

## SIĞIR HERPES VİRÜS 1 (BHV-1) PROTEİNLERİNİN ELEKTROFOREZ VE VESTERN İMMUNOBLOT METOTLARIYLA ÇALIŞILMASI\*

Hakan BULUT Yusuf BOLAT

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.03.2000

### Study of Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) Proteins with Electrophoresis and Western Immunoblot Methods

#### SUMMARY

Bovine herpes virus 1 (BHV-1) proteins were studied with two different methods. Initially, in order to analyse BHV-1 proteins by SDS-PAGE, BHV-1 infected MDBK and control MDBK cell lysates were subjected to electrophoresis on 10 % polyacrylamide gel. After staining with Coomassie blue, different proteins were determined in the infected MDBK cells. However, precise analysis of viral proteins could not be carried out.

Infected MDBK and VERO cell proteins, subjected to electrophoresis, were also examined by Western blot using immune rabbit serum. As a result, proteins at the molecular weights of approximately 55 kDa, 75 kDa and 180 kDa were determined to be antigenic proteins of BHV-1.

*Key Words: Bovine herpes virus 1, Electrophoresis, Western Immunoblot*

#### ÖZET

Sığır herpes virüs 1 (BHV-1) proteinleri iki farklı test ile çalışıldı. Öncelikle, Sığır herpes virüs 1 proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi amacıyla BHV-1 infekte Sığır Böbrek Hücre (MDBK) ve kontrol MDBK hücre lizatları % 10'luk poliakrilamid jelde elektroforez edildi. Proteinlerin belirlenmesi için jelin Coomassie mavisiyle boyaması yapıldı. Boyama neticesinde, infekte MDBK hücrelerinde, kontrol MDBK hücreleriyle karşılaştırıldığında, farklı proteinler tespit edildi. Ancak, viral proteinlerin tam bir analizi yapılamadı.

Bu çalışmada kullanılan ikinci testte, elektroforezleri yapılan infekte MDBK ve Yeşil Maymun Böbrek Hücre (VERO) proteinleri immun tavşan serumu kullanılarak Vestern İmmunoblot yöntemiyle görüntüldü. Vestern İmmunoblot neticesinde, molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 55 kDa, 75 kDa ve 180 kDa olan proteinlerin BHV-1'in antijenik proteinleri oldukları belirlendi.

*Anahtar Kelimeler: Sığır herpes virüs 1, Elektroforez, Vestern İmmunoblot*

\* Bu araştırma F.Araştırma Fonu (FÜNAF- Proje No: 161) tarafından desteklenmiş, aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

## GİRİŞ

Sığır Herpes Virüs 1 (BHV-1), sığırlarda; solunum, genital ve sinir sisteminde infeksiyonlara sebep olan önemli bir viral patojendir. Virüs, Herpesviridae ailesinin bir üyesi olup, alfa herpesvirinae alt ailesine mensuptur ve İnfeksiyöz Bovin Rhinotrakeitis-İnfeksiyöz Püstüler Vulvovaginitis (IBR/IPV) virüsü olarak da isimlendirilir (10).

Virionun yapısında; 152 kbp uzunluğunda çift iplikli ve linear DNA, 160-162 kapsomerden oluşmuş ikosaedral morfolojiye sahip, yaklaşık, 100-110 nm çapında kapsid, kapsidi sıkıca çevrelemiş olan *tegument* tabaka ve en dışta ise virüs tarafında kodlanmış olan glikoproteinleri de ihtiva eden zarf bulunmaktadır (10, 28, 29).

Litik bir herpesvirüs infeksiyonu esnasında, viral proteinlerin görülme zamanı, sentez kinetiği ve bazı metabolik inhibitörlere karşı duyarlılıkları gibi kriterler dikkate alınarak, herpesvirüs proteinleri üç grupta sınıflandırılmıştır (16, 26, 28, 35).

Replik DNA'ya ait transkripler tarafında sentezlenen geç proteinler (*late* ya da *gamma*) yeni virionlara ait yapısal proteinlerdir. Yapısal proteinlerin bir kısmı, infekte hücrenin sitoplazmasında sentezlendikten sonra, hücre nükleusuna gider ve burada nükleokapsid oluşturur (31). Oluşan bu nükleokapsidler, nükleusun iç membranındaki viriona ait *tegument* ve zarf kısmını da alıp, endoplazmik retikulumun sisternasından plazma membranına uzanan tübüler yapılar içinden hücreyi terk eder (8, 22).

Purifiye herpesvirüs partikülleriyle yapılan Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) analizi neticesinde en az 33 farklı yapısal protein tespit edilmiştir (1, 4, 5, 7, 15, 19, 23, 26, 33, 35). Bunlardan 5'inin kapsid proteini olduğu bildirilmiştir (27). Ayrıca, kapsidin tipine göre de kapsid protein sayılarının ve kompozisyonlarının değiştiği saptanmıştır (28). Transkripsiyonu aktive edici faktör-alfa, konakçı hücre metabolizmasını durdurucu protein (VHS protein) ve viral genomun terminal (a) sequensine bağlanan proteinler *tegument* proteinleri olarak virion yapısında bulunmaktadır (15, 32).

Herpesvirüs yapısal proteinlerinden 11 tanesinin, kimyasal olarak, glikoprotein yapısında olduğu yine SDS-PAGE analizle belirlenmiştir (1, 4, 13, 15, 26, 36, 37, 38). Bunlardan bir çoğu virionun yapısal unsurlarıdır. Bu glikoproteinlerden

tamamının fonksiyonu bugün için bilinmemesine rağmen, bazılarının virüsün hücreye adsorpsiyonu, penetrasyonu ve virüsün hücreden hücreye yayılımında etkin oldukları belirlenmiştir (17, 18, 37, 38). Ayrıca bu glikoproteinlerden bazıları, virüse karşı konakçıda şekillenen hücrel ve sıvısal immün cevabın asıl determinantları olarak kabul edilirler (6, 9, 20, 37).

Bu çalışmada, Sığır Herpes Virüs 1 (BHV-1) proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) ve Western immunoblot metotlarıyla incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Hücreler ve Virüs.** Çalışma süresince iki farklı devamlı hücre hattı kullanıldı. Virüs üretimi, Sığır Böbrek (MDBK; American Type Culture Collection, MD, USA) ve Afrika Yeşil Böbrek (VERO; Şap Enstitüsü, Ankara) hücrelerinde gerçekleştirildi.

Çalışmada, IBR/IPV virüsünün referans suşu olarak kabul edilen IBR-Colorado suşu (Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi) kullanıldı.

**Virüs Üretimi.** Virüs üretimi amacıyla % 1 Fötal Sığır Serum (FBS; SIGMA) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DME/F-12; SIGMA) vasatından faydalanıldı. ELISA'da kullanılan virüsü elde etmek için virüs infekte MDBK hücre üst sıvısı kullanıldı. Üst sıvı, önce +4 °C, 8000 rpm (Hettich, Tuttlingen, Germany)'de 20 dak. santrifüj edilerek hücre artıkları uzaklaştırıldı. Üst sıvının 5 ml'lik kısmı sıvı azota kaldırıldı. Azottan çıkartılan bu virüsün titresi hesaplandı (14). Kalan üst sıvı ise 40.000 rpm (Sorvall, RC 5B)'de 4 saat santrifüj edildi. Pelet virüs, PBS içinde sullanılarak, -20 °C'ye kaldırıldı.

SDS-PAGE ve Western blot deneylerinde viral proteinlerin incelenmesi amacıyla ikişer adet 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre üretme kabında MDBK ve VERO hücreleri üretildi. Hücreler tek tabaka oluşturmasından sonra hücre üretme vasatı dökülüp, IBR virüs ekimi yapıldı (3). Kontrol hücreler ise serumsuz vasatta bekletildi. Virüs ekilen hücrelerde, inokulasyondan 30 dak. sonra, vasat dökülüp, hücreler yıkandı. Bu kaplara virüs üretme vasatı ilave edildi. Virüs inokulasyonunu takip eden 14. saatte infeksiyon + 4 °C'de durduruldu. Eş zamanlı olarak kontrol hücre kapları da + 4 °C'ye kaldırıldı. Kapların

yüzeyi PBS ile yıkayıp, 5 ml PBS içinde yumuşak bir kazıyıcıyla hücreler kazındı. Hücreler 1200 rpm'de, 15 dak. santrifüj edilerek infekte ve kontrol hücre pelletleri elde edildi (3). BHV-1 infekte ve kontrol hücreleri üzerine 250 µl protein parçalama tamponu (% 10 gliserol, % 0004 Bromfenol blue, % 2 SDS, % 4 merkaptotanol, 0.004 M EDTA, 0.05 M Tris pH 6.8 ve % 60 dH<sub>2</sub>O ) ilave edildi (2). Ağırlık markerleri olarak kullanılmak üzere protein parçalama tamponunda 1/10 oranında serum numuneleri ve 2 mg/ml ovalbumin çözdürüldü. Hazırlanan numuneler, kaynar suda 3 dak. tutuldu. Vortekslenerek, - 70 °C'ye kaldırıldı.

**İnfekte Tavşan Serum.** Yetişkin beyaz tavşan (Viroloji Enstitüsü, Elazığ) temin edildi. Azot tankından çıkartılıp, çözdürülen DKID<sub>50</sub>; Log 10<sup>-6.25</sup> / 0.1 ml titredeki virüsün 0.2 ml'si intravenöz yolla uygulanarak bir tavşanda infeksiyon başlatıldı (21). Bu tavşandan, virüs inokulasyonundan önce ve infeksiyondan 20 gün sonra kulak venasında kan alınıp, serum çıkartıldı. Serumlar kullanılıncaya kadar - 20 °C'de saklandı.

**ELISA.** IBR-Colorado suşu ile infekte tavşan serumlarının test edilmesi için ELISA gerçekleştirildi (25). Karbonat tamponu içinde virüs bağlanan ELISA pleytlerinde pozitif ve negatif serumların 1/100 dilusyonları test edildi (25). Serumların 492 nm'deki adsorbans değerleri mikroeliza okuyucusunda ölçüldü.

**Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez.** Protein örnekleri Laemmli'nin aralıklı SDS-PAGE sistemi kullanılarak % 5'lik yığılmalı ve % 10'lik ayırıcı jelde, 15 cm vertikal elektroferez cihazında molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldı (2). Jeldeki tarakların her kuyucuğuna 20'şer µl numune yüklendikten sonra, numuneler 200 Volt'da 3,5 saat elektroferez edildi (30).

Elektroferezi takiben, jelin Coomassie mavisıyla boyanacak kısmı keskin bir bistürü yardımıyla dikkatlice kesildi ve içinde Coomassie mavi eriyiği bulunan derin bir kaba bırakıldı. Otomatik çalkalayıcı üstünde 4 saat boyama yapıldı. Boyanın giderilmesi için; Coomassie maviden alınan jel, derince bir kaptaki bulunan boya giderici (% 30 metanol, % 10 glacial asetik asit ve % 60 dH<sub>2</sub>O) içine atıldı ve otomatik sallayıcı üstünde jel berrak oluncaya kadar işleme devam edildi. Boya giderilmesi esnasında birkaç kez boya giderici eriyik değiştirildi. Daha sonra jelin fotoğrafı alındı (11).

**Vestern Blotlama.** Bu teste, elektroferezle ayrıştırılan viral proteinler önce nitrosellülöz

membrana transfer edildi. Daha sonra, proteinlerin yeri antijen-antikor tepkimesi üzerine kurgulanan bir yöntemle belirlendi (11).

Transfer işlemi, *Semi-dry* transfer cihazının elkitabında belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (IMM Semi-Dry Blotter Instruction Manual, W. E. P. Comp.Seattle, WA., U. S. A.). Transfer işlemi 0,3 Amperde, 45 dak. yapıldı.

Transfer işlemi bitiminde nitrosellülöz membran, blokama tampon (% 5 yağsız süt tozu içeren PBS) içerisine bırakıldı ve oda ısısında, otomatik sallayıcı üstünde 2 saat bekletildi. Yıkama işlemini takiben, membran 1/100 sulandırılmış anti-BHV-1 tavşan serumu içine bırakıldı. Otomatik sallayıcıda 1 saat inkubasyon yapıldı. Yıkama tekrarlandı. Membran daha sonra biyotinle işaretlenmiş keçi anti-tavşan IgG eriyiği (DAKO Corp., Carpintera, CA., U. S. A.) içine bırakıldı. Otuz dakikalık bir inkubasyondan sonra yıkama tekrarlandı. Arkasından, avidinle bileştirilmiş *horse radish-peroxidase* enzimi eriyiği (DAKO Corp., Carpintera, CA., U. S. A.) eklendi ve 30 dak. inkubasyona bırakıldıktan sonra yıkama tekrarlandı. Tepkimenin ortaya çıkarılması için kromojen-substrat eriyiği (0.05 M Tris pH 7.2 , 1 mg/ml diaminobenzidin ve % 0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içerisine bırakılan nitrosellülöz membran karanlık ortamda, 10 dakika inkube edildi. Membran, distile suda yıkandı ve membranın fotoğrafı çekildi (11). Jelde belirlenen proteinlerin büyüklükleri moleküler ağırlık markeri (MW-SDS 200, SIGMA) ile karşılaştırıldı.

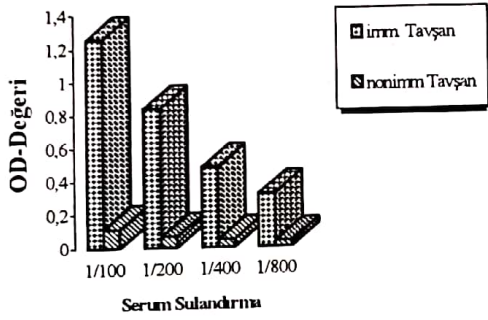
## BULGULAR

**ELISA ile Antikor Yanıtın Tespiti.** Sığır herpes virüsle infekte tavşan serumlarının ELISA değerleri şekil-1'de verilmiştir. Şekil-1'de görüleceği gibi, BHV-1'e özgül antikor titreleri ölçüldüğünde, infekte tavşan serumundaki BHV-1 titresi aynı tavşandan infekte edilmeden önce alınan serumla kıyaslandığında yüksek bulundu.

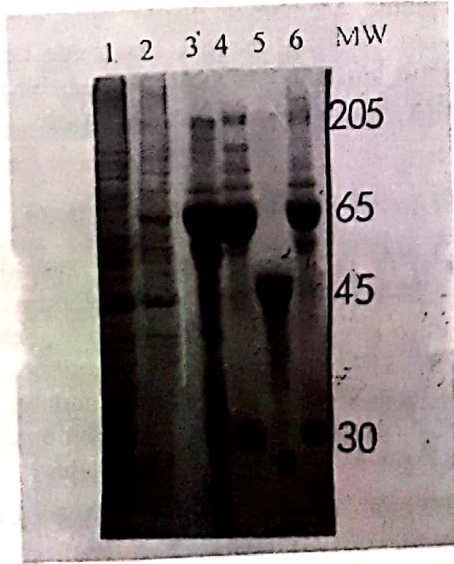
**BHV-1 Proteinlerinin SDS-PAGE ile Çalışılması.** BHV-1 infekte ve kontrol MDBK hücrelerinde elde edilen proteinler % 10'luk SDS-PAGE'de incelendi. Coomassie mavisıyla boyamadan sonra infekte hücrelerde, yaklaşık olarak, 20 ile 300 kDa arasında büyüklüğe sahip farklı protein türü belirlendi. Genel olarak, infekte hücrelerdeki protein türleri infekte olmayan hücrelerdeki protein türleriyle ortak bir elektroferez motifi sergilemektedir. Ancak, infekte hücrelerde

tespit edildiği halde kontrol hücrelerinde belirlenemeyen proteinler dikkat çekmektedir. Buna karşın, kontrol hücrelerindeki bazı proteinlerin de infekte hücrelerde miktarlarının azaldığı kaydedildi (Şekil-2).

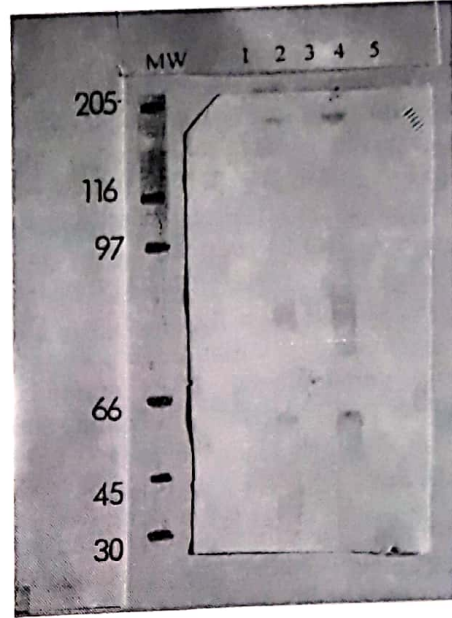
**BHV-1 Proteinlerinin İmmunoblotla Çalışılması.** İmmunoblotta BHV-1 immün tavşan serumu kullanılarak, infekte MDBK ve VERO hücrelerindeki immunojenik viral proteinler belirlenmeye çalışıldı. BHV-1 ile infekte her iki hücrede de molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 55 kDa, 75 kDa ve 180 kDa olan üç protein belirlendi (Şekil-3).



Şekil-1. BHV-1 infekte tavşan serum antikorlarının 492 nm'deki OD değerleri



Şekil-2. BHV-1 infekte ve infekte olmayan MDBK hücrelerine ait proteinlerin, %10 Poliakrilamid jelde elektroforezden sonra Coomassie mavile boyamada belirlenmesi. MW; Moleküler ağırlık (kDa), 1; Infekte MDBK, 2; Kontrol MDBK, 3; Fare serum, 4; Tavşan serum, 5; Ovalbumin, 6; Sığır serumu.



Şekil-3. BHV-1 infekte hücrelerdeki immunojenik proteinlerin, immün tavşan serumu kullanılarak, Vestern İmmunoblotta belirlenmesi. MW; Moleküler ağırlık (kDa), 1; Tavşan serum, 2; Infekte VERO, 3; Kontrol VERO, 4; Infekte MDBK, 2; Kontrol MDBK

İmmün boyamada, bu üç proteinin de VERO hücrelerine kıyasla, MDBK hücrelerinde daha yoğun olarak buldukları tespit edildi.

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Virüslerin temel yapısal komponentlerinden biri olan viral proteinler, virüs morfolojisini oluşturma ve viral nükleik asidi koruma fonksiyonlarına ilave olarak, virüs yaşam siklusunda etkin görev alan biyomoleküllerdir (12).

Viral proteinler, virüsün antijenik yapısını oluşturur ve viral infeksiyonlardan sonra konakçı vücudunda özgül antikor sentezi ve hücrel immün yanıt olgusu bu moleküllere karşı şekillenir (20, 24, 37). Bugüne kadar yapılan viroloji alanındaki çalışmalarda, yukarıda belirtilen özelliklerden dolayı, viral proteinler; gerek virüs morfolojisinin anlaşılmasına yönelik araştırmalarda gerekse virüslere karşı koruyucu aşılarda hazırlanması ve viral infeksiyonların tedavi ile teşhisinde öncelikli hedefler olmuşlardır (12, 20, 37).

Virüs proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi amacıyla yapılan çalışmalarda, çoğunlukla, radioaktif izotoplarla işaretli esansiyel amino asitleri ihtiva eden vasat ortamında üretilen virüs proteinleri kullanılmaktadır. Herpesvirüsle yapılan bu çalışmalar ya saflaştırılmış virionlarla (5, 26, 27) ya da infekte hücre lizatlarıyla gerçekleştirilmiştir (24, 26, 33, 34).

Saflaştırılmış BHV-1 ile yapılan bir çalışmada, virionda molekül ağırlıkları 14 ile 330 kDa arasında

değişen en az 25 tane yapısal protein bulunduğunu ve bu proteinlerden 11 tanesinin glikoprotein yapısında olduğunu belirtmişlerdir (26). Ayrıca, infekte hücre lizatının analizinde ise, 25 yapısal proteine ilave olarak, molekül ağırlıkları 32 kDa ve 182 kDa arasında değişen, 15 tane yapısal olmayan virüs proteini tespit etmişlerdir (26). Buna karşın, bir diğer çalışmada, saflaştırılmış virionun yapısında, molekül ağırlıkları 11 ve 240 kDa arasında değişen, 20 tane yapısal proteinin bulunduğu bildirilmiştir (33). Benzer bir çalışmada ise virionun yapısında 11 tanesi glikoprotein olan 32 tane yapısal protein rapor edilmiştir (1).

Şimdiye kadar infekte ve infekte olmayan hücre lizatlarıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE çalışılmalarında elde edilen bulgular şu şekilde özetlenmiştir. Elektroforezi yapılan her iki hücre numunesinde de hücreden kaynaklanan ortak proteinler belirlenmiştir (33). Bu ortak proteinlere ilave olarak infekte hücrelerde pek çok farklı protein türünün varlığı bildirilmiştir (26, 33). Özellikle radioaktif izotoplar kullanılarak yapılan protein işaretlemelerinde infeksiyon ilerledikçe, virüs tarafında hücresel protein sentezinin tamamen durdurulması veya azalması söz konusu olduğu için, ortak hücresel proteinlerin bir çoğunun ortadan kalkabileceği belirtilmiştir (33). Ancak, aynı çalışmada Coomassie mavisıyla yapılan boyamalarda infekte hücre numunelerindeki bazı hücresel proteinlerin sentezinin virüs tarafından durdurulmuş olduğunun belirlendiği, buna rağmen her iki numunede de hücreye ait proteinlerin tespit edildiği ve tam bir viral protein analizinin bu boyamayla mümkün olamayacağı bildirilmiştir (33).

İnfekte ve infekte olmayan hücreleriyle gerçekleştirilen bu çalışmadaki SDS-PAGE analizde, yukarıda Coomassie mavisıyla boyamada belirtilen sonuçlara paralel veriler elde edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada, virüs proteinlerinin tam bir analizi yapılamamıştır. Bunun en önemli sebebi, bu çalışmada radioaktif izotoplarla işaretlenmenin yapılamaması veya saf virüs elde edilememesidir. Ayrıca, herpesvirüslerde fazla sayıda protein bulunması da diğer önemli bir sebep olarak düşünülmektedir.

Herpesvirüslerin yapısında pek çok farklı protein bulunmasına rağmen, bu proteinlerden ancak bazıları konakçı immun sistemi tarafından

tanınmaktadır ve immunojenik proteinler olarak algılanmaktadırlar. Özellikle glikoproteinlerin, virüse karşı şekillenen hücresel ve sıvısal immun yanıtta önemli hedefler oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (9, 20, 37).

Glikoproteinlere özgül monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 130 kDa, 71 kDa ve 55 kDa'lık glikoproteinlerin virüs nötralizasyonunda ve komplemente bağlı lizide etkin olduklarını belirlenmiştir (38). Aynı araştırmacılar, bu glikoproteinlerin tavşanda nötralizan etkinliğe sahip antikorlar oluşturduğunu bir diğer çalışmada göstermişlerdir (36). Monoklonal antikorlar kullanarak gerçekleştirilen bir diğer çalışmada 55 kDa, 69 kDa, 82 kDa, 96 kDa ve 102 kDa'lık glikoproteinlerle haricinde 82 kDa ve 92 kDa'lık glikolize olmayan proteinlerin de nötralizan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (6).

BHV-1'e karşı nötralize edici aktiviteye sahip tavşan serumları kullanarak gerçekleştirilen immunopresipitasyon ve immunoblot deneylerinde ise, çalışılan serumların 69-75 kDa, 77-81 kDa, 82-92 kDa ve 108-115 kDa'lık 4 tane glikoproteinle reaksiyon verdikleri gösterilmiştir (19).

BHV-1 ile infekte hayvanlardan, infeksiyonun nekahat döneminde alınan ve yüksek nötralizan antikor titresine sahip serumlarda gerçekleştirilen bir çalışmada ise, serumların tamamının 85 kDa ve 70 kDa'lık ve bazılarının ise, bunlara ilave olarak, 150 kDa'lık glikoproteinlerle özgül tepkime verdikleri Vestern blot ile saptanmıştır (33).

Deneyisel olarak infekte edilen sığır serumlarıyla yapılan çalışmada, BHV-1'in primer infeksiyonu esnasında sıvısal immun yanıtın g I, g III ve g IV (yeni nomenklatüre göre; g B, g C ve g D)'ye özgül olduğunu tespit etmiştir (23).

İmmunojenik proteinlerin tespiti amacıyla gerçekleştirilmiş olan Vestern blot testlerinde, gerek bu çalışmada gerekse daha önce yapılmış olan çalışmalarda farklı sayıda ve molekül ağırlığında proteinlerin belirlenmesinin değişik nedenlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Öncelikle, kullanılan poliakrilamid jel sistemlerinin farklılığının bunda etkin olabileceği kaydedilmiştir (19, 33). Ayrıca, infeksiyonun seyri ve konakçı immun yanıtının da bir diğer etmen olabileceği ifade edilmiştir (23, 33).

## KAYNAKLAR

1. Bolton, D. C., Zee, Y. C., Ardans, A. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 1983; 8: 57-68.
2. Burleson, F. G., Chambers, T. M., and Wiedbrauk D. L. Media and Solutions. In: *Virology, A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego 1992; 214-230.
3. Burleson, F. G., Chambers, T. M., and Wiedbrauk D. L. Western blot analysis of EMC virus proteins. In: *Virology, A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego 1992; 175-185.
4. Cassai, E. N., Sarmiento, M., and Spear, P. G. Comparison of the virion proteins specified by herpes simplex virus type 1 and 2. *J Virol* 1975; 16: 1327-1331.
5. Chantler, J. K., and Hudson, J. B. Proteins of murine cytomegalovirus: Identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. *Virology* 1978; 86: 22-36.
6. Collins, J. K., Butcher, A. C., Riegal, C. A., McGrane, V., Blair, C. D., Teramoto, Y. A., and Winston, S. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus-1. *J Virol* 1984; 52: 403-409.
7. Courtney, R. J., and Benyesh-Melnick, M. Isolation and characterization of a large molecular-weight polypeptide of herpes simplex virus type 1. *Virology* 1974; 62: 539-551.
8. Courtney, R. J., McCombs, M., and Benyesh-Melnick, M. Antigens specified by herpesviruses. II. Effect of arginine deprivation on the synthesis of cytoplasmic and nuclear proteins. *Virology* 1971; 43: 356-365.
9. Eberle, R., and Courtney, R. J. Preparation and characterization of specific antisera to individual glycoprotein antigens comprising the major glycoprotein region of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1980; 35: 902-917.
10. Fenner, F. J., Gibbs, E. P., Murphy, F. A., Rott, R., Studdert, M. J., and White, D. O. Herpesvirinae; Diseases Caused by Alphaherpesviruses. In: *Veterinary Virology*. Academic Press, San Diego 1993; 345-348
11. Harlow, E., and Lane, D. Immunoblotting. In: *Antibodies*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1988; 471-504.
12. Harrison, S. C. Principles of virus structure. In: *Fields BN and Knipe DM, Fundamental Virology*. Raven, New York 1991; 37-61.
13. Heine, J. W., Spear, P. G., and Roizman, B. Proteins specified by herpes simplex virus. VI-Viral proteins in the plasma membrane. *J Virol* 1972; 9: 431-439.
14. Hierholzer, J. C., and Killington, R. A. Virus isolation and quantitation. In: *Mahy B. WJ and Kangro HO, Virology Methods Manual*. Academic Press, San Diego 1996; 35-41.
15. Honess, R. W., and Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. XI-Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell. *J Virol* 1973; 12: 1347-1365.
16. Honess, R., and Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 1974; 14: 8-19.
17. Liang, X., Pyne, C., Li, Y., Babiuk, L. A., and Kowalski, J. Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD; An indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology* 1995; 207: 429-441.
18. Littel, S. P., Jofre, J. T., Courtney, R. J., and Schaffer, P. A. A virion associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex type 1. *Virology* 1981; 115: 149-160.
19. Lum, M. A., and Reed, D. E. Identification of bovine herpesvirus-1 polypeptides involved in serum neutralization. *Vet Microbiol* 1986; 11: 213-220.
20. Lupton, H. W., and Reed, D. E. Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotracheitis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 383-390.
21. Lupton, H. W., Barnes, H. J., and Reed, D. E. Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet* 1980; 70:77-95.
22. Mark, G. E., and Kaplan, A. S. Synthesis of proteins in cell infected with herpesvirus. VII. Lack of migration of structural viral proteins to the nucleus of arginine-deprived cells. *Virology* 1971; 45: 53-60.
23. Marshall, R. L., Israel, B. A., Letchworth III, G. J. Monoclonal antibody analysis of bovine

- herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology* 1988; 165: 338-347.
24. McCombs, R. M. Antigens specified by herpesvirus. III. Viral-induced nuclear polypeptides. *Virology* 1974; 57: 448-458.
  25. McCullough, K. C., and Parkinson D. The standardization of a "spot-test" ELISA for the rapid screening sera and hybridoma cell product ; The determination of the optimum buffering systems. *J Biol Stand* 1984; 12: 67-74.
  26. Misra, V., Blumenthal, R. M., and Babiuk, L. A. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J Virol* 1981; 40: 367-378.
  27. Perdue, M. L., Kemp, M. C., Randall, C. C., and O'Callaghan D. J. Studies of the molecular anatomy of L-M cell strain of equine herpes virus type 1: Protein of the nucleocapsid and intact virion. *Virology* 1974; 59: 201-216.
  28. Roizman, B. Herpesviridae. In: Fields BN and Knipe DM, *Fundamental Virology*. Raven, New York 1991; 841-845.
  29. Roizman, B., and Batterson, W. Herpesviruses and their replication. In: Fields BN and Knipe DM, *Fundamental Virology*. Raven, New York 1985; 497-504.
  30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of protein. In: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989; 18.47-18.75.
  31. Schipper, I. A., and Chow, T. L. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. *Can J Com Med* 1968; 32: 412-415.
  32. Schmelter, J., Knez, J., Smiley, R., and Capone, J. P. Identification and characterization of a small modular domain in the herpes simplex virus host shutoff protein sufficient for interaction with VP16. *J Virol* 1996; 70: 2124-2131.
  33. Scott, N. A., Whalley, J. M., Mattick, J. S., Underwood, P. A., Aboud, L., Williams, K. L., and Kirkland, P. Identification of major antigenic proteins of bovine herpesvirus-1 and their correlation with virus neutralizing activity. *Vet Microbiol* 1988; 109-121.
  34. Seal, B. S., Martínez, J. D., Hall, M. R., and Jeor, S. C. Occurrence of bovine herpesvirus-1 DNA in nucleosomes and chromatin of bovine herpesvirus-1-infected cells: Identification of a virion-associated protein in chromatin of infected cells. *Arch Virol* 1988; 99: 221-236.
  35. Stinsky, M. F. Sequence of protein synthesis in cell infected by human cytomegalovirus; early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* 1978; 26: 686-701.
  36. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., and Babiuk, L. A. Antigenic and immunogenic characteristics of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins GVP 3/9 and GVP 6/11a/16, purified by immunoadsorbent chromatography. *Virology* 1985; 144: 204-215.
  37. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. V., and Babiuk, L. A. Topographical analysis of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins: Use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology* 1985; 144: 216-227.
  38. Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. V., Gilchrist, J. E., Misra, V., and Babiuk, L. A. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: Characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology* 1984; 135: 466-479.