

# 科技部補助

## 大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計 畫 \*  
\* : DnaD 與 DNA 結合模式之研究 \*  
\* 名 稱 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 呂欣頻  
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-016-B  
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月  
指導教授： 黃晟洋

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 103年03月27日

# 目 錄

目錄.....	I
摘要.....	II
第一章 簡介	
1-1 前言(含研究動機).....	1
1-2 文獻探討.....	2
1-3 研究方法.....	4
第二章 結論.....	10
參考文獻.....	18

## 摘要

細菌在 DNA 複製過程中，常因 DNA 損傷等原因而造成 DNA 複製程序意外的停止；經過 DNA 修復後，停滯的複製又可藉由其獨特的「重啟複製之引子合成體」(replication restart primosome)重新啟動，且人類並無此系統。革蘭氏陽性菌的引子合成體是一個核酸與蛋白質群的複合體 (DNA-protein complex)，包含了 PriA、DnaD、DnaB loader、DnaI loader、DnaC helicase、DnaG primase、SSB 等至少七個相關蛋白質，其功能是在複製叉上有次序的聚集並組裝，以重新啟動 DNA 複製程序。DnaD 已知為一 DNA 結合蛋白質，然其 DNA 結合模式、特異性與如何與 PriA 結合並不清楚。在此計劃，我們首先利用基因選殖與蛋白質純化技術來得到金黃色葡萄球菌 DnaD 重組蛋白質，並利用電泳遲滯法(EMSA)來分析其與不同序列、不同長度與不同結構的 DNA 之結合性質。接著我們將構築不同片段的 DnaD 並分析其各片段之 DNA 結合性質，同時並使用膠體過濾法(gel filtration)來分析其四級結構。透過螢光淬滅法分析 DnaD 片段與 DNA 的結合活性與結合位大小。

# 第一章 簡介

## 1-1 前言 (含研究動機)

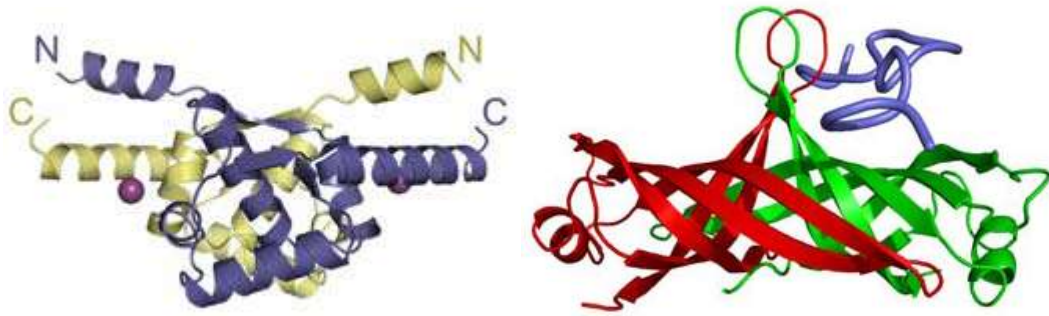
近來由於許多細菌的基因已被全定序，我們得以開始比較不同細菌其 DNA 複製的差異性。細菌在 DNA 複製過程中，常因 DNA 損傷等原因而造成 DNA 複製程序意外的停止，經過 DNA 修復後，停滯的複製又可藉由「重啟複製之引子合成體」重新啟動。目前分子生物學中，我們對大腸桿菌的重啟 DNA 複製模式相對較為了解：革蘭氏陰性菌的重啟複製引子合成體包括了 PriA、PriB、PriC、DnaT、DnaC、DnaB、DnaG 與 SSB 等八個蛋白質，已知這些基因任一產生缺失皆對細菌的生長造成嚴重的影響。然而令人驚訝的是，經過搜尋後許多的細菌並不含有 PriB、PriC、DnaT 與 DnaC，因此產生一個重要的問題：這麼重要的重啟複製的系統為何並不保留於細菌間，到底大腸桿菌本身是特例，還是有什麼演化上的共通性。

過去的研究發現，革蘭氏陽性菌的引子合成體包含了 PriA、DnaD、DnaB loader、DnaI loader、DnaC helicase、DnaG primase、SSB 等七個蛋白質，非常不同於革蘭氏陰性菌。革蘭氏陰性菌的 PriB 與革蘭氏陽性菌的 DnaD 雖皆為第二個結合至停滯複製叉上的引子合成體蛋白質，然其胺基酸序列卻大不相同，且其結構與功能亦無相關性可言。之前我們實驗室雖已解出 PriB 與部份 DnaD 片段(N-terminal domain) 的結晶結構，仍無法論定為何同是細菌，革蘭氏陰性菌與革蘭氏陽性菌卻需要用不同的複製重啟蛋白質來重啟複製，很大的原因之一就是因為 DnaD 的 DNA 結合模式仍未有系統性的探討。我們相信藉由此計畫對 DnaD 其 DNA 結合模式做完整的研究之後，能初步的比較其引子合成體在第二步驟的聚集過程中有何不同，以便了解這些蛋白質是如何的在複製叉上有次序的相互辨識並重新啟動 DNA 的複製：演化出不同的引子合成體，但最終卻執行一樣的功能。

## 1-2 文獻探討

DNA 複製對任何生物皆為必須，然細菌不像許多真核生物有即時的 DNA 修復系統，細菌對於紫外光或其他化學物質等都非常敏感，一有狀況其 DNA 複製馬上就陷入停滯，進而影響細胞分裂與生長。在 DNA 損害修復後，此時細菌內的 PriA 蛋白質會馬上偵測此停滯的叉型 DNA 並啟動引子合成體來重啟 DNA 繼續複製。目前絕大部分原核生物 DNA 複製又重啟機制都是以革蘭氏陰性菌的大腸桿菌作為模型，其引子合成體包含了 PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaC, DnaB, DnaG 與 SSB 蛋白質等八個蛋白質。然而，最近有其他的引子合成體被發現於革蘭氏陽性菌中如枯草桿菌，其包括了 PriA、DnaD、DnaB、DnaI、DnaC、DnaG、SSB 等七個相關蛋白質。有趣的是，這些蛋白質雖在大腸桿菌的模型中顯示極度的重要且缺一不可，但在不同的細菌(大致粗分為革蘭氏陰性與陽性菌)，竟相當的不同，例如第一個聚集於 PriA-複製叉複合體的蛋白質，在革蘭氏陰性菌為 PriB，而在革蘭氏陽性菌者為 DnaD。另外，甚至亦發現同時沒有 PriB 與 DnaD 者，如綠膿桿菌等。因此雖然大腸桿菌的引子合成體聚集機制已被初步推測為各引子合成體蛋白質利用換手機制(hand-off) 結合上 PriA，但在不含相關蛋白質卻亦能重啟 DNA 複製的細菌，如革蘭氏陽性菌的金黃色葡萄球菌與枯草桿菌，到底是用何機制頗耐人尋味。而第一個不同的點就是革蘭氏陽性菌是使用 DnaD 取代了 PriB。

雖然 PriB 與 DnaD 皆為雙套體蛋白質且可與自身各別的 PriA 作用，然他們卻沒有任何的胺基酸序列相似度。不同於 PriB 擁有大概 100 個胺基酸，DnaD 是一個 PriB 兩倍大、擁有大約 200 個胺基酸的蛋白質。我們之前已解出 PriB 全長與 DnaD 其 N 端含有 120 個胺基酸功能區的結晶結構：PriB 為 OB-fold 結構，而 DnaD 為 winged-helix fold 結構；兩者分子構造完全無相似性可言（圖一）。因此，無法利用比較結構的方法分辨出是何區域用於結合 PriA 與複製叉 DNA。為了要達到本計畫之目標，第一步就是要研究 DnaD 是如何參與此引子合成體的組裝，以便了解在演化過程中不同結構、序列與功能的蛋白質是如何執行相似的任務，在複製叉上有次序的相互辨識並最終載入解旋酶與引子合成酶，重新啟動 DNA 的複製程序。



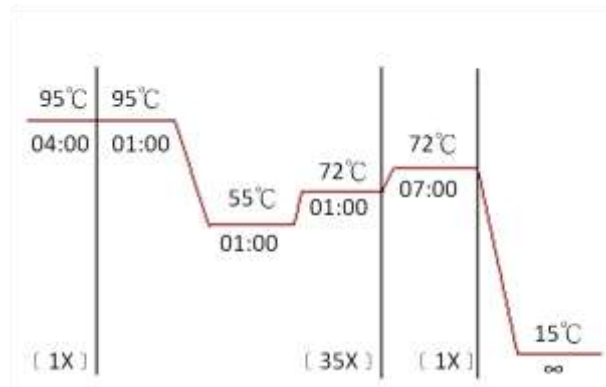
圖一：雙套體 DnaD 其 N 端 120 個胺基酸功能區(左圖)與 PriB 全長(右圖)的結晶結構。DnaD 為 winged-helix fold 結構，幾乎為  $\alpha$ -helix 蛋白質；而 PriB 為 OB-fold 結構，幾乎皆  $\beta$ -sheet。右圖藍色圖示為 DNA 骨架。

## 1-3 研究方法

### 1.1 金黃色葡萄球菌之 DnaD 蛋白質取得

#### 1.1.1 聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應所使用之儀器為 Bio-Rad Thermocycler。實驗進行反應條件如下：



實驗使用材料條件如下：

- (1) 84  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O
- (2) 10  $\mu$ l 的 10X PCR buffer
- (3) 2  $\mu$ l 的 10mM 三磷酸去氧核糖核苷酸 (dNTPs)
- (4) 1  $\mu$ l 的 10  $\mu$ M 5'端引子與 1  $\mu$ l 的 10  $\mu$ M 3'端引子
- (5) 1  $\mu$ l 的金黃球菌原菌菌液當模板 (Template)
- (6) 1  $\mu$ l 的 *Thermus aquaticus* 聚核酶酵素 (*Taq* polymerase)

取 4  $\mu$ l 內容產物與 1  $\mu$ l 的 6X loading dye 混合均勻後，注入到 1% 瓊脂膠 (0.5X TAE buffer and 1% agarose) 內進行電泳 (electrophoresis)，於 0.5X TAE buffer，電流 100 V 跑膠 30 分鐘，EtBr 染色 10~20 分鐘後用紫外光照膠確認內容產物是否正確。接著以 PCR clean up kit 進行產物的純化，其步驟如下：

- (1) 將PCR產物與5倍體積的Buffer PX混合均勻
- (2) 將混合好的反應物加入進column，以13000 rpm 離心1分鐘
- (3) 加入500  $\mu$ l的Buffer WF，以13000 rpm 離心1分鐘
- (4) 加入500  $\mu$ l的Buffer WS，以13000 rpm 離心1分鐘
- (5) 之後再以13000 rpm 離心3分鐘 (將WS buffer內的ethanol分離乾淨)
- (6) 最後加入50  $\mu$ l的elution buffer以以13000 rpm 離心2分鐘，完成  
PCR clean up

## 1.2 表現質體 pET21b-SaDnaD 之製備

實驗步驟如下：

- (1) 將PCR純化後之產物以及質體抽取後之產物以限制酶*EcoRI*和*HindIII*進行剪切，反應條件為4  $\mu$ l的酵素、6  $\mu$ l的10X *EcoRI* buffer、42  $\mu$ l的產物，混合均勻後置於37 °C培養箱中反應16小時。
- (2) 將剪切完成的基因片段依PCR clean up步驟操作，除去剪切下來的多於小片段，以免妨礙接合作用。
- (3) 將剪切完成的質體依gel extractin步驟操作，除去剪切下來的多於小片段，以免妨礙接合作用。gel extractin實驗步驟如下：
  - a. 將質體和6X loading dye混合均勻，注入到1%瓊脂膠內進行電泳，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物大小。
  - b. 將正確大小之質體片段連同膠體一起切下，置於ependorf中秤重，如果膠體重



量為0.2g，則加入200  $\mu$ l的capture buffer type 3，以此類推。

- c. 之後加熱60  $^{\circ}$ C，10分鐘，將ependorf內之膠體完全溶解。
- d. 將ependorf內之液體取出加入GFX column中，置於室溫反應1分鐘後，再以13000 rpm 離心1分鐘。
- e. 於column內加入500  $\mu$ l的Wash buffer type 1，以13000 rpm 離心30秒。
- f. 再以13000 rpm 離心1分鐘（將Wash buffer中的ethanol分離乾淨）。
- g. 最後加入50  $\mu$ l的elution buffer以以13000 rpm 離心2分鐘，完成gel extractin。

(4) 將純化過的基因產物及質體混合，以亮度3:1的比例進行接合作用。反應條件為0.5  $\mu$ l的T4 DNA ligase 和3.5  $\mu$ l的10X ligase buffer，以總體積4  $\mu$ l在4 $^{\circ}$ C冰箱中反應16小時。

### 1.3 質體轉型作用

實驗步驟如下：

- (1) 取100  $\mu$ l之經過特殊處理的大腸桿菌勝任細胞 (ECOS<sup>TM</sup>101) 和上述已經處理好的 clone反應物5  $\mu$ l混合均勻。
- (2) 之後置於42  $^{\circ}$ C反應45秒進行熱衝擊 (heat shock)，使質體易於被大腸桿菌吸收進入體內。
- (3) 隨即置於冰上1分鐘，而後將菌液均勻塗抹在LB培養盤，放置於37  $^{\circ}$ C培養箱，直到長出菌落。
- (4) 之後進行質體抽取動作，以限制酶EcoRI和HindIII將產物處理後，置於37  $^{\circ}$ C培養箱，

反應時間2小時。質體抽取實驗步驟如下：

- a. 將含有pET21b質體之單一菌落取下，加入含4  $\mu$ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml LB培養液中，置於37 °C培養箱，震盪培養約16小時至OD1.3。
  - b. 之後將菌液以12000 rpm 離心1分鐘，去除上清液。
  - c. 加入250  $\mu$ l的Solution I將離心下來的菌塊溶散，並置在冰上2分鐘。
  - d. 加入250  $\mu$ l的Solution II，用手緩慢搖晃均勻，並置於室溫1分鐘。
  - e. 加入250  $\mu$ l的Solution III，慢慢混合均勻，置室溫反應1分鐘。
  - f. 以11000 rcf 離心10分鐘，然後將上清液取出（避免打散底部白色菌塊）。
  - g. 取出的上清液放進column中靜置3分鐘，再以6300 rcf 離心1分鐘。
  - h. 將column下方之離心液體除去，再加入500  $\mu$ l Wash solution至column中，以7200 rcf 離心1分鐘（此步驟兩次）。
  - i. 以8800 rcf 空轉離心2分鐘（將Wash solution中的ethanol分離乾淨）。
  - j. 最後加入50  $\mu$ l的elution buffer，置在37 °C培養箱反應10分鐘，再以8800 rcf 離心2分鐘，完成質體抽取。
- (5) 取4  $\mu$ l內容產物與1  $\mu$ l的6X loading dye混合均勻，注入到1%瓊脂膠內進行電泳，於0.5X TAE buffer，電流100 V跑膠30分鐘，EtBr染色10~20分鐘後用紫外光照膠確認內容產物是否正確。若clone成功則可看見質體與StALLase的兩種不同大小片段。
- (6) 經定序確認結果無誤，至此完成Sa DnaD clone的製備。

## 1.4 蛋白質表現與純化

實驗步驟如下：

- (1) 將上述轉型之plate用挑菌棒取出單一菌落，加入含4  $\mu$ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml LB培養液中，置於37  $^{\circ}$ C培養箱，震盪培養約16小時至OD1.3，以12000 rpm 離心1分鐘收集在ependorf，再用400  $\mu$ l LB培養液和150  $\mu$ l 50% glycerol回融製成stock (保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱)。
- (2) 從stock中取出10  $\mu$ l，加入含4  $\mu$ l 100 mg/ml ampicillin的4 ml  $\mu$ l LB培養液中，置於37  $^{\circ}$ C培養箱，震盪培養約4小時至OD1.3，再加進含150  $\mu$ l 100 mg/ml ampicillin的500 ml LB培養液中，置於37  $^{\circ}$ C培養箱，震盪培養約5小時後，加入125  $\mu$ l 1M IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)，並繼續培養約8小時。
- (3) 之後以高速離心機 (Beckman)14000 rpm於4  $^{\circ}$ C低溫離心20分鐘。
- (4) 除去上清液，以5 mM imidazole將底部菌塊回融。
- (5) 以超音波破碎機 (sonicator) 將溶於5 mM imidazole內的菌體打碎。
- (6) 以12000 rpm於4  $^{\circ}$ C低溫離心20分鐘，收集上清液。
- (7) 以親和性管柱 (column HisTrap<sup>TM</sup>HP) 方式做純化。
- (8) 純化出的蛋白質以跑SDS-PAGE進行確認。

## 1.5 EMSA

實驗步驟如下：

- (1) 配置十種不同濃度的蛋白質，並與label上放射線物質<sup>32</sup>P的核甘酸反應1小時。
- (2) 加入3  $\mu$ l native dye於sample中，跑9% Native Page。
- (3) 取膠:將玻璃片一氣呵成的拆開，將膠的兩側先切過，再把膠黏在事先準備好的紙片上，最後再鋪上一層保鮮膜，放入乾膠機內40分鐘。

(4) 用IP板壓已乾好的膠2~3小時。

(5) 照膠。

## 1.6 蛋白質透析

實驗使用之透析膜為Thermo Snake Skin<sup>®</sup> Pleated Dialysis Tubing。操作步驟如下：

(1) 剪下適當長度後，將透析膜浸濕於ddH<sub>2</sub>O，2分鐘。

(2) 要確定蛋白質是否適用於置換之buffer，避免產生沈澱。

(3) 將透析膜浸濕於要置換之buffer，2分鐘。

(4) 將透析膜延展拉平，並先用長型夾子夾住下端，放入欲置換buffer之蛋白質，將上端用長型夾子夾住，並預留約1公分之置換膨脹空間。

(5) 根據置換蛋白質之體積不同，使用不同的置換buffer之體積，如20 ml之蛋白質則須置於1000 ml之buffer。

(6) 將蛋白質懸掛於欲置換之buffer中，並藉磁石攪動buffer，轉速約500 rpm，並置於4 °C環境下作用4小時，即完成蛋白質透析。

## 1-7 利用螢光光譜儀分析DnaD蛋白質與小分子(DNA)交互作用

本篇研究所使用的螢光光譜儀型號為 Hitachi F-2700，總反應體積為2000  $\mu$ l，實驗條件如下：

(1) 用螢光淬滅現象偵測DnaD與不同濃度DNA之作用情況

a. 反應環境之緩衝液：20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0

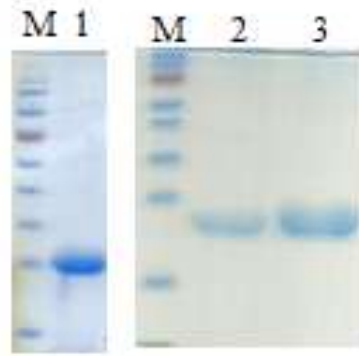
b. DnaD濃度：8.4372 mg/ml

- c. DNA 滴定濃度：0 至 80 mM
- d. 偵測間隔時間：2 分鐘
- e. 反應環境溫度：25 °C
- f. 偵測波長 (ex/em)：278/330 nm

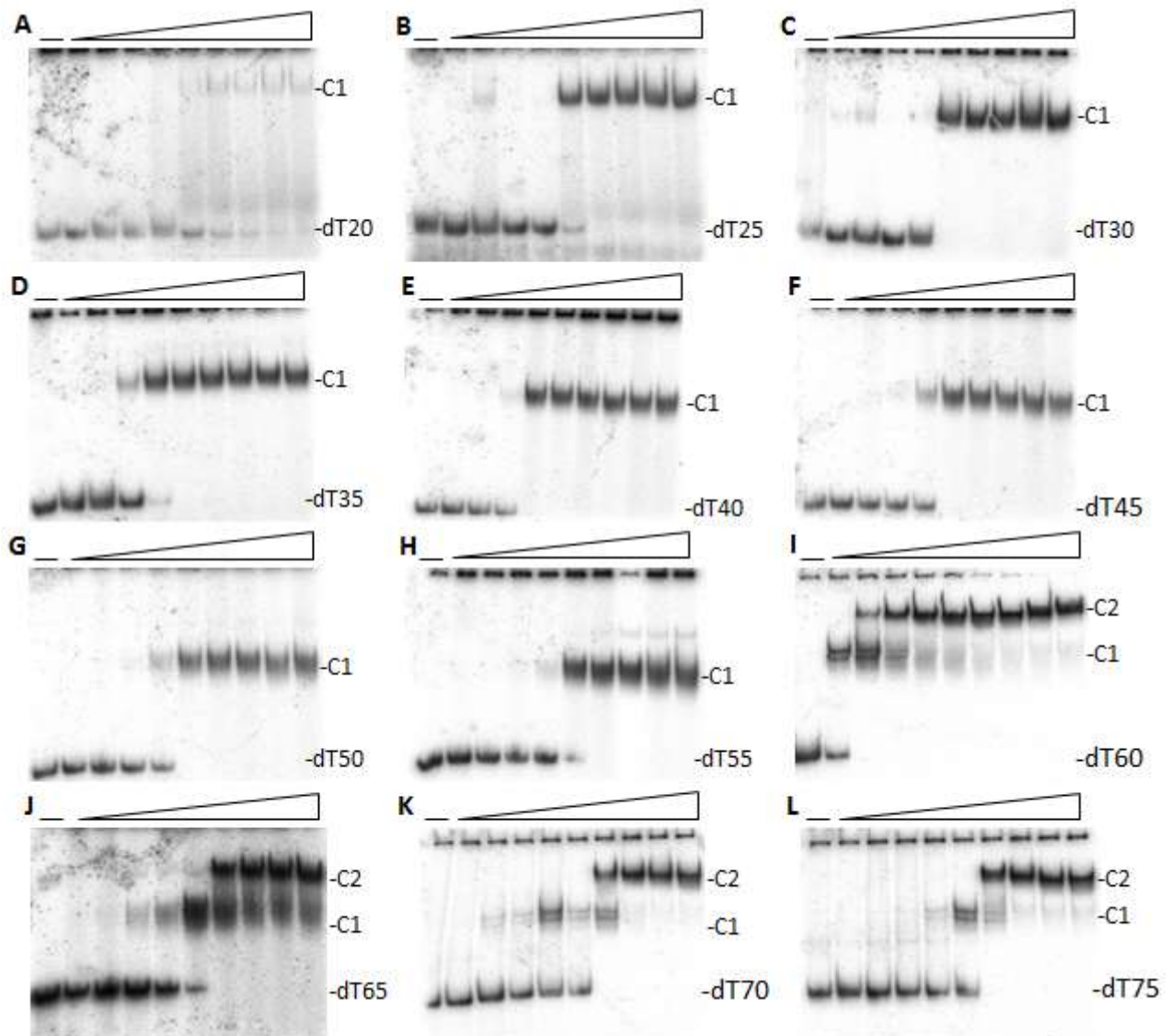
## 第二章 結論

不同片段之 *SaDnaD* WT、*SaDnaD* 1-195 以及 *SaDnaD* 1-204 的蛋白質已被大量表現與純化(圖一)。從 EMSA 的結果可以判定 *SaDnaD* WT 可與 ssDNA 和 dsDNA 結合(圖二、四)，且 *SaDnaD* 與 ssDNA 的結合位大小為  $27 \pm 1$  核苷酸(圖三)；由  $K_d$  值可看出 *DnaD* 與 ssDNA 結合能力較強(表一、二)。而 *SaDnaD* 1-195 及 1-204 在 EMSA 的實驗中與 DNA 結合情形的結果不如預期(圖五、六)，我們沒預料到蛋白質片段穩定性如此的低，以致無法得到穩定可重複的研究結果，因此無法進一步判定 *DnaD* 的結合區以及無法了解 *PriA* 對 *DnaD*-DNA 複合體的影響，之後會嘗試在更多不同條件的環境下對蛋白質做測試。

此研究已確定 *SaDnaD* 為雙套體蛋白質(圖七)，並利用螢光淬滅法找到 *SaDnaD* 1-195 的結合位大小為 22 個核苷酸(圖九)，透過 filter binding assay，我們也已嘗試讓 *DnaD* 在不同濃鹽度的環境下與 DNA 反應(圖十)。並也量化了在 NC 膜上的複合物(圖十一)。



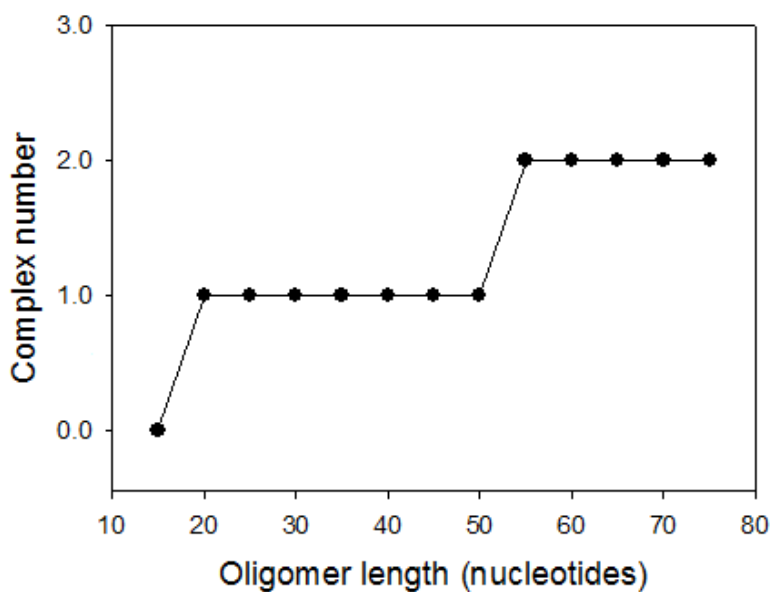
圖一：利用 SDS-PAGE 分析金黃色葡萄球菌 PriA 與 DnaD 蛋白質的純度。由於我們的重組蛋白質具有 His-tag，可用金屬螯合  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 的親和管柱層析法純化之。M, marker。Lane 1, DnaDWT；Lane 2, DnaD1-195；Lane 3, DnaD1-204。



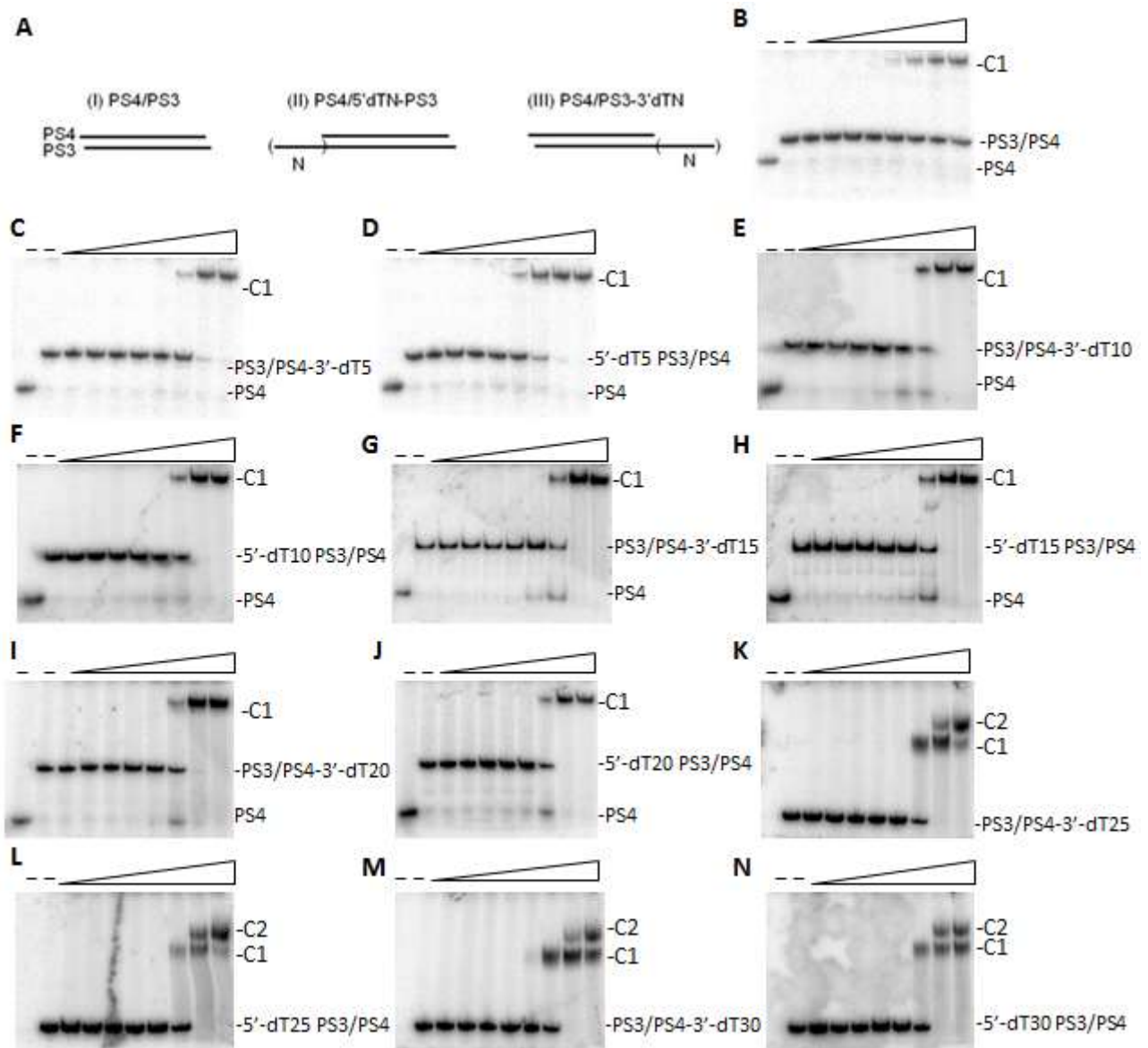
圖二：利用 ssDNA 與不同濃度的 DnaD 進行電泳遲滯反應

	SaDnaD		Complex number
	K <sub>d1</sub> (nM)	K <sub>d2</sub> (nM)	
dT20	560		1
dT25	420		1
dT30	390		1
dT35	160		1
dT40	190		1
dT45	190		1
dT50	180		1
dT55	190	700	2
dT60	10	75	2
dT65	170	680	2
dT70	70	820	2
dT75	70	810	2

表一：利用電泳遲滯法所計算出的解離常數。



圖三：將 EMSA 的結果整理，可得到 SaDnaD 結合位大小為  $27 \pm 1$  nt



圖四：利用 dsDNA 與不同濃度的 DnaD 進行電泳遲滯反應

A

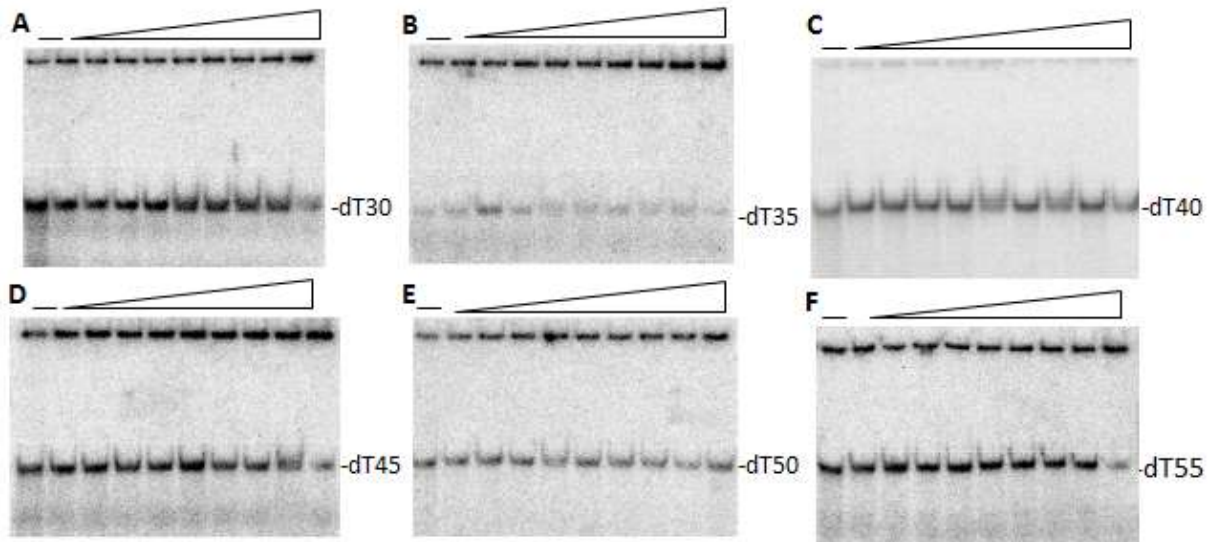
	SaDnaD		
	$K_{d1}$ (nM)	$K_{d2}$ (nM)	Complex number
PS3/PS4	1300		1
PS3/PS4-3'-dT5	2340		1
PS3/PS4-3'-dT10	2030		1
PS3/PS4-3'-dT15	1980		1
PS3/PS4-3'-dT20	2480		1
PS3/PS4-3'-dT25	1870	5100	2
PS3/PS4-3'-dT30	1600	5340	2



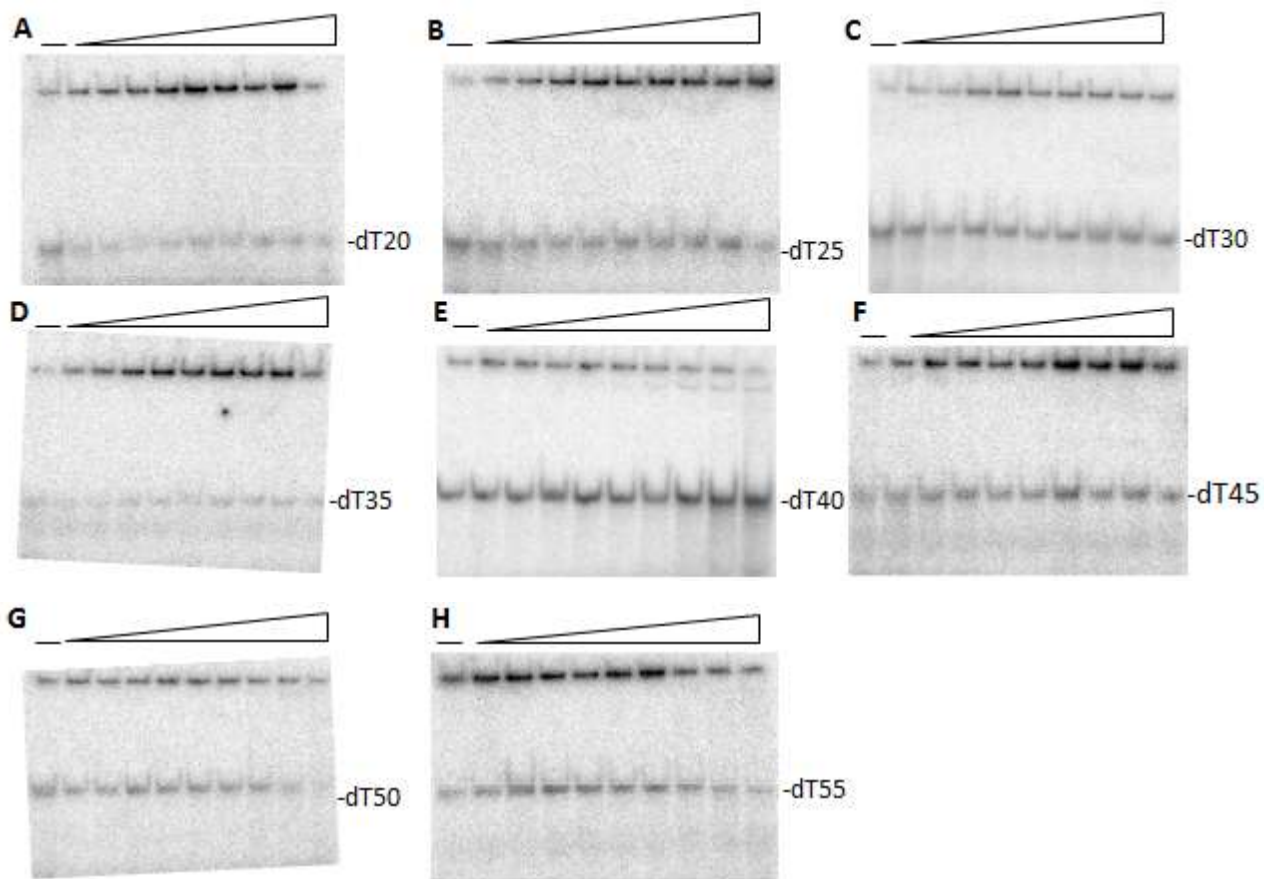
B

	SaDnaD		Complex number
	$K_{d1}$ (nM)	$K_{d2}$ (nM)	
PS3/PS4	1300		1
5'-dT5 PS3/PS4	1440		1
5'-dT10 PS3/PS4	2650		1
5'-dT15 PS3/PS4	2200		1
5'-dT20 PS3/PS4	2600		1
5'-dT25 PS3/PS4	2080	4770	2
5'-dT30 PS3/PS4	1780	4620	2

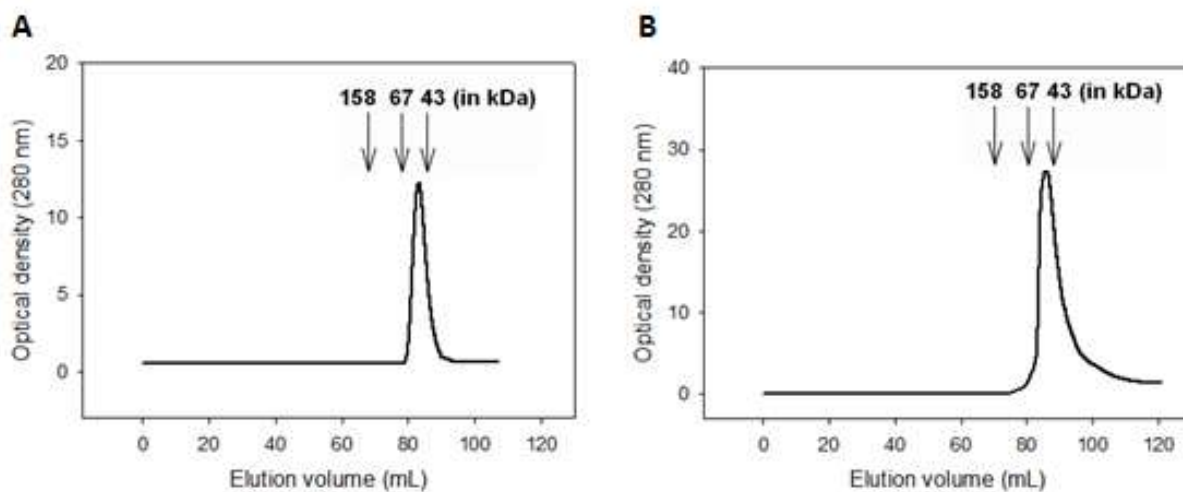
表二：利用電泳遲滯法所計算出的解離常數。



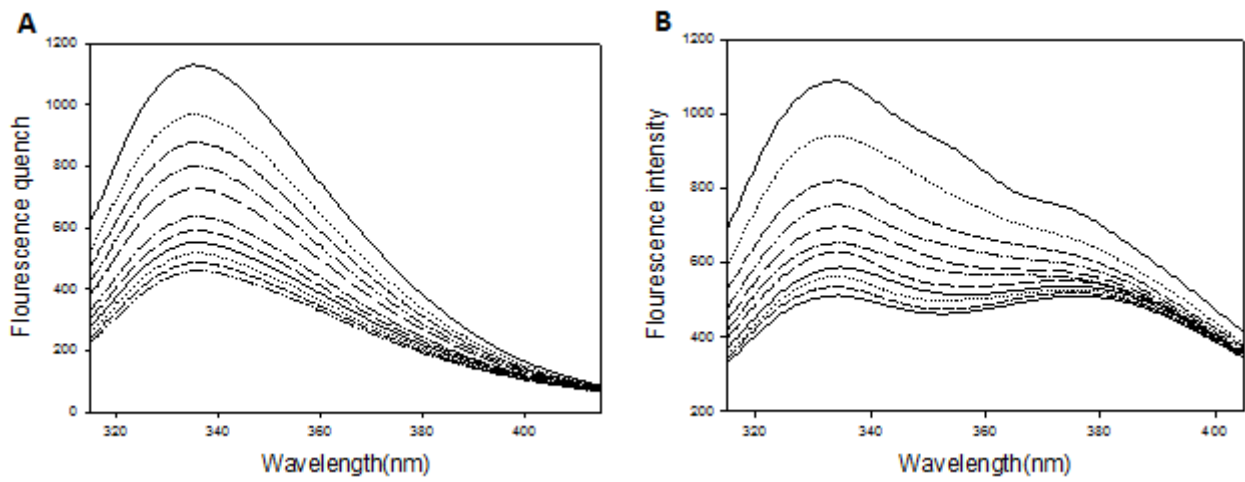
圖五：利用 ssDNA 與不同濃度的 DnaD1-195 進行電泳遲滯反應



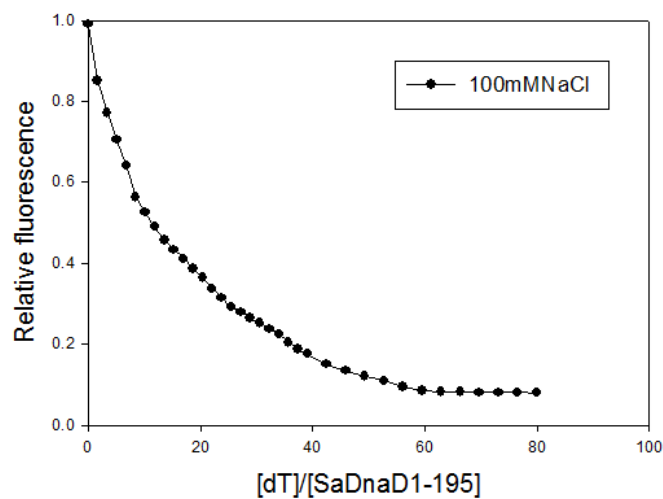
圖六：利用 ssDNA 與不同濃度的 DnaD1-204 進行電泳遲滯反應



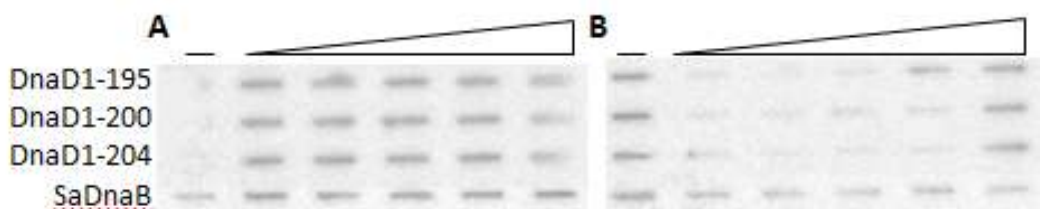
圖七：利用膠體過濾法分析 SaDnaD 的四級結構，結果得到一個 single peak，對照標準品的分子量圖 A 約為 50kDa，而圖 B 約為 44kDa，分別除上分子量可得知 A 及 B 為雙套體蛋白質。圖 A, DnaDWT；圖 B, DnaD1-204。



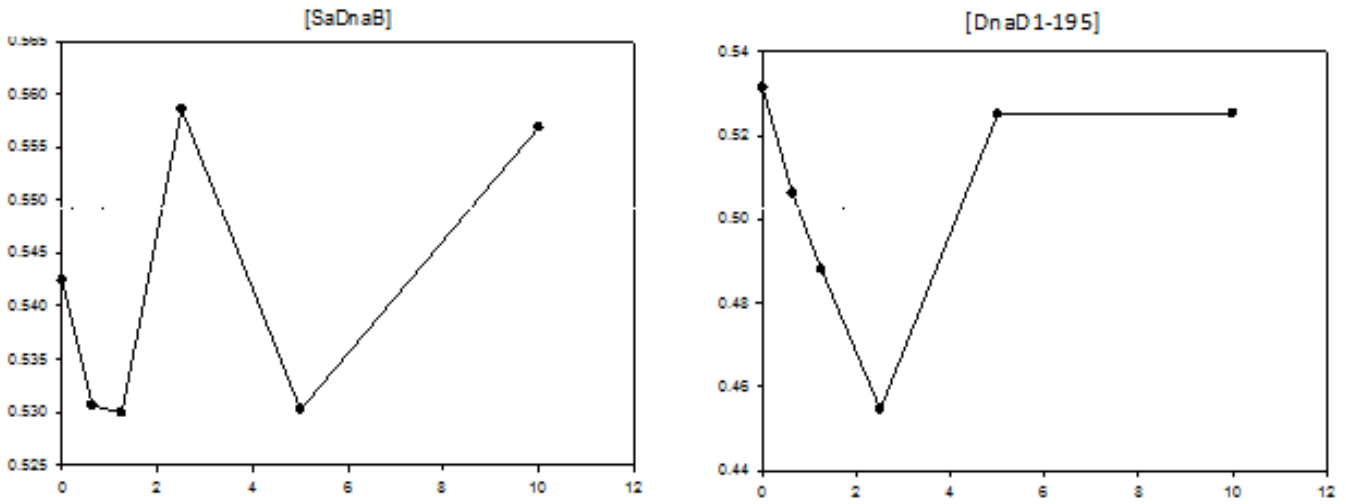
圖八：藉由蛋白質與 DNA 交互作用，帶有苯環的胺基酸就會被遮蔽(quench)，導致螢光強度下降。圖 A, DnaD1-195；圖 B, DnaD1-204。



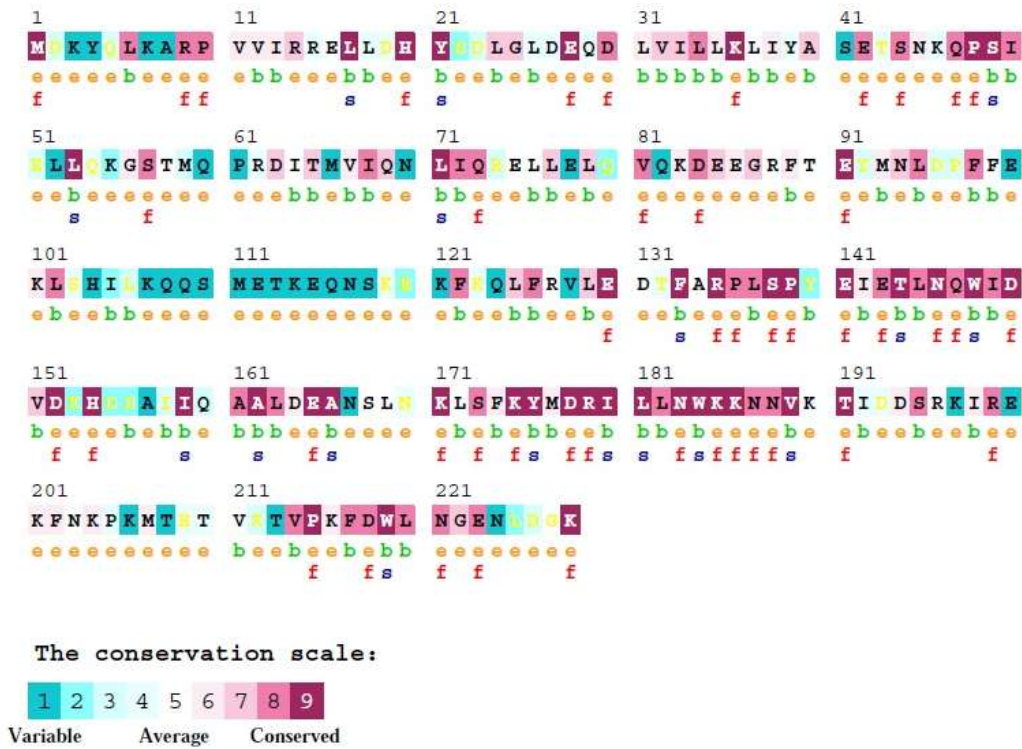
圖九：利用酵素動力學公式推導出  $[dT]/[SaDnaD1-195]$  等於  $n$ ，而此  $n$  值代表與 DNA 結合的大小。在接近飽和與達飽和的點取切線，兩條線相交於一點即結合位的大小，DnaD1-195 結合位大小為 22 個核苷酸。



圖十：ssDNA 與不同濃度的蛋白質在 50mM NaCl 環境下進行反應，形成的複合物會留在 A 上。A, NC 膜。B,  $N^+$  膜。



圖十一：將 NC 膜上的複合物量化，隨著蛋白質濃度越高，複合物並沒有出現穩定上升的趨勢。



圖十二：紅色為高度保留之序列，藍色則為低度保留的序列。

## 參考文獻

1. Merrikh, H., Machon, C., Grainger, W.H., Grossman, A.D. and Soultanas, P. (2011) Co-directional replication-transcription conflicts lead to replication restart. *Nature*, **470**, 554-557.
2. Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J. and Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, **404**, 37-41.
3. Heller, R.C. and Marians, K.J. (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 932-943.
4. Velten, M., McGovern, S., Marsin, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P. and Polard, P. (2003) A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell*, **11**, 1009-1020.
5. Hsieh, H.C. and Huang, C.Y. (2011) Identification of a novel protein, PriB, in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **404**, 546-551.
6. Huang, C.Y., Chang, Y.W. and Chen, W.T. (2008) Crystal structure of the N-terminal domain of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 DnaD protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **375**, 220-224.
7. Huang, Y.H., Lo, Y.H., Huang, W. and Huang, C.Y. (2012) Crystal structure and DNA-binding mode of *Klebsiella pneumoniae* primosomal PriB protein. *Genes Cells*, **17**, 837-849.
8. Huang, C.Y. (2012) Determination of the binding site-size of the protein-DNA complex by use of the electrophoretic mobility shift assay, in *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*, Chapter 10, pp. 235-242, edited by Innocenti, A., InTech Press, Rijeka, Croatia.
9. McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 859-870.

10. Lopper, M., Boonsombat, R., Sandler, S.J. and Keck, J.L. (2007) A hand-off mechanism for primosome assembly in replication restart. *Mol Cell*, **26**, 781-793.
11. Huang, C.Y., Hsu, C.H., Sun, Y.J., Wu, H.N. and Hsiao, C.D. (2006) Complexed crystal structure of replication restart primosome protein PriB reveals a novel single-stranded DNA-binding mode. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3878-3886.
12. Marston, F.Y., Grainger, W.H., Smits, W.K., Hopcroft, N.H., Green, M., Hounslow, A.M., Grossman, A.D., Craven, C.J. and Soutanas, P. (2010) When simple sequence comparison fails: the cryptic case of the shared domains of the bacterial replication initiation proteins DnaB and DnaD. *Nucleic Acids Res*, **38**, 6930-6942.
13. Huang, Y.H. and Huang, C.Y. (2012) Characterization of a single-stranded DNA-binding protein from *Klebsiella pneumoniae*: mutation at either Arg73 or Ser76 causes a less cooperative complex on DNA. *Genes Cells*, **17**, 146-157