

网络出版日期:2014-12-31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20141231.1039.011.html>

陕西关中某羊场羊口疮病毒的分离鉴定与基因序列分析

尚 辰, 黄 勇, 张秀娟, 董 峰, 杜 谦, 赵晓民, 张文龙, 童德文

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 羊口疮疫病的暴发可严重影响畜牧的经济效益,为探明陕西地区该病的发病原因。本研究从陕西关中地区某羊场出现特征症状病羊嘴部痂皮中分离病原,经过感染 MDBK 细胞系,获得 1 株病毒,经形态学、理化、PCR 检测及病理组织学等方法鉴定,该病毒分离株为羊传染性脓疱病毒(Orf virus, ORFV),命名为 ORFV-SXGZ。依据 GenBank 中发表的 ORFV 特异性 *B2L*、*F1L* 及 *VIR* 基因的核酸序列,设计并合成 3 对引物,应用 PCR 方法成功对 ORFV-SXGZ 毒株的 *B2L*、*F1L* 及 *VIR* 基因进行克隆,并将其基因序列及推导的氨基酸序列与其他不同来源 ORFV 分离株进行比较分析。序列分析结果表明,ORFV-SXGZ 毒株的 *B2L*、*F1L* 和 *VIR* 基因与其他已发表 ORFV 毒株之间的核苷酸同源性分别为 96.7%~99.6%、95.8%~97.9%和 95.0%~99.3%,氨基酸同源性分别为 95.3%~99.7%、95.8%~98.2%和 95.5%~98.4%。系统进化树分析结果显示,ORFV-SXGZ 毒株与国内新疆和甘肃等西北部地区分离株的亲缘关系更近,证实陕西关中地区养殖场中存在羊口疮病毒感染。

关键词 羊传染性脓疱病毒;分离鉴定;*B2L* 基因;*F1L* 基因;*VIR* 基因;序列分析

中图分类号 S858.27

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2014)12-0025-08

Isolation and Identification of Orf Virus Shaanxi Guanzhong and Sequence Analysis of *B2L*, *F1L* and *VIR* Genes

SHANG Chen, HUANG Yong, ZHANG Xiujuan, DONG Feng, DU Qian,
ZHAO Xiaomin, ZHANG Wenlong and TONG Dewen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract The outbreak of Orf can seriously affect the economic benefits of livestock. In order to investigate the etiology of this disease in Shaanxi province, ORFV-SXGZ-an Orf virus strain was successfully isolated from scab materials of goats with typical clinical symptom through passaging in MD-BK cells. This strain was indeed Orf virus, because virus particles form, physico-chemical property, PCR products lengths and pathohistology feature were as the same as Orf virus. Three pairs of primers for the *B2L*, *F1L* and *VIR* genes of Orf virus were designed on the basis of published sequences in GenBank. The *B2L*, *F1L* and *VIR* genes of ORFV-SXGZ were cloned, and compared nucleotide sequence and the homology of deduced amino acids sequence with other ORFV strains. Compared with other published ORFV strains, the homology of *B2L*, *F1L* and *VIR* genes were 96.7%—99.6%, 95.8%—97.9% and 95.0%—99.3%, respectively. The homology of deduced amino acids sequence between ORFV—SXGZ and other strains were 95.3%—99.7%, 95.8%—98.2% and 95.5%—

收稿日期:2014-02-18 修回日期:2014-04-06

基金项目:陕西省重点科技创新团队计划(2013KCT-28)。

第一作者:尚 辰,女,硕士,研究方向为基础兽医学。E-mail:shangchenshuang@126.com

通信作者:童德文,男,博士,教授,博士生导师,主要从事动物病理学研究。E-mail:dwtong@nwsuaf.edu.cn

98.4%, respectively. From the three phylogenetic trees, the results showed that ORFV-SXGZ strain was genetically close to other ORFV strains isolated from northwest China. The research confirmed the existence of ORFV infection in Shaanxi Guanzhong area.

Key words Orf virus; Isolation and identification; *B2L* gene; *F1L* gene; *VIR* gene; Sequence analysis

羊传染性脓疱病(Contagious ecthyma, CE), 俗称“羊口疮(Sore mouth)”, 是由痘病毒科(Poxviridae)脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae), 副痘病毒属(*Parapoxviruses*)羊传染性脓疱病毒(Orf virus, ORFV)引起的一种常见接触性嗜上皮性人畜共患传染病^[1]。此病常呈群体发病, 尤其是在饲养密度较大的羊群^[2]中。临床特征性病变为患病动物的口唇、舌、鼻、乳房和鼻孔周围皮肤上出现小红斑点、丘疹、水泡和脓疱, 最后形成痂皮或疣状病变——桑葚状痂垢^[1]。由于该病分布广泛、传染性强、发病率可达 50%~100%不等, 对畜牧业尤其养羊业危害日益凸显, 加之跨物种传染的报道不断增多, ORFV 已经成为研究者最为关注的病毒之一^[3]。

B2L 基因是 ORFV 的结构基因, 编码 42 ku 蛋白, 该蛋白属于病毒囊膜蛋白, 可刺激淋巴细胞释放抗体^[4], 是 ORFV 的一种保护性抗原^[5-6]。*F1L* 基因是 ORFV 的高度保守序列, 位于基因组中部^[7-8], Buddle 等^[9]和 Czerny^[10]研究表明该基因编码的蛋白是病毒表面微管的重要组成部分, 可介导体液免疫和细胞免疫, 是主要抗原蛋白, 能刺激机体发生免疫应答反应, 诱导宿主细胞产生中和抗体。除此之外, F1L 蛋白可以与具有硫酸乙酰肝素受体的动物细胞表面结合, 而该受体存在于大部分哺乳动物的细胞表面, 即病毒感染细胞时先通过 F1L 蛋白吸附到细胞表面后再感染细胞。因此, F1L 蛋白在病毒吸附、侵入宿主细胞及病毒成熟的过程中具有十分重要的作用^[11]。*VIR* 干扰素抑制基因, 位于 ORFV 基因组的左侧末端, 可以抑制机体干扰素的抗病毒活性^[12-14]。

2013 年 3 月, 陕西关中地区某羊场暴发羊口疮疫情, 共有 111 只羊发病, 其年龄均在 7 月龄以内。为了探明发病原因, 本试验采集疑似羊口疮的病羊嘴部痂皮病料, 进行病毒分离、鉴定及 *B2L*、*F1L*、*VIR* 基因的克隆及序列分析, 期望了解陕西省 ORFV 的分子流行情况, 为进一步开展 ORFV 致病机理、预防、诊断等相关方面的研究奠定生物学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞株和病料 MDBK 细胞株购自中国科学院上海细胞库, 由西北农林科技大学动物医学院动物病理实验室保存。病料采自陕西关中某羊场疑似羊口疮发病山羊的嘴部痂皮, 一部分置于 $\varphi=10\%$ 福尔马林中, 用于病理切片的制备, 一部分置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.1.2 菌株、试剂、载体 *E. coli* DH5 α 感受态菌株由西北农林科技大学动物医学院动物病理实验室通过 CaCl_2 方法制备并保存; DMEM 为 Gibco 公司产品; 胰酶、琼脂糖为 Sigma 公司产品; 胎牛血清为 Hyclone 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶、*T_4* DNA Ligase、DL 2000 DNA Marker、pMD18-T vector 购自大连 TaKaRa 公司; 病毒基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Gel Extraction、Plasmid Miniprep Kit 购自威格拉斯生物技术有限公司; 96 孔细胞培养板为丹麦 NUNC 公司产品; 磷酸盐缓冲液(PBS)即氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和 5-碘-2-2 脱氧尿苷等化学试剂均为分析纯, 购自杨凌宝鑫科学器材有限公司; 青霉素、链霉素购自杨凌三力化玻采供应站。

1.2 方法

1.2.1 病料处理 取患病羔羊嘴唇部位痂皮 1 g, 将其置于无菌生理盐水中漂洗 2 次后剪碎, 加入 2 mL 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 研磨成 1 g:10 mL 的悬液, 5 000 r/min 离心 35 min, 取上清液, 按照 20% 的比例加入 10 000 IU/mL 的双抗(青霉素、链霉素), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 感作过夜, 无菌检验阴性后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.2 病理切片制备 取 $\varphi=10\%$ 福尔马林中固定的痂皮块 5 mm³, 按常规方法进行石蜡切片、HE 染色和显微镜观察^[15]。

1.2.3 病毒分离 从液氮中取出第 6 代 MDBK 传代细胞冻存管, 迅速置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行细胞复苏, 之后, 将细胞接种于细胞培养瓶中, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi=5\%$ CO_2 培养箱中静置培养, 待细胞铺满瓶底的 70%~80% 且细胞生长良好时, 用 PBS 清洗细胞

胞 2~3 次,接种“1. 2. 1”处理好的病毒液 1 mL,于 37 ℃ 吸附 2 h,弃掉上清后加入含 2% 体积分数胎牛血清的 DMEM 培养液,置 37 ℃ $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱中静置培养,逐日观察细胞病变(CPE)。同时设置正常 MDBK 细胞为对照。若实验组细胞在病料接种后 4~5 d 内没有出现细胞病变则无间断盲传 3 代,若第 5 代细胞仍未出现所需病变则视为阴性,当出现 80% 细胞病变时反复冻融 3 次后收毒,置-20 ℃ 保存。

1. 2. 4 病毒粒子形态学鉴定 分离病毒株在盲传 5 代后,试验组 MDBK 细胞出现典型的 CPE 现象,收获病变细胞培养液,于-20~37 ℃ 反复冻融 3 次,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液进行超速离心(30 000 r/min,离心 3. 5 h),最后用超纯水溶解沉淀,经 $w=1\%$ 磷钨酸溶液负染病毒粒子,电镜观察。

1. 2. 5 病毒 TCID₅₀ 的测定 在 96 孔细胞培养板内培养 MDBK 细胞,将第 6 代病毒用常规方法测定 TCID₅₀,最后用 Reed-Muench 法计算分离株 TCID₅₀。

1. 2. 6 病毒理化特性试验 取第 6 代细胞病毒液,用 5-IUDR(5-碘-2-2 脱氧尿苷)对病毒液进行处理用于鉴定病毒的核酸类型;用 200 mL/L 乙醚、50 mL/L 氯仿分别处理病毒液用于脂溶性敏感试验;60 ℃ 水浴中处理 30 min 用于病毒的耐热性测试。在 96 孔培养板上分别接种 MDBK 细胞,测定上述 4 种处理后病毒的 TCID₅₀,同时设立未做任何处理的正常 MDBK 细胞为对照组。

1. 2. 7 引物设计与合成 根据 GenBank 数据库中发表的 ORFV *B2L*、*F1L* 和 *VIR* 的基因序列,利用引物设计软件 Premier 5. 0 设计 3 对特异性引物,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物序列及扩增片段长度见表 1。

1. 2. 8 分离株 DNA 提取和 PCR 扩增 参照病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明书,从细胞毒中提取总 DNA。以提取分离株病毒基因组 DNA 为模板,选用 25 μ L PCR 扩增体系:10 $\times$ PCR

Buffer 2. 5 μ L、dNTPs 2 μ L、上下游引物(20 Nmol/L)各 0. 5 μ L、DNA 2 μ L、*Taq* DNA polymerase 0. 2 μ L(1U)、灭菌双蒸水 16. 3 μ L。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,共进行 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 8 μ L PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳,并使用凝胶成像仪观察和记录结果。

1. 2. 9 *B2L*、*F1L* 和 *VIR* 基因的克隆 用凝胶回收试剂盒纯化目的片段,将 *B2L*、*F1L* 和 *VIR* 基因纯化后连接到 pMD18-T 载体上,将所有连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,并将其涂布于含有 Amp 的 LB 固体培养基中 37 ℃ 恒温培养箱中约 12 h 培养,再对每个基因选取 3 个单菌落进行摇菌、提取质粒并送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

1. 2. 10 *B2L*、*F1L* 和 *VIR* 基因的序列分析 将测序结果用 BLAST 进行比对分析,同时应用 DNASTar 软件的 MegAlign 进行核苷酸和氨基酸同源性比较,再用 Clustal X 1. 83 和 MEGA 5. 1 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2. 1 临床症状观察

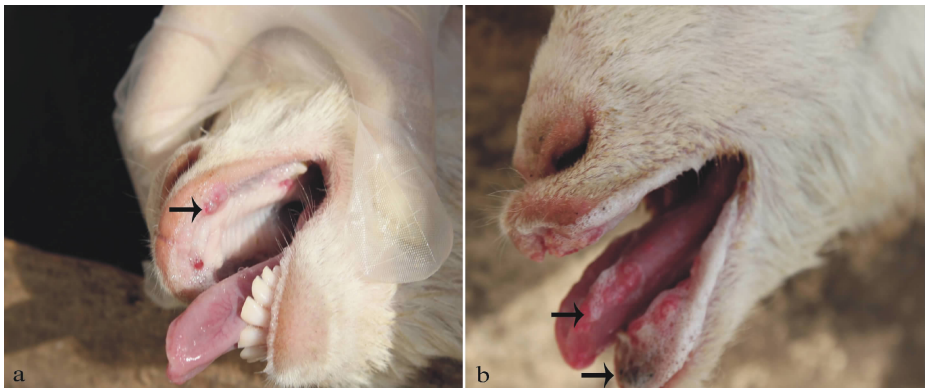
患病羊精神不振、食欲减退、身体虚弱、体温微升,口腔黏膜、齿龈、嘴唇、鼻孔周围等皮肤上出现小红斑点(图 1-a),随时间延长发展为丘疹、水疱、脓疱,脓疱破溃后流出覆盖在患部,最终形成棕褐色厚而硬的疣状痂皮(图 1-b)。病变部位血管较丰富,当该部位受到创伤或活体检查时常易引发出血,去掉硬痂皮后可流露出血的毛糙肉芽组织。

2. 2 病理组织学观察

制作临床采集的患病羔羊嘴部痂皮病理切片,经 H. E. 染色后,可见棘细胞层肥厚、细胞核碎裂、细胞变性、坏死、气球样变、空泡变性及出血等病理变化(图 2)。

表 1 PCR 引物序列列表
Table 1 Sequences of primer pairs used for PCR

基因 Gene	引物序列 Oligonucleotide primer for PCR amplification		大小/bp Size
	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	
<i>B2L</i>	ATGTGGCCGTTCTCCTCCA	TTAATTTATTGGTTTGCAGAACTCCG	1 137
<i>F1L</i>	ATGGATCCACCCGAAATCACGGG	TCACACGATGGCCGTGACCAG	1 005
<i>VIR</i>	ATGGCCTGCGAGTGCGCGTCTCTGAT	TTAGAAGCTGATGCCGCGAGTTGTTGA	552



a. 病羊上颌皮肤出现小红斑点和丘疹 Red spots and papules on palate; b. 病羊口唇和舌出现水疱、脓疱及痂皮 Pustules and scabs on lips and tongue

图 1 不同发病时期病羊的临床表现

Fig. 1 The clinical manifestations of the different period of ORFV infection in goats from Shaanxi flocks

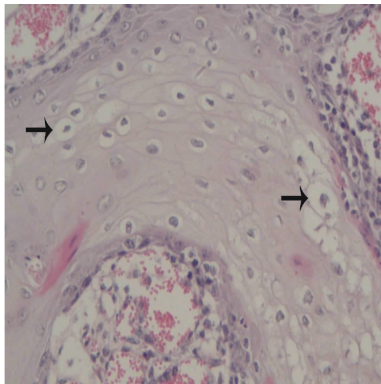


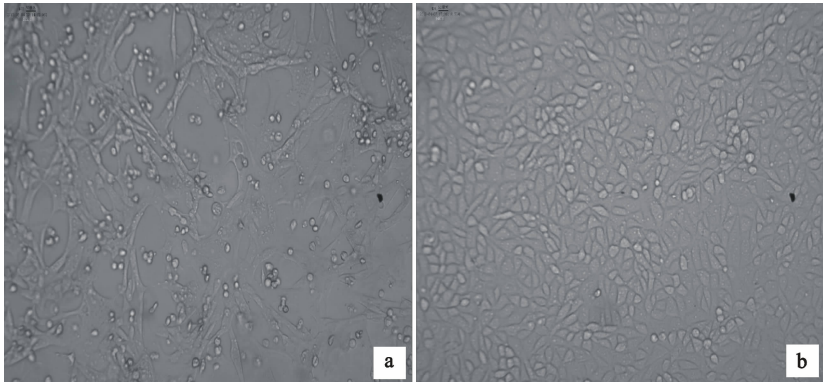
图 2 棘细胞层细胞发生空泡变性、核碎裂、毛细血管丰富(×400)
Fig. 2 Acanthosis, vacuolation, nucleus fragmentation and capillary rich in keratinocytes of the stratum spinosum (×400)

2.3 病毒分离

应用 MDBK 细胞系从患病羔羊唇部痂皮中分离到 1 株 ORFV,将其命名为 ORFV-SXGZ 毒株。该分离株接种前 4 代细胞时的 CPE 不明显,病毒盲传到第 5 代时细胞出现肿胀、变圆、皱缩、聚堆和细胞脱落等现象,病变时间出现在 24 h 左右,且随着病毒传代次数的增加,细胞病变时间越来越规律,病变也越来越明显,最后出现大面积的“拉网状病变”(图 3-a)。对照组细胞呈正常形态(图 3-b)。

2.4 病毒粒子形态学观察结果

经磷钨酸负染后,在电镜下可观察到直径为 200~300 nm 的大量病毒粒子,形态为毛线团样椭圆形,有囊膜,病毒粒子外表面呈 8 字型缠绕(图 4)。



a. 接毒 24 h 后病变的 MDBK 细胞 Cytopathic MDBK cells after affection 24 hours;b. MDBK 对照细胞 MDBK control cells

图 3 接毒 24 h 后病变的 MDBK 细胞和 MDBK 对照细胞(×100)

Fig. 3 Cytopathic MDBK cells after affection 24 hours and MDBK control cells(×100)

2.5 病毒 TCID₅₀ 测定结果

将不同稀释度的 ORFV 接种到 MDBK 细胞中,测定 TCID₅₀。按照 Reed-Muench 法得出 TCID₅₀为 10⁻⁴/0.1 mL。

2.6 病毒理化鉴定结果

ORFV-SXGZ 感染细胞毒液经过 5-IUDR、φ=20% 乙醚、φ=5% 氯仿及 60 ℃ 水浴特殊处理后,病毒的 TCID₅₀分别为 10^{-3.0}、0、0、10^{-3.2}/0.1 mL,与未做任何处理的细胞毒液的 TCID₅₀(10^{-4.4}/0.1 mL)相比较,4 组处理过的细胞毒液的 TCID₅₀均有所降低。

2.7 B2L、FIL、VIR 基因的扩增、克隆

提取 ORFV-SXGZ 分离株中的病毒 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增,分别扩增出大小约为 1 137、1 005、552 bp 的目的片段,与预期结果相一致(图 5)。

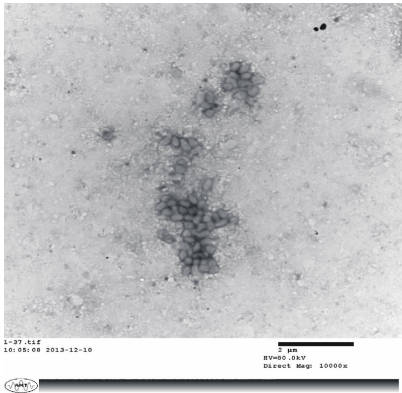
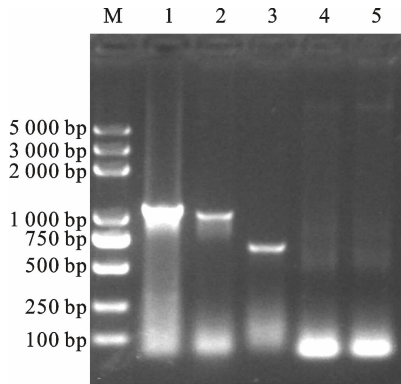


图 4 病毒粒子电镜负染照片

Fig. 4 Electron microscopic examination of the Orf virus

2.8 B2L、FIL 和 VIR 基因遗传进化树

将 ORFV-SXGZ 分离株的 B2L、FIL 和 VIR 基因的测序结果与 Genbank 数据库中已经发表的 ORFV 株相应基因编码序列输入 ClustalX 1.83 进行序列比对。应用分子进化遗传分析软件 MEGA 5.1,采用其中的临近值算法(Neighbor-joining),结合自检分析值 1 000 的方法构建系统进化树(图 6、图 7、图 8)。ORFV-SXGZ 分离株的 B2L、FIL 和 VIR 基因的系统进化树分析结果表明,ORFV-SXGZ-B2L 与 JN565696(新疆分离株)和 HQ694772(甘肃分离株)亲缘关系较近;ORFV-SXGZ-FIL 与 KC291656(新疆分离株)亲缘关系较近;ORFV-SXGZ-VIR 与 EU327507 和 EU935104(台湾分离株)及 JN565697(榆林分离株)亲缘关系较近。



M, DL 2 000 相对分子质量标准 DL 2 000 marker;1. B2L 基因 PCR 扩增产物 PCR products of B2L gene from the cell culture;2. FIL 基因 PCR 扩增产物 PCR products of FIL gene from the cell culture;3. VIR 基因 PCR 扩增产物 PCR products of VIR gene from the cell culture;4. 阴性对照 Negative control;5. ddH₂O 为模板的阴性对照 Negative control ddH₂O as a template

图 5 细胞毒中 B2L、FIL 和 VIR 基因 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR products of B2L, FIL and VIR genes from the cell culture

2.9 B2L、FIL 和 VIR 基因的核苷酸和氨基酸序列分析

选取 GenBank 数据库中发表的国内外 ORFV 分离株的 B2L 基因、FIL 基因和 VIR 基因序列与 ORFV-SXGZ 毒株相应基因进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较分析。分析结果表明 ORFV-SXGZ-B2L 基因与其他 31 个参考株的核苷酸同源性为 96.7%~99.6%,氨基酸序列同源性为 95.3%~99.7%;ORFV-SXGZ-FIL 基因与其他 14 个参考株的核苷酸同源性为 95.8%~97.9%,氨基酸序列同源性为 95.8%~98.2%;ORFV-SXGZ-VIR 基因与其他 26 个参考株的核苷酸同源性为 95.0%~99.3%,氨基酸序列同源性为 95.5%~98.4%。

3 讨论与结论

本研究首先依据发病羊所表现出的嘴部痂皮等典型特征和临床症状,初步猜测病羊所患疾病为羊口疮。为进一步确诊,本研究进行病理组织学检测、病原形态学鉴定、理化性质测定、细胞传代及 PCR 检测等一系列试验。对病料痂皮样品进行病理切片制备及 H. E. 染色后,观察到表皮毛细血管增多、棘细胞层细胞发生空泡变性、细胞核碎裂及破溃组织出血等病理变化,这与 Lyttle 等^[16] 1994 年和 Sovory 等^[17] 2000 年研究的羊口

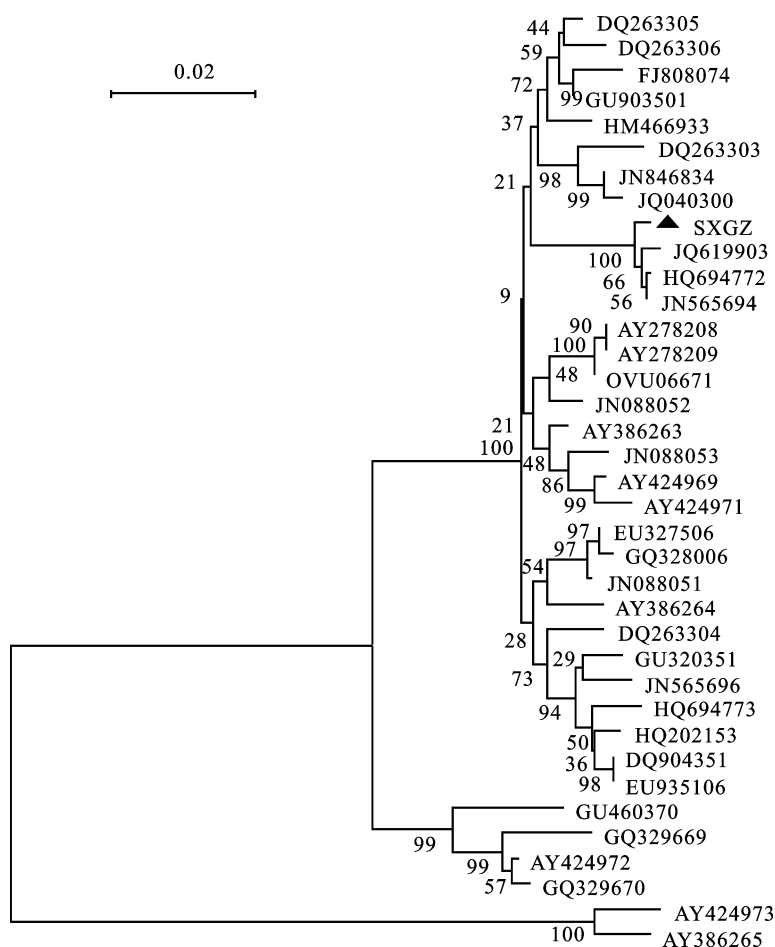


图 6 ORFV-SXGZ 分离株 *B2L* 基因与其他参考毒株的系统进化树分析

Fig. 6 Evolutionary analysis based on the *B2L* of ORFV-SXGZ with other reference strains

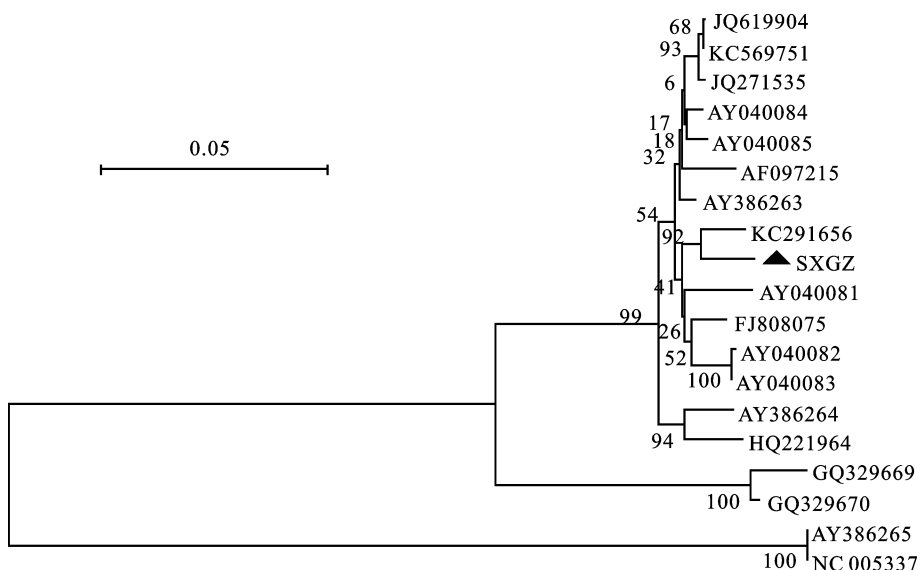


图 7 ORFV-SXGZ 分离株 *FIL* 基因与其他参考毒株的系统进化树分析

Fig. 7 Evolutionary analysis based on the *FIL* of ORFV-SXGZ with other reference strains

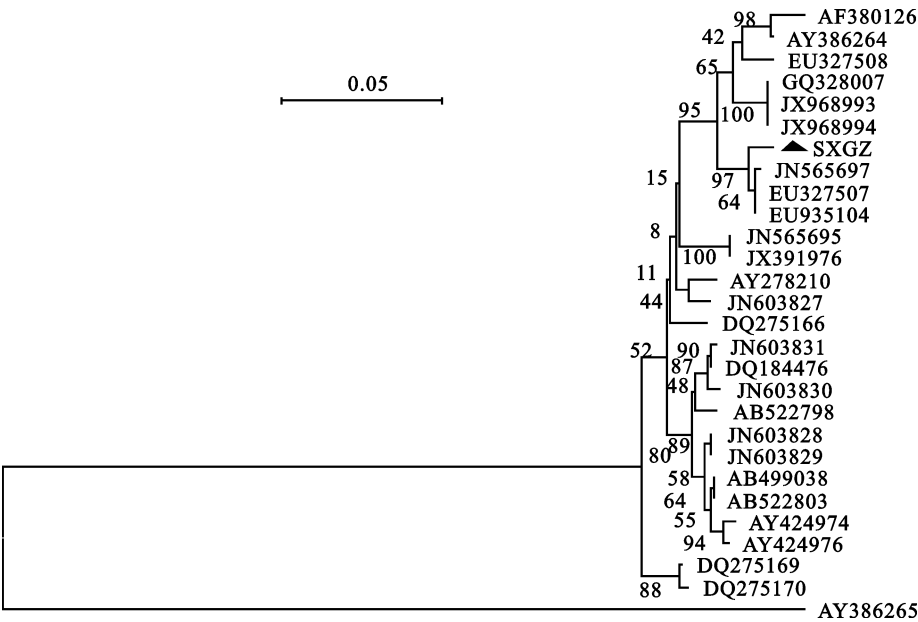


图 8 ORFV-SXGZ 分离株 VIR 基因与其他参考毒株的系统进化树分析

Fig. 8 Evolutionary analysis based on the VIR of ORFV-SXGZ with other reference strains

疮病毒基因组中存在血管内皮生长因子,它可以刺激被感染部位的皮肤表皮细胞和血管不断增殖,皮肤表面可见到丰富的毛细血管和溃烂组织大量溢血等现象相一致。病毒理化特性试验结果表明,该病毒的核酸类型为 DNA 病毒。经 MDBK 细胞接种痄皮毒液,可稳定出现典型的细胞病变,细胞毒经 $\omega=1\%$ 磷钨酸电镜负染后可观察到大量 ORFV 特征病毒粒子,最后成功对分离株病毒液进行特异性基因 PCR 鉴定。因此可知该羊场暴发的疫病是由 ORFV 引起的传染性脓疱病,并成功分离出 1 株羊口疮病毒——ORFV-SXGZ 株。通过测定该分离株的 TCID₅₀,可知该分离株能在体外稳定增殖,毒力稳定。

ORFV 为线性双链 DNA 病毒,基因组大小约为 135 kb,两端为共价闭合发卡结构,基因组中间是中心编码区(ORF 009-111),主要参与病毒的复制、组装和释放;两端(ORF 001-008 和 ORF112-134)为反向末端重复序列,主要与病毒的毒力、宿主嗜性及免疫调节有关。*B2L* 基因、*FIL* 基因及 *VIR* 基因均位于基因组中部,*B2L* 基因为 ORFV 的囊膜蛋白,可刺激机体产生强烈的抗体反应;*FIL* 基因是病毒表面微管成分,在病毒吸附宿主细胞及早期侵染过程中起重要作用,也是刺激机体产生免疫应答的主要抗原蛋白;*VIR* 基因编码双链 RNA 结合蛋白,主要是抑制干扰素的抗病毒活性。将 ORFV-SXGZ 分离株

的 *B2L*、*FIL* 和 *VIR* 基因与 GenBank 数据库中发表的国内外 ORFV 株的同源性进行比较,发现 *B2L*、*FIL* 和 *VIR* 基因高度保守,ORFV-SXGZ-*B2L* 基因的核苷酸同源性为 96.7%~99.6%,氨基酸序列同源性为 95.3%~99.7%;ORFV-SXGZ-*FIL* 基因的核苷酸同源性为 95.8%~97.9%,氨基酸序列同源性为 95.8%~98.2%;ORFV-SXGZ-*VIR* 基因的核苷酸同源性为 95.0%~99.3%,氨基酸序列同源性为 95.5%~98.4%。陕西省位于中国西北部地区,遗传进化树分析结果表明,ORFV-SXGZ 株与新疆、甘肃和榆林等西北地区的 ORFV 流行株亲缘关系最近,这说明本次羊口疮疾病的暴发很可能与以上地区该病的暴发有关。

陕西关中地区目前尚未见 ORFV 感染报道,本研究首次证明了陕西关中地区养殖场存在 ORFV 感染。羊口疮病毒陕西关中分离株的成功分离,不仅丰富陕西地区 ORFV 的流行病学资料,也为国内外关于羊口疮病毒的遗传起源、传播路径和流行规律的研究提供新思路,并为新型疫苗和增强免疫效果的研究奠定了理论基础。

Reference (参考文献):

[1] YIN Zhen (殷 震), LIU Jinghua (刘景花). Animal Virology(动物病毒学)[M]. Beijing: Science Press, 1997 (in Chinese).

[2] LU Chengping (陆承平). Veterinary Microbiology (兽医微

- 生物学[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007 (in Chinese).
- [3] ZHANG Hairui (张海瑞). Isolation and identification of orf virus strain and establishment of ELISA method [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (中国农业科学院), 2011 (in Chinese with English abstract).
- [4] HUANG Yinxian (黄引贤), LI Naijin (李乃津). The preliminary research on certain features of orf virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine (中国兽医杂志), 1986, 12(4): 2-5 (in Chinese with English abstract).
- [5] Sullivan J T, Mercer A A, Fleming S B, *et al.* Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K [J]. Virology, 1994, 202(2): 968-973.
- [6] McGuire M J, Johnston S A, Sykes K F. Novel immunomodulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (*Orf virus*) genome [J]. Proteome Science, 2012, 10(1): 4.
- [7] Delhon G, Tulman E R, Afonso C L, *et al.* Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus [J]. Journal of Virology, 2004, 78(1): 168-177.
- [8] Heine H G, Stevens M P, Foord A J, *et al.* A capripox detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia *H3L* gene [J]. Journal of Immunological Methods, 1999, 227(1-2): 187-196.
- [9] Buddle B M, Dellers R W, Schurig G G. Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates [J]. American Journal of Veterinary Research, 1984, 32(45): 75-79.
- [10] Czerny C P, Waldmann R, Scheubeck T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxvirus [J]. Archives of Virology, 1997, 142(4): 807-821.
- [11] Scagliarini A, Gallina L, Pozzo F D, *et al.* Heparin binding activity of orf virus F1L protein [J]. Virus Research, 2004, 105(2): 107-112.
- [12] Haig D M, McInnes C J, Thomson J, *et al.* The orf virus gene *OV20. 0L* gene product is involved in interferon resistance and inhibits interferon-inducible double-stranded RNA-dependent kinase [J]. Immunology, 1988, 98(3): 335-340.
- [13] Kottaridi C, Nomikou K, Teodori L, *et al.* Phylogenetic correlation of Greek and Italian orf virus isolates based on *VIR* gene [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 116(4): 310-316.
- [14] McInnes C J, Wood A R, Mercer A. Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon resistance gene *E3L* [J]. Virus Genes 1998, 17(2): 107-115.
- [15] REN Chenglin (任成林), ZHANG Yu (张煜), CUI Hongyu (崔红玉). Rapid animal tissue piece dyeing paraffin embedding production method [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine (中国兽医杂志), 2004, 40(6): 26 (in Chinese with English abstract).
- [16] Lyttle D J, Fraser K M, Fleming S B, *et al.* Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus [J]. Journal of Virology, 1994, 68(1): 84-92 (in Chinese with English abstract).
- [17] Savory L J, Stacker S A, Fleming S B, *et al.* Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection [J]. Journal of Virology, 2000, 74(22): 10699-10706.