doi:10.11751/ISSN.1002 – 1280.2020.07.01

BHK – 21 细胞悬浮驯化及对新城疫病毒悬浮培养工艺研究

徐宏军[1,2],张凌云[3],侯　野[3],姜　磊[1],董婷婷[1],郑　杰[3],张乾顺[3],马宁宁[3*]

(1. 青岛蔚蓝生物制品有限公司,山东青岛 266114;2. 青岛蔚蓝生物股份有限公司,山东青岛 266114;
3. 北京鼎持生物技术有限公司,北京 100176)

[收稿日期] 2020 – 02 – 28　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 – 1280 (2020) 07 – 0001 – 08　[中图分类号] S852.65

[摘　要]　为建立新城疫病毒在 BHK – 21 细胞的无血清全悬浮培养工艺以获得高滴度和高纯度的新城疫悬浮培养抗原,通过悬浮培养驯化和筛选获得了形态良好、稳定传代的 BHK – 21 – sc 悬浮细胞株;该细胞以初始密度 0.5×10^6 cells/mL 接种,培养 72 h 可增殖到 6×10^6 cells/mL,细胞活率达 95%。以 5 L 生物反应器悬浮培养 BHK – 21 – sc 细胞,对鸡新城疫病毒 La Sota 株的接毒剂量、TPCK 胰酶添加浓度、病毒培养温度、收获时间等工艺参数进行了摸索和优化;并在 5L – 16L – 50L 生物反应器中进行逐级放大,以优化后的鸡新城疫悬浮培养工艺进行 3 个批次病毒悬浮培养。最终确定鸡新城疫病毒 La Sota 株接种 BHK – 21 – sc 悬浮细胞株的悬浮培养工艺:BHK – 21 – sc 细胞悬浮培养的第 3 天按照感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 0.005 接种病毒,并添加终浓度为 5 μg/mL 的 TPCK 胰酶,于 33 ℃培养 72 h 后收获病毒液。应用该悬浮培养工艺在 5、16、50 L 反应器上悬浮培养 BHK – 21 – sc 悬浮细胞株生产鸡新城疫病毒 HA 滴度不低于 9log2,病毒含量不低于 $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/0.1mL。表明 BHK – 21 – sc 细胞无血清全悬浮生产鸡新城疫病毒工艺稳定,可以实现逐级放大和规模化生产。

[关键词]　BHK – 21;鸡新城疫病毒;反应器;悬浮培养

BHK – 21 Cell Suspension Adaptation and Culture Process Establishment for Newcastle Disease Virus (NDV) Production with the Suspension Cell Line

XU Hong – jun[1,2], ZHANG Ling – yun[3], HOU Ye[3], JIANG Lei[1], DONG Ting – ting[1], ZHENG Jie[3], ZHANG Qian – shun[3], MA Ning – ning[3*]

(1. *Qingdao Vland Biological Products Co. Ltd*, *Qingdao*, *Shandong* 266114, *China*;
2. *Qingdao Vland biotech Inc.*. *Qingdao*, *Shandong* 266114, *China*; 3. *Beijing Dingchi Biotechnology Co. Ltd*, *Beijing* 100176, *China*)
Corresponding author: *MA Ning – ning*, *E – mail*: *andy. ma@ vbiosci. com*

作者简介: 徐宏军,兽医师,博士,从事动物疫苗研发工作。

通讯作者: 马宁宁,E – mail:andy. ma@ vbiosci. com

Abstract: To increase the highly titer and purity of newcastle disease virus (NDV) vaccine antigen by the establishment of BHK - 21 cell suspension culture process, an adherent BHK - 21 cell line was domesticated to be a suspension cell line BHK - 21 - sc with good morphology and stable proliferation. The density of the suspension cell line could increase from the initial density of 0.5×10^6 cells/mL to 6×10^6 cells/mL in 72 h and the viability of cell was above 95%. Incubation parameters, such as inoculation dose, TPCK trypsin concentration, virus proliferation temperature and harvest time were optimized on suspension cultured BHK - 21 - sc in 5 L bioreactor. The optimized parameters were also verified 3 times in 16 L and 50 L bioreactor following BHK - 21 - sc cell culture amplifying process successively. The results showed that the best viral inoculation quantity was 0.005 of MOI. And when the suspending cells were cultured with 5 μg/mL of TPCK trypsin at 33 ℃ for 72 h, the hemagglutination inhibition (HI) titers of NDV was above 1∶512 and viral titer was more than $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/0.1mL, respectively. In conclusion, the established NDV suspension culture process is stable and could be used for the production of NDV antigen by large - scale suspension culture in bioreactor.

Key words: BHK - 21; newcastle disease virus; bioreactor; suspension culture

鸡新城疫(Newcastle disease,ND)是由新城疫病毒引起的鸡的一种急性、高度接触性、烈性、病毒性传染病,对养禽业危害极大,被世界动物卫生组织(OIE)列为对动物危害最大的 A 类传染病之一。该病的主要特征是呼吸困难、下痢、神经紊乱、黏膜和浆膜出血[1-2]。易感鸡群一旦被速发性嗜内脏型新城疫病毒所传染,可迅速传播并呈毁灭性流行,发病率和死亡率可达 90% 以上。新城疫首先于 1926 年于英国的新城发现,该疾病传播迅速,2010 年在 80 个国家中证实有 NDV 感染的病例。在 2002 ~ 2003 年间,由于美国加利福尼亚州暴发新城疫,扑杀的禽类达 300 万只,直接经济损失超过 1.6 亿美元[3];2009 ~ 2010 年间,新城疫疫情使得印度尼西亚商品鸡的死亡率达到了 70% ~ 80%[4]。在中国,从 1946 年通过病毒分离证实了新城疫在我国的存在和流行,就不断有禽类感染的报道。直到新城疫弱毒株的发现和新城疫弱毒疫苗(Hitchner B - 1 和 La Sota)的应用开启了新城疫防控的新纪元,使得新城疫的传播得到了一定程度的控制。在我国,使用低毒力活疫苗和油佐剂灭活疫苗已成为养禽业防治鸡新城疫的常规措施。目前国内鸡新城疫疫苗的生产主要依靠传统的“鸡胚法”工艺实现。此工艺大规模生产时存在鸡胚质量不稳定及潜在外源病毒污染问题,收获完成后,废胚难于无害化处理,存在散毒风险和污染环境问题。以转瓶培养哺乳动物细胞制备疫苗的方法虽然克服了上述缺点,却存在细胞生长过程不易控制、病毒效价难以提高、收获过程复杂,大规模生产劳动强度大,劳动效率低等劣势[5]。

无血清悬浮培养技术生产疫苗属于第三代疫苗生产方式,已应用于禽流感和圆环等病毒的悬浮培养[6-7]。该技术具有容易放大、细胞培养基不含有血清成分(可避免由于血清批次不稳定,外源病毒污染和严重免疫反应等问题)、自动化程度高、抗原培养滴度高等诸多优点。而目前新城疫疫苗的规模化生产仍以鸡胚培养为主,新城疫的细胞培养大多数还停留在贴壁培养水平,本研究拟对 BHK 贴壁细胞进行悬浮驯化,以获得能够稳定生长并满足新城疫大规模生产要求的悬浮细胞。并应用生物反应器系统对全悬浮培养条件下影响新城疫病毒 La Sota 株病毒产量的关键工艺参数进行了摸索、优化和确定;用获得的 NDV La Sota 株细胞悬浮培养工艺进行工业生产放大,以期为该工艺后续的产业化应用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*细胞与毒种*　BHK - 21 细胞由北京鼎持生物技术有限公司提供。鸡新城疫病毒 La Sota 株由

青岛蔚蓝生物制品有限公司提供。

1.1.2　主要试剂　MEM 培养基和新生牛血清均购自 GIBCO 公司,BHK105、BHK106 培养基由壹生科(深圳)有限公司提供,TPCK 胰酶购自 Sigma 公司。

1.1.3　主要设备　5 L 生物反应器 Sartorius stedim(赛多利斯)Biostat Ⓡ A、16 L 生物反应器,购自广州齐志生物工程设备有限公司;50 L 生物反应器购自上海奥星制药技术装备有限公司。

1.2　方法

1.2.1　BHK－21 细胞的悬浮驯化　复苏 1 支 BHK－21 细胞,用含 10% 新生牛血清 MEM 培养基按常规方法传代,细胞生长稳定后,用含 2% 新生牛血清 BHK105 培养基将细胞数调整至 0.5×10^6 cells/mL,并转移至摇瓶中,连续传代至细胞生长稳定,细胞密度大于 2×10^6 cells/mL,活率 > 95%,认为 BHK－21 细胞已适应低血清培养基培养。

取处于对数生长期已适应低血清悬浮培养的 BHK－21 细胞接种于无血清悬浮培养基 BHK105 中,初始密度为 0.5×10^6 cells/mL 连续传代至细胞生长稳定,细胞密度大于 2×10^6 cells/mL,活率 > 95%,认为 BHK－21 细胞已适应无血清培养基培养,命名为“BHK－21－sc”。

1.2.2　BHK－21－sc 细胞增殖的稳定性　取驯化后细胞,调整初始密度 0.5×10^6 cells/mL,连续传代 20 代,每 72 h 取样测定细胞密度和细胞活率,对细胞传代稳定性进行监测。

1.2.3　BHK－21－sc 悬浮培养生长动力学曲线　在 5 L 生物反应器中按照起始细胞密度 0.5×10^6 cells/mL、溶氧 DO 为 40%、搅拌速度为 150 r/min、pH 为 7.0,温度为 37 ℃的培养参数进行 3 个批次的 BHK－21－sc 的悬浮培养 168 h,每 24 h 取样进行细胞密度和细胞活率测定,并绘制 BHK－21－sc 悬浮培养生长动力学曲线。

1.2.4　鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺研究　按照 BHK－21－sc 悬浮培养工艺培养细胞,进行 NDV La Sota 株的悬浮培养工艺研究。①接毒量及收获时间:分别按 MOI 0.0001、0.001、0.005、0.01 接种鸡新城疫病毒 La Sota 株,分别于 48、60、72、84、96 h 收获病毒液;②TPCK 胰酶添加量:添加终浓度为 3、5、7、9 μg/mL TPCK 胰酶进行病毒增殖;③培养温度:接毒后培养温度分别设置为 30、33、37 ℃,确定最佳病毒培养温度。在优化各参数时,其他对应参数固定不变。收获的 NDV 病毒液进行 HA 和 $TCID_{50}$ 效价检测,以确定最佳病毒培养工艺参数。

1.2.5　鸡新城疫病毒 LaSota 株悬浮培养工艺验证　在 5 L 反应器中培养细胞,密度达到 6.0×10^6 cells/mL 以上,按照优化后确定的病毒接种量、TPCK 胰酶添加量和病毒培养温度进行病毒悬浮培养,按优化后确定的病毒收获时间,收获病毒液并进行 HA、$TCID_{50}$ 测定。按上述操作重复培养 3 批,验证该工艺的稳定性。

1.2.6　新城疫 La Sota 株悬浮培养逐级放大工艺研究与验证　以优化好的 BHK－21－sc 细胞悬浮培养工艺在 5 L 生物反应器中进行 BHK－21－sc 细胞悬浮培养,细胞培养 72 h,待细胞密度达到要求后,按生物反应器常规转罐技术操作,转入 16 L 生物反应器进行二级培养 72 h,细胞培养密度达到要求后,部分细胞转入 50 L 生物反应器进行三级培养,剩余细胞按优化确定的新城疫 La Sota 株悬浮培养参数进行病毒培养。当 50 L 生物反应器细胞培养 72 h,进行病毒培养,培养参数与 16 L 反应器一致,收获病毒液测定病毒含量。按照以上方法重复开展 3 批新城疫 La Sota 株悬浮培养,进行逐级放大工艺验证。

2　结果与分析

2.1　细胞驯化及传代　贴壁培养的 BHK－21 细胞用低血清细胞培养基在 125 mL 摇瓶中在进行连续传代 6～8 代后逐步适应,生长速度逐步变快,倍增时间逐步规律,细胞密度可达 2×10^6 cells/mL 以上,获得了适应低血清悬浮培养的 BHK－21 悬浮细胞。将已适应低血清培养基培养的 BHK－21 悬浮细胞,用无血清细胞悬浮培养基培养传代 8～10 代后逐步适应,生长速度逐步变快,倍增时间逐步规律,获得了适应无血清悬浮培养的 BHK－21 悬

浮细胞,将之命名为 BHK－21－sc 细胞。BHK－21－sc 细胞呈圆形、饱满、光滑,轮廓清晰、大小均一,分布均匀,培养液清亮,均为单一细胞,未见结团现象(图 1)。图 1 中 a 为贴壁培养的 BHK－21 细胞,b 为初始低血清悬浮培养的 BHK－21 细胞,c 为适应低血清悬浮培养的 BHK－21 细胞,d 为初始无血清悬浮培养的 BHK－21 细胞,e 为适应无血清悬浮培养的 BHK－21－sc 细胞。

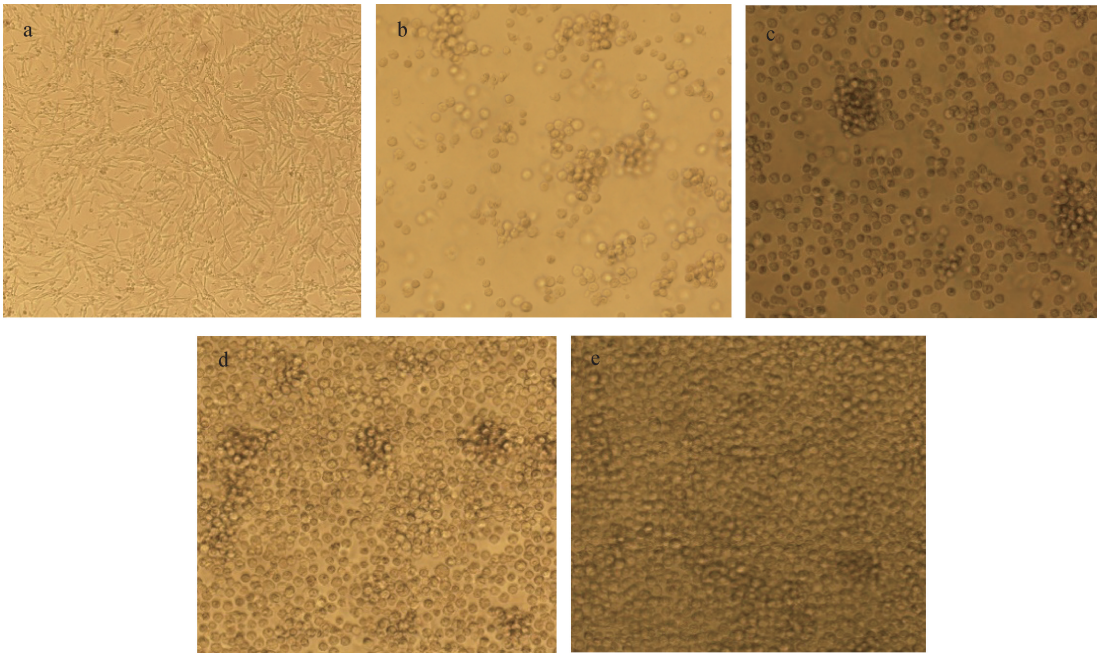

图 1　细胞驯化不同阶段细胞状态图(100×)

Fig 1　cell domestication at different stages (100×)

2.2　BHK－21－sc 悬浮细胞增殖的稳定性　为验证该驯化细胞的稳定性,将驯化后细胞按初始密度 0.5×10^6 cells/mL 连续传 20 代,细胞生长稳定,培养 72 h 细胞密度均在 5×10^6 cells/mL 以上,细胞活率大于 95%。稳定性结果见图 2。

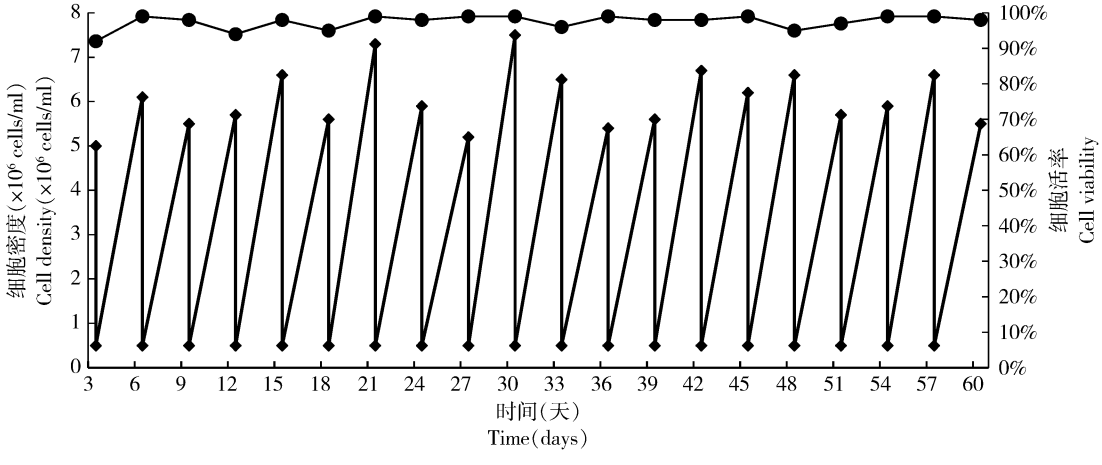

图 2　BHK－21－sc 悬浮细胞增殖的稳定性

Fig 2　Stability of BHK－21－sc suspension cell proliferation

2.3　BHK－21－sc 细胞悬浮培养生长动力学曲线　在 5 L 生物反应器上，对 BHK－21－sc 细胞株培养 168 h，绘制 BHK－21－sc 细胞株的悬浮培养生长曲线。结果表明：3 批次细胞培养 72 h 后，细胞密度均可达到 6.0×10^6 cells/mL 以上，细胞活率均达 97% 以上，证明该悬浮细胞生长稳定，能够满足 BHK－21－sc 细胞株的悬浮培养工艺需求，结果见图 3。

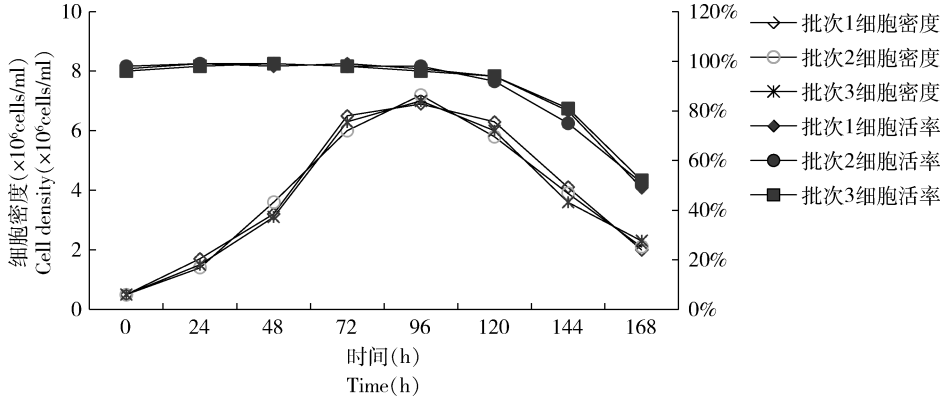

图 3　BHK－21－sc 细胞株在 5 L 生物反应器中的生长曲线

Fig 3　Growth curve of BHK－21－sc cell line in 5L bioreactor

2.4　接毒量及收获时间的优化　分别以不同 MOI 接种 La Sota 株，接毒后 48 h 开始不同时间取样绘制 4 批病毒增殖曲线。曲线图可见接毒后 72 h，病毒效价达到最高峰，随后病毒滴度逐渐下降。接毒剂量 MOI＝0.005 和 MOI＝0.01 时培养 72 h，病毒滴度相当，但较其他组病毒含量高，考虑生产实际的效率与成本问题，本试验确定最佳接种和收获条件为以 MOI＝0.005 的接种量接种培养 72 h 收获病毒液。结果见图 4。

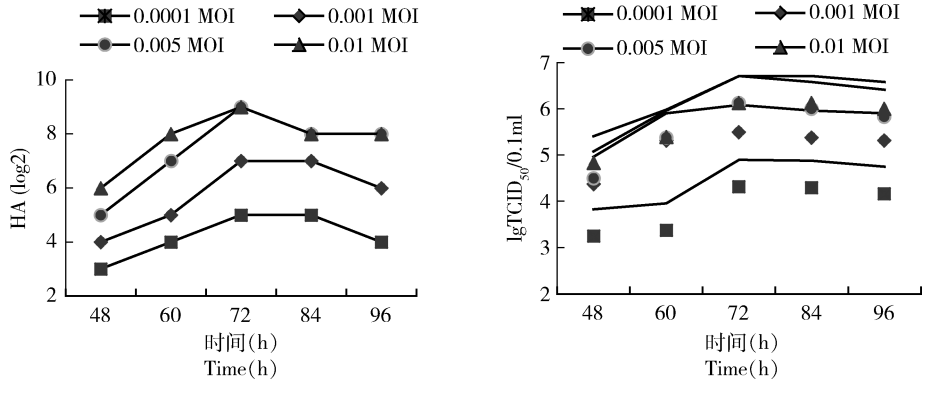

图 4　不同接毒量接种 BHK－21－sc 细胞不同收获时间的病毒含量测定

Fig 4　Virus titers of BHK－21－sc cells inoculated with different dose at different harvest time

2.5　TPCK 胰酶添加量的优化　以 MOI＝0.005 接毒，添加不同的胰酶量后培养 72 h 进行病毒效价检测，结果表明 TPCK 胰酶终浓度为 5 μg/mL 时，收获抗原 HA 为 9log2，病毒含量为 $10^{6.17}$ $TCID_{50}$/0.1mL，较其他胰酶添加量接种的病毒滴度高。确定 5 μg/mL 的 TPCK 胰酶浓度为最佳添加胰酶浓度。结果见表 1。

表 1　不同 TPCK 胰酶添加量接毒的病毒产量比较

Tab 1　Comparison of viral production with different TPCK trypsin dosage

	胰酶浓度 Trypsin dosage			
	3 μg/mL	5 μg/mL	7 μg/mL	9 μg/mL
HA(log2)	7	9	8	8
$TCID_{50}$/0.1mL	$10^{5.83}$	$10^{6.67}$	$10^{6.13}$	$10^{6.13}$

2.6　接毒后培养温度的优化　以不同培养温度进行病毒增殖,由病毒增殖结果可见,30 ℃和 37 ℃较 33 ℃病毒增殖效果差,故确定 33 ℃为最佳培养温度。结果见表 2。

表 2　不同温度收获病毒液的效价比较

Tab 2　Comparison of the titers of the viral at different temperatures

	温度 Temperature		
	30 ℃	33 ℃	37 ℃
HA(log2)	7	9	8
$TCID_{50}$/0.1mL	$10^{5.38}$	$10^{6.37}$	$10^{5.83}$

2.7　鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺验证　利用前期实验优化获得的最优悬浮培养工艺参数组合,进行 3 批次病毒悬浮培养,验证鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺的稳定性。结果表明:3 批次悬浮培养病毒液 HA 均不低于 9log2,病毒含量均不低于 $10^{6.13}$ $TCID_{50}$/0.1mL,证实建立的鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺科学、可靠、稳定。结果见表 3。

表 3　鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺重复性验证

Tab 3　Repeatability verification of suspension culture technology of NDV La Sota strain

试验次数 Test number	HA(log2)	$TCID_{50}$/0.1mL
第一批 The first batch	9	$10^{6.5}$
第二批 The second batch	9	$10^{7.0}$
第三批 The Third batch	9	$10^{6.37}$

2.8　鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺放大　用 5L－16L－50L 反应器对 BHK－21－sc 细胞进行逐级放大培养,放大工艺中 3 批细胞增殖曲线较为接近,细胞生长稳定。鸡新城疫病毒 La Sota 株在 16、50 L 中经 3 批次的培养,72 h 后,收获病毒液,HA 滴度均可达 9log2,病毒含量均可达 $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/0.1mL 以上,与 5 L 生物反应器培养效果基本一致,说明鸡新城疫病毒 La Sota 株悬浮培养工艺可稳定逐级放大到 16、50 L 生物反应器,工艺重复性好、科学稳定。结果见图 5、表 4。

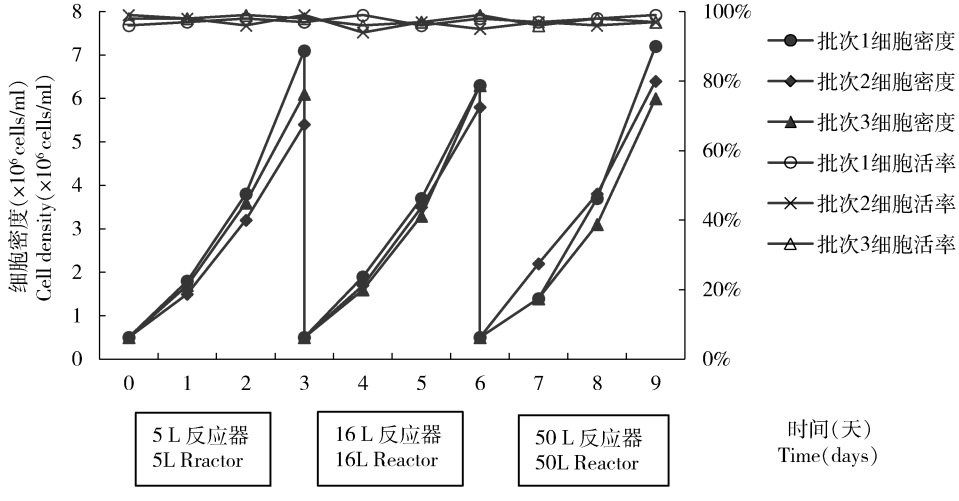

图 5　5、16、50 L 生物反应器内 BHK－21－sc 细胞的增殖曲线

Fig 5　Proliferation curves of BHK－21－sc cell in 16L and 50L bioreactors

表 4　16、50 L 生物反应器内工艺放大病毒增殖结果

Tab 4　Amplification results of virus proliferation in 16 L and 50 L bioreactors

反应器 Reactor	第一批 The first batch		第二批 The second batch		第三批 The Third batch	
	HA(log2)	$TCID_{50}$/0.1 mL	HA(log2)	$TCID_{50}$/0.1 mL	HA(log2)	$TCID_{50}$/0.1 mL
16 L	9	$10^{6.13}$	9	$10^{6.17}$	9	$10^{6.38}$
50 L	9	$10^{6.17}$	9	$10^{6.32}$	9	$10^{6.13}$

3　讨论与结论

我国兽医生物制品行业多采用鸡胚接种收获尿囊液的方式制备新城疫抗原,但鸡胚接种制备疫苗抗原存在诸如鸡胚来源不固定、有外源病毒污染可能等因素,而无血清悬浮培养可以有效提高单位体积内的细胞量,并能够增加批次间的稳定性,是目前抗原培养的发展方向。应用新型现代化的细胞悬浮培养工艺制造动物疫苗抗原也是当前我国动物疫苗的主流发展趋势之一。BHK 细胞是指幼年叙利亚地鼠肾细胞(Baby Hamster Syrian Kidney),1961 年建株,它广泛用于增殖各种病毒,生产兽用疫苗。通过优化悬浮 BHK－21 细胞的培养工艺能够使其达到工业生产的水平[8],BHK－21 悬浮细胞已应用于口蹄疫病毒的工业生产,生产规模达 4000 L 以上,显著提升了口蹄疫抗原的品质[9－10]。

研究表明,新城疫病毒在 BHK 贴壁细胞中能够稳定增殖[11],建立成熟的可放大的新城疫悬浮培养工艺将能够极大促进兽用疫苗的转型升级。本研究通过对 BHK－21 细胞进行低血清和无血清两个阶段的悬浮驯化,筛选出能稳定传代的 BHK－21 悬浮细胞系,由于贴壁至悬浮驯化过程中 BHK－21 细胞的生长特性会发生改变,因此,传代稳定和能够放大生产是实现细胞进行工业生产的必要条件,本研究悬浮驯化的 BHK－21－sc 细胞能够稳定传代并实现在反应器上生长,证实该细胞能够作为新城疫悬浮培养工业生产用细胞。

科学稳定的病毒培养工艺参数是获得均一、高品质和高免疫原性的抗原必要条件。本研究通过逐一优化病毒接毒量、TPCK 胰酶添加量、病毒培养温度及病毒收获时间 4 个关键悬浮培养工艺参数,最终确定最佳病毒培养温度为 33 ℃、最佳接毒量为 MOI＝0.005、最佳 TPCK 胰酶添加量为终浓度 5 μg/mL 及最佳收获时间为 72 h,建立了鸡新城疫病毒 La Sota 株的悬浮培养工艺。应用该工艺进行悬浮培养,病毒增殖效率最高,CPE 达 90% 以上,收获的病毒液 HA 效价可达 9log2,病毒含量不低于 $10^{6.0}TCID_{50}$/0.1mL。连续 3 批重复性验证结果显示该悬浮培养工艺重复性好,稳定可靠。为适应大规模生产,本试验还进行了悬浮工艺放大研究,在 16 L 和 50 L 生物反应器中逐级放大连续培养的 3 批 BHK－21－sc 悬浮细胞,病毒增殖曲线与 5 L 培养的细胞增殖曲线相近,用优化后的新城疫病毒培养工艺在接毒后 72 h 达到病毒效价高峰,收获的病毒液 HA 效价可达 9log2,病毒含量均不低于 $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/0.1mL,证实了该悬浮培养工艺的稳定性和可放大性,具有广泛的发展前景,为最终全面提高新城疫疫苗质量奠定了基础。

本研究通过悬浮培养驯化和筛选获得了形态良好、稳定传代的 BHK－21－sc 悬浮细胞株;该细胞以初始密度 0.5×10^6 cells/mL 接种,培养 72 h 可增殖到 6×10^6cells/mL 左右,细胞活率达 95% 以上。同时获得了鸡新城疫病毒 La Sota 株的全悬浮细胞培养工艺:病毒接种剂量为 MOI 0.005,TPCK 胰酶添加终浓度为 5 μg/mL,最佳培养温度 33 ℃,培养时间 72 h。应用该细胞悬浮培养工艺在 5、16、50 L 反应器上悬浮培养 BHK－21－sc 悬浮细胞株生产鸡新城疫病毒 HA 滴度不低于 9log2,病毒含量不低于 $10^{6.0}TCID_{50}$/0.1mL。表明 BHK－21－sc 细胞无血清全悬浮生产鸡新城疫病毒工艺稳定,可以实现逐级放大和规模化生产。

参考文献：

[1] Aldous E W, Alexander D J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) [J]. Avian Pathol, 2001, 30(2):117 – 128.

[2] Ke G M, Liu H J, Lin M Y, *et al*. Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan [J]. J Virol Methods, 2001, 97(1/2): 1 – 11.

[3] Janice C. Pedersen, Dennis A. Senne, Peter R. Woolcock, *et al*. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002 – 2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America [J]. Journal of Clinical Microbiology,2004, 42(2): 2329 – 2334.

[4] Sa Xiao, Anandan Paldurai, Baibaswata Nayak, *et al*. Complete genome sequences of Newcastle disease virus strains circulating in chicken populations of indonesia [J]. Journal of Virology,2012, 86(10): 5969 – 5970.

[5] 张元兴, 易小萍, 张 立, 等. 动物细胞培养工程[M]. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2007: 63 – 71.
Zhang Y X, Yi X P, Zhang L, *et al*. Animal cell culture engineering [M]. First Edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 63 – 71.

[6] 习 硕, 赵 蕾, 史爱华, 等. MDCK 细胞悬浮驯化及对 H9 亚型禽流感病毒敏感性的研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(10): 1 – 6.
Xi S, Zhao L, Shi Ai H, *et al*. Conversion of MDCK cell line to suspension culture and its sensitivity study to H9 subtype avian influenza Virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(10): 1 – 6.

[7] 刘天伦, 郎洪彬, 孔 飒. PK15 细胞的无血清全悬浮驯化研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(9): 12 – 18.
Liu T L, Lang H B, Zhang S, *et al*. Domestication of a PK15 cell line to suspension culture by serum – free medium [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(9): 12 – 18.

[8] Núñez E G, Leme J, de Almeida Parizotto L, *et al*. Influence of aeration – homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK – 21 cell growth and metabolism [J]. Cytotechnology, 2014, 66(4): 605 – 617.

[9] 薛 英, 王 延, 王玉红, 等. BHK – 21 细胞的悬浮驯化及其在悬浮条件下对口蹄疫 A 型病毒的培养[J]. 广东畜牧兽医科技, 2008, 33(1): 35 – 37.
Xue Y, Wang Y, Wang Y H, *et al*. Suspending and ramble culture in BHK – 21 cell & FMD A type virus culture by suspending condition [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2008, 33(1): 35 – 37.

[10] Li X R, Yang Y K, Wang R B, *et al*. A scale – down model of 4000 – L cell culture process for inactivated foot – and – mouth disease vaccine production. Vaccine [J]. 2019, 37(43): 6380 – 6389.

[11] 董炳梅, 孙培娇, 苗立中, 等. 鸡新城疫病毒 La Sota 株在 BHK – 21 细胞上增殖条件的优化[J]. 中国畜牧兽医,2019, 46(3): 858 – 864.
Dong B M, Sun P J, Miao L Z, *et al*. Optimization about proliferated condition of Newcastle disease virus La Sota strain in BHK – 21 cells [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(3): 858 – 864.

(编 辑:侯向辉)