

甘辉群, 王永娟, 吴双, 等. 基于 Sf9 细胞培养表达鸭短喙侏儒综合征病毒 VP2 蛋白的工艺优化 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 87-92.
GAN H Q, WANG Y J, WU S, et al. Process optimization for the expression of duck short beak and dwarfism syndrome virus VP2 protein based on Sf9 cell culture [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 87-92.

基于 Sf9 细胞培养表达鸭短喙侏儒综合征病毒 VP2 蛋白的工艺优化

甘辉群, 王永娟, 吴双, 傅宏庆, 谭菊, 刘明生*

(江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 旨在获得高表达的鸭短喙侏儒综合征病毒 VP2 抗原蛋白。本试验通过对接毒与表达工艺中 pH 值、Sf9 细胞密度、接毒量、收获时间、搅拌转速和溶氧值等参数进行优化, 考察 VP2 重组杆状病毒的增殖情况, 收获病毒液, 测定病毒含量变化; 同时, 对培养物进行 VP2 蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 并采用 SDS-PAGE 灰度扫描测定蛋白含量。结果: 在 pH 值维持 6.8~7.2, 接毒密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/mL, 感染复数 (MOI) 值为 0.01~0.1, 收获时间为接种后 5~7 d, 转速 100~140 r/min, 溶氧度控制在 40%~80% 时, 重组杆状病毒生长较好, 含量较高, 达 $10^{7.7} \sim 10^{8.5}$ TCID₅₀/mL; 均出现约 65 kDa 目的条带, 蛋白表达量基本一致, 达 57 μg/mL 以上。根据优化的工艺参数在 5 L 反应器进行 5 批抗原生产验证, VP2 蛋白表达量达 58~63 μg/mL, 蛋白生产稳定, 表达量高。

关键词: 鸭短喙侏儒综合征; 重组杆状病毒; Sf9 细胞; 接毒工艺; 表达生产工艺

中图分类号: S852 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)09-0087-06

Process optimization for the expression of duck short beak and dwarfism syndrome virus VP2 protein based on Sf9 cell culture

GAN Huiqun, WANG Yongjuan, WU Shuang, FU Hongqing, TAN Ju, LIU Mingsheng*

(Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: In order to obtain highly expressed VP2 antigen protein of duck short beak dwarfism syndrome virus, the PH value, Sf9 cell density, multiplicity of infection (MOI), harvest time, stirring speed and dissolved oxygen value were optimized in the vaccine poisoning and expression process. The proliferation of the recombinant baculovirus rBac-JS01 VP2 strain was investigated, and the virus was harvested. The change of virus content was determined. At the same time, the cultures were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis of VP2 protein, and the protein content was determined by gray scale scanning of SDS-PAGE. The test results showed that the recombinant baculovirus rBac-JS01 VP2 strain was maintained at pH 6.8-7.2, exposure density $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/mL, MOI 0.01-0.1, harvest time 5-7 days after inoculation, rotational speed 100-140 r/min, and dissolved oxygen concentration controlled at 40%-80%. The virus grew well with a high content of $10^{7.7} \sim 10^{8.5}$ TCID₅₀/mL. The target band of about 65 kDa appeared in both groups, and the protein expression levels were basically consistent, reaching over 57 μg/mL. According to the optimized process parameters, 5 batches of antigen production were validated in a 5 L reactor, and the expression level of VP2 protein reached 58-63 μg/mL. The protein production was stable and the expression level was high.

Keywords: duck short beak dwarfism syndrome; recombinant baculovirus; Sf9 cells; poisoning process; express production process

鸭短喙侏儒综合征 (short beak and dwarfism syndrome, SBDS) 又称“鸭大舌病”, 由新型小鹅瘟病毒 (novel goose parvovirus, NGPV) 感染引起的危害

多品种鸭的一种病毒性传染病, 临床症状以生长发育受阻、跛行瘫痪、上下喙萎缩及舌头外露为主要特点, 发病率 10%~100% 不等, 死亡率低于 10%, 但僵鸭或残鸭率高达 20%~80%, 对我国的养鸭业造成了巨大的经济损失^[1]。

昆虫细胞杆状病毒表达系统是一种广泛使用的蛋白表达系统, 常用的昆虫细胞株有草地贪夜蛾卵巢细胞系 Sf21、Sf9 和粉纹夜蛾胚胎细胞系 BT1-Tn5B1-4 等^[2], 是 20 世纪 80 年代发展起来的新型表达载体

收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2025-06-28

基金项目: 江苏农牧科技职业学院畜禽产业核心技术创新项目 (NSF2021ZR02); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (21KJA230001)

第一作者: 甘辉群, 女, 硕士, 副教授

* 通信作者: 刘明生, 博士, 教授, 主要从事临床兽医学研究,

E-mail: 4624689@qq.com。

系统。相比贴壁依附型的哺乳动物细胞,昆虫细胞可直接进行悬浮培养^[3],而且重组杆状病毒只能感染昆虫宿主,对人、畜及农作物均无危害,昆虫细胞也不能被人类病原体所感染,降低了表达的外源蛋白被污染的风险,安全性佳^[4],成为疫苗研究中较为理想的表达系统。据报道,利用重组杆状病毒感染高密度的 Sf9 细胞可获得高水平的外源蛋白表达^[5]。昆虫细胞杆状病毒表达系统常应用于人类致病性微生物疫苗的研究,如肝炎病毒^[6-8]、诺如病毒^[9]、流感病毒^[10]和乙型肝炎病毒^[11]疫苗等,也广泛应用于动物病毒疫苗的研究,如猪瘟病毒^[12]、猪流行性腹泻病毒^[13]、猪圆环病毒^[14]、犬细小病毒^[15]疫苗等。

本实验室已于 2018 年从发病樱桃谷肉鸭分离到 1 株 NGPV (JS01 株)^[16],并在此变异毒株的基础上,利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,获得了 VP2 重组杆状病毒 rBac-JS01 VP2 株。为了获得高表达的鸭短喙侏儒综合征病毒 VP2 抗原蛋白,本试验将 pH 值、Sf9 细胞密度、接毒量、收获时间、搅拌转速和溶氧 (dissolved oxygen, DO) 值进行参数优化,收获了稳定的 VP2 蛋白培养物,为批量生产 SBDS 亚单位疫苗,防控 SBDS 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂和仪器

Sf9 细胞由北京维牧康动保生物科技有限公司鉴定、保管和供应。重组杆状病毒 rBac-JS01 VP2 株 (P4 代) 由北京维牧康动保生物科技有限公司构建、鉴定、保管和供应。SBDS 病毒阳性血清由北京维牧康动保生物科技有限公司制备、检验和提供。悬浮培养基 IB905,购自壹生科 (深圳) 有限公司。台盼蓝染色剂购自 Sigma 公司。

光学生物显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司,5 L 生物反应器购自天信和 (苏州) 生物科技有限公司,智能细胞分析仪 Countstar 购自上海睿钰生物科技有限公司。

1.2 摇瓶细胞的制备

从液氮中复苏冻存的 Sf9 细胞,用吸管将细胞液加入到 125 mL 三角瓶中,加入 IB905 无血清培养基至 20 mL,调整初始密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 个/mL。将摇瓶置于摇床内,27 ℃,100~140 r/min 进行培养,培养 72~96 h 后,可进行传代,传代初始密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 个/mL。待细胞数量足够时,可接种反应器培养。

1.3 5 L 反应器细胞培养

取经摇瓶培养的悬浮 Sf9 细胞,以 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 个/mL 左右的密度接种到 5 L 反应器培养,

培养体积为 2.5 L,转速 100~140 r/min、温度 27 ℃、溶氧 40%~60%、pH 值不控,每隔 24 h 取样,观察细胞生长情况,同时进行细胞计数,根据细胞密度,适时补加细胞培养液。待细胞增殖密度达到 5.0×10^6 个/mL 以上时,进行发酵罐接毒工艺研究。

1.4 发酵液 pH 值优化试验

分别在 5 个发酵罐中加入一定量的细胞,培养初始 pH 值分别调为 6.5、6.8、7.0、7.2 和 7.6,用无血清培养基稀释,使细胞密度为 1.0×10^6 个/mL,分别接种 rBac-JS01 VP2 株病毒,感染复数 (MOI) 值为 0.1。定时取样观察,当悬液细胞出现细胞死亡、崩解、破碎,活率小于 30% 时停止培养,收获培养物,取样进行半数组织培养感染量 (TCID₅₀) 测定;同时,对收获培养物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,并采用 SDS-PAGE 灰度扫描测定 VP2 蛋白含量。以上试验重复 3 次,每次每种 pH 值取 3 个样品进行检测,根据试验结果确定最佳发酵液 pH 值。生物反应器的控制参数分别设为:DO 值 40%,温度为 27 ℃,搅拌速度为 120 r/min。

1.5 接毒细胞密度优化试验

分别在 4 个发酵罐中加入一定量的细胞,用无血清培养基稀释,使得细胞密度分别为 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 2.0×10^6 和 3.0×10^6 个/mL,分别接种 rBac-JS01 VP2 株病毒,MOI 值为 0.1。定时取样观察,当悬液细胞出现细胞死亡、崩解、破碎,活率小于 30% 时停止培养,收获培养物,取样进行 TCID₅₀ 测定;同时,对收获培养物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,并采用 SDS-PAGE 灰度扫描测定 VP2 蛋白含量。以上试验重复 3 次,每次每种细胞密度取 3 个样品进行检测,根据试验结果确定最佳接种的细胞密度。生物反应器的控制参数分别设为:DO 值 40%,温度为 27 ℃,搅拌速度为 120 r/min,pH 值 6.8~7.2。

1.6 接毒量优化试验

分别在 6 个发酵罐中加入一定量的细胞,用无血清培养基稀释,细胞密度为 1.5 确定的最佳接种的细胞密度。按 MOI 值 0.001、0.01、0.1、1.0 和 2.0 接入病毒液,定时取样观察,当悬液细胞出现细胞死亡、崩解、破碎,活率小于 30% 时停止培养,收获培养物,取样进行 TCID₅₀ 测定;同时,对收获培养物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,并采用 SDS-PAGE 灰度扫描测定 VP2 蛋白含量。以上试验重复 3 次,每次每种接毒量取 3 个样品进行检测,根据试验结果确定最佳接毒量。生物反应器的控制参数分别设为:DO 值 40%,温度为 27 ℃,搅拌速度为 120 r/min,pH 值 6.8~7.2。

1.7 最佳收获时间优化试验

分别在3个发酵罐中加入一定量的细胞，用无血清培养基稀释，细胞密度为 1.5×10^6 确定的最佳接种的细胞密度，接毒量为1.6确定的最佳接毒量。培养过程中分别于2、3、4、5、6、7、8 d取样观察和TCID₅₀测定；同时，对收获培养物进行SDS-PAGE和Western blot分析，并采用SDS-PAGE灰度扫描测定VP2蛋白含量。以上试验重复3次，每次每个收获时间取3个样品进行检测，根据检测结果确定最佳收获时间。生物反应器的控制参数分别设为：DO值40%，温度为27℃，搅拌速度为120 r/min，pH值6.8~7.2。

1.8 搅拌转速优化试验

分别在5个发酵罐中加入一定量的细胞，制备细胞，调整细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/mL，以MOI为0.05接种病毒，搅拌速度分别为80、100、120、140和160 r/min。定时取样观察，当悬液细胞出现细胞死亡、崩解、破碎，活率小于30%时停止培养，收获培养物，取样进行TCID₅₀测定；同时，对收获培养物进行SDS-PAGE和Western blot分析，并采用SDS-PAGE灰度扫描测定VP2蛋白含量。以上试验重复3次，每次每种转速条件下取3个样品进行检测，根据试验结果确定搅拌转速。生物反应器的控制参数分别设为：DO值40%，温度为27℃，pH值6.8~7.2。

1.9 DO值优化试验

分别在4个发酵罐中加入一定量的细胞，按1.9制备细胞，调整细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/mL，以MOI为0.05接种病毒，DO值分别为20%、40%、60%、80%。定时取样观察，当悬液细胞出现细胞死亡、崩解、破碎，活率小于30%时停止培养，收获培养物，取样进行TCID₅₀测定；同时，对收获培养物进行SDS-PAGE和Western blot分析，并采用SDS-PAGE灰度扫描测定VP2蛋白含量。以上试验重复3次，每次每个溶氧值取3个样品进行检测，根据试验结果确定DO值。生物反应器的控制参数分别设为：温度为27℃，搅拌速度为120 r/min，pH值6.8~7.2。

1.10 工艺验证

按照上述确定的rBac-JS01 VP2株工艺参数在5L反应器进行培养及蛋白抗原检测，设pH值在6.8~7.2，MOI值为0.01~0.1，DO值为40%~60%，搅拌速度为100~140 r/min，培养5~7 d，温度为27℃。收获病毒液，检测病毒含量，同时，SDS-PAGE检测VP2蛋白表达，通过SDS-PAGE灰度扫描测定VP2蛋白含量，评价工艺放大效果及其稳

定性。

1.11 病毒含量测定

在无菌离心管中将病毒液作连续10倍的稀释，从 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ ，即 10^{-1} 稀释为100 μL病毒液加入900 μL细胞悬液。将稀释好的病毒接种到96孔微量培养板中，每一稀释度接种一纵排共8孔，每孔接种100 μL。在每孔加入细胞悬液100 μL，使细胞量达到 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL。设正常细胞对照，正常细胞对照也作两纵排（100 μL病毒液+100 μL细胞悬液）。逐日观察并记录结果，观察5 d。按Reed-Muench两氏法，计算病毒含量（TCID₅₀/mL）。

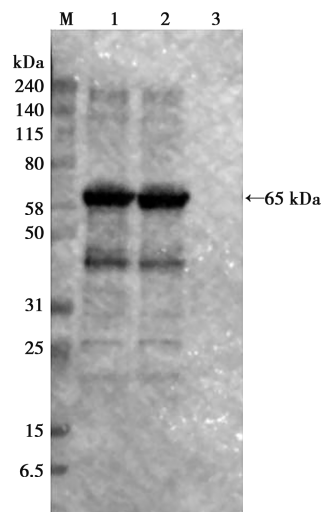
1.12 VP2蛋白含量测定

使用图像分析软件（如Image J）对SDS-PAGE凝胶上的蛋白质条带进行灰度扫描，测量其灰度值。通过测量一系列已知浓度的蛋白标准品的灰度值和浓度，建立蛋白浓度与灰度值之间的关系曲线。通过灰度扫描得到的数值代入标准曲线，计算其浓度。

2 结果与分析

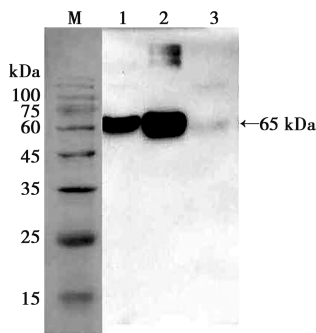
2.1 发酵液pH值优化

病毒接种后细胞产生病变时间主要在5~7 d，病毒的TCID₅₀计算结果显示，pH值在6.8~7.2时对病毒含量没有太大影响，所得的病毒含量较高，达 $10^{7.9} \sim 10^{8.1}$ TCID₅₀/mL，而pH值过高和过低均达不到良好效果；对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定，结果显示不同pH值均出现约65 kDa目的条带（图1和图2），以pH值在6.8~7.2时，VP2蛋白表达量最高，达58~61 μg/mL（图3）。故将rBac-JS01 VP2株病毒生长的pH值确定为6.8~7.2。



M. 蛋白分子量标记物；1. 细胞培养上清液；2. 阳性对照；3. 阴性对照。

图1 重组表达蛋白SDS-PAGE鉴定



M. 预染蛋白分子量标记物；1. 细胞培养上清液；2. 阳性对照；3. 阴性对照。

图2 重组表达蛋白 Western blot 鉴定

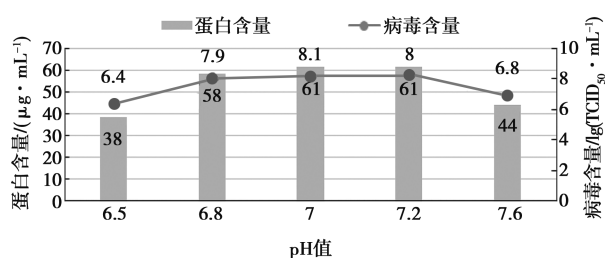


图3 不同 pH 值接种培养情况

2.2 细胞密度优化

由图4可知,在接毒量相同的条件下,病毒含量达到 $10^{6.9}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 以上,细胞密度在 $1.0\times 10^6\sim 2.0\times 10^6$ 个/ mL 接种培养,病毒含量稍高,达 $10^{8.3}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定,结果显示,不同细胞密度接种均出现目标蛋白表达,以 $1.0\times 10^6\sim 2.0\times 10^6$ 个/ mL 细胞密度接种后,VP2蛋白表达量较其他组高,为 $58\sim 67\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

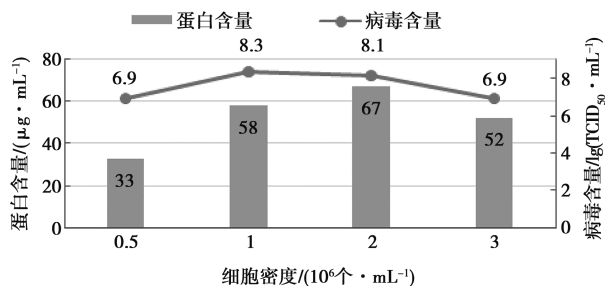


图4 不同细胞密度接种培养情况

2.3 接毒量优化

不同接毒量接种后病毒产生病变时间主要在5~7日。接种细胞密度相同的条件下,MOI值为0.01~

0.1,病毒含量最高,达 $10^{7.8}\sim 10^{8.2}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$;对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定,结果显示,以MOI为0.01~0.1接种病毒,VP2蛋白表达量平均在 $57\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。结果见图5。

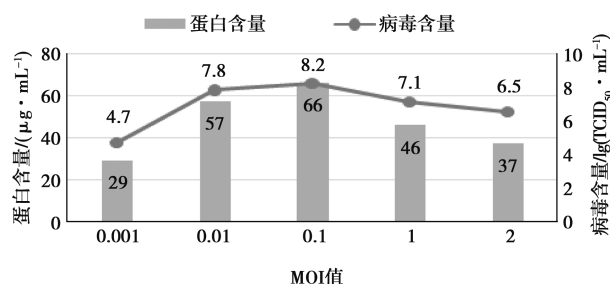


图5 不同 MOI 接种培养情况

2.4 最佳收获时间优化

由图6可知,收获时间在2~4d时,病毒含量低于 $10^{7.6}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$;收获时间在5~7d时,病毒含量均高于 $10^{7.6}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$;收获时间在8日时,病毒含量也低于 $10^{7.6}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$;随着培养时间的延长,病毒含量呈下降趋势。对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定,结果显示,接种病毒后培养5~7d,VP2蛋白表达量基本一致,均 $\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$,第7天最高。根据以上结果,确定rBac-JS01 VP2株病毒培养的最佳收获时间为5~7d。

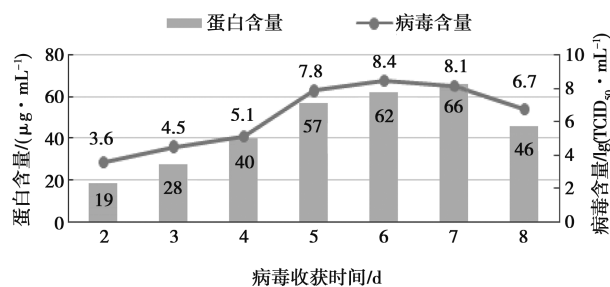


图6 不同收获时间接种情况

2.5 搅拌转速优化

由图7可知,接种细胞密度相同的条件下,搅拌转速为100~140r/min,病毒含量较高,达 $10^{7.9}\sim 10^{8.4}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$;病毒接种后以不同转速培养,对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定,显示100~160r/min时,VP2蛋白表达量基本一致,达 $61\sim 64\mu\text{g}/\text{mL}$;80r/min培养后,VP2蛋白表达量较低。

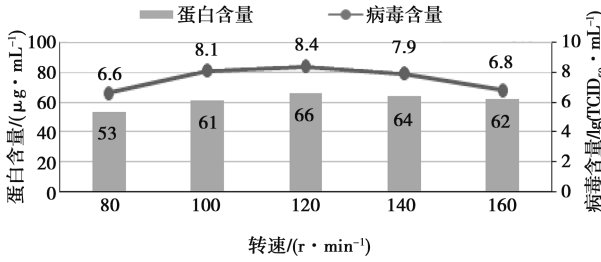


图7 不同转速接毒培养情况

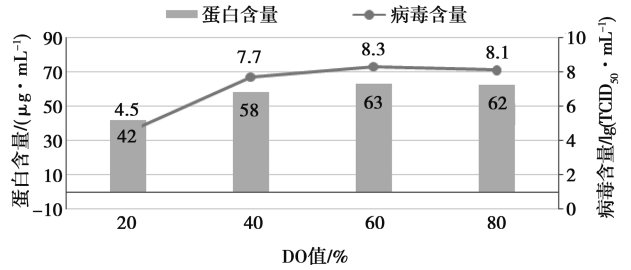


图8 不同DO值接毒培养情况

2.6 DO 值优化

由图8可知,接种细胞密度相同的条件下,DO值为40%~80%,病毒含量较高,达 $10^{7.7} \sim 10^{8.3}$ TCID₅₀/mL;病毒接种后以不同DO值培养,对培养物进行VP2蛋白SDS-PAGE和Western blot分析及蛋白含量测定,结果显示,DO值为40%、60%和80%组,VP2蛋白表达量基本一致,达58~63 μg/mL;DO值为20%培养后,VP2蛋白表达量较低。

2.7 工艺验证

按照优化的条件,pH值6.8~7.2,DO值为40%~60%,温度为27℃,搅拌速度为100~140 r/min,接种量MOI为0.01~0.1,细胞密度 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/mL,收样时间5~7 d,进行5批抗原蛋白的生产。结果显示,5批抗原产量稳定,病毒含量为 $10^{7.9} \sim 10^{8.5}$ TCID₅₀/mL,VP2蛋白可以达到58~63 μg/mL,满足生产需求,结果见表1和图9。

表1 5批工艺验证试验结果

批次	pH值	细胞密度/ ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	MOI	转速/ (r·min ⁻¹)	DO值/%	收获时间/d	病毒含量/ lg (TCID ₅₀ ·mL ⁻¹)	蛋白含量/ (μg·mL ⁻¹)
1	6.8	2.0	0.05	120	40	7	8.4	61
2	7.0	1.0	0.01	100	80	5	7.9	58
3	7.2	1.5	0.1	140	60	6	8.5	63
4	7.0	2.0	0.1	120	40	7	8.3	62
5	6.8	1.0	0.01	100	60	5	8.1	61

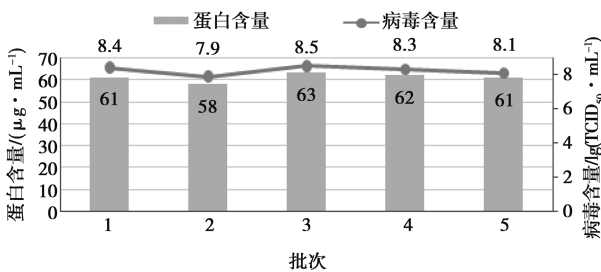


图9 5批工艺验证试验结果

3 讨论

在疫苗蛋白制备过程中,培养细胞的密度、不同的pH值、接毒量MOI、收获时间、搅拌转速和溶氧值等指标对于获得高质量、高产量的疫苗蛋白至关重要。培养环境pH值对细胞的生长、代谢和病毒的增殖有重要影响,合适的pH值范围能为细胞和病毒提供适宜的环境,促进疫苗的有效生产;培养细胞的密度过高可能导致营养竞争激烈、代谢废物积累过多,如氨、乳酸等,影响细胞健康和病毒增殖^[17],而密

度过低则可能无法充分利用培养体系,降低疫苗的产量。接毒量MOI过少可能导致病毒增殖不充分,疫苗产量受限,而接毒量过多可能对细胞造成过度负担,甚至导致细胞病变死亡过快,降低病毒产量^[18]。收获时间过早,病毒可能尚未充分增殖,疫苗效价不足,而收获过晚,细胞可能已经开始衰老或死亡,病毒也可能出现变异等问题,同样会影响疫苗质量和效果。盛程程等^[19]采用控制变量法对水貂犬瘟热疫苗株(CVD3-CL株)在生物反应器中微载体悬浮培养的相关参数,如温度、MOI及收毒时间进行优化,发现在5g微载体、1L培养体系中,温度设定为33℃,MOI为0.03时更有利于病毒的复制增殖,病毒滴度可在接毒后108h达峰值。适当的搅拌转速有助于均匀分布营养物质和氧气,促进细胞生长和病毒增殖。转速过高可能对细胞造成机械损伤,转速过低则可能导致局部环境不均。培养基中的DO值是影响昆虫细胞生长以及外源蛋白表达的关键性因素^[17],溶氧不足会抑制细胞和病毒活性,而过高的溶氧值也

可能产生氧化应激等不良影响,需要精确控制以保障疫苗生产。赵立民等^[21]在培养温度为 28 ℃,细胞接种密度 1.0×10^5 个/mL, pH = 6.2, 转速 50 r/min, DO 值为 50% 条件下,细胞生长状态良好。

本试验通过对重组杆状病毒 rBac-JS01 VP2 株在 Sf9 细胞的 pH 值、Sf9 细胞密度、不同 MOI 接种病毒、不同转速、收获时间和溶氧值等参数进行优化,确定了细胞生物反应器病毒培养的优化生产工艺: pH 维持在 6.8~7.2, 接毒密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/mL, MOI 值为 0.01~0.1, 收获时间为接种后 5~7 d, 搅拌转速 100~140 r/min, 溶氧度控制在 40%~80%, 温度为 27 ℃, 该悬浮培养条件下病毒含量较高, VP2 蛋白的生产稳定, 产量达 50 μg/mL 以上, 为批量生产 SBDS 亚单位疫苗, 防控 SBDS 提供可靠的数据支撑。

参考文献:

- [1] 刘明生, 甘辉群, 吴双, 等. 新型鹅细小病毒病研究进展 [J]. 现代畜牧兽医, 2022 (2): 75-79.
- [2] MARTÍNEZ-SOLÍS M, HERRERO S, TARGOVNIK A M. Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103 (1): 113-123.
- [3] 李伟, 秦红刚, 张萍, 等. Sf9 昆虫细胞悬浮培养工艺研究 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46 (8): 39-42.
- [4] HU Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (4): 405-416.
- [5] CHIOU T W, HSIEH Y C, HO C S. High density culture of insect cells using rational medium design and feeding strategy [J]. Bioprocess Eng, 2000, 22 (6): 483-491.
- [6] 王晓艳, 陈娜子, 艾君, 等. HBV pre-c-Fc 融合蛋白在杆状病毒表达系统中的表达及其生物学活性研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35 (4): 42-47.
- [7] 王金霞, 李雯, 张云智. 戊型肝炎病原学及流行病学研究进展 [J]. 中国热带医学, 2018, 18 (3): 277-281.
- [8] BELZHELARSKAIA S N, KOROLEVA N N, POPENKO V V, et al. Characterization of hepatitis C virus structural proteins and HCV-like particles produced in recombinant baculovirus infected insect cells [J]. Mol Biol (Mosk), 2010, 44 (1): 107-119.
- [9] ATMAR R L, BERNSTEIN D I, HARRO C D, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness [J]. N Engl J Med, 2011, 365 (23): 2178-2187.
- [10] 张民秀, 谢芝勋, 黄莉, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因在昆虫细胞中的表达 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (3): 859-864.
- [11] 刘微, 罗晓华, 陈文婧, 等. HSV-2 糖蛋白 D 在昆虫-杆状病毒表达系统中的表达及免疫原性分析 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2017, 43 (4): 720-724.
- [12] 范学政, 徐璐, 赵启祖, 等. 猪痘兔化弱毒 E2 基因重组杆状病毒的构建及抗体制备 [J]. 中国兽药杂志, 2015, 49 (1): 6-9.
- [13] 郝建伟, 薛春宜, 曹永长. 应用杆状病毒表达系统有效表达 PEDV 纤突蛋白 [J]. 山西农业科学, 2022, 50 (5): 714-719.
- [14] 张超, 安家慧, 于栋, 等. 猪圆环病毒 3 型 Cap 蛋白的表达与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (6): 85-90.
- [15] 李昫真, 代昕宇, 李双双, 等. 犬细小病毒颗粒疫苗的研制与免疫效果评价 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53 (12): 1516-1522.
- [16] 傅宏庆, 姚志兰, 王永娟, 等. 鸭短喙型小鹅瘟病毒 SBDS-GPV JS01 株的分离鉴定及其对雏鸭致病性的研究 [J]. 中国兽医科学, 2020, 50 (10): 1286-1293.
- [17] 赵佼, 谭文松, 周燕, 等. 昆虫细胞 (sf21) 悬浮培养过程中生长限制性基质间歇补加技术的应用 [J]. 生物工程学报, 2000, 16 (3): 367-362.
- [18] FTENSING T. Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors [J]. Biotechnol J, 2015, 10 (5): 681-689.
- [19] 盛程程, 黄东东, 李文娟, 等. 应用生物反应器悬浮培养水貂犬瘟热疫苗株工艺的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33 (2): 194-196.
- [20] GOTOH T, CHIBA K, KIKUCHI K I. Oxygen consumption profiles of Sf9 insect cells and their culture at low temperature to circumvent oxygen starvation [J]. Biochem Eng J, 2004, 17 (2): 71-78.
- [21] 赵立民, 蒋天华, 罗乃杰. 应用激流式生物反应器大规模悬浮培养昆虫细胞 (sf9) 的工艺研究 [J]. 山东畜牧兽医, 2012, 33 (8): 12-13.