

# 2009 年臺灣國際科學展覽會

## 優勝作品專輯

編號： 070007

### 作品名稱

竹嵌紋病毒分離株五端非轉譯區二級結構之比較

### 得獎獎項

微生物學科大會獎第三名

學校名稱： 臺北市立建國高級中學

作者姓名： 張耀文

指導老師： 魏宏仁

關鍵字： 竹嵌紋病毒、衛星核酸、共同演化

## 作者簡介



我，張耀文，家住臺北。高一進入中央研究院高中生命科學培育計畫，在教授實驗室學習研究。記得升高二的暑假，每天進實驗室做實驗。從瞭解實驗室的規定、基本的實驗操作到完成自己的報告，雖然在許多同學眼中是一件繁瑣的事，我卻認為這是件很有趣的經驗。比別人早申請到大學，在沒有升學壓力的情況下，會全心全力投注在科展上。

## 摘要

衛星核酸為次病毒分子與協助病毒不具核酸序列同源性，為了解次病毒分子與其協助病毒之可能關係，本研究以竹嵌紋病毒 (Bamboo mosaic virus, BaMV) 及其衛星核酸 (satellite RNA, satBaMV) 為材料，探討它們之間共同演化關係。採自自然界的多種竹葉經萃取後，選取包括 BaMV-BO 型 12 株、BaMV-BB 型 11 株及 BaMV-DL 型 2 株共 25 種分離株進行定序、變異率、演化樹及二級結構之分析。發現 BaMV 5' AHSL-like 結構之序列變異率約為 5.5%，並不像 satBaMV 5' AHSL 序列變異性高，也就是 BaMV 5' 端相對是保守的，可能為複製所需的辨識序列。具有 satBaMV 的 BaMV 分離株，其 AHSL-like 結構較具保守性，辨識度高較具競爭力，經分析其 AHSL-like 二級結構之頂端為五環結構，推論此結構可能與共同演化相關，並推測其相互影響之可能機制。

# **The Comparison of the Secondary Structure of the Bamboo Mosaic Virus and its satellite RNA in their 5' Untranslated Region**

## **Abstract**

Satellite RNA is a subviral agent which is non-homologous with its helper virus. In order to understand the possible relation between the subviral agent and its helper virus, we conduct our study by using Bamboo Mosaic Virus (BaMV) and the satellite RNA associated with BaMV (satBaMV) to recognize the co-evolution relation between them. We adapt different types of BaMV collected throughout Taiwan, including 12 types of BaMV-BO, 11 types of BaMV-BB, and 2 types of BaMV-DL to analyze their sequences, variation rates, evolution trees, and secondary structures. We discovered that the variation rates of the Apical Hairpin Stem Loop-like (AHSL-like) structure of the BaMV 5' end is approximately 5.5%, instead of the high variation rates of the satBaMV 5' end. In other words, the 5' end of the BaMV is more conserved. It may be because it is the recognition sequence during the replication process. Furthermore, the AHSL-like structure of the BaMV isolates with the satBaMV is more conserved, which leads to a more competitive characteristic. After analyzing, its top of the AHSL-like structure is a five-ring structure. We infer that the structure is related to the co-evolution relation between the BaMV and the satBaMV, and further propose a possible mechanism between them.

# 竹嵌紋病毒分離株五端非轉譯區二級結構之比較

## 壹、前言

### 一、病毒與次病毒分子

病毒很小且構造簡單，是絕對寄生的生物。令人驚訝的是病毒也有寄生物，次病毒分子(subviral agent)分為有自動複製能力者，如類病毒(viroid)與元蛋白(prion)；及需要仰賴協助病毒(helper virus)幫助複製者，如缺失性核酸(defective RNA)、衛星核酸(satellite RNA)以及衛星病毒(satellite virus)。缺失性核酸為病毒RNA在複製過程中發生重組所產生。而衛星病毒與缺失性核酸及衛星核酸最大的不同是它能夠表現外鞘蛋白來包被自己。

由於衛星核酸與協助病毒在序列上並無同源性，這使我們對衛星核酸與其協助病毒間的複製與演化上之關係產生濃厚的興趣。本實驗將以竹嵌紋病毒(BaMV)及其衛星核酸(satBaMV)為材料，根據其五端非轉譯區之二級結構，探討竹嵌紋病毒(BaMV)及其衛星核酸(satBaMV)於複製上共同演化的關係。

### 二、竹嵌紋病毒與衛星核酸

竹子為台灣的重要經濟作物之一。竹嵌紋病毒(Bamboo mosaic virus, BaMV)普遍存在於台灣的竹類栽培區，其會使竹葉產生嵌紋狀病徵，而使竹筍的產量與品質下降，造成農民的損害 (Lin *et al.*, 1993)。

BaMV，屬於馬鈴薯病毒群，為RNA單股正極病毒，全長約6,400個核苷酸，含有五個open reading frame (ORF)。其中ORF 1可轉譯出一個155 kDa的蛋白質，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)，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(如圖 1 所示)。

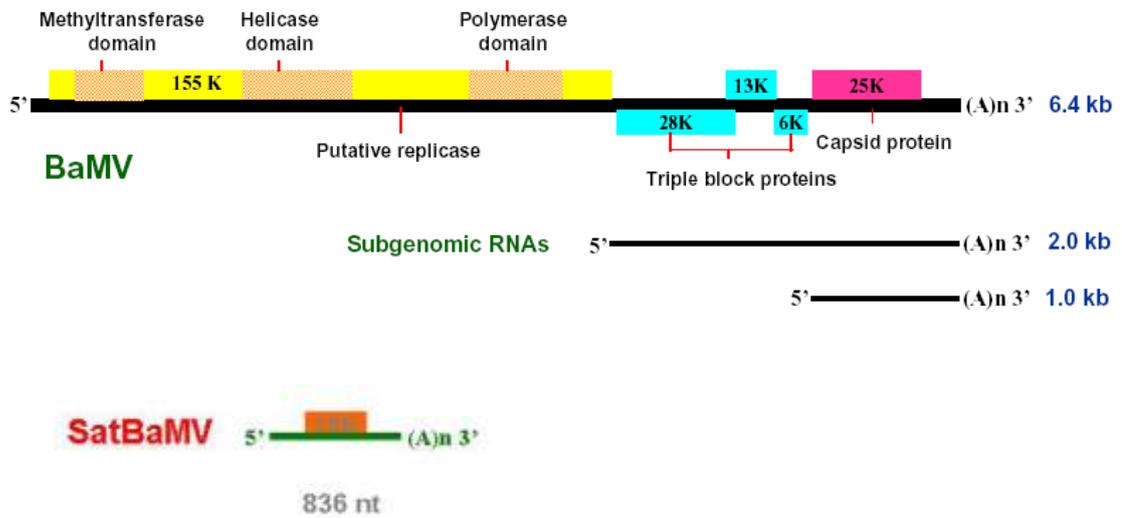


圖 1 BaMV 和 satBaMV 的基因圖

根據文獻，竹嵌紋病毒株攜帶有兩類次病毒分子 (subviral agent)：一為衛星核酸，另一為缺失性 RNA，其複製與包被完全依賴竹嵌紋病毒 (BaMV)，但前者的核啟酸序列與協助病毒無顯著同源性，而後者為病毒複製過程中發生部分核啟酸序列為被複製或序列被錯誤地重組，而產生的小 RNA 分子，因此核啟酸序列與協助病毒完全同源。已知 BaMV 的衛星核酸 (satellite RNA，簡稱 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 (Lin and Hsu, 1994)。

### 三、共同演化(coevolution)

共同演化指兩個無同源性的物種間，因自然選擇上的壓力，互相影響對方演化的過程。共同演化可能是一場掠食者與獵物間永無止盡的軍備競賽。但也可能是寄主與寄生體間互利共生的行為。實驗室之前的研究(Yeh and Lin, 2000)即發現 BaMV 及 satBaMV 在自然界存有高度競爭現象。

#### 四、高度變異區

在 satBaMV 的 5' 端非轉譯區 (untranslated region, UTR) 含有一高度變異區 (hypervariable region, HV region)，雖然此區序列變異高達 20.7%，但大都維持相似二級結構，稱之為 apical hairpin stem loop (AHSL)(如圖 2 所示; Yeh *et al.*, 2004)。前項研究亦發現 BaMV 的 5' 端也有類似 satBaMV 5' AHSL 的結構，稱之為 AHSL-like structure(如圖 3 所示)。因此推測 AHSLs 結構可能與 BaMV 及 satBaMV 的複製有關。本實驗將進一步分析更多的 BaMV 分離株 5' 端之二級結構，並配合已知的 satBaMV 之 AHSL 結構，比較不含衛星核酸的 BaMV 分離株以及含有不同生物特性衛星核酸之 BaMV 分離株，在 AHSL-like 結構上之差異，以期對 BaMV 與 satBaMV 間的共同演化關係有更深一層之認識。

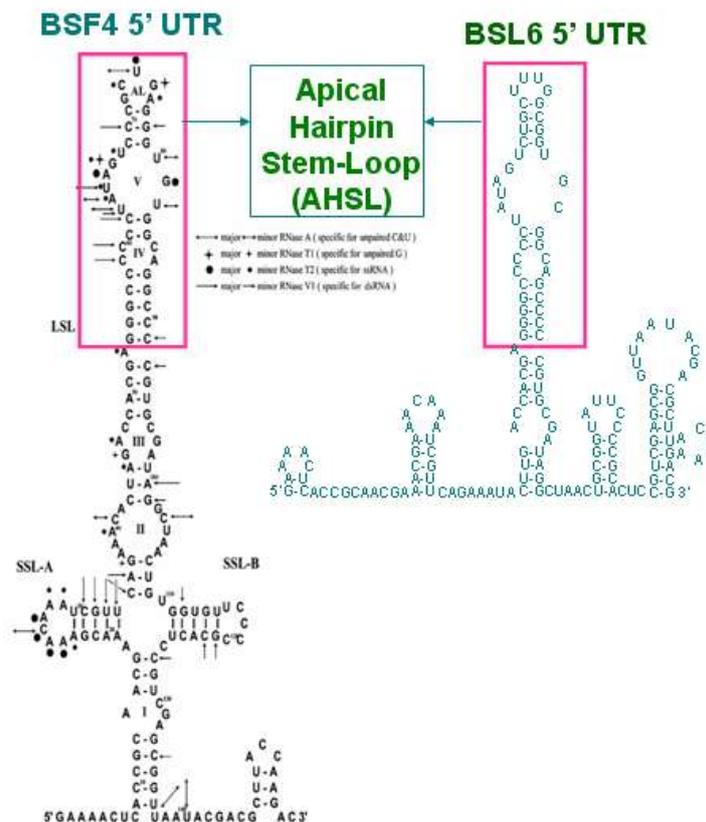


圖 2 SatBaMV BSF4 與 BSL6 5' 端非轉譯區(untranslated region, UTR) 之二級結構(Yeh *et al.*, 2004)

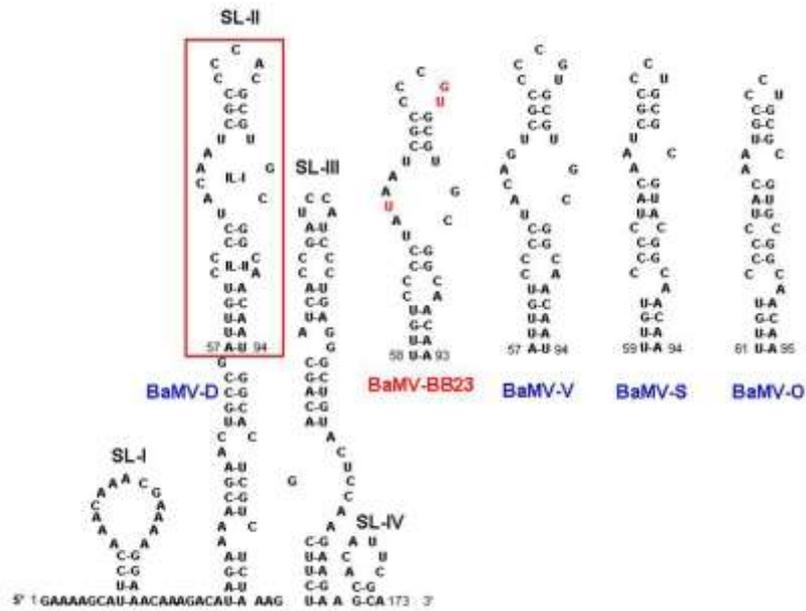
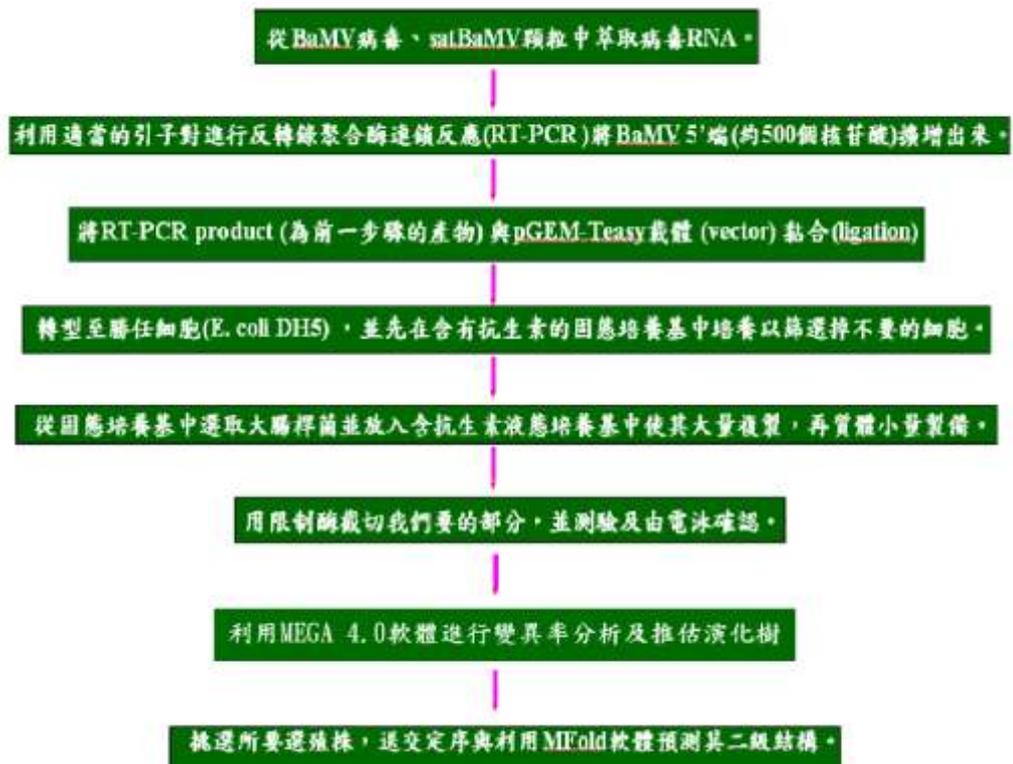


圖 3 BaMV-D、BaMV-BB23、BaMV-S 的 AHSL-like 二級結構體

## 貳、研究過程及方法

### 一、過程



## 二、方法

### (一) 從 BaMV 病毒、satBaMV 顆粒中萃取 RNA

於 300  $\mu\text{l}$  病毒溶液加入 100  $\mu\text{l}$  病毒解體溶液(100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM EDTA, 500  $\mu\text{g/ml}$  bentonite, 5% SDS)，再加入 5  $\mu\text{l}$  之 2-mercaptoethanol 和 1  $\mu\text{l}$  Ribonuclease Inhibitor (RNasin, 40 unit/ $\mu\text{l}$ )，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  $\mu\text{l}$  的 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ ，讀取 A260 之吸光值，並以 1 OD<sub>260</sub> = 40  $\mu\text{g/ml}$  計算 RNA 濃度。

### (二) 利用適當引子對進行反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)，將 BaMV

#### 5' 端(約 500 個核苷酸)擴增出來

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  $\mu\text{l}$ 。(如表 1 所示)

表 1

		劑量/每管
DEPC $\text{H}_2\text{O}$		44 $\mu\text{l}$
Nb protoplast total RNA (註 1)		3 $\mu\text{l}$
Primer (註 2)	B104 (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
	B45 (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$
總計		50 $\mu\text{l}$

註 1：在 satBaMV 的實驗中，製作一管，個別加入的 satBaMV RNA 分別為此一種：BaMV-BB35。

註 2：對於 satBaMV 所添加的 Primer 的序列：

BS104 (5'-GAAAACTCACCGCAACGA-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  $\mu$ l。  
(如表 2 所示)

表 2

		劑量/每管
DEPC H <sub>2</sub> O		43 $\mu$ l
BaMV RNA (註 3)		4 $\mu$ l
Primer (註 4)	B82 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
	B165 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
總計		50 $\mu$ l

註 3：在 BaMV 的實驗中，製作二十五管，個別加入的 BaMV RNA 分別為此二十五種：BaMV-BO11、BaMV-BO14、BaMV-BO17、BaMV-BO18、BaMV-BO13、BaMV-BO16、BaMV-BO19、BaMV-BO22、BaMV-BO25、BaMV-BO26、BaMV-BO27、BaMV-BO28、BaMV-BB20、BaMV-BB21、BaMV-BB22、BaMV-BB24、BaMV-BB29、BaMV-BB30、BaMV-BB31、BaMV-BB32、BaMV-BB34、BaMV-BB35、BaMV-BB37、BaMV-DL12、BaMV-DL20(如表 3 所示)。

註 4：所添加的 Primer 的序列：

B82 (5'-GAAGGCCTGAAAAG(C)CAT(C)TCCAAACA(G)-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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 使 primer 與單股 DNA 做互補結合。最後將溫度提高到 72  $^{\circ}$ C 讓四種核苷酸 A (adenosine)、C (cytosine)、T (thymidine)、G (guanidine) 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。

表 3 BaMV 的採集資料

簡稱	代碼	寄主 <sup>a</sup>	地點	採集時間	BaMV <sup>b</sup>	SatBaMV <sup>c</sup>	Virion <sup>d</sup> ( $\mu$ g)
DL12	AY205212	<i>D. latiflorus</i>	苗栗	02/18/1999	+	+	10.9
DL20	AY205225	<i>D. latiflorus</i>	高雄	06/20/1999	+	+	2.7
BO11		<i>B. oldhamii</i>	高雄	02/15/1999	+	-	36.7
BO13		<i>B. oldhamii</i>	南投	02/21/1999	+	-	17.2
BO14		<i>B. oldhamii</i>	彰化	02/21/1999	+	-	38.0
BO16		<i>B. oldhamii</i>	台南	03/29/1999	+	-	114.8
BO17		<i>B. oldhamii</i>	台南	03/29/1999	+	-	121.1
BO18		<i>B. oldhamii</i>	台南	03/29/1999	+	-	148.3
BO19		<i>B. oldhamii</i>	苗栗	04/03/1999	+	-	37.5
BO20		<i>B. oldhamii</i>	台北	04/20/1999	+	+	13.7
BO22		<i>B. oldhamii</i>	台中	05/16/1999	+	-	74.7
BO23		<i>B. oldhamii</i>	新竹	05/16/1999	+	+	80.0
BO24		<i>B. oldhamii</i>	桃園	06/12/1999	+	-	162.7
BO26		<i>B. oldhamii</i>	高雄	06/20/1999	+	-	34.7
BO27		<i>B. oldhamii</i>	高雄	06/20/1999	+	-	18.7
BO28		<i>B. oldhamii</i>	嘉義	07/26/1999	+	-	50.7
BB13		<i>B. ventricosa</i>	台北	02/23/1999	+	-	32.5
BB14		<i>B. dolichoclada</i>	台北 植物園	02/23/1999	+	-	31.2
BB18	AY205216	<i>D. giganteus</i>	台北 植物園	08/19/1999	-	+	ND
BB20		<i>B. dolichoclada</i>	台北 植物園	05/18/1999	+	-	34.
BB21	AY205199	<i>G. levis</i>	台北 植物園	05/18/1999	+	+	8.0
BB22		<i>B. edulisi</i>	嘉義	06/20/1999	+	-	117.3
BB23	AY205217	<i>B. pachinensis</i>	台北 植物園	08/19/1999	+	+	152.0
BB24		<i>B. dolichoclada</i>	台北 植物園	08/19/1999	+	-	168.0

<sup>a</sup>D:Dendrocalamus; B:Bambusa; G:Giantochloa; P:Pseudosasa; <sup>b</sup>+, BaMV RNA 有偵測到; -, BaMV RNA 未偵測到; +, <sup>c</sup>satBaMV RNA 有偵測到; -, satBaMV RNA 未偵測到; <sup>d</sup>每公克竹葉 BaMV 之產量 ND: 未測量

以下為針對擴增 satBaMV 全長所設定的溫度與時間(如表 4 所示)：

表 4

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(如表 5 所示)：

表 5

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				

**(三)將 RT-PCR product(前一步驟產物)與 pGEM-Teasy 載體(vector)黏合(ligation)**

將劑量(如表 6 所示)加入微離心管中混合均勻，並置於水浴槽 16°C，反應至隔天。

表 6

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

#### **(四)轉型至勝任細胞(E. coli DH5 $\alpha$ strain)，並先在含有抗生素的固態培養基上培養以篩選掉不要的細胞**

將 10  $\mu$ l ligation product 和 100 $\mu$ l competent cell 混合，置於冰上 30 分鐘後放入 42 $^{\circ}$ 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 混合液並放進 37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l 的上層溶液(小心不要碰到沉澱物)，再取 150  $\mu$ l 與沉澱物充分混和，將混合液均勻塗抹在含 Ampicillin (100 $\mu$ g/ml)的 LB plate 上，靜置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱內，反應至隔天。

#### **(五)從固態培養基中選取大腸桿菌並放入含有抗生素的液態培養基中使其大量複製，再質體小量製備**

在無菌操作台中，將 200  $\mu$ l 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  $^{\circ}$ C 中震盪培養 (200 rpm) 至隔天。

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  $\mu$ l 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  $\mu$ l MX2 破壞細菌之細胞膜，再加入 350  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l(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  $\mu$ l 的水，離心一分鐘

(12,000 rpm) ，將質體 DNA elute 下來。

#### (六)用限制酶裁切我們要的部份，並測驗及用電泳確認

將劑量(如表 7 所示)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。

表 7

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

#### (七)利用 MEGA 4.0 軟體進行變異率分析及推估演化樹

#### (八)挑選所要選的植株，送交定序並利用 MFold 軟體預測其二級結構

挑選經限制酶檢查正確的選植株，再利用自動核酸序列分析儀 (型號 ABI377) 定序，利用 MFold 軟體預測二級結構。

## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) BaMV5' AHSL-like 結構序列之較 satBaMV5' AHSL 序列具保守性

前人研究顯示，satBaMV5' AHSL 的序列變異率達 20.7% (Yeh *et al.*, 2004) 。為了進一步確認 BaMV 5' 端是否和 satBaMV5' 端一樣具有高變異區，我們分析 25 種 BaMV 分離株 5' 端非轉譯區 AHSL-like 結構之序列，並以 BaMV-V 為對照組計算其變異率。結果顯示，BaMV5' AHSL-like 結構之序列 (如圖 4 所示)，不似 satBaMV5' AHSL 的序列 (如圖 5 所示) 為高度變異區。AHSL-like 結構序列較具保守性，可能為 BaMV 5' 複製所需的辨識序列。

根據前人的研究得知，若將較具競爭力的 BaMV-BB23 AHSL-like 結構接於較不具競爭力的 BaMV-S5' 端上，會使 BaMV-S 的競爭力增加，顯示 AHSL-like 在 BaMV 的複製上確實有著舉足輕重的地位。

為了進一步證實 AHSL-like 在 BaMV 的複製上的重要性，我們分析了不同種 BaMV 分離株的變異性。結果顯示(如表 3 所示)，麻竹叢(DL12、DL20)變異率頗高，為 6.1%~7.4%，而綠竹的變異率為 5.7%也不小，尤其來自嘉義的 BO28，甚至達 10%。但相對於 satBMV5'20.7%的高變異率都是小巫見大巫。





表 8 不同來源 BaMV 分離株的變異率

B O11	B O13	B O14	B O16	B O17	B O18	B O19	B O22	B O25	B O26	B O27	B O28
6.1	5.2	5.7	4.3	5.7	5.7	4.3	4.8	4.8	3.9	7.4	10.0
B B20	B B21	B B22	B B24	B B29	B B30	B B31	B B32	B B34	B B35	B B37	
6.5	8.3	7.0	0.9	6.1	5.2	4.8	0.9	4.3	4.8	6.5	
DL12						DL20					
7.4						6.1					

\*以 BaMV-V 為對照組比對 BaMV5' 端非轉譯區 AHSL-like 結構之序列

綜合上述可知，BaMV 5' 端 AHSL-like 結構保守(conserved)，高辨識度的結果，驗證了 AHSL-like 結構為 BaMV 複製上辨識序列的可能。

## (二) BaMV 分離株 5' 端 AHSL-like 結構能影響 BaMV 的競爭表現

為了進一步探討 AHSL-like 結構在 BaMV 複製時所扮演的角色，我們用 Mfold 軟體預測了自然界的 BaMV5' 之二級結構。結果(如圖 6 所示)顯示多數綠竹 (BaMV-BO) 分離株沒有 satBaMV 存在，其 AHSL-like 結構之頂端以 3 環結構為主，較不具保守性，辨識低較不具競爭力；而具有干擾性 satBaMV 的 BaMV 分離株，如 D、DL11、DL16、DL19、BB23，其 AHSL-like 結構較具保守性辨識度較高，較具競爭力；其 AHSL-like 之頂端為五環結構；具非干擾性 satBaMV 的 BaMV 分離株，如 DL12、DL20、BB32、BB34、BB35，其 AHSL-like 之頂端亦多為五環結構。此結果說明了 AHSL-like 結構能影響 BaMV 的競爭表現。

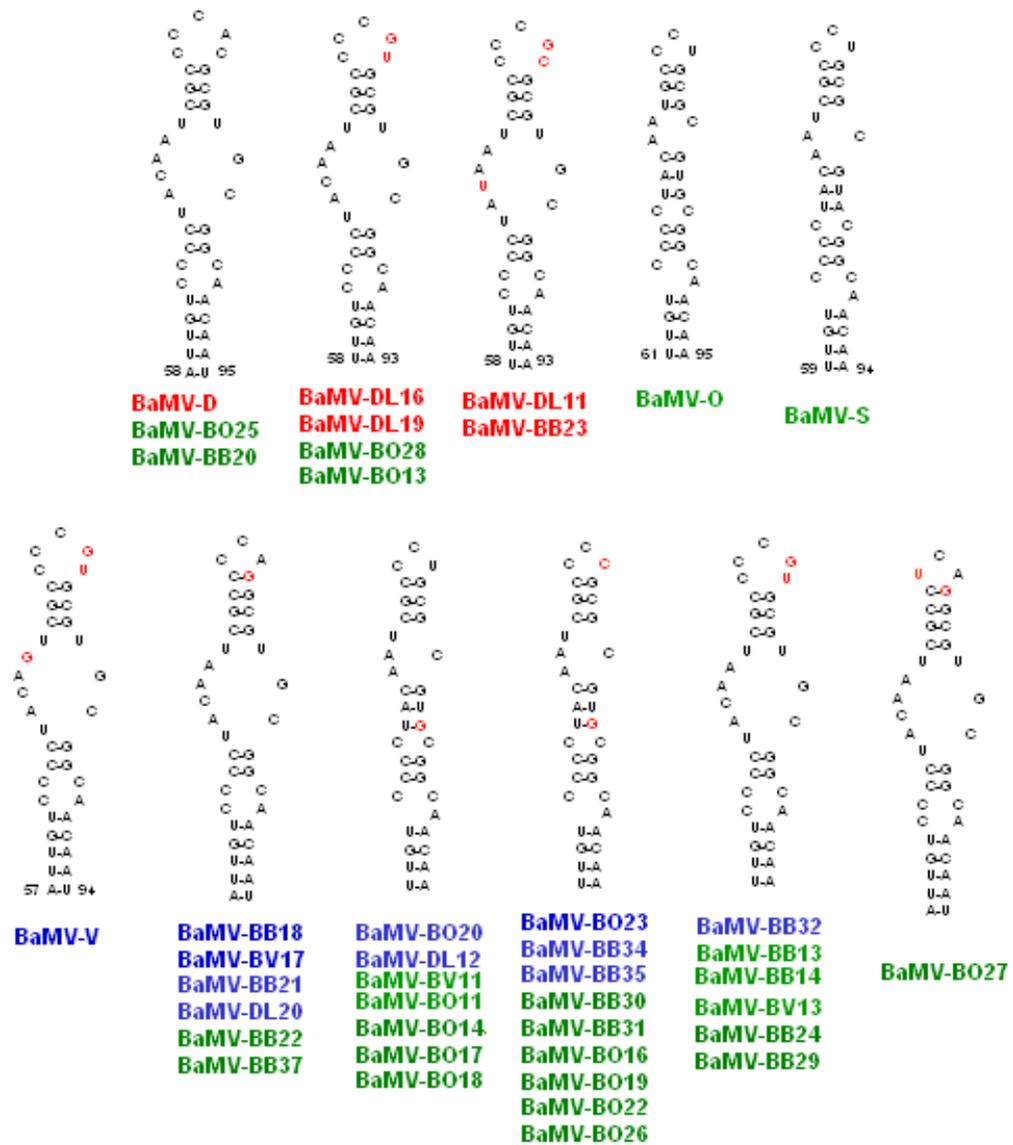


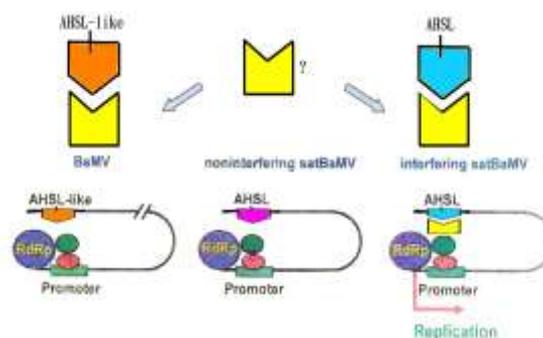
圖 6 自然界的 BaMV 分離株 5' 端之二級結構

## 二、討論

(一) 如果 BaMV 的 AHSL-like 結構變異度小，辨識度高，前人實驗已證實其在複製上較佔優勢。而本實驗發現，大多數具有 satBaMV 之 BaMV 分離株，其 AHSL-like 結構較具保守性，而其頂端多為五環結構。表示 BaMV 可能是受到 satBaMV 的複製競爭，而發展出保守的 5' AHSL-like 結構。因此，推測此五環結構可能是 BaMV 與 satBaMV 共同演化的關鍵之一。

(二) 多數綠竹的 BaMV 分離株，其 AHSL-like 結構較不具保守性，而頂端結構多為三環，可能不利於 satBaMV 的複製競爭，是以再度佐證五環結構可能是 BaMV 與 satBaMV 共同演化的關鍵之一。

(三) 可能某個未知物質在複製的起始即會有效率的辨識 AHSL-like 結構上的特殊構造，BaMV 與 satBaMV 彼此競爭與此一物質結合，以便啟動複製。而 AHSL-like 頂端五環結構是否為複製辨識所需特殊構造的重要關鍵之一，尚需進一步的實驗證實。



The proposed model of the role of the AHSL-like structure in the competitive co-evolution of the BaMV with satBaMV

## 肆、結論

已知 satBaMV 與 BaMV 是利用相同的複製酶進行複製，雖然在核酸序列上並無同源性，但在其 5' 端都含有類似的 AHSL 結構，表示 AHSL 結構在 BaMV 與 satBaMV 的複製有決定性的影響。我們對於 AHSL-like 序列作更進一步的探討，我們先比較了 BaMV5' 端 AHSL-like 的序列與 satBaMV5' 端的序列，發現 AHSL-like 結構有較高的保守性。接著，我們進一步討論 BaMV5' 端 AHSL-like 結構對 BaMV 競爭表現的影響，發現 AHSL-like 結構能決定 BaMV 的競爭力。

此外，我們製作了採自各地 BaMV 的類緣關係圖 (如圖 7 所示)。我們發現，類緣分析除了種類外，似與地緣亦有關，此點推測是同一區域不同種 BaMV 受到相同 satBaMV 感染而產生較相近的 AHSL-like 結構。

綜合本實驗的結果可知，BaMV5' AHSL-like 結構序列之保守性較 satBaMV 5' AHSL 序列之保守性高，且 BaMV 分離株 5' 端 AHSL-like 結構能影響 BaMV 的競爭表現。

為確認 AHSL-like 結構頂端之五環是否為 BaMV 與 satBaMV 共同演化的關鍵之一，可進一步著手於置換 AHSL-like 結構頂端之五環並測試其複製能力之實驗。

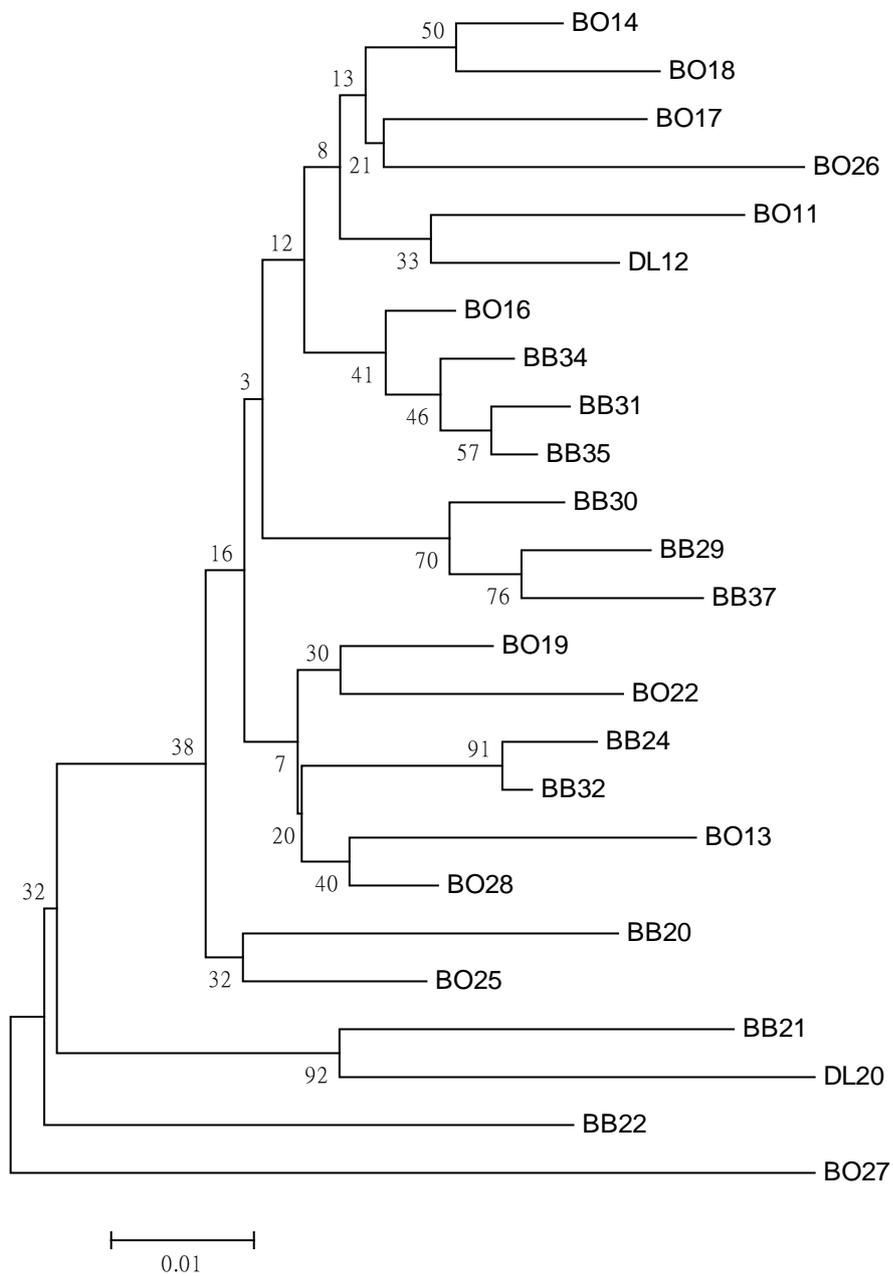


圖 7 採自各地 BaMV 的類緣關係圖

## 伍、參考文獻

- 一、 徐堯輝，孟孟孝，蔡慶修，張邦彥，張雅君及林納生. 2000. 竹嵌紋病毒分子生物學之整合型計畫成果. 科學發展月刊 28(9): 666-674.
- 二、 葉文斌 2002；竹嵌紋病毒演化模式之探討；國科會生命科學簡訊 16 (7):1-8.
- 三、 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.
- 四、 Chen HC, Hsu YH, Lin NS. 2007. Downregulation of bamboo mosaic virus requires the 5' apical hairpin stem loop structure and sequence of satellite RNA. *Virology* in press.
- 五、 Hsu, Y. H., H. C., Chen, J., Cheng, P., Annamali, B. Y., Lin, C. T., Wu, W. B., Yeh, and Lin, N. S. 2006. Crucial role of the 5' conserved structure of bamboo mosaic virus satellite RNA in downregulation of helper viral RNA replication. *J Virol* 80(5), 2566-2574.
- 六、 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.
- 七、 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.
- 八、 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.
- 九、 Lin, N. S., and Y. H. Hsu. 1994. A satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus. *Virology* 202:707–714.
- 十、 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.

- 十一、 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.
- 十二、 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.
- 十三、 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.
- 十四、 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.
- 十五、 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.

## 評語

完整而深入的研究成果，是一份豐碩的作品，利用先進的分子生物技術探討病毒相互競爭的機制，作者的表達能力佳，對於該研究主題的相關背景也有滲入的瞭解。