

文章编号:1001-1498(2004)01-0116-09

昆虫细胞工程研究进展

宋德伟, 马艳, 冯颖*, 陈晓鸣

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要:综述了从 60 年代首次建立昆虫细胞系以来国内外的昆虫细胞工程的研究进展。包括昆虫细胞培养基的研究, 昆虫细胞系的建立, 昆虫细胞冻存的研究, 昆虫细胞培养过程中污染的检测和解决, 以及昆虫细胞—杆状病毒表达系统(Baculovirus Expression Vector System, BEVS)的研究现状和展望。

关键词:昆虫细胞培养; 昆虫细胞系; 污染; 细胞冻存; 杆状病毒

中图分类号:S718.7 **文献标识码:**A

随着生命科学的迅猛发展, 在生物工程技术领域中, 细胞工程已愈来愈受到重视。以昆虫细胞为培养对象的昆虫细胞培养技术在现代实验生物学上具有重要的价值, 广泛地应用于医药学、农业及生物学的各个领域。自从 T. D. C. Grace 在 1962 年首次建立了天蚕蛾 (*Antheraea eucalypti* Scott) 的四个可持续性细胞系^[1]以来, 昆虫细胞培养技术得到了迅速的发展, 420 余株来自不同昆虫及组织的细胞系得以建立^[2]。目前为了满足科学研究和发展的多方面需要, 科学工作者们还在不断致力于新细胞系的建立。近年来, 以昆虫杆状病毒为载体, 以体外培养的昆虫细胞为受体的基因工程研究取得了突破性的进展, 昆虫杆状病毒已发展成为基因工程的一种安全有效的载体, 可在体外培养的昆虫细胞中高效安全表达外源基因, 生产出了具有重要医用价值, 具备天然活性的生物工程制品, 从而使昆虫细胞培养倍受青睐。目前世界上至少有 150 家公司上千个实验室在从事这方面的研究, 我国的科学工作者已经建立了 20 多株昆虫传代细胞系, 并利用昆虫细胞—杆状病毒表达系统成功表达了近 40 种外源蛋白^[3]。昆虫细胞培养作为一项极具产业化发展潜力的技术, 正在日益受到人们的关注。本文拟对昆虫细胞培养基、细胞系建立、昆虫细胞冻存、培养过程中遇到的污染以及昆虫细胞—杆状病毒表达系统的研究现状及发展趋势作一综合性概述。

1 昆虫细胞培养基的研究

体外培养昆虫组织的首创者是 Richard Goldschmiedt, 但他当时没有合适的昆虫细胞培养基。Trager 首次研究了培养基中昆虫细胞的生长条件, 目的是证明单个细胞能在体外存活几天, 并利用昆虫组织培养基研究昆虫和哺乳动物病毒^[4]。1956 年, Silver Wyatt 大大改进了用于家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) 蛹的培养基, 成功地使卵巢细胞存活了 14 d。他的培养基含有浓

收稿日期: 2003-06-23

基金项目: 国家林业局 948 项目“昆虫细胞系及细胞系库建立技术引进”(2002-52)

作者简介: 宋德伟(1976—), 男, 山东平度人, 硕士研究生。

* 通讯作者, E-mail: yingf @263. net

度与家蚕血淋巴成分相应的 21 种氨基酸、5 种盐、3 种有机酸、以及果糖、海藻糖和葡萄糖,并相应调解了 pH 值和渗透压^[5],这为昆虫细胞培养基的研究奠定了重要的基础。1956 年就在 Wyatt 发表论文时,Grace 在 Wyatt 溶液中增加了胆固醇,内分泌腺和卵巢组织的提取物以及含有 10 种 B 族维生素的混合物,使 4 龄家蚕幼虫的卵巢细胞存活了 29 d^[6]。从此,昆虫细胞培养基的研究便迅速的发展起来。到目前为止,至少已报道了 60 多种昆虫细胞培养基。细胞培养的关键是培养基配方的开发^[7]。目前已商品化的昆虫细胞培养基有:Grace 和 TC-100 等。常用的昆虫细胞培养基有 Grace ,BML-TC/10 ,IPL-41 ,MGF-443 ,MGF-448 ,MGF-450 和 MM 培养基等^[8]。

通常的昆虫细胞培养基都需要补加 3%~15% 的血清,在普通培养基中,如不加血清,绝大部分细胞将不能增殖^[9]。但以血清作为添加物,存在许多难以克服的困难:如血清来源困难,价格昂贵,质量不稳定,批次之间的差异大,重复性差;血清是支原体和和其它异源病毒的重要来源;另外,血清成分十分复杂,给基因工程表达产物的后处理带来困难,所以开发无血清昆虫细胞培养基 (serum-free media ,SFM) 是今后昆虫细胞产业化的必然趋势。

昆虫细胞无血清培养基的研究始于 20 世纪 60 年代末和 70 年代初,发展无血清培养基,必须寻找适当的具有类似于血清功能的因子,由于血清成分复杂,具有多种促细胞生长和增殖的因子,因此要找到血清的替代物是相当困难的^[10]。目前,通常的添加物有酵母自溶物、细菌蛋白胨、细菌胰蛋白胨、蛋黄乳液、酵母抽提物水解乳蛋白及微量元素等。近几年无血清昆虫细胞培养基得到了很大的发展,先后研制出了 SFM-5、CDM、EX-CELL400、ISFM、CDC 等。实验证明,无血清培养基是可行的,如 GIBCO 公司的无血清培养基 SF-900II 适于 Sf1-21、Sf-9、Tr-368、舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linnaeus) 和果蝇 (*Drosophila* sp.) 等细胞的培养^[3]。我国的戴琥等用来自粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni* Hübner) 的卵细胞株 BTF-TN-5B1-4 从含 5% 胎牛血清 (FBS) 的培养基经过 3%、2%、1% FBS 的血清含量递减培养,最终可适应无血清培养基 IC-SFM,适应后,细胞在无血清培养基中的活性一直维持在 90% 以上,接种细胞密度可达 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个 mL^{-1} ^[11]。值得一提的是日本的三桥淳先生曾用海水替代培养基中的无机盐,用食糖代替葡萄糖,补加水解乳蛋白和酵母提取物等研制出了一种无血清培养基,大大降低了成本^[12]。三桥淳的研究还表明,从含 3% FBS 的 MM 培养基中去掉 FBS,即 MM-SF 培养基也能进行各种细胞株的培养^[13]。昆虫细胞无血清培养基的发展还不十分完善,但其发展前景毋庸置疑。更为重要的是,目前已有许多研究表明,无血清培养基可用来大量生产病毒和表达重组蛋白,这些结果表明无血清培养基具有十分广阔的应用前景。

2 昆虫细胞系的建立

建立合适的可稳定传代的昆虫细胞系对于体外进行体细胞遗传学、昆虫抗性机理、通过杆状病毒等昆虫病毒在昆虫细胞内的感染、复制来有效杀灭害虫以及利用昆虫细胞—杆状病毒表达系统进行外源蛋白的表达等研究都是一项极为重要的基础性工作。所以人们一直在不断地进行新细胞系建立的研究,目前已有数百个昆虫细胞系问世。进行昆虫细胞的原代培养,通常使用蛹或幼虫的卵巢组织、全蛹、幼虫血细胞、血淋巴或早期胚胎组织。我国已报道了 20 余个昆虫细胞系,其中较常见的昆虫细胞系如下^[14~23]。

2.1 双翅目(Diptera)

白纹伊蚊(*Aedes albopictus* Skuse)细胞系 Aa₂-678, Aa₆-678, Aa-778; 中华按蚊(*Anopheles sinensis* Wiedemann)细胞系 As-684。

2.2 鳞翅目(Lepidoptera)

小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)细胞系 BCIRL-Px₂-HNU₃; 黄条行军虫(*Spodoptera ornithogalli* Guenée)细胞系 BCIRL-So₃-HNU₁ 和 BCIRL-So₄-HNU₂; 棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hübner)细胞系 SIE-Ha-798 和 SIE-Ha-806; 棉铃虫血细胞株 SIE-Ha-806; 斜纹贪夜蛾(*Spodoptera litura* Fabricius)细胞系 ZSU-S1-1; 粘虫(*Leucania separata* Walker)血细胞株 SIE-LSH805; 小埃尺蛾(*Ectropis oblique* Warren)蛹卵巢细胞株 SIE-Eo-801; 家蚕(*Bombyx mori* Linnaeus)胚胎细胞系 BmF₂₁-HNU₅; 甜菜夜蛾(*Laphygma exigua* Hübner)血细胞系 Le-H-HNU₇; 银纹夜蛾(*Plusia agnata* Staudinge)细胞系 Pa-E-HNU₆; 八字地老虎(*Xestia c-nigrum* Linnaeus)细胞系 NEAU-AC730 和 NEAU-AC21。

虽然已建立了很多的昆虫细胞系,但迄今为止,研究和应用得最多的是草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith)细胞系 Sf-21 及其克隆株 Sf-9。随着 BEVS 朝着应用方面发展,为了选育高水平表达重组蛋白的昆虫细胞系来用于生产,通过对不同来源的昆虫细胞进行了多次比较,确定了 BTF-Tr-5B1-4(简称 5B1)在增殖多角体病毒和表达重组蛋白水平最高^[24], 5B1 因此而驰名,并被申请了专利,在商业上称之为“高五”细胞(high 5)。由此可见,建立新的高水平表达重组蛋白昆虫细胞系,对我国病杆状病毒表达载体的基因工程研究及其生产非常重要。华中师范大学的洪华珠等^[2]报道了用粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni* Hübner)的脂肪体细胞系建立了一株高水平表达外源蛋白的细胞系。经初步研究,此细胞系在表达重组蛋白和增值核型多角体病毒方面比草地贪夜蛾 Sf-21 细胞的水平高出一倍,于 5B1 相当,显示出非常好的应用前景,为我国的外源重组蛋白表达研究奠定了基础。

3 昆虫细胞培养过程中微生物的污染

与培养的细胞无关的杂质混入培养系统,统称为污染(contamination)。细胞培养中微生物的污染的严重性已引起人们的普遍关注,尤其是有重要应用价值的细胞株。但目前有关昆虫细胞培养污染研究的报道不多,所以,哺乳动物细胞培养的相关经验是具有重要参考价值的。

3.1 污染的检测

在昆虫细胞的原代和继代培养过程中,与其它细胞培养一样会受到细菌、真菌、病毒和支原体等的污染。在细胞培养过程中若怀疑细胞受细菌污染时一般将细胞悬液离心后用无菌 PBS 洗涤两次,加入无抗生素的培养液后,置于 37℃ 培养箱中培养。如果真的受到细菌污染就可以在 24 h 内因细菌的大量繁殖而观察到阳性结果^[25]。经作者初步观察,在昆虫细胞培养中,不加抗生素的培养基如果受到细菌的污染,25℃ 条件下一般会在 48 h 内观察到培养液浑浊。污染了酵母菌(*Saccharomyces* spp.)的细胞,类似细菌的污染,在倒置相差显微镜下可以观察到圆形或卵圆形的酵母菌,开启培养器皿,可闻到发酵的异味。被青霉菌(*Penicillium* spp.)污染的细胞,在倒置相差显微镜下可以观察到呈丝状或树枝状生长的菌丝。

细菌和真菌的污染的检测相对来说较为容易,最使人们感到头痛的是支原体和病毒的污染。判断细胞是否受到病毒污染其难点在于病毒种类的复杂性和相应宿主细胞的特异性^[26]。

感染了病毒的宿主细胞形态学上不一定有显著的特异性变化,因此仅根据目测或显微镜观察到的细胞形态学变化来判断病毒的污染是不充分的^[27]。应根据不同的病毒选用不同的方法,如红细胞吸附试验、接种鸡胚或实验动物、与已知的宿主细胞进行联合培养,以及利用特异的血清学反应和 PCR(多聚酶链反应)方法等。在生物学研究中,细胞培养的支原体污染是一个严重的问题,支原体的发生也许比预想的还要高^[28]。有报道称,目前世界上有 30%~50%的细胞系(株)已受到支原体污染。在培养细胞的过程中,如果显微镜下发现破碎的细胞很多,细胞需要频繁的改善营养环境才能支持长期传代培养时,应该怀疑是支原体的污染。当有一定经验后,在光镜下即可根据细胞的形态(包括 CPE)、细胞的折光率变化和表面光滑程度等作出初步判断。用姬姆萨(Geimsa)或地衣红(orcein)染色后观察,都可在支原体分布区看到颗粒状的染色。除此之外的方法还有直接培养法、免疫荧光法、荧光染色技术(霍氏染色法)、DNA 分子杂交检查法、PCR(多聚酶链反应)方法等^[29]。目前关于支原体污染的报道大多是基于脊椎动物细胞研究的基础上的,昆虫细胞支原体污染的研究尚需要进一步的研究。

3.2 污染的排除

培养的细胞受到污染以及排除污染的措施都有可能影响细胞的生物学性状。为保证实验的可靠性和防止污染的进一步蔓延,受到污染的细胞应尽早销毁。但一些有价值的细胞株如被污染则需要挽救,现在用来消除污染的方法^[30]主要用抗生素、巨噬细胞共培养、小鼠皮下腹腔过继培养等。

中国生物制品药品检定所^[31]用小鼠体内、体外加用不同抗菌素处理和克隆的方法处理细胞污染的支原体,3 株细胞经 2 次、1 株细胞经 3 次处理后,经培养方法、DNA 染色法及 PCR 法检查支原体污染均为阳性,并证明对其抗体分泌没有任何影响,是一个较为理想的去除支原体的方法,从而使被支原体污染的细胞重新应用成为可能。

昆虫细胞污染的检测和排除大多仍是借鉴脊椎动物细胞培养中的经验,但由于昆虫细胞培养基较之脊椎动物细胞的培养基成分更为复杂,而且,昆虫细胞和脊椎动物细胞的理化特性有很大不同,所以关于昆虫细胞培养污染的问题是今后研究中需要解决的重点。

4 昆虫细胞的冻存与复苏

在体外培养昆虫细胞工作中,为了保种和长期保存昆虫细胞的活性,必须将细胞进行冷冻保存,并在需要进行复苏培养。Knudson 和 Bckley^[32]曾指出,脊椎动物细胞冻存方法也适用于昆虫细胞的冻存,但在冻存和复苏的方法上不尽相同。Spallanzani 在 1776 年最早发表了冷处理对细胞生命活动的影响报道。1949 年,Polge 等人发现了甘油对低温贮存的细胞的保护作用。1959 年,Lovelock 等人发现了一种新的化学保护剂,这就是人们所熟知的二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)。但三桥淳指出,以甘油作为保护剂来冻存昆虫细胞同样可以取得很好的效果^[33]。

4.1 冷冻保存方法

按冷冻保护液在冻结后是否形成冰晶来划分,冻存方法可分为非玻璃化和玻璃化冻存两种。非玻璃化冻存是利用各种温级的冰箱分阶段降温至 -70~-80℃,或者用程序降温仪逐级降温然后投入液氮中保存。玻璃化冷冻则是指利用多种高浓度保护剂组合成的玻璃化冷冻保护液悬浮细胞,直接投入液氮中进行保存的方法,该方法冻结的细胞悬液无冰晶形成^[34],

但目前前一种方法更为常用。

在昆虫细胞保存方面我国的科学工作者也作了一些有益的尝试,金立杰等^[35]报道了将生长旺盛期的昆虫细胞直接置于 4℃ 冰箱中,可保存 1 个月,经两次传代可恢复至正常。黎路林、陈曲候^[36]报道在 4 ~ 10℃ 条件下可保存昆虫细胞 60 d 以上。胡有健、刘栖干^[37]报道,在 4℃ 条件下保存茶尺蠖卵巢细胞株取得良好的效果。但如果需要长期保存细胞,目前的方法还是限于液氮和超低温冰箱。

不同的昆虫细胞,其最适冻存速率、解冻温度、解冻速度以及保护液的选择等是有一定差别的,对于一个新的细胞系,为了使细胞得到最佳的保存,其冻存方法需要进行不断的摸索和研究。

4.2 冻存昆虫细胞的复苏

非玻璃化冻存细胞复苏一般是在水浴中完成复温,经离心去除冻存液,将细胞加入新鲜培养基进行培养。昆虫细胞一般则需要热水浴中复苏,当冻存管中的冰刚要全部融解的时候马上将冻存管拿出水浴^[33],细胞冻存悬液一旦融解后,要尽快离心弃除冻存液防止冷冻保护剂对细胞产生毒性。

玻璃化冻存细胞的复温则需要在 4℃ 冰浴中进行,避免室温下冷冻保护剂对细胞产生毒性。稀释过程也要缓慢进行,保证足够时间让冷冻保护剂从细胞内渗出到细胞外,已达到细胞内外平衡,避免高渗透压的损伤。

5 昆虫细胞—杆状病毒表达系统(BEVS)

以杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达外源基因系统是在 20 世纪 80 年代发展起来的真核表达系统。1983 年 Smith 和 Summers^[38,39]首次重组了 AcMNPV,成功地在草地贪夜蛾细胞 Sf-9 中表达了人的 α -干扰素。随后 Maeda 等^[40]又用 BmNPV 为载体,在家蚕幼虫体内高水平表达了人的 α -干扰素。到目前为止,国内外的科学工作者已利用昆虫细胞表达系统成功表达了 300 余种不同的蛋白质。例如人干细胞因子、乙肝病毒、人 α -干扰素、人 α 型肿瘤坏死基因、HIV-1 核蛋白 P24、鸡马立克病病毒糖蛋白 B 抗原基因、弓形虫表面抗原 P30、烟草天蛾的保幼激素环氧化水解酶和蛙酰胺酶等;并且利用该表达系统对人乙酰胆碱酯酶、人透明带蛋白、人胃脂肪酶、催乳素、促性腺素、人体免疫缺陷病毒(HIV)蛋白水解酶以及植物自交不亲和基因等进行了研究^[41~48]。目前,杆状病毒表达系统已得到了广泛的应用,它已成为基因工程四大表达系统之一(另三种是细菌、酵母和哺乳动物表达系统)。

5.1 BEVS 的特点

BEVS 作为表达外源基因,生产重组蛋白的一个表达系统,已经越来越受到人们的重视并得到广泛的应用。这主要是因为它同细菌、酵母、植物以及哺乳动物表达系统相比具有很多方面的优势,如具有较高的重组蛋白表达水平,可容纳较大外源 DNA 的插入,可以同时表达多个外源基因;并且用其生产出的重组蛋白的生物活性、抗原性和免疫原性都与天然蛋白极为相等^[49]。同样为真核表达系统,昆虫细胞还具有较易培养和生长等优势^[50],与哺乳动物细胞相比,昆虫细胞可悬浮培养,还可在无血清培养基中培养,给表达产物的纯化带来了方便,它的后加工过程较完全,成本低且安全^[3]。此外,经细胞培养获得重组病毒后,还可在宿主昆虫幼虫、蛹体内进行表达,这更是哺乳动物细胞所难以比拟的。但杆状病毒具有瞬时表达的缺点,

即病毒感染最终导致细胞死亡,因此必须重新启动感染,每一轮蛋白质合成都必须再感染新鲜培养的细胞,这对商品化生产无疑是个缺点。此外还存在糖基化问题,在昆虫细胞中表达产物糖基化过程与脊椎动物细胞有所不同。在昆虫细胞中形成的糖蛋白相对简单,多不分枝侧链,而且甘露糖成份高。产生的糖蛋白在变性 PAGE 中泳动率较大,分子质量往往较天然糖蛋白小。

但已有报道称,可以利用细胞稳定转化的方法使昆虫转化细胞系无需病毒感染即可提供连续不断的外源基因表达,并且这一方法已成功地用于鳞翅目和双翅目昆虫细胞系,用上述系统表达的产物其分泌性和糖基化程度远远优于 BEVS 表达系统^[51]。由此可见,昆虫细胞稳定性转化系统不失为 BEVS 系统的极好补充。

5.2 昆虫细胞的大规模培养

大规模培养昆虫细胞的方法很多,综合起来可分为两种类型:贴壁细胞培养和悬浮细胞培养^[52]。前者以滚瓶培养和微载体方法为主,后者则常用转瓶培养、气升发酵罐和灌注培养等方法。Sf-9 细胞已能在气升式(airlift)和涡旋搅动式(stirred-sparged)生物反应器中大量悬浮培养,规模可达 3 ~ 90 L,细胞倍增时间 18 ~ 24 h,细胞密度可达 5×10^6 个 mL^{-1} ,与传统的贴壁培养相接近。IPLB-Sf-21 和粉纹夜蛾细胞也己能用生物反应器大量悬浮培养。其他细胞株如伊蚊、Schneider、Drosophila、Tr-368、Sf-1PLB 等均有悬浮培养的报道^[4]。

昆虫细胞的培养和杆状病毒的生产不仅在生产规模上、而且在生产工艺流程的设计、培养条件的优化和培养基的改进等方面,都取得了很大的进展。甲基纤维素、抗泡沫剂和 pluronic polyol F-68 的应用,通气设备的改进等使昆虫细胞脆性和高氧需要等限制因素也得到了很好的解决^[53]。

6 研究展望

随着昆虫细胞培养技术和分子生物学、基因工程研究突飞猛进的发展,昆虫细胞系已被越来越广泛地应用于各个研究领域,昆虫细胞培养技术从单纯的生物离体培养技术逐渐变为一种许多生物学研究都需要的常规研究手段,昆虫细胞系也将逐步成为各个研究领域开展研究的必备材料。在生物杀虫剂研究方面,通过昆虫细胞的大规模培养和低成本培养基研究的不断深入,昆虫细胞的规模化和低成本培养将成为可能,利用这些技术开展昆虫细胞大量繁殖昆虫病原病毒、微孢子虫的研究,利用基因工程技术改良病毒粒子,提高毒力,并最终利用昆虫细胞的大规模培养繁殖昆虫病原病毒、微孢子虫,生产生物杀虫剂用于植物害虫的生物防治。在基础生物学研究方面,昆虫细胞系可用来开展昆虫遗传学、生物化学和生理学等学科的研究;利用昆虫杆状病毒作外源基因载体,在昆虫细胞系中表达,开展基因工程和分子生物学研究。在基础医学研究方面,利用昆虫细胞开展虫作媒介的人体病毒、原生动物的研究,研究这些引起人类疾病的病毒、原生动物的发育和侵染等;利用昆虫细胞系开展人类疾病基因研究;利用昆虫细胞系检测药物,特别是抗癌药物,进行毒理学研究。在基因药物研究方面,由于昆虫细胞—杆状病毒表达系统所具有的优越性,昆虫细胞工程已越来越显示出它的重要地位。利用病毒昆虫细胞表达系统高效表达人体基因,获得具有治疗疾病的干扰素等蛋白质、多肽和其他具有生物活性的物质,并最终利用昆虫细胞系作为生物反应器,生产基因工程药物和疫苗。目前,美国 FDA 已批准一批 NPV 表达系生产疫苗、药物用于临床试验和投放市场。

BEVS 系统产业化已初露头角,随着研究的进一步深入,昆虫细胞工程必将在生命科学领域发挥出更大的作用。

由于昆虫细胞培养和能够稳定传代的昆虫细胞系在基础生物学研究、遗传学研究、基因工程研究和生物杀虫剂的研究等诸多方面都有非常重要的地位,可以预测,昆虫细胞培养技术及其相关研究将会得到更广泛的关注和应用。针对目前我国只有 20 余株昆虫细胞系的状况,中国林业科学研究院资源昆虫研究所在国家林业局 948 项目“昆虫细胞系及细胞系库建立技术的引进”的资助下,通过自建和收集国内外的昆虫细胞系,建立我国的第一个专业昆虫细胞库,为我国的生物技术、分子生物学、生化和遗传研究提供必要的技术和物质储备。

综观昆虫细胞工程的历史、现状和发展趋势,笔者认为,要使昆虫细胞工程技术在研究和产业化方面得到广泛的应用,今后应重点加强以下几个方面研究:(1)加强无血清培养基配方的研制和开发,以此来进一步降低生产成本,新一代培养基将是一种既无血清,无蛋白,又可以高温消毒的适合于多种不同细胞生长的全能型培养基。(2)加大建立新昆虫细胞系的力度,按最保守估计世界上至少有 300 万种昆虫,占动物界种类的 $2/3 \sim 3/4$,而世界目前也只不过建立了 420 余株昆虫细胞系,而且其中已建立的昆虫细胞系多集中在鳞翅目和双翅目,因此建立更多新的细胞系,筛选出更加高效的表达系统无疑是十分必要的。(3)加强昆虫细胞规模化培养方法的研究,昆虫细胞大规模培养技术的完善和成熟,将为昆虫细胞培养在各个方面应用、以及基因工程药物的研究和产业化、病毒杀虫剂的产业化奠定必要的基础。

参考文献:

- [1] Grace T D C. Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*[J]. Nature, 1962, 195: 788 ~ 789
- [2] 洪华珠,彭建新. 一株高水平表达重组蛋白昆虫细胞系的建立[J]. 昆虫学报, 2001, (3): 144: 276 ~ 279
- [3] 张传溪. 昆虫分子科学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 271 ~ 276
- [4] Trager W. Multiplication of the virus of equine encephalomyelitis in surviving mosquito tissues[J]. J Trop Med, 1938, 18: 387
- [5] Wyatt S. Culture *in vitro* of tissue from the silkworm, *Bombyx mori* L[J]. Gen Physiol, 1956, 39: 841 ~ 852
- [6] Grace T D C. The prolonged growth and survival of ovarian tissue of the promethan moth *in vitro*[J]. En Physiol, 1958, 41: 1027 ~ 1034
- [7] Gossen M F. Insect Cell Culture Engineering[M]. New York: Marcel Dekker Inc. 1993. 184
- [8] 河原烟勇. 昆虫细胞培养技术的开发及应用[J]. 国外农学——蚕业, 1993, 53: 45 ~ 54
- [9] Gotoh T, Miyazaki Y. Investigation of sequential behavior of carbosyl protease and cysteine protease activities in virus infected Sf-9 insect cell culture by inhibition assay[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56(5/6): 742 ~ 749
- [10] Mitsuhashi. Development of insect cell culture media for biotechnology[A]. 1991 World Congress on Cell & Tissue Culture. Anaheim, CA. 1991
- [11] 戴琥, 赵佼, 谭文松. 无血清培养昆虫细胞(BT-Tn-5B1-4)的适应过程[J]. 生物工程学报, 2002(3): 232 ~ 234
- [12] Mitsuhashi J. Invertebrate and fish tissue culture[J]. Japan Scientific Societies Press, 1987(12): 29 ~ 32
- [13] Mitsuhashi J. Invertebrate tissue culture methods[J]. Pringer-verlag Tokyo, 2002(5): 23 ~ 29
- [14] 潘李珍, 孔德芳, 王凤云, 等. 白蚊伊蚊细胞系的建立[J]. 实验生物学报, 1980, 13(2): 147 ~ 153
- [15] 潘李珍, 石梦辉, 张漪, 等. 中华按蚊(*Anopheles sinensis*)细胞系的建立和特征[J]. 细胞生物学杂志, 1989, 11(2): 78 ~ 82
- [16] 陈曲候, 麦克塔西, 伊格诺夫. 黄条行军虫(*Spodoptera ornithogalle*)二个传代细胞系的建立[J]. 华中师范学院学报, 1983(3): 99 ~ 103
- [17] 陈曲候, 麦克塔西, 伊格诺夫. 菜蛾科小菜蛾(*Plutella xylostella*)细胞系的建立[J]. 华中师范学院学报, 1984(3): 101 ~ 108
- [18] 陈曲候, 谢荣栋. 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 一个新细胞系的建立[J]. 昆虫学研究集刊, 1983(3): 129 ~ 136
- [19] 沈立美. 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 血细胞株的建系报道[J]. 细胞生物学杂志, 1984, 6(2): 94 ~ 99

- [20] 谢伟东,曲士芮,庞义.斜纹贪夜蛾(*Spodoptera litura* Fabricius)细胞系的建立[J].中山大学学报,1988(4):113 ~ 116
- [21] 刘栖干,胡有健,沈立美.茶尺蠖蛹卵巢细胞株的建立[J].昆虫学研究集刊,1981(2):123 ~ 128
- [22] Kuroad Y,Lurastak E,Maramrosch K. Invertebrate and Fish Tissue Culture[M]. Tokyo:Japan Societis Press,1988. 259 ~ 261
- [23] 余泽华,彭坚信,黎路林,等.昆虫学研究文集[C].北京:北京农业大学出版社,1990. 7 ~ 10
- [24] Wickham T J,Davis T,Granados R R,et al. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system[J]. Biotechnol Prog,1992,8:391 ~ 396
- [25] 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001. 136 ~ 144
- [26] Roberts D C,Trevan D J. A versatile microscope chamber for the study of the effects of environmental changes on living cells[J]. Roy Microsc,1961,79:361 ~ 366
- [27] 戴华生.新实验病毒学[M].北京:中国学术出版社,1983. 70 ~ 72
- [28] 何大澄.细胞培养中支原体的污染及检测[J].细胞生物学杂志,1984,6(4):153 ~ 156
- [29] 卢锦汉.细胞培养感染支原体及其检测技术[A].见:卢锦汉,章以浩,赵锐.医学生物制品学[M].北京:人民卫生出版社,1995. 212 ~ 220
- [30] 尹红章.细胞培养物中污染支原体的去除[J].微生物学免疫学进展,1994(3):22 ~ 24
- [31] 郑从义.细胞培养物的低温保存[A].见:郑广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1997. 171 ~ 188
- [32] Knudson D L,Buckley S M. Invertebrate cell culture methods for the study of invertebrate associated animal viruses[J]. Methods in Virology,1977() :323 ~ 328
- [33] Mitsuhashi J. Invertebrate Tissue Culture Methods[M]. Tokyo, Springer-Verlag,2002. 41 ~ 42
- [34] 华泽钊.低温生物学研究的物理化学基础[A].见:郑广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1997. 226 ~ 297
- [35] 金立杰,薛伟钢,张士安.有效冻存昆虫细胞的新方法[J].生物技术,1996,40:23
- [36] 黎路林,陈曲候.一种贮存昆虫细胞系的简便方法[J].华中师范大学学报(自然科学版),1995(12):511 ~ 512
- [37] 胡有健,刘栖干.茶尺蠖蛹卵巢细胞株的冷冻保存试验[J].昆虫学研究集刊,1981(2):135 ~ 138
- [38] Smith G E,Vlak J M,Summers M D. Physical analysis of *Autorapolha californica* nuclear polyhedrosis virus and 10 000 molecular weight protein[J]. Virol,1983,45:215 ~ 225
- [39] Smith G E,Summers M D. Production of human beta interferon in insect cells infect with a baculovirus expression vector[J]. Mol Cell Biol,1983,13:183 ~ 192
- [40] Maeda S,Kawai T,Obinata Metal. Production of human 2-interferon in silkworm using a baculovirus vector[J]. Nature,1985,315:592 ~ 594
- [41] Plateborze Peter L. Expression of biologically active human butyrylcholinesterase in the cabbage looper[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry,2000,31(3):225 ~ 229
- [42] Wang Mingying. Pduction of functional hepatocyte growth factor(HGF) in insect cells infected with an HGF recombinant baculovirus in a serumfree medium[J]. Biotechnology Progress,2000,16(2):146 ~ 151
- [43] Harris Jeffrey D. Expression and purification on recombinant human zona pellucida proteins[J]. Protein Expression and purification,1999,16(2):298 ~ 307
- [44] Chen Xiaoguang. Expression of p30,the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* in BEVS and the evaluation of immune response induced by p30[J]. Journal of Protozoology Research,1998,8(1):19 ~ 27
- [45] Debernard Stephane. Expression and characterization of the recombinant juvenile hormone epoxide hydrolase from *Manduca Sexta*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,1998,28(5 ~ 6):409 ~ 419
- [46] Stokovskaya L I. The expression of recombinant human prolactin with use of the baculovirus vector on the basis of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus[J]. Dopovidi Natsional noyi Akademiyi Nauk Ukrainy,1970(1):166 ~ 169
- [47] Overton H A. The protease and gag gene products of the human immunodeficiency virus:Authentic cleavage and post-translational modification in an insect cell expression system[J]. Virology,1970(1):107 ~ 116
- [48] Zhang Dongmei. Expression of recombinant human stem cell factor in insect cells[J]. Weishengwu xuebao February,2000,40(1):

44 ~ 49

- [49] Dwight E Lynn. Insect cell culture[J]. *Biology and Applications for Biological Control*, 2001(7): 110 ~ 115
- [50] Murhammer D W. The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: Engineering aspects[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999(3): 283 ~ 292
- [51] 周亚竞, 张志芳, 张元兴, 等. 昆虫细胞培养研究进展[J]. *蚕业科学*, 2000, 26(11): 74 ~ 78
- [52] 邓宁, 陈曲候, 洪华珠. 昆虫细胞大规模培养和杆状病毒的生产[J]. *昆虫知识*, 1995, 32: 236 ~ 239
- [53] 小池胜. 通过大量培育昆虫细胞生产天敌病毒[J]. *国外农学——植物保护*, 1992(9): 26 ~ 30

Advances in Research of Insect Cell Engineering

SONG De-wei, MA Yan, FENG Ying, CHEN Xiaoming

(Research Institute of Resource Insect, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The advances in research of insect cell engineering at home and abroad since the establishment of the first insect cell line in 1960s were reviewed, which included the research of insect cell culture medium, establishment of insect cell lines, cryopreservation of insect cells, testing and solving of pollution during the course of the insect cell culture. The present research and future development of insect cell-baculovirus expression vector system were also discussed.

Key words: insect cell culture; insect cell lines; pollution; cryopreservation of cells; baculovirus