

生物检定

黄热减毒活疫苗(鸡胚细胞)三级毒种库的建立和质量控制研究*

徐宏山, 黄艳秋, 刘欣玉, 贾丽丽, 李玉华**

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 筛选黄热减毒活疫苗 17D-204 原代鸡胚细胞适应株, 制备三级毒种库, 并对毒种库质量控制研究。方法: 筛选黄热减毒活疫苗生产毒种 17D-204 株, 在原代鸡胚细胞上适应和驯化培养, 获得鸡胚细胞适应株, 并对毒种库进行质量控制研究。结果: 黄热减毒活疫苗 17D-204 在原代鸡胚细胞最适宜培养温度为 37 °C, 最适宜感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.0048; 建立了黄热减毒活疫苗(17D-204(CEC))原始种子、主代种子批、工作种子批三级毒种库。对毒种库鉴别试验、病毒滴度测定、无菌检查、支原体检查、外源病毒因子检查、分枝杆菌检查等项目研究, 均符合《中华人民共和国药典》三部规定。高通量测序显示, 17D-204(CEC)在原代鸡胚细胞上传代 7 代, 其基因序列未发生改变。也未发现内、外源病毒因子污染。结论: 筛选出了鸡胚细胞 17D-204 适应株 17D-204(CEC), 建立了三级毒种库, 传代稳定性和遗传稳定性均良好, 为原代鸡胚细胞取代鸡胚卵黄囊制备黄热减毒活疫苗奠定了坚实基础。

关键词: 黄热病毒; 原代鸡胚细胞; 毒种库; 质量控制; 黄热减毒活疫苗; 17D-204

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)10-1749-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2022-0451

Establishment and quality control of virus seed bank of live attenuated yellow fever vaccine (chicken embryo cells)*

XU Hong-shan, HUANG Yan-qiu, LIU Xin-yu, JIA Li-li, LI Yu-hua**

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To screen primary chicken embryo cells adapted strain of live attenuated yellow fever vaccine 17D-204, prepare virus seed banks and perform release tests. **Methods:** The virus seed of live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 was adapted and domesticated on primary chicken embryo cells, and the chicken embryo cells adapted strain was obtained. Establish virus seed banks of live attenuated yellow fever vaccine (primary chicken embryo cells), and quality control was performed. **Results:** The optimum culture temperature of live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 in primary chicken embryo cells was 37 °C, and the optimum MOI (multiplicity of infection) was 0.0048. Three-level seed banks of primary seed bank, master seed bank, working seed bank of live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 (primary chicken embryo cells) [17D-204 (CEC)] were established. The verification of virus titer, identification test, sterility test, mycoplasma, exogenous

* 重大新药创制项目(2018ZX09738003-008)

** 通信作者 Tel:(010)53852128;E-mail:liyuhua@nifdc.org.cn

第一作者 Tel:(010)53851780;E-mail:xuhongshan@nifdc.org.cn

virus factor test, Mycobacterium test and other items were in line with the provisions of volume III of the Chinese Pharmacopoeia. High throughput sequencing showed that there was no gene mutation and no internal and external virus factor pollution in the gene sequence of the virus seed banks. **Conclusion:** The primary chicken embryo cell adapted strain of live attenuated yellow fever vaccine 17D-204(CEC) can be screened out to establish the virus seed banks, with good passage stability and genetic stability. This study laid a firm foundation for the regeneration of live attenuated yellow fever vaccine from chicken yolk sac to chicken embryo cells.

Keywords: yellow fever virus; primary chicken embryo cells; virus seed bank; quality control; live attenuated yellow fever vaccine; 17D-204

目前,我国采用将17D-204疫苗株接种于鸡胚卵黄囊生产黄热减毒活疫苗,该工艺从1953年开始至今已沿用67年^[1]。传统的生产鸡胚卵黄囊疫苗方法工艺烦琐,流程长,劳动强度大,收获率低,毒种用量大,且疫苗中鸡胚卵清蛋白含量较高。鸡胚中难免潜在一些外源因子(如卵清蛋白、禽类病毒等)污染疫苗。原代鸡胚细胞株相对容易获得,而且增殖能力强,适应性强,具有良好的耐受性,性状比较稳定,不易发生转化^[2]。为了实现原代鸡胚细胞取代鸡胚卵黄囊,实现黄热减毒活疫苗工艺升级换代,本研究首先利用黄热减毒活疫苗17D-204疫苗株在原代鸡胚细胞上适应和驯化培养,获得鸡胚细胞适应株17D-204(CEC)。在此基础上,建立黄热减毒活疫苗(原代鸡胚细胞)原始种子、主代种子批、工作种子批三级毒种库,并对三级毒种库进行质量控制研究。以原代鸡胚细胞为基质生产的黄热减毒活疫苗,将会极大提高疫苗的产量、扩大生产规模、降低疫苗杂蛋白的残留量。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NU-437-600S型生物安全柜, Nuair 公司; ICO150型二氧化碳培养箱, Memmert 公司; ST8R型离心机, Thermo 公司; N60TOUCH型超微量分光光度计, IMPLIN 公司。TC20细胞计数仪, Bio-Rad 公司。

1.2 实验材料

9~10日龄SPF鸡胚,购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司;DMEM培养基、1×PBS缓冲液、胰酶、胎牛血清,购自Gibco公司;T175细胞培养瓶,购自Corning公司;病毒RNA提取试剂盒,购自TIANGEN公司;黄热减毒活疫苗17D-204疫苗株,源自北京天坛生物制品股份有限公司。人血白蛋白,购自成都蓉生药业有限责任公司;Vero细胞,本虫媒病毒疫苗室保存。

2 方法与结果

2.1 原代鸡胚细胞制备及17D-204疫苗株在原代鸡胚细胞上的适应株筛选和驯化培养

取9~10日龄SPF鸡胚,用无菌的解剖剪将鸡蛋的顶部打开,剪掉膜上蛋壳,使膜保持完整。用无菌镊子将膜取掉。取出鸡胚,放入无菌的培养皿。加入1×PBS 20 mL冲洗1次,剪掉每个鸡胚的头、四肢及内脏,将剩余的鸡胚组织放入50 mL无菌烧杯中,将鸡胚组织剪成1 mm³左右小块,再用PBS 20 mL冲洗2次。将烧杯中的组织小块移到锥形瓶中,加入适量37℃的胰酶(每胚约加入胰酶4 mL),并在恒温水浴锅中37℃消化30~35 min,期间15 min轻摇1次。待组织体积增大,边缘出现毛边停止消化,小心倒出胰酶,用PBS 20 mL洗3次。小心倒出PBS,按每鸡胚30 mL加入适量的DMEM培养基(含10%胎牛血清),剧烈震荡,用吸管反复吹打数次使大部分组织小块分散成单细胞状态,用含12层纱布的漏斗过滤即得原代鸡胚细胞悬液。取细胞悬液20 μL与台盼蓝染色液20 μL混匀立即进行活细胞计数后,调整细胞密度至1.0~1.5×10⁶个·mL⁻¹接种细胞培养瓶。

待原代鸡胚细胞长满单层后,将17D-204疫苗株接种长满单层的原代鸡胚细胞,每天观察细胞病变情况,每天取上清样品,采用蚀斑形成法进行17D-204鸡胚细胞适应株的筛选。取待测上清样品用DMEM培养基(含2%胎牛血清)进行10倍稀释,再进行4倍系列稀释,取3~4个适宜稀释度接种Vero细胞单层,每个稀释度病毒接种2孔,每孔0.4 mL,另设细胞对照2孔,置二氧化碳培养箱(36±1)℃吸附1 h,然后每孔加入0.75%羧甲基纤

维素 4 mL,于(35 ± 1) °C 继续培养 7 d 后倾去覆盖物,每孔加入 10% 结晶紫染色液约 2 mL 染色 15 min,用自来水流水冲洗至无紫色,晾干,计数蚀斑数。

正常原代鸡胚细胞生长状态良好,细胞呈长梭形。感染 17D-204 疫苗株病毒后,可发现病变细胞逐日增多,3~5 d 出现病变细胞圆缩脱落。本研究成功获得 17D-204 在原代鸡胚细胞上的适应株 17D-204 (CEC。正常原代鸡胚细胞和接种 17D-204 (CEC) 的病变结果见图 1、2。

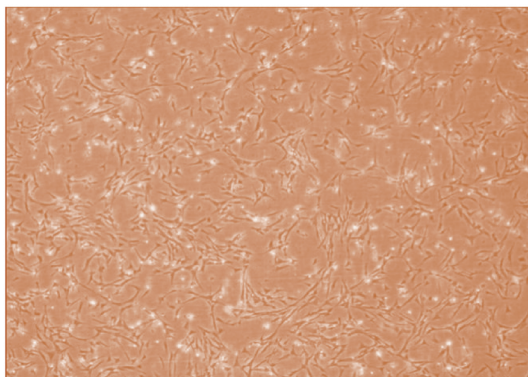


图 1 正常原代鸡胚细胞

Fig. 1 Normal primary chicken embryo cells

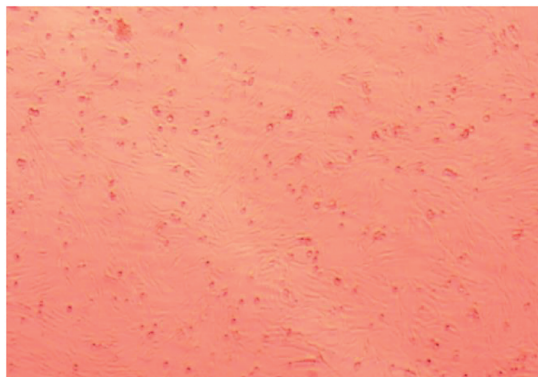


图 2 17D-204 (CEC) 接种长满单层的原代鸡胚细胞后的第 5 天病变情况

Fig. 2 Pathological changes of monolayer primary chicken embryo cells on day 5 after 17 D-204 (CEC) inoculation

2.2 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上的增殖曲线

将黄热减毒活疫苗鸡胚细胞适应株 17D-204 (CEC) 按照病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 0.003 2 接种原代鸡胚细胞,并从接种后第 2

天至第 9 天每天取样,按“2.1”项下蚀斑形成法进行操作,将每天取得的样品用 DMEM 培养基(含 2% 胎牛血清)进行 10 倍系列稀释,取 3~4 个适宜稀释度接种 Vero 细胞单层,每个稀释度病毒接种 2 孔,每孔 0.2 mL,另设细胞对照 2 孔,置二氧化碳培养箱(36 ± 1) °C 吸附 1 h 后每孔加入 0.75% 羧甲基纤维素 4 mL,于(35 ± 1) °C 继续培养 7 d,然后倾去覆盖物,每孔加入 10% 结晶紫染色液约 2 mL 染色 15 min,用自来水流水冲洗至无紫色,计数蚀斑数,计算病毒滴度并绘制病毒增殖曲线。

结果显示 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞于接种后第 3 天病毒滴度达到高峰。因此选择在接种后第 3 天进行病毒收获。病毒增殖曲线见图 3。

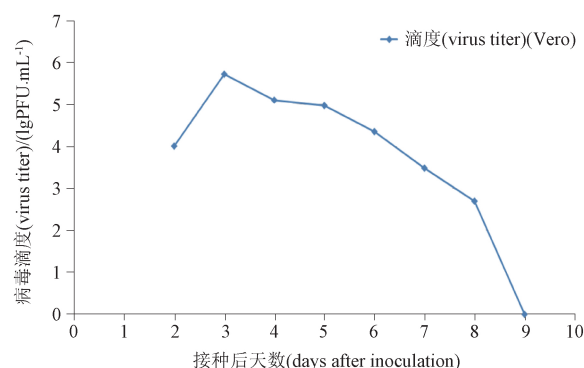


图 3 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上的增殖曲线

Fig. 3 Proliferation curve of 17D-204 (CEC) on primary chicken embryo cells

2.3 最适 MOI 的确定

原代鸡胚细胞接种不同 MOI 的 17D-204 (CEC) 后,经培养,根据增长曲线,分别于接种后第 3、4、5 天收获取上清,采用蚀斑形成法进行病毒滴度测定。根据病毒滴度与病毒在高峰后滴度下降的幅度,绘制不同 MOI 的 17D-204 (CEC) 在鸡胚细胞上的增殖曲线,确定 17D-204 (CEC) 接种原代鸡胚细胞的最适 MOI。

按不同 MOI 接种原代鸡胚细胞后,结果显示(表 1、图 4),病毒高峰均在第 3 天出现。根据病毒滴度与病毒在高峰后滴度下降的幅度,MOI 为 0.004 8 PFU · 个⁻¹时,第 3 天病毒滴度最高,可达 6.10 lgPFU · mL⁻¹。随后病毒滴度下降幅度最小(第 3 天至第 5 天病毒滴度下降 0.8 lgPFU · mL⁻¹)。因此确定最适 MOI 为 0.004 8 PFU · 个⁻¹。

表 1 不同 MOI 对病毒滴度的影响

Tab. 1 Effect of different MOI on virus titer

接种后天数 (days after virus inoculation)	病毒滴度(virus titer)/(lgPFU · mL ⁻¹)		
	MOI = 0.001 6 PFU · 个 ⁻¹	MOI = 0.003 2 PFU · 个 ⁻¹	MOI = 0.004 8 PFU · 个 ⁻¹
2	3.67	4.01	4.12
3	5.10	5.73	6.10
4	3.18	5.10	5.48
5	2.50	4.48	5.30

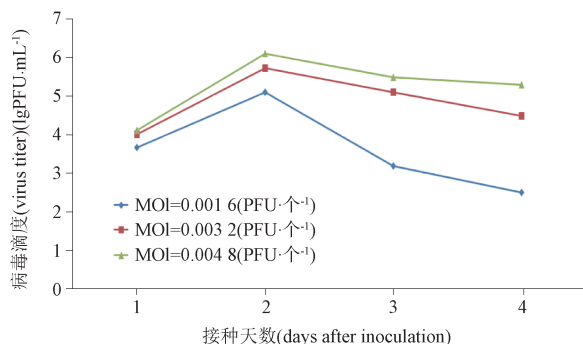


图 4 不同 MOI 对病毒滴度的影响

Fig. 4 Effect of different MOI on virus titer

2.4 17D-204(CEC)原始种子、主种子批、工作种子批的制备

按“2.1”项下方法制备浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个 · mL⁻¹ 的原代鸡胚细胞悬液 240 mL, 分装至 T175 细胞培养瓶, 按照最适 MOI 为 0.004 8 PFU · 个⁻¹ 接种 239 代 17D-204(CEC), 于接种后第 3 天收获病毒液, 分装至无菌离心管, 每管 40 mL, 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取离心后的病毒液上清合并, 加入终浓度为 10% 人血白蛋白, 分装至冻存管, 每支 1.0 mL, 制备黄热减毒活疫苗 17D-204(CEC) 原始种子批, -70 °C 以下冻存。用同样方法将原始种子接种鸡胚细胞制备主种子批(细胞悬液

480 mL, 接种 17D-204(CEC) 主种子批病毒, 每支分装 1.5 mL), 将主种子批接种鸡胚细胞制备工作种子批(细胞悬液 2 400 mL, 接种 17D-204(CEC) 工作种子批病毒, 每支分装 10 mL)。

本研究共制备黄热减毒活疫苗 17D-204(CEC) 原代鸡胚细胞原始种子 200 支(每支 1.0 mL)、主种子批 300 支(每支 1.5 mL)、工作种子批 220 支(每支 10 mL)。

2.5 黄热减毒活疫苗 17D-204(CEC) 原始种子、主种子批、工作种子批的质量控制研究

取黄热减毒活疫苗 17D-204(CEC) 原始种子、主种子批、工作种子批, 按照 2020 年版《中华人民共和国药典》三部黄热减毒活疫苗部分相应的检验方法(具体参照药典操作), 分别进行病毒滴度测定(蚀斑形成法)、鉴别试验(蚀斑中和法)、无菌检查(通则 1101)、支原体检查(通则 3301)、外源病毒因子检查(通则 3302)、分枝杆菌检查(直接接种法)等关键项目进行检定。结果显示 17D-204(CEC) 三级毒种库的鉴别试验的蚀斑减少率均为 100%, 病毒滴度分别为 6.09、6.27、6.18 lgPFU · mL⁻¹, 符合“应不低于 5.8 lgPFU · mL⁻¹”的要求。无菌检查、支原体检查、分枝杆菌检查、外源病毒因子检查等关键质控项目结果也均符合规定。结果详见表 2。

表 2 17D-204(CEC) 三级毒种库检定结果

Tab. 2 Verification results of 17D-204(CEC) virus seed bank

检定项目 (test)	原始种子 (primary virus seed)	主种子批 (master virus seed)	工作种子批 (working virus seed)
鉴别试验(identity test) 蚀斑减少率(plaque reduction rate)/%	100	100	100
病毒滴度(virus titration)/(lgPFU · mL ⁻¹)	6.09	6.27	6.18
外源病毒因子检查(test for adventitious viruses)(细胞培养法)	阴性(negative)	阴性(negative)	阴性(negative)
无菌检查(sterility test)(直接接种法)	无菌生长(conform)	无菌生长(conform)	无菌生长(conform)
支原体检查(test for mycoplasma)(培养法)	无支原体生长(conform)	无支原体生长(conform)	无支原体生长(conform)
分枝杆菌检查(test for mycobacterium)	未见分枝杆菌生长(conform)	未见分枝杆菌生长(conform)	未见分枝杆菌生长(conform)

2.6 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上的传代稳定性研究

制备浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的原代鸡胚细胞悬液, 接种 17D-204 (CEC) 工作种子批, 于接种后第 3 天收获病毒液, 使 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上的传代。以同样方法连续传代 7 代, 对每代进行病毒滴度测定, 绘制传代稳定性图表。结果显示传代后黄热病毒滴度范围为 $5.44 \sim 6.31 \text{ lgPFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上具有较好的传代稳定性, 具体结果如图 5。

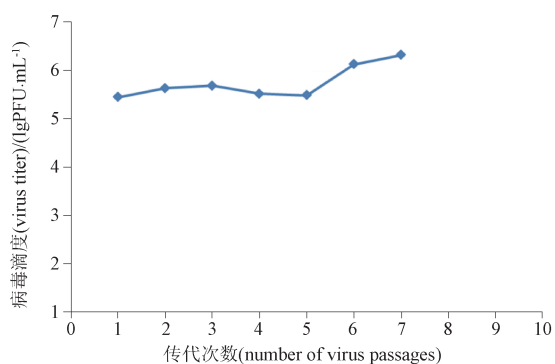


图 5 17D-204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上传代稳定性

Fig. 5 Stability of 17D-204 (CEC) continuously passaged on primary chicken embryo cells

2.7 黄热减毒活疫苗 17D-204 (CEC) 三级毒种库高通量法序列测定

按照 TIANGEN 公司病毒 RNA 提取试剂盒说明书, 分别提取 17D-204 (CEC) 原始种子、主代种子

批、工作种子批 RNA 样本。用移液器将 Carrier RNA 工作液 $560 \mu\text{L}$ 加入 1 个干净的 1.5 mL 离心管中。向离心管中加入平衡至室温的样本 $140 \mu\text{L}$, 涡旋振荡 15 s 混匀, 在室温孵育 10 min 。加入无水乙醇 $560 \mu\text{L}$, 盖上管盖并涡旋振荡 15 s 。仔细将离心管中的 $1260 \mu\text{L}$ 液体分 2 次 (每次 $630 \mu\text{L}$) 转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2 (吸附柱放在收集管中), 盖上管盖, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min , 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。小心打开吸附柱盖子, 加入缓冲液 GD (使用前已加入无水乙醇) $500 \mu\text{L}$, 盖上管盖, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min , 弃废液, 将吸附柱放回收集管。小心打开吸附柱盖子, 加入漂洗液 RW (使用前已加入无水乙醇) $500 \mu\text{L}$, 盖上管盖, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min , 弃废液, 将吸附柱放回收集管。重复漂洗 1 次, 将吸附柱放回收集管中, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min , 使吸附膜完全变干, 弃废液。将吸附柱放入 RNase-Free 离心管 (1.5 mL) 中, 小心打开吸附柱的盖子, 向吸附膜的中间部位悬空滴加平衡至室温的 RNase-Free ddH₂O $50 \mu\text{L}$, 盖上盖子, 室温放置 5 min , $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min 。采用超微量分光光度计对提取的 RNA 样本进行浓度测定。高通量 RNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。获得黄热减毒活疫苗三级库病毒基因组序列后, 用 NCBI Blast +、MegAlign 等生物学软件对三级库核酸序列进行比对分析。

提取的 17D-204 (CEC) 原始种子、主种子批、工作种子批病毒 RNA 采用超微量分光光度法进行 RNA 浓度测定, 结果见表 3。

表 3 YF17D-CEC 三级毒种库提取 RNA 浓度测定结果

Tab. 3 RNA concentration extracted from YF-17D-CEC virus seed bank

序号 (No.)	名称 sample name)	体积 (volume) / μL	浓度 (concentration) / ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	YF-17D PS20190112mRNA	50	234.2
2	YF-17D MS20190115mRNA	50	265.3
3	YF-17D WS20190117mRNA	50	258.9

结果显示, 成功提取了 17D-204 (CEC) 三级毒种库 RNA 样本。RNA 的浓度均能够达到高通量 RNA 序列测定的要求。

采用新一代 Illumina/Solexa 测序平台进行高通量 RNA 测序^[3-6], 应用 NCBI Blast +、MegAlign 等生物学软件 17D-204 (CEC) 三级毒种库全基因组核酸

序列进行比对分析。测序和比对分析结果显示, 测得 YF17D-CEC 的病毒基因组大小为 10862 个核苷酸, GC 含量为 49.71% , 该基因组无重复序列。序列比对分析 17D-204 (CEC) 三级毒种库序列与 YF/Vaccine/USA/Sanofi - Pasteur - 17D - 204/UF795AA/YFVax (GeneBank 编号: JX503529.1)、

YFV17D - 204 (GeneBank 编号: KF769015.1)、YFV17D RKI (GeneBank 编号: JN628279.1) 同源性均为 100%。三级毒种库之间未发生突变,说明 17D - 204 (CEC) 在原代鸡胚细胞基质上增殖有比较好的遗传稳定性。

3 讨论

原代鸡胚细胞对各类病毒广泛敏感且接种病毒不会产生针对性抗体,培养简便易操作^[7],可用于流感病毒、狂犬病病毒、猴痘病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、黄热病毒等多种病毒的培养^[8-12],并已用于生产麻疹减毒活疫苗、腮腺炎减毒活疫苗等。

本研究首先利用黄热减毒活疫苗 17D - 204 疫苗株在原代鸡胚细胞上适应和驯化培养,获得鸡胚细胞适应株 17D - 204 (CEC),在原代鸡胚细胞于接种后第 3 天病毒滴度达到高峰,与李淑云、钱依韵等研究的结果^[13-14]基本一致。在此基础上,建立 17D - 204 (CEC) 原始种子、主代种子批、工作种子批三级毒种库,并对三级毒种库进行关键项目质量控制,所检项目均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》三部黄热减毒活疫苗相关规定。

病毒疫苗株的连续传代稳定性是决定该毒株能否实现从研发到生产的关键。确定生产用毒种能保持良好的传代稳定性是确保后续研制和生产顺利进行的基础^[15]。如果一株病毒株在传代过程中病毒滴度不稳定,尤其是出现病毒滴度降低趋势,就会局限它的使用。将 17D - 204 (CEC) 工作种子批病毒在原代鸡胚细胞上连续传代 7 代后,病毒滴度依然稳定,病毒滴度范围 5.44 ~ 6.31 lgPFU · mL⁻¹,说明 17D - 204 (CEC) 在原代鸡胚细胞上具有较好的传代稳定性。

减毒活疫苗基因组的遗传稳定性是评价减毒活疫苗安全性和免疫原性的关键指标。如果一株病毒株在传代增殖过程中容易发生基因变异,导致毒力变化和免疫原性降低,就会局限它的使用次数,甚至不能用于生产疫苗。世界卫生组织建议新的主种子和工作种子批应该进行病毒基因组测序,以检查疫苗的遗传稳定性^[16]。本研究测序结果显示 17D - 204 (CEC) 毒种库基因组与 NCBI GeneBank 数据库中的 YFV17D RKI 株 (GeneBank 编号: JN628279.1)、YFV17D - 204 株 (GeneBank 编号: KF769015.1)、YF/Vaccine/USA/Sanofi - Pasteur - 17D - 204/UF795AA/YFVax (GeneBank 编号:

JX503529.1) 同源性均为 100%。三级毒种库之间未发生突变,也未发现内、外源病毒因子污染。说明 17D - 204 (CEC) 基因组在原代鸡胚细胞基质上传代增殖遗传稳定性良好。利用高通量 RNA 测序技术可快速检测 17D - 204 (CEC) 三级毒种库全基因组信息,序列分析数据可用于黄热减毒活疫苗毒种库的遗传稳定性监测,对 17D - 204 (CEC) 毒种在基因水平进行质量控制。

鸡胚细胞有可能取代鸡胚卵黄囊制备黄热减毒活疫苗。这种疫苗比鸡胚卵黄囊疫苗更安全,在质量控制上具有明显优势。本研究为进一步深入研究鸡胚细胞替代鸡胚卵黄囊制备黄热减毒活疫苗,提高生产能力,实现黄热减毒活疫苗真正的升级换代奠定了基础。

参考文献

- [1] 侯爵, 刘颖, 邵一鸣. 黄热病减毒活疫苗的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(9):860
HOU J, LIU Y, SHAO YM. Research progress of live attenuated yellow fever vaccine[J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2011, 31(9):860
- [2] 朱国坡, 周晓丽, 郭延锋, 等. 鸡胚成纤维细胞原代培养及应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(3):112
ZHU GP, ZHOU XL, GUO YF, et al. Primary culture and application of chicken embryo fibroblasts[J]. *Prog Vet Med*, 2010, 31(3):112
- [3] DILLIES MA, RAU A, AUBERT J, et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis[J]. *Brief Bioinform*, 2013, 14(6):671
- [4] KUKURBA KR, MONTGOMERY SB. RNA sequencing and analysis[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015(11):951
- [5] RAVI RK, WALTON K, KHOSROHEIDARI M. MiSeq: a next generation sequencing platform for genomic analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1706: 223
- [6] WITHANAGE MHH, LIANG H, ZENG E. RNA-seq experiment and data analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2418: 405
- [7] 程尧, 程小玲, 申瑗琳, 等. 人用疫苗生产用细胞基质使用现状及研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2023, 46(5):295
CHENG Y, CHENG XL, SHEN AL, et al. Current status and research progress of cell substrate for human vaccine production[J]. *Int J Biol*, 2023, 46(5):295
- [8] PRESCOTT MA, MOULTON H, PASTEY MK. An alternative strategy to increasing influenza virus replication for vaccine production in chicken embryo fibroblast (DF-1) cells by inhibiting interferon alpha and beta using peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers[J]. *J Med Microbiol*, 2024, 73(2)

- [9] 王远征, 卫江波, 张国强, 等. 狂犬病病毒在鸡胚成纤维细胞上的传代适应性[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(6): 669
WANG YZ, WEI JB, ZHANG GQ, *et al.* Adaptive passage of rabies virus in chicken embryo fibroblasts[J]. *Chin J Biol*, 2012, 25(6):669
- [10] HUANG Q, WANG Y, ZHAO T, *et al.* Examination of the cross-reactivity between vaccinia virus Tiantan strain and monkeypox virus[J]. *J Virol Methods*, 2023, 320: 114772
- [11] 刘晓琳, 张安宁, 陈晓梅, 等. 麻疹、腮腺炎、风疹和水痘联合减毒活疫苗的研制[J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 39(5): 209
LIU XL, ZHANG AN, CHEN XM, *et al.* Preparation of a live attenuated measles, mumps, rubella and varicella combined vaccine[J]. *Int J Biol*, 2016, 39(5):209
- [12] FREIRE MS, MANN GF, MARCHEVSKY RS, *et al.* Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity[J]. *Vaccine*, 2005, 23(19):2501
- [13] 李淑云, 付琨, 黄浩, 等. 鸡胚细胞制备 17D 黄热疫苗[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(11):831
LI SY, FU K, HUANG H, *et al.* Preparation of 17D yellow fever vaccine with chick embryo cells[J]. *Chin J Biol*, 2007, 20(11): 831
- [14] 钱依韵, 许定花, 熊文典, 等. 17D 黄热病病毒在鸡胚成纤维细胞(DF-1)上的传代培养[J]. 药物生物技术, 2020, 27(3):201
QIAN YY, XU DH, XIONG WD, *et al.* Passage culture of 17D yellow fever virus on chicken embryo fibroblast (DF-1) [J]. *Pharm Biotechnol*, 2020, 27(3):201
- [15] 张莉. 四价流感病毒裂解疫苗生产用毒种连续传代稳定性研究[J]. 科学与财富, 2015(11):691
ZHANG L. Study on the passage stability of the virus seeds for quadrivalent influenza virus-split vaccine production [J]. *Sci Wealth*, 2015(11):691
- [16] PESTANA CP, LAWSON-FERREIRA R, LESSA-AQUINO C, *et al.* Sanger-based sequencing technology for yellow fever vaccine genetic quality control[J]. *J Virol Methods*, 2018, 260: 82

(本文于 2024 年 9 月 6 日修改回)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。