

重组鲎 C 因子酶原的高效表达及其在内毒素检测中的应用

陈富^{1,2}, 吴文卿², 刘婷婷^{2,3}, 曾嘉辉^{2,3}, 邓梅清^{2,3}, 林秀华^{2,3}, 吴清平^{2*}, 陈玲^{2,3,4*}

1 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州

2 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 国家市场监督管理总局重点实验室(食品微生物安全大数据技术), 广东 广州

3 广东省微生物分析检测中心, 食品药品实验室, 广东 广州

4 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆

陈富, 吴文卿, 刘婷婷, 曾嘉辉, 邓梅清, 林秀华, 吴清平, 陈玲. 重组鲎 C 因子酶原的高效表达及其在内毒素检测中的应用[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 899-914.

CHEN Fu, WU Wenqing, LIU Tingting, ZENG Jiahui, DENG Meiqing, LIN Xiuhua, WU Qingping, CHEN Ling. High level expression of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen and its application in endotoxin detection[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(2): 899-914.

摘要: 【目的】利用重组鲎 C 因子酶原(recombinant horseshoe crab factor C enzymogen, rFC)开发一种低成本、高灵敏度的内毒素检测试剂及相应检测方法。【方法】采用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞 Sf9 中表达 rFC, 并通过终点荧光法测定其酶活性。优化蛋白表达条件, 采用离子交换进行初步纯化。优化 rFC 的反应条件, 进而建立基于终点荧光法的内毒素检测方法, 并将该方法与传统鲎试剂(limulus amoebocyte lysate, LAL)进行等效性验证。【结果】重组鲎 C 因子酶原的表达量为 110.42 mg/L, 提高了 4.75 倍。该内毒素检测方法在 0.005–1.000 EU/mL 范围内具有良好的线性, 反应时间为 1 h, 检测限为 0.005 EU/mL。该方法在实际样本中的适用率为 92.45%, 检测值一致性为 83.67%, 且 89.80% 的样本检测限值与 LAL 法一致。【结论】本研究成功实现了重组鲎 C 因子酶原的高效表达, 建立了低成本、灵敏度高于普通鲎试剂的内毒素检测方法, 具有良好的应用潜力。

关键词: 杆状病毒表达系统; 重组鲎 C 因子酶原; 内毒素检测

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1100700)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100700).

*Corresponding authors. E-mail: WU Qingping, wuqp203@163.com; CHEN Ling, chenling@gdim.cn

Received: 2025-08-06; Accepted: 2025-10-13; Published online: 2025-11-26

High level expression of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen and its application in endotoxin detection

CHEN Fu^{1,2}, WU Wenqing², LIU Tingting^{2,3}, ZENG Jiahui^{2,3}, DENG Meiqing^{2,3}, LIN Xiuhua^{2,3}, WU Qingping^{2*}, CHEN Ling^{2,3,4*}

1 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Key Laboratory of Big Data Technologies for Food Microbiological Safety (State Administration for Market Regulation), Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

3 Food and Drug Laboratory, Guangdong Detection Center of Microbiology, Guangzhou, Guangdong, China

4 Guangdong Huankai Biological Sci & Tech Co., Ltd., Zhaoqing, Guangdong, China

Abstract: **[Objective]** To develop a low-cost and highly sensitive endotoxin detection reagent and detection method with recombinant horseshoe crab factor C enzymogen (rFC). **[Methods]** The Bac-to-Bac baculovirus expression system was used to express rFC in Sf9 cells and the activity of rFC was measured by the end-point fluorescence assay with endotoxin. The conditions of protein expression were optimized, and ion exchange was used for crude enzyme separation. An endotoxin detection method with rFC based on end-point fluorescence assay was established after the reaction conditions were optimized. Furthermore, the established method was compared with the conventional limulus amoebocyte lysate (LAL). **[Results]** The expression level of rFC was 110.42 mg/L, increasing by 4.75 times. The linear range of endotoxin detection was 0.005–1.000 EU/mL in 1 h, with a good linearity and the limit of detection being 0.005 EU/mL. The applicability rate of this method for actual samples was 92.45%. The consistency of the detection results was 83.67%, and 89.80% of the samples had consistent detection limits with LAL. **[Conclusion]** This study achieves the efficient expression of rFC and establishes an endotoxin detection method with higher sensitivity than LAL, which has great potential for application.

Keywords: baculovirus expression system; recombinant horseshoe crab factor C enzymogen; endotoxin detection

内毒素(endotoxin)是革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)复合物, 是引发热原反应、脓毒症和多器官功能障碍的主要致病因子^[1-2], 严重威胁人类生命健康^[3-6]。其性质稳定、难以去除, 广泛存在于药品、医疗器械及生物制品中^[7-11]。因此, 建立灵敏可靠

的内毒素检测方法对保障公共卫生安全至关重要。

目前, 内毒素检测主要依赖鲎试验法(limulus amoebocyte lysate, LAL); 该法虽灵敏度高、应用广泛, 但其生产严重依赖鲎血资源; 鲎因过度采捕导致种群濒危, 于2021年被我国

列为国家二级保护动物，进而使得鲎试剂原料获取日趋受限^[12-13]。此外，LAL法在实际应用中易受(1,3)- β -D-葡聚糖等的干扰，存在特异性不足的问题^[14]。鲎C因子酶原(horseshoe crab factor C enzymogen, FC)是一种对痕量内毒素高度敏感的丝氨酸蛋白酶原，是鲎试剂启动内毒素检测酶级联反应的关键组分；其可被内毒素激活并水解人工合成的荧光底物，进而实现高灵敏度的内毒素定量检测^[15]。近年来，重组鲎C因子酶原(recombinant horseshoe crab factor C enzymogen, rFC)已通过多种异源表达系统成功获得，并开发出基于荧光法的商品化内毒素检

测试剂盒(重组C因子法)^[16-19]。然而，重组C因子法因生产成本高昂，导致其商品化进程缓慢、市场占有率较低^[19]。因此，开发低成本的重组鲎C因子酶原制备工艺已成为当前领域的研究热点。

本研究采用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统在昆虫细胞Sf9中高效表达rFC，通过优化表达条件以获得最佳产量；通过优化酶反应条件提高其在内毒素检测中的灵敏度，以期为建立一种低成本、高灵敏度的内毒素检测方法并实现大规模推广应用奠定坚实基础(图1)。

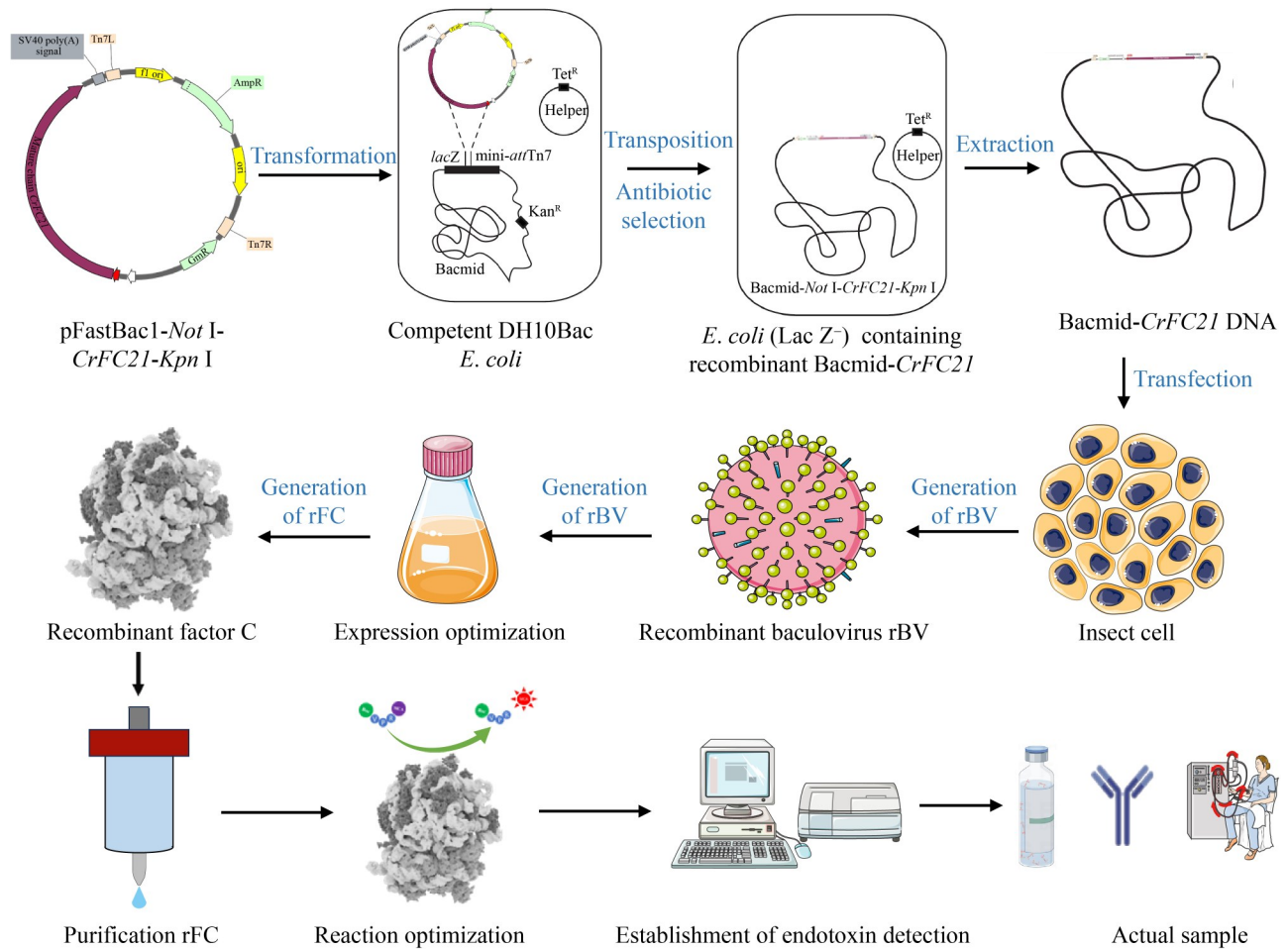


图1 基于重组鲎C因子酶原的内毒素检测方法构建

Figure 1 Establishment of endotoxin detection method based on recombinant horseshoe crab factor C enzymogen.

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、质粒和细胞

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、pUC57-*CrFC21* 质粒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 含 pFastBac1 质粒的大肠杆菌购自广东省科学院微生物研究所; 大肠杆菌感受态细胞 DH10Bac 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 草地贪夜蛾细胞(Sf9)购自国家实验细胞资源共享平台。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Not* I、*Kpn* I, 宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA Ligase 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 荧光底物, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; Tris、CM-琼脂糖凝胶 CL-6B, 北京索莱宝科技有限公司; Lipofectamine 3000, 赛默飞世尔科技公司; 内毒素标准品(90 EU/支), 中国食品药品检定研究院; 动态浊度法鲎试剂(每支 1.25 mL)、细菌内毒素检查用水, 湛江安度斯生物有限公司; 重组 C 因子法内毒素检测试剂盒, 苏州瑞特佰生物科技有限公司。

BioTeK/Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统, 伯腾仪器有限公司; LKM 动态试管检测仪, 湛江安度斯生物有限公司。

1.3 重组转座质粒 pFastBac1-*Not* I-*CrFC21*-*Kpn* I的构建与amp;鉴定

在 NCBI 网站下载圆尾蝎鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*) 的鲎 C 因子酶原 DNA 序列 *CrFC21* (登录号为 S77063.1), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司完成基因合成。以合成的基因序列为模板, 使用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Max Mix (P515) 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 35 个循

环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物与 pFastBac1 质粒先经 *Not* I 和 *Kpn* I 双酶切, 随后进行胶回收纯化, 并使用 T4 DNA 连接酶连接。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后, 通过菌落 PCR (引物 P3/P4, 表 1) 筛选阳性克隆, PCR 反应体系和 PCR 反应条件与使用引物 P1/P2 时相同。

1.4 重组杆状病毒载体 Bacmid-*CrFC21* 构建与amp;鉴定

将重组转座质粒 pFastBac1-*CrFC21* 转化至含有 Helper 和 Bacmid 的大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中。将转化产物涂板于含有 50 μ g/mL 卡那霉素、10 μ g/mL 四环素、7 μ g/mL 庆大霉素、40 μ g/mL IPTG 及 200 μ g/mL X-gal 的 LB 平板, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。通过蓝白斑筛选, 挑取白色菌落; 使用引物 P5/P6 (表 1) 进行菌落 PCR 以鉴定阳性克隆菌株。PCR 反应体系、反应条件与 1.3 节使用引物 P1/P2 时相同。

1.5 重组杆状病毒 ACMNPV-*CrFC21* 制备与amp;鉴定

利用 Lipofectamine 3000 将 5 μ g Bacmid-*CrFC21* 转染至 Sf9 细胞, 于 27 $^{\circ}$ C 培养 7 d。收集培养上清, 4 $^{\circ}$ C、500 \times g 离心 10 min 后, 获得 P1 代重组杆状病毒储液。随后, 将 P1 代病毒以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.1 感染 Sf9 细胞, 培养 4 d 后收集 P2 代病毒储液; 用 P2 代病毒以相同 MOI 感染细胞, 培养 4 d 后获

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequence

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'→3')
P1	ATTTGCGGCCGCATGGTCTTAGCGTCCG
P2	CGGGGTACCTCAAATGAACTGCCTAATC CATGA
P3	CGGATTATTCATACCGTCCCACCAT
P4	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATG
P5	CCCAGTCACGACGTTGTAATAACG
P6	AGCGGATAACAATTTCACACAGG

得 P3 代病毒储液。取 200 μL P3 代病毒液提取核酸, 并参照 1.3 节方法进行 PCR 验证。

1.6 重组蚩 C 因子酶原表达和鉴定

使用 P3 代病毒感染 Sf9 细胞(MOI 为 1.0), 于 27 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 72 h, 分别收集培养上清和细胞沉淀。细胞沉淀经无热原水洗涤 2-3 次后, 于冰水浴中进行超声破碎(功率 240 W, 工作时间 5 s、间歇 5 s, 总时长 20 min)。破碎液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清, 作为胞内组分待测。

取 5 μL 待测样品, 与 20 μL 10 \times 反应缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.00, 1.5 mol/L NaCl)、2 μL 1 mmol/L 荧光底物及 75 μL 无热原水在 96 孔板中混合。实验组加入 100 μL 1 EU/mL LPS, 空白对照组则加入等体积无热原水。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 在激发光 360 nm、发射光 460 nm 下分别读取 0 h 和 1 h 的荧光值, 计算其相对荧光增益值(relative fluorescence unit, ΔRFU), 选取酶活性显著的组分进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 表达优化

为评估不同感染复数下的表达效果, 将细胞悬液(密度 2.0×10^6 个/mL)分别以 MOI 为 500、50、5 的条件进行接毒, 并每隔 12 h 收集 1 次上清液, 采用 1.6 节方法检测其酶活性。

1.8 蛋白纯化

采用弱阳离子交换层析(CM-琼脂糖凝胶)对发酵液上清进行初步纯化。将样品上柱后, 使用不同离子强度的缓冲液进行梯度洗脱, 并参照 1.6 节的方法检测各洗脱组分的酶活性。收集具有活性的组分, 经超滤浓缩后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.9 反应体系优化

为确定最佳反应条件, 分别考察了 pH、NaCl 浓度、酶量及荧光底物浓度对酶活性的影响。具体参数设置如下: pH 梯度为 6.00-10.00 (间隔 0.50); NaCl 浓度梯度为 0.05-0.50 mol/L; 酶量为 1-10 μL ; 荧光底物浓度为 10-140 $\mu\text{mol/L}$ 。

通过对比各条件下的反应活性, 筛选最优反应体系。

1.10 检测方法建立

用无热原水将内毒素标准品配制成 90 EU/mL 的母液, 再稀释至 10 EU/mL, 进一步经 10 倍或等倍梯度稀释, 获得浓度为 5.000、1.000、0.500、0.100、0.050、0.010、0.005、0.001 EU/mL 的标准品溶液。参照 1.6 节方法测定各浓度对应的荧光增益值, 以内毒素浓度为横坐标, 相对荧光增益值为纵坐标, 绘制标准曲线。依据《中国药典》(2020 年版)第四部通则 1143 中细菌内毒素检查法的相关规定^[20], 对标准曲线进行有效性判定。

1.11 实际样本检测

选取透析液、医药耗材、注射药品、氨基酸、包装饮用水、酸奶等实际样本, 采用本研究建立的方法与蚩试剂进行等效性验证。根据《中国药典》(2020 年版)第四部通则 1143 对检测结果进行有效性判定。

2 结果与分析

2.1 重组转座质粒 pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I

以 pUC57-CrFC21 质粒为模板, PCR 扩增蚩 C 因子酶原全长序列(图 2A)。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑选阳性转化子进行菌落 PCR 验证。阳性克隆在 3 432 bp 位置有目的条带; 阴性克隆在 406 bp 位置有空载条带(图 2B)。双酶切鉴定阳性克隆质粒(pFastBac1-CrFC21), 阳性克隆质粒条带正确(含有目的条带 3 071 bp 和线性化载体 4 731 bp)(图 2C)。

2.2 重组杆状病毒载体 Bacmid-CrFC21

将重组转座质粒 pFastBac1-CrFC21 转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中, 涂布于含有抗性、诱导剂和显色底物的平板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。蓝白斑筛选, 阳性克隆菌为白色, 阴性

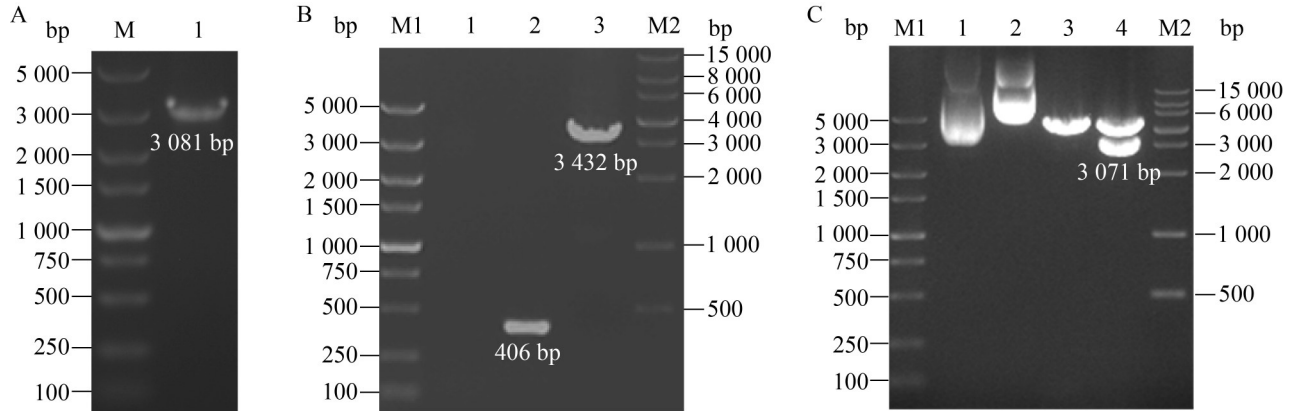


图2 重组转座质粒pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I构建和鉴定。A: PCR扩增Not I-CrFC21-Kpn I (泳道M: DL5000 DNA marker; 泳道1: Not I-CrFC21-Kpn I); B: 重组转座质粒pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I的菌落PCR鉴定(泳道M1: DL5000 DNA marker; 泳道1: PCR空白对照; 泳道2: pFastBac1-空载质粒; 泳道3: 阳性克隆; 泳道M2: DL15000 DNA marker); C: 双酶切验证(泳道M1: DL5000 DNA marker; 泳道1: pFastBac1-空载; 泳道2: pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; 泳道3: 双酶切pFastBac1-空载; 泳道4: 双酶切pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; 泳道M2: DL15000 DNA marker)。

Figure 2 Construction and identification of pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I. A: The amplification of Not I-CrFC21-Kpn I by PCR (Lane M: DL5000 DNA marker; Lane 1: Not I-CrFC21-Kpn I); B: The identification of pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I (Lane M1: DL5000 DNA marker; Lane 1: The negative control of PCR; Lane 2: Negative for pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; Lane 3: Positive for pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; Lane M2: DL15000 DNA marker); C: The identification of pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I by enzyme digestion (Lane M1: DL5000 DNA marker; Lane 1: pFastBac1; Lane 2: pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; Lane 3: The enzyme digestion of pFastBac1; Lane 4: The enzyme digestion of pFastBac1-Not I-CrFC21-Kpn I; Lane M2: DL15000 DNA marker).

克隆菌体(Bacmid-空载)为蓝色(图 3A)。挑选阳性克隆菌体进行菌落 PCR 鉴定, 真阳性克隆菌体(Bacmid-CrFC21)在 5 400 bp 位置存在目的条带, 假阳性克隆菌体无目的条带(图 3B)。提取真阳性克隆菌体质粒, 分别进行双酶切鉴定和一代测序验证。真阳性克隆菌体质粒 Bacmid-CrFC21 在 3 071 bp 具有目的条带(图 3C)。测序结果与预期一致, 表明重组杆状病毒载体 Bacmid-CrFC21 构建成功。

2.3 重组杆状病毒 ACMNPV-CrFC21

将收集的 P2 代杆状病毒浸染 Sf9 细胞, 27 °C 培养 96 h 后在显微镜下观察。未被杆状病毒感染的细胞圆润、有光泽(图 4A); 被杆状病毒感染的细胞出现臃肿、漂浮、不贴壁、

细胞间隙变大、细胞碎片多等细胞病变现象(图 4B、4C)。重组杆状病毒 ACMNPV-CrFC21 在 5 400 bp 存在目的条带, 而 ACMNPV-空载(野生型)在 310 bp 存在目的条带, 正常 Sf9 细胞无条带(图 4D), 表明具有侵染 Sf9 细胞的重组杆状病毒颗粒 ACMNPV-CrFC21 制备成功。

2.4 酶活性鉴定

具有完整活性的重组蚕 C 因子酶原仅存在于重组杆状病毒 ACMNPV-CrFC21 的培养基上清中(图 5A), 该蛋白为分泌蛋白。将发酵液上清进行 SDS-PAGE 鉴定, 其全长的分子量约为 116 kDa (图 5B)。经 DTT 处理, 还原二硫键后双链结构分开, 分别为 80 kDa 的重链和 36 kDa 的轻链(图 5B)。

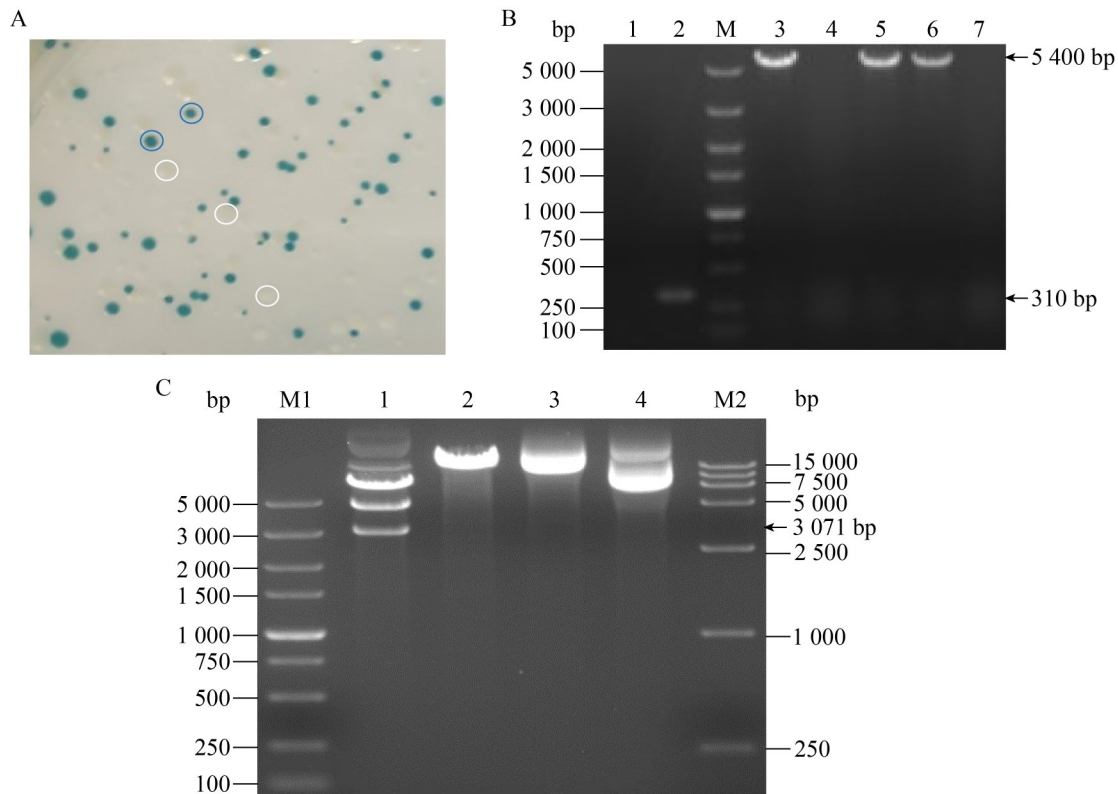


图3 重组杆状病毒载体Bacmid-*CrFC2I*的构建和鉴定。A: 重组杆状病毒载体Bacmid-*CrFC2I*蓝白斑筛选; B: 阳性转化子菌落PCR鉴定(泳道M: DL5000 DNA marker; 泳道1: PCR空白; 泳道2: Bacmid-空载; 泳道3、5、6: Bacmid-*CrFC2I*; 泳道4、7: 假阳性, 无Bacmid载体); C: 杆状病毒载体双酶切鉴定(泳道M1: DL5000 DNA marker; 泳道1: Bacmid-*CrFC2I*双酶切; 泳道2: Bacmid-空载双酶切; 泳道3: Bacmid-空载; 泳道4: Bacmid-*CrFC2I*; 泳道M2: DL15000 DNA marker)。

Figure 3 Construction and identification of recombinant baculovirus vector Bacmid-*CrFC2I*. A: The blue-white spot screening assay for Bacmid-*CrFC2I*; B: The identification of positive transforming colonies by PCR (Lane M: DL5000 DNA marker; Lane 1: The negative control of PCR; Lane 2: Negative for Bacmid-*CrFC2I*; Lanes 3, 5, 6: Positive for Bacmid-*CrFC2I*; Lanes 4, 7: False positive for Bacmid-*CrFC2I*); C: The identification of Bacmid-*CrFC2I* by enzyme digestion (Lane M1: DL5000 DNA marker; Lane 1: The enzyme digestion of Bacmid-*CrFC2I*; Lane 2: The enzyme digestion of wild Bacmid; Lane 3: The non-enzyme digestion of wild Bacmid; Lane 4: The non-enzyme digestion of Bacmid-*CrFC2I*; Lane M2: DL15000 DNA marker).

2.5 最佳表达条件

不同表达时间对重组鲎C因子酶原活性具有显著影响, 其在攻毒24 h后开始表达, 最佳表达时间为84 h(图6A)。当MOI>50时重组鲎C因子酶原表达量差异不显著, 其最佳MOI=5(图6B)。

2.6 纯化结果

收集具有酶活性的组分(图7A)并利用30 kDa超滤膜对收集液进行超滤浓缩和脱盐。将酶活性最高的流穿组分进行SDS-PAGE, 其非还原型条带为116 kDa, 还原型具有80 kDa的重链和36 kDa轻链(图7B)。蛋白纯度约为50%, 表达量为110.42 mg/L。

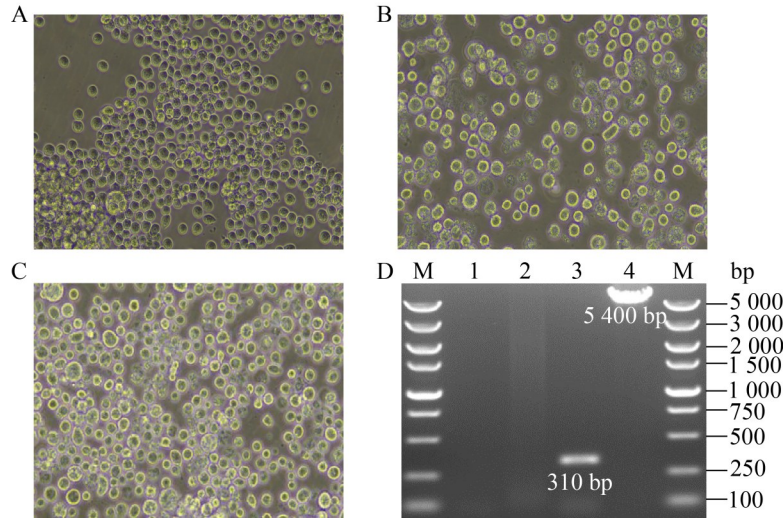


图4 重组杆状病毒颗粒ACMNPV-*CrFC2I*制备和鉴定。A: 正常Sf9细胞; B: ACMNPV-野生型杆状病毒侵染Sf9细胞; C: ACMNPV-*CrFC2I*杆状病毒侵染Sf9细胞; D: 杆状病毒PCR验证(泳道1: PCR空白; 泳道2: Sf9细胞; 泳道3: ACMNPV-野生型; 泳道4: ACMNPV-*CrFC2I*; 泳道M: DL5000 DNA marker)。Figure 4 Production and identification of recombinant baculovirus ACMNPV-*CrFC2I*. A: Sf9 cells without infection; B: Sf9 cells infection of wild ACMNPV; C: Sf9 cells infection of ACMNPV-*CrFC2I*; D: The identification of ACMNPV-*CrFC2I* by PCR (Lane 1: The negative control of PCR; Lane 2: Sf9 cells without infection; Lane 3: Sf9 cells infection of wild ACMNPV; Lane 4: Sf9 cells infection of ACMNPV-*CrFC2I*; Lane M: DL5000 DNA marker).

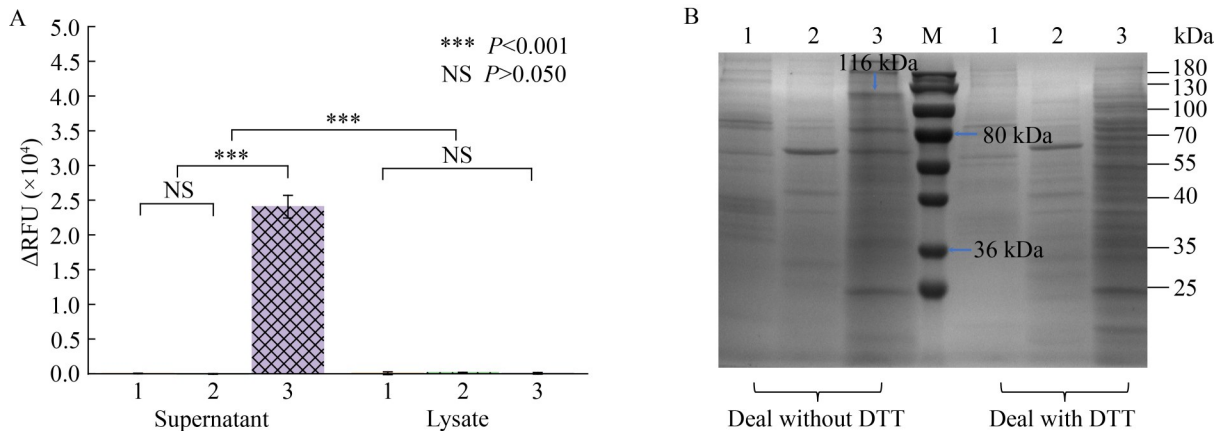


图5 重组蟹C因子酶原鉴定。A: 重组蟹C因子酶原活性鉴定(1: Sf9; 2: ACMNPV-wild; 3: ACMNPV-*CrFC2I*); B: 重组蟹C因子酶原SDS-PAGE分子量鉴定(泳道1: Sf9; 泳道2: ACMNPV-wild; 泳道3: ACMNPV-*CrFC2I*; 泳道M: 180 kDa plus prestained protein marker)。Figure 5 Identification of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen. A: The activity assay of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen (1: Sf9 cells without infection; 2: Sf9 cells infection of wild ACMNPV; 3: Sf9 cells infection of ACMNPV-*CrFC2I*); B: The molecular size of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen by SDS-PAGE (Lane 1: Sf9 cells without infection; Lane 2: Sf9 cells infection of wild ACMNPV; Lane 3: Sf9 cells infection of ACMNPV-*CrFC2I*; Lane M: 180 kDa plus prestained protein marker).

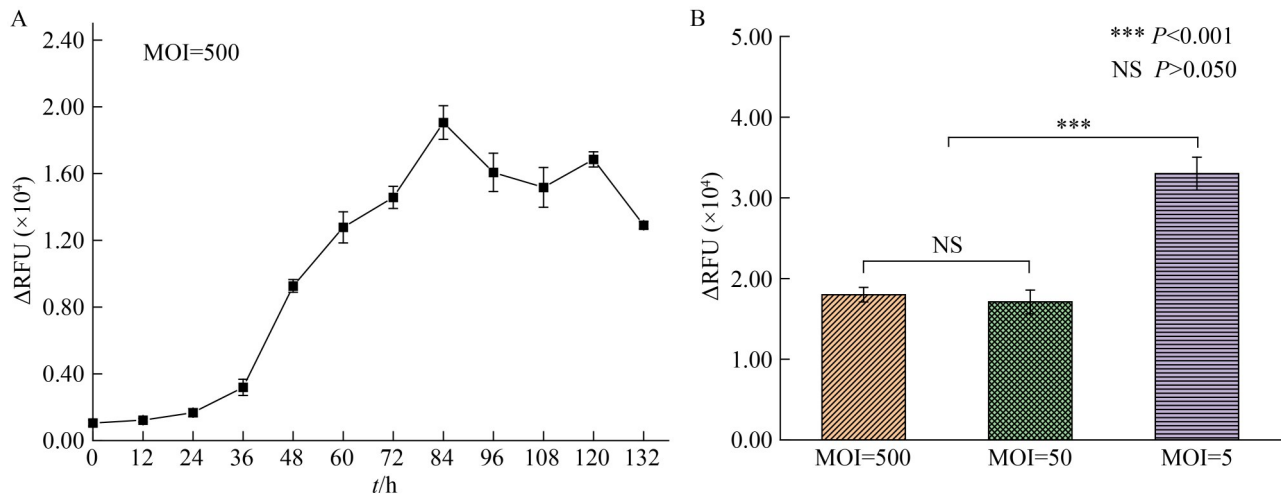


图6 重组鲎C因子酶原表达优化。A: 表达时间对重组鲎C因子酶原活性的影响; B: MOI对重组鲎C因子酶原表达的影响(表达84 h)。

Figure 6 The expression optimization of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen. A: The effect on the expression of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen by time; B: The effect on the expression of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen by MOI (The expression time is 84 h).

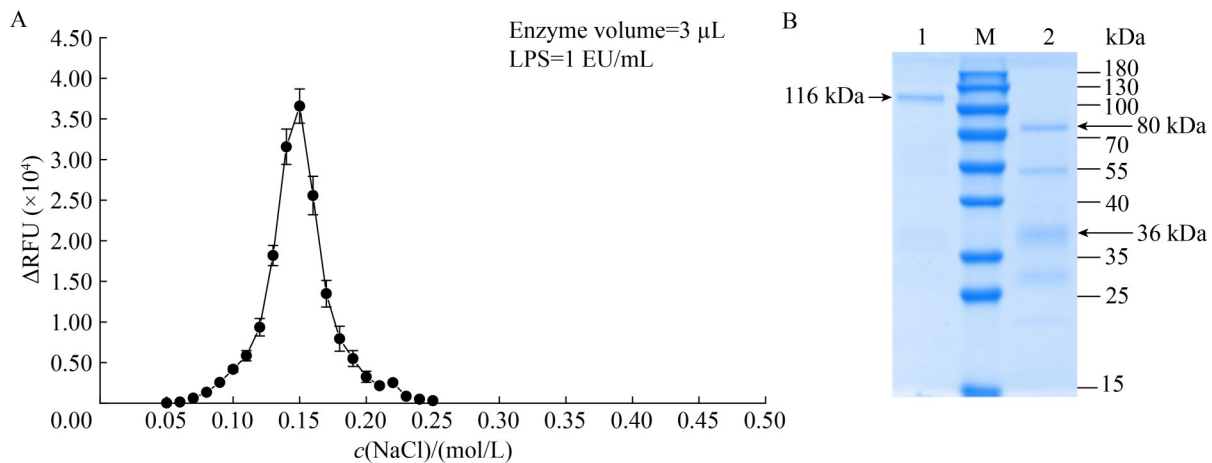


图7 重组鲎C因子酶原梯度洗脱。A: 不同NaCl浓度对重组鲎C因子酶原的洗脱效果; B: 纯化蛋白SDS-PAGE (泳道1: 非还原型; 泳道2: 还原型; 泳道M: 180 kDa plus prestained protein marker)。

Figure 7 The gradient elution of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen. A: The effect on gradient elution of recombinant horseshoe crab factor with NaCl; B: The SDS-PAGE of purified horseshoe crab factor C enzymogen (Lane 1: Non-reduced type; Lane 2: Reduced type; Lane M: 180 kDa plus prestained protein marker).

2.7 最佳酶活性条件

重组鲎C因子酶原在 pH 7.50 时酶活性最高(图 8A); 在 NaCl 浓度为 0.20–0.30 mol/L 时酶活性最高(图 8B); 荧光底物在 90 μmol/L 时酶活

性最高(图 8C); 当酶量≥6 μL 时其酶活性最高(图 8D)。综上所述, 最佳反应体系为 pH 7.50、NaCl 0.20 mol/L、荧光底物 90 μmol/L 和 6 μL 酶(即 1.422 μg/200 μL)。

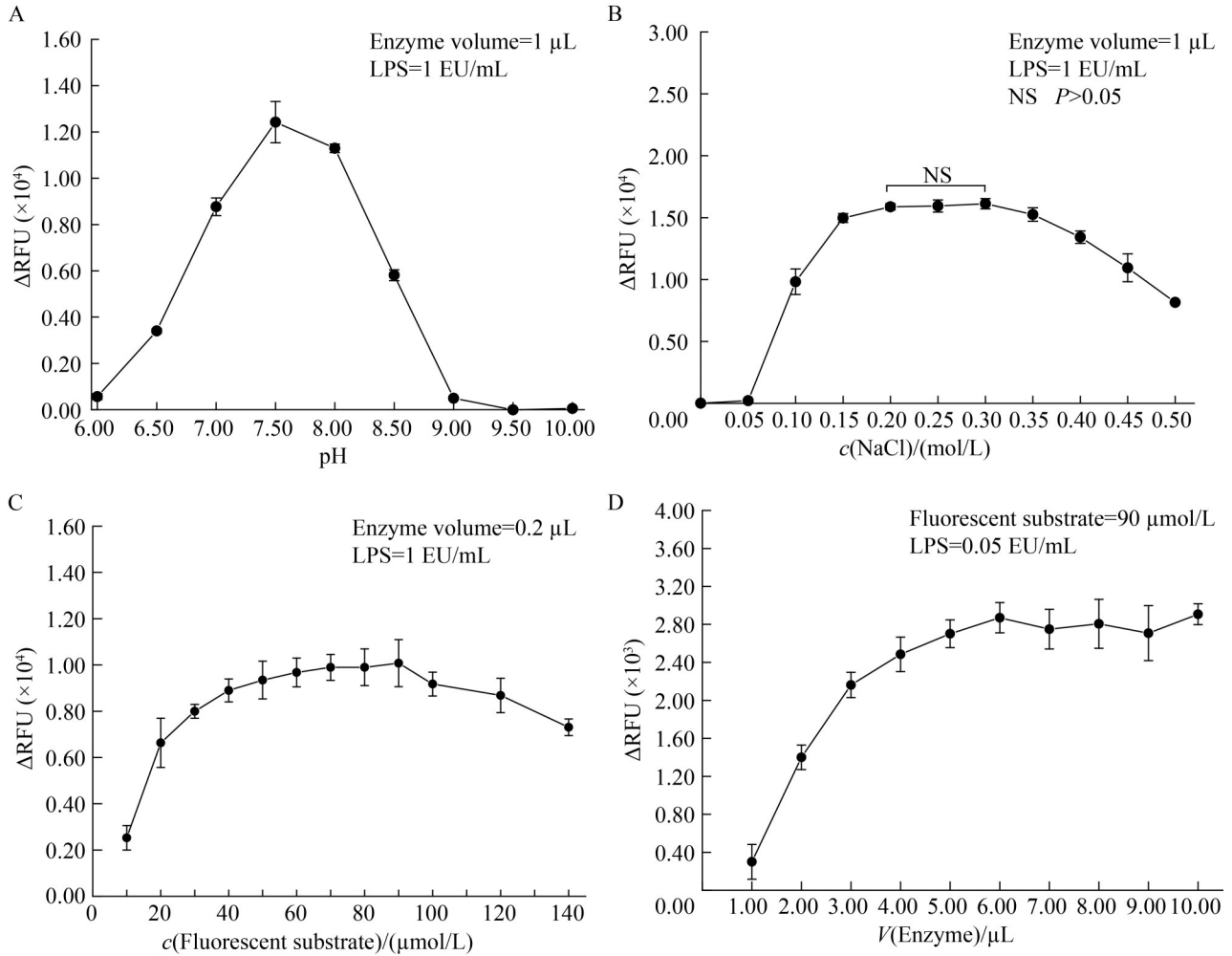


图8 重组鲎C因子酶原反应体系优化。A: pH对酶活性的影响; B: NaCl对酶活性的影响; C: 荧光底物对酶活性的影响; D: 酶量对酶活性的影响。

Figure 8 The optimization reaction of recombinant horseshoe crab factor C enzymogen. A: pH; B: NaCl; C: Fluorescent substrate; D: Enzyme volume.

2.8 方法建立

通过对系列稀释内毒素标准品的荧光信号测定, 进而构建内毒素检测方法。该方法的检测限为 0.005 EU/mL (图 9A), 判定依据为信噪比(S/N)≥3 且响应值显著高于空白对照, 其灵敏度优于目前常用的商品化试剂盒(图 9B)。当内毒素含量在 0.005–5.000 EU/mL 范围内时, 荧光增益值与内毒素含量的线性拟合度为 $R^2=0.998\ 03$, 相关系数 Pearson' $r=0.999\ 14 > 0.98$, 符合《中国药典》要求(图 9C)。然而, 内

毒素含量 < 0.100 EU/mL 时其准确度 < 50.00%。当内毒素含量在 0.005–1.000 EU/mL 范围内时, 荧光增益值与内毒素含量线性关系良好, 线性拟合度为 $R^2=0.999\ 21$, 相关系数 Pearson' $r=0.999\ 66 > 0.98$, 符合《中国药典》要求(图 9D), 且该区间内精密度(CV < 10.00%)与准确度(> 85.00%)均符合要求, 性能优于普通鲎试剂(检测限 0.01 EU/mL) (表 2)。此外, 1 L 发酵液上清可制备 77 651 次反应, 具备良好的制备效率。

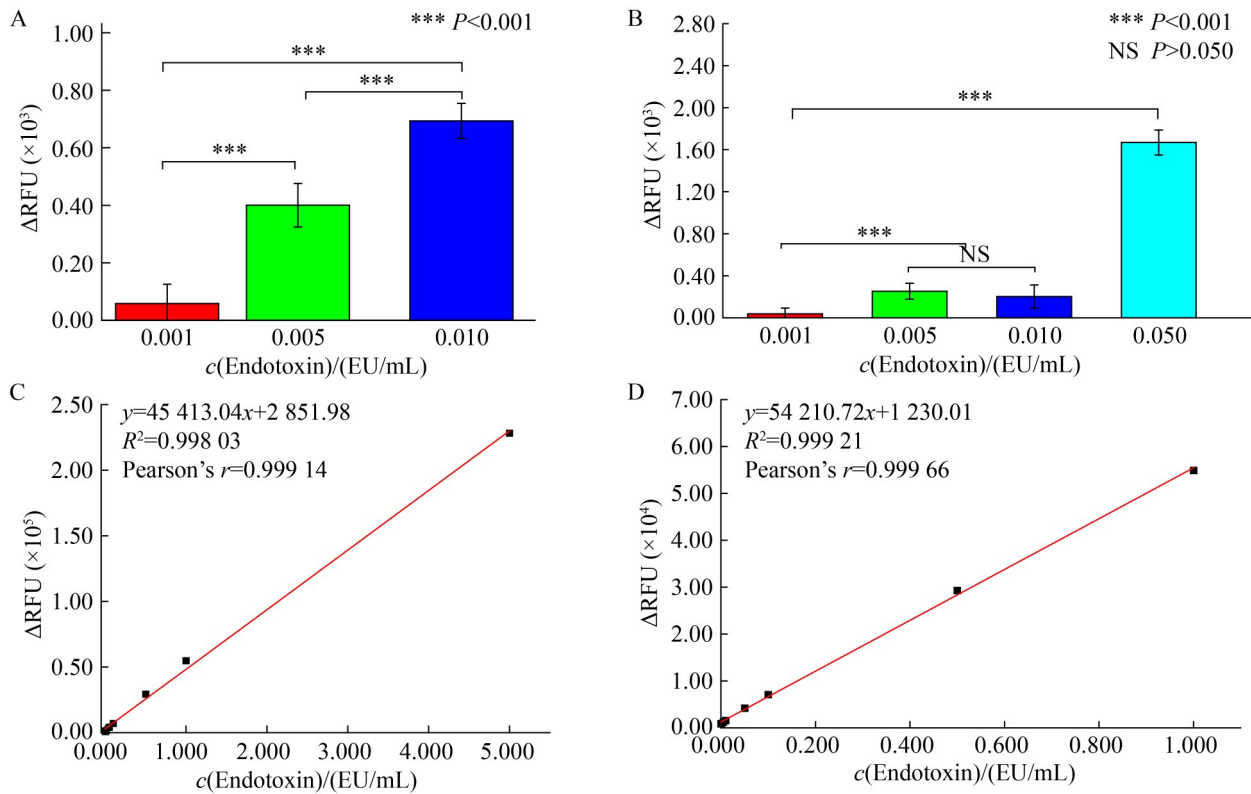


图9 内毒素检测方法建立。A: 自研-灵敏度测试; B: 商品化试剂盒-灵敏度测试; C: 自研-检测范围 0.005–5.000 EU/mL; D: 自研-检测范围0.005–1.000 EU/mL。

Figure 9 The establishment of endotoxin detection method. A: The sensitivity assay of this study; B: The sensitivity assay of commercialization kit; C: The linearity of endotoxin detection is 0.005–5.000 EU/mL; D: The linearity of endotoxin detection is 0.005–1.000 EU/mL.

表2 精密度和准确度比较

Table 2 Comparison of precision and accuracy

Endotoxin (EU/mL)	This study		LAL		Commercialization kit	
	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)
0.005	5.92	85.11	9.50	69.60	8.40	38.72
0.010	3.88	88.63	1.13	92.20	12.82	49.89
0.050	2.50	93.47	1.58	70.48	5.13	43.99
0.100	4.95	93.41	1.26	63.46	4.10	77.91
0.500	3.52	96.59	0.20	80.50	6.14	84.92
1.000	1.21	99.03	0.50	88.20	7.92	88.55
5.000	3.76	83.82	1.53	65.88	2.76	99.21

2.9 样本检测

根据上述建立的内毒素检测方法, 对实际样本进行测试(表 3), 并与鲎试剂进行等效性验证

(图 10)。本方法可用于反渗透水、药品、注射剂氨基酸、医用耗材、生物制品和食品中的内毒素检测, 适用率为 92.45% (图 10A)。由于透析

表3 样本汇总

Table 3 Sample summary

Sample classification	Sample
Dialysis water	Hemodialysis solutions ^a , hemodialysis replacement fluid ^b , the inlet of reverse osmosis water, the outlet of reverse osmosis water, the backwater outlet for reverse osmosis water, the terminal of reverse osmosis water ^c
Drug	Sulfamethazine sodium ^d , dexamethasone ^e , raffinose ^f , dressings ^g
Injectable amino acids ^h	Arginine hydrochloride, glutamate, isoleucine, leucine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, arginine, lysine acetate, cysteine hydrochloride, asparaginate, glycine, cystine
Medical consumables ⁱ	Aluminium foil bag, medicinal low-density polyethylene bag, inner package material
Biological products	β -nicotinamide mononucleotide ^j , nicotinamide adenine dinucleoside ^j , nicotinamide ^j , polysaccharide ^k
Food	Tap-water ^l , pure water ^m , drinking purified water ⁿ , natural mineral water ⁿ , yogurt ⁿ , oral liquid ⁿ

^a: 采集自临床正在运行的血液透析机的专用采样口; ^b: 取自连续性肾脏替代治疗(CRRT)设备的在线置换液输送端口; ^c: 采集自医院中心水处理系统的4个关键位点; ^d: 上海绩祥生物科技有限公司; ^e: 湖南玉新药业有限公司; ^f: 内蒙古昶辉生物科技股份有限公司; ^g: 山东纳美德生物科技有限公司; ^h: 无锡晶海氨基酸股份有限公司; ⁱ: 南通凤龙生物科技股份有限公司; ^j: 阿拉丁试剂(上海)有限公司; ^k: 本实验室提取的多糖; ^l: 本实验室不同楼层的自来水; ^m: 本实验室不同楼层的三级纯水; ⁿ: 市售产品。

^a: Collected from the dedicated sampling port of the clinically running hemodialysis machine; ^b: Collected from the online replacement fluid delivery port of continuous renal replacement therapy (CRRT) equipment; ^c: Collected from four critical locations of water treatment system in hospital; ^d: Shanghai Jixiang Biological Technology Co., Ltd.; ^e: Hunan Yuxin Pharmaceutical Co., Ltd.; ^f: Inner Mongolia Changhui Biotechnology Co., Ltd.; ^g: Shandong Nameide Biological Technology Co., Ltd.; ^h: Wuxi Jinghai Amino Acids Co., Ltd.; ⁱ: Nantong Fenglong Biological Technology Co., Ltd.; ^j: Aladdin Reagent (Shanghai) Co., Ltd.; ^k: The polysaccharides extracted in our laboratory; ^l: Tap water collected from different floors of our laboratory; ^m: Grade 3 pure water collected from different floors of our laboratory; ⁿ: Commercially available products.

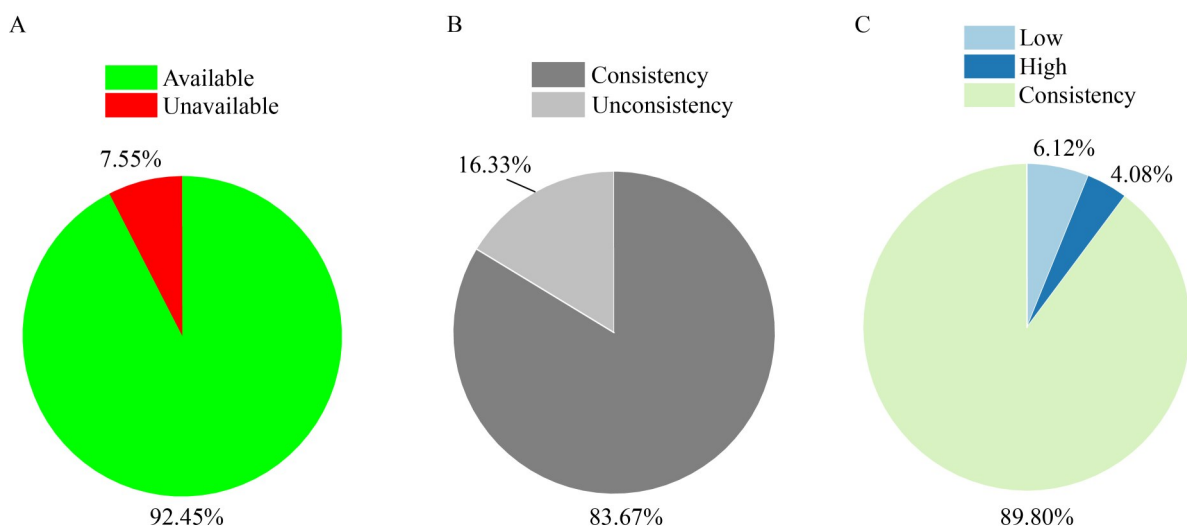


图10 重组C因子法等效性验证。A: 适用率; B: 检测值比较; C: 检测限值比较。

Figure 10 Equivalence verification of recombinant factor C method. A: Applicable rate; B: Comparison of detection values; C: Comparison of detection limits.

液和置换液的加标回收率<50%而检测无效,该方法不适用于透析液和置换液样本。《中国药典》允许鲎试剂的检测结果与真实值存在50%–200%的偏差(即加标回收率为50%–200%),因此当鲎试剂检测值/重组鲎C因子法检测值>50%且<200%时可判定检测结果一致。其中,16.33%样本的检测方法与鲎试剂检测结果不一致(图10B),分别为敷料、自来水、天然饮用水、风行酸奶和口服液,鲎试剂检测值大于重组鲎C因子法,可能是样本中含有真菌葡聚糖引起鲎试剂的假阳性。89.80%样本的检测限值与鲎试剂相同,6.12%样本检测限值优于鲎试剂,4.08%样本检测限值劣于鲎试剂。

3 讨论

随着鲎资源濒临枯竭而内毒素检测需求持续增长,开发可靠、可持续的鲎试剂替代方案迫在眉睫^[21–23]。目前,主要替代路径包括基于基因工程的重组试剂^[24–25]、基于细胞模型的活性检测^[26–28]、新型内毒素识别分子的开发^[29–31]以及结合现代仪器的靶向检测技术^[32–33]。其中,重组鲎C因子(rFC)法因其操作简便、反应快速、灵敏度高、可持续等突出优势,已被欧洲药典、美国药典等多国监管机构逐步采纳;然而,该技术的商业化与普及仍面临多重挑战:FC酶原分子结构复杂,缺乏高效表达系统;其对内毒素污染高度敏感,表达环境要求苛刻;生产工艺成本高昂,制约了其市场竞争力^[15]。因此,开发低成本的rFC酶原制备方法已成为推动该技术落地的关键研究方向。

为获得具有完全生物活性的rFC酶原,研究者已尝试多种表达系统。原核系统(如大肠杆菌^[34–35])与低等真核系统(如酵母^[35–36])因无法完成复杂翻译后修饰,且产物易形成包涵体或发生错误折叠,均难以获得具有天然活性的蛋白。随后,研究转向高等真核表达系统,包括昆虫细胞(如果蝇S2细胞^[37]、家蚕BmN细胞^[16]、家蚕幼虫^[16]、草地贪夜蛾SF9细胞^[18])和哺乳动物

细胞(如COS-1细胞^[38]、HEK 293S GnTI⁻细胞^[17]、Expi293F细胞^[19]、HEK 293T细胞^[39]、乳腺癌细胞MCF-7^[39])。然而,其中仅少数宿主(如草地贪夜蛾Sf9细胞、HEK 293S GnTI⁻细胞、HEK 293T细胞及乳腺癌MCF-7细胞)可成功表达具有完全活性的rFC酶原,并据此建立内毒素检测方法。例如,祁静等^[16]采用Bac-to-Bac/BmNPV杆状病毒系统在家蚕幼虫中表达重组鲎C因子酶原,检测限为0.2 EU/mL;张轶岭等^[18]利用昆虫细胞表达系统,发酵液上清的检测限达0.05 EU/mL,检测时间为90 min;柯文锋等^[19]基于Expi293F细胞表达体系,检测限为0.05 EU/mL,检测时间缩短至60 min;兰兰等^[40]通过优化杆状病毒表达系统同样实现0.05 EU/mL的检测灵敏度。然而,上述研究大多未对重组蛋白进行深度纯化和反应体系系统优化,导致其检测灵敏度普遍低于传统鲎试剂(0.01 EU/mL),限制了其实用性。

针对上述瓶颈,本研究通过优化表达条件与反应条件成功建立了低成本、高灵敏度的内毒素检测方法。本方法在多项关键性能上取得显著提升:检测限达0.005 EU/mL,灵敏度为普通鲎试剂的2倍;线性范围宽(0.005–1.000 EU/mL);精密性(CV<10.00%)与准确度(>85.00%)良好,且与鲎试剂结果等效,显示出良好的可靠性与实际应用前景。

未来rFC技术的进一步发展可从以下几个方向着力:在技术层面,可通过优化信号放大系统与引入新型检测策略(如结合传感或纳米材料)进一步提升检测灵敏度与反应速度;在系统集成方面推动技术向微型化、智能化与集成化方向发展,将有助于拓展其在现场快速检测领域的应用场景^[41–46]。此外,严格参照相关法规要求,开展更广泛的实际样本等效性验证,将为rFC法提供坚实的理论支持并加速其市场认可进程。通过持续优化生产工艺以降低综合成本,rFC技术有望逐步提高市场渗透率,最终成为传统鲎试剂的可靠替代品,为内毒素检测领

域提供一条可持续、高效率的新路径。

4 结论

本研究基于杆状病毒表达系统，成功实现了具有完全生物活性的重组鲎C因子酶原的高效表达。通过系统性优化，目标蛋白产量提升了4.75倍，并建立了灵敏度达0.005 EU/mL的内毒素检测方法。该方法与鲎试剂等效，可作为其可靠替代方案，为内毒素检测提供了新的技术选择。

作者贡献声明

陈富：整体实验调研、设计、实验操作、数据分析、图表绘制、文章撰写和修改；吴文卿：参与实验调研、设计、数据分析，协助完成蛋白表达、纯化和实际样本检测；刘婷婷：指导内毒素检测、提供资源和论文指导；曾嘉辉：采集实际样本并提供资源，指导实验设计和数据校对；邓梅清：指导内毒素检测、监督管理和实验数据复核；林秀华：指导内毒素检测和提供实际样本；吴清平：论文整体设计构思、论文修改、提供资源；陈玲：指导整体实验设计、基金获取、文章修改和文章校对。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LI YM, SCHÜTTE W, DEKEUKELEIRE M, JANSSEN C, BOON N, ASSELMAN J, LEBEER S, SPACOVA I, de RIJCKE M. The immunostimulatory activity of sea spray aerosols: bacteria and endotoxins activate TLR4, TLR2/6, NF- κ B and IRF in human cells[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 927: 171969.
- [2] 张灿, 张传福, 白宇超, 桂萍, 谭朝洪, 白森, 张明露. 不同来源细菌内毒素光谱特征及其对单核细胞免疫效应的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(1): 258-265.
ZHANG C, ZHANG CF, BAI YC, GUI P, TAN CH, BAI M, ZHANG ML. Spectral characteristics of bacterial endotoxin from different sources and their effects on the immune response of monocytes[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2025, 16(1): 258-265 (in Chinese).
- [3] KELLUM JA, RONCO C. The role of endotoxin in septic shock[J]. *Critical Care*, 2023, 27(1): 400.
- [4] 李丽, 崔海山, 李梅. 慢病毒介导 miR-140-5p 过表达对内毒素诱导大鼠肝损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(1): 69-74.
LI L, CUI HS, LI M. Protective effect of overexpression of miR-140-5p mediated by lentivirus on lipopolysaccharide-induced liver injury in rats[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2025, 41(1): 69-74 (in Chinese).
- [5] 崔轶, 张丁冉, 胡艳艳, 辛宁. 微生态制剂对肝癌介入治疗患者内毒素水平及肝功能的影响[J]. *实用癌症杂志*, 2025, 40(2): 293-295, 307.
CUI Y, ZHANG DR, HU YY, XIN N. Effects of microecological preparations on endotoxin level and liver function in patients with hepatocellular carcinoma underwent interventional therapy[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2025, 40(2): 293-295, 307 (in Chinese).
- [6] ROY K, JĘDRZEJEWSKI T, SOBOCIŃSKA J, SPISZ P, MACIEJEWSKI B, HÖVELMEYER N, PASSERI B, WROTEK S. Divergent impact of endotoxin priming and endotoxin tolerance on macrophage responses to cancer cells[J]. *Cellular Immunology*, 2025, 411: 104934.
- [7] HEINRICH MA, HEINRICH L, ANKONE MJ, VERGAUWEN B, PRAKASH J. Endotoxin contamination alters macrophage-cancer cell interaction and therapeutic efficacy in pre-clinical 3D *in vitro* models[J]. *Biomaterials Advances*, 2023, 144: 213220.
- [8] UEHARA K, OSHIRO E, OCHIAI A, TAKAGI R, YAMATO M, KATO A. Lessons learned from contamination with endotoxin originated from the supplement in the cell culture medium[J]. *Regenerative Therapy*, 2024, 27: 230-233.
- [9] SOLANO G, AINSWORTH S, SÁNCHEZ A, VILLALTA M, SÁNCHEZ P, DURÁN G, GUTIÉRREZ JM, LEÓN G. Analysis of commercially available snake antivenoms reveals high contents of endotoxins in some products[J]. *Toxicon*: X, 2024, 21: 100187.
- [10] DEPTUCH T, KUCHARCZYK K, FLORCZAK A, DAMS-KOZŁOWSKA H. Endotoxin reduction from biotech silk material inhibits the production of anti-silk antibodies in mice[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2024, 112(3): 463-472.
- [11] Liu F. Safety assessment of endotoxin related to drug products and medical devices: a review[J]. *Toxicology Letters*, 2025, 412: 223-233.
- [12] 鲍虞园, 李银康, 林吴颖, 周志琴, 肖晓波, 颀晓勇. 中国南海北部近海资源调查及北部湾潮间带中华鲎幼鲎潜在栖息地评估[J]. *生物多样性*, 2023, 31(5): 76-86.
BAO YY, LI YK, LIN WY, ZHOU ZQ, XIAO XB, JIE XY. The current situation of horseshoe crabs in the offshore waters of northern South China Sea with analysis of the potential habitat distribution of juvenile *Tachypleus tridentatus* in Beibu Gulf[J]. *Biodiversity Science*, 2023, 31(5): 76-86 (in Chinese).
- [13] 颀晓勇, 钟金香, 关杰耀, 贾晓平. 基于鲎试剂需求的中国鲎资源保护的迫切性研究[J]. *中国渔业经济*, 2021, 39(2): 109-116.
XIE XY, ZHONG JX, GUAN JY, JIA XP. The urgency of horseshoe crab protection in China from the perspective

- of *Tachypleus* amebocyte lysate industry[J]. Chinese Fisheries Economics, 2021, 39(2): 109-116 (in Chinese).
- [14] 叶良君, 张强, 张涛, 贺利成. β -葡聚糖对含糖大输液细菌内毒素检查的影响[J]. 中国药业, 2008, 17(19): 24-25. YE LJ, ZHANG Q, ZHANG T, HE LC. Effect of β -glucan on endotoxin detection in large infusion[J]. China Pharmaceuticals, 2008, 17(19): 24-25 (in Chinese).
- [15] 黄丽萍, 丁友玲, 陈晓佳, 欧阳松应. 重组C因子在内毒素检测中的研究进展[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2025, 41(4): 57-63. HUANG LP, DING YL, CHEN XJ, OUYANG SY. Advances in recombinant factor C technology for endotoxin detection[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2025, 41(4): 57-63 (in Chinese).
- [16] 祁静, 刘涛, 李珍, 贡成良, 吴海苹, 张春. Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒在家蚕幼虫中表达重组 Δ C因子[J]. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1594-1601. QI J, LIU T, LI Z, GONG CL, WU HP, ZHANG C. Expression of *Limulus* factor C in silkworm larvae by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(10): 1594-1601 (in Chinese).
- [17] KOBAYASHI Y, SHIGA T, SHIBATA T, SAKO M, MAENAKA K, KOSHIBA T, MIZUMURA H, ODA T, KAWABATA SI. The N-terminal arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(37): 25987-25995.
- [18] 张铁岭, 祁静, 张春, 刘晓玫. 昆虫细胞表达 Δ C因子内毒素活性检测的研究[J]. 生物技术, 2017, 27(5): 478-483. ZHANG YL, QI J, ZHANG C, LIU XM. Endotoxin detection with *Limulus* clotting factor C expressed by Bac-to-Bac baculovirus expression system[J]. Biotechnology, 2017, 27(5): 478-483 (in Chinese).
- [19] 柯文锋, 李诗洁, 郑梦林, 白仲虎, 杨艳坤. Expi293F 表达重组 Δ C因子用于荧光法内毒素检测[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(2): 106-111. KE WF, LI SJ, ZHENG ML, BAI ZH, YANG YK. Recombinant expression of *Limulus* factor C in Expi293F for the detection of endotoxin by fluorescence method[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(2): 106-111 (in Chinese).
- [20] 国家药典委员会. 中国药典[2020](四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. National Medical Products Administration Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [2020] (Part IV)[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020 (in Chinese).
- [21] MALONEY T, PHELAN R, SIMMONS N. Saving the horseshoe crab: a synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection[J]. PLoS Biology, 2018, 16(10): e2006607.
- [22] GORMAN R. Atlantic horseshoe crabs and endotoxin testing: perspectives on alternatives, sustainable methods, and the 3Rs (replacement, reduction, and refinement)[J]. Frontiers in Marine Science, 2020, 7: fmars.2020.582132.
- [23] TAMURA H, REICH J, NAGAOKA I. Outstanding contributions of LAL technology to pharmaceutical and medical science: review of methods, progress, challenges, and future perspectives in early detection and management of bacterial infections and invasive fungal diseases[J]. Biomedicine, 2021, 9(5): 536.
- [24] 杨宇希, 裴宇盛, 刘涛, 高华, 蔡彤. 检验用 Δ C试剂及重组试剂的现状与思考[J]. 中国药物警戒, 2024, 21(8): 847-851. YANG YX, PEI YS, LIU T, GAO H, CAI T. Current situation and reflection on *Limulus* amebocyte lysate and recombinant reagents for testing[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2024, 21(8): 847-851 (in Chinese).
- [25] 许朝生, 吴少海. 重组C因子法在医疗器械细菌内毒素检测中的应用前景[J]. 医疗装备, 2024, 37(19): 35-39, 47. XU CS, WU SH. The application prospect of recombinant factor C method in bacterial endotoxin detection of medical devices[J]. Medical Equipment, 2024, 37(19): 35-39, 47 (in Chinese).
- [26] YOUNG ID, NEPOGODIEV SA, BLACK IM, Le GALL G, WITTMANN A, LATOUSAKIS D, VISNAPUU T, AZADI P, FIELD RA, JUGE N, KAWASAKI N. Lipopolysaccharide associated with β -2,6 fructan mediates TLR4-dependent immunomodulatory activity *in vitro*[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 277: 118606.
- [27] 裴宇盛, 陈晨, 宁霄, 蔡彤. 首批单核细胞活化反应检查法专用细菌内毒素国家标准品的建立与应用[J]. 中国药物警戒, 2023, 20(11): 1217-1220. PEI YS, CHEN C, NING X, CAI T. Establishment and application of the first batch of national standards for bacterial endotoxin for monocyte activation reaction tests[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2023, 20(11): 1217-1220 (in Chinese).
- [28] HE Q, YU CF, WU G, WANG KQ, NI YB, GUO X, FU ZH, WANG L, TAN DJ, GAO H, WANG C, CHEN G, CHEN XH, CHEN B, WANG JZ. A novel alternative for pyrogen detection based on a transgenic cell line[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9: 33.
- [29] WANG XL, HE XY, HOU LW, HE ZH, GE C, ZHANG Y, XU Y. High-performance detection of endotoxin by the microfluidic chip integrated with surface acoustic wave sensor modified by $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x/\text{Au}$ NPs nanocomposite[J]. Applied Surface Science, 2023, 618: 156423.
- [30] BACHTIAR Z, MUSTOPA AZ, ASTUTI RI, FAUZIYAH F, FATIMAH F, ROZIRWAN R, WULANDARI TNM, WIJAYA DP, AGUSTRIANI F, ARWANSYAH A, IRAWAN H, MAMANGKEY J. Production of codon-optimized factor C fragment from *Tachypleus gigas* in the *Pichia pastoris* GS115 expression system for endotoxin detection[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2023, 21(1): 103.
- [31] CUI Q, LI JH, LI YT, TANG LN, LI K, LI TX, CHEN XH, ZHANG ZY, ZHANG GJ. Sensitive and rapid detection of bacterial endotoxin with a functional carbon nanotube field-effect transistor biosensor[J]. Talanta, 2024, 266: 125035.
- [32] REHUES P, RODRÍGUEZ M, GUARDIOLA M, RIBALTA J. Characterization of the LPS and 3OHFA

- contents in the lipoprotein fractions and lipoprotein particles of healthy subjects[J]. *Atherosclerosis*, 2022, 355: 10-11.
- [33] HOFFMANN A, ZOLLINGER M, PACIOS K, BUCSELLA B, KALMAN F. Reversed-phase HPLC based assay for selective and sensitive endotoxin quantification-part II[J]. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1717: 464657.
- [34] 王东宁, 刘杰武, 陈琳, 汪渊, 杨冠珍, 吴祥甫, 张惟杰. 东方鲎C因子的分段克隆及表达[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002(1): 77-82.
WANG DN, LIU JW, CHEN L, WANG L, YANG GZ, WU XF, ZHANG WJ. Cloning and expression of *Tachypleus tridentatus* factor C[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002(1): 77-82 (in Chinese).
- [35] 柯文锋. 重组鲎C因子的表达与内毒素检测[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
KE WF. Expression of recombinant *Limulus* factor C and endotoxin detection[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [36] DING JL, CHAI C, PUI AWM, HO B. Expression of full length and deletion homologues of *Carcinoscorpius rotundicauda* factor C in *Saccharomyces cerevisiae*: immunoreactivity and endotoxin binding[J]. *Journal of Endotoxin Research*, 1997, 4(1): 33-43.
- [37] WANG J, TAN NS, HO B, DING JL. Modular arrangement and secretion of a multidomain serine protease. evidence for involvement of proline-rich region and N-glycans in the secretion pathway[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(39): 36363-36372.
- [38] DWARAKANATH RS, HO B, DING JL. Recombinant COS-1 cells express *Carcinoscorpius rotundicauda* factor C[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(4): 357-362.
- [39] 许炬丹, 张婷, 周桂羽, 卢余盛. 哺乳动物细胞表达鲎C因子在内毒素检测中的应用[J]. *进展*, 2025(5): 211-213.
XU JD, ZHANG T, ZHOU GY, LU YS. Expression of horseshoe crab factor C in mammalian cell and its application in endotoxin detection[J]. *Progress*, 2025(5): 211-213 (in Chinese).
- [40] 兰兰, 刘焕蕾, 南昊, 何思骏, 宋望成, 王云龙, 范新娟, 万香波, 许晓东. 基于杆状病毒表达系统的鲎C因子表达及其活性检测[J]. *生物工程学报*, 2025, 41(4): 1428-1439.
LAN L, LIU HL, NAN H, HE SJ, SONG WC, WANG YL, FAN XJ, WAN XB, XU XD. Baculovirus expression system-based expression of horseshoe crab factor C and its activity[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2025, 41(4): 1428-1439 (in Chinese).
- [41] HUANG Y, WANG L, SHA LJ, WANG YS, DUAN XG, LI GX. Highly sensitive detection of lipopolysaccharide based on collaborative amplification of dual enzymes[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1126: 31-37.
- [42] XIANG ST, GE C, LI SB, CHEN L, WANG L, XU Y. *In situ* detection of endotoxin in bacteriostatic process by SERS chip integrated array microchambers within bioscaffold nanostructures and SERS tags[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(26): 28985-28992.
- [43] YAWATA S, NODA K, SHIMOMURA A, KURODA A. Improved bioluminescence-based endotoxin measurement method using a salt-resistant luciferase mutant[J]. *Analytical Biochemistry*, 2021, 633: 114408.
- [44] KLATT JN, SCHWARZ I, HUTZENLAUB T, ZENGERLE R, SCHWEMMER F, KOSSE D, VINCENT J, SCAER M, FRANASZCZUK K, WADSWORTH D, PAUST N. Miniaturization, parallelization, and automation of endotoxin detection by centrifugal microfluidics[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(24): 8508-8516.
- [45] NISHITSUJI R, UEDA S, SUEYOSHI K, HISAMOTO H, ENDO T. Combining TiO₂ photonic crystals and reagents enhances the sensitivity of endotoxin detection[J]. *Chemical Papers*, 2023, 77(1): 611-615.
- [46] XIAO YX, WANG XW, YIN YT, YIN FC, LI JC, HOU ZY, KHAN M, ZHAO RS, WU WL, HU QZ. Distance-based lateral flow biosensor for the quantitative detection of bacterial endotoxin[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2024, 35(12): 109718.