止反應，於 1% agarose 電泳分析。正確的質體 DNA (pFX7-JCVP1) 可被 Sac I 切一刀，而看到約 8,600 bps 的片段。而未切的質體 DAN



(circular form)約在 5 kbp 的位子。

敏感性實驗 (sensitivity test)

將轉殖成功的酵母菌含質體 DNA (pFX7-JCVP1/INVSC1)，各取 3 μ l 分別種到 3 ml 各含有 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 70 μ l, 90 μ l formaldehyde/100 ml YPD 選擇性液體培養基中，於 30 °C, 200 rpm 振盪培養 24 小時，然後加入 3% galactose 去誘發菌體表達 JCV VP1 蛋白質，持續培養於 30 °C, 16 小時。

以西方墨點法 (Western blot) 來確認 JCV VP1 蛋白質在酵母菌細胞表達情形

將誘發培養 16 小時的菌液，各取 1.5 ml, 12,000 rpm 離心沈澱菌體，倒去上清液後，溶於 200 μ l 4X 稀釋的 SDS sample buffer (250 μ l 20% SDS, 0.2% glycerol, 250 μ l bromophenol blue, 125 μ l β -mercaptoethanol)，在 100 °C 沸水中煮沸 5 分鐘，再以超音波震盪打斷 DNA，取 15 μ l 以 12.5% SDS-PAGE 分析。再將膠上的蛋白以 HORIBLOT(ATTO) 的 anode buffer # 1: 0.3 M Tris, pH 10.4, 20% methanol; anode buffer # 2: 25 mM Tris, pH 10.4, 20% methanol; cathode buffer # 3: 25 mM Tris, pH 9.4, 40 mM 6-aminohexanoic acid (Sigma, USA), 20% methanol, 在 2.5 mA/cm², 40 分鐘條件下轉印到 nitrocellulose paper 上，再用 10 ml 0.5% 脫脂奶粉搖動，使均勻混合 30 分鐘，進行 blocking。再加入來自 *E. coli* 產生的全長 JCV VP1 所製成的抗體 (anti-JCV VP1 antibody, 1:3000) (12)，室溫下搖動 30 分鐘。再用 TBS-0.01% Tween 20 洗三次，每次 5 分鐘。之後加入 biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) made in goat (Vectastain ABC kit, USA)，於室溫反應 30 分鐘，再用 TBS-0.01% Tween-20 洗三次，每次五分鐘；然後加入 ABC reagent (avidin DH, biotinylated horseradish peroxidase H) 30 分鐘，再加 TBS-0.01% Tween-20 洗三次，每次五分鐘。最後加 diaminobenzidine solution (DAB, 0.01% final concentration)，及 H₂O₂ (0.012 % final concentration) 呈色分析。

測定轉殖酵母菌 (pFX7-JCVP1 / INVSC1) 生長曲線

挑取單一酵母菌菌落種到 3 ml 含有 formaldehyde (30 μ l/100 ml) 的 YPD 液體培養基，於 30 °C 振盪培養 24 小時，測吸光度(OD₆₀₀)，在由其中吸取 1 ml 培養液種到 100 ml 含有 formaldehyde (30 μ l/100 ml) 的 YPD 液體培養基中，之後每 4 小時測一次吸光度(OD₆₀₀)，直到 24 小時。

JCV VP1 蛋白質在酵母菌細胞不同時間表達情形

取 0.5 ml 的 pFX7-JCVP1 / INVSC1 培養液，種到 50 ml 含有 formaldehyde (30 μ l/100 ml) 的 YPD broth，於 30 °C, 振盪培養 12 小時，然後加入 3% galactose (final concentration)，每隔 4 小時收集 1.5 ml 的菌液，一直到 72 小時。然後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘沈澱菌體，再以 100 °C 沸水煮沸 5 分鐘，及超音波振盪打斷 DNA 後，以西方墨點法分析。

血液凝集試驗 (Hemagglutination Assay , HA)

收集已表達 JCV VP1 蛋白質的菌液，去除上清液後，加入 1 ml suspension buffer (成分為:10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 u/μl lyticase (Sigma, USA), 無菌過濾懸浮菌體，於室溫均勻上下混合 30 分鐘，再加入 0.3 g 的玻璃珠，劇烈振盪 1 分鐘。然後加入 3 ul (1 U /1 μl) DNase I (Promega, USA), 2.5 μl 5 mM MgCl₂, 5 μl 1 mM PMSF, 於室溫反應 30 分鐘，接著超音波振盪打斷 DNA，離心 14,000 rpm 10 分鐘，將上清液換到乾淨離心管，即可用於血液凝集試驗。先將人類的 O 型血球以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗三次，製成 0.5 % 紅血球懸浮液。以 96 well 的 microtiter plate 用 PBS 作 2 倍的連續稀釋含有 JCV VP1 蛋白質的酵母菌上清液，最後加入 50 μl 的 0.5 % 紅血球懸浮液，混合均勻，靜置在室溫 1 小時，再觀察血液凝集的情形。以呈現血液凝集的最後稀釋倍數，定為血液凝集活性。

JCV P1 蛋白質的純化

A. 破酵母菌細胞

2 ml 的 pFX7-JCVP1 / INVSC1 培養液種到 200 ml (1:100) 含有 formaldehyde (30 μl/100 ml) 的 YPD 液體培養基，在 30 °C 振盪培養 12 小時，使它達到最佳誘發 JCV VP1 蛋白質表達的時間點，然後加入 3% galactose 誘發 JCV VP1 蛋白質表現，於 30 °C, 24 小時，以表現最大量的蛋白質之後。收集細胞，用 1000 X g, 室溫離心 5 分鐘，使菌體沈澱下來，然後用滅過菌的二次水清洗菌體，離心，移去上清液後，以 4 ml suspension buffer [成分為 :10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 4.5 u/μl lyticase] 懸浮菌體，在室溫使反應 30 分鐘。然後加入玻璃珠 (glass beads) 劇烈混合，使細胞壁破裂，-70 °C 冷凍，室溫解凍，兩次，使細胞膜破裂。加入 5 μl (1u/μl) DNase I 及 10 μl 1 mM PMSF, 在室溫反應 30 分鐘，在冰浴下以超音波震斷 DNA, 再離心 (14,000 rpm), 4 °C, 10 分鐘，上清液收集於乾淨試管，進行 sucrose cushion。

B. Sucrose cushion :

在 5 ml 超高速離心管 (Beckman, USA) 底部加入 3 ml 20 % 蔗糖溶液 (in TBS), 然後加入 2 ml 的上清液，再用 TBS 平衡兩根試管。接著以超高速離心機 (Beckman L8-70 M), SW55 的 rotor, 23,000 rpm 轉速，於 4 °C 下離心 3 小時之後，倒掉上層液，兩離心管沈澱下來的蛋白質溶於 0.5 ml Tris (pH 7.4) buffer, 再加入 0.167 ml 的 1.8 g/cm³ CsCl 溶液，使密度相當於 1.2 g/cm³。

C . CsCl gradient centrifugation

在 5 ml 的超高速離心管中分別由下而上加入 5-step 密度的 CsCl 溶液各 0.8 ml (1.35, 1.32, 1.29, 1.25, 1.2 g/cm³), 上層再加上含 CsCl, 密度為 1.2 g/cm³ 的 sucrose cushion 純化出的蛋白質，同樣以 Beckman L8-70 M 超高速離心機, SW55 的 rotor, 35,000rpm 轉速，於 4 °C 下離心 16 小時，之後以蠕動 pump (EYELA MP-3),

每 6 滴為一個 fraction 收集在 1.5 ml 離心管，測定每一管的血液凝集活性(HA)、密度及以 SDS-PAGE 分析蛋白質純度；以 Western blot 鑑定 JCV VP1 蛋白質的分佈。

密度測定

從收集到的各 fraction 中，分別取 3 μ l 到曲光儀(Abbe Refractometer No.501)上，調整刻度，使平面剛好位於交叉線上，此時所讀到的值，即為檢體的曲光度，再由換算表而得出檢體的密度。然後以 1.32 g/cm³ 粗分為兩群蛋白質。經由 CsCl 超高速離心純化之後的兩群 JCV VP1 蛋白質，在 10 mM Tris pH 7.4, 0.5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 5% glycerol 的緩衝液，於 4°C 下透析，隔夜之後，保存於 -70 °C。

D.10-30 % 蔗糖梯度離心(sucrose gradient centrifugation)

經由 CsCl 超高速離心純化之後，收集密度為 1.36 至 1.32 g/cm³ 及 1.32 至 1.26 /cm³ 兩部分蛋白質，再利用 10-30 % 蔗糖梯度離心純化，以得到高純度的 JCV VP1 蛋白質。取兩根 5 ml 的超高速離心管(Beckman, USA)，由底部而上加入經過 gradient mixer(Hofer, USA)混合的 30%至 10%的蔗糖溶液各 2.3 ml，最上層再分別加上 CsCl 純化後的兩群蛋白質，然後以 Beckman L8-70 M 超高速離心機，SW55 的 rotor，35,000 rpm 轉速，於 4 °C 下離心 40 分鐘，之後以蠕動 pump 每 6 滴為一個 fraction 收集在 1.5 ml 離心管，分別測定血液凝集(HA)，並以 SDS-PAGE 分析蛋白質純度。

電子顯微鏡觀察 JCV VP1 capsid 外形

JCV VP1 capsid 陰染的方法根據 Garcea (41) 的方法再稍做修飾。在 parafin paper 點一滴(約 10 μ l)純化的 JCV VP1 capsid，再用碳蒸著的篩片(carbon formvar-coated grid)浮在上面 5 分鐘，使蛋白質吸附其上。再用濾紙沿篩片邊緣將多餘水份吸走。再用 2 % uranyl acetate 染色 10~15 秒，即可在電子顯微鏡(JOEL, JEM, 2000-CX, 80KV)下觀察。

病毒顆粒(virion-like particle)核酸的萃取

純化病毒顆粒內的核酸是使用 Hirt 的方法(33)，再稍作修飾。100 μ g 經過蔗糖梯度純化的病毒顆粒(virion-like particle)，加入 2 μ l(1U/ μ l) DNase I 於 37 °C，反應 30 分鐘 及 2 μ l(5 ng/ μ l) RNase A (Promega, USA)，於 37 °C，反應 45 分鐘，先把病毒顆粒外圍的核酸處理完。然後加入溶解緩衝液(成份為：proteinase K 200 μ g/ml, 1%SDS 及 25 mM EDTA)，置於 37 °C，反應 30 分鐘，之後，加入等量體積的 Leader phenol(phenol : chloroform : isoamyl alcohol=25 : 24 : 1)均勻混合後，離心 (7,000rpm) 10 分鐘，吸取上層液到新的 1.5 ml 離心管，加入十分之一體積的 3M 醋酸鈉，及 3 倍體積冰溫酒精使核酸沈澱。然後置於 -70 °C，一小時。接著，離心 (16,000rpm) 20 分鐘，移去上清液，用 speed-vac 乾燥沈澱物，再加入 20 μ l 滅菌的二次水懸浮沈澱物。取 1 μ l 做 PCR 偵測 JCV VP1 基因是否存在，其餘跑 1% agarose 膠電泳。另外，兩批 100 μ g 病毒顆粒萃取的核酸，分別用 DNase I 及 RNase

A, 於處理 37 °C, 30 分鐘後, 跑 1% agarose 膠電泳。

利用假的病毒殼體(pseudocapsid partile)攜帶外生性的 DNA 到人類細胞

利用假的病毒殼體(pseudocapsid)包裝外生性的 DNA 是參考 Forstova 等人的方法(23)。取 40 μ g 經過 10-30 %蔗糖梯度離心純化的 pseudocapsid, 加入 3 μ g pEGFP-C1 質體 DNA (Clontech, USA), 在 37 °C 水浴中反應 30 分鐘, 然後加入 350 μ l 滅過菌的二次水稀釋混合物, 並進行 osmotic shock, 於 37 °C, 30 分鐘。接著加入 3 U 的 DNase I (Promega, USA), 37 °C, 作用 30 分鐘, 然後, 準備以此混合物去感染人類胎兒腎臟上皮細胞 293 (ATCC CRL-1573)。293 細胞是培養在含有 10 %胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培養基。在感染的前一天, 把約長 8 分滿的 293 細胞, 分裝到 35 mm² dish 內部所含載玻片上, 加入 2 ml 新鮮的培養液, 於 37 °C, 含 5 % CO₂ 的培養箱中培養隔夜, 第二天, 移去培養液, 用磷酸鹽緩衝液(PBS)清洗細胞一次, 吸去 PBS 後, 加入 pseudocapsid particle 以包裝 pEGFP-C1 質體, 於 37 °C 培養箱中, 每 15 分鐘輕搖一次, 一直到 1.5 小時, 使之吸附。之後加入 2 ml 新鮮的培養液, 於 37 °C, 含 5 % CO₂ 的培養箱中培養 48 小時。之後, 把細胞收起來, 在顯微鏡下觀察螢光蛋白質的表現。

Two dimensional gel 分析 JCV VP1 蛋白質

2D-PAGE 分析蛋白質的方法主要參照 O'Farrel (42) 及 Forstova 等人 (24) 的方法, 再稍做修飾。

2D gel 的配製

1D : Isoelectrofocusing (IEF)

A. 玻璃管 (2×4×160 mm, Bio-Rad, USA) 的清洗

先將玻璃管浸泡於 1 M KOH / 95% ethanol, 隔夜之後, 以水清洗, 再用二次水潤濕。再用 95% 酒精潤濕, 置於烘箱烘乾。

B. Tube gel 的配製

4 支 tube gel 則取 1.78 g urea, 430 μ l 30% acrylamide, 0.8% bisacrylamide, 10% NP-40, 638 μ l H₂O, 在 37°C 水浴下混合均勻後, 以 0.45 μ m 的濾膜過濾, 再加入 130 μ l pH 3-10 Ampholyte (Bio-Rad, USA), 3.23 μ l ammonium persulfate 及 2.27 μ l Temed。將 gel 加到玻璃管內, 置於室溫 2-3 小時, 待其凝固。

C. Running buffer

上層: 20 mM NaOH, 0.8 g NaOH 溶於 1 公升去離子水, 下層: 10 mM phosphoric acid, 1.8 ml phosphoric acid 溶於 2.6 公升去離子水。使用前先 degas。

D. 檢體(purified capsid particle)的處理

取 10 μg 純化的 capsid particle 置於 1.5 ml 離心管，加入 0.057 g urea 及 5 μl 2-mecaptoethanol，補二次水至總體積為 95 μl ，於 100 °C 熱水中煮沸 2 分鐘，室溫兩分鐘，再加 5 μl pH 3-10 Ampholyte。

E. Isoelectrofocusing (IEF) 電泳

裝好 IEF 電泳裝置後，將檢體加到玻璃管的 gel 上，其上再置 10 μl overlay buffer (0.48 g urea, 20 μl pH 3-10 Ampholyte, 0.975 ml H₂O, urea 溶解之後過濾，再加入 Ampholyte)，最後以上層鹼性緩衝液填滿剩餘空間，不能破壞分層。跑 1D 電泳，先以 200 V 的電壓跑 1 小時後，再將電壓升至 500 V 繼續跑 1 小時，然後 700 V 跑 14 小時，接著以 800 V 的電壓跑 1 小時，最後升高電壓至 1000 V 跑 3 小時。

2D : SDS-PAGE

1D 的 IEF 分離好之後，再將 gel 從玻璃管擠出來，放在 equilibration buffer (其成分為：2.3 g SDS, 5 ml 2-ME, 10 ml glycerol, 0.75 g Tris, 85 ml H₂O。共 100 ml pH 6.8)，待其平衡 (20 分鐘，兩次)，再轉移到 SDS-PAGE 膠體上方，以 1% low melting agarose 封膠，然後以 200 V 的電壓跑 5 小時。VP1 subspecies 的鑑定採用西方墨點法。西方墨點法參照前面敘述，也就是將蛋白質轉印到 nitrocellulose paper，再用抗體確認，以 DAB 呈色。

螯合劑(EGTA)及還原劑(DTT)對 capsid 穩定度的影響

7 μg (50 μl) 由 10-30% sucrose gradient 純化的 VP1 capsid，單獨加入 (1) 10 mM EGTA (ethyleneglycol-bis-N, N'-tetraacetic acid) (Promega, USA) 或 (2) 3 mM DTT (dithiothreitol) (Promega, USA)，或 (3) 同時加入 10 mM EGTA 及 3 mM DTT 混合均勻，置於室溫，分別於室溫 1 小時，3 小時，5 小時測定血液凝集活性(HA)。

螯合劑(EGTA)及還原劑(DTT)對再組合殼體(reassembled capsid)穩定度的影響

由前面實驗已知 EGTA 及 DTT 同時存在會使 capsid 瓦解為 capsomere，即完全失去血液凝集的活性(HA)。為了瞭解螯合劑 EGTA 及還原劑 DTT 對再組合 capsid 穩定度的影響，把經過 EGTA 及 DTT 瓦解的 capsid (即 capsomere)，加入 20% DMSO 終止反應，然後利用 reassemble buffer (其成份為：130 mM NaCl, 10% DMSO, 0.5 mM CaCl₂, 0.01% Triton X-100) 把 capsomere 再組裝為 capsid，於 4 °C，置隔夜，然後測 HA。如果 capsid 重新組裝回來，再分別加入 10 mM EGTA 或 3 mM DTT，於室溫作用 5 小時，測其 HA。

螯合劑(EGTA)及還原劑(DTT)使 capsid 瓦解的順序性

取二支 1.5 ml 離心管，編號為 A, B，分別在兩管中各加入 7 μg (50 μl) 純化的 capsid，於 A 管中的 capsid，先加入 3 mM DTT，破壞雙硫鍵，然後透析在 TBS

buffer(pH7.5)中，4 °C，隔夜，測 HA，第二天，加入 10 mM EGTA 置室溫 5 小時，測 HA。B 管的 capsid 則先處理 10 mM EGTA，抓走鈣離子，同樣透析在 TBS buffer，4 °C，隔夜，測 HA，加入 3 mM DTT，置室溫 5 小時，測 HA。

利用 non-reducing SDS-PAGE 及 Western blot 偵測 VP1 capsid 雙硫鍵的鍵結

經過 10-30%蔗糖梯度離心純化的 VP1 capsid，各取 7 μ g，分別加入含有還原劑及不含還原劑的 2 倍 SDS sample buffer，100 °C 沸騰的熱水中煮沸 10 分鐘，然後跑 7% SDS-PAGE，150 V，1 小時，接著轉印到 nitrocellulose paper 上，110 mA，40 分鐘，用 anti-JCV VP1 抗体做 Western blot 確認。

還原劑 DTT 對殼體雙硫鍵鍵結的影響

7 μ g 純化的 VP1 capsid，加入終濃度為 3 mM DTT，置室溫 3 小時，然後透析於 TBS 緩衝液，移去作用完的 DTT，於 4 °C 隔夜。然後跑 7% SDS-PAGE，150 V，1 小時，接著轉印到 nitrocellulose paper 上，110 mA，40 分鐘，用 anti-JCV VP1 抗体做 Western blot 確認。

氧化劑 diamide 對 VP1 capsid 及 capsomere 的雙硫鍵鍵結的影響

純化的 capsid 7 μ g (50 μ l)及 3 mM DTT、10 mM EGTA 處理後完全解離的 capsomere(HA=0)，兩者分別處理或不處理 0.5 mM diamide，然後透析在 TBS buffer(pH 7.5)，於 4 °C 隔夜。接著跑 7% non-reducing SDS-PAGE gel。用 anti-JCV VP1 抗体做 Western blot 確認。

利用 2-step PCR 做 C1~C6 的定位點突變(site-directed mutagenesis)

(1)step 1 PCR

取 1 μ l JCV1/pSG5 當模板(template)，加入 5 μ l 10 倍 Taq buffer，5 μ l 材料 dNTP，2 μ l JCV1S1G primer 1，及分別 2 μ l 的 JCV1 C1AS，C2AS，C3AS，C4AS，C5AS，C6AS 的 primer 2，1 μ l Taq polymerase(Promega，USA)及補 34 μ l 滅過菌的二次水至總體積為 50 μ l，上面覆蓋 30 μ l 礦物油，由 N 端做出包含 C1~C6 6 個位於 antisense 這一股的突變片段，分別為 134，249，301，607，750 及 786 bps 的 DNA 片段。另外一管則取 1 μ l JCV1/pSG5 為模板，加入 5 μ l 10X Taq buffer，5 μ l dNTP，2 μ l JCV1S1G primer 1 及分別 2 μ l JCV1 C1S，C2S，C3S，C4S，C5S，C6S 的 primer 2，1 μ l Taq polymerase，然後加入 34 μ l 滅過菌的二次水至總體積為 50 μ l，上面覆蓋 30 μ l 礦物油，由 C 端做出包含 C1~C6 6 個位於 sense 這一股的突變片段，分別為 951，835，783，477，366，297 bps 的 DNA 片段。接著跑 PCR，95 °C，3 分鐘 1 個循環及 95 °C，1 分鐘，denature；55 °C，1 分鐘，annealing；72 °C，2 分鐘，extension，共 30 個循環，然後 72 °C，3 分鐘，1 個循環。然後，以 1% agarose 電泳確定這個 PCR 產物。

(2)step 2 PCR：

接著取出各 0.5 μ l (10 ng) 由 step 1 PCR 做出的 N 端突變產物，命名為 C1AS, C2AS, C3AS, C4AS, C5AS, C6AS 及各 0.5 μ l (10 ng) C 端突變產物，命名為 C1S, C2S, C3S, C4S, C5S, C6S, 加入 5 μ l 10X Taq buffer, 及 4 μ l dNTP, 然後加入 2 μ l JCV1S1G primer 1, 2 μ l JCV1AS1G primer 2, 1 μ l Taq polymerase, 加二次水至總體 50 μ l, 上層覆蓋 30 μ l 礦物油。跑 PCR, 95 $^{\circ}$ C, 3 分鐘, 1 個循環之後, 95 $^{\circ}$ C, 1 分鐘, denature; 55 $^{\circ}$ C, 15 分鐘使 N 端, C 端突變點 annealing; 72 $^{\circ}$ C, 2 分鐘, extension, 共 10 個循環。接著跑正常 PCR, 95 $^{\circ}$ C, 1 分鐘; 55 $^{\circ}$ C, 1 分鐘, 72 $^{\circ}$ C, 2 分鐘, 20 個循環。

構築 pFX7 plasmid

(1) 設計聚合酶引子(primer)

為了得到完整的不含 JCVP1 基因的 pFX7 質體, 我們由 VP1 的兩端設計兩條 primer PFXAS SPE: GTT GGG GCC ATT ATA CTA GTG ATG TTT T 及 PFXS SPE: CTG TAA GGA TCC ACT AGT GTC GAC CTG CAG G, 利用 PCR 技術由 VP1 兩端反方向增幅 pFX7 基因。

(2) 聚合酶連鎖反應(PCR)

取 0.5 μ l 由 Mini-M plasmid DNA Miniprep kit (Viogenic, Taiwan) 抽出的 pFX7-JCVP1 DNA 當模板, 加入 5 μ l 10 倍稀釋的低鹽緩衝液, 4 μ l 的材料 dNTP, 及各 1 μ l 終濃度為 20 pmol 的兩股引子 pFXS SPE 及 pFXAS SPE, 然後加入 1 μ l 具有校正功能的聚合酶(Taq plus Long polymerase, Stratagene, USA)及 37.5 μ l 滅過菌的二次水, 混合均勻後, 覆蓋一層 30 μ l 的礦物油, 進行基因增幅。95 $^{\circ}$ C, 1 分鐘, 一個循環; 再 95 $^{\circ}$ C, 30 秒, denature; 60 $^{\circ}$ C, 1 分鐘, annealing 及 72 $^{\circ}$ C, 5 分鐘, extension。共 40 個循環。然後跑 1% 瓊脂膠電泳分析。

(3) 轉殖 pFX7 到 E.Coli 細胞

由 PCR 放大出來的 pFX7 片段, 利用 gel extraction kit (Viogenic, Taiwan) 純化出約 7.5 kb 的 pFX7 產物片段, 取出 42 μ l, 加入 3 μ l SPE I 及 5 μ l 10 倍緩衝液, 混合均勻後, 於 37 $^{\circ}$ C, 反應 3 小時。然後 50 μ l 帶有 SPE I linker 的 DNA, 加入 4 μ l ligase 及 6 μ l 10X ligase buffer, 於 16 $^{\circ}$ C, 隔夜, 進行 self-ligation。第二天, 取 150 μ l 新鮮製備的 competent cells 加到 15 μ l pFX7 ligate, 在冰上反應 30 分鐘, 接著進行熱休克 3 分鐘, 馬上放到冰上 5 分鐘, 然後加入 200 μ l LB, 於 37 $^{\circ}$ C 1 小時, 使菌體先活躍, 接著塗在含有 Ampicillin (100 μ g/100 ml) 的平板培養基上, 37 $^{\circ}$ C 培養箱中隔夜。以自動定序儀確定 DNA 的核苷酸序列。

(4) pFX7 DNA 定序

A. PCR

取 pFX7 DNA 10 μ l (0.5 μ g), 加入 1 μ l primer (5 pmol), 及 8 μ l A.T.G.C 反

應混合物，混合均勻後，跑聚合酶連鎖反應(PCR)，96 °C，10 秒，denature；接著 50 °C，5 秒 annealing；60 °C，4 分鐘，extension。共 25 個循環。然後放於 4 °C，使其終止反應。

B. 製作 sequencing gel：

sequencing gel 的成分為：18 g 4 M urea，5 ml 40% acrylamide 及 20 ml 二次水，混合均勻後，用 0.2 μ m cellulose nitrate filter 過濾，並 degas 5 分鐘，然後加入無菌的 5x TBE 緩衝液，最後補二次水至總體積 50 ml，再加入 250-300 μ l 10% ammonium persulfate 及 35 μ l TEMED 製成 sequencing gel，置於室溫，約 3 小時。

C. 檢體的處理：

在 1.5 ml 離心管中，先加入 2 μ l 3 M NaOAc (pH 4.6-5)，再加入已完成 PCR 的混合物，均勻混合，加入 55 μ l 95% 酒精，混合均勻，置於 -20 °C，15 分鐘，沈澱混合物，然後離心，12,000 rpm，10 分鐘，接著輕吸掉上層液，加入 250 μ l 75% 酒精，上下混合幾次，離心 12,000 rpm，3 分鐘，移去酒精，於 speed-Vac 乾燥混合物加入 3-5 μ l loading buffer[(成分為：5 份的 Formamide 及 1 份的 Blue dextran (50 mM EDTA 及 50 mg blue dextran)]，混合均勻後，於 100 °C 沸水中煮沸 2 分鐘，置於冰上 5 分鐘，便 loading 於 sequencing gel，以自動定序儀(ABI, USA)定序。

結果

確定 pFX7-JCVP1 質體 DNA

我們收到由立陶宛的 Kestas Sasnauskas 教授所構築的 pFX7-JCVP1 後，得知他們所構築的重組質體 DNA 是 8.6 kbs，於是我們利用 restriction mapping 再次確定它的長度。於 1% agarose 電泳可看到沒有經過限制酶切的 circular form pFX7-JCVP1，約 5 kb (圖 1，Lane 1)，用 *SacI* 切一刀可見 8.6 kb 的 linear form (圖 1，Lane 2)。把 pFX7-JCVP1 轉殖(transformation)到酵母菌(INVSC1)後，抽取轉殖的質體 DNA (pFX7-JCVP1)，用 PCR 放大 VP1 的基因(1,065 bps)，確定 VP1 DNA 存在 (圖 1，Lane 3)，而抽取的 pFX7-JCVP1 轉殖到 *E.coli* 後，抽取質體 DNA，再利用 restriction mapping 確定與轉殖前是否一樣，結果於 1% agarose 上看到 pFX7-JCVP1 未切型式(圖 1，Lane 4)，及用 *SacI* 切一刀為 8.6 kb (圖 1，Lane 5)，與未轉殖前的大小相同。

敏感性實驗：

為了了解轉殖酵母菌 INVSC1 的 pFX7-JCV1，對 formaldehyde 的敏感性及 JCVP1 蛋白質的表達情形。我們在轉殖(transformation)的過程中，利用選擇性的 YPD 平板培養基，分別含有 30, 40, 50, 70, 90 μ l/100 ml 的 formaldehyde 來篩選轉殖的菌落。發現在 30, 40, 50, 70, 90 μ l/100 ml formaldehyde 的濃度下，菌落均可生長。而分別挑選單一菌落去測試 galactose 誘發 JCV VP1 蛋白質表達的情形，發現在這些 formaldehyde 濃度下，都有表達 JCV VP1 蛋白質(圖 2，Lane 3~7)。而在愈高濃度，菌落生長愈慢，且蛋白質表達量也愈低，所以，我們以 30 μ l/100 ml formaldehyde 為日後培養的選擇性濃度。

測定酵母菌生長曲線

為了瞭解酵母菌(INVSC1)的生長狀況做為誘發(induction) JCV VP1 蛋白表達的最佳時間點的參考，INVSC1 於 YPD 培養基培養，每 4 小時測定其吸光密度(OD_{600})做為生長指標，結果發現第 12 小時約為 mid-log phase，第 20 小時約為 stationary phase (圖 3)。因此，VP1 表達的 induction 時間選定在第 12 小時。

JCV VP1 蛋白質在酵母菌細胞不同時間點的表達情形

為了瞭解酵母菌不同時間表達 VP1 蛋白質的情形，我們以 Western blot 測定蛋白質表達的 time course，分別在 galactose induction 後，每 4 小時收集 1.5 ml 菌液，一直到 72 小時，以 30 μ g /lane 的蛋白質濃度，以 12.5% SDS-PAGE 分析，再轉印到 nitrocellulose paper 上，再用 anti-JCV VP1 的抗體做 Western blot 分析。結果，發現在 42 kd 左右有明顯的 JCVP1 蛋白質出現，約在 24 小時達到最大量 (圖 4，Lane 7)。以後持平產量。所以，我們日後 induction JCVP1 蛋白質表達，至少

以 24 小時為主。

JCV VP1 蛋白質在酵母菌細胞表達後之血液凝集活性(HA)

鼠類 polyomavirus VP1 在昆蟲細胞表達可形成殼體 (41)。人類 JCV VP1 在昆蟲細胞(9)及 *E.coli*(44)表達也會自己組合成殼體並可導致血液凝集現象(9、44)。因此我們以血液凝集試驗來初步證實 JCV VP1 是否在酵母菌細胞內自組殼體。JCV VP1/INVSC1 在酵母菌細胞表達 24 小時之後，收集細胞，溶於溶解緩衝液破細胞，以連續稀釋法測定蛋白質血液凝集活性。發現表達 JCV VP1 的酵母菌細胞液 (lysate) 有 20×2^{11} hemagglutination activity (HA)，而未表達 JCV VP1 的酵母菌細胞液則不具血液凝集特性 (表 1)。此實驗初步證明 JCV VP1 在酵母菌細胞內可自組為殼體。

JCV VP1 蛋白質的純化

由 HA 證實 JCV VP1 在酵母菌細胞內可能可自組為殼體。完整病毒顆粒 (virion) 密度為 1.34 g/cm^3 ，空殼顆粒 (empty capsid) 密度為 1.29 g/cm^3 (44)，而一般蛋白質的密度為 1.25 g/cm^3 ，所以我們利用此特性以 CsCl 超高速離心純化 JCV VP1 蛋白質。CsCl 密度梯度離心之後，以約 200 μl 為一 fraction，測定每管血液凝集特性、蛋白質密度、SDS-PAGE 及 Western blot。從血液凝集特性可見到 fraction 12 及 15 有兩個 HA 活性高峰，約分別分佈於密度 1.34 g/cm^3 及 1.29 g/cm^3 之處 (圖 5)。從 Western blot 上也可發現 fraction 12 及 15 確實含有兩個高峰的 VP1 蛋白質分佈 (圖 6)。以這些結果推測，純化出的 VP1 可能含有空殼顆粒 (empty capsid-like particle)，即密度 1.29 g/cm^3 部分及密度 1.34 g/cm^3 部分的完整病毒顆粒 (virion-like particle) 兩部分蛋白質。所以，接著我們收集密度 1.36 至 1.32 含 1.34 g/cm^3 (peak 1) (圖 5) 這部分蛋白質從 fraction 3 到 fraction 13 及密度 1.32 至 1.26 含 1.29 g/cm^3 (peak 2) (圖 5) 這部分蛋白質從 fraction 14 到 fraction 30，分別以 10-30% 蔗糖梯度離心之後，每 200 μl 為一 fraction 測定其 HA 並以 SDS-PAGE 分析蛋白質純度。由 HA 測定發現 peak 1 這部分蛋白質在 fraction 18 有活性高峰，而 peak 2 這部分蛋白質在 fraction 21 有活性高峰 (圖 7)。從 SDS-PAGE 可看到分別在 fraction 18 及 fraction 21 有高純度的 virion-like (圖 8A) 及 empty capsid-like (圖 8B) 的 VP1 蛋白質高峰分佈。推測可能因為 virion-like 及 empty capsid-like particle 分別在 240 S 及 170 S 不同的沉降係數而使得 virion-like particle peak 往前 shift。

JCV VP1 蛋白質組成殼體的穿透式電子顯微鏡圖

為了更進一步證實 virion-like particle 及 empty capsid-like particle 的存在，我們利用 uranyl acetate 陰染 (negative stain) 在穿透式電子顯微下觀察純化的 VP1 殼體形態。結果可見內部為實心，含核酸的病毒顆粒 (virion-like particle)，大小約為 45 nm (圖 9A) 及空殼顆粒 (empty capsid-like)，亦即沒有包裹核酸 (圖 9B) 的兩種殼體形態。

病毒顆粒 (virion-like particle) 核酸的萃取

我們實驗室已在原核細胞(*E. coli*)中發現, virion-like particle 可以包裹 DNA(44), 我們預測真核酵母菌細胞也有類似情形。為了分析酵母菌內組裝的 virion-like particle 是否包裹核酸, 在密度 1.34 g/cm^3 的 virion-like 這一部分純化的蛋白質, 用 DNase I 及 RNase A 處理任何可能殘留在病毒顆粒外面的核酸後, 用 leader phenol 萃取病毒顆粒內的核酸, 發現其內含有約 20 kb 及一些小於 2 kb 的核酸(圖 10, Lane 1)。為了證明這些核酸為 RNA 或 DNA 分子, 用 DNase I 處理後, 20 kb 分子消失了(圖 10, Lane 2); 用 RNase A 處理後, 2 kb 分子消失(圖 10, Lane 3), 顯示, 20 kb 的分子為 DNA, 小分子的則為 RNA。接著, 為了瞭解 pFX7-JCVP1 是否也被包裝在殼體內, 因而以 PCR 偵測此萃取物, 結果發現 JCVP1 DNA 確實存在(圖 10, Lane 4)。這表示在酵母菌內 JCV VP1 組裝成病毒顆粒也同時包裝 pFX7-JCVP1 plasmid DNA。

利用假病毒殼體(pseudocapsid particle)攜帶外生性 DNA 到人類細胞

為了證明在酵母菌組裝的 JCV VP1 capsid 可用來運送 DNA 進入人類細胞, 我們利用純化的 pseudocapsid particle 藉 osmotic shock 方法包裝螢光蛋白基因的質體 DNA(pGFP-C1), 然後感染人類胎兒腎臟細胞(293 細胞)。細胞感染 60 小時後, 在 UV 顯微鏡下可見螢光蛋白質的表現(圖 11B)。這表示假病毒殼體(pseudocapsid particle)能夠攜帶含螢光蛋白基因的質體 DNA 到人類 293 細胞, 然後在細胞內表達螢光蛋白質。而單獨只用 pGFP-C1 質體 DNA 而不含 pseudocapsid particle 的實驗對照組去感染細胞, 則沒有看到任何螢光蛋白質出現在 293 細胞中(圖 11A)。

Two dimensional gel 分析

鼠類 polyoma 病毒顆粒 VP1 species 有 6 種 (2), 但 Forstova 等人 (24) 發現在昆蟲細胞表達的 polyoma VP1 species 為 10 種。Montross 等人 (41) 發現 polyoma VP1 在昆蟲細胞中有三種 species。在我們實驗中發現原核 *E. coli* 表達的人類 JCV VP1 約有 7 種(圖 12A), 昆蟲細胞所表達的人類 JCV VP1 約有 6 種(圖 12B)。由酵母菌表達的人類 JCV VP1 約有 6 種 species (圖 12 C)。

EGTA 及 DTT 對 VP1 殼體穩定性的影響

由鼠類 polyomavirus、SV40 及 JCV 研究得知, 雙硫鍵及鈣離子對病毒顆粒的完整性扮演重要角色(5、6、9、20、66)。為了瞭解人類 JCV VP1 殼體的穩定性, 我們以螯合劑(EGTA, 移除 Ca^{2+})及還原劑(DTT, 使雙硫鍵 $\sim\text{S}\sim\text{S}\sim$ 變為硫氫基 $\sim\text{SH}$) 同時處理 capsid, 在室溫 5 小時, 結果發現可使形成殼體的 VP1 蛋白質解離而失去 HA 活性(圖 13)。而單獨處理 EGTA 或 DTT 的情況, 室溫 1 小時, 3 小時, 5 小時, 血液凝集的特性仍存在(圖 13), 即尚保持殼體的完整性。

還原劑或螯合劑對重新組合 capsid 的影響

由上個實驗得知 EGTA 及 DTT 必須同時存在, 才能使 capsid 解離為 capsomere。因此, 我們懷疑雙硫鍵具有保護金屬離子的功能。如果雙硫鍵具有保護

金屬離子被移去的作用，則在 reassembled VP1 殼體因缺乏雙硫鍵形成，只要 EGTA 存在應就可使其解離成 capsomere。因此我們把 capsomere 加入 Ca^{2+} 後，使其重新組合成 capsid 再分別加入 EGTA 或 DTT，結果發現只要單獨 EGTA 就可以使 capsid 完全解離失去 HA，而單獨 DTT 並無法使 capsid 解離(圖 14)。以此結果推論 Ca^{2+} 為殼體組裝(assembly)所必需而雙硫鍵可能扮演保護 Ca^{2+} 被螯合的角色。

還原劑或螯合劑處理 capsid 的順序性對 capsid 穩定度的影響

為了確定雙硫鍵具有保護金屬離子的功能，我們把 capsid 先處理 DTT 破壞雙硫鍵後，以透析去除 DTT，再加入 EGTA，結果發現 capsid 完全瓦解為 capsomere，失去血液凝集活性(圖 15)。因為此時 capsid 中的 Ca^{2+} 沒有雙硫鍵保護，所以加入 EGTA 後便解離為 capsomere。而相反地，先加入 EGTA 作用 capsid 後，以透析去除 EGTA，此時 Ca^{2+} 仍有雙硫鍵保護而且單獨 EGTA 不會破壞 capsid 完整性，所以隨後加入 DTT 破壞雙硫鍵依然保持 capsid 完整結構及 HA 活性(圖 15)。因此，我們推論雙硫鍵應具有保護金屬離子的功能。

利用 non-reducing SDS-PAGE gel 偵測 capsid 雙硫鍵的鍵結

為了分析雙硫鍵在 capsid 組裝中的存在性，我們利用 reducing SDS-PAGE 及 non-reducing gel 觀察雙硫鍵是否存在。結果我們發現 VP1 在 reducing gel 含 2-mercapto-ethanol 只見約 42 kDa 的 monomer(圖 16, Lane 1)。而在 non-reducing gel 則出現 3 種 monomer isoforms(約 42, 43 及 48 kDa)、dimer(約 85 kDa)和少數 trimer(約 120 kDa)(圖 17, Lane 2)。這些 monomer isoforms、dimer 及 trimer 的形成只發現於 non-reducing gel，可見 JCV 殼體內確時存在雙硫鍵。經過密度分析儀(densitometry)分析，它們各占 VP1 分子的 45%，40%及 15%。

還原劑 DTT 對殼體雙硫鍵鍵結的影響

以上的實驗證實 JCV VP1 殼體內的雙硫鍵會受 2-mercapto-ethanol 破壞形成 monomer，為了更進一步證實 DTT 也有相同的功能。我們以 DTT 處理 capsid，以 non-reducing gel 分析，結果發現 dimer，trimer 都不見了，只剩 monomer(圖 17, Lane 2)。因此，確定 DTT 確實可以破壞 capsid 內的雙硫鍵但 capsid 仍保有完整性(圖 13)。

DTT 處理 JCV VP1 殼體後的電顯圖

在 papillomavirus L1 殼體發現當 DTT 處理 L1 殼體會使得殼體構造膨脹，而此膨脹的殼體可能是 capsomere 的前身產物(37)。在我們實驗中以 DTT 處理 JCV VP1 殼體後以電子顯微鏡觀查其外形。結果發現殼體受 DTT 處理後並沒有瓦解成 capsomere 但呈現少許膨脹(約 46 nm)(圖 18B)。沒有 DTT 處理的 capsid 約為 44 nm (圖 18A)。

利用 non-reducing gel 偵測 capsomere 是否存在雙硫鍵

SV40 的三度空間結晶體構造指出：在 VP1 capsomere 或 capsid 的層次，並沒有看到雙硫鍵(39)。為了更進一步探討 JCV VP1 capsomere 是否存在雙硫鍵，我們以 EGTA 及 DTT 同時處理 capsid，使其瓦解為 capsomere，然後利用 non-reducing gel 觀察是否出現雙硫鍵的連結。結果只見 VP1 monomer(圖 19, Lane 2)。可見 capsomere 並無雙硫鍵存在，以此推論 capsid 內的雙硫鍵是存在 capsomere 與 capsomere 之間。

氧化劑 diamide 對 VP1 capsid 及 capsomere 的雙硫鍵的影響

diamide 是一種強氧化劑，它會使蛋白質的巰基(S⁻)氧化為雙硫鍵(~S-S~)(41b)，因此，我們利用它來觀察 capsid 內的 VP1 monomer 是否因純化過程受到氧化而形成，以及已經失去雙硫鍵的 capsomere，是否會透過 diamine 而使雙硫鍵再形成。結果發現 diamide 處理 capsid 對雙硫鍵幾乎沒有影響，依然存在 monomer、dimer 及 trimer(圖 20, Lane 2)。處理 diamide 的 capsomere 則使部分的雙硫鍵再形成，使 monomer 減少而 dimer、trimer 增加(圖 20, Lane 4)。

JCV VP1 cysteine 突變蛋白質在 *E.coli* 表達情形

為了探討人類 JCV 主要殼體蛋白 VP1 中形成雙硫鍵的氨基酸(cysteine)對病毒殼體組裝的影響，我們參考以 SV40 VP1 晶體結構(39)所模擬的台灣三號(43)JCV VP1 cysteine 所在位子(圖 21)，設計 PCR primer (表 2)，利用定位點突變把 VP1 分子中 6 個 cysteine (第 41 個 cysteine codon TGC；第 80 個 cysteine codon TGT；第 97 個 cysteine codon TGT；第 200 個 cysteine codon TGT；第 247 個 cysteine codon TGC 及第 260 個 cysteine codon TGT)突變為 glycine(第 41 個 codon GGC/命名為 C1；第 80 個 codon GGT/命名為 C2；第 97 個 codon GGT/命名為 C3；第 200 個 codon GGT/命名為 C4；第 247 個 codon GGC/命名為 C5 及第 260 個 codon GGT/命名為 C6)。本實驗的 PCR 定位點突變，是由以前實驗室助理賴瑞芬完成。經由選殖 C1 至 C6 到原核 *E.coli* ΔpFlag 表達系統測定這些蛋白質表達情形。表達後的 C1 至 C6 total lysate，以 14,000 rpm 離心分開 supernatant 及 pellet，分別以 12.5% SDS-PAGE 分析，再轉印到 nitrocellulose paper 上再以 anti-JCV VP1 抗体確認。發現 C1 至 C6 蛋白質在 *E.coli* 中都大量表現(圖 22 C1 至 C6 total lysate:T)，而大多蛋白質都沈澱到 pellet 中(圖 22 C1 至 C6 pellet:P)，在 supernatant 部分則只有看到少量蛋白質(圖 22 C1 至 C6 supernatant:S)，可見 C1 至 C6 在 *E.coli* 系統是不溶的，同時無法偵測到血液凝集活性(HA)，所以我們企圖改以 yeast 表達系統做為繼續研究的材料。

C1 至 C6 突變(cysteine→glycine)定序

為了確定 C1 至 C6 突變株經由 PCR 定位點突變的正確性，我們以幾個短片段 primer 讀這些突變區域。以 JCV1 AS6 primer(ACA TGT GGA TCC TTA **CAT GAG TAT ATT TCC**，位於 VP1 的 306-292 核苷酸序列)讀在 VP1 第 124 核苷酸突變(T 變 G)的 C1 及第 238 核苷酸突變(T 變 G)的 C2；JCV1 AS5 primer(ACA TGT GGA TCC TTA **TAA AGC CTC CCC CCC**，位於 VP1 的 456-442 核苷酸序列)讀第 288

核甘酸突變(T 變 G)的 C3；JCV1 AS3 primer(ACA TGT GGA TCC TTA TAA GTT GTC ACC TTT，位於 VP1 的 753-742 核甘酸序列)讀第 597 核甘酸突變(T 變 G)的 C4；JCV1 AS2 primer(ACA TGT GGA TCC TTA AAT TAA ATC AGT AAG，位於 VP1 的 904-891 核甘酸序列)讀第 739 核甘酸突變(T 變 G)的 C5 及第 778 核甘酸突變(T 變 G)的 C6。結果確定這些點突變無誤(圖 23)。C1 至 C6 突變株便用於分子選殖。

pFX7-JCVP1 定序

由於 JCVP1 可藉由 pFX7 plasmid 在酵母菌中大量表達並自我組裝成殼體(圖 4 至 9)，因此我們想將 VP1 cysteine 突變株轉殖至 pFX7 並在酵母菌中表達。但我們不知道 pFX7 DNA 核甘酸序列，所以我們先利用 JCV1AS7 primer (Table 3)，讀出 VP1 5' 端與 PYK1 基因連接處。AS7 primer 讀出 VP1 5' 端與 PYK1 基因的 extra base 366 至 385 核甘酸序列及 PYK1 基因的 386 至 660 核甘酸序列[(相對於基因庫 (Genebank) 中 PYK1 基因 accession No. VO1321、JO1348 的核甘酸 636 至 905)] 及 GAL10 基因的 1 至 365 核甘酸序列(相當於基因庫中 GAL10 基因 accession No. KO21152 的 662 至 298 核甘酸序列)。接著，我們再由 GAL10 核甘酸序列上設計 PFXAS1 primer (Table 3)，此 primer 讀出 GAL10 連接到 pUC19 的 7,577 至 7,116 核甘酸序列(相當於基因庫中 pUC19 基因 accession No. L09137、X02514 的核甘酸 428 至 945)，然後，以 pUC19 的 7,577 至 7,116 核甘酸序列為 template 到基因庫 blast 程式去做基因比對(alignment)，得到 pUC19 的 7,575 至 4,925 核甘酸序列(相當於基因庫 pUC19 accession No. LO9137、XO2514 的 2,668 至 428，396 至 1 核甘酸序列)。然後以 pUC19 核甘酸序列設計 PFXS3 primer (Table 3)，繼續讀 pUC19 連接到 FDH1 基因的 extra base 4,924 至 4,848 及 FDH1 的 4,847 至 4,298 核甘酸序列(相當於基因庫 FDH1 accession No. M 58332 的 11 至 560 核甘酸序列)。另外，以 JVC C6S primer (Table 3)讀 VP1 3' 端與 PGK1 基因連接處，C6S primer 讀出 VP1 3' 端到 PGK1 基因的 extra base 從 662 至 764 及 PGK1 基因的 765 至 1,135 核甘酸序列(相當於基因庫 PGK1 基因 accession No. JO1342 的 1,455 至 1,828 核甘酸序列)。接著從 PGK1 基因設計 PFXS1 primer 讀 PGK1 連接到 2 μ 基因，包括 extra base 2,896 至 2,881 核甘酸序列，及 2,880-2,444 的 2 μ 基因核甘酸序列(相當於基因庫 2 μ 基因 accession No. JO1347、VO1323 的 4,311 至 3,875 核甘酸序列)，繼續以此段 DNA 序列設計 PFXS4 primer 讀出 2 μ 的 2,443 至 1,775 核甘酸序列(相當於基因庫 2 μ 基因 accession No. JO1347、VO1323 的 3,874 至 3,206 核甘酸序列)，接著再繼續設計 PFXS5 primer 讀 2 μ 的 1,774-1,136 核甘酸序列及 FDH1 基因的 2,897 至 3,355 核甘酸序列(相當於基因庫中 FDH1 基因 accession No. M 58332 的 1,968 至 1,510 核甘酸序列)。並以此 DNA 序列到基因庫 blast 做基因比對，得到 FDH1 的 3,365 到 4,298 核甘酸序列(相當於 FDH1 基因 accession No. M58332 的 1,509 至 576 核甘酸序列)並與 PFXS3 primer 所讀出的 FDH1 4,847 至 4,298 核甘酸序列相連接。最後，以 PYK1 基因 3' 端設計 PFX AS2 primer (Table 3)，讀 PYK1 基因與 PGK1 基因連接處。確定無誤後便彙集不含 JCVP1 的全部 pFX7 核甘酸序列，以 GAL10 基因的第一個核甘酸為起始密碼，共 365 個核甘酸(1-365 bps)，接著 PYK1 基因包括 extra base 共 296 個核甘酸(366 至 661 bps)，PGK1 基因包括 extra base

共 474 核苷酸(662 至 1,135 bps), 2 μ 基因包括 extra base 共 1,761 個核苷酸(1,136 至 2,896 bps), FDH1 基因包括 extra base 共 2,028 個核苷酸(2,897 至 4,924 bps), pUC19 基因包括 extra base 共 2,653 個核苷酸(4,925 至 7,577), 全長 pFX7 共 7,577 個核苷酸。然後以電腦程式(Strider)編排全部核苷酸序列(圖 24)及 restriction enzyme 所切的切點(圖 25), 並繪出其 genome map(圖 27)。

pFX7 表達質體的製備

因為 VP1 cystein 突變蛋白質在 *E.coli* 的 Δ pFlag 表達系統不溶, 所以我們以 PCR 構築在酵母菌系統表現的 pFX7 質體。利用已完成定序的 pFX7-JCVP1 核苷酸序列在 VP1 的兩端設計 primer(PFXSSPE 及 PFXASSPE), 以 pFX7-JCVP1 為 template 反方向增幅 pFX7。PCR 產物以 0.7% agarose gel 分析 DNA 片段大小。結果發現在約 7.6 Kb 之處有 DNA 片段存在(圖 26, Lane 2)。以 agarose 萃取 7.6 Kb 的產物, 以 SPE I digestion 及 self-ligation, 然後轉殖到 *E.coli*。以 miniprep 萃取轉殖後的 pFX7 質體, 利用 restriction mapping 確定其大小, 以 0.7% agarose gel 電泳分析。可見未切的 circular form 約 5 Kb(圖 26, Lane 3), 以 SPE I 切出 7.6 Kb 的 DNA 片段(圖 26, Lane 4), EcoR I 切出 4,828、2,380 及 369 bp 三段 DNA 片段(圖 26, Lane 5)。確定其大小無誤後, 便企圖以此 plasmid 在酵母菌系統表達 VP1 cysteine 突變蛋白。

討論

過去鼠類多瘤性病毒的研究(5、27、52)發現在還原劑及螯合劑同時存在，才能使 capsid 解離成 capsomere。在我們實驗室藉由電子顯微鏡觀察，也確定同時加入 EGTA 及 DTT 會使人類多瘤性病毒 JCV capsid 失去血液凝集活性，是因解離成 capsomere 所致(圖 13)。但單獨加入 EGTA 或 DTT 並不會破壞病毒殼體(5、27、52)。capsomere 加入二價金屬離子 Ca^{2+} ，會使部分血液凝集活性恢復。而有趣的是，若在此時，只單獨加入 EGTA，就會使血液凝集活性完全尚失(圖 14)。因為，加入 Ca^{2+} 而恢復血液凝集，亦即恢復 capsid 的結構，此時的 capsid 並沒有雙硫鍵存在，所以只要 EGTA 就可以使其解離成 capsomere。

另外，為了釐清 Ca^{2+} 及雙硫鍵在殼體穩定上所扮演的角色，我們在實驗中，先加入螯合劑(EGTA)除去 Ca^{2+} 後再以 DTT 破壞雙硫鍵，或相反的先加入 DTT 再加入 EGTA，結果發現，先用 DTT 破壞雙硫鍵，再用 EGTA 螯合 Ca^{2+} ，可使 capsid 完全瓦解為 capsomere，即失去血液凝集活性；而先加入螯合劑再破壞雙硫鍵，無法破壞病毒顆粒仍保有血液凝集活性(圖 15)。經由這些結果，我們推論二價金屬離子 Ca^{2+} 是殼體完整性所必須，而雙硫鍵則有保護殼體內的二價金屬離子被螯合劑移去的功能。

從 polyomavirus(5)及 SV40(20)的殼體穩定性試驗，証實還原劑是殼體解離所需。因此推測需要雙硫鍵幫助穩定病毒顆粒，而使這些鍵還原，則是病毒脫殼(uncoating)過程很重要的步驟之一。然而，1991年，Liddington(39)對 SV40 VP1 蛋白質所作的 X-ray 繞射三度空間結構圖，不管是在 VP1 monomer 或 pentamer 的層次並沒有看到雙硫鍵的存在。但是，他們利用 Hg 標定 cysteine 的研究中，仍証明 SV40 的 7 個 cysteine 中，有 3 個不能被 Hg 標定，推測這三個 cysteine 可能形成雙硫鍵鍵結。

此外，Ghafakhanian (29)等人研究 SV40 VP1 蛋白質，証實雙硫鍵可穩固自我組裝的 postpentameric 12S 複合物，且雙硫鍵參與在病毒組裝過程的 postpentameric 階段。Sapp 等人(56)，在昆蟲細胞中研究人類 papillomavirus 也發現其主要殼體蛋白質 L1 中的兩個 cysteine 形成 capsomere 之間雙硫鍵，約二分之一的 L1 蛋白質形成 trimer。而此 trimerization 使 capsomere 連結，對保持 papillomavirus 殼體的穩定相當重要。

在本篇研究中我們利用 non-reducing SDS-PAGE 分析人類多瘤性病毒 JCV VP1 殼體(capsid)的雙硫鍵鍵結，發現自然狀態下的 VP1 分子之間，在環境中的 SDS 存在下，出現 3 種 VP1 monomer isoforms 及 dimer 和少許 trimer(圖 16)，它們分別占全部 VP1 分子的 45%，40%及 15%，可見雙硫鍵確實存在 VP1 在殼體中，而這些 monomer 是單獨存在並非純化過程所產生(圖 20)。當我們以 DTT 破壞殼體雙硫鍵後，在 non-reducing gel 只見 VP1 monomer(圖 17, Lane 2)。同時，其電顯圖呈現少許殼體構造膨脹的現象(圖 18B)，推測可能是即將瓦解為 capsomere 的前軀構造，隨後容許 EGTA 移去鈣離子而瓦解為 capsomere。所以雙硫鍵不但可保護二價金屬離子，同時具有穩定殼體構造的功能。

當我們同時用 DTT 及 EGTA 處理 capsid，使其完全瓦解為 capsomere 後，以

non-reducing SDS-PAGE 分析，沒有出現 dimer 及 trimer(圖 19)。因此我們推論 capsomere 並沒有雙硫鍵，殼體內的雙硫鍵是存在 capsomere 與 capsomere 之間。這些 intercapsomeric 雙硫鍵鍵結使約二分之一(55%) VP1 蛋白質形成 dimer 及 trimer，藉由這些 dimerization 及 trimerization 的連結穩定 VP1 殼體的構造。另外，當我們用 diamide 處理 capsid 及 capsomere，以 non-reducing SDS-PAGE 及 HA 分析發現 capsid 內的雙硫鍵並沒有增加(圖 20, Lane 2)，而 capsomere 的雙硫鍵鍵結則部分氧化回來(圖 20, Lane 4)。推測可能殼體內的雙硫鍵鍵結是定量存在的，游離於殼體表面的硫氫基並不多，密度測定儀定量 dimer 及 trimer 約占全部 VP1 分子的一半(55%)。而 diamide 確實可使 capsomere 的雙硫鍵鍵結部分還原，這也許有利於殼體的再組合(reassembly) 效率，利用它去包裝外來 DNA 的效率或許有一些幫助。

由於 JC 病毒不容易在組織培養中得到，而且在原核細胞(*E.coli*)所表現的 VP1 突變蛋白不溶，因此我們選用酵母菌表達系統做為 JC 病毒蛋白功能的研究。為了探討雙硫鍵對病毒組裝的影響，我們得先瞭解人類多瘤性病毒 JCV VP1 在酵母菌系統是否自我組裝(self-assemble)成 capsid-like particle。於是，我們將源自於類風濕性關節炎病人尿液的 Taiwna-3 JCV VP1 結構基因(11、12、15、17、43)送到酵母菌細胞表達。由於先前我們實驗室已証實人類 JCV VP1 蛋白質可在昆蟲細胞(9)及 *E.coli*(44)中自我組裝成殼體。利用 JC virus 具有凝集人類 O 型血球的特性(46)，証實在酵母菌細胞表達的 VP1 蛋白質確定具有 HA(表 1)，所以 JCV VP1 蛋白質在 yeast 細胞內已形成 capsid-like particle。透過 CsCl 密度梯度離心發現在 yeast 細胞內形成的 VP1 殼體含有 2 個 population(圖 5)，第一個 population 位於密度 1.34 g/cm^3 部分，電顯圖呈現類似完整病毒顆粒(virion-like particle)的構造(圖 9A)，隨後萃取其內的核酸，則發現包裹著 DNA 及 RNA 分子(圖 10, Lane 1)，在鼠類 polyomavirus VP1 (31)及猴子 BLPV VP1(48)也証實這些蛋白質在昆蟲細胞表達，可以包裹 DNA 分子。而人類 JCV VP1 也被發現在 *E.coli* 中包裹 DNA 及 RNA 分子(44)。這些現象，在真核系統，包括 yeast，推測可能是這真核的 DNA 與宿主的 histone 蛋白質纏繞而形成一個 minichromosome 的構造變化。第二個 population 位於密度 1.29 g/cm^3 附近，電顯圖呈現類似空殼體(empty capsid-like particle)的構造(圖 9B)。先前鼠類 polyomavirus VP1 (23、24、31)及 SV40 VP1 (53)已被証實可在昆蟲細胞自我組裝成 capsid-like particle，其 pseudocapsid 可攜帶外生性 DNA 到哺乳類細胞中(23)。最近的研究，在 *E.coli* 自我組裝為 capsid-like particle 的人類 JCV VP1，也被証實可包裝 DNA 及攜帶外生性 DNA 到人類細胞(44)。在本研究中，我們成功地利用 pseudocapsid 攜帶可表達螢光蛋白質的質體 DNA(pEGFP-C1)到人類腎臟上皮細胞表達，也說明了在酵母菌細胞形成的 capsid-like particle 具有包裝及攜帶外生性 DNA 到人類細胞的能力，可能可運用做為基因治療的有效載體。

此外。在酵母菌細胞表達的蛋白質的修飾作用(modification)類似於哺乳類細胞的修飾作用，如磷酸化(phosphorylation)，乙醯化(acetylation)，醣化(glycosylation)等(34)。利用 2D-PAGE 分析人類 JCV VP1 蛋白質，發現在原核細胞 *E.coli* 表達的蛋白質有 7 種，昆蟲細胞表達的有 6 種，而在酵母菌細胞表達的則有 6 種。VP1 蛋白質的修飾作用可能跟病毒顆粒的組裝有關(2)。同一 polypeptide 不同的修飾，是否造成不同的生物功能，目前尚不明瞭，需更進一步分析。

參考文獻

1. Baker, T.S., Dark, J., and Bina, M. (1989) The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryoelectron microscopy of SV40. *Biophys. J.* 55:243-253.
2. Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempy, J., and Consigli, R.A. (1981) Differences in the subpopulations of the structural protein of polyoma virions and capsids: Biological functions of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37:80-91.
3. Boerman, R.H., Arnoldus, E.P.J., Rapp, A.K., Peters, A.C.B., Ter Schegget, J., and Van den Ploeg, M. (1989) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by hybridization techniques. *J. Clin. Pathol.* 42:153-161.
4. Brady, J.N., Kindal, J.D., and Consigli, R.A. (1979) In Vitro reassembly of infectious polyoma virions. *J. Virol.* 32:640-647.
5. Brady, J.N., Winston, V.D., and Consigli, R.A. (1977) Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.* 23:717-724.
6. Brady, J.N., Winston, V.D., and Consigli, R.A. (1978) Characterization of a DNA-protein complex and capsomere subunits derived from polyomavirus by treatment with ethyleneglycol-bis-N,N-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. Virol.* 27:193-204.
7. Brooks, B.R., and Walker, D.L. (1984) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.* 2:299-313.
8. Brown, P., Tsai, T., Gajdusek Am, D.C. (1975) Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin population and some unusual patterns of the world. *Am. J. Epidemiol.* 102:331-340.
9. Chang, D.C., Fung, C.Y., Ou, W.C., Chao, P.C., Li, S.Y., Wang, M.L., Huang, Y.L., Tzeng, T.Y., and Tsai, R.T. (1997) Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 78:1435-1439.
10. Chang, D.C., Haynes, J.I., Brady, J.N., and Consigli, R.A. (1992) Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 191:978-983.
11. Chang, D.C., Haynes, J.I., Brady, J.H., and Consigli, R.A. (1992) The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology.* 189:821-827.
12. Chang, D.C., Liou, Z.M., Ou, W.C., Wang, K.Z., Wang, M.L., Fung, C.Y., Tsai, R.T. (1996) Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid

protein VP1. *J. Virol. Meth.* 59:177-187.

13. Chang, D.C., Ou, W.C., Liao, K.K., Wang, M.L., and Fung, C.Y. (1996) Cloning, expressing and purification of the recombinant polyomavirus VP1 and characterization of its DNA binding domain. *Chu. Shan Med. J.* 7:1-12.
14. Chang, D.C., Sugimoto, C., Wang, M.L., Tasi, R.T. and Yogo, Y. (1999) JC virus genotypes in the Taiwan aboriginal tribe (Bunun): implication for its population history *Arch. Virol.* In press.
15. Chang, D.C., Tsai, R.T., Wang, M.L., and Ou, W.C. (1996) Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:204-209.
16. Chang, D.C., Wang, M.L., Ou, W.C., Lee, M.S., Ho, H.N., and Tsai, R.T. (1996) Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant individuals in Taiwan. *J. Med. Virol.* 48:95-101.
17. Chang, D.C., Wang, M.L., Ou, W.C., Tsai, R.T., Fung, C.Y., and Hwang, Y.J. (1996) A simple method for detecting human polyomavirus DNA in urine by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 58:131-136.
18. Chang, D.C., Wang, M.L., and Tsai, R.T. (1999) Treatment with cytotoxic immunosuppression agents increases JC viruria in autoimmune disease patients. *J. Med. Virol.* Submitted.
19. Chen, C.H., Wen, M.C., Shu, K.H., Chang, D.C., Wu, M.J., Cheng, C.H., and Lian, J.D. (1999) BK virus induces interstitial nephritis in a kidney allograft. *J. Med. Virol.* Submitted.
20. Christiansen, G., Landers, T., Griffin, J., and Berg, P. (1977) Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40. *J. Virol.* 21:1079-1284.
21. Dorries, K., Loeber, G., and Meixensbarger, J. (1987) Association of polyomavirus JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology.* 160:268-270.
22. Doorbar, J., and Gallimore, P.H. (1987) Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J. Virol.* 61:2793-2799.
23. Forstova, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palkova, Z., Strauss, M., and Griffin, B.E. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* 6:297-306

24. Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, J.A., Dilworth, M.S., Beard, S., and Griffin, B. (1993) Cooperation of structural protein during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67:1405-1413.
25. Frisque, R.J., Bream, G.L., and Cannella, M.T. (1984) Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.
26. Frisque, R.J., Rifkin, D.B., and Walker, D.L. (1980) Transformation of primary hamster brain cells with JC virus and its DNA. *J. Virol.* 35:265-269.
27. Friedman, T. (1971) In vitro reassembly of shell-like particles from disrupted polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:2574-2578.
28. Gardner, S.D., Field, A.M., and Coleman, D.V. (1971) New human papova-virus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1:1253-1257.
29. Ghafakhanian, E., Andrew, K.S., and Weidman, M.K. (1995) SV40 VP1 assembles into disulfide-linked postpentameric complexes in cell-free lysates. *Virology.* 207:251-254.
30. Gietz, S.D., Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Res.* 20:1425.
31. Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D.C., Cai, X., Smiley, S.A., and Consigli, R.A. (1997) Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 71:2857-2865.
32. Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, L., Murakami, W.T., and Caspar, D.L.D. (1992). Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355:652-654.
33. Hirt, B. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26:365-369.
34. Killer, L. (1988) Baculovirus as gene expression vector. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.
35. Klug, A.J. and Finch, J.T., (1965) The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J. Mol. Biol.* 11:424-431.
36. Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A., and Handa, H. (1996) Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by expression of SV40 capsid protein in insect cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1290:37-45.
37. Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K., and Garcea, R.L. (1998) Intercapsomeric

disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* 72:3160-2167.

38. Li, M., Cripe, T.P., Estes, P.A., Lyon, M.K., Rose, R.C., and Garcea, R. L. (1997) Expression of the human papillomavirus type-11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA-binding and capsid assembly. *J. Virol.* 71:2988-2995.
39. Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., and Harrison, S.C. (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278-284.
40. Mandl, C.W., and Frisque, R.J. (1986) Characterization of cells transformed by the human polyomavirus JC virus. *J. Virol.* 67:1733-1739.
- 41a. Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Donald, H., Capar, L.D., and Garcea, R.L. (1991) Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65:4991-4998.
- 41b. Kosower, N.S., and Kosower, E.M., (1995) Diamide: An oxidant probe for thios. *Meth. of the Enzy.* 251:123-133.
42. O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
43. Ou, W.C., Tasi, R.T., Wang, M.L., Fung, C.Y., Hseu, T.H., and Chang, D.C. (1997) Genomic cloning and sequence analysis of Taiwan-3 human polyomavirus JC virus. *J. Form. Med. Asso.* 96:511-516.
44. Ou, W.C., Wang, M.L., Fung, C.Y., Tsai, R.T., Chao, P.C., Tzeng, T.Y., and Chang, D.L. (1999) The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *E. coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 80:39-46.
45. Padgett, B.L., Rogers, C.M., and Walker, D.L. (1977) JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. *Infect. Immun.* 15:656-662.
46. Padgett, B.L., and Walker, D.L. (1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* 127:467-470.
47. Padgett, B.L., Walker, D.L., Zu Phein, G.M., Echroade, R.J., and Dessel, B.H. (1971) Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1:1257-1260.
48. Pawlita, M., Muller, M., Oppenlander, M., Zentgraf, H., and Herrmann, M. (1996)

DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* 70:7517-7526.

49. Rayment, L., Baker, T.S., Caspar, D.L.D., and Murakami, W.T. (1982) Polyoma virus capsid structure at 22.5A resolution. *Nature* 195:110-115.
50. Rodgers, R.E.D., Cai, X., Chang, D.L., and Consigli, R.A. (1994) Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *J. Virol.* 68:3386-3390.
51. Salunke, D.M., Caspar, D.L.D., and Garcea, R.L. (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell.* 46:895-904.
52. Salunke, D.M., Caspar, D.L.D., and Garcea, R.L. (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 56:887-900.
53. Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B., and Oppenheim, A. (1997) In vitro assembly of SV40 virion and pseudovirion: vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 8:843-849.
54. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual.*
55. Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J.R., Streeck, R.E. (1995) Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76:2407-2412
56. Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J.R., Streeck, R.E. (1998) Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfide between two highly conserved cysteines. *J. Virol.* 72:6186-6189.
57. Schiesti, R.H., and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acid as a carrier. *Curr. Genet.* 16: 339-346.
58. Silverman, L., and Rubinstein, L.J. (1965) Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta. Neuropathol.* 5: 215-224.
59. Tsai, R.T., Wang, M.L., Ou, W.C., Lee, Y.L., Li, S.Y., Fung, C.Y., Huang, Y.L., Tzeng, T.Y., Chang, D.C. (1997) Viruria incidence of JC virus is higher than that of BK virus in Taiwan. *J. Med. Virol.* 52:253-257.
60. Tooze, J. (1981) *DNA tumor viruses*, 2nd edn, pp:61-370. Cold Spring Harbor,

NY:Cold Spring Harbor Laboratory.

- 61.Walker, D.L. (1978) Progressive multifocal leukoencephalopathy : An opportunistic viral infection of the central nervous system. in Vinken PJ, Bruyn GW (eds) : Handbook of Clinical Neurology. Amsterdam, North-Holland Publishing Co. 18:307-329.
- 62.Walker, D.L. (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy, in Handbook of Clinical Neurology, P.J. Vinken, G.W. Bruyn, and H.L. Elsevier Science. Amsterdam. 3:503-524.
- 63.Walker, D.L. (1983) Progressive multifocal leukoencephalopathy, in Comprehensive Virology ,Plenum, B. L. Padgett, H. Frankel-Conrat, R. R. Wanger New York. 18: 161-193.
- 64.Walker, D.L., and Frisque, R.J. (1986) The biology and molecular biology of JC virus. In the papovaviride, pp:327-377.Edited by N.P.Salzman. New York : Plenum Press.
- 65.Walker, D.L., Padgett, B.L., and Zu-Rhein, G.M. (1973) Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. Science. 181:674-676.
- 66.Walter, G., and W, Deppert. (1974) Intermolecular disulphide bonds : an important structural feature of the polyoma virus capsid. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39:225-257
- 67.Wang, M.L, Tzeng, T.Y., Fung, C.Y., Ou, W.C., Tsai, R.T., Chen C.H., and Chang, D.C. (1999) Human anti-JC virus serum reacts with native but not denatured JC major capsid protein VP1. J. Virol. Meth. 78:171-176.
- 68.Willoughby, E., Price, R.W., Padgett, B.L., Walker, D.L., and Dupont, B. (1980) Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML); in vitro cell-mediated immune responses to mitogens and JC virus. Neurology. 30:1 256-262.
- 69.Yuen, L.K.C., and Consigli, R.A. (1982) Improved infectivity of reassembled polyoma virus. J.Virol. 43:337-341.
- 70.Zu Rhein, G.M. (1983) Studies of JC virus-induced nervous system tumors in the Syrian hamster: A review. Polyomaviruses and Human Neurological Disease. Sever, J. L. and D.L. Madden, eds., Alan R. Liss, New York. 205-221.
- 71.Zu Rhein, G.M., and Varakis, J.N. (1979) Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamsters by a human polyoma virus (JC). Natl. Cancer. Inst. Monoer. 51: 205-208.

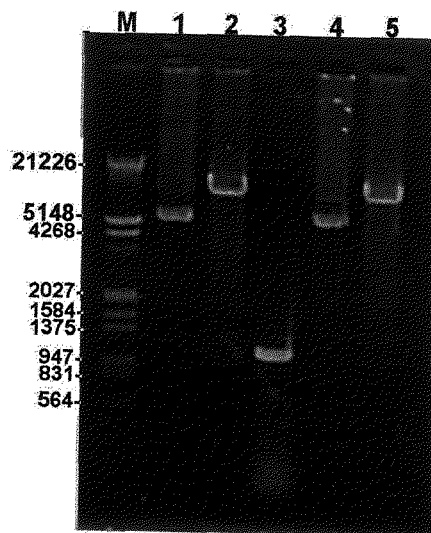


圖 1: 以 agarose gel 分析 pFX7-JCVP1 的長度大小。經由基因重組所構築的 pFX7-JCVP1 質體 DNA，利用 restriction mapping 確定其長度大小。Lane 1: 未切的 circular form pFX7-JCVP1 質體 DNA。Lane 2: 以 Sac I 切一刀，可切出約 8,600 bp 的 linear form DNA 片段。Lane 3: 轉殖酵母菌後，miniprep 萃取質體 DNA，以 PCR 偵測 VP1 DNA (1,065 bp) 的存在。隨後轉殖到 *E.coli*，以 agarose gel 確定 pFX7-JCVP1 的存在 (Lane 4)。並以 restriction mapping，用 Sac I 切出 8,600 bp 的 DNA 片段(Lane 5)。

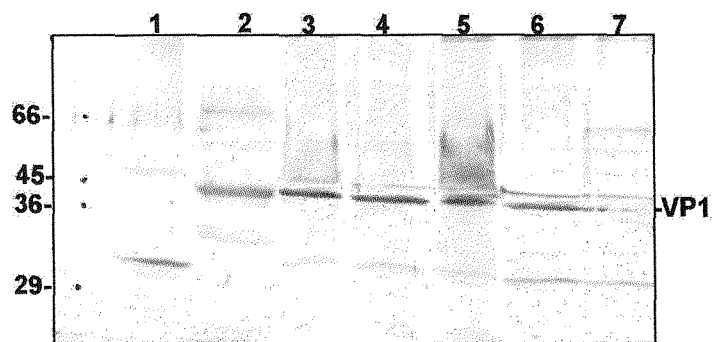


圖 2：pFX7-JCVP1 / INVSC1 對 formaldehyde 的敏感性試驗。pFX7-JCVP1 在含各種不同濃度的 formaldehyde 的酵母菌細胞內的表達情形，以 anti-JCVP1 抗體做 Western blot 分析。Lane 1：沒有表達 JCVP1 蛋白質的 yeast 細胞，做為陰性對照組。Lane 2：JCVP1/ Δ pFlag/JM109 做為陽性對照組。Lane 3-7 分別是含 30、40、50、70、90 μ l/100ml formaldehyde 濃度生長的酵母菌細胞。

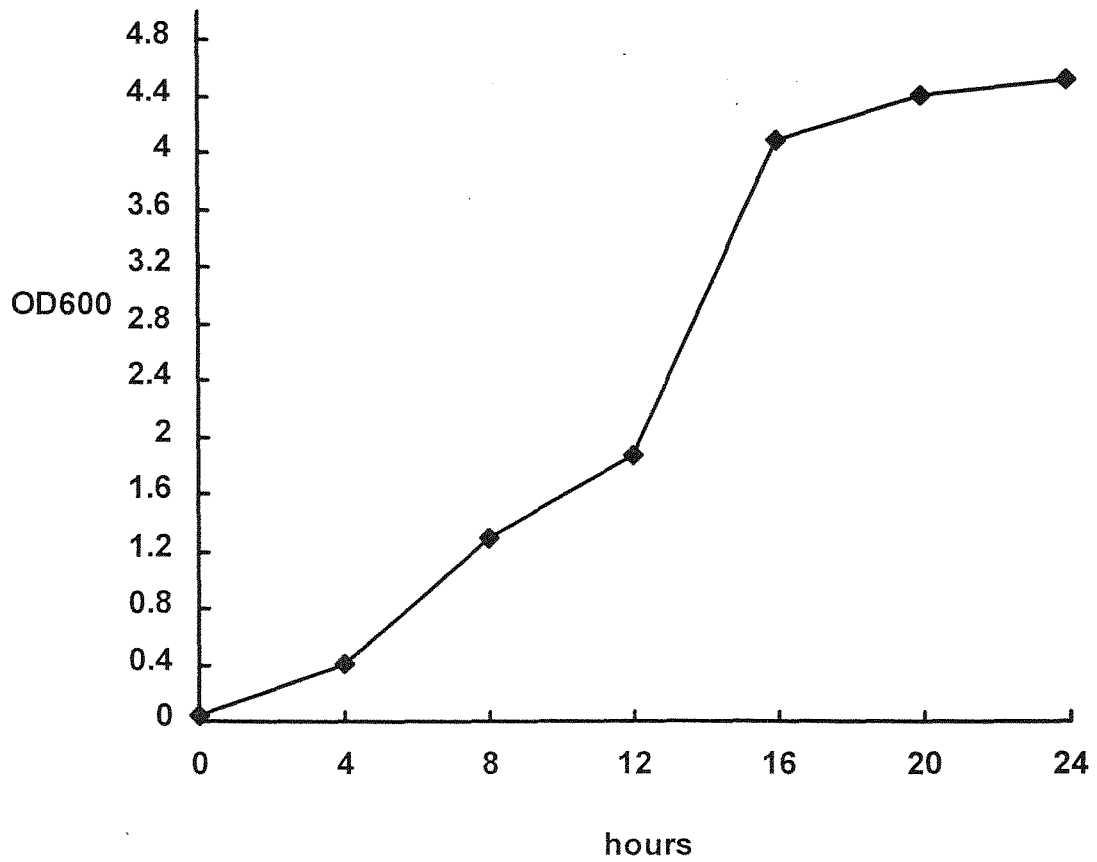


圖 3：pFX7-JCVP1/INVSC1 的生長曲線。轉殖酵母菌的 pFX7-JCVP1 在 YPD 培養基中生長，以每 4 小時的時間間隔，測定其吸光度的變化。

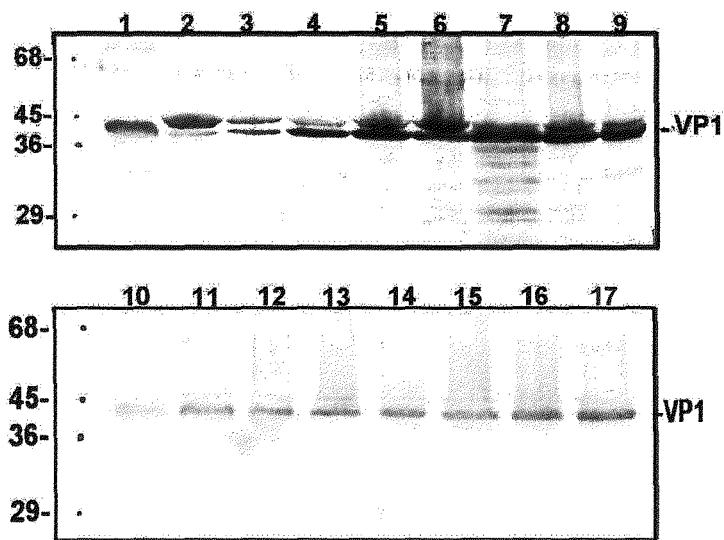


圖 4: 西方墨點法(Western blot)分析 JCV VP1 蛋白質在酵母菌細胞內不同時間點的表達情形。pFX7-JCVP1 在含有 30% formaldehyde YPD 培養基的酵母菌細胞中生長達 mid-log phase 後，加入 3% galactose 誘發 VP1 蛋白質表達，以每 4 小時的間隔收集菌液，以西方墨點法(Western blot)分析。Lane 1: JCVP1/ Δ pFlag /JM109 做為陽性對照組。Lane 2-17 分別為第 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、72 小時。

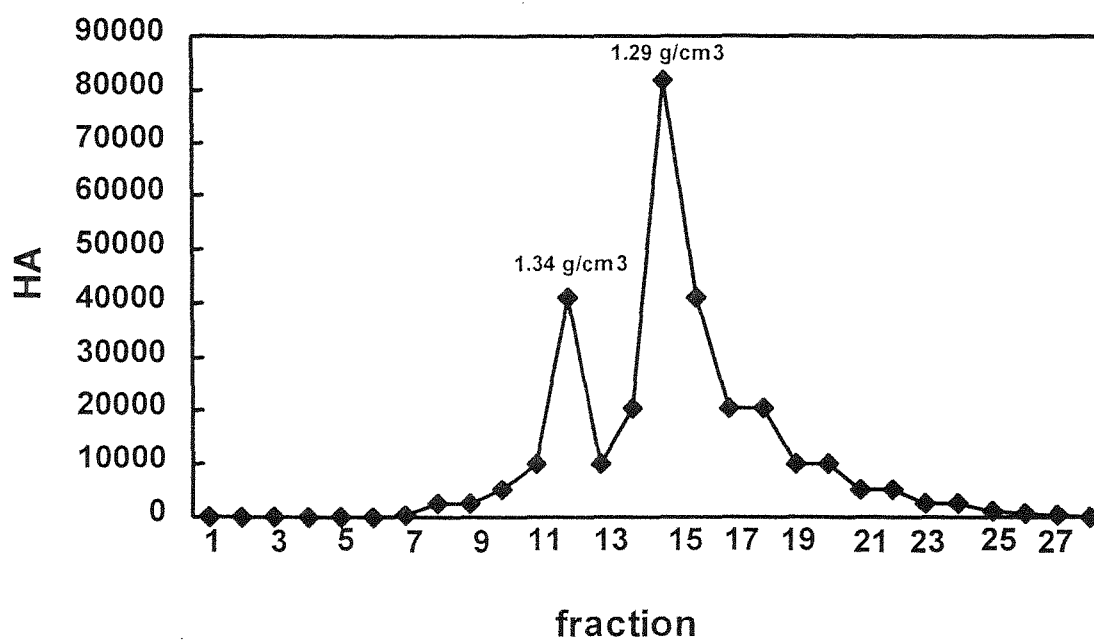


圖 5: 以 CsCl 密度梯度離心純化來自酵母菌細胞液的 VP1 capsid-like particle。經過 CsCl 密度梯度離心純化後，每一 fraction 以血液凝集活性(HA)及密度測定分析。

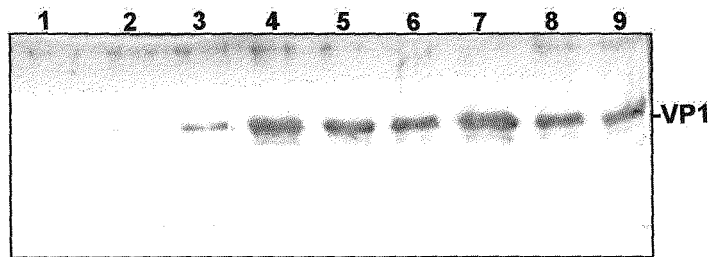


圖 6: 西方墨點法分析 CsCl 密度梯度離心純化的部分 VP1 capsid-like particle。Lane 1~9 分別為 gradient fraction 9-17。

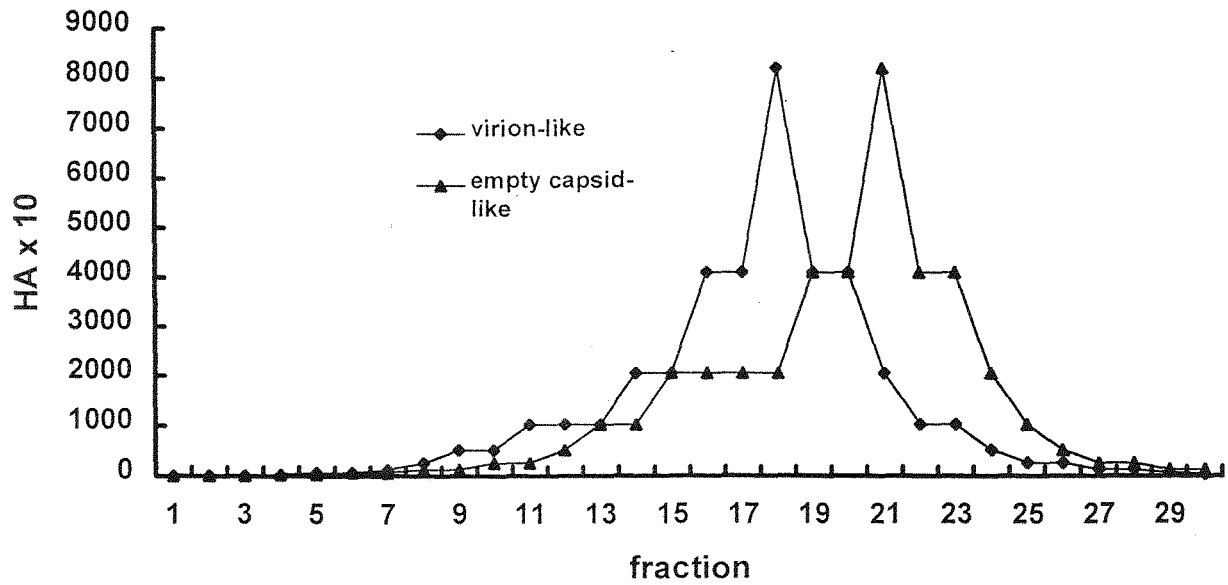


圖 7：以 10-30% 蔗糖梯度離心純化 virion-like particle 及 empty capsid-like particle。經過 10-30% 蔗糖梯度離心純化密度 1.34 g/cm^3 (virion-like) population 及密度 1.29 g/cm^3 (empty capsid-like) population 的 JCV VP1 蛋白質各 fraction 以血液凝集特性分析。

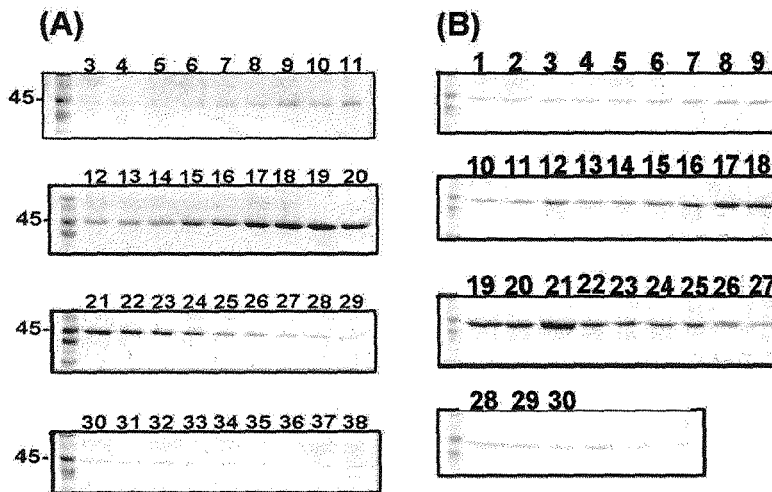


圖 8：以 SDS-PAGE 分析純化的 virion-like particle 及 empty capsid-like particle 的蛋白質純度。virion-like particle 及 empty capsid-like particle 經過 10-30% 蔗糖梯度離心純化後，分別以 12.5% SDS-PAGE 分離，再以 Coomassie blue 染色，分析其純度。(A). virion-like particle fraction 3-38 的蛋白質純度。(B). empty capsid-like particle fraction 1-33 的蛋白質純度。

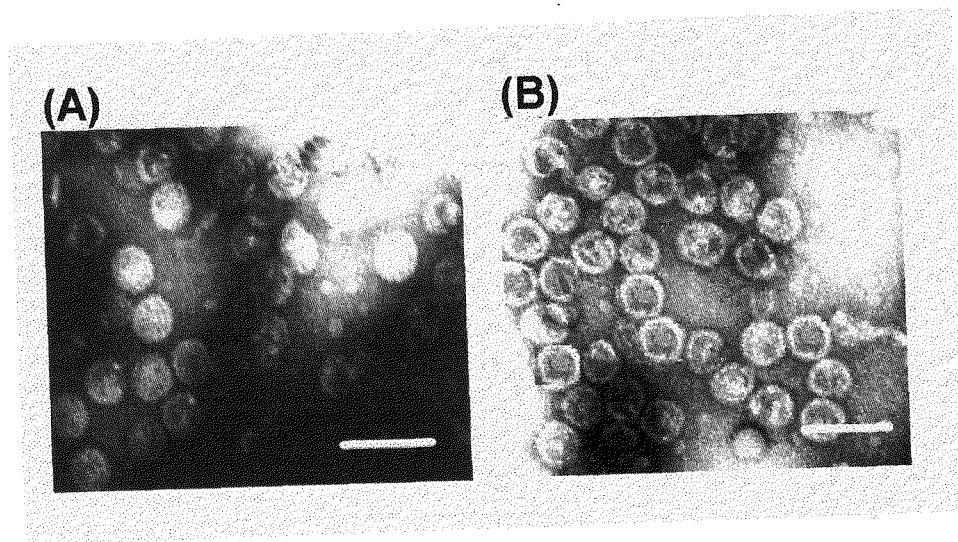


圖 9: JCV VP1 殼體的電顯圖。純化的 JCV VP1 殼體，以 2% uranyl acetate 染色，以 TEM 觀察其外形。(A) 密度 1.34 g/cm^3 的部分，即 virion-like particle 的電顯圖。(B) 密度 1.29 g/cm^3 的部分，即 empty-capside-like particle 的電顯圖。圖中的 bars 為 100 nm。

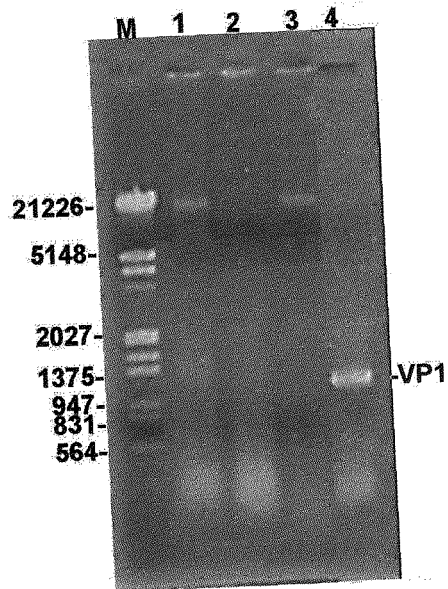


圖 10：以 garose gel 分析由 VP1 病毒顆粒(virion-like particle)所萃取的核酸。由病毒顆粒所萃取的核酸用 1% agarose gel 分析。Lane M：分子量 maker。Lane 1：密度 1.34 g/cm^3 的病毒顆粒 (virion-like particle) 所萃取的核酸。Lane 2：由 Lane 1 所萃取的核酸隨後以 DNase I 處理。Lane 3：由 Lane 1 所萃取的核酸隨後以 RNase I 處理。Lane 4：密度 1.34 g/cm^3 的病毒顆粒 (virion-like particle) 所萃取的核酸以 PCR 偵測 VP1 DNA 的存在。

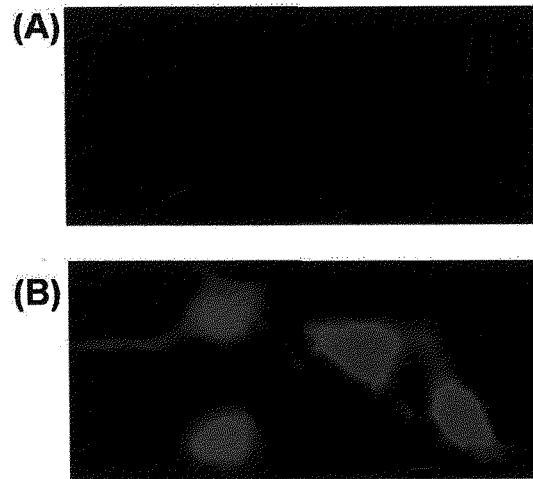


圖 11：以 UV 顯微鏡觀察 JCV VP1 pseudocapsid particle 攜帶 pEGFP-C1 質體 DNA 感染人類胎兒腎上皮細胞 293 表達螢光蛋白質。(A). 單獨 pEGFP-C1 感染 293 細胞。
(B). JCV VP1 pseudocapsid particle 攜帶 pEGFP-C1 質體感染 293 細胞。

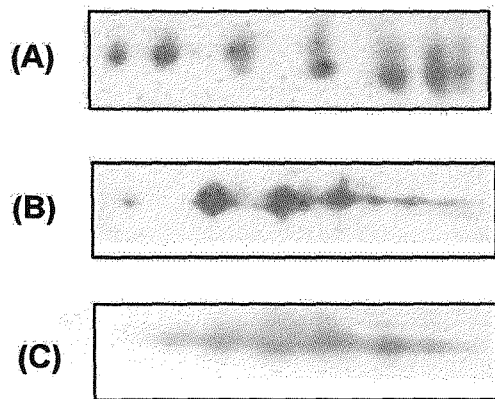


圖 12: 2D gel 分析在原核細胞(*E. coli* cell)及真核細胞(Insect cell/yeast cell)所表達 JCV VP1 蛋白質的 subspecies。在 *E. coli*，Insect cell 及 yeast 中純化得到的 JCV VP1 蛋白質，用 IEF 及 SDS-PAGE 分離後，以 anti-JCV VP1 抗體鑒定 VP1 的 subspecies。 (A). *E. coli* cell 中 VP1 subspecies。(B). Insect cell 中的 VP1 subspecies。(C). yeast 中的 VP1 subspecies

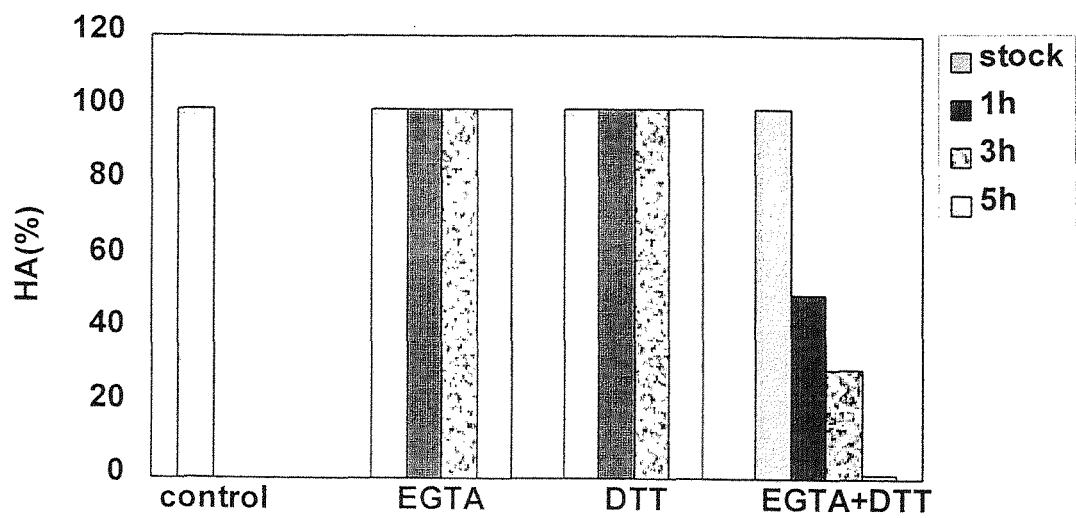


圖 13. EGTA 及 DTT 對殼體穩定性的影響。純化的 JCV VP1 殼體分別以 10 mM EGTA，3 mM DTT 或兩者同時存在作用 JCV VP1 殼體 1，3，5 小時後，測血液凝集活性。

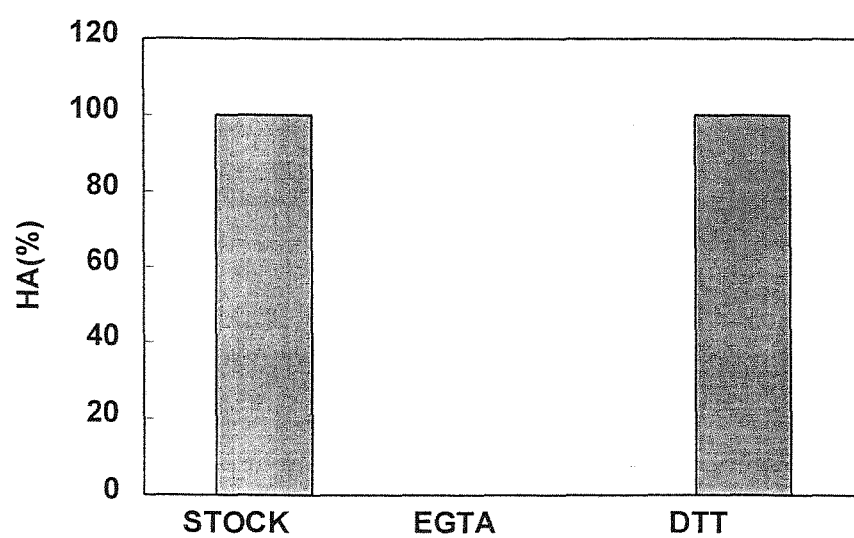


圖 14. EGTA 及 DTT 對再組合(reassembled)capsid 的影響。

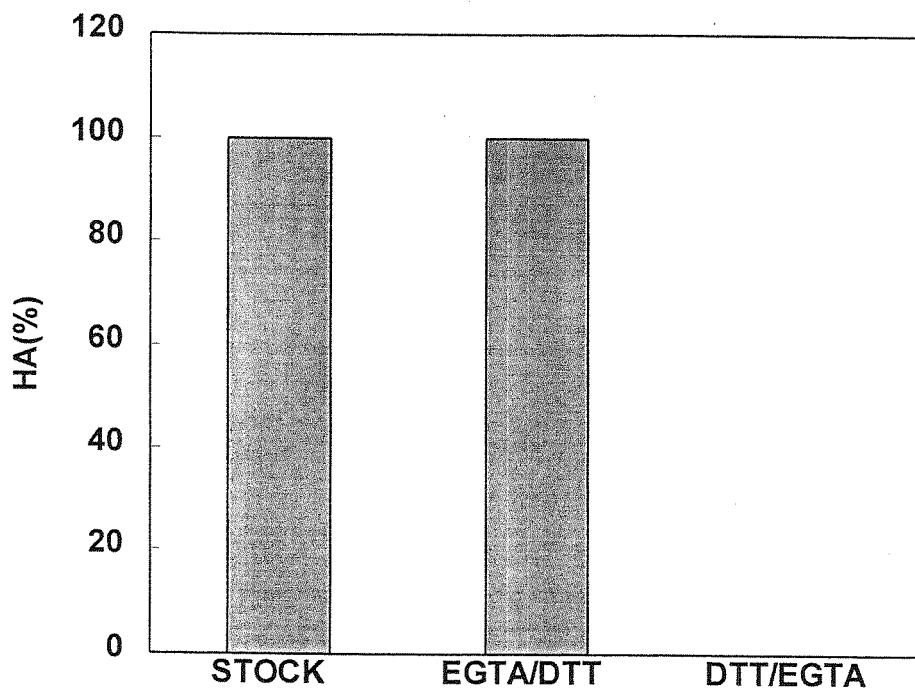


圖 15. 處理 EGTA 及 DTT 的順序性對 VP1 殼體的影響。VP1 殼體先處理 EGTA 後再加入 DTT 或先處理 DTT 後再加入 EGTA，分別測定其血液凝集活性。EGTA/DTT：VP1 殼體先處理 EGTA 後經過透析再加入 DTT。DTT/EGTA：VP1 殼體先處理 DTT 後經過透析再加入 EGTA。

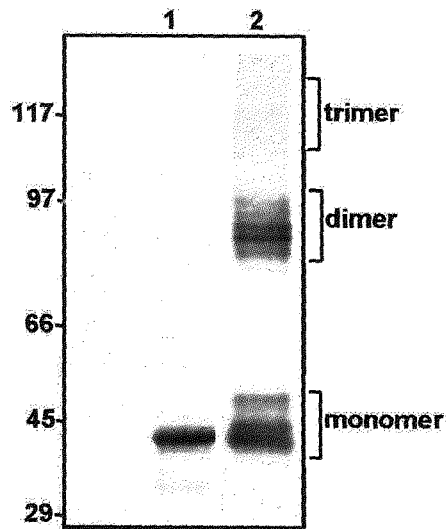


圖 16 .Non-reducing SDS-PAGE 分析 VP1 殼體的雙硫鍵鍵結。Lane 1：純化的 JCV VP1 capsid particle 經由還原劑處理。Lane 2：JCV VP1 capsid particle 沒有還原劑處理。

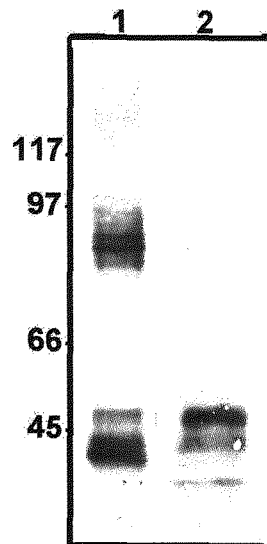


圖 17：Non-reducing SDS-PAGE 分析 DTT 對殼體內雙硫鍵鍵結的影響。Lane 1：沒有處理 DTT 的 JCV VP1 殼體。Lane 2：處理 DTT 的 JCV VP1 殼體。

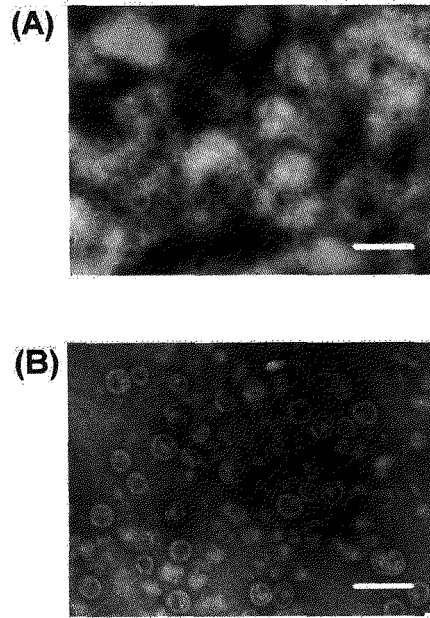


圖 18：DTT 處理殼體後的電顯圖。(A)為未經 DTT 處理的 JCV VP1 殼體。(B)經過 DTT 處理的 JCV VP1 殼體。圖中的 bar 為 100 nm。

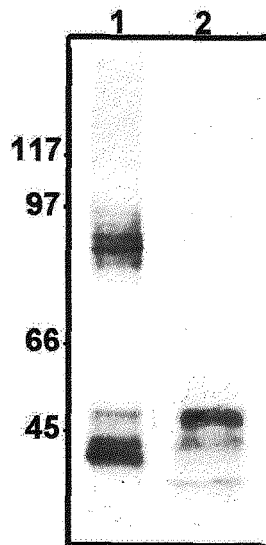


圖 19 : Non-reducing SDS-PAGE gel 分析 JCV VP1 capsomere 的雙硫鍵鍵結。Lane 1 : 純化的 JCV VP1 capsid。Lane 2 : 同時處理 EGTA 及 DTT 後瓦解的 capsomere。

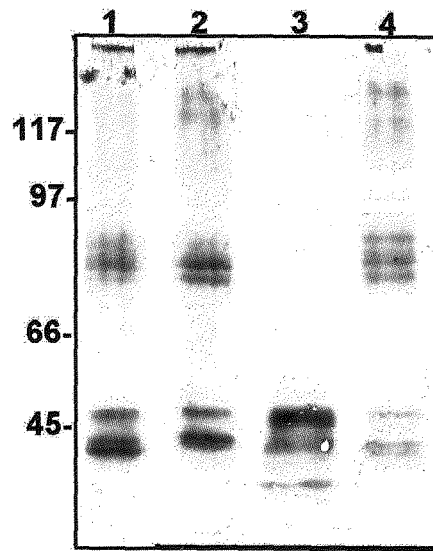


圖 20: Non-reducing SDS-PAGE 分析 diamine 處理的 JCV VP1 capsid 及 capsomere。
Lane 1: 純化的 JCV VP1 capsid。Lane 2: 經過 diamide 處理的 capsid。Lane 3: JCV VP1 capsomere。Lane 4: diamide 處理之後的 capsomere。

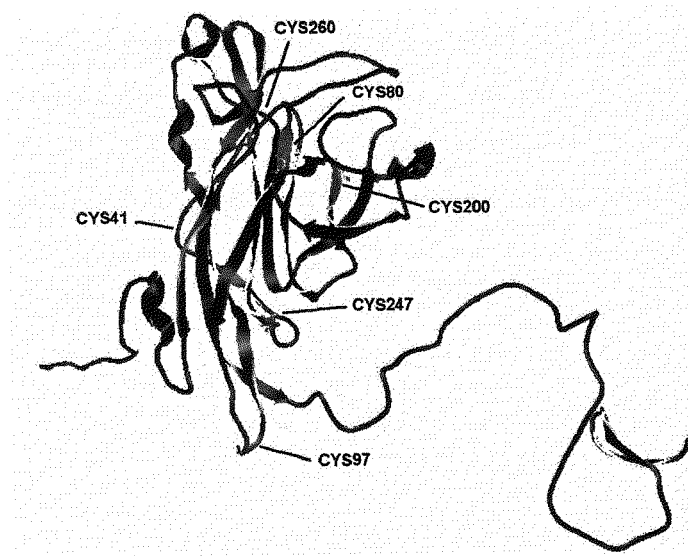


圖 21:台灣三號(43)JCV VP1 cysteine 所在位置。將 JCV VP1 氨基酸序列送至 Swiss-Model 網站並利用 SV40 VP1 晶體構造(39)為 template 模擬 JCV VP1 之立體結構，找出其中之 cysteine 所在位置，分別位於第 40、第 80、第 97、第 200、第 247 及第 260 個氨基酸(紅色區域為 cysteine)。

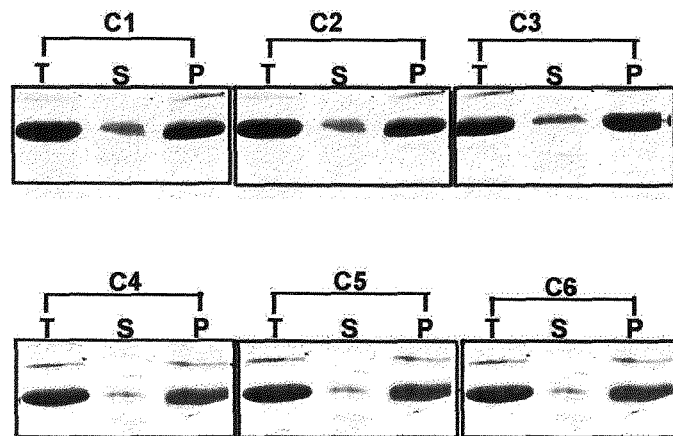


圖 22:以西方墨點法(Western blot)偵測 JCV VP1 C1 至 C6 蛋白質在 *E.coli* 表達情形及溶解度。C1 至 C6 經選殖入 *E.coli* 系統 Δ pFlag 表達載體後,以 IPTG 誘發蛋白質表達,並溶解細胞液然後離心分開 supernatant 及 pellet。以 JCV VP1 抗體鑑定。T:total lysate ; S:supernatant ; P:pellet。

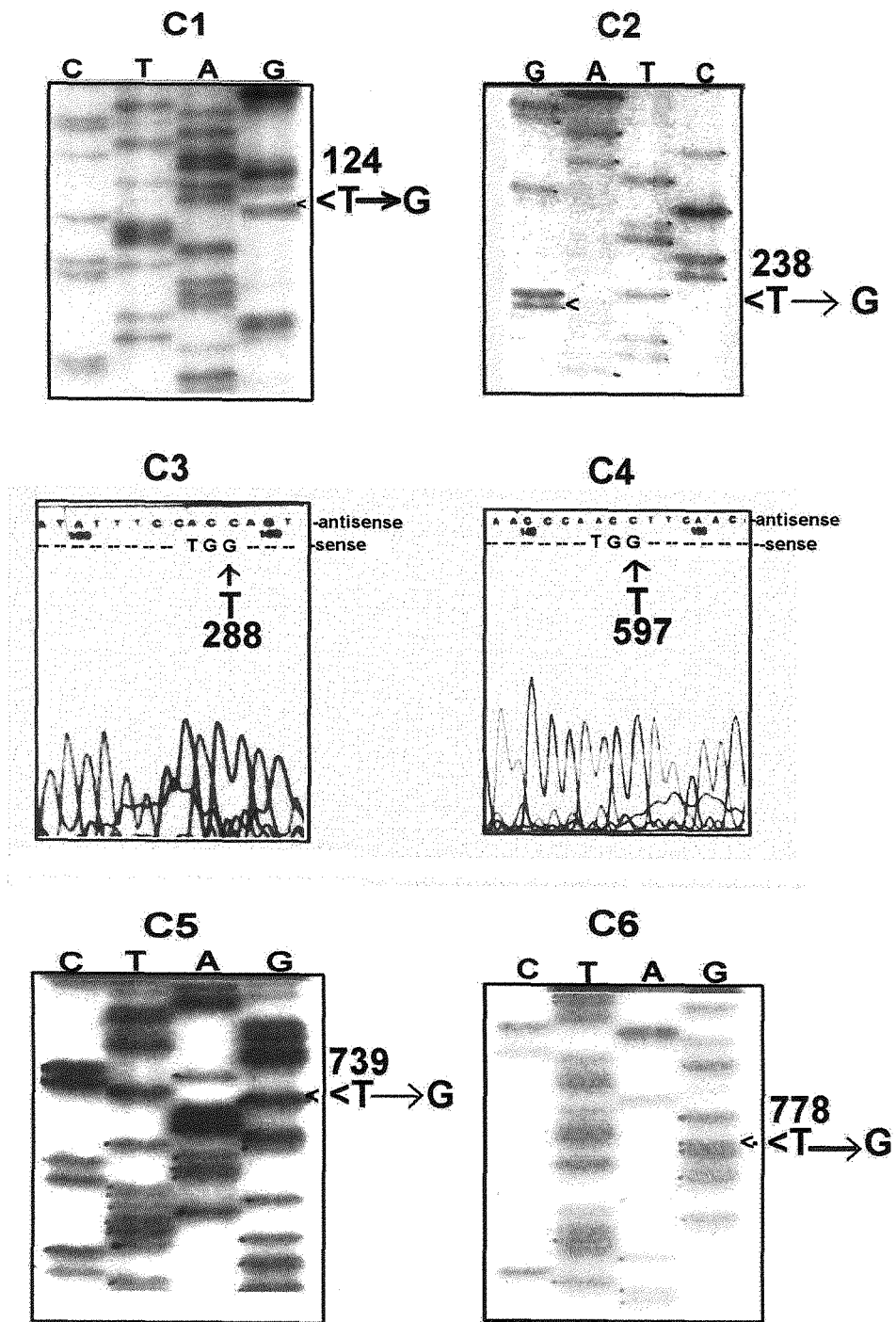


圖 23:利用 DNA 定序(sequencing)分析 JCVP1 C1-C6 蛋白質的核苷酸點突變序列。由 PCR 點突變後的產物以 DNA 定序分析 C1(VP1 第 124 核苷酸)、C2(VP1 第 238 核苷酸)、C3(VP1 第 288 核苷酸)、C4(VP1 第 597 核苷酸)、C5(VP1 第 739 核苷酸)、C6(VP1 第 778 核苷酸)其核苷酸 T 突變為 G。

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	ATCAAAAATC	ATCGCTTCGC	TGATTAATTA	CCCCAGAAAT	AAGGCTAAAA	AACATAATCGC	ATTATCATCC	TATGGTTFGT	80
81	AATTTGATTC	GTTCAATTTGA	AGGTTTGTGG	GGCCAGGTTA	CTGCCAATTT	TTCCCTCTTCA	TAACCATAAA	AGCTAGTATT	160
161	GTAGAATCTT	TATTGTTCCG	AGCAGTGGCG	CGCGAGGCAC	ATCTGCGTTT	CAGGAACCGG	ACCCGTGAAG	ACCAGGACGC	240
241	ACGGAGGAGA	GTCTTCCTTC	GGAGGGCTGT	CACCCGCTCG	GCGGCTTCTA	ATCCGTACTT	CAATATAGCA	ATGAGCAGTT	320
321	AAGCGTATTA	CTGAAAGTTC	CAAAGAGAAG	GTTTTTTTAG	GCTAATCGGC	CTCGAATTCG	AGCTCGGTAC	CTTTAGTGTG	400
401	TTCCATAAAA	AAAAAAAAG	GCTCGCCATC	AAAACGATAT	TCGTTGGCTT	TTTTTTCTGA	ATTATAAATA	CTCTTTGGTA	480
481	ACTTTTCATT	TCCAAGAACC	TCTTTTTTCC	AGTTATATCA	TGGTCCCCTT	TCAAAGTTAT	TCTCTACTCT	TTTTCATATT	560
561	CATTCCTTTT	CATCCTTTGG	TTTTTTATTC	TTAACTTGT	TATATTCTC	TCTGTCTCT	ATTTACAAGA	CACCAATCAA	640
641	AACAAATAAA	ACATCACTAG	TGTCGACCTG	CAGGCATGCA	AGCTTTCCCT	ATAGTGAGTC	GTATTAGAGC	TTGGCGTAAT	720
721	CATGGTCATA	GCTGTTTCC	GGGAATTCAT	CGATATCTAG	ATCTCCCATG	TCTCTACTGG	TGGTGGTGCT	TCTTTGGAAT	800
801	TATTGGAAGG	TAAGGAATTG	CCAGGTGTG	CTTCTTTATC	CGAAAAGAAA	TAAATTGAAT	TGAATTGAAA	TCGATAGATC	880
881	AATTTTTTTT	TTTTCTCTTT	CCCATCCTTT	ACGCTAAAA	AATAGTTATT	TTATTTTTTG	AATATTTTTT	ATTTATATAC	960
961	CGTATATATA	GACTATTATT	TATCTTTTAA	TGGATTATTA	AGATTTTTAT	TAAAAAAA	TTCCCTCCTC	TTTTAATGCC	1040
1041	TTTATGCGAGT	TTTTTTTTCC	CATTCGATAT	TCTCATGTTT	GGGTTCAGCG	TATTTTAAGT	TTAATAACTC	GAAAATCTG	1120
1121	CGTTCGTTAA	AGCTTATGAT	CCAATATCAA	AGGAAATGAT	AGCATTGAAG	GATGAGACTA	ATCCAAATTGA	GGAGTGGCAG	1200
1201	CATATAGAAC	AGCTAAAGGG	TAGTGTGAA	GGAGCATAAC	GATACCCCGC	ATGGAATGGG	ATAATATCAC	AGGAGGTACT	1280
1281	AGACTACCTT	TCATCCTACA	TAAATAGACG	CATATAAGTA	CGCATTTAAG	CATAAACACG	CACATAGCCG	TTCTTCTCAT	1360
1361	GTATATATAT	ATACAGGCAA	CACGCAGATA	TAGGTGGCAG	GTGAACAGTG	AGCTGTATGT	GCGCAGCTCG	CGTTGCATTT	1440
1441	TCGGGAAGCG	TCGTTTTCCG	AAACGCTTTG	AAGTTCCTAT	TTCGAAGTTC	TATCTCTAG	CTAGAAAGTA	TAGGAACCTC	1520
1521	AGAGCGCTTT	TGAAAACCAA	AAGCGCTCTG	AAGACGCCACT	TTCAAAAAAC	CAAAAACGCA	CCGGACTGTA	ACGAGTACT	1600
1601	AAAATATTGC	GAATACCGCT	TCCACAAAAC	TTGCTCAAAA	GTATCTCTTT	GCTATATATC	TCTGTGCTAT	ATCCCTATAT	1680
1681	AACCTACCCA	TCCACCTTTC	GCTCCTTGAA	CTFGCATCTA	AACCTGACCT	CTACATTTTT	TATGTTTATC	TCTAGTATTA	1760
1761	CTCTTTAGAC	AAAAAAATTG	TAGTAAGAAC	TATTCATAGA	GTGAATCGAA	AACAAATACG	AAATGTAAAC	ATTTCCCTATA	1840
1841	CGTAGTATAT	AGAGACAAAA	TAGAAGAAAC	CGTTCATAAT	TTTCTGACCA	ATGAAGAATC	ATCAACGCTA	TCACCTTCTG	1920
1921	TTACACAAAGT	ATCGGCAATC	CACATCGGTA	TAGAATATAA	TCGGGGATGC	CTTTATCTTG	AAAAAATGCA	CCCGCAGCTT	2000
2001	CGCTAGTAAT	CAGTAAACGC	GGGAAGTGA	GTCAGGCTTT	TTTTATGGAA	GAGAAAATAG	ACACCAAAGT	AGCCTTCTTC	2080
2081	TAACCTTAAC	GGACCTACAG	TGCAAAAAGT	TATCAAGAGA	CTGCATTATA	GAGCGCACAA	AGGAGAAAAA	AAGTAATCTA	2160
2161	AGATGCTTTG	TTAGAAAAAT	AGCGCTCTCG	GGATGCATTT	TTGTAGAACA	AAAAAGAAGT	ATAGATTCTT	TGTTGGTAAA	2240
2241	ATAGCGCTCT	CGCGTTGCAT	TTCGTGTTCTG	TAAAAATGCA	GCTCAGATTC	TTTGTTTGAA	AAATTAGCGC	TCTCGCGTTG	2320
2321	CATTTTGTGT	TTACAAAAAT	GAAGCACAGA	TTCTTCGTTG	GTAATAATAG	GCTTTCGCGT	TGCATTTCTG	TTCTGTAAAA	2400
2401	ATGCGACTCA	GATTCCTTGT	TTGAAAAAT	AGCGCTCTCG	CGTTGCATTT	TTGTTCTACA	AAATGAAGCA	CAGATGCTTC	2480
2481	GTTAACAAAG	ATATGCTATT	GAAGTCAAG	ATGGAACCC	AGAAAATGAA	CCGGGATGC	GACGTGCAAG	ATTACCTATG	2560
2561	CAATAGATGC	AATAGTTTCT	TCAGGAACCG	AAATACATAC	ATTGTCTTCC	GTAAACCGCT	AGACTATATA	TTATTATACA	2640
2641	GGTCAAAATA	TACTATCTGT	TTCAGGAAA	ACTCCCAGGT	TCGGATGTTT	AAAATCAAT	GATGGGTAAC	AAGTACGATC	2720
2721	GTAATCTGT	AAAACAGTTT	GTCGGATATT	AGGCTGTATC	TCTCAAAAGC	GTATTCGAAT	ATCATTGAGA	AGCTGCATTT	2800
2801	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	ATATATTTCA	AGGATTTACC	ATTGTAATGT	CTGCCCTTAA	AAAAATCGTC	2880
2881	TTTTTCCAG	TTGACGATTC	AGATAATGAA	TAGAATTTTT	AGTAATCCAT	TTTTTATTTT	TATTTTATT	TGAAGSTTAT	2960
2961	AATAATAGAT	ATATATACG	TATCTTAATT	ACAAACGAAC	AAACAAACAA	CTTAAAGTTT	GCTGTCTAGT	CATGACAAGT	3040
3041	CAACAACAGC	TCTGATACAA	TCACCAGCAT	GCATTTCTTC	AAAAGCTTTG	TTAATGGCTG	CCAAAGGTTT	TCTGTGGGTA	3120
3121	ATGAATCTTT	CAACCTTCAA	TTTACCATCC	AAGTAATTGT	TAACAATTC	TGGTAATTGG	GATCTACCTT	TAACACCACC	3200
3201	GAAAGCAGCT	CCTTTCCAAG	TTCACCGGT	AACCAATTGG	AATGGTCTGG	TGGAATTTT	TTTACCAGCT	GCAGCAACAC	3280
3281	CAATAATGAC	GGAAAGTACC	CAACCTTTAT	GACAAGCTTT	CAAAGCGTTT	CTCATAACCC	CAACATTTACC	GGTACAATCA	3360
3361	AAAGTGAAT	CACAACCACC	ATCGGTCATT	CCAATCAAT	TATCGACAAT	AGTGGTACCT	TCTGGTAAAT	TGGTGGGTTT	3440
3441	AACAAGGCA	GTCGACCCAA	GTTTTTGACC	CCATTTCTCT	TTCTTTGCTAC	TGATATCAAC	TAAAATGATT	TGAGCAGCTC	3520
3521	CTCTTTCAGC	ACAACCTTGA	ATGACGGATA	ACCCGACAAT	ACCACCACCG	AAAACAGCAA	CGTTGTCACC	TTTTTGAACG	3600
3601	TTGGCGGTGA	TGGTGGCGGC	ACCATAACCA	GTAGTAATAC	CACAACCTAA	CAAACAAGCT	TTGTCAAAT	CAGCTTTTGG	3680
3681	ATTGATGGCA	ACAACAGAAA	TGTCAGCAAC	AACAGTATAT	TGGGAGAAAAG	TGGAACAACC	CATAAAGTGG	AGAAATTTCT	3760
3761	TACCTTTGCA	TGTAATCTTT	GAAGTACCAT	CTGGCATAAC	ACCTTTACCT	TGGGTAGCTC	TAATTTTACC	ACACAAGTTG	3840
3841	TTTTTACCAG	ATTTACAGAA	TTTACATTC	CCACATTCG	GGTATACAA	GGCAATGACA	TGGTACCACA	CTTTAACATT	3920
3921	GTTGACACCT	TCCACCAATAC	TTTCGACAA	ACCGGCACCT	TCAATGTTCC	AAATAACTGG	GAAAGCACCT	TCTGATCAA	4000
4001	CCCACCTTAA	AGTGTAAAGCA	TCAGTGTGAC	AAACACCAGT	GTCATAAAGT	TTGATACGGA	CTTCATGACG	TTTTGGTGG	4080
4081	GCAACAGTGA	CATCTTCAAT	GGATAATGGT	TTAGCAGCTT	CCCAAGCAAC	AGCGGCTTTA	CAGGTAATTTG	GCTGAGTAAA	4160
4161	GTAGTAAAA	TGAACATAAT	TTCTTTTTTT	TGAGTTTATG	TTTTAACCAC	TAGGGTGATT	TTCGAATTTG	TCATGGTGTG	4240
4241	TGGGTATAAA	ATATGATGAA	AATTTCCCTT	TTTTTCAAAA	AAAAAAAATA	ATTACCAAT	TTCTCCACCA	ATTGAAAATC	4320
4321	ATTTTCCAAT	TTCAATTAAG	AAAGAACAAA	TGAAAAAAA	AGGGGATAAA	ATGAATGAG	TTACATACCT	TTCCAACAGT	4400
4401	TGATTCAGAC	ATTTATATAG	TACAATTGAT	AAAATAAGTA	AGTTAATTA	TCAATGGTAA	GACTAGAAAA	TGAAAAGAAG	4480
4481	AAGAAGGAGT	TGATTTGGTT	TTTATAATCT	TTTTTTTTTT	TTTTCTTCGT	TCTATCAGTT	TCATTGAAC	TCTTTGTTTC	4560
4561	TCGCGCTGAA	CGTTGCAGGG	AATTGGTTAC	CCGATTAGGC	TCATCTTTAC	GGCTTACTCA	CGTTTTTTTT	TTTTAGTTTC	4640
4641	GCATAATTTT	GACCAATGCTT	AATAATTAGG	TATCACAAAT	AGCGCGGAAA	CTTATCCCTT	AAACTCATAT	AATCAGGAAG	4720
4721	TATCTACACC	GCAATATTGT	TTAGAAAAGT	ATTGGTTCTA	TCTTGATTTAC	TAATTCCTA	TTTATGATGA	ACGTTGACAC	4800
4801	ACTTAAACTC	AGATAATCTC	TTTGTGTTGA	CTATCGCTTG	CTTTTCCGAA	AGATGAAATC	TTAGATCACA	CTGCCTTTTC	4880
4881	TCAGCTGGAT	CAATAGAGTA	ACAAAAGAGT	GGTAAGGAGC	TTGGCACTGG	CCGTCTTTT	ACAACGCTCT	GACTGGGAAA	4960
4961	ACCCTGGCGT	TACCCAACCT	AATCGCCTTG	CAGCACATCC	CCCTTTCGCC	AGCTGGCGTA	ATAGCGAAGA	GGCCCCACC	5040

圖 24.pFX7 的核甘酸序列分析。全長共有 7,577 bps。(接下頁)。

(接上頁)

5041	GATCGCCCTT	CCCAACAGTT	GCGCAGCCTG	AATGGCGAAT	GGCGCCTGAT	GCGGTATTTT	CTCCTTACGC	ATCTGTGCGG	5120
5121	TATTTACAC	CGCATATGGT	GCACCTCAG	TACAATCTGC	TCTGATGCCG	CATAGTTAAG	CCAGCCCCGA	CACCCGCCAA	5200
5201	CACCCGCTGA	CGCGCCCTGA	CGGGCTTGTC	TGCTCCCGGC	ATCCGCTTAC	AGACAAGCTG	TGACCGTCTC	CGGGAGCTGC	5280
5281	ATGTGTCAGA	GGTTTTACCC	GTCATCACCG	AAACGCGCGA	GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGGTAA	5360
5361	TGTCATGATA	ATAATGGTTT	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGGAA	ATGTGCGCGG	AACCCCTATT	TGTTTTATTTT	5440
5441	TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	TGAGACAATA	ACCCTGATAA	ATGCTTCAAT	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	5520
5521	ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCCTTTT	TTGCGGCATT	TTGCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	5600
5601	GCTGGTGAAA	GTAAGATG	CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	ACCGGTAAGA	5680
5681	TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAAGCTT	TTCCAATGAT	GAGCACTTTT	AAAGTTCGTC	TATGTGGCGC	GGTATTATCC	5760
5761	CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC	ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	5840
5841	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG	GCATGACAGT	AAGAGAATTA	TGCAGTGCCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA	5920
5921	ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG	GGGATCATGT	AACTCGCCTT	6000
6001	GATCGTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	6080
6081	GTTGCGCAAA	CTATAAAGT	GCGAAGTACT	TACTCTAGCT	TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG	6160
6161	TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTTATTGCT	GATAAATCTG	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	6240
6241	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT	CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	6320
6321	TATGGATGAA	CGAAATAGAC	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT	6400
6401	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACCTC	ATTTTTAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA	TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	6480
6481	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTCTGTT	CACGAGCGGT	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	6560
6561	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTTGCCG	GATCAAGAGC	6640
6641	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	6720
6721	GGCCACCCT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC	TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	6800
6801	CGATAAGTCG	TGCTTACCG	GTTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT	6880
6881	CGTGCACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCTATGAGA	AAGCGCCACG	6960
6961	CTTCCCAGAG	GGAGAAGGGC	GGACAGSTAT	CCGTAAGCG	GCAGGGTCCG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	7040
7041	GGAAAACGCC	TGGTATCTTT	ATAGTCCCTG	CGGTTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTTTGTA	TGCTCGTCAG	7120
7121	GGGGCCGGAG	CCTATGGAAG	AACGCCAGCA	ACGCGCCCTT	TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	7200
7201	TTCTTTCTCG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCGCCG	7280
7281	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAAGCGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	7360
7361	CGATTCAATTA	ATGCAAGCTG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	ACGCAATTA	TGTGAGTTAG	7440
7441	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	7520
7521	TCACACAGGA	AACAGCTATG	ACCATGATTA	CGCCAAGCTT	GGCTGCAGGT	CGACGGG			7577
	10	20	30	40	50	60	70	80	

Aat II	gacgt/c	1	1(5384)	1	5385(2193)	2
Afl III	a/crygt	1	1(7195)	1	7196(382)	2
AlwN I	cagnnn/ctg	1	1(6781)	1	6782(796)	2
Ava I	c/ycgrg	1	1(2186)	2	2187(5391)	1
Ban II	grgcy/c	1	1(379)	2	380(7198)	1
Bbe I	ggcgc/c	1	1(5080)	1	5081(2497)	2
Bgl II	a/gatct	1	1(758)	2	759(6819)	1
Bsa I	ggtctc	1/5	1(6235)	1	6236(1342)	2
Ecl136 I	gag/ctc	1	1(379)	2	380(7198)	1
EcoO109 I	rg/gnccy	1	1(5326)	1	5327(2251)	2
Ehe I	ggc/gcc	1	1(5080)	1	5081(2497)	2
Esp I	gc/tnagc	1	1(4878)	1	4879(2699)	2
Gsu I	ctggag	16/14	1(6217)	1	6218(1360)	2
Kas I	g/gcgc	1	1(5080)	1	5081(2497)	2
Nar I	gg/cgcc	1	1(5080)	1	5081(2497)	2
Nde I	ca/tatg	1	1(5132)	1	5133(2445)	2
Pac I	ttaat/taa	1	1(4442)	1	4443(3135)	2
Sac I	gagct/c	1	1(379)	2	380(7198)	1
Sca I	agt/act	1	1(5824)	1	5825(1753)	2
Sna I	gta/tac	1	1(3882)	1	3883(3695)	2
Spe I	a/ctagt	1	1(655)	2	656(6922)	1
Sse8337 I	cctgca/gg	1	1(666)	2	667(6911)	1
Sty I	c/cwggg	1	1(3807)	1	3808(3770)	2
Tth111 I	gacn/nngtc	1	1(3896)	1	3897(3681)	2
Xba I	t/ctaga	1	1(755)	2	756(6822)	1
Xca I	gta/tac	1	1(3882)	1	3883(3695)	2
Asp718	g/gtacc	2	1(385)	3	386(3028)	2
Bgl I	gccnnnn/nggc	2	1(5065)	1	5066(1118)	3
BsaA I	yac/gtr	2	1(1838)	2	1839(1138)	3
BspM I	acctgc	4/8	1(665)	2	666(6899)	1
Cla I	at/cgat	2	1(748)	2	749(121)	3
Drd I	gacnnnn/nngtc	2	1(5218)	1	5219(1869)	2
EcoR V	gat/atc	2	1(751)	3	752(2740)	2
Kpn I	ggtac/c	2	1(385)	3	386(3028)	2
Nsi I	atgca/t	2	1(2192)	2	2193(876)	3
PflM I	ccannnn/ntgg	2	1(3739)	1	3740(131)	3
Sal I	g/tcgac	2	1(661)	2	662(6907)	1
SnaB I	tac/gta	2	1(1838)	2	1839(1138)	3
Sph I	gcatg/c	2	1(673)	3	674(2393)	2
Xmn I	gaann/nnttc	2	1(1865)	3	1866(3838)	1
Acc I	gt/mkac	3	1(661)	3	662(3221)	2
Age I	a/ccggt	3	7569(9)	4	3225(123)	4
Aha II	gr/cgyc	3	1(5080)	1	5081(304)	4
ApaL I	g/tgcac	3	5767(1811)	2	5385(382)	3
BstB I	tt/cgaa	3	1(5138)	1	5139(497)	4
BstE II	g/gtnacc	3	6882(696)	3	5636(1246)	2
Dra I	ttt/aaa	3	1(1480)	2	1481(1293)	4
Eae I	y/ggccr	3	4221(3357)	1	2774(1447)	3
EcoR I	g/aattc	3	1(3227)	1	3228(674)	4
Gdi II	yggccg	-5/-1	4585(2993)	2	3902(683)	3
Hae I	wgg/ccw	3	1(5727)	1	5728(692)	3
Hpa I	gtt/aac	3	6439(1139)	2	6420(19)	4
Pst I	ctgca/g	3	1(4927)	1	4928(987)	3
			7357(221)	4	5915(1442)	2
			1(373)	3	374(369)	4
			3123(4455)	1	743(2380)	2
			1(4927)	1	4928(987)	3
			7357(221)	4	5915(1442)	2
			1(6719)	1	6720(452)	2
			7183(395)	3	7172(11)	4
			1(2480)	2	2481(678)	3
			3438(4140)	1	3159(279)	4
			1(667)	3	668(2601)	2
			7563(15)	4	3269(4294)	1

圖 25. pFX7 DNA 的內核甘酸酶(endonuclease)切點彙整。endonuclease 的名稱、切割位子及切割點數目、切割後 DNA 片段大小的序列，以切割點的數目為彙整。(接下頁)。

(接上頁)

Pvu I	cgat/cg		3	1(2715) 1	2716(2324) 2	5040(896) 4
				5936(1642) 3		
Pvu II	cag/ctg		3	1(3265) 1	3266(1744) 3	5010(2364) 2
				7374(204) 4		
Xcm I	ccannnnn/nnntgg		3	1(508) 2	509(257) 4	766(417) 3
				1183(6395) 1		
Ava II	g/gwcc		4	1(521) 4	522(1569) 2	2091(3853) 1
				5944(222) 5	6166(1412) 3	
BceF I	acggc	12/13	4	1(1346) 3	1347(3262) 1	4609(321) 5
				4930(1781) 2	6711(867) 4	
Fsp I	tgc/gca		4	1(1419) 3	1420(512) 5	1932(3128) 1
				5060(1023) 4	6083(1495) 2	
Mme I	tccrac	20/18	4	1(2740) 1	2741(1651) 3	4392(2430) 2
				6822(184) 5	7006(572) 4	
Ssp I	aat/att		4	1(940) 3	941(662) 5	1603(3130) 1
				4733(768) 4	5501(2077) 2	
Ase I	at/taat		5	1(22) 6	23(4423) 1	4446(1686) 2
				6132(1235) 3	7367(59) 5	7426(152) 4
Bbs I	gaagac	2/6	5	1(226) 4	227(24) 6	251(147) 5
				398(1152) 2	1550(1054) 3	2604(4974) 1
Bsp1286 I	gdgch/c		5	1(379) 5	380(4759) 1	5139(497) 4
				5636(85) 6	5721(1161) 2	6882(696) 3
BspH I	t/catga		5	1(3029) 1	3030(1033) 4	4063(1300) 2
				5363(105) 6	5468(1008) 5	6476(1102) 3
Cfr10 I	r/ccggy		5	1(220) 5	221(3004) 1	3225(123) 6
				3348(603) 4	3951(2272) 2	6223(1355) 3
Ear I	ctcttc	1/4	5	1(133) 6	134(1914) 2	2048(2978) 1
				5026(488) 4	5514(1804) 3	7318(260) 5
HgiA I	gwgw/c		5	1(379) 5	380(4759) 1	5139(497) 4
				5636(85) 6	5721(1161) 2	6882(696) 3
Nsp I	rcatg/y		5	1(673) 5	674(2393) 1	3067(701) 4
				3768(1511) 3	5279(1917) 2	7196(382) 6
Nsp7524 I	r/catgy		5	1(673) 5	674(2393) 1	3067(701) 4
				3768(1511) 3	5279(1917) 2	7196(382) 6
NspC I	rcatg/y		5	1(673) 5	674(2393) 1	3067(701) 4
				3768(1511) 3	5279(1917) 2	7196(382) 6
Bcn I	ccs/gg		6	1(2530) 2	2531(2704) 1	5235(35) 7
				5270(501) 5	5771(351) 6	6122(696) 4
				6818(760) 3		
Eco57 I	ctgaag	16/14	6	1(1225) 2	1226(291) 6	1517(31) 7
				1548(1031) 4	2579(3042) 1	5621(1048) 3
				6669(909) 5		
Hind III	a/agctt		6	1(679) 3	680(450) 4	1130(1953) 2
				3083(231) 6	3314(342) 5	3656(3899) 1
				7555(23) 7		
Nci I	cc/sgg		6	1(2530) 2	2531(2704) 1	5235(35) 7
				5270(501) 5	5771(351) 6	6122(696) 4
				6818(760) 3		
Ple I	gagtc	4/5	6	1(248) 7	249(447) 5	696(1333) 2
				2029(4280) 1	6309(517) 3	6826(471) 4
				7297(281) 6		
BsaJ I	c/cnngg		7	1(737) 5	738(1793) 2	2531(143) 7
				2674(1134) 4	3808(1154) 3	4962(2074) 1
				7036(421) 6	7457(121) 8	
BsiE I	cgry/cg		7	1(218) 7	219(2497) 1	2716(2324) 2
				5040(747) 4	5787(149) 8	5936(923) 3
				6859(424) 5	7283(295) 6	

(接下頁)

(接上頁)

Hga I	gacgc	5/10	7	1(235) 8 1553(3656) 1 6517(578) 4	236(1071) 2 5209(558) 5 7095(483) 6	1307(246) 7 5767(750) 3
Mcr I	c/grycg		7	1(218) 7 5040(747) 4 6859(424) 5	219(2497) 1 5787(149) 8 7283(295) 6	2716(2324) 2 5936(923) 3
Ban I	g/gyrcc		8	1(385) 5 3453(165) 7 5081(1274) 2	386(3028) 1 3618(336) 6 6355(1097) 4	3414(39) 9 3954(1127) 3 7452(126) 8
BsmA I	gtctc	1/5	8	1(769) 3 1852(265) 7 5319(153) 8	770(404) 6 2117(3149) 1 5472(765) 4	1174(678) 5 5266(53) 9 6237(1341) 2
BstY I	r/gatcy		8	1(758) 5 5661(17) 7 6458(86) 6	759(2421) 2 5678(768) 4 6544(11) 9	3180(2481) 1 6446(12) 8 6555(1023) 3
Hinc II	gty/rac		8	1(661) 4 3039(120) 7 4793(33) 8	662(1819) 2 3159(279) 6 4826(2743) 1	2481(558) 5 3438(1355) 3 7569(9) 9
NspB II	cmg/ckg		8	1(3265) 1 5010(194) 9 6611(245) 7	3266(864) 4 5204(466) 6 6856(518) 5	4130(880) 3 5670(941) 2 7374(204) 8
Sfe I	c/tryag		8	1(667) 5 2095(1174) 3 6740(191) 7	668(21) 8 3269(2793) 1 6931(632) 6	689(1406) 2 6062(678) 4 7563(15) 9
Eco47 III	agc/gct		9	1(1445) 2 1542(639) 3 2306(62) 9 2615(4963) 1	1446(77) 5 2181(62) 8 2368(63) 7	1523(19) 10 2243(63) 6 2431(184) 4
Sau96 I	g/gncc		9	1(109) 8 2091(2940) 1 5944(222) 7 6262(1316) 3	110(412) 5 5031(297) 6 6166(17) 10	522(1569) 2 5328(616) 4 6183(79) 9
Fau I	cccgc	4/6	10	1(272) 6 1991(28) 10 5033(160) 8 7348(57) 9	273(973) 3 2019(2709) 1 5193(10) 11 7405(173) 7	1246(745) 4 4728(305) 5 5203(2145) 2
BsiY I	ccnnnnn/nngg		11	1(255) 6 2674(1066) 4 5264(1448) 2 7157(18) 12	256(18) 11 3740(131) 10 6712(279) 5 7175(174) 8	274(2400) 1 3871(1393) 3 6991(166) 9 7349(229) 7
BstN I	cc/wgg		11	1(112) 10 821(1854) 2 3169(1794) 3 7049(121) 8	113(625) 4 2675(212) 7 4963(2073) 1 7170(288) 5	738(83) 11 2887(282) 6 7036(13) 12 7458(120) 9
EcoR II	/ccwgg		11	1(112) 10 821(1854) 2 3169(1794) 3 7049(121) 8	113(625) 4 2675(212) 7 4963(2073) 1 7170(288) 5	738(83) 11 2887(282) 6 7036(13) 12 7458(120) 9
Tth111 II	caarca	11/9	11	1(1624) 2 2418(582) 6 3651(379) 7 6583(6) 11	1625(668) 4 3000(4) 12 4030(93) 9 6589(33) 10	2293(125) 8 3004(647) 5 4123(2460) 1 6622(956) 3
Alw I	ggatc	4/5	12	1(1137) 2 3994(893) 4 5679(303) 8 6459(85) 9 6630(948) 3	1138(2042) 1 4887(774) 6 5982(464) 7 6544(12) 13	3180(814) 5 5661(18) 11 6446(13) 12 6556(74) 10
Csp6 I	g/tac		12	1(294) 9 1276(42) 13 3295(57) 12 3784(636) 6 5826(1752) 1	295(92) 10 1318(1395) 2 3352(63) 11 4420(730) 4	387(889) 3 2713(582) 7 3415(369) 8 5150(676) 5

(接下頁)。

(接上頁)

Hae II	rgcgc/y	12	1(1445) 3	1446(77) 8	1523(19)13
			1542(639) 4	2181(62)11	2243(63) 9
			2306(62)12	2368(63)10	2431(184) 7
			2615(2466) 1	5081(1871) 2	6952(370) 5
Rsa I	gt/ac	12	7322(256) 6		
			1(294) 9	295(92)10	387(889) 3
			1276(42)13	1318(1395) 2	2713(582) 7
			3295(57)12	3352(63)11	3415(369) 8
Dde I	c/tnag	13	3784(636) 6	4420(730) 4	5150(676) 5
			5826(1752) 1		
			1(2157) 1	2158(124)12	2282(125)11
			2407(1745) 2	4152(656) 3	4808(52)13
Hae III	gg/cc	13	4860(20)14	4880(266) 8	5146(235) 9
			5381(426) 6	5807(540) 5	6347(166)10
			6513(409) 7	6922(656) 4	
			1(110)10	111(257) 7	368(4561) 1
Tfi I	g/awtc	13	4929(102)11	5031(298) 5	5329(587) 2
			5916(267) 6	6183(80)12	6263(458) 3
			6721(434) 4	7155(18)13	7173(11)14
			7184(174) 9	7358(220) 8	
Mae II	a/cgt	15	1(85)10	86(78)11	164(1639) 2
			1803(93) 9	1896(328) 6	2224(62)13
			2286(63)12	2349(62)14	2411(485) 4
			2896(1506) 3	4402(454) 5	4856(2366) 1
Rma I	c/tag	15	7222(140) 8	7362(216) 7	
			1(1398) 1	1399(441) 8	1840(702) 3
			2542(436) 9	2978(602) 4	3580(18)16
			3598(470) 6	4068(502) 5	4570(50)15
Bsr I	actgg	1/-1 16	4620(171)13	4791(153)14	4944(442) 7
			5386(320)12	5706(373)11	6079(416)10
			6495(1083) 2		
			1(152)14	153(504) 6	657(100)15
Fok I	ggatg	9/13 16	757(522) 5	1279(218)13	1497(4)16
			1501(251)11	1752(251)12	2003(616) 4
			2619(407) 7	3026(1184) 2	4210(253) 9
			4463(1652) 1	6115(335) 8	6450(253)10
SfaN I	gcatac	5/9 16	6703(875) 3		
			1(508) 5	509(267) 8	776(2852) 1
			3628(348) 7	3976(60)14	4036(890) 2
			4926(26)16	4952(706) 3	5658(175)11
BstK I	c/cngtg	17	5833(264) 9	6097(43)15	6140(118)12
			6258(406) 6	6664(117)13	6781(13)17
			6794(603) 4	7397(181)10	
			1(65)17	66(505) 4	571(332) 8

(接下頁)。

(接上頁)

Dsa V	/ccngg	17	1(112)15	113(625) 4	738(83)16
			821(1710) 2	2531(144)12	2675(212)11
			2887(282) 8	3169(1794) 1	4963(272) 9
			5235(35)17	5270(501) 5	5771(351) 6
			6122(696) 3	6818(218)10	7036(13)18
Nla IV	ggn/ncc	17	7049(121)13	7170(288) 7	7458(120)14
			1(108)14	109(277) 9	386(136)12
			522(2062) 1	2584(830) 3	3414(39)17
			3453(165)11	3618(336) 7	3954(1127) 2
			5081(338) 6	5419(590) 5	6009(211)10
ScrF I	cc/ngg	17	6220(41)16	6261(94)15	6355(772) 4
			7127(39)18	7166(286) 8	7452(126)13
			1(112)15	113(625) 4	738(83)16
			821(1710) 2	2531(144)12	2675(212)11
			2887(282) 8	3169(1794) 1	4963(272) 9
Taq I	t/cga	17	5235(35)17	5270(501) 5	5771(351) 6
			6122(696) 3	6818(218)10	7036(13)18
			7049(121)13	7170(288) 7	7458(120)14
			1(371) 8	372(6)18	378(285) 9
			663(87)14	750(121)13	871(193)12
Hpa II	c/cgg	18	1064(45)16	1109(373) 7	1482(242)11
			1724(82)15	1806(969) 3	2775(628) 4
			3403(540) 5	3943(279)10	4222(1432) 2
			5654(1444) 1	7098(472) 6	7570(8)17
			1(221)10	222(1359) 1	1581(950) 3
Msp I	c/cgg	18	2531(695) 4	3226(123)13	3349(603) 5
			3952(1284) 2	5236(34)17	5270(501) 6
			5771(242) 9	6013(110)14	6123(67)16
			6190(34)18	6224(404) 8	6628(190)11
			6818(26)19	6844(147)12	6991(489) 7
Hinf I	g/antc	19	7480(98)15	222(1359) 1	1581(950) 3
			1(221)10	222(1359) 1	1581(950) 3
			2531(695) 4	3226(123)13	3349(603) 5
			3952(1284) 2	5236(34)17	5270(501) 6
			5771(242) 9	6013(110)14	6123(67)16
Hph I	ggtga	8/7 19	6190(34)18	6224(404) 8	6628(190)11
			6818(26)19	6844(147)12	6991(489) 7
			7297(65)17	7362(216) 9	
			1(223)12	224(46)14	270(2620) 1
			2890(171)13	3061(525) 4	3586(20)16
BstU I	cg/cg	20	3606(262) 9	3868(36)15	3904(17)17
			3921(10)19	3931(283) 8	4214(511) 5
			4725(571) 3	5296(9)20	5305(284) 7
			5589(15)18	5604(226)11	5830(396) 6
			6226(227)10	6453(1125) 2	
			191(26)19	217(1212) 2	
			1429(589) 3	2018(233) 9	2251(63)16
			2314(62)18	2376(63)17	2439(2123) 1
			4562(121)13	4683(528) 5	5211(103)14
			5314(2)20	5316(100)15	5416(332) 7
			5748(493) 6	6241(330) 8	6571(581) 4
			7152(198)11	7350(2)21	7352(226)10

(接下頁)。

(接上頁)

BspW I	gcnnnnn/nngc	21	1(1411) 1	1412(9)18	1421(5)22
			1426(183)10	1609(379) 9	1988(572) 6
			2560(756) 5	3316(801) 4	4117(9)19
			4126(910) 3	5036(30)17	5066(9)20
			5075(7)21	5082(50)15	5132(1052) 2
			6184(388) 8	6572(572) 7	7144(114)12
			7258(67)14	7325(84)13	7409(44)16
			7453(125)11		
Dpn I	ga/tc	22	1(759) 5	760(117)12	877(261) 9
			1138(1579) 1	2717(464) 7	3181(814) 4
			3995(869) 3	4864(24)18	4888(153)11
			5041(585) 6	5626(36)17	5662(17)20
			5679(258)10	5937(46)16	5983(18)19
			6001(341) 8	6342(105)13	6447(12)21
			6459(78)14	6537(8)23	6545(11)22
			6556(75)15	6631(947) 2	
Dpn II	/gatc	22	1(759) 5	760(117)12	877(261) 9
			1138(1579) 1	2717(464) 7	3181(814) 4
			3995(869) 3	4864(24)18	4888(153)11
			5041(585) 6	5626(36)17	5662(17)20
			5679(258)10	5937(46)16	5983(18)19
			6001(341) 8	6342(105)13	6447(12)21
			6459(78)14	6537(8)23	6545(11)22
			6556(75)15	6631(947) 2	
Mbo I	/gatc	22	1(759) 5	760(117)12	877(261) 9
			1138(1579) 1	2717(464) 7	3181(814) 4
			3995(869) 3	4864(24)18	4888(153)11
			5041(585) 6	5626(36)17	5662(17)20
			5679(258)10	5937(46)16	5983(18)19
			6001(341) 8	6342(105)13	6447(12)21
			6459(78)14	6537(8)23	6545(11)22
			6556(75)15	6631(947) 2	
Sau3A I	/gatc	22	1(759) 5	760(117)12	877(261) 9
			1138(1579) 1	2717(464) 7	3181(814) 4
			3995(869) 3	4864(24)18	4888(153)11
			5041(585) 6	5626(36)17	5662(17)20
			5679(258)10	5937(46)16	5983(18)19
			6001(341) 8	6342(105)13	6447(12)21
			6459(78)14	6537(8)23	6545(11)22
			6556(75)15	6631(947) 2	
Nla III	catg/	24	1(518) 5	519(156)12	675(46)20
			721(46)21	767(483) 7	1250(108)14
			1358(1673) 1	3031(37)22	3068(701) 3
			3769(130)13	3899(63)19	3962(102)16
			4064(168)11	4232(422) 8	4654(626) 4
			5280(84)17	5364(105)15	5469(393) 9
			5862(36)23	5898(78)18	5976(10)25
			5986(491) 6	6477(720) 2	7197(346)10
			7543(35)24		
Bbv I	gcagc	8/12 25	1(1196) 1	1197(226)13	1423(571) 5
			1994(284)11	2278(125)17	2403(389) 7
			2792(305)10	3097(108)18	3205(63)22
			3268(3)25	3271(243)12	3514(600) 4
			4114(876) 2	4990(73)20	5063(213)14
			5276(611) 3	5887(366) 8	6253(328) 9
			6581(206)15	6787(3)26	6790(65)21
			6855(419) 6	7274(18)23	7292(81)19
			7373(189)16	7562(16)24	

(接下頁)。

(接上頁)

Mnl I	cctc	7/7	25	1(132)14	133(61)20	194(39)23
				233(11)26	244(18)25	262(108)17
				370(129)16	499(528) 5	1027(162)13
				1189(84)18	1273(455) 6	1728(1034) 2
				2762(758) 3	3520(1509) 1	5029(260) 9
				5289(42)22	5331(611) 4	5942(206)12
				6148(130)15	6278(81)19	6359(400) 7
				6759(267) 8	7026(57)21	7083(226)11
				7309(33)24	7342(236)10	
				Mae III	/gtnac	
478(1110) 2	1588(1118) 1	2706(185)16				
2891(338) 5	3229(257)11	3486(99)23				
3585(318) 7	3903(19)29	3922(104)22				
4026(61)25	4087(293) 8	4380(206)13				
4586(202)14	4788(110)21	4898(51)27				
4949(20)28	4969(291) 9	5260(388) 4				
5648(188)15	5836(153)17	5989(58)26				
6047(331) 6	6378(283)10	6661(116)20				
6777(63)24	6840(738) 3					
Mbo II	gaaga	8/7	28	1(134)18	135(92)20	227(25)28
				252(147)17	399(953) 1	1352(198)14
				1550(313)10	1863(30)25	1893(155)16
				2048(28)26	2076(276)11	2352(226)13
				2578(27)27	2605(471) 6	3076(51)23
				3127(348) 8	3475(618) 4	4093(384) 7
				4477(3)29	4480(44)24	4524(325) 9
				4849(177)15	5026(488) 5	5514(109)19
				5623(78)22	5701(755) 3	6456(91)21
				6547(771) 2	7318(260)12	
Hha I	gcg/c		32	1(189)10	190(1231) 2	1421(26)31
				1447(77)21	1524(19)33	1543(390) 4
				1933(200) 9	2133(49)28	2182(62)26
				2244(63)24	2307(62)27	2369(63)25
				2432(184)11	2616(1947) 1	4563(119)15
				4682(379) 5	5061(21)32	5082(130)14
				5212(103)17	5315(100)18	5415(332) 7
				5747(337) 6	6084(93)20	6177(393) 3
				6570(109)16	6679(174)12	6853(100)19
				6953(67)22	7020(270) 8	7290(33)29
HinP I	g/cgc		32	7323(28)30	7351(65)23	7416(162)13
				1(189)10	190(1231) 2	1421(26)31
				1447(77)21	1524(19)33	1543(390) 4
				1933(200) 9	2133(49)28	2182(62)26
				2244(63)24	2307(62)27	2369(63)25
				2432(184)11	2616(1947) 1	4563(119)15
				4682(379) 5	5061(21)32	5082(130)14
				5212(103)17	5315(100)18	5415(332) 7
				5747(337) 6	6084(93)20	6177(393) 3

(接下頁)。

(接上頁)

Fnu4H I	gc/ngc	36	1(186)16	187(94)26	281(916) 1
			1197(226)13	1423(571) 3	1994(284)10
			2278(125)19	2403(389) 5	2792(305) 8
			3097(108)22	3205(63)30	3268(3)35
			3271(243)11	3514(102)24	3616(498) 4
			4114(18)32	4132(858) 2	4990(73)28
			5063(104)23	5167(109)21	5276(287) 9
			5563(229)12	5792(95)25	5887(27)31
			5914(339) 6	6253(328) 7	6581(206)14
			6787(3)36	6790(65)29	6855(143)18
			6998(155)17	7153(118)20	7271(3)37
			7274(18)33	7292(81)27	7373(189)15
			7562(16)34		
Alu I	ag/ct	42	1(150)17	151(230)13	381(300) 7
			681(27)37	708(22)38	730(401) 5
			1131(80)28	1211(200)16	1411(14)43
			1425(74)29	1499(95)24	1594(402) 4
			1996(284) 9	2280(125)20	2405(386) 6
			2791(257)10	3048(36)35	3084(123)21
			3207(60)32	3267(48)33	3315(201)15
			3516(141)19	3657(15)42	3672(144)18
			3816(300) 8	4116(767) 1	4883(35)36
			4918(93)26	5011(245)12	5256(19)41
			5275(679) 2	5954(63)31	6017(100)23
			6117(521) 3	6638(257)11	6895(46)34
			6941(90)27	7031(226)14	7257(118)22
			7375(64)30	7439(95)25	7534(22)39
			7556(22)40		
Mse I	t/taa	42	1(23)36	24(55)28	79(240)11
			319(272) 9	591(396) 5	987(11)40
			998(12)39	1010(23)37	1033(62)26
			1095(6)41	1101(26)35	1127(199)14
			1326(760) 2	2086(396) 6	2482(503) 3
			2985(27)34	3012(79)24	3091(69)25
			3160(30)33	3190(249)10	3439(474) 4
			3913(94)23	4007(196)16	4203(133)20
			4336(107)21	4443(4)43	4447(212)13
			4659(40)31	4699(104)22	4803(176)18
			4979(197)15	5176(181)17	5357(372) 7
			5729(365) 8	6094(39)32	6133(235)12
			6368(53)29	6421(14)38	6435(5)42
			6440(52)30	6492(876) 1	7368(59)27
			7427(151)19		

1117 sites found

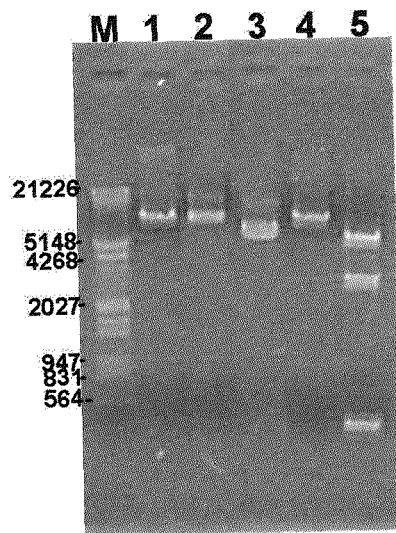


圖 26:以 agarose gel 分析 pFX7 的長度大小·經由 PCR 所構築的 pFX7 DNA 以 0.7% agarose 確定其長度，並 self-ligation 轉殖至 *E.coli* 後，以 restriction mapping 確定其正確性。Lane 1：7.6 Kb 的 DNA maker。Lane 2：p FX7 PCR 產物，約 7.6 Kb。Lane 3：轉殖 *E.coli* 後經 miniprep 萃取 p FX7 DNA，未切的 circular form DNA 約 5 Kb。隨後以 SPE I 切出約 7.6 Kb DNA 長度(Lane 4)及 EcoR I 切出 4,828、2,830、369 bp 三段 DNA(Lane 5)。

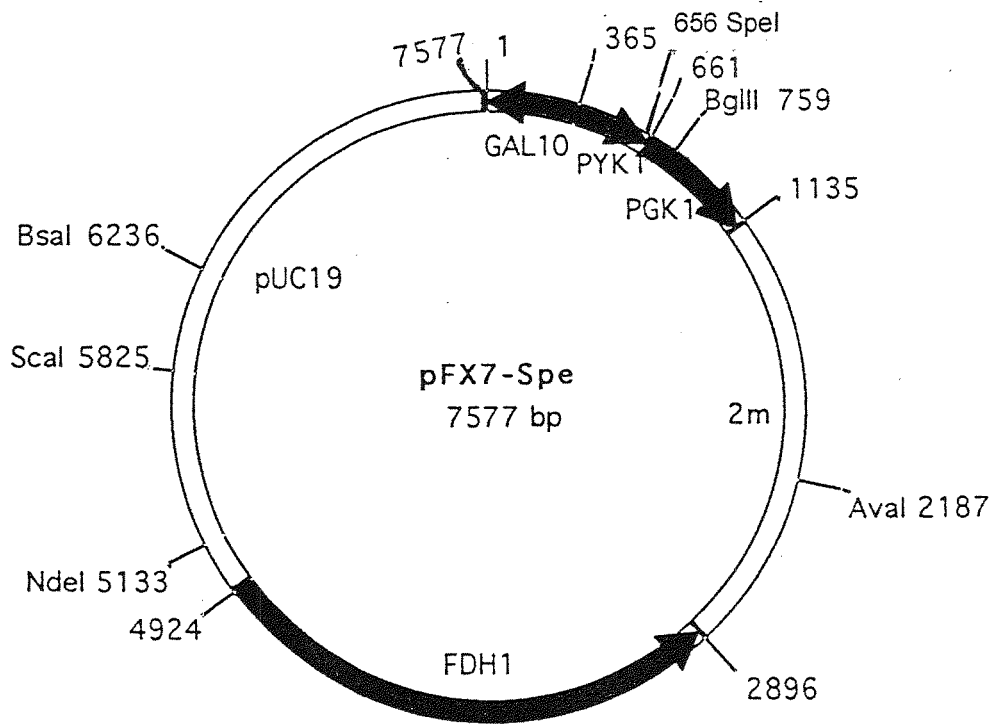


圖 27.pFX7 的 genome map。利用電腦程式(DNA strider)將定序後的 GAL10 基因、PYK1 基因、PGK1 基因、2m 基因、FDH1 基因及 pUC19 基因組裝為 pFX7 整個基因組(genome)而繪出其 map。

表 1：酵母菌細胞液(INVSC1)及表達人類 JCV VP1 蛋白質的酵母菌細胞液 (INVSC1/JCV VP1)與人類 O 型紅血球反應的血液凝集特性。

細胞液(lysate)	血液凝集活性(HA)
INVSC1 yeast	0
INVSC1/JCV VP1	20×2^{11}

表 2: Primers used for PCR generation of C1 to C6 VP1 mutants

peptide	primer	sequence (5' to 3')
JCV1 C1S	sense	GAGGTAGAAGGCTTTTAACTCC
JCV1 C1AS	antisense	TGTCTCCATCTTCCGAAAAATTG
JCV1 C2S	sense	GCTTCCTGGTTACAGTGTGGCCAG
JCV1 C2AS	antisense	GTACGAAGGACCAATGTCACAC
JCV1 C3S	sense	CTAACTGGTGGAAATATACTAATG
JCV1 C3AS	antisense	CTCCTAGATTGACCACCTTTATATG
JCV1 C4S	sense	CCTGTTGAAGGTTGGGTTCTG
JCV1 C4AS	antisense	CGTATAGGACAACCTCCAACCCAAG
JCV1 C5S	sense	GGGCCACTTGGCAAAGGTGACAAC
JCV1 C5AS	antisense	CAACCCGGTGAACCTTTTCCACTG
JCV1 C6S	sense	GTTGATGTTGGTGGCATGTTTACT
JCV1 C6AS	antisense	GTCGACAACCTACAACCACCGTAC

*Underline: The mutated of C1 to C6 VP1 proteins

日期	88.01.11
姓名	蔡榮
單位	醫務

表 3: Primers used for PFX7-JCVP1 sequencing

N0.	Name	Sequence (5'→3')	Polarity	Location
1.	JCV1 AS7	CCTCTGTAATTGAGCC	antisense	JCVP1
2.	JCV1C6S	GTTGATGTTGGTGGCATG TTTACT	sense	JCVP1
3.	PFXAS1	CCATAGGATGATAATGCGAT	sense	GAL10
4.	PFXS1	CTTTCCCCATCCTTTACAG	sense	PGK1
5.	PFXS2	GAAACGCTTTGAAG	antisense	2 μ
6.	PFXS3	GGCGATTAAGTTGGG	sense	pUC19
7.	PFXS4	CGCGGGAAGTGGAG	antisense	2 μ
8.	PFXS5	CCGTAAAGCGCTAGACT	antisense	2 μ