

传染性法氏囊病病毒超强毒地方株HN01的 分离鉴定及分子系统进化分析*

贾 赟^{1,3}, 张素芳¹, 周 斌¹, 王旭东¹,
王川庆², 赵玉军³, 陈溥言¹

(1 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2 河南农业大学 牧医学院, 河南 郑州 450002; 3 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161)

[摘 要] 用分离的疑为鸡传染性法氏囊病病毒(BDV)超强毒(vvBDV)地方分离株HN 01, 经处理后接种SPF 鸡, 36 h 后接种鸡开始发病, 发病率为100%, 死亡率为70%以上。剖检可见与野外病例相同的病理变化, 如肌肉、腺胃、心脏出血, 法氏囊水肿且多呈“紫葡萄”样外观。经血清学试验、毒力试验、鸡胚接种试验、分子生物学和电镜形态学观察均证明该分离物为超强毒株, 从而证明河南省鸡群中存在不同于BDV一般强毒株、经典株和变异株的超强毒株。通过对BDV不同毒株VP2基因高变区氨基酸序列的聚类分析发现, HN 01与华南超强毒株G9201、欧洲超强毒株UK661关系最接近, 而与HK46, OKYM, D6948, UPM 92-04和KS等毒株关系依次渐远。

[关键词] 传染性法氏囊病病毒; 超强毒株; 分离鉴定; VP2; 序列分析; 系统进化树

[中图分类号] S858.315.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0032-07

鸡传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, BDV)属于双链双节段RNA病毒科, 禽双RNA病毒属, 其基因组由2个双链RNA节段A和B组成。较大的A节段(3.3~3.4 kb)包括2个完整的阅读框架ORF1和ORF2。ORF1编码相对分子质量为110 ku的前体蛋白(H2N-VP2-VP4-VP3-COOH), 经加工变成成熟的VP2, VP4和VP3。现已证实^[1~3], VP2和VP3是主要的结构蛋白, 共同构成病毒衣壳, 是主要的宿主保护性抗原。其中VP2可诱导产生保护性中和抗体, 并具有血清型特异性^[1,2]; VP3为群特异性抗原^[3]; VP4在病毒蛋白成熟过程中起重要作用, 可能为一种蛋白水解酶^[1]。ORF2编码VP5, VP5与病毒的致病性有关, 在病毒释放和传播上起关键作用^[4]。较小的B节段(2.8~2.9 kb)编码VP1, 相对分子质量为90 ku。VP1是病毒RNA依赖RNA聚合酶, 与病毒RNA复制有关^[5]。

鸡传染性法氏囊病(BD)是一种世界性流行的烈性传染病, 20世纪80年代初已成为危害养鸡业的主要疫病之一。1987年以前, 世界各地流行的鸡传

染性法氏囊病病毒(BDV)均为低毒力毒株, 引起鸡的死亡率低于2%, 应用各种疫苗控制该病也能取得较满意的效果。但自1986年在美国发现应用传统疫苗不能提供理想的保护, 且从免疫鸡群中分离到变异株, 继而1987年欧洲报道了第1例超强毒型鸡传染性法氏囊病(BD)起, 世界各地均有免疫失败的报道^[6]。BDV变异株和超强毒株已成为近年来世界上许多国家和地区发生和流行BD的一个重要特征, BDV变异株的抗原性与经典疫苗株间有差异, 其毒力向减弱的方向演变; BDV超强毒株(vvBDV)的主要特征是致病力明显增强, 常导致急性爆发性流行, 且致死率极高, 对其抗原性一般认为与经典BDV疫苗株之间无差别。我国在90年代初也证明有超强毒的存在, 并已分离、鉴定了在北京、广州发现的BDV超强毒株^[7,8]。本研究通过对BDV超强毒的分离、鉴定, 确证河南省已发生超强毒型鸡传染性法氏囊病, 为进一步研究BDV超强毒的分子流行病学、分子生物学及研制基因工程疫苗进行有效免疫预防奠定了基础。

* [收稿日期] 2004-04-01

[基金项目] 国家“863”项目(2002AA245051)

[作者简介] 贾 赟(1975-), 男, 河南鹤壁人, 硕士, 主要从事动物分子病毒学研究。现工作单位: 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁大连116001。

[通讯作者] 陈溥言(1942-), 男, 江苏南京人, 教授, 主要从事动物传染病与分子病毒学研究。E-mail: aid@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 鸡胚购自南京药械厂; 4 周龄 SPF 鸡购自山东省农科院家禽所; 健康商品鸡购自南京郊区某鸡场; BDV 标准阳性血清和抗原由江苏农科院牧医所禽病室惠赠, 阳性抗原及多抗鸡阳性血清由本实验室保存。

1.2 病毒分离

1.2.1 病料来源与处理 将河南省郑州市郊区某鸡场收集的疑为传染性法氏囊病鸡的法氏囊, 以 0.01 mol/L TNE 缓冲液 (pH 7.2) 按体积比 1:4 匀浆病料, 反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 -80℃ 冻存备用。

1.2.2 SPF 鸡接种 取上述法氏囊上清液, 加入青、链霉素作用 2~4 h 后, 以每只 0.2 mL 剂量滴鼻、点眼接种 4 周龄 SPF 鸡, 接种后观察鸡的发病情况, 72 h 后无菌取出感染鸡的法氏囊, 按 1.2.1 方法处理。

1.3 琼脂扩散试验

用含硫柳汞钠盐质量浓度为 0.1 g/L 的生理盐水配制 10 g/L 琼脂, 加热融化, 倒入灭菌平皿中, 冷却凝固。用打孔器在平皿上打孔, 微量移液器加样。在温箱中放置 24 h 后观察。

1.4 病毒的纯化与观察

将按 1.2.2 处理的病毒悬液进行差速离心 (4 8 000 g 离心 15 min, 取上清液 4 25 000 g 离心 3 h, 沉淀用适量的 TNE 悬浮) 和 200~500 g/L 蔗糖线形梯度超速离心 (4 25 000 g 离心 3 h, 收集沉淀病毒带, 适量 TNE 悬浮, 4 30 000 g 离心 1 h), 收集含病毒的相应沉淀带, 用 0.01 mol/L TNE (pH 7.2) 悬浮回收病毒, 透析。20 g/L 磷钨酸负染, 在电镜下观察病毒粒子形态。-80℃ 冻存备用。

1.5 蛋白酶 K 法提取病毒 RNA

参照陈博言等^[9]的方法并略加改进。获得粗提的 dsRNA 后, 用 10 g/L 低熔点琼脂糖电泳, 长波紫外灯下割胶分离 dsRNA。并进一步采用酚/氯仿抽提、乙醇沉淀获得高纯度的 dsRNA。

1.6 VP2 基因的扩增

1.6.1 引物的设计与合成 参照 BDV 国际标准毒株 52-70 的基因组序列 (登录号为 D00869, 该毒株为国际标准强毒株), 设计、合成了 1 对引物, 引物序列如下:

P1 5'-GGCGCTAGCATGTTCA TACGGA GCCTTCTG-3';
P2 5'-AGACGCGTTCACTCA TGGCCCA GCA GGT A-3'。
划线部分为添加的酶切位点 *Mlu*I 和 *Nhe*I。

1.6.2 RT-PCR 扩增 VP2 基因 取 BDV 核酸 5 μL, 加 P2 1 μL (20 pmol), 100℃ 加热 5 min, 立即冰浴 5 min, 向上述体系中加入 RNA sin (40 U/μL) 1 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL, 5×AMV 反转录酶 Buffer 4 μL, AMV 反转录酶 5 U, 然后加 DEPC 处理的 ddH₂O 至 20 μL, 混匀, 置 42℃ 水浴 1 h, 95℃ 作用 5 min。取上述反转录反应产物 10 μL 作模板, 置于 0.5 mL 灭菌离心管中, 加入 5 μL 10×PCR Buffer, 3 μL 25 mmol/L MgCl₂, P1 1 μL (20 pmol), P2 1 μL (20 pmol), rTaq 酶 0.5 μL, 然后加入 ddH₂O 至 50 μL, 混匀后置于 PCR 仪上进行扩增, 循环程序为: 94℃ 变性 2 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 68℃ 2 min, 循环扩增 30 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6.3 VP2 基因的克隆与测序 用胶回收试剂盒回收 VP2 基因, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 利用蓝白斑筛选原理, 涂布于含 X-Gal, IPTG, Amp 的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养过夜, 挑选白色菌落扩大培养, 提取质粒, 用酶切和 PCR 进行鉴定, 样品交由 TAKARA 公司测序。测序结果与基因库中的弱毒株、变异毒株、强毒株和超强毒株进行序列比较。

1.7 病毒毒力测定

1.7.1 病毒的准备 将经过灭菌处理的病毒上清液用 SPF 鸡进行传代, 收集病死鸡的法氏囊按 1.2.1 方法处理。

1.7.2 接种 SPF 鸡胚 采用绒毛尿囊膜的接种方法进行接种。

1.7.3 ED₅₀ 的测定和计算 用双夹心 ELISA 方法对其进行检测, 按照 "Reed and Muench" 的方法计算。

1.7.4 动物回归试验 对上述已经毒力测定的 HN 01 毒株分别进行 SPF 鸡和健康商品鸡的动物试验。

2 结果与分析

2.1 琼脂扩散试验结果

加入经 1.2.2 处理的病毒悬液的待检孔与加入抗 BDV 阳性血清孔之间形成明显的沉淀线, 结果为阳性; 而阴性对照孔周围未出现沉淀线。

2.2 病毒的纯化与电镜观察

病料经预处理、差速离心和蔗糖线形梯度超速离心、负染后,电镜观察可见到比较典型的无囊膜六角形病毒粒子,二十面体立体对称,直径约60 nm,病毒间呈晶格状排列,未发现其他病毒粒子,见图1。

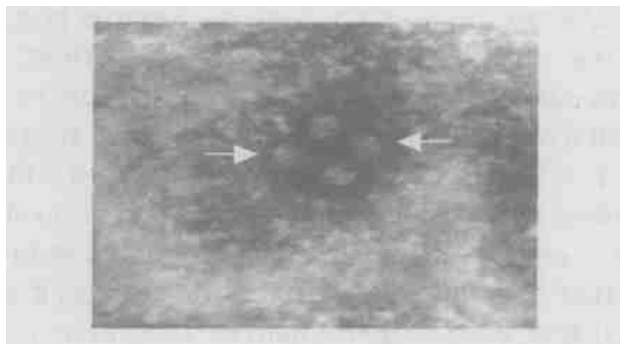


图1 电镜观察法氏囊乳剂中的病毒粒子, ×52 000

Fig 1 BDV in the suspension of bursas observed by the electron microscope, ×52 000

2.3 VP2 基因的扩增与序列分析

以P1和P2为引物,经RT-PCR扩增后获得1条很清晰的约1.45 kb的VP2基因(图2)。应用pMD18-T载体进行克隆,经过酶切鉴定选出阳性克隆,并用PCR对阳性克隆进行鉴定(图3)。

通过对VP2基因测序结果进行分析发现,HN01株与国内外鸡传染性法氏囊病病毒毒株的核苷酸同源性很高,均在95%以上(表1),从而在基因水平上验证了导致该病的病原是鸡传染性法氏囊病病毒。进一步对HN01株与其他毒株VP2基因翻译的氨基酸序列的同源性进行比较,结果表明HN01与几个超强毒株的同源性高达99.8%,而与其他毒株差异较大(表1)。对VP2基因高变区氨基酸进行详细分析发现,HN01株具有超强毒株所具有的高变区分子特征,在高变区(AccI-SpeI)的重要结构(亲水区I、II和七肽区)关键位点上与弱毒株和变异株、强毒株存在明显差异(图4),而和超强毒株的相应区域完全相同。

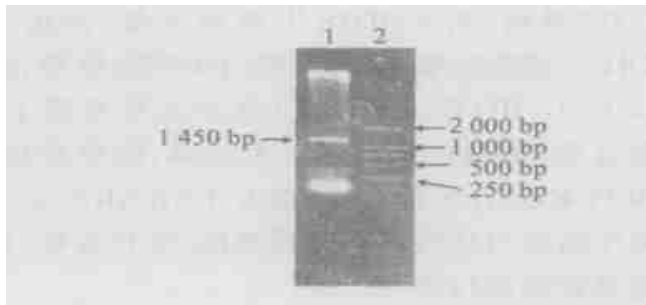


图2 BDV VP2 基因的扩增结果

1. 标准分子质量; 2 VP2 基因

Fig 2 RT-PCR of VP2 gene

1. Marker; 2 VP2 gene

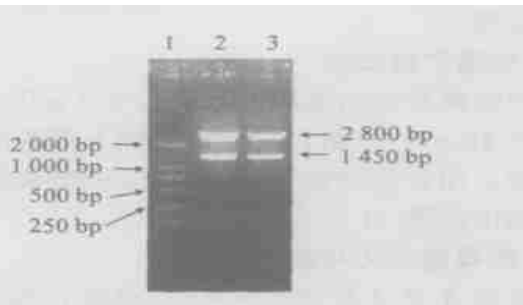


图3 T-VP2 重组质粒酶切鉴定

1. 标准分子质量; 2, 3 T-VP2 重组质粒 MluI 和 NheI 双酶切

Fig 3 Identification of recombinant plasmid T-VP2

1. Marker; 2, 3 T-VP2 digested with MluI and NheI

表1 法氏囊病毒VP2片段的核苷酸和氨基酸序列比较

Table 1 Comparison of nucleotide and amino acid homology of VP2 segment of BDV

	HN01	U K661	OKYM	HK46	52-70	Varsint-E	CU-1
HN01		99.8	99.8	99.8	98.9	96.6	97.4
U K661	98.3		99.1	99.1	97.4	96.2	97.3
OKYM	98.6	99.1		99.5	97.8	96.3	97.7
HK46	98.7	98.6	98.8		97.8	96.3	97.7
52-70	95.9	95.2	95.4	95.6		96.9	98.4
V ar-sint-E	95.3	94.8	95.1	95.3	96.6		97.0
CU-1	95.5	95.2	95.4	95.5	97.4	96.9	

注: 表格左下为核苷酸同源性; 右上为氨基酸同源性。

Note: Nucleotide similarity is on left and amino acid similarity is on top row.

2.4 分子系统进化树分析

将HN01与其他17个BDV毒株VP2高变区第210~382氨基酸区域进行比较,做出系统进化树,结果见图5。HN01与华南超强毒株G9201、欧洲超强

毒株U K661关系最接近,而G9201和U K661属于同一组,说明国内华南和欧洲超强毒株之间有密切关系,河南毒株HN01可能是由这2个毒株演变而来的。香港超强毒株HK46、日本超强毒株OKYM、荷

兰超强毒株D6948 等与HN 01 亲缘关系依次渐远, 而关系更远的2 个超强毒株是马来西亚超强毒株UPM 92-04 和以色列超强毒株KS。而在超强毒株之外与HN 01 相比远近关系依次为强毒株(STC, 52-70), 弱毒株(CJ801BKF, CJ908, CU -1), 变异株(V araint-A ,V araint-E,OH)。

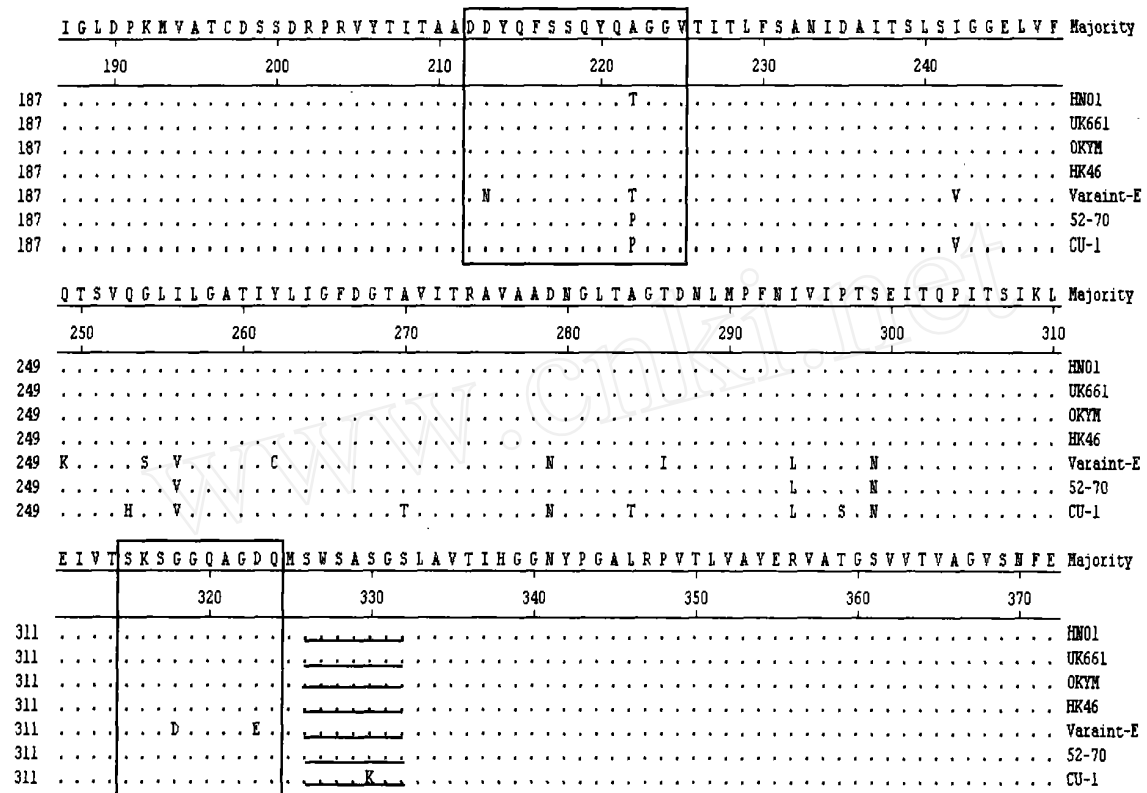


图4 HN 01 毒株VP 2 高变区氨基酸序列与6 个已发表 BDV 毒株相应序列的比较
“ · ”表示相同的氨基酸序列; 框内为亲水可变区; 下划线为七肽区

Fig 4 Comparison of the hypervariation region of the VP2 protein's amino acid sequence of BDV HN01 strain with the correspondent sequences from 6 published standard strains
“ · ”Denote the same amino acid residues; the boxed region are variable region of hydrophilicity residues; the underlined region are hepta-peptides

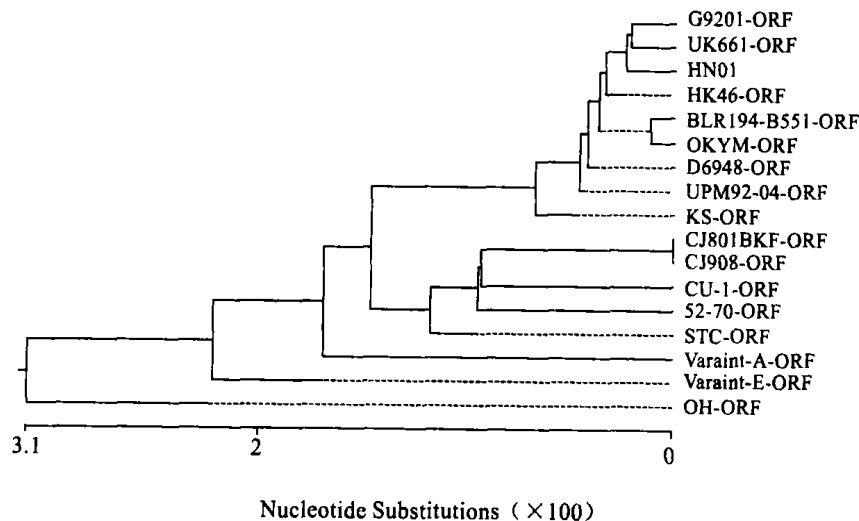


图5 根据不同 BDV VP 2 基因第210~ 382 氨基酸序列所作的系统进化树

Fig 5 The phylogenetic tree according to the compared result for the sequence of VP2 proteins from different BDV strains

2.5 毒力效价测定与动物回归试验

2.5.1 鸡胚接种试验结果 通过绒毛尿囊膜接种9日龄SPF鸡胚后,接种鸡胚在48~72 h内全部死亡,鸡胚发育弱小,周身水肿出血严重,特别是头和趾部出血尤为严重,尿囊膜增厚,肝脏肿大、出血;脾脏出血,肾脏肿大、出血,有的呈“花斑状”。在鸡胚上连续传代3次后,可引起鸡胚规律性死亡,并且在接种后72~96 h内全部鸡胚死亡。

2.5.2 毒力效价测定 采用双抗体夹心ELISA方法测定HN 01毒株的阴阳性,通过计算得到HN 01

毒株的ED₅₀效价,然后分别对SPF鸡和健康商品鸡做动物回归试验,结果见表2。HN 01毒株导致了SPF鸡和商品鸡的死亡。根据国际上通用的毒力判定标准判断为超强毒株。剖检除可见胸、腿肌有严重斑条状出血外,还可见心脏、腺胃、盲肠盲桃体和泄殖腔出血,多数鸡脾脏肿大,法氏囊肿大且呈弥漫性出血,切开囊腔可见粘膜条纹状或斑点状出血,有粘稠的奶酪样物质,法氏囊呈“紫葡萄”样外观,扑杀未死鸡,剖检也可见典型症状。

表2 HN 01毒株的毒力测定结果

Table 2 Detemination of virulence of HN 01 strain

分离株 Isolated strain	ED ₅₀	死亡率/% Mortality rate		毒力判定 Virulence deteminant
		SPF 鸡 SPF chicken	商品鸡 Commercial chicken	
河南株HN 01 Henan strain HN 01	10 ^{-8.7}	78	56	超强毒 Very virulent

3 讨论

超强毒型鸡传染性法氏囊病20世纪80年代末首次发生于欧洲,90年代初传到日本,随后迅速传到世界各地,给世界养禽业带来了巨大的经济损失。该毒型的烈性超乎人们想象,已彻底改变了BD原来的流行病学。vvBDV感染的基本特征是vvBDV的高致病性引发严重的临床症状和高死亡率,与I型BD感染相似,但症状更严重,且病鸡普遍如此。本试验中,HN 01能引发4周龄SPF鸡和健康商品鸡发病率均达100%,死亡率分别达75%和56%,而且病鸡死亡高峰较为集中,均在接种后3~4 d,第5天以后很少引起死亡,随后很快恢复。在死亡高峰期死亡的鸡,法氏囊是主要的诊断器官,可见其肿胀出血,有干酪样分泌物,在感染3~4 d后开始萎缩,7~10 d内严重萎缩。其他认为是超强毒引起的典型病理变化,如肝、脾脏肿大,胸腺萎缩,骨髓脂肪化等,在HN 01毒株均有表现。

Takase等^[10]将超强毒株F539和DV 86通过不同途径(CAM, AS, YS)接种SPF鸡胚,发现CAM途径最敏感,AS最不敏感,YS介于前两者之间;并且认为引起适应性鸡胚规律性死亡是vvBDV的典型特征。在HN 01毒株的毒力测定试验中,通过CAM接种9日龄SPF鸡胚后,接种鸡胚在48~72 h内全部死亡,并表现出vvBDV的典型致病特征。在鸡胚上连续传代3次(使鸡胚得以适应)以后,引起鸡胚规律性死亡,并且在接种后72~96 h内鸡胚全部死亡。这些特点和上述报道基本吻合,证明了

HN 01毒株确实是超强毒株。

从分子水平上分析发现,HN 01毒株与欧洲标准超强毒株UK661和日本超强毒株OKYM以及香港超强毒株HK46高度相似,核苷酸同源性分别为98.3%, 98.6%和98.7%;氨基酸同源性均为99.8%。VP2基因序列与UK661, HK46, OKYM各相差1个氨基酸,而与52-70, Variant-E, CU-1分别相差6, 15和12个氨基酸,52-70为标准强毒株,Variant-E为变异株,CU-1为标准弱毒株。从而说明,HN 01与一般的弱毒株、强毒株、变异株的差别很大。

国内外学者对不同株的vvBDV VP2基因进行了克隆和测序,通过与强毒株、变异株以及不同超强毒株的相关序列进行分析、比较,揭示了超强毒株具有独特的氨基酸残基^[11], vvBDV VP2在高变区具有重要特征:首先,249和254位的氨基酸分别为Q和G,而非K和S,从而保证其抗原型不发生变异;其次,七肽区保持SWSGSAS不变,且279和284位分别为D和A,而非N和T,这是BDV毒株具有致病力的必要条件;第三,在222, 294和299位上具有3个特征性氨基酸,分别为A, I和S,这3个氨基酸使超强毒株的亲水性发生变化,从而可能使毒力增强。通过对HN 01毒株的VP2基因高变区的分析,其特点与其完全符合,从而在分子水平上证明HN 01毒株的确为vvBDV。

从世界不同地区分离的BDV超强毒株间具有抗原和分子相似性的结果表明^[12, 13], BDV超强毒株有共同的起源和相似的抗原进化。HN 01毒株

VP2 基因所翻译的氨基酸和欧洲、日本、香港的超强毒株的相同区域完全相同。且通过分子系统进化树表明, HN 01 和华南及欧洲超强毒株最接近, 可能由他们直接传播而来。也间接说明国内 vvBDV 与国外超强毒株有密切亲缘关系, 传播途径可能由国外间接而来。目前, 国内已经有北京、广州、上海、河北等省市有 vvBDV 分离株的报道, 河南迄今尚未有关于 vvBDV 毒株分离鉴定的系统报道。近年来

BD 疫苗免疫失效的情况时有发生, 除免疫不合理外, 抗原变异和毒力增强也是免疫无效的原因之一。不同毒力的毒株共存使得对流行毒株的鉴定很困难, 所以研制针对不同毒株特别是超强毒株的单抗用于鉴别诊断迫在眉睫, 另外, 由于超强毒株和强毒株的抗原性基本无差别, 利用超强毒制备基因工程疫苗以预防超强毒法氏囊病也是今后的研究方向。

[参考文献]

- [1] Fashey K J, Erny K, Crooks J. A common form of immunogenicity in VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens[J]. J Gen Virol, 1989, 70: 1473- 1481.
- [2] Reddy S K, Silm A, Ratcliffe M J H. Biological roles of the major capsid proteins and relationships between the two existing serotypes of infectious bursal disease virus[J]. Arch Virol, 1992, 127: 209- 222.
- [3] Hirai K, Kawamoto B, Shimamura S. Some properties of precipitating antigens associated with infectious bursal disease virus[J]. Infect Immun, 1974, 10: 1235- 1240.
- [4] Mundt E, Muller H. Complete nucleotide sequences of 5' and 3' noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus[J]. Virology, 1995, 209: 10- 18.
- [5] Tacken M G, Rottier P J, Gielkens A L, et al. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA dependent RNA polymerase, VP1[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 209- 218.
- [6] Chettle N J, Stuart J C, Wyeth P J. Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia[J]. Vet Rec, 1989, 125: 271- 272.
- [7] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强 BDV 毒株宿主保护抗原的分子特征[J]. 中国兽医学报, 1998, 18: 521- 526.
- [8] 刘 爵, 刘尚高, 周 蛟. 鸡传染性法氏囊病超强毒株 X 株的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26: 13- 15.
- [9] 陈溥言, 卢 春. 传染性法氏囊病病毒 dsRNA 核酸提纯[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(4): 73- 76.
- [10] Takase K, Baba G M, Ariyoshi M, et al. Susceptibility of chicken embryos to highly virulent infectious bursal disease virus[J]. J Vet Med Sci, 1996, 58(11): 1129- 1131.
- [11] Brown M D, Green P, Skinner M A. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but distinct from those of 'classical' strains[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 675- 680.
- [12] Domitorio T V, Gianfrancesco J J, Duck L W. Sequence comparison of the variable VP2 region of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates[J]. Avian Dis, 1997, 41: 36- 44.
- [13] Vandenberg T P, Gonze M, Mprales D, et al. Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain[J]. Avian Pathol, 1996, 25: 751- 768.

Isolation, identification and molecular phylogenetic analysis of infectious bursal disease virus (BDV) for vv (very virulent) strain HN 01

JIA Yun^{1,3}, ZHANG Su-fang¹, ZHOU Bin¹, WANG Xu-dong¹,
WANG Chuang-qing², ZHAO Yu-jun³, CHEN Pu-yan¹

(1 Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Jiangsu, Nanjing 210095, China;

2 Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

3 Department of Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Liaoning, Shenyang 110161, China)

Abstract: An isolated strain HN 01 of Infectious Bursal Disease Virus (BDV), a suspected very virulent strain, was purified and inoculated into SPF chickens, which were proved infected 36 h later with

lethal rate more than 70% and incidence rate 100%. The anatomical diagnosis showed that pathologic morphology was similar to field cases, such as hemorrhages in muscle, Glandular stomach and heart, edema as well as "purple grapes bunch-like" facet in Bursa. The serological inspection, the virulent investigation, chicken embryo inoculation molecular biological analysis, and the electron microscopy examination all showed that the isolated was very virulent strain, which suggested that there were very virulent strains, different from ordinary virulent, typical and mutated BDV strains in chickens in Henan Province. The analogy inspection on the amino acid sequence of BDV VP2 gene's hyper-variety section was done, which resulted in a phylogenetic tree, showing that the evolutionary relation between HN01 strain and vvBDV strains of G9201 and UK661 is close; but the evolutionary relation between HN01 strain and HK46, OKYM, D6948, UPM92-04, KS is far.

Key words: infectious bursal disease virus; very virulent strain; isolation and identification; VP2; sequencing; phylogenetic tree

(上接第31页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0027-EA

Isolation and culture of goat embryonic germ cells

GE Xiu-guo, HUA Jin-lan, YANG Ji-jian, XU Xiao-ming, DOU Zhong-yong

(Shaanxi Center of Stem Cell Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The primordial germ cells were isolated from 46 goat fetuses with embryonic age from 25 to 38 days. The research showed there were many colonies in primary culture. One EG cell line maintained undifferentiation for 6 passages. When goat primordial germ cells were cultured on different feeder cells, MEF, GEF and BEF all could sustain goat primary embryonic germ cells, and MEF was finer than others. But there were no significant difference between MEF and GEF ($P > 0.05$). Goat primordial germ cells were cultured with the medium of 3 different concentrations of LIF. There was no difference in primary culture ($P > 0.05$). When passed, the group containing ng/mL LIF was finer than others. But there was no difference with the group containing 5 ng/mL LIF ($P > 0.05$). The group containing 1 ng/mL LIF was the worst.

Key words: goat; embryonic stem cell; primordial germ cell