

昆虫细胞系的培养和建立技术

张 寰¹, 张永安², 秦启联^{1,*}, 王玉珠², 曲良建², 李 瑄¹,
苗 麟¹, 殷珍仙¹, 张爱君¹, 温发园²

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护重点实验室, 北京 100091)

摘要: 迄今已经报道的昆虫细胞系有 800 株以上。昆虫细胞系在昆虫病理学、寄生虫学、内分泌学、遗传学和分子生物学等基础和应用研究中得到越来越广泛的应用。本文结合我们研究的结果和实践经验, 概括了国内外昆虫细胞系建立技术的研究进展, 包括昆虫细胞培养的发展、昆虫细胞系建立技术、不同昆虫组织来源细胞系的建立方法和过程, 以及对昆虫细胞系特征的鉴定等方面。

关键词: 昆虫; 细胞培养; 细胞系; 建立技术

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)08-0834-06

Advances in establishment of insect cell lines

ZHANG Huan¹, ZHANG Yong-An², QIN Qi-Lian^{1,*}, WANG Yu-Zhu², QU Liang-Jian², LI Xuan¹, MIAO Lin¹, YIN Zhen-Xian¹, ZHANG Ai-Jun¹, WEN Fa-Yuan² (1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: More than 800 insect cell lines have been reported by now. Insect cell lines have become useful tools with a variety of applications in such research fields as insect pathology, parasitology, endocrinology, genetics, molecular biology, etc. This paper reviews the progresses in the technique of establishing insect cell lines in combination with our results and experiences gained in recent years, which include development of insect culture, establishment of insect cell lines, initiation of a cell line from different tissues, characterization and identification of new insect cell line.

Key words: Insect; cell culture; cell line; establishment

昆虫细胞系是很多生物学领域中非常重要的研究工具。双翅目昆虫的细胞系, 如蚊虫细胞系主要用来研究虫媒病毒、寄生虫等动物和人体的病原体, 果蝇细胞系主要用于遗传学、发育生物学的研究; 同翅目的叶蝉细胞系用来研究叶蝉传播的植物病毒病的病原; 鳞翅目昆虫细胞系应用最为广泛, 主要用于研究昆虫杆状病毒、微孢子等昆虫专性寄生物的侵染机制及其分子生物学, 还被应用于大规模生产重组病毒杀虫剂, 构建昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统, 表达具有研究或商品价值的外源蛋白质等。为了满足相关学科研究和发

展等多方面的需求, 人们一直在不断地开拓并加强新的昆虫细胞系建立和

研究工作。近年来, 国外已经有很多关于杆状病毒表达载体系统、昆虫细胞系建立及培养方法等方面的介绍和专著(Hink and Hall, 1989; Lynn, 1989, 2001, 2002; Mitsuhashi, 2002; Sudeep *et al.*, 2005); 国内也有许多关于昆虫细胞培养以及杆状病毒表达载体系统方面的综述(Maramorosch, 1992; 河原畑勇, 1993; 曾传海和任中原, 1995; 李兵和沈卫德, 2002; 宋德伟等, 2004), 但是有关昆虫细胞系建立方面的介绍却很少。结合我们研究工作中的经验和体会, 就昆虫细

基金项目: 国家“948”项目(2005-4-30); 科技部农业科技成果转化资金项目(04EFN216700334)

作者简介: 张寰, 女, 助理研究员, 研究方向为昆虫病毒学与昆虫细胞工程, E-mail: zhanghuan@ioz.ac.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 010-64807056; E-mail: qinql@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2007-02-15; 接受日期 Accepted: 2007-05-11

胞系建立的方法、细胞系的特征和鉴定等研究现状及存在的问题,作一综合性的概述。

1 历史回顾

20 世纪初,许多昆虫学家尝试过使用体外培养的昆虫细胞作为科学研究的工具。最早进行昆虫组织体外培养的是 Richard Goldschmied(1915),他使用惜比古天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 的精子进行体外培养,用来观察精子的发育(Goldschmidt and Kaiser, 1915)。首次成功建立连续培养的昆虫细胞系的是 Grace,于 1961 年建立了桉蚕蛾 *Anteraea eucalypti* 卵巢细胞系(Grace, 1962)。从此,昆虫细胞系的建立工作在世界范围内广泛展开,新建立的细胞系(株)不断出现。

到目前为止,全世界建立的昆虫细胞系有 800 株以上,分别来源于鳞翅目、双翅目、鞘翅目、蜚蠊目、膜翅目、直翅目、同翅目和半翅目等 8 个目的 170 多种昆虫,然而其中大部分来自鳞翅目和双翅目,来源于其他目的昆虫细胞系仅占 1/10 左右(图 1,个人统计)。由于草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 细胞株 Sf 9 和 Sf 21,以及粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 细胞株 Tn5B1-4(商品名 High Five)对模式病毒苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus(AcMNPV)非常敏感,因而成为各实验室普遍采用的细胞系(Granados *et al.*, 1994)。

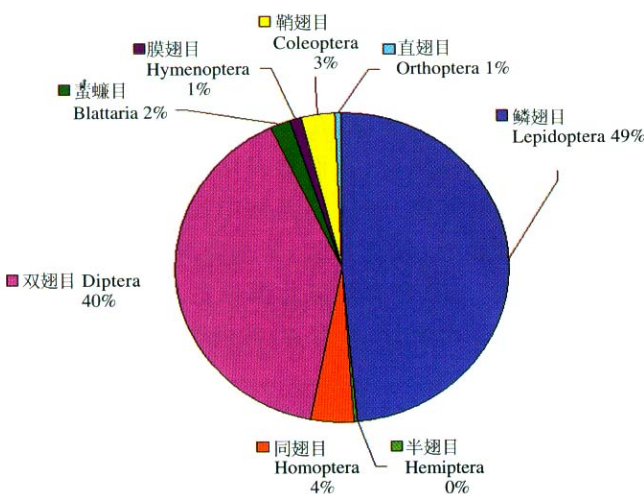


图 1 已经建立的昆虫细胞系来源于 8 个目的昆虫

Fig. 1 Established insect cell lines from eight insect orders

在我国,1958 年高尚荫首次尝试体外培养家蚕 *Bombyx mori* 血细胞,并用之进行家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的感染实验(Gaw *et al.*, 1959)。随后,

有近 50 株昆虫细胞系由国内的研究者建立并公开报道,分别分布于鳞翅目和双翅目昆虫中(个人统计)。最近,我们实验室建立了 5 株甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫脂肪体细胞系(Zhang *et al.*, 2006a; 张寰, 2006)和 1 株棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)幼虫脂肪体细胞系(Zhang *et al.*, 2006b),丰富了昆虫细胞系资源,其中甜菜夜蛾细胞系 IOZCAS-Spex- II 对同源病毒甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeNPV)非常敏感(Zhang *et al.*, 2006a)。随后又从 IOZCAS-Spex- II 中获得了一株对 SeNPV 更加敏感的单细胞克隆株,该细胞株对 AcMNPV 也有很高的敏感性(未发表)。目前我们正在对这个细胞克隆株进行鉴定和进一步的研究,力图使之成为又一个昆虫病毒分子生物学研究的重要的工具。

2 昆虫细胞系的建立技术和鉴定方法

2.1 昆虫细胞系原代培养的主要步骤及特点

目前还没有统一的和规范的建立昆虫细胞系的方法和技术手段。建立细胞系的过程主要包括昆虫体表消毒、组织解剖、原代细胞的获得、细胞入瓶和恒温培养等几个步骤。首先是将虫体体表消毒。消毒的方法有多种,可以使用次氯酸钠或酒精进行体表消毒,并用灭菌水清洗后晾干。第 2 步是解剖虫体,获得需要的待培养的组织,如脂肪体、卵巢等,用生理盐水清洗以除去血细胞,然后浸入含 10% ~ 20% 胎牛血清的细胞培养液中。第 3 步是原代细胞的获得。获得原代细胞并进行原代培养的方法有多种,哺乳动物常选择机械分离法,即用细筛网挤压组织,使之分散释放出细胞。这种方法分离效率高,但细胞损失大、死亡率高,不适合个体小、组织不易获得的昆虫。另外也可以选用胰蛋白酶消化组织的胞外基质,解离细胞。胰蛋白酶法和机械分离法各有弊端,昆虫细胞的原代培养一般倾向于避免使用对细胞有机械损伤的方法,而是采用直接将组织块放入培养瓶中,用适当的培养液浸润,然后转移到 25℃ ~ 28℃ 的环境下静置培养(Eide *et al.*, 1975; Zhang *et al.*, 2006a, 2006b)。入瓶一个星期后加入一定量的传代培养液,然后每星期更换半量的培养液,待细胞长满瓶底后开始传代。

与哺乳动物细胞原代培养过程类似,昆虫细胞原代培养过程主要包括三个时期:即快速增殖期、非特异性的细胞恶化期和最后(但不总是)相同种类的细胞继续增殖期(Lynn *et al.*, 1982)。增殖的细胞

有形成单层细胞贴壁的,也有悬浮细胞形成团块的。细胞在由入瓶后到增殖、最后可以传代的过程中,发生了很大的变化。Willmer (1965)认为有3种可能的变化:(1)细胞的表面、细胞器、或酶系发生改变;(2)适应环境变化的细胞类型存活,不适应的细胞死亡是一种选择的过程;(3)随着培养条件的变化,细胞发生了基因突变,适应的突变细胞被选择而生存。Eide 等(1975)通过延时电影技术(time-lapse cinematography)指出,较小的球形细胞更容易发生分裂。我们在进行光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 细胞原代培养的过程中发现,较小的、透明梭形的细胞增殖分裂活跃,验证了 Eide 等的结论(张寰, 2006)。

与哺乳动物植块培养相似,组织贴壁对促进原代细胞增殖的作用非常明显(张寰, 2006)。当培养的组织块贴壁后 2~3 天即可见到有成纤维细胞状的细胞从组织块周边游离出来,2 至 4 周左右即可增殖长满瓶底,进行传代。使用这种分离原代细胞的方法,使得培养体系背景清澈,细胞增殖容易观察。但是,使用不同的昆虫脂肪体组织,组织块周边游离出细胞的可能性和多少存在差别,细胞持续增殖和存活的能力也各不相同。

2.2 昆虫细胞系的组织来源

相对于已知的几十万种昆虫以及昆虫细胞系的广泛用途来说,已经建立的细胞系还远远不够。在某些研究方面,仍然需要特定昆虫种类来源或者特定细胞类型的细胞系,因此有必要建立更多新的种类和类型的昆虫细胞系。据统计,已报道的昆虫细胞系的母细胞分别来自昆虫的胚胎、初孵幼虫、卵巢、精巢、血细胞、脂肪体、器官芽、中肠、表皮、神经系统、内分泌系统和肌肉等(图 2)。

胚胎细胞的优点是再生潜力高。使用昆虫胚胎和初孵幼虫建立的细胞系最多,占有建成细胞系的 50% 以上(图 2)。其建系方法首先是由 Mitsuhashi 和 Maramorosch(1963)在建立叶蝉细胞系的时候创立的。一般是将卵壳表面消毒后,让卵在无菌条件下孵化。采用机械的方法将胚胎(或初孵幼虫)组织分散成单细胞后,不用或者使用蛋白酶进一步消化分散,然后转入培养瓶进行培养。其原代培养的时间变化较大,大部分需几个月至 1 年。很多研究者认为,使用不同发育阶段的胚胎为实验材料,获得增殖细胞的可能性不一样。

自从 Grace 利用卵巢组织建立第 1 个昆虫细胞系以来,卵巢成为一个常用的组织来源。大多是解

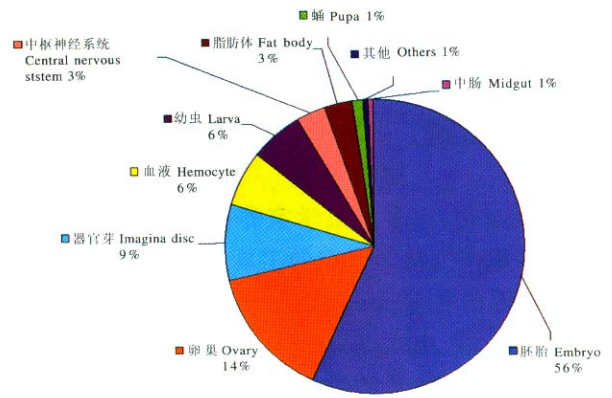


图 2 不同组织来源的昆虫细胞系
Fig. 2 Established insect cell lines from different tissues

剖出卵巢,用机械方法研碎,或者直接放入培养瓶中培养。不同发育时期昆虫的卵巢都可以作为培养材料,成虫、蛹、幼虫的卵巢均被成功地使用过。我们在实验中发现,幼虫的卵巢没有充分发育,不便操作;成虫,尤其是鳞翅目成虫,鳞片等体表附属物妨碍操作,增加了污染的机会;而采用将要羽化的蛹,比较容易解剖到卵巢组织,大大减少了受到污染的机会,是较好的实验材料。卵巢组织体外培养时,卵巢小管上皮细胞较易从组织上游离出来,但进一步分裂的情况并不多见。来自卵巢组织的细胞系有 90 株以上(图 2),来自精巢组织的细胞系也有报道(Goodman *et al.*, 2001)。

昆虫的血细胞是最易于获得的培养材料,具有单细胞和污染概率较小的特点,但培养的成功率较低(Lynn, 2001)。主要原因之一就是血淋巴和血细胞中含有的酚氧化酶原,在体外容易被激活成酚氧化酶而使培养物黑化,从而毒害培养的细胞。有多种防止黑化的方法,如在培养物中加入酚氧化酶的抑制剂半胱氨酸、谷胱甘肽、苯基硫脲等,或者通过分离的方法,去除含有酚氧化酶原的血淋巴和绛色细胞。据不完全统计,约有 40 株细胞系来源于昆虫的血细胞(图 2)。

昆虫的脂肪体同哺乳动物的肝脏具有类似的功能,是昆虫重要的生理代谢组织,也是很多病原物的靶标。不同种类昆虫的脂肪体细胞在体外生长增殖的能力差别很大,具体的原因还不清楚。我们的研究表明,原代培养的脂肪体组织在从体内转移到体外时,使之贴壁的过程非常关键,是能否快速成系的重要步骤之一。有近 20 篇文献报道了昆虫脂肪体来源的细胞系,其中有 10 余种鳞翅目昆虫、1

种蟑螂和 1 种天牛(图 2)。

器官芽包含各种类型的细胞,是发育生物学研究的重要材料,经过分化,将发育成为特定的器官组织。较为特化的器官组织,如表皮细胞、神经组织、内分泌系统、肌肉组织等是昆虫生理学的研究对象,对之进行原代培养常常被用来研究其生理学功能,但真正建立细胞系的很少。然而建立特定器官和组织来源的细胞系,对昆虫生理学、细胞生物学以及发育生物学等研究,具有重要的意义,是未来昆虫细胞培养发展的方向之一。

2.3 昆虫细胞系的传代培养

将原代培养的细胞重新接种到另外的培养器皿内,再进行培养的过程被称为传代培养。传代的初期,细胞生长较慢,传至 5 代至 10 代以后,增长速度明显加快。待传代培养细胞生长稳定后,每 3~7 天以 1:4 到 1:5 的比率传代 1 次。随着传代的进行,细胞趋于纯化,形态趋于同一。有人认为,这是由于高密度传代后,细胞失去多向分化潜能的缘故(Colter *et al.*, 2001)。多次传代意味着不断选择生长最快的一群细胞,这样,最终获得了较为单一类型的细胞。其他类型的细胞在多次传代中将逐渐消失。培养过程中,健康细胞也会自动将无用的细胞淘汰、排除,甚至将其吞噬消化掉。传代的昆虫细胞系可以静置在培养瓶或培养皿中贴壁培养,也可在培养瓶或各种生物反应器中摇动悬浮培养。Fedoroff(1966)依据培养人成纤维细胞的经验认为,传代细胞至少传代 70 次以上,才被认为是连续传代的细胞系。对昆虫细胞而言,传代 10~20 次之后,生长就已经基本稳定。

细胞系建立以后,细胞系的命名工作也非常重要。Brooks 和 Kurtti(1971)指出,细胞系的名称代码,应该包括实验室名称,细胞系虫种来源,细胞株编号及克隆株编号。如我们建立的甜菜夜蛾幼虫脂肪体细胞系名称为 IOZCAS-Spex-II,表示该细胞系在中国科学院动物研究所(IOZCAS,中国科学院动物研究所英文缩写)的实验室中,培养建立的甜菜夜蛾 Spex(甜菜夜蛾学名缩写)的第 2 个细胞系(II,罗马数字第 2)。

2.4 昆虫细胞系的特征和鉴定

随着昆虫细胞系数量的增多,对新建细胞系进行鉴定并描述其形态的、生理的和分子的特征显得越来越重要。传统的细胞系鉴定内容包括细胞形状大小(显微镜和电镜观察)、生长特性、倍增时间、核型、同工酶谱等,但至今仍未形成统一的标准。随着

分子生物学手段和技术的发展,DNA 扩增指纹图谱(DNA amplification fingerprinting,DAF-PCR)被广泛用于对新建立的昆虫和哺乳动物细胞系进行分子鉴定,具有较好的特异性和重复性(McIntosh *et al.*, 1996;Zhang *et al.*, 2006a, 2006b)。其他的细胞系鉴定技术还有 AFLP(amplified fragment length polymorphism DNA fingerprinting)(Khurad *et al.*, 2006)、线粒体 DNA 限制性内切酶分析(Sieburth and Maruniak, 1988)、异源双链核酸分子分析(Sudeep *et al.*, 2002),以及 Southern-blot、RAPD、ELISA、放射免疫测定、蛋白双向电泳、血清学分析、免疫扩散测定等分析手段。

3 问题与展望

大约 100 年前就开始了无脊椎动物的细胞培养,很多实验室也曾经开展过细胞系的建立工作,但是否成系带有很多的随机性和经验性。至今还没有建立细胞系统一的标准方法,我们的初步培养实验表明,昆虫细胞培养是否成功的关键,是细胞入瓶前和入瓶后处理的步骤和方法,随后的换液、传代等步骤也可能是重要的影响因素。

诱导细胞从特定的组织中生长出来有时是非常困难的。通常认为特定时期和虫龄的昆虫组织细胞体外增殖的可能性是各不相同的,蛹和胚胎期的细胞最易分裂增殖。Hirumi 和 Maramoro(1964)在研究建立叶蝉胚胎细胞系的过程中发现,未分化的细胞更适于培养,但并不是所有未分化的细胞都具这种特性。细胞的生命活动是受其所在的精确微环境影响和制约的,组织微环境的适宜和稳定是维持细胞增殖、分化、代谢和功能活动的重要前提。通过显微观察,我们无法判定细胞在体外环境中能否适应,无法知道它们去分化并转化为球状或者扁平形状的内在原因。然而,我们的实验经验认为,虫体组织块在体外同培养器皿表面紧密附着,非常利于该组织块细胞的分裂生长,可能这样的贴壁改善或稳定了其在体外的微环境,促进细胞分裂生长。

传代培养,尤其是前几次成功传代的过程非常重要。与 Dübendorfer 和 Liebig(1992)的传代方法不同,我们没有使用胰蛋白酶消化细胞单层的方法进行传代,而是使用反复轻轻敲打的方法,在尽量减低对细胞化学的和机械损伤的前提下,将贴壁细胞悬浮,然后转入新的培养瓶。

昆虫细胞系常常来源于胚胎、初孵幼虫、卵巢组

织、血细胞,或者脂肪体组织等,这些组织来源的细胞系是由各种类型的细胞组成。很多学者曾努力培养特定组织或器官以获得特定类型的细胞,然而特定组织或器官并不是由单一的细胞类型组成的。由于对昆虫特定组织的细胞缺乏特异性的标记,因此,鉴定某一细胞系是否来源于特定组织或器官的工作还无法展开(Lynn 2001)。

利用细胞工程和基因工程的方法改造细胞,从根本上改变细胞的培养特性,是动物细胞培养研究的重要课题。比如,通过导入一些基因,改变细胞对生长周期的调控,有可能使原代细胞获得传代生长的特性,也有可能使传代细胞适应于无血清或无蛋白的培养。有些细胞可能依赖于来源于血清的特殊生长因子,那么可以导入特异生长因子基因,使细胞能合成该生长因子来满足生长的需求。

总的来说,相对于哺乳动物细胞培养研究的历史和现状,昆虫细胞培养技术仍然处于初始阶段,难点和问题很多,许多基本的技术和方法有待建立,需要作大量细致的研究工作。昆虫种类繁多,不同物种、甚至相同物种不同组织来源的细胞培养的方法、现象、规律往往截然不同。一些研究思路可以借鉴哺乳动物细胞培养的研究,但是也要注重昆虫细胞自身的特殊性。尽管现有的昆虫细胞系建立技术已经在多种昆虫种类中得到应用,但是,新的理论和技术仍有待建立和完善,以便为科研人员提供系统的、可操作的昆虫细胞系建立的技术和方法。

参 考 文 献 (References)

- Brooks MA, Kurti TJ, 1971. Insect cell and tissue culture. *Ann. Rev. Entomol.*, 16: 27-52.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ, 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(14): 7841-7845.
- Dübendorfer A, Liebig B, 1992. Cell differentiation *in vitro* and establishment of permanent ecdysone-responsive cell lines from embryonic tissues of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.*, 38: 397-407.
- Eide PE, Caldwell JM, Marks EP, 1975. Establishment of two cell lines from embryonic tissue of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *In Vitro*, 11: 395-399.
- Fedoroff S, 1966. Proposed usage of animal tissue culture terms. *In Vitro*, 2: 155-159.
- Gaw ZY, Liu NT, Zia TU, 1959. Tissue culture methods for cultivation of virus grasserie. *Acta Virol.*, 3: 55-60.
- Goldschmidt R, Kaiser W, 1915. Some experiments on spermatogenesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1(4): 220-222.
- Goodman CL, Ssyed GN, Mcintosh AH, Grasele JJ, Stiles B, 2001. Establishment and characterization of insect cell lines from 10 lepidopteran species. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 37: 367-373.
- Grace TDC, 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 195: 788-789.
- Granados RR, Li GX, Derksen ACG, McKenna KA, 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 260-266.
- He YTY, 1993. Application and development of insect cell culture. *Agronomy Oversea-Silkworm*, (1): 45-54. [河源畑勇, 1993. 昆虫细胞培养技术的开发及应用. 国外农学: 蚕业, (1): 45-54]
- Hink WF, Hall RL, 1989. Recently established invertebrate cell lines. In: Mitsuhashi J ed. *Invertebrate Cell System Applications*. Vol. II. Florida: CRC Press. 269-293.
- Hirumi H, Maramorosch K, 1964. The *in vitro* cultivation of embryonic leaf hopper tissues. *Expl. Cell Res.*, 36: 625-631.
- Khurad AM, Kanginakudru S, Qureshi SO, Rathod MK, Rai MM, Nagaraju J, 2006. A new *Bombyx mori* larval ovarian cell line highly susceptible to nucleopolyhedrovirus. *J. Invert. Pathol.*, 92: 59-65.
- Li B, Shen WD, 2002. Advance on cell lines of silkworm and wild silkworm. *Industry of Silkworm in China*, (11): 67-69. [李兵, 沈卫德, 2002. 家蚕和野蚕的细胞系研究进展. 中国蚕业, (11): 67-69]
- Lynn DE, 1989. Methods for the development of cell lines from insects. *J. Tissue Cult. Methods*, 12: 23-29.
- Lynn DE, 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 37: 319-321.
- Lynn DE, 2002. Methods for maintaining insect cell cultures. *J. Insect Sci.*, 9(1): 1-6.
- Lynn DE, Miller SG, Oberlander H, 1982. Establishment of a cell line from lepidopteran wing imaginal discs: Induction of newly synthesized proteins by 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2589-2593.
- Maramorosch K, 1992. The development of insect cell lines: a historical perspective. *Journal of Wuhan University*, (4): 115-120. [Maramorosch K, 1992. 昆虫细胞系的发展: 历史回顾. 武汉大学学报, (4): 115-120]
- McIntosh AH, Grasele JJ, Matteri RL, 1996. Identification of insect cell lines by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Insect Mol. Biol.*, 5: 187-195.
- Mitsuhashi J, Maramorosch K, 1963. Aseptic cultivation of four virus transmitting species of leafhoppers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 22: 165-173.
- Mitsuhashi, 2002. *Invertebrate Tissue Culture Methods*. Tokyo: Springer Lab. Manual.
- Sieburth PJ, Maruniak JE, 1988. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 52: 453-458.
- Song DW, Ma Y, Feng Y, Chen XM, 2004. Advance in research of insect cell engineering. *Forest Research*, 17(1): 116-124. [宋德伟, 马艳, 冯颖, 陈晓鸣, 2004. 昆虫细胞工程研究进展. 林业科学研

- 究, 17(1):116-124]
- Sudeep AB, Mourya DT, Shouche YS, Pidiyar V, Pant U, 2002. A new cell line from the embryonic tissue of *Helicoverpa armigera* HBN (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 38: 262-264.
- Sudeep AB, Mourya DT, Mishra AC, 2005. Insect cell culture in research: Indian scenario. *Indian J. Med. Res.*, 121:725-738.
- Willmer EN, 1965. Morphological problems of cell type, shape and identification. In: Willmer EN ed. *Cells and Tissues in Culture*. Vol. 1. New York: Academic. 143-176.
- Zhang H, Zhang YA, Qin QL, Li X, Miao L, Wang YZ, Yang ZQ, Ding C, 2006a. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua*: characterization and susceptibility to baculoviruses (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.*, 91:9-12.
- Zhang H, Zhang YA, Qin QL, Wang YZ, Li X, Miao L, Yin ZX, Zhang AJ, Qu LJ, Ding C, 2006b. A new cell line from larval fat bodies of the bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 10:290-293.
- Zhang H, 2006. Studies on Proliferation of Cells of Insect Fat Bodies *In Vitro* and Establishment of Seven Cell Lines Susceptible to Homologous Virus. PhD Dissertation, Chinese Academy of Forestry. Beijing. [张寰, 2006. 昆虫脂肪体细胞体外增殖方法及同源病毒敏感脂肪体细胞系建立研究. 北京: 中国林业科学研究院博士学位论文]
- Zeng CH, Ren ZY, 1995. Baculovirus expression system and its application. *Medical Virology Oversea*, 2(4):120-123. [曾传海, 任中原, 1995. 杆状病毒表达载体及其应用. 国外医学病毒学分册, 2(4):120-123]

(责任编辑: 黄玲巧)