

DOI:10.13350/j.cjpb.240102

• 论著 •

应用 KMB17 细胞培养柯萨奇病毒 B 族 1、2、3 型的研究*

邓自君, 靳玮华, 李艳艳, 张伟, 杨凤梅, 张名, 陈丽雄, 徐鸿界, 李明学, 刘权, 唐洁,

段素琴, 孙文亭, 李咏洁, 马绍辉, 赵远, 杨明, 和占龙**, 杨净思**

(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650018)

【摘要】 目的 采用人胚肺二倍体细胞(human embryonic lung diploid cell) KMB17 株对柯萨奇病毒 B 族(Coxsackievirus B, CVB)1、2、3 型进行适应性培养, 探索应用 KMB17 细胞培养 CVB1-3 型病毒的相关参数, 为基于 KMB17 细胞研发 CVB 多价疫苗提供参考。 **方法** 将 CVB 1-3 型分别设置 8 个不同的感染复数(multiplicity of infection, MOI)梯度(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4), 在 KMB17 细胞上进行培养观察, 对病毒培养结果进行统计分析。 **结果** CVB 1-3 型病毒均能在 KMB17 细胞中复制, 并使细胞产生明显的细胞病变(cytopathic effect, CPE)。其中 CVB 1 型在 KMB17 细胞上适宜的种毒 MOI 值为 0.25~0.3, 病毒收获液的平均滴度为 7.25 lgCCID₅₀/mL, 适宜 MOI 范围内病毒培养时间的 95% 置信区间为 96.1~97.6 h; CVB 2 型在 KMB17 细胞上适宜的种毒 MOI 值为 0.20~0.25, 病毒收获液平均滴度为 7.375 lgCCID₅₀/mL, 适宜 MOI 范围内病毒培养时间的 95% 置信区间为 74.8~76.8 h。CVB 3 型在 KMB17 细胞上适宜的种毒 MOI 值为 0.30~0.35, 病毒收获液的平均滴度为 7.25 lgCCID₅₀/mL, 适宜 MOI 范围内病毒培养时间的 95% 置信区间为 82.7~84.7 h。 **结论** KMB17 为一株理想的用于 CVB1、2、3 型培养的基质细胞, 可为基于 KMB17 细胞研发 CVB 多价疫苗提供参考。

【关键词】 KMB17 细胞; 柯萨奇病毒 B 1、2、3 型; 病毒培养

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0010-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jan;19(1):10-14.]

Study on culture conditions of Coxsackievirus B type 1-3 on human embryonic lung diploid cell line KMB17

DENG Zijun, JIN Weihua, LI Yanyan, ZHANG Wei, YANG Fengmei, ZHANG Ming, CHEN Lixiong, XU Hongjie, LI Mingxue, LIU Quan, TANG Jie, DUAN SUqing, SUN Wenting, LI Yongjie, MA Shaohui, ZHAO Yuan, YANG Ming, HE Zhanlong, YANG Jingsi (Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650018, China)***

【Abstract】 Objective To use human embryonic lung diploid cell KMB17 strain for adaptive culture of Coxsackievirus B (CVB) types 1, 2, and 3, and to explore the relevant parameters of using KMB17 cells to culture CVB1-3 virus, providing reference for the development of CVB multivalent vaccines based on KMB17 cells. **Methods** CVB 1-3 types were cultured on KMB17 cells with 8 different multiplicity of infection (MOI) gradients (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4), and the virus culture results were statistically analyzed. **Results** CVB 1-3 viruses can replicate in KMB17 cells and produce obvious cytopathic effect (CPE). The suitable MOI value for CVB type 1 virus on KMB17 cells is 0.25-0.3, the average titer of virus harvesting solution is 7.25 lgCCID₅₀/mL, and the 95% confidence interval for virus cultivation time within the appropriate MOI range is 96.1-97.6 hours; The suitable MOI value for CVB type 2 virus on KMB17 cells is 0.20-0.25, the average titer of virus harvest solution is 7.375 lgCCID₅₀/mL, and the 95% confidence interval for virus culture time within the suitable MOI range is 74.8-76.8 hours. The suitable MOI value for CVB type 3 virus on KMB17 cells is 0.30-0.35, the average titer of the virus harvest solution is 7.25 lgCCID₅₀/mL, and the 95% confidence interval for virus culture time within the appropriate MOI range is 82.7-84.7 hours. **Conclusion** KMB17 is an ideal stromal cell for culture of CVB1, 2, and 3 types, which can provide reference for the development of CVB multivalent vaccines based on KMB17 cells.

【Key words】 KMB17 cells; Coxsackievirus B 1, 2, 3; Virus culture

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2021YFF0702804); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(No. 2021-I2M-1-024); 云南省重大科技专项计划项目(No. 202002AA100009); 中国医学科学院医学生物学研究所所级重点科研专项项目(No. 2022IMBCAMS002)。

** **【通讯作者】** 和占龙, E-mail: hzl612@126.com; 杨净思, E-mail: yjs@imbcams.com.cn

【作者简介】 邓自君(1985-), 男, 云南楚雄人, 本科, 技师, 研究方向: 病原生物学。E-mail: 56732603@qq.com

柯萨奇病毒 B(Coxsackievirus B, CVB)属于肠道病毒,具有多个不同的血清型,广泛流行于全球的多个国家和地区^[1],不同的血清型病毒可引起包括无菌性脑炎^[2]、心肌炎^[3]、糖尿病^[4]等多种严重疾病,尤其是新生儿感染 CVB 会导致强烈的临床症状甚至死亡^[5]。目前有多种血清型 CVB 同时流行,开发 CVB 单价疫苗所面临的最大问题在于不同血清型 CVB 所引起的疾病并不相同^[6],单价疫苗并不能很好地应对不同地区的流行株感染,所以开发针对于 CVB 不同血清型的多价灭活疫苗不论从生产成本和控制传染病流行的角度来说都是比较好的选择。目前尚无 CVB 商品化的疫苗上市,但针对 CVB 的疫苗研究已经展开,已有的相关研究多采用 Vero 细胞作为病毒培养的细胞基质^[6]。由于 Vero 细胞为动物源性细胞,在安全性及生产检定方面均存在一定的问题,目前已经获批上市采用 Vero 细胞基质生产的多种人用疫苗诸如人用狂犬疫苗(Vero 细胞)、冻干人用狂犬疫苗(Vero 细胞)等品种均需要对疫苗进行 Vero 细胞 DNA 残留量、Vero 细胞蛋白质残留量等的检测^[7],质量检测及控制过程较为繁琐。人胚肺二倍体细胞(human embryonic lung diploid cell)KMB17 株也是我国人用病毒性疫苗生产的主要细胞基质之一,以 KMB17 细胞作为细胞基质生产的多种人用疫苗诸如肠道病毒 71 型灭活疫苗已成功上市,且安全性、有效性良好^[8]。该细胞作为一株经中国食品药品监督管理局批准使用,可进行人用疫苗生产的细胞与 Vero 细胞相比在安全性、质量检定及控制方面有着明显的优势。

本实验采用 KMB17 细胞分别对 CVB1、CVB2、CVB3 三种血清型病毒进行培养,对三种血清型病毒在细胞基质上培养的条件和培养结果进行比较分析,以确定 CVB1、2、3 型在 KMB17 细胞上的最优培养参数,为以 KMB17 细胞为培养基质研发 CVB 多价疫苗提供参考依据。

材料与方法

1 材料

1.1 毒株和细胞 CVB1、2、3 型毒株由中国医学科学院医学生物学研究所马绍辉实验室提供。KMB17 人胚肺二倍体细胞由中国医学科学院医学生物学研究所提供,KMB17 细胞种毒代次为 38 代。

1.2 主要试剂及器材 MEM 培养基,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline PBS),双抗,96 孔细胞培养板,细胞培养瓶及 CO₂ 培养箱均购自美国赛默飞世尔科技公司;新生牛血清购自内蒙古维克生生物技术股份有限公司;胰蛋白酶消化液和谷氨酰胺购自德国默克公司;生物安全柜购自苏州安泰空气技术有限公

司;细胞计数仪购自江苏卓微生物科技有限公司;透射光成像系统购自德国卡尔蔡司公司;电子显微镜购自日本日立公司。

2 方法

2.1 细胞传代 KMB17 细胞采用 MEM 作为基础培养基进行培养,细胞传代过程中培养基添加 10% 新生牛血清。传代前先将细胞培养瓶中生长为致密单层的细胞吸去原培养基,PBS 润洗细胞 2 次;加入胰蛋白酶,轻轻摇动细胞培养瓶使胰蛋白酶溶液与培养面上的细胞充分接触;吸去胰蛋白酶溶液,将细胞培养瓶放置于(37±0.5)℃的培养箱中消化 5 min,待细胞完全消化;加入含 10% 新生牛血清的 MEM 培养液终止消化,充分摇匀分散后按照 1:3 的比例接种到新的细胞培养瓶中,置于(37±0.5)℃的 CO₂ 培养箱中进行培养待用。

2.2 细胞计数与毒种加量的计算 待细胞培养瓶中的 KMB17 细胞生长到致密单层后随机选取 1 瓶进行细胞计数。计数时先用胰酶完全消化细胞,加入 50 mL 培养基充分混匀分散细胞后吸取 10 μl 细胞悬液与等体积台盼蓝溶液混合后上机计数。根据细胞计数结果计算各 MOI 梯度的毒种加量并配制不含血清的病毒维持液。

2.3 病毒收获液滴度测定 待 KMB17 细胞达到 80% CPE 时将培养瓶置于 4℃冰箱中冻存 12 h 后抽取病毒收获液至无菌瓶中-80℃保存。病毒收获液采用微量细胞病变法对病毒收获液进行滴度测定。取病毒收获液,充分混匀后作 10 倍比稀释,接种于已生长为致密单层的 Vero 细胞 96 孔板,每一稀释度接种 8 孔,每孔接种 100 μL,补加细胞维持液后置于(37±0.5)℃的 CO₂ 培养箱中进行培养,7 d 后观察各孔细胞病变情况,出现 50% CPE 时判定为阳性,采用 karber 法计算病毒收获液滴度。

2.4 不同 MOI 条件下的收获液病毒滴度测定 分别按照 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 共 8 个 MOI 值将 CVB1、2、3 型维持液接种于 KMB17 细胞,置于(37±0.5)℃的 CO₂ 培养箱中进行培养。待 80% 细胞出现 CPE 时终止培养,4℃冻存 12 h 后收获病毒液,测定收获液病毒滴度,以确定适合病毒培养的最佳 MOI 范围。

2.5 不同 MOI 条件下的细胞病变时间观察 透射光成像系统下观察细胞病变情况并记录细胞病变的时间。

2.6 适宜 MOI 条件下病毒培养 验证取适宜 MOI 梯度的 CVB 分别接种 5 个 T225 瓶,对病毒收获液进行滴度测定。

2.7 病毒颗粒电镜观察 取病毒收获液,经 0.22 μm

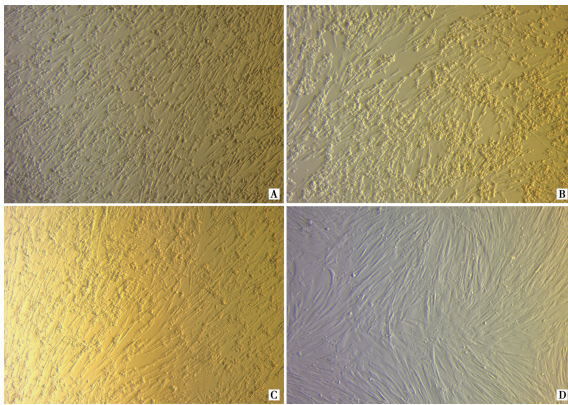
过滤器后电镜下观察病毒颗粒形态。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,采用 GraphPad Prism 8.0 进行图表制作。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 CVB1、2、3 型在 KMB17 细胞上的适应性培养

通过对接种病毒后的细胞进行观察, CVB1、2、3 型均能在 KMB17 细胞上进行培养并使细胞产生 CPE。CVB1、2、3 型感染细胞后造成细胞变圆皱缩脱落(图 1)。取 3 种血清型 CVB 病毒收获液于电镜下观察, 均可见到典型的病毒颗粒(图 2)。

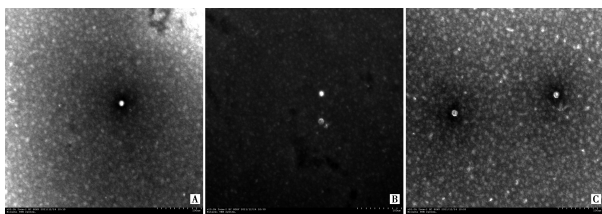


A CVB1 在 KMB17 细胞上引起的 CPE B CVB2 在 KMB17 细胞上引起的 CPE C CVB3 在 KMB17 细胞上引起的 CPE D KMB17 细胞正常对照

图 1 CVB1-3 型在 KMB17 细胞上培养引起的细胞病变(40×)

A CPE induced by CVB1 on KMB17 cells B CPE induced by CVB2 on KMB17 cells C CPE induced by CVB3 on KMB17 cells D KMB17 cells normal control

Fig. 1 CPE induced by CVB types 1, 2, and 3 on KMB17 cells(40×)



A CVB1 型病毒颗粒 B CVB2 型病毒颗粒 C CVB3 型病毒颗粒

图 2 电镜观察 CVB1、2、3 型病毒颗粒(20 000×)

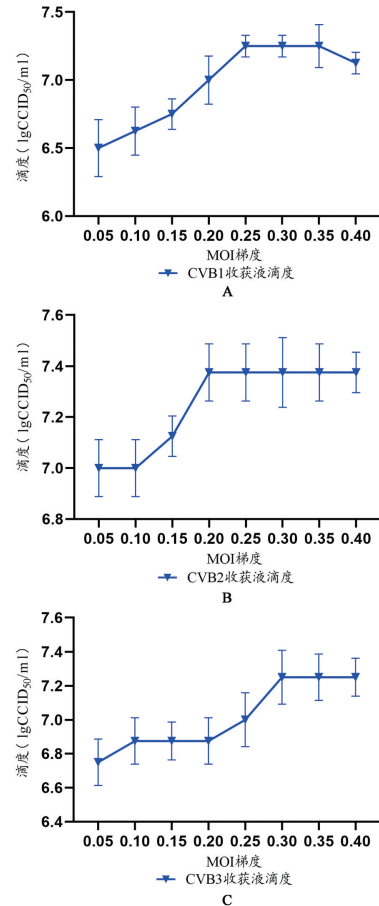
A CVB Type 1 virus particles B CVB Type 2 virus particles C CVB Type 3 virus particles

Fig. 2 Observation of the virus particles under the electron microscope(20 000×)

2 接种不同 MOI 的 CVB 对收获液病毒滴度的影响

采用微量细胞病变法测定不同 MOI 条件下 3 种血清型病毒在 KMB17 细胞上培养后达到 80% CPE 时获得的收获液滴度, 结果如图 3。一定范围内 3 种血清型 CVB 在细胞上培养后收获液的滴度均随 MOI

值的上升而增加, 其中 CVB1 收获液滴度在 MOI 值达到 0.25 时出现平台期, CVB2 收获液滴度在 MOI 值达到 0.2 时出现平台期, CVB3 收获液滴度在 MOI 值达到 0.3 时出现平台期。据此确定 CVB1、2、3 型在 KMB17 细胞上培养的最适宜接种 MOI 范围分别在 0.25~0.3、0.2~0.25 和 0.3~0.35 之间。



A KMB17 细胞培养 CVB1 型收获液滴度 B KMB17 细胞培养 CVB2 型收获液滴度 C KMB17 细胞培养 CVB3 型收获液滴度

图 3 不同 MOI 条件下 KMB17 细胞收获液的 CVB 1、2、3 型病毒滴度

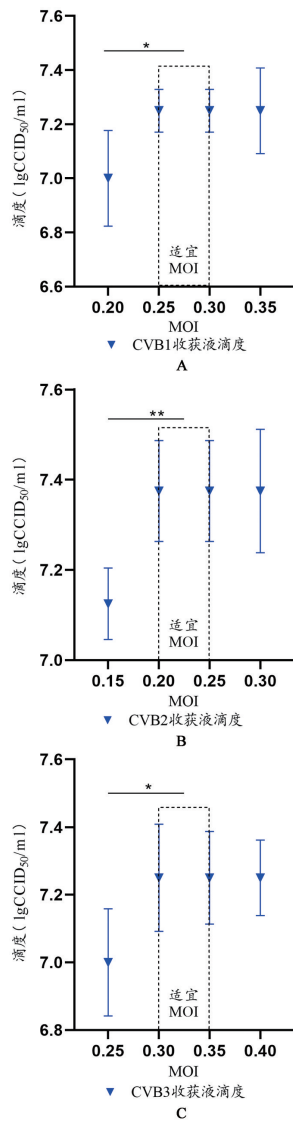
A CVB1 Virus titer in medium B CVB2 Virus titer in medium C CVB3 Virus titer in medium

Fig. 3 The titers of CVB types 1, 2 and 3 in KMB17 cells cultured under different MOI conditions

3 适宜 MOI 条件下的病毒培养验证

对上述得到的 3 种血清型病毒的适宜种毒 MOI 范围进行验证, 采用微量细胞病变法进行病毒滴度测定。其中 CVB1 在适宜 MOI 条件下(0.25~0.30)培养后获得的病毒收获液平均滴度为 7.25 lgCCID₅₀/mL, 与低 MOI 条件下(0.2)收获液平均滴度 7.0 lgCCID₅₀/mL 比较差异有统计学意义($P = 0.01012$, $P < 0.05$), 与高 MOI 条件下(0.35)收获液平均滴度 7.25 lgCCID₅₀/mL 比较差异无统计学意义($P = 1$, $P > 0.05$)。CVB2 在适宜 MOI 条件下(0.20~0.25)培养后获得的病毒收获液平均滴度为 7.375 lgCCID₅₀/mL, 与低 MOI 条件下(0.15)收获液平均滴度 7.125

lgCCID₅₀/mL 比较差异有统计学意义($P=0.00119$, $P<0.01$),与高 MOI 条件下(0.30)收获液平均滴度 7.375 lgCCID₅₀/mL 比较差异无统计学意义($P=1$, $P>0.05$)。CVB3 在适宜 MOI 条件下(0.30~0.35)培养后获得的病毒收获液平均滴度为 7.25 lgCCID₅₀/mL,与低 MOI 条件下(0.25)收获液平均滴度 7.0 lgCCID₅₀/mL 比较差异有统计学意义($P=0.02088$, $P<0.05$),与高 MOI 条件下(0.40)收获液平均滴度 7.25 lgCCID₅₀/mL 比较差异无统计学意义($P=1$, $P>0.05$)(图 4)。



A CVB 1 型适宜 MOI 及其他条件下培养的收获液滴度 B CVB 2 型适宜 MOI 及其他条件下培养的收获液滴度 C CVB3 适宜 MOI 及其他条件下培养的收获液滴度。组间比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

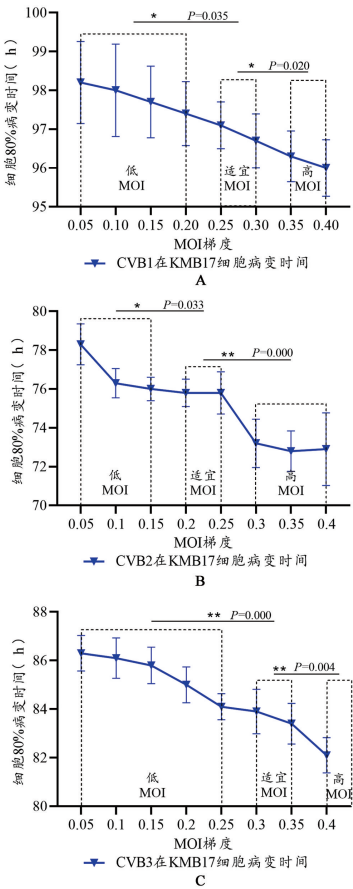
图 4 CVB1、2、3 型收获液滴度比较

A CVB 1 was suitable for harvest liquid titer cultured under MOI and other conditions B CVB 2 was suitable for harvest liquid titer cultured under MOI and other conditions C CVB 3 was suitable for harvest liquid titer cultured under MOI and other conditions. Comparison between groups, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Fig. 4 CVB1, 2, 3 type of harvest liquid titer comparison

4 接种不同 MOI 的 CVB 对细胞病变时间的影响

记录不同 MOI 条件下各实验组的细胞达到 80% CPE 所需要的培养时间,结果如图 5。随着 MOI 值升高,细胞达到 80% CPE 的时间均缩短。将 8 个 MOI 梯度简单划分为低 MOI 组、适宜 MOI 组和高 MOI 组,比较不同 MOI 组出现 CPE 的时间,差异有统计学意义, (P 2 值可参看图 5 $P<0.05$)。CVB1 在适宜的 MOI 条件下(0.25、0.3)使 KMB17 细胞 CPE 达到 80% 的时间为 96.1~97.7 h, CVB2 在适宜 MOI 条件下(0.20、0.25)使 KMB17 细胞 CPE 达到 80% 的时间为 74.1~77.0 h, CVB3 在适宜 MOI 条件下(0.3、0.35)使 KMB17 细胞 CPE 达到 80% 的时间为 82.5~85.1 h。根据 t 分布原理,计算在适宜 MOI 条件下使 KMB17 细胞 CPE 达到 80% 时长的 95% 置信区间,结果如表 1。



A 不同 MOI 条件下 CVB1 型在 KMB17 细胞上达到 80% CPE 的时间 B 不同 MOI 条件下 CVB2 型在 KMB17 细胞上达到 80% CPE 的时间 C 不同 MOI 条件下 CVB3 型在 KMB17 细胞上达到 80% CPE 的时间。组间比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图 5 不同 MOI 条件对 CVB1、2、3 型所致 KMB17 细胞病变时间的影响

A The time for CVB1 to reach 80% CPE on KMB17 cells under different MOI conditions B The time for CVB2 to reach 80% CPE on KMB17 cells under different MOI conditions C The time for CVB3 to reach 80% CPE on KMB17 cells under different MOI conditions. Comparison between groups, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Fig. 5 Effect of different MOI conditions on the pathological time of KMB17 cells induced by CVB1, 2 and 3

表 1 适宜 MIO 条件下 CVB 1、2、3 型在 KMB17 细胞上达到 80% CPE 时长的 95% 置信区间(h)

Table 1 95% confidence interval for 80% CPE duration of CVB types 1, 2, and 3 on KMB17 cells under suitable MIO conditions(h)

感染复数 MOI	CVB 1 型 Type of CVB1	CVB 2 型 Type of CVB2	CVB 3 型 Type of CVB3
0.20	-	75.2~76.4	-
0.25	96.6~97.6	74.8~76.8	-
0.30	96.1~97.3	-	83.1~84.7
0.35	-	-	82.7~84.1

讨 论

病毒是一种只有在细胞内才能体现出生物活性的微生物,如今虽然有像 RNA 疫苗^[9]、DNA 疫苗^[10]等多种基因工程技术疫苗的出现,但是基于细胞、病毒培养的传统病毒性疫苗生产工艺至今仍然是广泛采用的技术路线^[11]。对于传统病毒疫苗的研发与生产而言,细胞和病毒培养都是极其关键的步骤,建立良好的细胞和病毒培养体系是完成疫苗研发和生产的前提。有文献报道 KMB17 细胞可用于其他肠道病毒疫苗的研究与生产^[8,12-13]。本实验设置不同的病毒接种量(MOI),采用 KMB17 细胞对 CVB1、2、3 型病毒进行培养,对病毒培养的相关参数进行了比较分析。结果表明 3 型病毒均能在 KMB17 细胞中复制并产生明显的细胞病变。对病毒收获液进行滴度测定,结果显示随着 MOI 梯度的升高病毒收获液滴度也随着升高,但 MOI 值达到一定数值后收获液病毒滴度进入平台期,由此初步确定了 CVB1、2、3 型在 KMB17 细胞上适宜的种毒 MOI 范围,并对适宜 MOI 范围进行了验证,结果也显示在适宜的 MOI 范围内 3 种血清型病毒收获液滴度均在 7.125 lgCCID₅₀/mL 左右,可以满足相关疫苗研发及生产的要求。

适宜 MOI 条件相较于低 MOI 条件下获得的收获液病毒滴度显著不同,但相较于高 MOI 条件下收获液滴度并无显著差异。同时发现 CVB1 在 MOI 值达到 0.4 时收获液病毒滴度反而出现降低,可能与高 MOI 情况下细胞过早发生病变,病毒未能充分复制释放有关,表明病毒维持液的 MOI 值对于病毒培养的产量有重要影响^[14]。

适宜 MOI 条件下对 3 种血清型病毒进行培养,记录细胞培养瓶中细胞 CPE 达到 80% 的时间并计算其 95% 置信区间,发现相同 MOI 条件下不同培养瓶中的细胞病变时间均集中在 2 h 左右。适宜 MOI 范围内相对集中的病变时间对于规模化生产极其重要^[15-17]。人胚肺二倍体细胞用于病毒培养^[18]和疫苗研发有很多成功的案例,疫苗质量不论从安全性、有效性、稳定性方面都得到了证明。本研究为基于 KMB17 细胞进行 CVB1、2、3 型多价疫苗研发提供了理论依据,同时

证明 KMB17 细胞适用于 CVB1、2、3 型病毒的培养。

【参考文献】

- [1] Abedi GR, Waston JT, Nix WA, et al. Enterovirus and parechovirus surveillance-United States, 2014-2016 [J]. MMWR Morb Mortal, 2018, 67(1): 515-518.
- [2] Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, et al. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis[J]. Clin Virol, 2008, 43(6): 207-211.
- [3] Fairweather D, Stafford KA, Sung YK. Update on coxsackievirus B3 myocarditis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2012, 24(2): 401-407.
- [4] Hyoty H, Leon F, Knip M, et al. Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B [J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(3): 1071-1083.
- [5] Hong J, Kang B, Yeo S, et al. Pathogenesis of coxsackievirus B2 in mice: Characterization of clinical isolates of the coxsackievirus B2 from patients with myocarditis and aseptic meningitis in Korea [J]. Vet Sci, 2017, 18(6): 457-464.
- [6] Stone VM, Hankaniemi MM, Laitinen OH, et al. A hexavalent Coxsackievirus B vaccine is highly immunogenic and has a strong protective capacity in mice and nonhuman primates[J]. Sci Adv, 2020, 6(1): 2433-2447.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第三部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [8] 高帆, 卞莲莲, 吴星, 等. 2017 年国产肠道病毒 71 型灭活疫苗质量一致性研究[J]. 中国病毒学杂志, 2018, 8(6): 456-462.
- [9] Hunziker IP, Harkins S, Feuer R, et al. Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. Virology, 2004, 330(6): 196-208.
- [10] 傅连臣, 刘灵芝, 侯佩强, 等. DNA 疫苗研究进展[J]. 预防医学论坛, 2019, 25(10): 797-800.
- [11] 康庄, 唐梅. 新型冠状病毒疫苗的研发进展及分析[J]. 生物医学工程杂志, 2020, 37(03): 375-379.
- [12] 赵婷, 施红媛, 李菁, 等. 脊髓灰质炎病毒受体转基因小鼠接种 I + III 型二价脊髓灰质炎减毒活疫苗后的排毒规律[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(5): 505-516.
- [13] 刘洪波, 张捷, 许丹茜, 等. 一株柯萨奇病毒 A 组 6 型毒株 RYN-A1205 的分子特征及其在 KMB17 细胞上的遗传稳定性研究[J]. 中国病毒学杂志, 2020, 10(2): 102-108.
- [14] 王微, 邱恒, 杨振清, 等. 细胞工厂中 F 基因型腮腺炎病毒 SP-A 株在人二倍体细胞上的增殖研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(1): 63-68.
- [15] 付永其, 宋艳梅, 高静, 等. 细胞工厂在麻腮风系列疫苗生产中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(10): 1049-1054.
- [16] 张晋, 王红燕, 张亮, 等. 口服脊髓灰质炎减毒活疫苗(人二倍体细胞)的稳定性研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(4): 50-56.
- [17] Hann L, Woos S, Seung YS, et al. Corynebacterium cell factory design and culture process optimization for muconic acid biosynthesis[J]. Sci Rep, 2018, 8(2): 18041-18052.
- [18] 王辉, 张莹, 刘龙丁, 等. 人二倍体细胞对不同病毒感染过程的生物学效应比较分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(9): 907-912.

【收稿日期】 2023-08-08 【修回日期】 2023-10-25