

研究论文

重组杆状病毒感染悬浮昆虫细胞感染 策略优化及扩大试验

张佑红, 靖志强, 马 静, 徐 鹏, 陈 龙

(武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430073)

摘要: 昆虫细胞-杆状病毒表达系统已经广泛应用于生物杀虫剂及重组蛋白的大规模生产。在昆虫细胞-杆状病毒表达系统中, 感染策略中的感染复数 (MOD)、感染时间 (TOI)、细胞初始浓度 (ICD) 的相互关系还不是很清楚, 而且相关报道也很少。本研究在摇瓶中利用正交实验探讨了 MOI、TOI 及 ICD 的相互作用关系以及对包涵体病毒 (OV) 和非包涵体病毒 (BV) 产量的影响。结果表明, 感染复数对 OV 和 BV 产量有显著的影响; 最佳感染条件为 MOI 为 0.1, TOI 为细胞处于对数生长期初期, ICD 为 2×10^5 cells \cdot ml $^{-1}$; 最大 BV 病毒滴度为 2.0×10^7 TCID $_{50}$ \cdot ml $^{-1}$ 。将在摇瓶中获得的最佳条件在气升式反应器进行扩大试验, 获得最大病毒滴度为 2.13×10^7 TCID $_{50}$ \cdot ml $^{-1}$ 。

关键词: 昆虫杀虫剂; 杆状病毒; 昆虫细胞; 感染策略

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2010) 04-0942-07

Optimization of infection strategy for recombinant baculovirus infection of suspended insect cells and its scale-up test

ZHANG Youhong, JING Zhiqiang, MA Jing, XU Peng, CHEN Long

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073, Hubei, China)

Abstract: Insect cell-baculovirus expression system has been widely used in insect pesticide and recombinant protein production on a large scale. The interplay among the multiplicity of infection (MOI), time of infection (TOI) and initial cell density (ICD) in insect cell-recombinant expression systems is not clearly understood and the literature related to the investigation of the quantitative relationship of MOI, TOI and ICD is very scarce. In the present study, an orthogonal design was used to select the optimum conditions, in which the effects of MOI, ICD and TOI on the budded virus (BV) titer and occluded virus (OV) number were evaluated in the HzAM1 insect cell-recombinant baculovirus system at a low MOI in shake-flasks. The results indicated that among MOI, TOI and ICD, MOI had a significant influence on the amounts of BVs and OVs produced. The optimal conditions for the production of both BVs and OVs in the HzAM1 insect cell-recombinant baculovirus system were: MOI of 0.1, initial cell density of 2×10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ and infection at the early exponential phase. A maximum BV concentration of 2.0×10^7 TCID $_{50}$ \cdot ml $^{-1}$, was obtained. Furthermore, the optimal condition obtained was applied to the scale-up test in the airlift reactor, and a maximum BV concentration of 2.13×10^7 TCID $_{50}$ \cdot ml $^{-1}$ was obtained,

2009-08-24 收到初稿, 2009-12-18 收到修改稿。

联系人及第一作者: 张佑红 (1964—), 男, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20876120); 武汉市科技攻关项目 (20052002044)。

Received date: 2009-08-24.

Corresponding author: Dr. ZHANG Youhong, youhong64@yahoo.com.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20876120).

which was bigger than those in the shaken flask.

Key words: insect pesticide; baculovirus; insect cell; infection strategy

引 言

利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统进行重组蛋白、疫苗和生物杀虫剂的大规模生产越来越受到人们的重视^[1], 因此需要对其生产过程进行优化。近年来, 人们主要在以下几个方面进行了优化: (1) 细胞生长情况^[2]; (2) 培养基^[3]; (3) 溶氧^[4]; (4) 反应器的设计^[5]; (5) 感染策略^[6-9], 其中包括感染复数 (MOD)、感染时间 (TOI)、细胞初始浓度 (ICD) 和培养基的替换。

利用高感染复数进行重组蛋白和病毒杀虫剂的生产过程已经很清楚, 在高感染复数条件下, 所有细胞都“同步”感染^[10]。但在实际生产中, 采用低感染复数有以下优点^[11-12]: (1) 可以大大减少病毒原种的用量, 无需大量扩增培养, 从而减少设备投资, 缩短工艺流程, 降低生产中受污染的概率。(2) 减少了由于高复数感染引起的“传代效应”。而且据相关报道, 在高感染复数下获得的重组蛋白的产量比低感染复数下低。因此, 低感染复数下杆状病毒感染昆虫细胞的研究日益受到重视。

对于棉铃虫细胞-杆状病毒体系的培养基^[13-14]、溶氧、反应器的设计在本课题组已经得到优化^[15], 因此, 本研究将主要从感染策略的3个方面 (不包括培养基的替换): MOI、TOI 和 ICD 进行优化。研究感染策略的文献^[5-9]一般只考察单因素对昆虫细胞-杆状病毒表达体系的影响。本研究将采用正交实验来进行感染策略的优化, 这种方法的优点是它不仅考虑了单因素对昆虫细胞-杆状病毒表达体系的影响, 而且考虑到了各个因素间的相互影响。这样得到的结果对实际的生产有更大的参考价值。

1 实 验

1.1 实验材料

(1) 培养基

Grace 培养基 (GBICO 公司)、胎牛血清 (GBICO 公司)、酵母提取物及脂类复合物 (GBICO 公司)、Pluronic F-68 (GBICO 公司)。培养基组成: Grace 培养基, 5% (体积, 下同) 的胎牛

血清, 1% 的酵母提取物, 1.5% 的脂类复合物, 0.1% 的 Pluronic F-68。贴壁培养、摇瓶悬浮培养和气升式反应器培养的培养基相同。

(2) 细胞、病毒及其计数

棉铃虫细胞 HzAm1 由中国科学院武汉病毒所提供。将棉铃虫细胞 HzAm1 在含 5% (正常的情况是 10%) 胎牛血清的 Grace 培养基于 27℃ 下恒温培养^[13-14]。将细胞用 0.4% 台盼蓝染色后用血球计数板计数, 计算活细胞浓度及细胞存活率。

棉铃虫病毒 [*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV)] 由中国科学院武汉病毒所的王华林教授提供, 由该所构建提供的棉铃虫病毒 (HaBacHZ8-eGFP-PH) 带有绿色荧光蛋白 (eGFP)^[16-17]。包涵体病毒浓度利用血球计数板在高倍显微镜下计数, 非包涵体病毒滴度的测定采用终点稀释法 (TCID₅₀)^[18-19]。

1.2 仪器与设备

(1) 常规仪器

2001 型振荡恒温培养箱 (常州国华电器有限公司), 荧光显微镜 (Olympus BX-51), 倒立式显微镜 (XDS-1B), 超低温冰箱 (New Brunswick Scientific), 无油空气压缩机 (扬州市恒顺机械厂), 氧气瓶、氮气瓶 (青岛华青集团有限公司), pH 探头、氧探头 (Broadley James 公司), 其他均为实验室常规仪器。

(2) 气升式反应器

本实验室设计的气升式反应器总体积 570 ml, 有效体积 500 ml。配备有一个溶氧探头和一个 pH 探头, 中间有 4 根金属导管, 它们的作用分别是通气、取样、放气和加料。通气导管从容器底部通入无菌的空气、氧气和氮气, 它的作用主要有两个: 通入的气体推动溶液在反应器中循环流动, 使细胞悬浮生长; 通过空气、氧气和氮气的比例来调节溶氧的大小。通过计算机自动控制反应器中的溶氧值和 pH 值。

1.3 实验方法

(1) 正交实验

将生长良好的细胞接种在 100 ml 的摇瓶中在振荡培养箱中培养。其中接种体积为 20 ml, 培养

温度为 27℃，转速为 80 r·min⁻¹。本研究设计了正交实验，三因素为感染复数、感染时间和细胞初始浓度。每个因素设计了 3 个水平。正交因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

| Levels | Factors | | |
|--------|---------|--|--------------------------|
| | MOI(A) | ICD /10 ⁵ cells·ml ⁻¹ (B) | TOI(C) |
| 1 | 0.01 | 1 | early exponential phase |
| 2 | 0.1 | 3 | middle exponential phase |
| 3 | 1.0 | 2 | late exponential phase |

其中 ICD 为细胞接种摇瓶时的细胞浓度，而不是细胞被感染时的细胞浓度。TOI 是指细胞处于对数生长期的初期、中期和末期。细胞进入对数生长期初期、中期和末期的时间取决于细胞初始浓度^[20]，因此细胞初始浓度不同时，TOI 是不同的。

根据以上的正交表，一共进行了 9 组实验，每组实验设立了一个对照实验（不加病毒的）。细胞接种摇瓶后，每 24 h 采样测定活细胞浓度及细胞存活率，接种病毒后，每 6 h 采样测定 BV 滴度和 OV 浓度。

(2) 在气升式反应器中的扩大试验

细胞首先在 25 ml 的 T-flasks 瓶中进行 3~4 d 的贴壁培养，细胞生长良好后，将细胞转入 250

ml 的摇瓶中，加入新鲜培养基后进行转速为 80 r·min⁻¹ 的悬浮培养。每 24 h 测定摇瓶中活细胞浓度及存活率，在细胞指数生长末期将摇瓶里的细胞离心后转入气升式反应器。每组实验都是在恒定溶氧 30%、pH 值 6.2 和温度 27℃ 下进行的^[15]。

利用在摇瓶中获得的最佳优化条件在气升式反应器中进行扩大试验。

2 结果与分析

2.1 数据分析

由正交实验得到的最大 BV 的滴度和 OV 的浓度见表 2。表中的 K_m 和 K'_m 值直接反映不同水平对实验结果影响的大小， R 和 R' 值直接反映不同因素对实验结果影响的大小。

从表 2 中可以看出，在条件 A₂B₃C₁ 下能够获得最大的 BV 滴度 2.0×10⁷ TCID₅₀·ml⁻¹，而且从 K_m 值可以看出最佳条件也是 A₂B₃C₁。所获得的最大滴度比其他的相关报道都高^[21-22]，这说明利用正交实验进行优化的有效性。也就是说在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中，在细胞初始浓度为 2×10⁵ cells·ml⁻¹，细胞处于对数生长期初期时，MOI 为 0.1 进行感染，能够获得最大的 BV 滴度。从表 2 中还可以看出，在 A₂B₃C₁ 下获得最大的 OV 浓度 1.90×10⁶ OV_s·ml⁻¹，从 K'_m 中也可以看出

表 2 正交实验设计及结果 (BV 滴度及 OV 浓度)

Table 2 Effects of MOI,ICD and TOI on BV titer and OV concentration

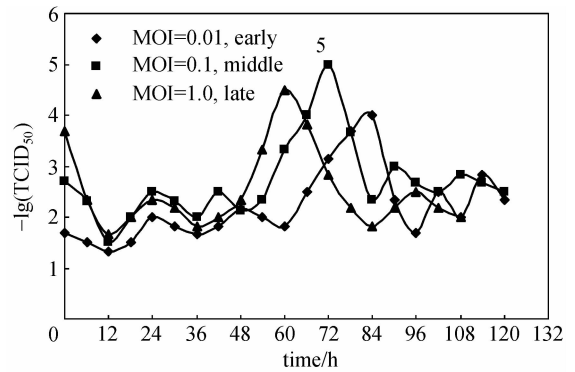
| Experiment No. | MOI (A) | ICD /10 ⁵ cells·ml ⁻¹ (B) | TOI(C) | Maximum titer of BV/10 ⁵ TCID ₅₀ ·ml ⁻¹ | Maximum OV concentration /10 ⁴ OV _s ·ml ⁻¹ |
|----------------|---------|--|--------|---|--|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 110 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 28 | 120 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 9.28 | 125 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 20 | 145 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 92.8 | 160 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 200 | 190 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 6.32 | 125 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 6.32 | 142 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 13.3 | 160 |
| K_1 | 13.09 | 9.44 | 69.44 | | |
| K_2 | 104.27 | 42.37 | 20.43 | | |
| K_3 | 8.65 | 74.19 | 36.13 | | |
| R | 95.62 | 64.75 | 49.01 | | |
| K'_1 | 118 | 127 | 147 | | |
| K'_2 | 165 | 141 | 142 | | |
| K'_3 | 142 | 158 | 137 | | |
| R' | 47 | 32 | 11 | | |

最佳条件是 $A_2B_3C_1$ 。可以说在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中，在细胞初始浓度为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，细胞处于对数生长期初期时，MOI 为 0.1 进行感染，能够获得最大的 OV 浓度。从表 2 可以看出，能够获得最大 BV 滴度和 OV 浓度的最佳条件都是 $A_2B_3C_1$ 。这进一步说明，杆状病毒的两种不同显型 (BV 和 OV) 的产量密切相关。

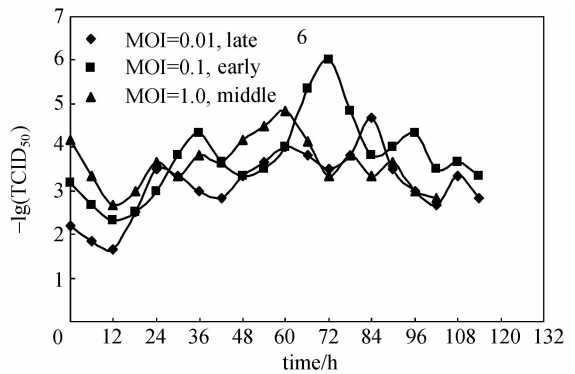
2.2 ICD、MOI 和 TOI 对 BV 和 OV 滴度的影响

从表 2 中的 K_m 和 K'_m 可以看出，在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中，能够获得最大 BV 和 OV 滴度的最佳感染条件为：MOI 为 0.1，ICD 为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，TOI 为细胞生长对数期初期。表 2 中 R 和 R' 值可以反映因子对实验结果影响的大小，MOI、ICD 和 TOI 的 R 值大小依次为 $95.62 > 64.75 > 49.01$ ，可以说明 MOI 对 BV 滴度的影响最大，ICD 次之，TOI 对 BV 滴度的影响最小。MOI、ICD 和 TOI 的 R' 值依次为 $47 > 32 > 11$ ，同样表明 MOI 对 OV 滴度的影响最大，ICD 次之，TOI 对 OV 滴度的影响最小。对于 MOI，当 MOI 为 1.0 时，相对于 MOI 为 0.01 和 0.1，大部分细胞在初期就被感染，使得很多细胞丧失了繁殖的能力，因此，BV 和 OV 的产量将在二次和多次感染的时候大幅度降低 [如图 1 (c) 和图 2 (c) 所示]。相反，当 MOI 为 0.01 时，在第一次感染时，很少量的细胞被感染，产生的子代病毒相对较少，大部分细胞生长会继续生长，之后会有二次感染、三次感染等多次感染，形成了一个细胞的生长速度与病毒的扩增速度的竞争，但在这个过程中从病毒开始感染一直到细胞开始进入死亡期，病毒量一直不大 [图 1 (a) 和图 2 (a)]，这样一部分细胞在扩增中没有起到作用。当 MOI 为 0.1 时，病毒在二次或三次感染后，基本所有的细胞全部被感染，这样不仅能够生产大量的病毒，还充分地利用了细胞。设定的 3 个细胞初始浓度依次为 1×10^5 、 3×10^5 、 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。当细胞初始浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时，细胞浓度比较低，相对于细胞浓度为 $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，进入多次感染周期的细胞很少。而对于细胞初始浓度为 $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时，进入多次感染周期后剩余的细胞太多。多余的细胞继续生长，很快消耗完培养基中的营养，这样的环境不利于病毒的扩增。因此，细胞浓度为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 相对于细胞初始浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 3×10^5

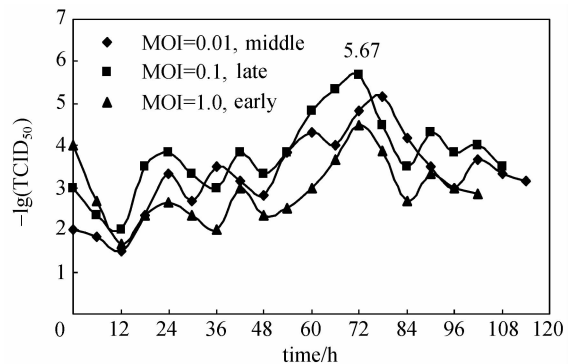
$\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 更容易收获高产量的病毒。在对数生长期初期接种病毒，相对于对数生长期中期和末期接种病毒，有一个更长的细胞生长周期和病毒及子代病毒的感染循环，因此在对数期初期接种病毒更容易获得高产量的病毒 (图 1 和图 2)。综上所述，在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中，最佳的感染条件是 ICD 为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，MOI 为 0.1，TOI 为细胞生长期初期。



(a) $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$



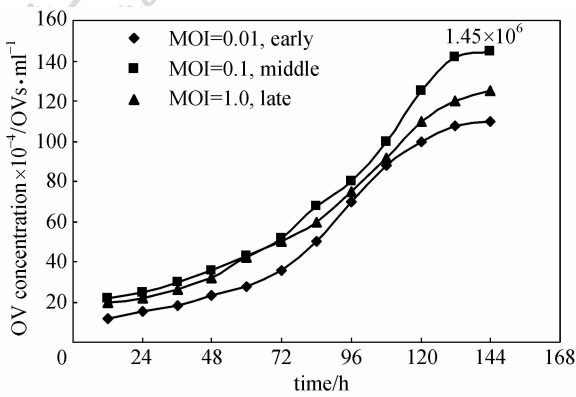
(b) $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$



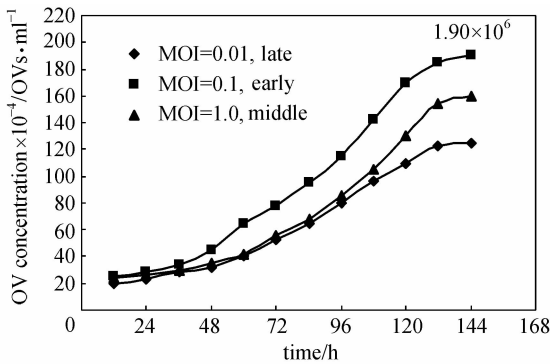
(c) $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$

图 1 不同细胞初始浓度下的 BV 病毒滴度
Fig. 1 Evolution of minus logarithm of $TCID_{50}$ under different ICDs

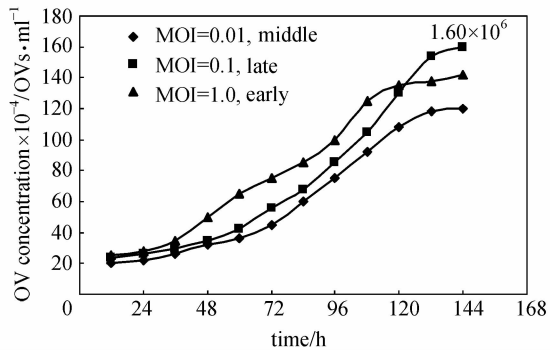
(The errors of all samples analysis range from 0 to 5% and are not signed in figures)



(a) $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$



(b) $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$



(c) $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$

图 2 不同细胞初始浓度下的 OV 病毒浓度
Fig. 2 Evolution of amount of OVs under different ICDs

(The errors of all samples analysis range from 0 to 5% and are not signed in figures)

2.3 最优条件在气升式反应器中的扩大试验

在气升式反应器中，接种细胞初始浓度为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，细胞生长 36 h 后进入对数生长期初期，接种病毒 MOI 为 0.1。在感染过程中，每 24 h 采样测定细胞浓度及细胞存活率，每 6 h 采样测定 BV 滴度和 OV 浓度。图 3 和图 4 是在 ICD 为

$2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、MOI 为 0.1、TOI 为细胞生长初期条件下细胞生长曲线和细胞存活率图及 BV、OV 浓度随时间变化曲线图。从图 4 中可以看出，在 ICD 为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，MOI 为 0.1，TOI 为细胞生长初期条件下，在气升式反应器中，能够获得的最大 BV 滴度为 $2.13 \times 10^7 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，最大 OV 浓度为 $2.20 \times 10^6 \text{ OVs} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，这一产量略大于摇瓶中同样条件下得到的最大 BV 和 OV 浓度，这说明在气升式反应器中改善了培养体系的溶氧及细胞和营养之间的交换。

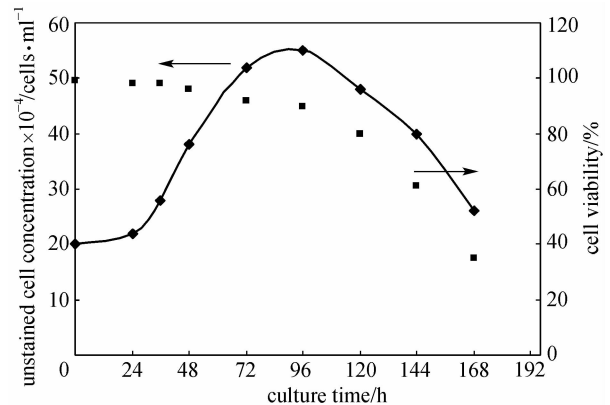


图 3 优化条件下气升式反应器中的细胞生长曲线及存活率

Fig. 3 Evolution of unstained cell concentration under optimal infection conditions and cell viability in airlift reactor

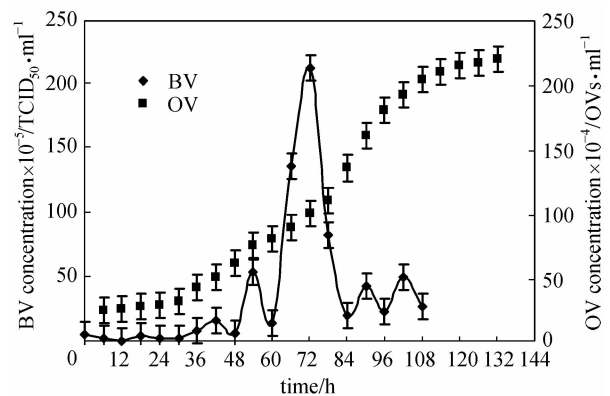


图 4 优化条件下气升式反应器中的 BV 和 OV 浓度变化

Fig. 4 Evolution of amounts of BVs and OVs under optimal infection condition in airlift reactor

3 结 论

本研究是针对低感染复数下昆虫细胞-杆状病毒表达体系感染策略的优化，对 BVs 和 OVs 产量

的影响考察了3个因素: MOI、ICD和TOI。采用正交实验来选择最佳感染条件, 结果表明MOI对BV_s和OV_s产量的影响最大, ICD次之, TOI对BV_s和OV_s产量的影响最小; 最佳感染条件为: MOI为0.1, ICD为 2×10^5 cells · ml⁻¹, TOI为细胞生长对数期初期, 得到的较高的BV滴度 2.0×10^7 TCID₅₀ · ml⁻¹。但是本研究没有在接种病毒后适当补给营养的条件下进行优化, 因此在下一步的工作中可能获得更高的BV滴度。此外, 本研究阐明了MOI、ICD和TOI的相互关系及对BV_s和OV_s产量的影响。这为昆虫病毒杀虫剂的大规模化生产提供了一定的依据。本研究就上述最佳感染条件在气升式反应器中进行了扩大试验, 得到的最大病毒滴度为 2.13×10^7 TCID₅₀ · ml⁻¹。结果表明, 在气升式反应器中得到的BV_s和OV_s产量略高于摇瓶中所获得。这说明在气升式反应器中改善了培养体系的溶氧及细胞和营养之间的交换。但是这个条件对于气升式反应器来说是不是最佳感染条件还需要进一步验证, 而且对于反应器来说还有很多其他的因素需要考虑, 如: 反应器结构的设计、表观气速、溶氧浓度、pH等。

References

- [1] Maiorella B, Inlow D, Shauger A, Harano D. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*, 1988, **6**: 1406-1410
- [2] Wickham T J, Nemerow G R, Wood HA, Shuler M L. Comparison of different cell lines for the production of recombinant baculovirus proteins. *Methods Mol. Biol.*, 1995, **39** (10): 385-395
- [3] Power J F, Reid S, Radford K M. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **44** (6): 710-715
- [4] Gotoh T K, Miyazaki Y H, Chiba K H, Kikuchi K I. Significant increase in recombinant protein production of a virus-infected Sf-9 insect cell culture of low MOI under low dissolved oxygen conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, **94** (5): 426-433
- [5] Maranga L, Cunha A, Clemente J, Cruz P, Cruz P, Carrondo M J T. Scale-up of virus-like particles production; effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *Journal of Biotechnology*, 2004, **107** (1): 55-64
- [6] Rodas V M, Marques F H, Honda M T, Soares D M, Jorge S AC, Antoniazzi M M, Medugno C, Castro M E B, Ribeiro B M, Souza M L. Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology*, 2005, **48** (1/2/3): 27-39
- [7] Hu Y C, Bentley W E. Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus-like particles by baculovirus co-infection: deterministic predictions and experimental results. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **75** (1): 104-109
- [8] Carinhas N, Bernal V, Yokomizo A Y, Carrondo M J, Oliveira R, Alves P M. Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **81** (6): 1041-1049
- [9] Zhang Y H, Enden G, Merchuk J C. Insect cells-baculovirus system: factors affecting growth and low MOI infection. *Biochem. Eng. J.*, 2005, **27** (1): 8-16
- [10] Kumar A, Shuler M L. Model of a split-flow airlift bioreactor for attachment-dependent, baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol. Prog.*, 1995, **11** (4): 412-419
- [11] Zhang Y H. Multi-peak phenomenon of insect cell infection with baculovirus at low multiplicity of infection. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2005, **37** (12): 857-861
- [12] Maranga L, Brazao T F, Carrondo M J T. Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. *Biotech. Bioeng.*, 2003, **84** (2): 245-253
- [13] Zhang Youhong (张佑红), Wang Hualin (王华林), Zhu Xiongwei (朱雄伟), Qin Qin (秦琴), Chen Yan (陈燕), Lü Zhong (吕中), Ma Jie (马洁), Zhang Jing (张菁). Screen of media for insect cells (HzAm1) growth and its adaptation to low serum culture. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22** (4): 686-688
- [14] Zhang Youhong (张佑红), Chen Yan (陈燕), Du Jin (杜进), Zhu Xiongwei (朱雄伟), Qin Qin (秦琴), Zhao Liang (赵亮), Wu Yuanxin (吴元欣). Improvement of medium grace's for the cultivation of *Helicoverpa armigera* cells HzAm1. *Chemistry & Bioengineering* (化学与生物工程), 2007, **24** (7): 49-51
- [15] Zhao Liang (赵亮), Zhang Youhong (张佑红), Jing Zhiqiang (靖志强), Chen Long (陈龙). Effects of reactor configuration and superficial gas velocity on insect cells cultivation in airlift reactors. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2008, **28** (6s): 136-139
- [16] Pan X Y, Long G, Wang H L, Hou S W, Wang H Y, Zheng Y T, Sun X L, Westenberg M, Deng F, Wang H L. Deletion of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus gene encoding a virion structural protein (ORF107) increases the budded virion titre and reduces in vivo infectivity. *J. Gen. Virol.*, 2007, **88** (12): 3307-3316
- [17] Jing T, Li X, Song J H, Chen X W. Baculovirus per os infectivity factors are involved in HearNPV ODVs infection of HzAM1 cells in vitro. *Virol. Sin.*, 2008, **23** (1): 25-30
- [18] Cha H J, Gotoh T, Bentley W E. Simplification of titer determination for recombinant baculovirus by green

- fluorescent protein marker. *Biotechniques*, 1997, **23** (5): 782-786
- [19] Finney D J. Statistical Method Biological Assay. 3rd ed. London: Charles Griffin & Co. Press, 1978
- [20] Kioukia N, Nienow A W, Emery A N, Al-Rubeai M. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *J. Biotechnol.*, 1995, **38** (3): 243-251
- [21] Wang M L, Tan Y, Yin F F, Deng F, Valk J M, Hu Z H, Wang H L. The F protein of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus can be substituted functionally with its homologue from *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 2008, **89**: 791-798
- [22] McIntosh A H, Grasele J J, Goodman C L, Ignoffo C M. Growth of a clonal cell line of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in suspension culture and replication of its homologous baculovirus HzSNPV. *Appl. Entomol. Zool.*, 2001, **36**: 349-352