

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：竹嵌紋病毒及其衛星核酸 5'端非轉譯區與複製
競爭關係之探討

得獎獎項：第一名
新加坡正選代表：新加坡 31 屆青年科學節

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 王俐雲
臺北市立第一女子高級中學 江采蓮

作者簡介



王俐雲

北一女中高三生。雖然不是完美主義者，但是對於自己事情，仍然會盡心負責病努力完成。空閒時，大多數的時間都花在閱讀，閱讀範圍廣泛，大部分是以小說為主，而小說之中又以科幻為多，但對於愛情小說則興致缺缺。喜歡在一片混亂的生活之中，抽空讓自己放鬆一下心情，或許只是發呆讓心情沉澱，或許是想點事情，都能讓我重新充電。

作者簡介



江采蓮

北一女中高三生。總是相信平凡的學生生活也能看見神奇，這次在實驗室研究的經驗尤其特別。認為有時候以簡單的心處理複雜的事情，會比慌忙而不著頭緒好。雖然高三生活忙碌，仍喜歡畫圖、欣賞音樂、看漫畫和小說，尤其喜愛音樂劇，即使嗓子不是特別好聽，平時仍愛在家裡無人時高歌，或者思考一些可稱為天方夜譚之事，抑或隨筆畫下生活中或想像裡的人物，又或上網逛奇摩知識+腦力激盪。

壹、前言

RNA 病毒在複製過程中容易產生錯誤，導致其族群中有很大的遺傳歧異度，累積的錯誤再加上選汰的壓力造成往後之變異。由於 RNA 基因體之病毒變異較大，使得 RNA 病毒在單一寄主上具有 quasispecies 的特性，提供病毒產生新基因體的機會以適應環境或演化成新病毒。例如流行性感冒病毒與之前造成恐慌的嚴重急性呼吸道症候群病毒(severe acute respiratory syndrome, SARS)以及禽流感病毒 (avian influenza virus) 皆為 RNA 病毒，意味著 RNA 病毒知不穩定性，並容易造成一些目前我們無法及時反應的危害。大部分的植物病毒又為 RNA 病毒，本研究將以竹嵌紋病毒 (*Bamboo mosaic virus*, BaMV) 及其衛星核酸 (satellite RNA, satBaMV) 為材料，進一步探討核苷酸序列之變異對其族群在複製競爭上的影響。

BaMV 為單股正極的 RNA 病毒，全長約 6,400 個核苷酸 (Fig. 1)，含有五個 open reading frames (ORFs)。其中 ORF 1 可轉譯出一個 155 kDa 的蛋白質，具有三個功能區，分別為 methyltransferase、helicase 和 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)，與病毒 RNA 之複製有關。ORF 2、3、4 為三個重疊的基因 (triple gene block, TGB)，分別合成 28、13 和 6 kDa 的蛋白，與病毒在細胞間的移動有關。ORF 5 則是一 25 kDa 之鞘蛋白 (coat protein, CP)，負責病毒 RNA 的包被 (Lin *et al.*, 1994)。

有的 BaMV 分離株除了基因體 (genomic) RNA 外，還含有衛星核酸 (satellite RNA)，簡稱 satBaMV。satBaMV 亦為單股正極的 RNA 分子，全長約 840 個核苷酸，包含一 ORF，可轉譯出 20 kDa 的蛋白，其功能尚不清楚。satBaMV 需要 BaMV 的幫助才能在宿主中複製、移動與包被。分析比對從各地採集到的 satBaMV 分離株之序列得知，這些分離株大致可分為 A、B 兩群。A 群涵蓋的竹種較廣，包括綠竹、泰山竹、巨竹、金絲竹、烏腳綠竹、南洋竹、長毛八芝蘭竹、包籜矢竹等，B 群則主要是來自麻竹 (Yeh *et al.*, 2004)。另外，在 satBaMV 的 5' 端非轉譯區 (untranslated region, UTR) 含有一高度變異區 (hypervariable region, HV region)，雖然此區域的序列變異高達 20.7%，但大都維持相似的二級結構，稱之為 apical hairpin stem loop (AHSL) (Yeh *et al.*, 2004)；AHSL 結構包含了一個頂莖環 (apical stem loop, ASL) 及兩個中環 (internal loop) — IL-I 與 IL-II (Fig. 2)。

之前的研究發現，不同的 satBaMV 分離株所展現之生物特性亦不相同，例如 BSF4 和 BSL6 分別來自泰山竹以及麻竹，當其各自與 BaMV 共同感染菸草時，BSL6 會干擾 BaMV 的複製並減輕其對宿主造成的病徵；BSF4 則影響不大 (Hsu *et al.*, 1998)。由 BSF4 和 BSL6 雜合體 (chimerica) 的實驗得知，BSL6 干擾 BaMV 複製的決定區域位於 5' UTR (Hsu *et al.*, 2006)。另外，如果將 BSF4 與 BSL6 的 HV region 互換，結果 BSF4 與 BSL6 原來的生物特性也隨之改變，表示造成此差異的主要決定因子位於 satBaMV 5' HV region (Hsu *et al.*, 2006)。進一步的分析得知，AHSL 上的特定核苷酸及其二級結構在 BSL6 干擾 BaMV 複製之過程扮演著重要的角色 (Chen *et al.*, 2007)。

有趣的是，在大多數 BaMV 的 5' 端也包含類似 satBaMV 5' AHSL 的結構，稱之為 AHSL-like structure (Fig. 3)。因此，我們推測 AHSLs 結構可能與 BaMV 及 satBaMV 的複製

有關。進一步的分析發現，由自然界採集來的 BaMV 分離株大都具有保留性的 AHSL-like 結構；而來自綠竹者(BaMV-O)大部分之分離株均不含衛星核酸，其 AHSL-like 結構則較不具保守性 (林，未發表)。

在自然界中，植物病毒與衛星核酸存在著 heterogenous 族群(Aranda et al., 1993)。而在 satBaMV-BV17 的族群中亦發現五種變異(林，未發表)。檢視不同的 satBaMV 分離株在複製上的競爭情形得知，當 BaMV-S 與 BSL6 及 BSF4 共同感染菸草的原生質體時，其子代均為 BSL6，表示具有干擾 BaMV 複製能力的 BSL6 在複製上之競爭力較 BaMV-S 與 BSF4 來得強。

由上述資料顯示，AHSL-like 與 AHSL 結構對於 BaMV 與 satBaMV 的複製以及 satBaMV 干擾 BaMV 複製之過程中扮演著重要的角色，而這也讓我們對 BaMV 與 satBaMV 之間的競爭關係感到相當好奇。因此，本實驗將進一步探討 satBaMV 5' AHSL 的序列變異對其競爭能力之影響。另外亦將探討含有與不包含保留性 AHSL-like 結構之 BaMV 間的競爭關係，以期對 BaMV 與 satBaMV 間的互動關係有更深一層之認識。

貳、研究過程及方法

質體：

1. BaMV-S：不具衛星核酸的 BaMV。
2. BaMV-SB23：將 BaMV-BB23 之 AHSL-like 結構取代 BaMV-S 之 AHSL-like 結構，形成 BaMV-SB23 (Fig. 6)。
3. BSF4-I：將 BSL6 和 BSF4 二級結構中的 AHSL 互換之後 (Fig. 4)，所產生的 BSF4-I 含有 BSL6 的 AHSL 及 BSF4 的主體。
4. BSL6-I：將 BSL6 和 BSF4 5' UTR 二級結構中的 AHSL 互換之後 (Fig. 4)，所產生的 BSL6-I 含有 BSF4 的 AHSL 及 BSL6 的主體。
5. BSF4-5：將 BSL6 之 AHSL 其中的 C⁸³ 變異為 U 後 (Fig. 5) 形成 F23。
6. BSL6-11：將 BSF4 之 AHSL 中 U⁸² 變成 C (Fig. 5) 形成 F24。

1. 病毒RNA之萃取

於 300 μ l 病毒溶液加入 100 μ l 病毒解體溶液(100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 500 μ g/ml bentonite, 5% SDS)，再加入 5 μ l 之 2- mercaptoethanol 和 1 μ l Ribonuclease Inhibitor (RNasin, 40 unit/ μ l)，於 60°C 反應 5 分鐘後，加入等體積之 PCI，震盪並以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液並加入等量之 PCI，混勻且離心後，進行酒精沉澱，最後將病毒 RNA 溶於 50 μ l 的 DEPC-H₂O，讀取 A₂₆₀ 之吸光值，並以 1 OD₂₆₀ = 40 μ g/ml 計算 RNA 濃度。

2. 生體外轉錄(in vitro transcription)

取 2 μ g 經限制酶切開之質體加於 100 μ l 的轉錄溶液 (1x RNA polymerase buffer, 10 mM DTT, 0.4 mM ATP, 0.4 mM CTP, 0.4 mM UTP, 0.075 mM GTP, 0.5 mM Cap Analog, 20 unit RNasin, 50 unit T7 RNA polymerase)，於 37°C 反應 45 分鐘後，加入 0.5 μ l 20 mM GTP 及 50 unit T7 RNA polymerase，再於 37°C 反應 45 分鐘，接著酒精沉澱後，溶於 25 μ l 的 DEPC-H₂O，並以電泳確認轉錄之完整性。

3. 菸草懸浮細胞原生質體(protooplast)之分離

取 25 ml 的菸草懸浮細胞，以 1,000 rpm 離心 7 分鐘後，將細胞懸浮於 25 ml 的分解溶液(1% cellulose R-10, 0.2% driselase, 0.6% macerozyme R-10, 0.1% BSA, 13.7% sucrose, pH=5.6)，於 25°C 黑暗中處理 8-10 小時後，以孔徑 90 nm 的尼龍篩網過濾，再以 1,000 rpm 離心 7 分鐘，將原生質體沉澱於 2 ml 的電擊緩衝溶液(每升含有 77.4 g mannitol, 2.38 g Hepes, 0.735 g CaCl₂, 5.965 g KCl, pH=7.2)。取 10 μ l 細胞懸浮液，利用血球計數器於顯微鏡下計算細胞濃度。

4. 以電擊方式(electroporation)接種病毒RNA

取 2 x 10⁵ 個原生質體置於直徑 1.6 公分的培養皿中，再加入 20 μ l 病毒 RNA (1 μ g) 與 satBaMV transcript (1 μ g)，於 50 μ FD 與 250 V 的條件下，以電擊環電擊原生質體 1 次，接著靜置於冰上 10 分鐘，然後在 25°C 之暗處培養。

5 · 原生質體total RNA之萃取

取500 μl 經感染之原生質體，加入200 μl 萃取溶液(0.33 M glycine, pH=9.5, 0.33 M NaCl, 33 mM EDTA, 3.3% SDS, 8.3 mg/ml bentonite)與500 μl 之PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol = 25:24:1)，震盪5分鐘後，以12,000 rpm離心5分鐘，吸取上清液再加入等量之PCI，混勻後離心5分鐘，吸取上清液，以酒精沉澱後，溶於30 μl 的DEPC-H₂O，並以電泳確認RNA之完整性。

6 · 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

1) 使用 Amersham Pharmacia ready to go™ beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)，於含 reaction bead 管內加入下表劑量，使總體積和為 50 μl 。

		劑量/每管
DEPC H ₂ O		44 μl
Nb protoplast total RNA (註 1)		3 μl
Primer (註 2)	B104 (10 μM)	1 μl
	B45 (10 μM)	2 μl
總計		50 μl

註 1：在 satBaMV 的實驗中，製作三管，個別加入的 satBaMV RNA 分別為此三種：BSF4-I、BSL6-I 以及 BSF4-I,BSL6-I mix。

在 satBaMV 的實驗中，製作三管，個別加入的 satBaMV RNA 分別為此三種：BSF4-5、BSL6-11 以及 BSF4-5,BSL6-11mix。

註 2：對於 satBaMV 所添加的 Primer 的序列：

BS104 (5'-GAAACTCACCGCAACGA-3')

BS45 (5'-CATCTTTTAACGTCTTTATTC-3')

2) 使用 Amersham Pharmacia ready to go™ beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)，於含 reaction bead 管內加入下表劑量，使總量為 50 μl 。

		劑量/每管
DEPC H ₂ O		43 μl
BaMV RNA (註 3)		4 μl
Primer (註 4)	B29 (10 μM)	1 μl
	B165 (10 μM)	2 μl
總計		50 μl

註 3：在 BaMV 的實驗中，製作三管，個別加入的 BaMV RNA 分別為此三種：BaMV-SB23、BaMV-S 以及 BaMV-SB23,BaMV-S mix。

註 4：所添加的 Primer 的序列：

B29 (5'-AGGTAAGCTTGAAAACCACTCCAAACGAAA-3')

B165 (5'-GGGAGGCGGGGGTAGATAG-3')

在核酸增殖儀上設定反應條件，進行連鎖反應。先在 95 °C 的高溫之下將 DNA 雙股螺旋結構分開，形成單股的 DNA 模版。再將溫度降至 55 °C 使 primer 與單股 DNA 做互補結合。最後將溫度提高到 72 °C 讓四種核苷酸 A (adenosine)、C (cytosine)、T (thymidine)、G (guanine) 以 primer 為起點被催化聚合成與單股 DNA 模版互補的雙股 DNA。將以上三個步驟，來回重複做 35 次的循環便可將原來的 DNA 複製放大。

以下為針對擴增 satBaMV 全長所設定的溫度與時間：

溫度	42°C	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
時間	45 分鐘	5 分鐘	50 秒	50 秒	1 分鐘	10 分鐘	持續保存
			循環 35 次				

以下為針對 BaMV 5'端 (500 nt)所設定的溫度與時間：

溫度	42°C	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
時間	45 分鐘	5 分鐘	30 秒	30 秒	30 秒	7 分鐘	持續保存
			循環 35 次				

7. 將 RT-PCR product (為前一步驟的產物) 與 pGEM-Teasy 載體 (vector) 黏合 (ligation)

	劑量
PCR product	3.3 µl
Vector pGEM-Teasy (50ng/µl)	0.7 µl
T4 DNA ligase 10X buffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM ATP)	5 µl
T4 DNA ligase (1U/µl)	1 µl
Total	10 µl

將上表劑量加入微離心管中混合均勻，並置於水浴槽 16°C，反應至隔天。

8. 轉型 (transform) 至勝任細胞 (competent cell) (*E. coli* DH5α strain)

將 10 µl ligation product 和 100 µl competent cell 混合，置於冰上 30 分鐘後放入 42°C 水浴槽 30 秒，瞬間的冷熱轉換使 DNA 便於進入勝任細胞中，再置於冰上 3 分鐘，使破裂的勝任細胞癒合。接著加入 1 ml LB 混合液放進 37°C 的培養箱中震盪搖擺 1 小時 (200 rpm)，取出後離心 30 秒 (10000 rpm)，令細菌與 LB 溶液分離。抽掉 950 µl 的上層溶液 (小心不要碰到沉澱物)，再取 150 µl 與沉澱物充分混和，將混合液均勻塗抹在含 Ampicillin (100 g/ml) 的 LB plate 上，靜置於 37°C 培養箱內，反應至隔天。

9 · 大腸桿菌液態培養

在無菌操作台中，將200 µl的Ampicillin(50 mg/ml)加入至100 ml的LB混和均勻(10^{-3} g/l)，取2 ml的LB混合液分別加入培養管中，另將已滅菌的牙籤輕刺plate上的菌落，丟入其中，放入37 °C中震盪培養 (200 rpm) 至隔天。

10 · 質體小量製備

利用Mini-M kit(VIOGENE-BIOTEK CORP)萃取質體。於無菌操作台中取出1.5 ml的菌液至微離心管內，離心1分鐘(10,000 rpm)使細菌沉澱，倒掉上層液，加入250 µl含有RNase A的MX1溶液，將其快速震盪使細菌懸浮在溶液中。加入250 µl MX2破壞細菌之細胞膜，再加入350 µl MX3迅速中和，離心10分鐘(13,000 rpm)，則細菌的蛋白質與染色體DNA將會沉澱，將含有質體DNA的上層液倒入到column內，離心1分鐘(13,000 rpm)並倒出離下來的溶液，加入500 µl 的WF純化product，離心1分鐘(13,000 rpm)並倒出離下來的溶液，加入WS 700 µl(含酒精)，離心1分鐘(13,000 rpm)，再倒出離下來的溶液，離心3分鐘(13,000 rpm)將酒精揮發，將column置入新的微離心管中，並加入50 µl的水，離心一分鐘(12,000 rpm)，將質體DNA elute 下來。

11 · 限制酶截切測驗及電泳確認

將下表劑量加入微離心管中，於37 °C培養箱中靜置兩小時，再以電泳確認正確的DNA片段。

	劑量/每管
Plasmid (0.2µg/µl)	3 µl
10X EcoR1 Buffer (50 mM NaCl,100 mM Tris-HCl,10 mM MgCl2 ,0.025%Triton X-100,)	1 µl
EcoR I (20U/µl)	0.15 µl
H ₂ O	5.85 µl
Total	10 µl

12 · 挑選所要選殖株並定序

挑選經限制酶檢查正確的選殖株，再利用自動核酸序列分析儀 (型號 ABI377)定序，觀察兩者變異後的競爭情形。

	處理	選殖株個數 (註 5)
一	BSF4-I	15
	BSL6-I	12
	BSF4-I,BSL6-I mix	25
二	BSF4-5	13
	BSL6-11	12
	BSF4-5,BSL6-11 mix	28
三	BaMV-S	10
	BaMV-SB23	10
	BaMV-S, BaMV-SB23 mix	31

註 5：選殖株個數以至少 10 株為準，由於實驗是單獨分析一種選殖株其內部的差異，因此各種選殖株個數就算不相等，也不會對實驗結果造成影響。

13 · 探針之製備

利用生體外轉錄合成 DIG 標定的 RNA 探針，反應成份如下表所列

Reagent	Volume
1 μ g linearized plasmid DNA or appropriate amount of PCR product (100-200 ng)	1 μ l
DIG RNA labeling mix,10 \times	2 μ l
Transcription buffer,10 \times	2 μ l
Add sterile RNase free double dist. water to a final volume of 18 μ l	13 μ l
RNA polymerase (SP6,T7orT3) 20U/ μ l	2 μ l
Total volume	20 μ l

以上材料需在冰桶中加入微量離心管，混合並離心，置於 37 $^{\circ}$ C 中兩個小時。在無 RNase 的環境下加入 2 μ l DNase I 以除去 DNA 模板，置於 37 $^{\circ}$ C 中 15 分鐘，加入 2 μ l 的 0.2M EDTA (pH8.0)反應停止。加入 2.5 μ l (0.1 volume) 4M LiCl 至 -15 \sim -25 $^{\circ}$ C 75 μ l (2.5 volumes)的酒精中並混合均勻，並在 -60 $^{\circ}$ C 以下放置 30 分鐘，或者在 -15 \sim -25 $^{\circ}$ C 中放置兩個小時。以 13000 \times g 離心 5 分鐘，小心地倒出酒精並將沉澱物以 50 μ l 的 -15 \sim -25 $^{\circ}$ C 酒精(70%)洗去。再以 13000 \times g 離心 5 分鐘，溶解在 50 μ l 的 DEPC-H₂O 中。

14 · 北方墨點法

將 2 μg total RNA 以 glyoxal 變性並以磷酸瓊脂凝膠分離，接著轉印到 Hybond-N+ 尼龍膜上 (Amersham)，再用 DIG 標定之專一性核酸探針與其雜合，然後以 DIG luminescent Detection Kit 進行偵測。

參、研究結果與討論

1. 具干擾 BaMV 複製能力之 satBaMV 變異株在複製過程中有較強的競爭力

之前的實驗顯示，當 BaMV-S 與 BSL6 及 BSF4 共同感染菸草的原生質體時，具有干擾 BaMV 複製能力的 BSL6 在複製上之競爭力較 BaMV-S 與 BSF4 來得強(林，未發表)。另外，如果將 BSF4 和 BSL6 的 HV region 互換之後形成 BSF4-1 與 BSL6-1，其生物特性也會隨之改變：BSF4-1 具有干擾 BaMV 複製能力；BSL6-1 則失去干擾能力(Chen et al., 2007)。為了進一步確認具有干擾 BaMV 複製能力的 satBaMV 變異株—BSF4-1，在複製上也具有較高的競爭能力。我們將 BaMV-S 與 BSF4-1 及 BSL6-1 共同感染至菸草的原生質體，並分析其子代的數目。由 Northern blot assay 的結果得知，當 BaMV-S 與 BSF4-1 共同感染菸草的原生質體時，其可以減少 BaMV RNAs 累積的量，約為 BaMV-S 單獨感染時的 2%。當等量的 BSF4-1 和 BSL6-1 與 BaMV-S 混合接種至菸草的原生質體時，仍可大幅減少 BaMV RNAs 的累積量，約為 BaMV-S 單獨感染時的 10%。利用 RT-PCR 及序列分析來辨識 satBaMVs 的子代發現，在混合感染的子代群體中，BSF4-1 佔了 24/25 (Fig. 4)，表示具有干擾 BaMV 複製能力 BSF4-1 能穩定複製且具優勢。

根據前人的研究得知，AHSL 上的特定核苷酸在 BSL6 干擾 BaMV 複製之過程扮演著重要的角色(Chen et al., 2007)。如果將 BSF4 的 IL-I 中的 U⁸² 變異為 C 形成 BSF4-5，則能夠干擾 BaMV 的複製。相反地，如果將 BSL6 IL-I 中的 C⁸³ 改為 U 形成 BSL6-11，則會失去干擾的能力。為了進一步證實單一核苷酸的變異會影響其複製上的競爭能力，我們針對 BSF4-5 和 BSL6-11 進行了上述的實驗。結果顯示，BSF4-5 和兩者混合感染的群體都能顯著地降低 BaMV RNAs 累積的量，分別為 BaMV 單獨感染時量的 2%和 7%。在 28 個 BSF4-5 和 BSL6-11 混合感染的子代中有 26 個子代為 BSF4-5，顯示 BSF4-5 在子代群體中佔有優勢(Fig. 5)。

綜合以上結果可知，具有干擾能力的 satBaMV 變異株，即使是單一個核苷酸的改變，在複製上較 BaMV-S 以及不具干擾能力的 satBaMV 變異株更具競爭力。

2. 含有保留性 AHSL-like 結構的 BaMV 在複製過程中較不含保留性結構者更具競爭力

3.

因為大部分的 BaMV 分離株在其 5'端具有保留性的 AHSL-like 結構，例如 BaMV-D (Fig. 3)，此結構及序列與具干擾能力的 satBaMV 5' AHSL 結構相似。另外，如果將 BaMV-D 5' AHSL-like 結構中環之序列換至 BSL6 5' AHSL 之中環，此 BSL6 變異株仍具有干擾 BaMV 複製的能力(Chen et al., 2007)。而來自綠竹的 BaMV-O 及其變異株—BaMV-S (本實驗中所用之協助病毒)，它們的 AHSL-like 結構則較不具保守性 (林，未發表)。因此，為了要測試擁有保留性的 AHSL-like 結構的 BaMV 在複製的過程中，是否比沒有此保留性二級結構的 BaMV 更具競爭力，我們將 BaMV-S 的 AHSL-like 結構以 BaMV-BB23 者取代形成 BaMV-SB23 (Fig. 6A)。BaMV-BB23 為具干擾能力之衛星核酸 satBaMV-BB23 的協助病毒。當菸草原生質體接種 BaMV-SB23 時，其 BaMV RNAs 的累積量與接種 BaMV-S 者相當，表示此 BaMV-S 變異株能夠進行複製 (Fig. 6B)。若原生質體同時感染了 BaMV-S 和 BaMV-SB23，在其子代中有

19/31 為 BaMV-SB23，顯示 BaMV-SB23 在子代的群體中較具優勢(Fig. 6B)。然而，BaMV-SB23 對於 BaMV-S 的優勢並沒有如干擾性 satBaMV 對非干擾性 satBaMV 一樣的明顯。

討論

satBaMV 需依靠 BaMV 的幫助才能複製、移動與包被，因此 satBaMV 也會和自己的寄主競爭複製所需的蛋白。而自前人的研究中發現，AHSL 結構在這種競爭中扮演著重要的角色，接續這些研究成果，我們對於 AHSL 序列作更進一步的探討。實驗一開始，我們先從較大範圍處著眼，驗證 satBaMV 位於 5' 端的 AHSL 結構對於其競爭的影響力。藉由將兩個生物特性相異的 satBaMV (BSF4 與 BSL6) 之 AHSL 互換形成 BSF4-I 與 BSL6-I，由此實驗結果可證實 AHSL 的確能影響 BaMV 的競爭表現。接著，我們縮小變異的範圍，針對 AHSL 上的單一序列進行更深入的實驗。原本競爭力較差的 BSF4，在將其 AHSL 中 U82 變成 C 形成 BSF4-5 後，反而較將 BSL6 之 AHSL 中的 C82 變異為 U 後形成之 BSL6-11 更具有競爭力，而此不但承接了上一個實驗的結論，並證明此單一個核苷酸之改變對於 satBaMV 的生物特性與競爭能力，具有一定的影響力。

此外，將 BaMV-BB23 的 AHSL-like 結構接在 BaMV-S 的主體上形成 BaMV-SB23，其與 BaMV-S 競爭的實驗結果顯示，BaMV-SB23 與 BaMV-S 的子代比例為 19:12，由於差異沒有特別的顯著，所以無法充分證明含有保留性 AHSL-like 結構之 BaMV 較不具此結構之 BaMV 來得有競爭力。

綜合本實驗的結果可知，AHSL 結構及序列在 BaMV 與 satBaMV 的複製過程中扮演了重要的角色。我們推測 BaMV 與 satBaMV 可能是透過 AHSL 結構來競爭複製所需的因子，而具有干擾能力之 AHSL 結構對複製因子有較高的競爭力，因此在子代群體中佔有較大的優勢。另外，AHSL 中環(IL-I)上單一個核苷酸之變異並不影響其二級結構，但卻改變了 satBaMV 的生物特性與競爭能力，可能是因三級結構的改變而影響其對複製因子的競爭能力。

對於本實驗未來仍有許多的發展空間。對於 BSL6 抑制 BaMV 的機制，至今仍尚待學者的努力，在 BSL6 的序列中，或許還有對於其抑制 BaMV 性質有影響力的序列還未被發現。此外 satBaMV 和原寄主兩者之間的競爭關係，也需要作更進一步的探討。利用 BSL6 能夠抑制 BaMV 複製的特性，我們培育 BSL6 的轉殖竹子，用以對抗 BaMV 的感染，增加竹筍的品質與產量。

肆、結論與應用

1. 含有 BSL6 之 AHSL 序列的 BSF4-I 較含有 BSF4 之 AHSL 序列之 BSL6-I 更具競爭力，證明 AHSL 對於 satBaMV 的競爭有相當的影響力。

2. BSF4 與 BSL6 5' AHSL 之單一核苷酸改變，會造成其競爭能力改變，推知此單一核苷酸與其生物特性有關。
3. 含有保留性 AHSL-like 結構之 BaMV-SB23 較 BaMV-S 稍具競爭力，但由於實驗結果不如前二者顯著。
4. satBaMV 其抑制性質與其 AHSL 有很大的關係，未來可對於此部分的序列做更進一步的研究。

伍、參考文獻

- Chang, B.Y., Lin, N.S., Liou, D.Y., Chen, J.P., Liou, G.G., Hsu, Y.H., 1997. Subcellular localization of the 28 kDa protein of the triple-gene-block of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt. 5), 1175–1179.
- Hsu, Y. H., Y. S. Lee, J. S. Liu, and N. S. Lin. 1998. Differential interactions of bamboo mosaic potexvirus satellite RNAs, helper virus, and host plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1207–1213.
- Lin, N. S., Y. J. Chai, T. Y. Huang, T. Y. Chang, and Y. H. Hsu. 1993. Incidence of bamboo mosaic potexvirus in Taiwan. *Plant Dis.* 77:448–450.
- Lin, N. S., B. Y. Lin, N. W. Lo, C. C. Hu, T. Y. Chow, and Y. H. Hsu. 1994. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* 75:2513–2518.
- Lin, N. S., and Y. H. Hsu. 1994. A satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus. *Virology* 202:707–714.
- Lin, N. S., Y. S. Lee, B. Y. Lin, C. W. Lee, and Y. H. Hsu. 1996. The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced with a bacterial gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3138–3142.
- Lin, M.K., Chang, B.Y., Liao, J.T., Lin, N.S., Hsu, Y.H., 2004. Arg-16 and Arg-21 in the N-terminal region of the triple-gene-block protein 1 of Bamboo mosaic virus are essential for virus movement. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 1), 251–259.
- Li, Y.I., Cheng, Y.M., Huang, Y.L., Tsai, C.H., Hsu, Y.H., Meng, M., 1998. Identification and characterization of the Escherichia coli-expressed RNA-dependent RNA polymerase of bamboo mosaic virus. *J. Virol.* 72 (12), 10093–10099.
- Li, Y.I., Shih, T.W., Hsu, Y.H., Han, Y.T., Huang, Y.L., Meng, M., 2001. The helicase-like domain of plant potexvirus replicase participates in formation of RNA 5Vcap structure by exhibiting RNA 5V-triphosphatase activity. *J. Virol.* 75 (24), 12114–12120.
- Roossinck, M. J., D. Sleat, and P. Palukaitis. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol. Rev.* 56:265–279.
- Wung, C.H., Hsu, Y.H., Liou, D.Y., Huang, W.C., Lin, N.S., Chang, B.Y., 1999. Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt. 5), 1119–1126.
- Yang, C. C., J. S. Liu, C. P. Lin, and N. S. Lin. 1997. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a bamboo mosaic potexvirus isolate from common

bamboo (*Bambusa vulgaris* McClure). Bot. Bull. Acad. Sin. 38:77–84.

Yeh, W.-B., Y.-H. Hsu, H.-C. Chen, and N.-S. Lin. 2004. A conserved secondary structure in the hypervariable region at the 5' end of Bamboo mosaic virus satellite RNA is functionally interchangeable. Virology 330:105–115.

陸、附錄

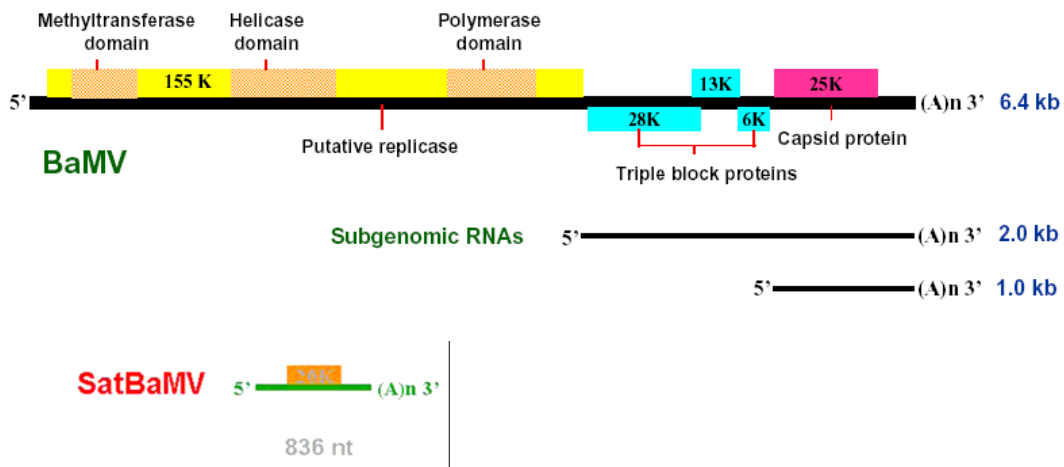


Figure 1. BaMV 和 satBaMV 的基因圖。

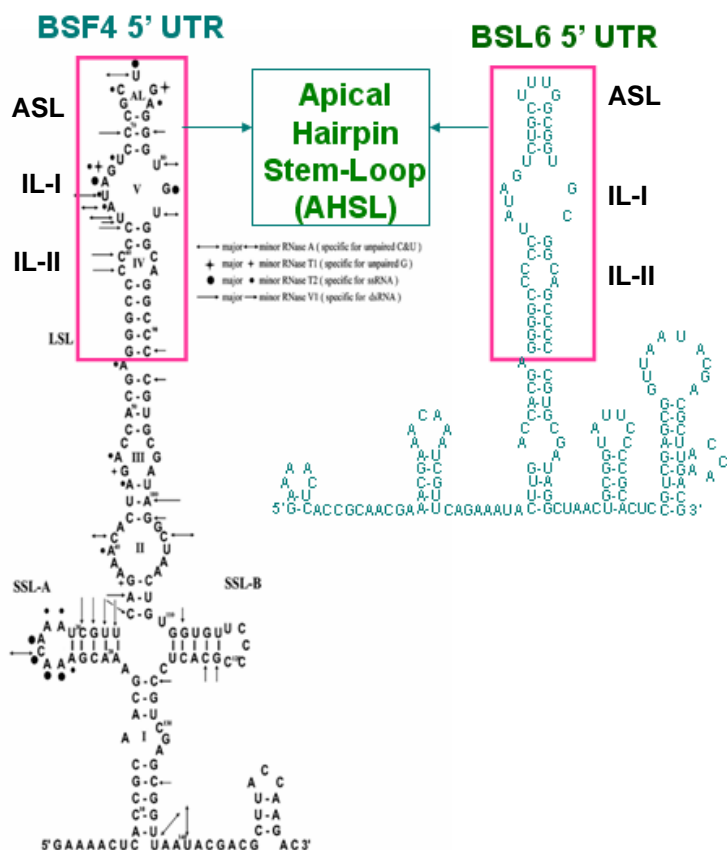


Figure 2. 在 satBaMV 的 5' 端非轉譯區 (untranslated region, UTR)含有一高度變異區 (hypervariable region, HV region)，雖然此區域的序列變異高達 20.7%，但大都維持相似的二級結構 (紅框標示處)，稱之為 apical hairpin stem loop (AHSL) (Yeh et al., 2004)；AHSL 結構包含了一個頂莖環(apical stem loop, ASL)及兩個中環(internal loop)–IL-I 與 IL-II。

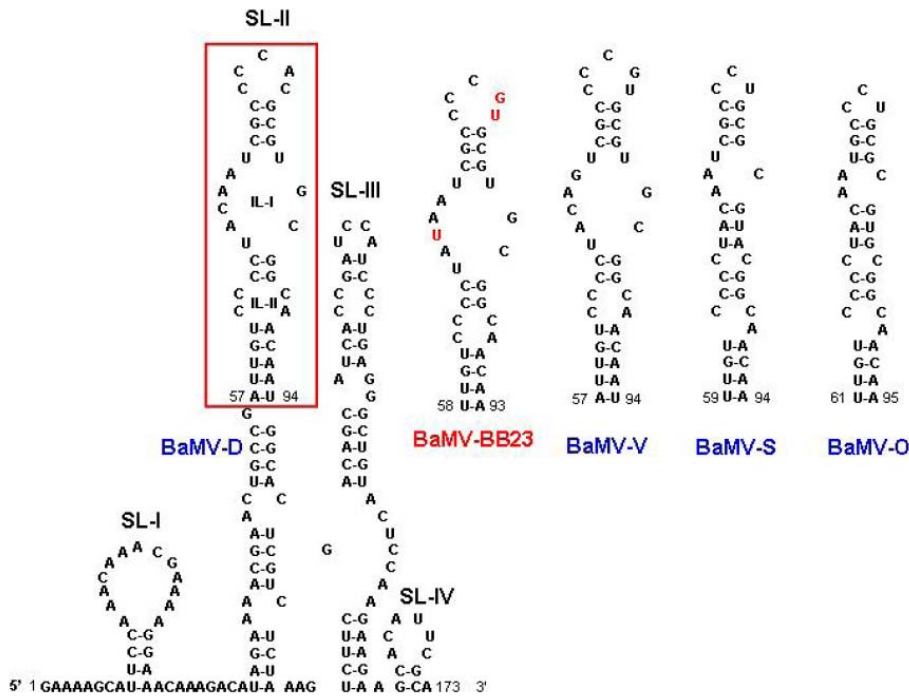


Figure 3. 在大多數 BaMV 的 5'端也包含類似 satBaMV 5' AHSL 的結構，稱之為 AHSL-like structure (紅框標示處)。此分別為 BaMV-D、BaMV-BB23、BaMV-S 的 AHSL-like 二級結構體。

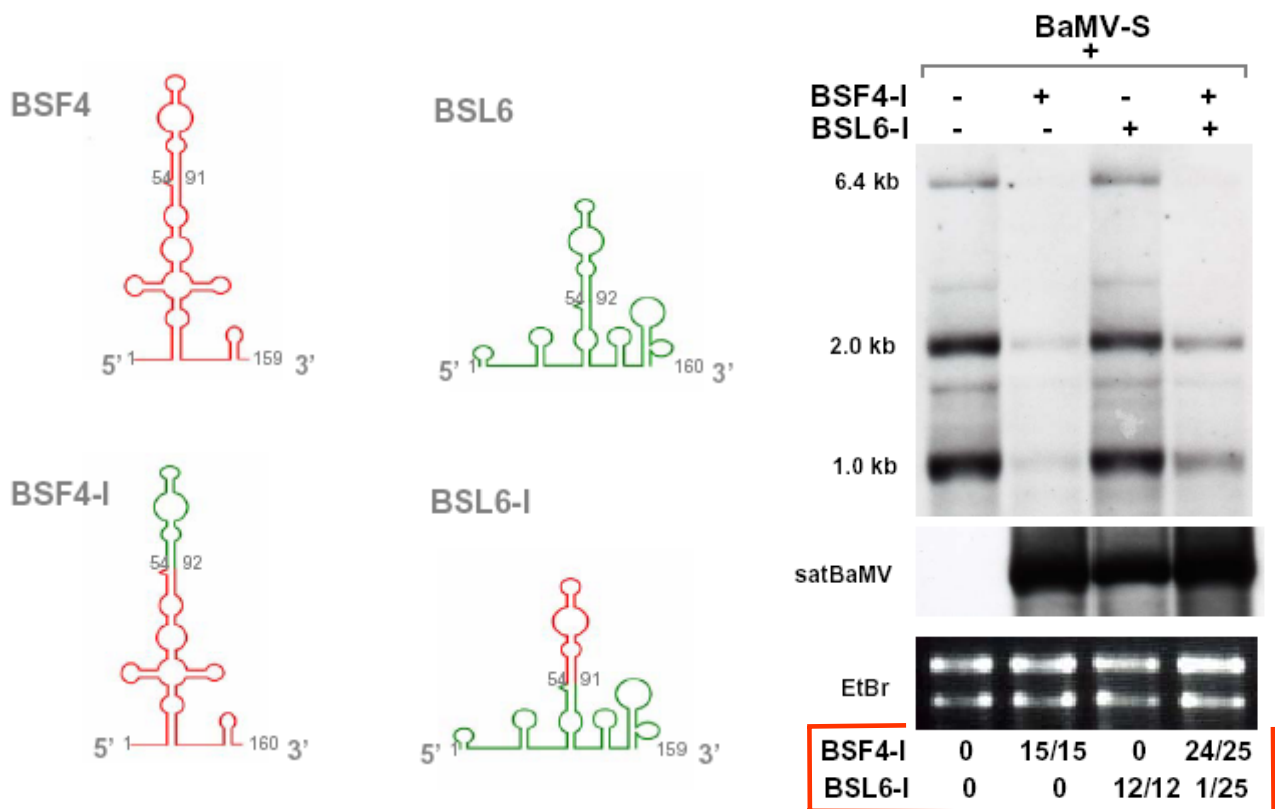


Figure 4. BSF4-I 與 BSL6-I 共同感染菸草原生質體之競爭力分析

將 BSF4 與 BSL6 之 AHSL 互相交換後，形成 BSF4-I 與 BSL6-I。在 25 個 BSF4-I 和 BSL6-I 混合感染的子代中有 24 個子代為 BSF4-I (紅框標示處)，表示在子代的群體中具干擾性的 BSF4-I 能穩定複製且較具優勢。

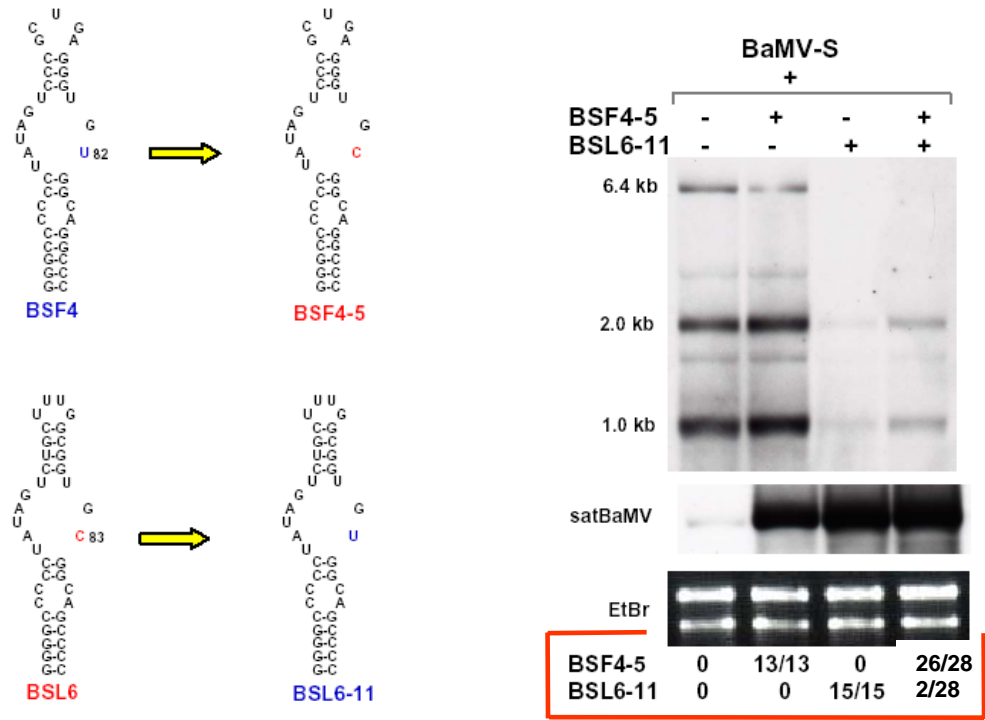


Figure 5. 將 BSF4 與 BSL6 之 AHSL 中的單一核苷酸互相交換後，形成 BSF4-5 和 BSL6-11。在 28 個 BSF4-5 和 BSL6-11 混合感染的子代中有 26 個子代為 BSF4-5 (紅框標示處)，顯示 BSF4-5 在子代群體中佔有優勢。

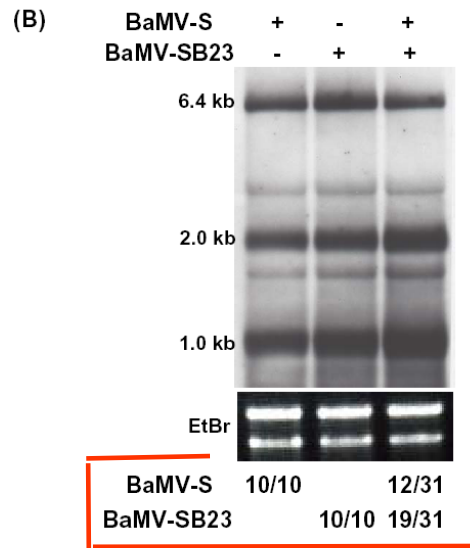
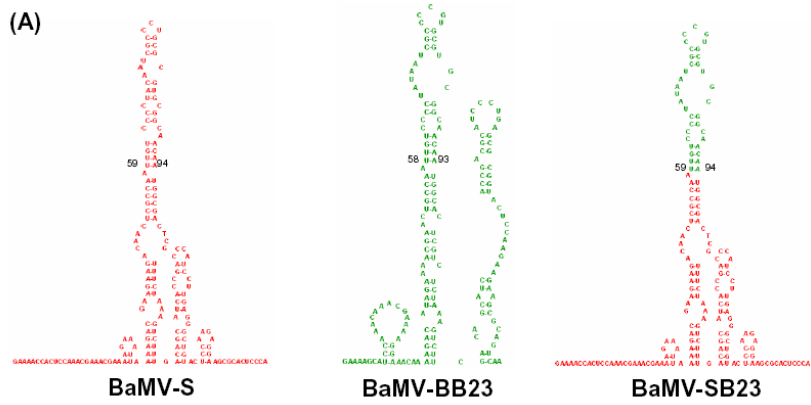


Figure 6. 將 BaMV-BB23 之 AHSL-like 結構取代 BaMV-S 之結構，形成 BaMV-SB23。原生質體同時感染了 BaMV-S 和 BaMV-SB23，在其 31 個子代中有 19 個為 BaMV-SB23 (紅框標示處)，顯示 BaMV-SB23 在子代的群體中較具優勢(Fig. 6B)。

評語

- 1) 能針對新穎的病毒複製機制探討。
- 2) 實驗數據完整、明確。
- 3) 建議自行設計可能有作用之突變 RNA 序列，進行更深入之研究。