

离体昆虫细胞对 AcNPV 和 BmNPV 的 敏感性测定与分析

张欣, 冯颖*, 丁伟峰, 马涛

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所; 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要: 采用来源于 3 个目 14 种昆虫的离体细胞系对苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 AcNPV (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) 和家蚕核型多角体病毒 BmNPV (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) 进行敏感性测定。试验结果表明: 各昆虫细胞系对两种病毒的敏感性不同, 来源于双翅目及直翅目的细胞系均不能被这两种病毒感染; AcNPV 可侵染来源于鳞翅目的 Sf21、Sf9、HighFive、RIRI-PX 及 HZ, 宿主范围较广; 而 BmNPV 仅能侵染 BmN 细胞, 宿主专一。AcNPV 对 Sf9 细胞的感染率最高, 接种病毒 10 d 后感染率平均达 84.0%, 而 RIRI-PX 的 AcNPV 病毒产量最高, 形成的多角体数目为 43.9 PIBs/感染细胞。接种 BmNPV 10 d 后, BmN 的感染率为 72.2%, 形成的多角体数目为 23.1 PIBs/感染细胞。

关键词: 昆虫细胞系; AcNPV; BmNPV; 感染

中图分类号: S763 **文章标识码:** A

Survey and Analysis for Susceptibility of *in vitro* Cultured Insect Cell Lines to AcNPV and BmNPV

ZHANG Xin, FENG Ying, DING Wei-feng, MA Tao

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Fourteen insect cell lines from three orders were used to be infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) and *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV). The result showed that the susceptibility for two viruses were different among different insect cell lines. The cell lines which come from Diptera and Orthoptera could not be infected with AcNPV and BmNPV. The five cell lines, Sf21, Sf9, HighFive, RIRI-PX and HZ, which come from Lepidoptera, could be infected with AcNPV. The BmN cell line could be infected only with BmNPV. The infection rate of AcNPV to Sf9 was the highest, reached 84.0% after 10 days infection. RIRI-PX infected with AcNPV could produce the highest yield of polyhedral inclusion bodies which reached 43.9 PIBs/cell at 10 day post infection. The infection rate of BmNPV to BmN was 72.2% after 10 days infection, and the yield of polyhedral inclusion bodies was 23.1 PIBs/cell.

Key words: insect cell lines; AcNPV; BmNPV; infection

近年来,离体昆虫细胞作为昆虫生理生化研究、生物反应器以及表达基因产物等的重要研究工具,受到越来越广泛及深入的研究和利用^[1]。特别是自 Smith 等^[2]创建了昆虫杆状病毒表达系统以来,昆虫

杆状病毒作为一种安全、高效的表达载体被广泛应用,从而使昆虫细胞培养倍受青睐。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, 简称 AcNPV) 和家蚕核型多角体病毒

收稿日期: 2011-01-10

基金项目: 林业公益性行业科研专项(编号:4-38)

作者简介: 张欣(1981—),女,云南彝良人,助理研究员,主要从事昆虫细胞工程相关研究。

* 通讯作者。

(*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, 简称 BmNPV) 表达系统是目前最主要的两类昆虫杆状病毒表达系统^[3]。利用杆状病毒—昆虫细胞表达系统除了能工业化生产重组病毒杀虫剂之外,还可以高效生产许多外源蛋白^[4]。1983年 Smith 等^[2]首次重组了 AcMNPV, 成功地在草地贪夜蛾细胞 Sf29 中表达了人的 β -干扰素。随后 Maeda 等^[5]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。我国的科学家也利用 AcNPV 表达了人可溶性白细胞介素-6 受体^[6]、天蚕抗菌肽^[7]等,利用 BmNPV 表达了人表皮因子信号肽融合蛋白^[8]、猪繁殖与呼吸综合征病毒的蛋白^[9]等。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^[10]。杆状病毒—昆虫细胞离体培养系统的发展,促进了病毒感染机制、病毒形态发生、病毒与宿主的相互作用、病毒毒株分离的发展,并为大规模培养昆虫细胞生产病毒奠定了基础^[11]。

目前,昆虫细胞对昆虫病毒的敏感性几乎成为了昆虫细胞的生物学特性之一^[12-14],昆虫细胞对于感染病毒并不具有同一性,一般均采用与昆虫细胞来源虫种或亲缘关系较近的病毒来测试昆虫细胞的病毒敏感性,杆状病毒的宿主域一直是生物学比较感兴趣的研究内容,自然界中杆状病毒具有高度的宿主特异性,一种病毒往往只能感染亲缘关系较近的少数几种昆虫^[15]。在利用昆虫细胞表达杆状病毒时,大部分细胞系只能被与来源于亲缘性较近的昆虫的杆状病毒感染^[16-18],有的昆虫细胞系甚至不能感染与来源于其同源性昆虫的杆状病毒^[19];但也有昆虫细胞系能感染来源于不同目昆虫的杆状病毒的报道^[20]。本文利用目前应用最为广泛的杆状病毒 AcNPV 和 BmNPV 对来源于鳞翅目、双翅目及直翅目的 14 种昆虫细胞系进行侵染测定,以期找出高水平表达 AcNPV 和 BmNPV 病毒的细胞系,为昆虫细胞与病毒的关系研究,以及昆虫细胞用于外源基因表达、病毒扩增及病毒杀虫剂等研究奠定科学基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试细胞系 本文采用来源于 3 个目的 14 种离体昆虫细胞系进行侵染测定,其中,鳞翅目细胞为: Sf21 (来源于草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda* Smith) 卵巢细胞), Sf9 (来源于草地夜蛾卵巢细胞克

隆株), HighFive (来源于粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni* Hübner) 卵巢细胞), NIAS-MaBr-85 (来源于甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae* Linnaeus) 5 龄幼虫脂肪体细胞), Ae (来源于桉大蚕蛾 (*Antheraea eucalypti* Scott) 卵巢细胞), FRI-SpIm-1229 (来源于桑斑血灯蛾 (*Spirosoma imparilis* Butler) 5 龄幼虫脂肪体细胞), HZ (来源于美洲棉铃虫 (*Heliothis zea* Boddie) 蛹卵巢细胞), NIAS-Px-58 (来源于柑橘凤蝶 (*Papilio xuthus* Linnaeus) 卵巢细胞), RIRI-PX (来源于柑橘凤蝶新孵幼虫细胞), BmN (来源于科家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) 胚胎细胞)。双翅目细胞为: *Aedes albopictus* (来源于白纹伊蚊 (*Aedes albopictus* Linnaeus) 新孵幼虫细胞), SL2 (来源于黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster* Smith) 胚胎细胞), TRA-171 (来源于巨蚊 (*Toxorhynchites amboinensis* Doleschal) 幼虫细胞)。直翅目细胞为: RIRI-GG1 (来源于短翅鸣螽 (*Gampsocleis gratiosa* Wattenwy) 胚胎细胞)。

以上细胞均由中国林业科学研究院资源昆虫研究所保存,其中, RIRI-PX 及 RIRI-GG1 为自建细胞系。

1.1.2 供试病毒 AcNPV (苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*))、BmNPV (家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*)), 由江苏大学生命科学研究院提供。

1.2 方 法

1.2.1 病毒对细胞的感染 取对数生长期细胞,调配成 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 浓度,接种到培养瓶中,每瓶 10 mL。培养 2 ~ 3 h 后,弃去培养基,留下贴壁细胞。将制备好的病毒液接种于该细胞 (感染复数 MOI = 10), 每瓶 100 μ L。每天观察细胞被感染的情况,在接种病毒 10 d 后,以细胞中出现多角体为感染,计算细胞感染率,重复 3 次,取其平均值。用冻融法裂解病毒感染细胞,充分释放多角体,利用血球计数板计算出多角体的浓度。

1.2.2 病毒感染滴度 (TCID₅₀) 测定 以原浓度为基本浓度单位,将病毒液用细胞培养基以 10 倍稀释法稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 等 8 个浓度梯度,加入同体积的 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 浓度的细胞悬液混匀。取 96 孔板,加入各级病毒细胞混匀液 0.1 mL,每个浓度加 11 个孔,其余 8 个孔加入用培养基稀释 1 倍的细胞液作对照。96 孔板用封口膜封好,在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中静止培养 10 d

后,在显微镜下观察,以产生多角体为感染特征,按照 Reed-Muench 算法测定了各病毒感染细胞系的(半数组织培养感染剂量)TCID₅₀值,即:

$LgTCID_{50}$ = 高于 50% 感染率稀释度的对数 - (高于 50% 的感染率 - 50%) / (高于 50% 的感染率 - 低于 50% 的感染率)。

2 结果与分析

2.1 离体昆虫细胞系对 AcNPV 和 BmNPV 的敏感性

接种病毒 5 d 及 10 d 后,观察细胞对病毒的敏感性。各昆虫细胞系对两种病毒的感染性不同(表 1),本文试验采用的 3 种双翅目细胞系及 1 种直翅目细胞系在接种 AcNPV 和 BmNPV 10 d 后细胞核内无多角体形成,细胞液不表现任何病理变化,表明这 4 个细胞系对鳞翅目昆虫病毒 AcNPV 和 BmNPV 均不具有敏感性;而 10 种来源于鳞翅目昆虫细胞系中,3 个夜蛾细胞系、1 个柑桔凤蝶细胞系、1 个棉铃虫细胞系细胞核内产生多角体,对 AcNPV 表现出感染特征,家蚕离体细胞系被 BmNPV 感染后细胞核内产生多角体,表现出感染特征。不同细胞对病毒的敏感性具有差异,接种病毒 5 d 后,Sf21、Sf9、High-Five 及 RIRI-PX 细胞被 AcNPV 侵染,BmNPV 仅能侵染 BmN 细胞;接种病毒 10 d 后,Sf21、Sf9、High-Five、RIRI-PX 及少部分 HZ 细胞能被 AcNPV 侵染,而 BmNPV 仍然仅能侵染 BmN 细胞。结果表明:AcNPV 的侵染宿主较广,BmNPV 对 BmN 细胞侵染具有专一性。

表 1 14 种昆虫细胞对 AcNPV 和 BmNPV 的敏感性

细胞系	感染结果			
	AcNPV		BmNPV	
	5 d	10 d	5 d	10 d
Sf21	++	++	-	-
Sf9	++	++	-	-
High Five	++	++	-	-
NIAS-MaBr-85	-	-	-	-
Ae	-	-	-	-
FRI-SpIm-1229	-	-	-	-
HZ	-	+	-	-
NIAS-Px-58	-	-	-	-
RIRI-PX	++	++	-	-
BmN	-	-	++	++
Aedes albopictus	-	-	-	-
SL2	-	-	-	-
TRA-171	-	-	-	-
RIRI-GG1	-	-	-	-

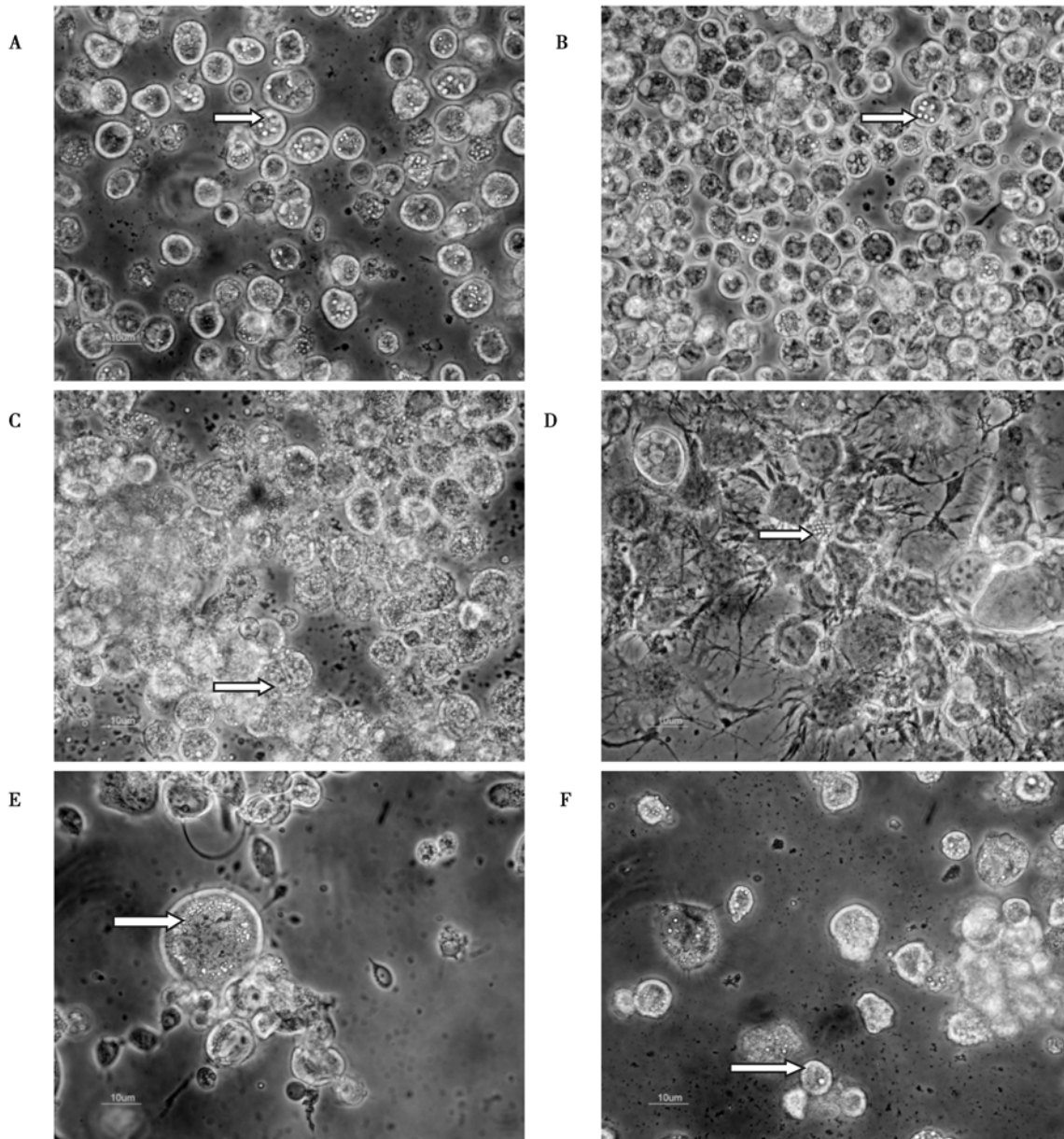
注:“++”细胞感染特征明显,大部分细胞被感染,“+”表示细胞感染特征不明显,少量细胞被感染,“-”表示细胞不能被病毒感染。

2.2 感染离体昆虫细胞系的病毒产量及病毒感染滴度(TCID₅₀)测定

2.2.1 AcNPV 感染离体昆虫细胞系的敏感性及其病毒感染滴度(TCID₅₀)测定 接种病毒 10 d 后,Sf21、Sf9、HighFive、HZ 及 RIRI-PX 能被 AcNPV 侵染,但感染效应不同。Sf21 与 Sf9 细胞对 AcNPV 感染情况相似,均较为敏感,接种病毒 24 h 后即可观察到部分细胞开始膨大,细胞边缘变得不整齐和模糊,核内产生了多角体,5 d 后大部分细胞已经感染了 AcNPV,且多角体体积较大,10 d 时可见游离于培养基内的多角体(图 1A、B)。High Five 在接种病毒 24 h 变化不明显,48 h 后可观察到部分细胞聚集,核膜膨大,少数细胞内开始有多角体颗粒出现,5 d 时细胞被感染现象明显,10 d 后多数细胞被感染,有部分多角体释放于培养液中(图 1C)。HZ 细胞对 AcNPV 较不敏感,接种病毒 5 d 后未见细胞核内有多角体形成的现象,但随着接种时间的增长,逐渐观察到有少数细胞内产生多角体,接种病毒 10 d 后可观察到有小部分细胞核内形成多角体(图 1D)。RIRI-PX 细胞在接种病毒 72 h 后即可观察到部分细胞内产生了多角体,部分细胞的细胞核膨大明显,单个细胞内的多角体数量较多,细胞边缘也变得不整齐,部分细胞失去贴壁习性,5 d 后约 1/3 细胞感染,10 d 时细胞内多角体数量增加,但破裂释放多角体的细胞很少(图 1E)。接种病毒 10 d 后进行感染率及产量的统计(表 2),结果表明:5 个细胞系对病毒的感染性及病毒产量并不具统一性,其中,Sf9 细胞对 AcNPV 的感染率最高,为 84.0%,而每个感染细胞形成的多角体数 RIRI-PX 最高,为 43.9 个。采用病毒 10 倍稀释法和 96 孔板培养,细胞的感染情况见表 3,按照 Reed-Muench 算法测定 AcNPV 感染 Sf21 等细胞系的 TCID₅₀值(表 4),Sf21 与 Sf9 的 TCID₅₀值最高,为 3.75×10^{-7} 。实验结果表明:从离体昆虫细胞对病毒等敏感性、TCID₅₀值等可见,AcNPV 对与原宿主细胞亲缘关系近的 Sf21 与 Sf9 细胞侵染性更强。

表 2 感染昆虫细胞对 AcNPV 和 BmNPV 的感染率及产量

细胞系	感染病毒	细胞感染率/%	多角体产量	
			多角体浓度 ($\times 10^6$ PIB · mL ⁻¹)	多角体产量 (PIBs/感染细胞)
Sf21	AcNPV	68.8	15.3	22.2
Sf9	AcNPV	84.0	10.7	12.7
High Five	AcNPV	51.4	8.1	15.8
HZ	AcNPV	23.0	1.9	8.2
RIRI-PX	AcNPV	39.8	17.5	43.9
BmN	BmNPV	72.2	16.7	23.1



A. AcNPV 感染 Sf21; B. AcNPV 感染 Sf9; C. AcNPV 感染 High Five; D. AcNPV 感染 HZ;
E. AcNPV 感染 RIRI-PX; F. BmNPV 感染 BmN

图1 细胞系感染病毒后的形态变化(箭头处为产生的多角体)

2.2.2 BmNPV 感染离体昆虫细胞系的敏感性及其病毒滴度(TCID₅₀)测定 试验发现 BmNPV 仅能感染 BmN 细胞,细胞接种病毒 24 h 即可以见到细胞核膨大,48 h 可以见到部分细胞内产生了多角体,到 5 d 后大部分细胞已经感染了 BmNPV,10 d 时可见游离于培养基内的多角体(图 1F)。此时对其进

行感染率及产量的统计,BmN 对 BmNPV 的感染率为 72.2%,每个感染细胞形成的多角体数为 23.1 个(表 2)。采用病毒 10 倍稀释法和 96 孔板培养,细胞的感染情况见表 3,按照 Reed-Muench 算法测定 BmNPV 感染 BmN 细胞系的 TCID₅₀ 值为 3.63×10^{-7} (表 4)。

表3 感染昆虫细胞对不同浓度 AcNPV 和 BmNPV 的感染率

%

细胞系	感染病毒	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Sf21	AcNPV	100	100	100	90.9	81.8	72.7	54.5	45.5
Sf9	AcNPV	100	100	100	90.9	81.8	81.8	54.5	45.5
High Five	AcNPV	100	63.6	54.5	36.4	27.3	18.9	9	9.0
HZ	AcNPV	81.8	72.7	54.5	27.3	9.0	9.0	0.0	0.0
RIRI-PX	AcNPV	100	100	100	100	81.8	63.6	36.3	27.2
BmN	BmNPV	100	100	100	90.9	81.8	72.7	54.5	36.3

表4 感染昆虫细胞对 AcNPV 和 BmNPV 的 TCID50 测定

细胞系	感染病毒	TCID50
Sf21	AcNPV	3.75 × 10 ⁻⁷
Sf9	AcNPV	3.75 × 10 ⁻⁷
High Five	AcNPV	1.63 × 10 ⁻⁷
HZ	AcNPV	1.59 × 10 ⁻⁷
RIRI-PX	AcNPV	3.25 × 10 ⁻⁷
BmN	BmNPV	3.63 × 10 ⁻⁷

3 结论与讨论

本文研究表明:供试的14种离体昆虫细胞系对AcNPV和BmNPV的敏感性具有较大的差异,其中,3种双翅目细胞系及1种直翅目细胞系均不能被两种病毒侵染,来源于鳞翅目的5种细胞系能被AcNPV感染,表明AcNPV的侵染宿主较广,但对与原宿主细胞亲缘关系近的细胞侵染性更强;而BmNPV仅能感染BmN细胞,对其余13种细胞均不能感染,具有宿主专一性。AcNPV和BmNPV对离体昆虫细胞的侵染具有很大的差异性。据张传溪^[21]报道,可感染AcNPV的离体昆虫细胞系有14种,但其中未包含本试验中能感染的棉铃虫及柑橘凤蝶离体细胞系。AcNPV和BmNPV对离体昆虫细胞的侵染能力与其对活体昆虫的侵染能力相符,AcNPV感染宿主范围较广,能感染28种昆虫之多^[22],BmNPV能感染家蚕以外的昆虫的报道很少。AcNPV和BmNPV病毒基因组全长核苷酸序列的同源性约70%,而宿主域却不同^[23],研究发现杆状病毒对细胞的侵染性是由杆状病毒侵染宿主的有关基因及蛋白质决定的^[24],实验证明将两种杆状病毒杂交重组或相互替换基因位点能扩大其宿主域,如Mori等^[25]将BmNPV DNA的BamHI酶切片段与AcNPV DNA共转染Sf21细胞,使之在细胞内进行重组,获得的子代病毒HyNPV,其宿主范围扩大,能感染BmN细胞,也能感染Sf细胞。Argand等^[26]将AcNPV基因组在解旋酶基因产物的3个位点用相应的BmNPV特异性氨基酸替代后,其宿主范围可扩展到家蚕。说明杆状病毒的宿主域是由其遗传特性决定的。其次,不同目

离体昆虫细胞的遗传背景具有很大的差异,除了其本身具有的遗传特征外,在长期的离体培养中遗传物质也发生着改变,如无限传代的鳞翅目昆虫细胞系染色体异倍化严重^[27],双翅目细胞系染色体倍性不发生改变^[28],而直翅目细胞系染色体只有少部分发生改变。由此分析,杆状病毒与昆虫细胞在遗传背景上的相互选择,造成了各细胞系对不同杆状病毒的敏感差异性。

在昆虫细胞对AcNPV敏感性的试验中,各昆虫细胞系的敏感性及其敏感程度差异较大,即使是来自于同种昆虫的细胞系,其敏感性差异也较明显。试验中NIAS-Px-58及RIRI-PX为来源于柑橘凤蝶的细胞系,但在对AcNPV的敏感性上却存在巨大差异,细胞系RIRI-PX能被AcNPV感染,且单个细胞的病毒产量最大,而NIAS-Px-58不能被AcNPV感染。说明即使是来源于同一昆虫的不同细胞系,对同一病毒的敏感性也会有很大的差异。产生差异的原因除了与病毒的特异性有关外,还可能与细胞的收受性、细胞生长的不同步性和细胞种群的不均一有关^[29];也可能与离体细胞的来源有关。试验中NIAS-Px-58及RIRI-PX分别来源于柑橘凤蝶的卵巢及新孵幼虫组织,而核多角体病毒对不同昆虫的侵染部位是不同的^[30],所以病毒对不同组织来源的同种昆虫细胞系的侵染能力也有所不同。试验中RIRI-PX细胞单个细胞的病毒产量最高,但其感染率并不高,可能是由于RIRI-PX是新建细胞系,病毒的感染率也与细胞的收受性、细胞生长的不同步性和细胞种群的不均一差异较大有关,但具体原因还有待于进一步的研究。

本文结果表明:就宿主范围而言,AcNPV感染的宿主范围更广,对多种昆虫细胞均具有感染性,而BmNPV的宿主专一,只能对家蚕细胞具有感染力。就感染率及病毒产量而言,BmN细胞对BmNPV的感染率及病毒产量较高;感染AcNPV的各细胞系感染率及病毒产量差异较大,多数细胞感染率不高,在今后可通过改变实验条件来提高病毒的感染率与产

量。就感染细胞而言, Sf21、Sf9、HighFive、RIRI-PX及HZ细胞易于培养、生长旺盛,而BmN细胞生长及继代较慢,表达病毒所需时间较长^[22]。在细胞系的利用研究中,可针对不同的研究目的合理选择较为合适的杆状病毒表达系统及离体昆虫细胞系。

参考文献:

- [1] Maramorosch K, 罗曦霞. 昆虫细胞系的发展: 历史回顾[J]. 武汉大学学报, 1992(4): 115-120
- [2] Smith G E, Summers M D. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector[J]. Mol Cell Biol, 1983, 3: 2156-2165
- [3] 朱江, 吴祥甫. 昆虫杆状病毒表达系统研究进展及其应用展望[J]. 蚕业科学, 2003, 29(2): 114-119
- [4] 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, 44(3): 276-279
- [5] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human 22interferon in silkworm using a baculovirus vector [J]. Nature, 1985, 315: 592-594
- [6] 常炳圣, 李元. 人可溶性白细胞介素-6受体基因在昆虫细胞内的克隆与表达[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(1): 36-37
- [7] 黄亚东, 郑青, 李校, 等. 天蚕抗菌肽AD基因在AcNPV载体系统中的表达研究[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(5): 304-307
- [8] 吕正兵, 张文平, 于威, 等. 家蚕表达人表皮生长因子gp67信号肽融合蛋白及生物学特性研究[J]. 生物工程学报, 2008, 24(1): 111-116
- [9] 王丹, BHASKAR Roy, 李兴华, 等. 利用杆状病毒Bac-to-Bac系统在家蚕表达猪繁殖与呼吸综合征病毒的E蛋白和M蛋白[J]. 蚕业科学, 2010, 36(5): 855-859
- [10] 宋德伟, 马艳, 冯颖, 等. 昆虫细胞工程研究进展[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 116-124
- [11] 胡远扬. 昆虫病毒研究的回顾与展望[J]. 中国病毒学, 2004, 19(3): 303-308
- [12] Yeh S C, Lee S T, Wu C Y, et al. A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae): characterization, viral susceptibility, and polyhedra production[J]. J Invertebr Pathol, 2007, 96: 138-146
- [13] Zhang H, Zhang Y A, Qin Q, et al. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua*: Characterization and susceptibility to baculoviruses (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. J Invertebr Pathol, 2006, 91: 9-12
- [14] Pant U, Sudeep A B, Athawale S S, et al. Baculovirus studies in new indigenous lepidopteran cell lines [J]. Indian J Expt Biol, 2002, 40(1): 63-68
- [15] 刘丽华, 沈卫德. 几种核型多角体病毒感染性的检测[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(10): 71-73
- [16] Wang C H, Chou C M, Liu H C, et al. Continuous cell line from pupal ovary of *Perina nuda* (Lepidoptera: Lymantriidae) that is permissive to nuclear polyhedrosis virus from *P. nuda* [J]. J Invertebr, Pathol, 1996, 67: 199-204
- [17] Shih C J, Lin R W, Wang C H. Establishment of a cell line from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and replication of *S. litura* nuclear polyhedrosisvirus *in vitro* [J]. J Invertebr Pathol, 1997, 69: 1-6
- [18] Boyapalle S, Pal N, Miller W A, et al. A glassy-winged sharpshooter cell line supports replication of *Rhopalosiphum padi* virus (Dicistroviridae) [J]. J Invertebr Pathol, 2007, 67: 199-204
- [19] Chen Y R, Solter L F, Chien T Y, et al. Characterization of a new insect cell line (NTU-YB) derived from the common grass yellow butterfly, *Eurema hecabe* (Linnaeus) (Pieridae: Lepidoptera) and its susceptibility to microsporidia [J]. J Invertebr Pathol, 2009, 102: 256-262
- [20] Levin D B, Huang J. *Spodoptera littoralis* Type B Nucleopolyhedrovirus Infection of a Grasshopper Cell Line [J]. J Invertebr Pathol, 1999, 74: 184-192
- [21] 张传溪. 昆虫杆状病毒ph、pk基因分析和人EPO基因在杆状病毒-昆虫系统中的表达[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001
- [22] 吴小锋, 曹翠平, 许雅香, 等. BmNPV和AcNPV扩大寄主域杂交重组病毒表达载体的构建和改进[J]. 中国科学C辑: 生命科学, 2004, 34(2): 156-164
- [23] 王文兵, 马双双, 李兵, 等. 利用双色荧光观察分析重组家蚕杆状病毒对昆虫细胞及蚕体组织的感染[J]. 蚕业科学, 2009, 35(3): 634-637
- [24] 李充壁, 庞义. 杆状病毒侵染的分子基础[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 80-84
- [25] Mori H, Nagazawa H, Shiai N, et al. Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range [J]. J Gen Virol, 1992, 73: 1877-1880
- [26] Argaud O, Croizier L, Lopez-Ferber M, et al. Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae [J]. J Gen Virol, 1998, 79(4): 931-935
- [27] 张欣, 冯颖, 丁伟峰, 等. 七种鳞翅目昆虫细胞系染色体分析[J]. 林业科学研究, 2008, 21(4): 493-499
- [28] 张欣, 冯颖, 马涛, 等. 五种双翅目昆虫细胞系染色体分析[J]. 林业科学研究, 2007, 20(4): 551-555
- [29] 于洪春, 王晓云, 李国勋. 四株昆虫细胞系对粘虫核型多角体病毒敏感性的测定[J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(4): 342-345
- [30] 包建中, 古德祥. 中国生物防治[M]. 太原: 山西科学出版社, 1998