

## 权 利 要 求 书

---

- 1.一种大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗,其特征在于:包括大口黑鲈虹彩病毒 LMBV,于 2020 年 1 月 11 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC NO:V202018。
- 2.如权利要求 1 所述的大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗,其特征在于:所述灭活疫苗还包括佐剂 IMS1312。
- 3.一种权利要求 1 中大口黑鲈虹彩病毒病灭活疫苗的制备方法,其特征在于包括以下步骤:  
步骤 1.培养 EPC 细胞;  
步骤 2.将培养的 EPC 细胞进行 LMBV 病毒扩增,获得 LMBV 病毒液;  
步骤 3.将 LMBV 病毒液进行灭活处理。
- 4.如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 1 中培养 EPC 细胞为:  
步骤 1.1,将长满单层 EPC 的培养皿中的培养基去除,加入体积浓度为 0.25%的胰蛋白酶消化液消化 1~2min,再加入 pH 在 7.4~7.6 的含有体积百分比 10%的小牛血清的 199 培养基,用移液管轻吹细胞瓶底,再添加含有体积百分比 10%的小牛血清的 199 培养基悬浮细胞,于 23~25℃进行培养扩增,待 EPC 细胞在培养皿中铺满即得到 EPC 细胞。
- 5.如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 2 中将培养的 EPC 细胞进行 LMBV 病毒扩增,包括:  
步骤 2.1,在获得的 EPC 细胞中按照 1/10 的培养基体积接种感染复数 1~3 PFU/cell 的 LMBV 病毒悬液,待病毒吸附细胞 30~60min,补加含有体积百分比 2%的小牛血清的 199 培养基进行病毒增殖 3~6 天,获得病变细胞;  
步骤 2.2,将病变细胞反复冻融 2~3 次,于 2000~3000r/min 离心 10~15min,收集上清液即 LMBV 病毒液。
- 6.如权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 2.2 中冻融条件为:于-80℃冻存,然后于 20~25℃自然溶解。
- 7.如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 3 中将 LMBV 病毒液进行灭活处理,包括:在 LMBV 病毒液中加入二乙烯亚胺至其终浓度为 2%,得到的混合液于 37℃灭活 48h。