

说明书

一株羊口疮病毒弱毒株及其应用

技术领域

本发明属于麻保沙星药物制剂技术领域，具体涉及一株羊口疮病毒弱毒株及其应用。

背景技术

羊口疮 (Orf) 又称羊传染性脓疱病 (CE)，接触传染性脓疱性口炎，其主要由羊口疮病毒 (Orfv) 引起的一种接触性人畜共患病。ORF 传染性强，发病率高。该病分布广泛，养羊的国家基本均有该病发生的相关报道，该病的发生对于养殖造成了严重经济损失，我国的养羊业均遭受影响。人也会被感染 Orfv，主要症状有手部、鼻、嘴唇及面部出现丘疹，免疫失调者可出现非典型增生病变及自身免疫性障碍等并发症。Orfv 是痘病毒科副痘病毒属中的典型代表。

目前并没有治疗羊口疮的特效药，所以对于羊口疮的预防工作就显得尤为重要，羊口疮疫苗现已研究出痂皮强毒疫苗、灭活疫苗、弱毒疫苗，但是到目前为止，灭活疫苗的保护力低，弱毒疫苗也有散播病毒和毒力反强的风险，应用的弱毒疫苗在免疫过程中仍效果不理想、保护率不高，到目前为止没有有效的疫苗用于羊口疮的防治。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一株羊口疮病毒弱毒株及其应用，该株具有较弱的毒力和很好的免疫原性。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一株羊口疮病毒弱毒株，是羊口疮病毒弱毒 QF_{nm2015} 株，保藏编号为 CCTCC NO: V201903，保藏日期为 2019 年 3 月 29 日。

进一步的，所述弱毒株是通过一株羊口疮病毒强毒株传代 90 代获得，所述强毒株是羊口疮病毒弱毒 QD/2015 株，保藏编号为 CCTCC NO: V201963，保藏

说明书

日期为 2019 年 9 月 2 日。

进一步地,所述羊口疮病毒强毒株在羊睾丸细胞上的 TCID₅₀ 为 $10^{-4.5}$, 以及培养 20 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 $10^{-5.5}$, 50 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 10^{-6} , 70 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 $10^{-6.5}$, 90 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 $10^{-6.6}$ 。

第二个方面,本发明提供上述羊口疮病毒弱毒株在预防羊口疮病毒中的应用。

本发明的有益效果在于:本发明通过对已分离的羊口疮病毒在羔羊睾丸细胞上增殖培养,通过连续传代培育出羊口疮病毒弱毒株,该病毒分离毒株对研制地方性 ORFV 的有效疫苗提供了优质的材料基础和选择空间,对于羊口疮的预防及治疗具有重要的意义。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 的荧光定量 PCR 扩增结果图,其中 M 为 DL2000 Marker; 1 病料研磨液; 2~3 分离株。

图 2 为本发明实施例 1 的荧光定量 PCR 扩增曲线,其中 2-1 为 PCR 检测扩增曲线, 2-2 为 PCR 标准曲线,并且在图中: 1~5: $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ copies/ μ L 标准品; 6: 检测 20 代细胞毒液; 7: 检测 50 代细胞毒液 ; 8: 检测 90 代细胞毒液 ; 9: 检测 90 代细胞毒液。

图 3 为本发明实施例 1 中 ORFV-Q 株 B2L 基因与其他 25 个国内外参考株的核酸同源性比对结果。

图 4 为本发明实施例 1 中 F1L 基因与选取的 20 个参考株的核酸同源性比对结果。

图 5 为本发明实施例 1 中 VIR 基因与选取的 15 个参考株的核酸同源性比对结果。

具体实施方式

在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常

说明书

规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

本实施例提供一株羊口疮病毒弱毒株的分离与鉴定方法，该弱毒株为 QFnm2015 株，已经在中国典型培养物保藏中心提交保藏，保藏编号为 CCTCC NO: V201903。该弱毒株是通过一株羊口疮病毒强毒株传代 90 代获得，所述强毒株是羊口疮病毒弱毒 QD/2015 株，也已经在中国典型培养物保藏中心提交保藏，保藏编号为 CCTCC NO: V201963。具体方法包括以下步骤：

一、强毒株的分离与鉴定

1 材料准备

1.1 病料

羊口疮痂皮：采自青岛某 Orf 发病养殖场，主要采集病羊唇部，口腔等病变明显部位的痂皮。（内蒙古农业大学传染病实验室保存）

1.2 病毒株

ORFV/QD/2015：将从步骤 1.1 中获得痂皮进行病毒分离，得到的分离株由内蒙古农业大学兽医学院传染病教研室分离保存。

1.3 实验动物

2~3 月龄羔羊、成年羊由金宇宝灵生物制品有限公司提供。

1.4 主要试剂

病毒基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒，购自 TIANGEN 生物有限公司；DL-5000 Marker、DL-1000 Marker、2×Easy Taq SuperMix、质粒 DNA 小提试剂盒

说明书

购自大连 Takara 宝生物公司；胎牛血清为 Hyclone 公司产品；胰酶、琼脂糖、酵母提取物为 Sigma 公司产品；碳酸氢钠粉末、链霉素、青霉素、无水乙醇、甲醛等化学试剂均为分析纯，购自呼和浩特宏之惠商贸有限公司。

1.5 仪器

生物安全柜 (Thermo)；PCR 仪 (Eppendorf 公司)；高压自动蒸汽灭菌器 (TOMY SX-500)；超速离心机 (Sigma)；高速低温离心机；恒温培养箱；电子天平 (德国 Sartorius BS-210S)；微波炉 (美的)；核酸电泳仪 (Bio-Rad)；水平电泳槽 (Bio-Rad)；紫外凝胶成像系统 (Syngene)；恒温振荡培养器 (Blue-pard)；电子显微镜 (GEM-2000EX)，日本电子公司生产，内蒙古农业大学大学生科院提供。

2 方法

2.1 病料处理

用经过灭菌的生理盐水漂洗痂皮病料 2 次后剪碎，加入适量 Hanks 液充分研磨，再用 Hanks 液按 1:5 的体积比稀释成悬液，置 -40℃ 和室温反复冻融三次，4000r/min 离心 10min，取上清用 0.45um 滤膜过滤，滤液经菌检为阴性后置 -40℃ 保存待用。

2.2 羔羊睾丸原代细胞的制备

(1) 按无菌操作方法，摘取 3 月龄健康雄性绵羊睾丸 1 个，用含有双抗（青霉素、链霉素各 300IU/mL）的 Hanks 液冲洗采集的睾丸组织 3 次。

(2) 剥离鞘膜及白膜后，用组织剪将其剪碎，含双抗的 Hanks 液冲洗组织 3 次。

(3) 将所有组织吸入 100mL 玻璃瓶内，加入 5 倍于睾丸组织量的 0.25% 胰蛋白酶溶液后，37℃ 水浴消化 30min，至睾丸组织呈蓬松状。

(4) 弃掉瓶内液体，用含双抗的 Hanks 液清洗 3 次后，加入 3mL 细胞培养

说明书

营养液反复吹打。

(5) 将吹打分散的睾丸组织经高压灭菌处理的六层纱布过滤后，加入剩余细胞培养营养液。

(6) 分装后，于 37℃ 恒温培养箱中培养。

2.3 羊睾丸细胞的传代

首先倒掉原细胞培养瓶中的营养液，用少量消化液先冲洗 2 次，然后再加入 0.3mL 左右消化液，盖好瓶盖后用肉眼观察，直到细胞面呈流沙状，或显微镜下观察到细胞完全脱离，然后用 10mL 吸管吸取 3mL 已配好的细胞生长液反复吹打消化好的细胞，使其完全脱壁并分散，补齐营养液，最后分装到各培养瓶中，盖紧瓶盖，放置 37℃ 生化恒温培养箱中培养，并逐日观察其生长情况。

2.4 病毒接种

挑选形态完好且长成致密单层的羊睾丸细胞，弃掉培养瓶中的细胞培养液，用 Hanks 液清洗细胞 2 次，接种已处理的病毒液 1mL，对照细胞接 1mL 的生理盐水，37℃ 吸附 1h，加入 MEM 维持液后置于细胞培养箱 37℃ 继续培养，观察细胞病变 (CPE)，当细胞出现 80% 病变时收毒，反复冻融 3 次后继续传代

2.5 病毒毒力 (TCID₅₀) 的测定

(1) 将羊睾丸细胞培养于 96 孔板中，每个孔所加营养液为 0.18mL。

(2) 取无菌 EP 管 10 个，置于提前准备好的试管架上，每个 EP 管中加入 900uL Hanks 液，用无菌处理的移液管吸取 100uL 羊口疮病毒液加入到第一个离心管中，反复吹打混匀，再从第一个离心管中吸取 100uL 混合液加入到第二个管中，同样充分混匀，照这种方法，一直到第 10 个管。根据此方法，我们对病毒液做了 10 倍梯度稀释。

说明书

(3) 待步骤(1)中的细胞长成致密单层,弃掉每个孔中的营养液,用 Hanks 清洗两次,然后每孔接入已经稀释好的病毒液 20uL,每个稀释梯度做 8 个重复,从 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等,从左到右每个梯度一行 8 个孔,其余两排 16 个孔作为对照。

(4) 将培养板放置于 37°C 培养箱中培养,每日观察孔中细胞的病变,观察 5 d,最后用 Reed-Muench 法计算分离株 TCID_{50} 。

2.6 动物回归实验

将 4 只三月龄羔羊分为两组,实验组 3 只,对照组 1 只,取产生稳定病变的细胞培养物病毒液,在羔羊的唇部划痕接种,每只接种 1mL,对照羊只以同样方法接种等量生理盐水,并与实验组隔离饲养。接种后观察接种部位病变,每天测量体温、记录临床症状和拍照,实验组的羔羊均表现出羊口疮发病症状,并且确诊为典型的羊口疮。

2.7 病毒 PCR 鉴定

2.7.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中已公布的羊口疮病毒 F1L 基因序列(登录号为 KC569751)和病毒全基因组序列(登录号: JN613810),利用软件 Premier 6.0 设计特异性引物,由上海生工合成,引物序列和目的片段大小见下表 1。

表 1 F1L 扩增 PCR 引物信息

基因	引物名	引物序列 (5'~3')	大小(bp)	Tm($^{\circ}\text{C}$)
F1L	F1L-F	GGTGGAGGCTAAGACAGAG	1400	55
	F1L-R	GCCGCCATAAAAGAGTTGT		
B2L	B2L-F	GAACCCAGCATCCTCCAA	1255	57
	B2L-R	TTTCCCTGAAGCCCTATTA		
VIR	VIR-F	TAATGTTATTGGCGGTGGC	676	59
	VIR-R	AAACGCACGCCCCGTAAAT		

说明书

2.7.2 病毒 DNA 的提取

用 TIANGEN 病毒 DNA 提取试剂盒从产生稳定病变的分离株细胞培养液中提取病毒总 DNA，操作方法及步骤按试剂盒说明书进行。

2.7.3 PCR 扩增

以提取的羊口疮病毒的总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，取 6 μ LPCR 产物，配制 1.5%琼脂糖凝胶，1 \times TAE 中，以 110V 电压进行电泳，电泳 30min，完毕后经凝胶成像系统观察结果并记录。具体的反应体系和反应参数如下：

PCR 反应体系（25 μ L）为：

2 \times Easy Taq SuperMix 12.5 μ L，

上游引物（10 μ mol/L） 1.0 μ L，

下游引物（10 μ mol/L） 1.0 μ L，

DNA 模板 1.0 μ L，

RNase-Free ddH₂O 9.5 μ L；

实验 PCR 扩增反应具体参数为：预变性 95 $^{\circ}$ C 5min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 T_m 30s，35 个循环；延伸 72 $^{\circ}$ C 30s，终延伸 72 $^{\circ}$ C 10min；扩增结果如图 1 和 2 所示。

2.7.4 琼脂糖凝胶目的片段的回收

按照 TIANGEN 胶回收试剂盒说明书操作

2.8 目的片段与载体 pMD19-T 的连接

表 2 载体连接体系

体系组分	各组分体积(μ L)
目的基因片段回收产物	4
pMD19-T 载体	1
Solution I	5

2.9 重组质粒的转化

- (1) 从-80℃冰箱中取出 E.coli DH5α 感受态细胞放在冰上融化，待稍微化开，用枪头轻试，稍微有些冰即可。
- (2) 取过程 2.2.10.5 中的 10 μL 连接产物加入到 100 μL 感受态细胞中，用手指轻弹混匀，冰浴 20 min。
- (3) 将 EP 管立刻放入 42℃ 水浴锅中，热激 90 sec，热激结束后立即取出。
- (4) 冰浴 2 min，时间需要准确。
- (5) 在无菌条件下加入 890 μL LB 液体培养基，轻轻混匀。
- (6) 放入摇床，保持 37℃，150 rpm 慢摇 1h。
- (7) 恢复室温后，放入离心机中设置 4000 rpm，离心 5 min。
- (8) 弃去 800 μL 上清液，用移液器轻轻吹打管底菌液，充分混匀，用涂布器涂于含有氨苄青霉素的 LB 平板上。
- (9) 37℃倒置平皿培养 16h 左右，待出现单个菌落，立即取出。

2.10 阳性菌的筛选

在恒温培养箱中取出倒置的平皿，观察菌落大小和蓝白斑出现情况，如果菌落太小，则需继续放置于培养箱中，直至菌落较大，能被挑起；如果蓝斑太少或者未出现，则需放置 4℃，待出现较多蓝斑后取出。提前在 10mL 的 EP 管中移入 5mL 的 LB 液体培养基，在无菌工作台上用灭菌的接种环挑取单个白色菌落，尽量挑取间距较大、在平皿边缘位置的菌落，然后迅速接种到含 Amp⁺ 的液体培养基中。盖上管盖后放入摇床，保持 37℃、200 rpm 慢摇 16h。当菌液密度较大（培养基底部有菌落沉淀出现，摇匀后出现浑浊），可停止摇菌。短时间保存可放置 4℃，如需长时间保藏，需加入甘油保藏，使其甘油体积占菌液总体积的 15%~20%，并置于-40℃。

说 明 书

2.11 重组质粒的提取

- (1) 取 1.5mL 经过夜培养的菌液，加入高压灭菌的 EP 管中，使用离心机 12000 rpm，离心 5min，弃去上清液。
- (2) 向 EP 管中加入 250uL 的溶液 P1，用移液器枪头完全悬浮菌液沉淀。
- (3) 将 250uL 的溶液 P2 加入 EP 管中，然后温和的将 EP 管上下翻转 8 次，完全裂解菌体。
- (4) 向 EP 管沿壁加入 350uL 溶液 P3，同样温和翻转 8 次，12000 rpm，离心 10min。
- (5) 将步骤(4)的上清液转入吸附柱 CP3 中，12000rpm 离心 1min，弃掉废液。
- (6) 用移液器向 CP3 中加入 500uL 的 PD 溶液，充分混匀，12000rpm 离心 1min，弃废液。
- (7) 再向 CP3 中加入 600uL 溶液 PW，12000rpm 离心 1min，弃废液。
- (8) 重复以上操作步骤(7)。
- (9) 将吸附柱重新放回离心管中，空离心 2min，彻底去除残留的溶液 PW。
- (10) 将吸附柱转移到另一个灭菌的 EP 管中，向中部悬空滴加 50uL 无菌水，室温静置 3min，12000rpm 离心 2min，弃吸附柱，将 EP 管中质粒放入-20℃保存。

2.12 质粒测序

根据 2.2.10 的结果，挑选最亮的目的条带所属样品进行 OD 值检测，符合测序结果的质粒送上海生工测序。

2.13 核苷酸的同源性分析

运用 DNASTar 软件，选取 GenBank 中已经发表的国内外羊口疮病毒的 B2L

说 明 书

基因、FIL 基因和 VIR 基因序列与本分离株 ORFV-Q 相关基因进行同源性比较分析。结果表明, ORFV-Q 株 B2L 基因与其他 25 个国内外参考株的核酸同源性为 96.8%、98.9% (图 3); F1L 基因与选取的 20 个参考株的同源性为 96.25%、99.9% (图 4); VIR 基因与选取的 15 个参考株的同源性为 94.9%、99.8% (图 5)。

小结: 利用羊睾丸细胞成功分离出一株羊口疮病毒, 命名为 QD/2015 株(保藏号为: CCTCC NO: V201963), 其在羊睾丸细胞上的 TCID₅₀ 为 $10^{-4.5}$ /0.1ml, 该毒株为强毒株, 临床症状表现为典型的羊口疮发病症状。

二、弱毒株的传代与鉴定

1 材料

1.1 病毒株 羊口疮病毒 QD/2015 株。

1.2 动物 2~3 月龄羔羊、成年羊由金宇宝灵生物制品有限公司提供,

1.3 荧光定量 PCR TaqMan 探针:由内蒙古农业大学兽医学院传染病教研室提供。

1.4 主要试剂

MEM、胰蛋白酶、胎牛血清等购自 Gibco 公司, 水解乳蛋白、生理盐水、甲酸等由实验室配制, 病毒基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, Montanide ISA 201 VG 佐剂、Montanide ISA II R VG 佐剂购自法国 Seppic 公司, 红细胞裂解液购自 Solarbio 科技有限公司, CD4⁺、CD8⁺荧光单克隆抗体购自美国 BD 公司。

1.5 主要仪器

HW.SY II -K2 型电热恒湿水浴锅、BJ-2CD 型双人单面垂直净化工作台超净工作台、HZQ-X300 型电热恒温培养箱、Eppendorf 5417R 小型台式高速冷冻离心机、BCD-215KAJ 型低温冰箱、SX-500 型高压锅、G:BOX 紫外凝胶成像系统、梯度 PCR 仪等由内蒙古农业大学兽医学院传染病实验室提供。

2 方法

2.1 羊口疮病毒的增殖

2.1.1 羊睾丸细胞的制备

- (1) 无菌条件下采集 2~3 月龄黑羊睾丸放入无菌平皿内。
- (2) 将羊睾丸置于超净工作台内用 Hanks 液冲洗 3 遍，用无菌剪镊将其移至另一无菌平皿内，剪去白膜、鞘膜用 Hanks 液冲洗 3 遍。
- (3) 将组织剪碎，Hanks 液冲洗 3 遍。
- (4) 以无菌吸管将其无菌处理过的 100mL 瓶中，加入 0.25%的胰酶约组织的 4~5 倍），置于 37℃水浴锅消化 30min，每隔 10min 摇晃一次，消化至组织成蓬松状。
- (5) 吸弃消化液，Hanks 液冲洗 3 次。
- (6) 加入少量配好的营养液，反复吹打。
- (7) 经无菌处理过的，六层纱布、漏斗将其过滤至细胞瓶，补液，分装每瓶 8mL 液体。
- (8) 将分装好的细胞水平放入 37℃恒温培养箱，使其贴壁生长。

2.1.2 羊睾丸细胞的传代

- (1) 当细胞贴壁长满，无菌条件下弃去细胞液，用消化液快速洗 3 次。
- (2) 加消化液于培养瓶中，封闭细胞瓶，在倒置显微镜下观察，若细胞大部分变圆，迅速拿回操作台，轻敲几下细胞瓶后加 3mL 培养液终止消化。
- (3) 10mL 无菌吸管反复吹打，待细胞完全被吹散成单个细胞补齐培养液，轻轻吹打匀后吸出一半，分装到新的培养瓶中，放入 37℃恒温培养箱培养。

2.1.3 羊口疮病毒的接种

- (1) 取嘉羊睾丸原代细胞进行细胞培养，待细胞铺满细胞瓶壁时弃去培养液，

说明书

向细胞瓶接种已分离的强毒株 800 μL ，对照瓶加入维持液 800 μL ，同时放入 37°C 恒温培养箱吸附 1 h 后补齐维持液至 8 mL 后放入 37°C 恒温培养箱。

(2) 观察细胞病变情况，当细胞脱落至 70% 以上，且呈现拉网状时，将其放入 -20°C 冻融 3 次后做 F_1 代毒备用。

(3) 将强毒株接种到铺满细胞瓶的细胞中，依次增殖，接种传代至 90 代。取 10 代、20 代、59 代、70 代、90 代细胞毒冻存，做 TCID_{50} 检测病毒滴度及荧光定量 PCR 检测病毒含量，其中传代到 90 代的弱毒株即为本申请提交保藏的弱毒株。

实施例 2

羊口疮病毒相关测试

1 羊口疮病毒荧光定量

1.1 PCRTaqMan 探针：由内蒙古农业大学兽医学院传染病教研室提供。

1.2 主要试剂

MEM、胰蛋白酶胎牛血清等购自 Gibco 公司，水解乳蛋白、生理盐水、甲醛等由实验室配制，病毒基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司，Montanide ISA 201 VG 佐剂、Montanide ISA 11 R VG 佐剂购自法国 Seppic 公司，红细胞裂解液购自 Solarbio 科技有限公司，CD4+、CD8+ 荧光单克隆抗体购自美国 BD 公司。

1.3 主要仪器

HW.SY11-K2 型电热恒温水浴锅、BJ-2CD 型双人单面垂直净化工作台超净工作台、HZQ-X300 型电热恒温培养箱、Eppendorf 5417R 小型台式高速冷冻离心机、BCD-215KAJ 型低温冰箱、SX-500 型高压锅、G: BOX 紫外凝胶成像系统、梯度 PCR 仪等由内蒙古农业大学兽医学院传染病实验室提供。

说明书

1.4 羊口疮病毒荧光定量 PCR 的测定

将前面获取的强毒株在羊睾丸细胞上培养传代 20 代、50 代、70 代、90 代细胞病毒液的 DNA，参照已内蒙古农业大学兽医学院传染病教研室建立的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法对羊口疮病毒进行检测。所用引物、探针、反应参数与条件均由本教研室提供，其引物和探针和反应体系如表 3 所示。

表 3 TaqMan 探针法引物及探针序列

方法	引物 / 探针	碱基序列 (5'-3')	目的片段 (bp)
TaqMan 探针法	F	CTC AAG GCG GTG GAA TGG A	84
	R	CTT CGG ACA CGT GGA CTT GC	
	探针	FAM-AGA CGT GGA CTC CAA AGA CTA CCC GCA-TAMRA	

TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应体系：

Premix Ex TaqT M (Probe qPCR) : 2× 10μL,

上游引物 10μmol/L: 0.6μL,

下游引物 10μmol/L: 0.6μL,

TaqMan 10μmol/L: 0.5μL,

DNA 模板: 1.0μL,

超纯水: 7.3μL,

合计: 20μL;

TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应参数: 预变性 95℃ 30s, 变性 95℃ 5s, 退火 58℃ 30s, 45 个循环; 延伸 58℃ 30s。

2 羊口疮病毒的相关检验

2.1 TCID₅₀ 试验结果

强毒株在羊睾丸细胞上的细胞毒 TCID₅₀ 结果为 $10^{-4.5}$, 及培养 20 代细胞毒

说 明 书

TCID₅₀ 结果为 $10^{-5.5}$, 50 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 10^{-6} , 70 代细胞毒结果为 $10^{-6.5}$, 90 代细胞毒 TCID₅₀ 结果为 $10^{-6.6}$, 如表 4 所示为 90 代细胞毒 TCID₅₀ 结果。

表 4 90 代细胞毒 TCID₅₀ 结果

稀 释 度	有 CPE 数	无 CPE 数	累积 CPE 数	累积无 CPE 数	累积 CPE 百分率
10^{-1}	8	0	49	0	100% (49/49)
10^{-2}	8	0	41	0	100% (41/41)
10^{-3}	8	0	33	0	100% (33/33)
10^{-4}	8	0	25	0	100% (25/25)
10^{-5}	7	1	17	1	94% (17/18)
10^{-6}	6	2	10	3	77% (10/13)
10^{-7}	3	5	4	8	33% (4/12)
10^{-8}	1	7	1	15	6.3% (1/16)
10^{-9}	0	8	0	23	0 (0/23)
10^{-10}	0	8	0	31	0 (0/31)

距离比例 = (高于 50% 病变率的百分数 - 50%) / (高于 50% 病变率的百分数 - 低于 50% 病变率的百分数) = (77% - 50%) / (77% - 33%) = 0.61;

$\lg \text{TCID}_{50} = -6 + 0.61 \times 1 = -6.61$;

$\text{TCID}_{50} = 10^{-6.6}$;

2.2 羊口疮病毒荧光定量 PCR 测定结果

运用传染病教研室建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对羊口疮病的在羊睾丸细胞上培养的 20 代、50 代、70 代和 90 代细胞毒液进行定量检测, 结果均为阳性, 阴性对照未出现扩增曲线。所选取的浓度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品, 其线性关系良好, 相关系数 $R^2 = 0.998$, 扩增效率 (Eff%) = 87.61, 起始拷贝数的对数与 Ct 值的表达式为 $y = -3.66x + 4.622$ 。

2.3 羊口疮病毒灭活效果检验结果

将 37℃ 以 0.4 甲醛灭活 48h 的传代 90 的弱毒株接种于羊睾丸细胞上观

说明书

察 3~5 天，结果显示细胞没有产生病变，盲传 3 代后细胞仍然没有产生病变，病毒已灭活不具备感染能力。

综上，本发明通过对已分离的羊口疮病毒在羔羊睾丸细胞上增殖培养，通过连续传代培育出羊口疮病毒弱毒株，该病毒分离毒株对研制地方性 ORFV 的有效疫苗提供了优质的材料基础和选择空间，对于羊口疮的预防及治疗具有重要的意义。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。