

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (7):965-971; 4 July 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

简化 cDNA 末端快速扩增技术测定基因 III、VI b 和 VII d 型新城疫病毒基因组末端序列及分析

仇旭升, 孙庆, 王伟伟, 董丽, 吴双, 胡顺林, 吴艳涛, 刘秀梵*

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要: 【目的】简化 cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 流程, 测定基因 III、VI b 和 VII d 型新城疫病毒 (*Newcastle disease virus*, NDV) 基因组两侧末端序列, 并对 NDV 的 leader 和 trailer 进行分析。

【方法】利用 T4 RNA 连接酶将特定寡聚核苷酸片段的连接于病毒基因组 RNA 和 cDNA, 再利用 RT-PCR 或 PCR 方法对病毒基因组的末端进行快速的扩增。【结果】建立一套操作简单、低成本、可重复性高的 RACE 方法, 测定了三种基因型 5 株 NDV 3' 末端 leader 和 5' 末端 trailer 序列比对分析。【结论】本实验测定的鹅源 VII 型毒株 JS/7/05/Ch 基因组的 15, 184 nt 由一个 T 变为了 C, 5' 端 trailer 与 3' 端 leader 的连续互补序列由 8 nt 变为 12 nt, 而其它 4 株基因 III 型和 VI 型 NDV 均未发现该突变。通过 RNA 的二级结构分析, NDV 基因组和反向基因组 RNA 的 3' 末端形成一个发卡结构。JS/7/05/Ch 等 3 株 NDV U→C (T→C) 的突变位于发卡环上, 不影响二级结构的形成, 发卡环的 RNA 序列突变为 3'-UCUC-5', 与基因组 3' 端发卡环的 3'-UCUUA-5' 相似, 推测可能影响了基因组 RNA 的复制速度。

关键词: cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE); 基因 III 型; 基因 VI b 型; 新城疫病毒; 基因组 3' 末端 (leader); 基因组 5' 末端 (trailer)

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0965-07

新城疫 (*Newcastle disease*, ND) 是由新城疫病毒 (*Newcastle disease virus*, NDV) 引起的一种烈性传染病, 给许多国家的养禽业造成巨大的经济损失^[1]。新城疫病毒为副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*)、副粘病毒亚科 (*Paramyxovirinae*)、禽腮腺炎病毒属 (*Avulavirus*) 的唯一成员^[2], 为单股不分节段的负链 RNA 病毒^[3]。目前, 根据 Ballagi 等提出的分型方法^[4]可以将 NDV 分为 9 种基因型。基因 I 型 NDV 主要包括从鸡和水禽中分离到的缓发型毒株; 基因 II 型包括 50 年代前分离的大批北美毒株, 毒力从弱毒到强毒不等; 基因 II、III、IV 型毒株主要与 NDV 第

一次大流行有关; 第二次大流行中, 出现了两个新的基因型, 即基因 V 和基因 VI 型; 现在流行株以基因 VII 型, 尤其基因 VII d 型为主^[5-6]。

NDV 与所有副粘病毒一样, 基因组末端尤其最末端 12 nt-13 nt 序列保守, 是病毒复制、转录及包裹的顺式调控因子。基因组 3' 端 leader 序列主要启动基因转录及反义基因组复制, 而 5' 端 trailer 序列则主要启动基因组的复制。NDV 基因组最末端序列是其 RNA 聚合酶的特定识别基序, 3' 和 5' 末端序列正好互补^[7]。黄勇等发现, 基因 I 型和基因 II 型毒株基因组末端连续有 9 nt 互补, 而基因 VII d 型毒株

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (90630048); “十一五”国家支撑计划项目 (2006BAD06A03); 江苏省科技创新工程重大项目培育资金项目 (N0706031)

* 通信作者。Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 仇旭升 (1981-), 男, 江苏扬州人, 博士研究生, 主要从事新城疫病毒分子生物学方向研究。E-mail: qiuxusheng@163.com

收稿日期: 2009-01-13; **修回日期:** 2009-03-26

ZJ1 5'末端第9位由T突变为C,两侧末端序列连续有12nt互补^[6]。因次,克隆并研究NDV基因组的3'和5'端序列具有重要意义。

cDNA末端快速扩增技术(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)是一种常用的获取RNA末端的方法。随着技术不断发展,出现了各种针对各种具体情况的RACE方法。根据副粘病毒基因组RNA的特点,一般采用T4 RNA连接酶连接法(RNA ligase mediated RACE, RLM-RACE)进行RACE反应^[7],其基本原理是利用T4 RNA连接酶直接将特定核苷酸片段于单链DNA或RNA连接,然后用PCR或RT-PCR方法对基因组的末端进行快速的扩增。本文对一般的RLM-RACE步骤进行了一定的改进和简化,测定了基因III、VIb和VIIId型新城疫病毒基因组末端序列进行比对分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:实验使用毒株均由本实验室分离鉴定:鸡源分离株JS/7/05/Ch和鹅源分离毒株JS/9/05/Go鉴定为基因III型;鹅源分离株JS/5/05/Go为基因VII型;鸽源分离株JS/07/04/Pi和JS/07/16/Pi

为基因VIb型。上述病毒均通过蚀斑筛选的方法纯化3代。

1.1.2 主要仪器和试剂:PT-2000 PCR仪, Model 3000Xi电泳仪购自BioRAD公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit、X-Gal、IPTG、dNTP、LA Taq酶等购自宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶和T4 RNA ligase购自Fermentas; LB培养基、Trizol抽提试剂,购自Invitrogen; Mo-MLV反转录酶、RNasin、T-easy载体和琼脂糖购自Promega; PCR纯化试剂盒为Axygen产品。

1.2 引物设计

根据RACE操作的要求设计锚定引物(adaptor) CL+, 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3', 及其反向互补引物(anti-adaptor)CL-, CL+ 5'末端磷酸化。根据各种基因型NDV病毒基因组已知序列,在3'末端300 bp-500 bp范围设计3'RACE特异引物,标记为3SR;在5'末端1000bp以内设计5'RACE第一轮PCR特异引物,标记为5LF;在5'末端300-500 bp范围设计5'RACE第二轮PCR特异引物,标记为5SR。由于各种基因型病毒序列差异较大,针对每种基因型各设计一套引物,送上海生物工程公司合成,引物序列均在表1中列出。

表1 针对基因III、VI和VII型NDV末端的RLM-RACE特异性引物序列

Table 1 Specific primers used for RLM-RACE of genotype III, VI and VII NDV strains

Genotype	Specific primer	Primer sequence (5'→3')	Position (nt)
III	3SR	GAGAGATATGAGAGCACCTTGTCTGAGT	322-349
	5LF	GTCCATTCTGTGCAGAGAGTTAGTGAG	14520-14529
	5SF	CAATACTGGGTCTCAGAGTCAAAAATC	14724-14750
VI	3SR	TGCTATCACCATGAATCTCTGTGCTCTCTC	488-517
	5LF	CACGGTACACTTCTGTCTAAATCGGATGAG	14339-14368
	5SF	ACAGACGGTAAGAAGAGAACATCACTCAAACAG	14669-14701
VII	3SR	ACCATCGATCTCAAGAACGCCAGTG	414-439
	5LF	GGCTATGCCTGTAGAGGGGATATGGAG	14222-14248
	5SF	CCATTAAGGACATACCTGAAGCGCA	14816-14840

1.3 病毒RNA提取

NDV尿囊液10000×g离心10 min。收集上清,按照Invitrogen Trizol试剂使用说明书流程提取病毒基因组RNA^[6]。每份病毒RNA样品溶解于50 μL DEPC处理水中,保存于-70℃备用。

1.4 3'RACE操作

1.4.1 病毒基因组RNA 3'端的锚定:病毒RNA 10 μL, 锚定引物CL+ 25 pmol, 10×T4 RNA Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L ATP 1 μL, 1 mg/mL BSA 2.5 μL, RNasin 20 U, T4 RNA连接酶25U, DEPC水补足至25 μL。37℃作用1.5 h, 75℃作用15 min。

1.4.2 RT-PCR:取5 μL连接产物加入反向锚定引

物CL-反转录,反应体系流程参照反转录酶说明书进行。利用CL-和3SR扩增目的片段,PCR反应体系和条件按高保真酶说明书进行,退火温度均为61℃。

1.5 5'RACE操作

1.5.1 反转录和cDNA纯化:参照反转录酶说明书进行反转录操作,反转录引物为5LF,42℃ 1h。反转录产物加入等体积0.6 mol/L NaOH,60℃作用20 min后,用PCR回收试剂盒纯化cDNA。

1.5.2 cDNA 3'端锚定:cDNA 10 μL, CL+ 25 pmol, 10×T4 RNA Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L ATP 1 μL, 1mg/mL BSA 2.5 μL, T4 RNA连接酶25 U, DEPC水

补足至 25 μ L。37 $^{\circ}$ C 作用 1.5 h, 75 $^{\circ}$ C 15 min。

1.5.3 半套式 PCR: 第一轮 PCR 反应引物为 CL₋和 5LF, 产物 100 倍稀释后做第二轮反应的模板。第二轮 PCR 的引物为 CL₋和 5SF。PCR 反应体系和条件按 LA Taq 酶说明书进行, 退火温度在 61 $^{\circ}$ C ~ 65 $^{\circ}$ C 间调节。

1.6 克隆转化和基因测序分析

PCR 产物的回收按 Agarose Gel DNA Purification Kit 说明书进行。将纯化后的产物按 pGEM-T easy Vector 说明书进行连接和转化。经 AIX 平板筛选阳性克隆, 常规方法提取质粒, 用 *EcoR* I 进行酶切鉴定。将含有重组质粒的菌液送上海生物工程有限公司进行测序。应用分析软件 DNASTAR 和 MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007), 对实验毒株和 GenBank 收录的其它 NDV 毒株的相应序列进行比对分析。

2 结果

2.1 3' RACE 结果及序列比对

利用针对不同基因型的特异引物和反向锚定引物 CL₋成功扩增目的片段, 见图 1。通过序列测定, 确定锚定引物 CL₋成功连接在病毒基因组 3' 末端。获得 5 株 NDV 3' 末端序列上传 EMBL/GenBank, 登录号如下: JS/5/05/Go (FJ600546), JS/07/04/Pi (FJ600547), JS/07/16/Pi (FJ600548), JS/7/05/Ch (FJ430159), JS/9/05/Go (FJ430160)。

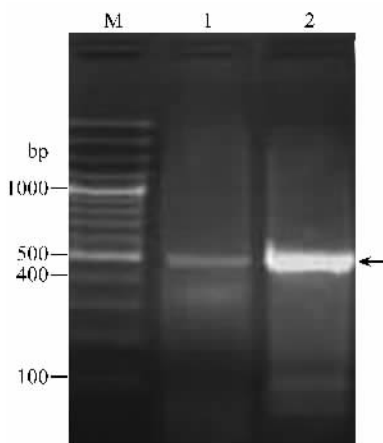


图 1 3' 端 RLM-RACE PCR 电泳图片

Fig.1 The results of 3' RLM-RACE. Lane 1 was JS/07/04/Pi, lane 2 was JS/07/16/Pi

2.2 5' RACE 结果及序列比对

利用针对不同基因型的特异引物和反向锚定引物 CL₋扩增目的片段, 第一轮 PCR 产物电泳无可见条带。PCR 产物经 10^{-1} ~ 10^{-4} 稀释后, 分别作为底

物进行半套式 PCR, 电泳结果见图 2。通过序列测定, 确定锚定引物 CL₋成功连接在 cDNA 3' 端。获得 5 株 NDV 5' 末端序列上传 EMBL/GenBank, 登录号如下: JS/05/05/Go (FJ600549), JS/07/04/Pi (FJ600550), JS/07/16/Pi (FJ600551), JS/7/05/Ch (FJ430159), JS/9/05/Go (FJ430160)。经比对, 本研究中测定的基因 III 型和 VIb 型基因组最末端高度保守, 而基因 VIIId 型毒株 JS/05/05/Go 与 ZJ1 和 NA-1 一样, 5' 末端第 9 位核苷酸由 T 突变为 C。

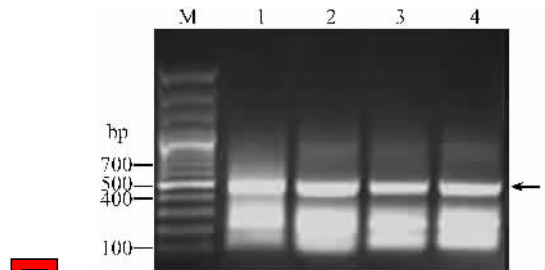


图 2 毒株 JS/7/05/Ch 5' 端 RLM-RACE 第二轮 PCR 电泳图片

Fig.2 The results of 5' RLM-RACE of strain JS/7/05/Ch. Lane 1-4 represented the products of hemi-nested PCR with templates 10^{-1} ~ 10^{-4} diluted.

2.3 3' 最末端进化分析和 5' 最末端进化分析及其与 F 基因进化树相关性分析

通过 DNASTAR 软件比对分析 GenBank 已有的 NDV 基因组末端序列, 发现 7 个基因型 NDV leader 序列的同源性均较高, 而 trailer 序列的同源性相对较低, 不同基因型 NDV 基因组末端 leader 和 trailer 序列存在保守性替换 (表 2)。

利用 5' 末端 trailer 序列绘制的遗传进化树与利用 F 基因 47 nt-420 nt 绘制的进化树基本一致, 见图 3。通过统计学软件对基因 I-VII 型 NDV 5' 末端 trailer 序列同源性和 F 基因同源性的相关性进行了分析, 结果显示两者显著相关 ($P < 0.01$), 复相关系数 $r = 0.857$ 。图 4 为 NDV 不同毒株 5' 末端 trailer 序列与 F 基因 47 nt-420 nt 序列一一对应的线性分析图。

2.4 RNA 二级结构分析

利用 RNA 二级结构预测软件 RNAfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) 预测 NDV 基因组及反向基因组 RNA 两侧末端的二级结构。结果显示, NDV 基因组 3' 末端和反向基因组 3' 末端均形成一个发卡结构。毒株 JS/05/05/Go 以及 ZJ1 和 NA-1 5' 最末端第 9 位核苷酸的 T/C 突变不影响基因组 5' 端和反向基因组 3' 端的 RNA 二级结构。所有已知的 NDV 基因组 3' 末端发卡结构环状区的 RNA 序列都是 3'-

表 2 在不同基因型 NDV 间 leader 和 trailer RNA 的保守序列

Table 2 RNA substitution of leader and trailer converted in specific genotypes, given as viral genomic RNA sense in the 3' to 5' direction.

NDV genotype	leader								trailer							
	40	27	47	51	6	18	32	54	56	61	62	70	77	81	86	
I	C	U	G	C	G	U	U	U	U	C	G	A	C	C	C	
II	C	U	A	C	G	U	U	U	U	C	G	A	C	C	C	
III	C	U	G	C	A	U	U	U	U	C	G	A	C	U	C	
IV	C	U	G	C	A	U	U	U	C	C	G	A	C	U	C	
V	U	U	G	U	A	C	C	G	C	U	A	A	C	U	C	
VI	U	C	G	U	A	C	C	G	C	C	U	A	U	U	C	
VII	U	U	G	U	A	C	C	G	U	C	G	G	U	U	T	

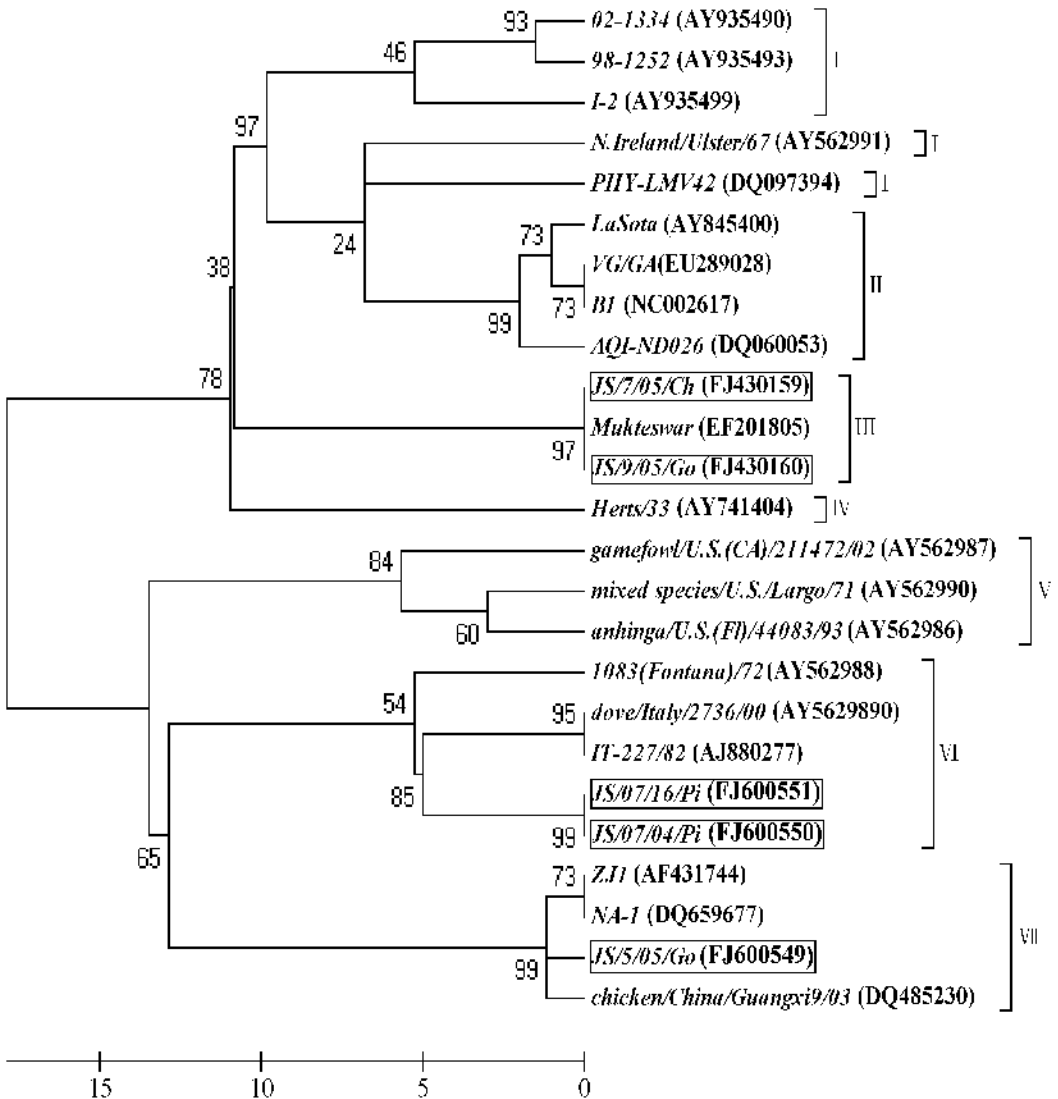


图 3 根据 NDV trailer 的 cDNA 序列绘制的遗传进化发生树

Fig.3 Phylogenetic tree analysis based on cDNA sequence of trailer. Horizontal-line distances are proportional to the minimum numbers of nucleotide changes needed to join nodes and gene sequences. The vertical lines are present simply for spacing the branches and labels. The sequences determined in this study were framed.

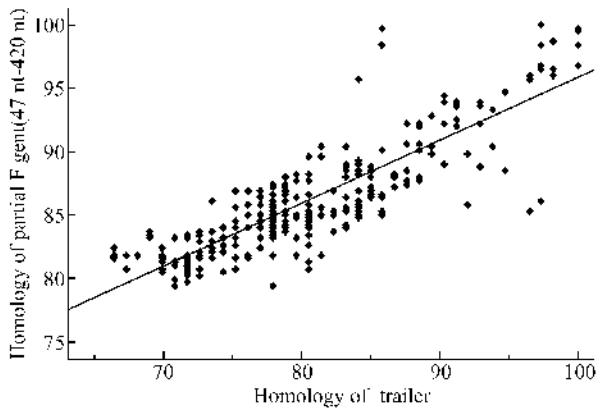


图4 NDV 基因组 trailer 序列同源性与 F 基因 47 nt-420 nt 序列同源性的相关性分析

Fig.4 The statistical analysis of homology correlation between trailer of NDV genome and partial F gene (47 nt-420 nt).

UCUUA-5', 基因 I-VI 型 NDV 反向基因组 3' 末端发卡结构环状区的 RNA 序列是 3'-UUUC-5', 而基因 VIId 型毒株 JS/05/05/Go 以及 ZJ1 和 NA-1 为 3'-UCUC-5' (图 5)。

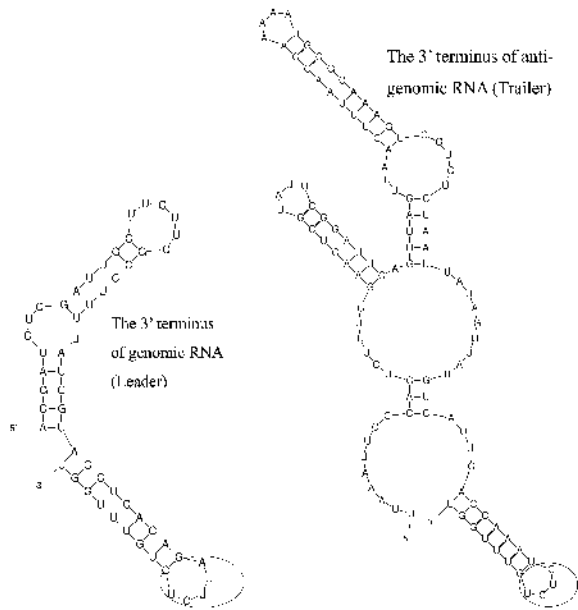


图5 毒株 JS/05/05/Go 基因组和反向基因组 3' 末端 RNA 二级结构。其中 U/C 突变的位置已框出。

Fig.5 RNA secondary structure of the 3' end region of genome and anti-genome. The position of U/C substitution in the 3' end of anti-genome was framed.

3 讨论

RLM-RACE 是一种利用 T4 RNA 连接酶进行单链连接的 RACE 方法, 与其它 RACE 法相比, 不需要用 poly (T) 或 poly (C) 来引导第二链 cDNA 的合成, 适

合用于测定负股 RNA 病毒的末端序列^[7,11-13]。本实验对一般的 RLM-RACE 步骤进行一定的简化和改进, 包括降低 RACE 样品的要求, 优化了锚定引物的设计、RACE 的反应体系以及 cDNA 的纯化流程。经检验, 这套 RACE 方案能够准确测定 NDV 基因组末端序列, 可重复性高, 操作更为简单, 而且大幅度降低了成本。

一般认为, RACE 操作需要很高浓度和纯度的 RNA 样品^[4], 这也就意味着需要对病毒粒子和病毒 RNA 进行浓缩和纯化。病毒浓缩纯化的流程大大增加了 RACE 反应的时间和成本, 制约了 RACE 技术的广泛使用。本研究尝试直接利用鸡胚尿囊液, 省略了病毒超速离心提纯的步骤, 病毒 RNA 提取以后直接用以 RLM-RACE 操作。反复尝试后证明, 该方法获得病毒 RNA 的浓度和纯度不影响 RACE 的进行, 相当稳定。

3' 端 RLM-RACE 的即是将特定单链核苷酸片段与单链 RNA 连接, 再用 RT-PCR 方法对基因组的末端进行的扩增。其原理是利用 T4 RNA 连接酶连接单链 DNA 或 RNA 5' 端磷酸和 3' 端羟基的功能。通常人工合成的核苷酸片段 5' 末端为羟基, 需要磷酸化才能连接; 而锚定核苷酸片段单链 3' 端羟基原则上可以和任何单链 DNA 或 RNA, 甚至引物的 5' 端磷酸连接, 推测会影响 RACE 的效率, 产生较多的非特异条带, 应当将末端的羟基阻断^[6,14]。在本实验中, 锚定引物 5' 端磷酸化而 3' 端未阻断, 电泳结果可见较多的非特异条带, 但目的条带清晰可见。

5' 端 RLM-RACE 与 3' 端操作相似, 不同的是先进行 RT, 再将锚定引物与 cDNA 连接, 最后用半套式 PCR 方法对基因组的末端进行的扩增。本实验在 RLM-RACE 的操作前使用的反转录酶对 RACE 的效率起着至关重要的作用。在尝试的几种反转录酶中, Promega 的 Mo-MLV 反转录酶效果最好, 而效率不高。实验结果显示, 在使 RNase H-反转录酶时, 锚定引物连接在 5' 末端的比例不到十分之一, 大多连接在了 cDNA 5' 末端最后 100 nt 范围内, 推测 RNase H-反转录酶不能反转录到基因组末端。

本研究中共测定了 5 株 NDV 病毒 leader 和 trailer 序列, 经过比对分析未发现区分 NDV 强弱毒株的依据^[7], 但是发现不同 NDV 毒株 leader 和 trailer 序列某些位点在基因型间有一定的保守性, 对揭示 NDV 遗传进化规律有着重要意义。如 leader 的 40 nt、51 nt, trailer 的 18 nt, 32 nt 和 54 nt, 基因 I-IV 型 NDV 依次为 C、C、U、U、U, 而基因 V-VII 型 NDV

则均为 U、U、C、C、G。据报道,基因 I-IV 型 NDV 出现在 20 世纪 20 ~ 30 年代,基因组长度为 15,186 nt,而基因 V-VII 型的出现不早于 20 世纪 60 年代,基因组长度为 15 192 nt^[5]。NDV 毒株 leader 和 trailer 序列的差异为 NDV 的进化分析提供了新的依据,但是由于传统 RACE 成本的限制,目前已经测定的 leader 和 trailer 序列不多。

特别值得注意的是,本实验确定的鹅源 VII 型毒株 JS/7/05/Ch 基因组的 15,184 nt 由一个 T 变为了 C,与早期报道的基因 VII 型毒株 ZJ1 和 NA-1 株一致^[8,15],而其它 4 株基因 III 型和 VI 型 NDV 均未发现该突变。三株基因 VII 型 NDV 的 T→C 突变使其 5' 端 trailer 与 3' 端 leader 的连续互补序列由 8 nt 变为 12 nt。只有通过 RACE 方法才能确定 NDV 基因组末端 15,184 nt 是否存在突变,如果利用最末端保守序列设计引物,获得的末端序列应为引物序列^[6]。目前确定有 T→C 突变的毒株均为鹅源基因 VII 型或者基因 VIIId 型 NDV 所特有。

JS/7/05/Ch、ZJ1 和 NA-1 株 trailer 突变的位置位于基因组 5' 最末端,这里是病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶特异性识别、结合以及基因组 RNA 复制起始的位点。通过 RNA 的二级结构分析,反向基因组 RNA 的 3' 末端形成一个发卡结构,U→C (T→C) 的突变位于发卡环上,不影响二级结构的形成。JS/7/05/Ch 株发卡环的 RNA 序列为 3'-UCUC-5',与基因组 3' 端发卡环的 3'-UCUUA-5' 相似,也可能影响了基因组 RNA 的复制速度。据报道,传染性水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 正链和负链的复制速度与最末端序列有关,其基因组 5' 端 trailer 序列启动基因组复制的能力比 3' 端 leader 序列启动反义基因组复制的能力要强 5 ~ 10 倍,而且当 leader 序列启动基因转录及反义基因组复制的功能与 trailer 序列启动基因组复制的功能发生冲突时,病毒 RNA 聚合酶首先启动基因组的复制^[7]。NDV 基因组 RNA 5' 末端 U→C 突变是否是基因 VII 型特有以及该突变的生物学意义还需要实验进一步验证。

参考文献

[1] Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections//Saif JM, Barnes HJ, Glisson JR, et al. Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2003: 63 - 99.

- [2] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002, 147: 1655 - 1656.
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 743 - 748.
- [4] Ballagi-Pordany A, Wehmann E, Herczeg J et al. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F genes. *Archives of Virology*, 1996, 141: 243 - 261.
- [5] Czeplédi A, Ujvári D, Wehmann E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 2006, 120: 36 - 48.
- [6] Liu XF, Wan HQ, Ni XX. Pathotypical and genotypical characterization of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985 - 2001. *Archives of Virology*, 2003, 148: 1387 - 1403.
- [7] Krishnamurthy S, Samal, SK. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 2419 - 2424.
- [8] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Archives of Virology*, 2004, 149: 1445 - 1457.
- [9] Zhuo L, Meng Y, Hong Z. Improved rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping both the 5' and 3' terminal sequences of paramyxovirus genomes. *Journal of Virological Methods*, 2005, 130: 154 - 156.
- [10] 姚春峰, 仇旭升, 刘文博, 等. 新城疫分离毒 HN 蛋白的抗原性初步分析及分子特性研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2008, 35 (1): 87 - 93.
- [11] Chang PC, Hsieh ML, Shien JH, et al. Complete nucleotide sequence of avian Paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 2157 - 2168.
- [12] Philips RJ, Samson ACR, Emmerson PT. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Archive of Virology*, 1998, 143: 1993 - 2002.
- [13] Schutze H, Enzmann PJ, Kuchling R, et al. Complete genomic sequence of the fish Rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 2519 - 2527.

- [14] Schaefer BC. Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Analytical Biochemistry*, 1995, 227: 255 - 273.
- [15] Xu M, Chang S, Ding Z. Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Archives of virology*, 2008, 153: 1281 - 1289.
- [16] 谢芝勋, 唐小飞, 董建宝. 三株新城疫广西分离株全基因组序列的测定与分析. *中国病毒学 (Virologica Sinica)*, 2006, 21 (3): 261 - 266.
- [17] Whelan SPJ, Wertz GW. Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of Vesicular Stomatitis virus: Identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. *Journal of Virology*, 1999, 75 (1): 297 - 306.

Analysis of leader and trailer sequence of genotype III, VIb and VIId Newcastle disease virus determined by modified rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategy

Xusheng Qiu, Qing Sun, Weiwei Wang, Li Dong, Shuang Wu, Shunling Hu, Yantao Wu, Xiufan Liu*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this research is to establish a simple rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategy for direct mapping of the 3' end and 5' end of the genomic RNA of Newcastle disease virus (NDV), and to analyze the leader and trailer sequence of NDV strains belonging to different genotypes. [Methods] Classic RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACE) was specifically modified for mapping both ends of the NDV genome. 3'-RACE was carried out by genomic RNA ligation with 5' end phosphated adaptor CL+, and the 5' end was obtained by first strand cDNA with adaptor CL+. [Results] A modified RLM-RACE strategy was established in this paper, which proved simple, low-cost, repetitive and could be specifically used to map genome ends of NDV. By using this method, the leader and trailer sequence of 5 NDV strains, termed JS/5/05/Go, JS/07/04/Pi, JS/07/16/Pi, JS/7/05/Ch and JS/9/05/Go, belonging to genotype III, VI and VII was determined, respectively. [Conclusion] The initial 8nt at the 3' and 5' ends of the genome of genotype I-VI NDV strains were complementary, whereas, the complementary sequences of strain JS/5/05/Go were up to 9 nt due to a mutation from T to C at the 9th nt in the 5' end. The 3' end of NDV genomic and anti-genomic RNA was predicted to form a potential hairpin structure. The U→C (T→C) mutation was located in the circle part of the hairpin in the 5' end of anti-genomic RNA, and had no visible influence on the formation of RNA secondary structure. However, the sequence of the circle part of the hairpin was changed from 3'-UUUC-5' to 3'-UCUC-5', more similar to the 3'-UCUUA-5' in the hairpin of genomic RNA.

Keywords: rapid amplification of cDNA ends (RACE); genotype III; genotype VIb; NDV; leader; trailer

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of Chinese National Natural Science Foundation (30630048), the National Science & Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (2006BAD06A03), and the Cultivation Found of the Key Scientific and Technical Innovation Project of Education Ministry of China (N0706032)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 13 January 2009/Revised: 26 March 2009