

基于杆状病毒表达系统的鲎 C 因子表达及其活性检测

兰兰^{1#}, 刘焕蕾^{2,3,4,5,6#}, 南昊^{1,4}, 何思骏¹, 宋望成^{1,7}, 王云龙^{2,3,4,5},
范新娟^{2,3,4,6}, 万香波^{2,3,4,5}, 许晓东^{1*}

- 1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100
- 2 郑州大学 天健先进生物医学实验室, 河南 郑州 450001
- 3 郑州大学 医学科学院, 河南 郑州 450001
- 4 郑州大学第一附属医院 河南省卫生健康委员会放射损伤与防护重点实验室, 河南 郑州 450052
- 5 郑州大学第一附属医院 放射治疗医学部, 河南 郑州 450052
- 6 郑州大学第一附属医院 病理医学部, 河南 郑州 450052
- 7 陕西天宠生物科技有限公司, 陕西 西安 710086

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 Lan, LIU Huanlei, NAN Hao, HE Sijun, SONG Wangcheng, WANG Yunlong, FAN Xinjuan, WAN Xiangbo, XU Xiaodong. Baculovirus expression system-based expression of horseshoe crab factor C and its activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1428-1439.

摘 要: 内毒素是常见外致热原, 内毒素超标会导致脓毒血症、感染性休克甚至死亡等严重后果, 因此其检测在医疗、制药和食品领域至关重要。鲎试剂检测法的广泛应用导致鲎数量急剧下降, 且该方法存在批间差异和难以定量等限制。重组 C 因子检测法批次间稳定、灵敏度高且可定量, 可代替鲎试剂, 但高成本和复杂操作限制了该方法的推广。为简化制备重组 C 因子的步骤, 同时降低重组 C 因子的生产成本, 本研究利用高产抗凋亡载体 qBac-IIIIG、优选信号肽和优化密码子的策略, 使用杆状病毒蛋白表达系统制备重组 C 因子, 分泌至细胞培养上清液中的重组 C 因子无需纯化, 可直接用细胞培养上清液检测内毒素。表达重组 C 因子的 1 L 发酵体系中发酵液的内毒素检测灵敏度可达到 0.05 EU/mL, 每 L 发酵液可以支持 50 万个检测反应。本研究提高了重组 C 因子的产量和活性, 节省了蛋白纯化步骤, 降低了生产成本, 为重组 C 因子内毒素检测法的推广应用奠定基础。

关键词: 内毒素检测; 重组 C 因子; 杆状病毒表达载体; 中华鲎

资助项目: 国家自然科学基金(32170164, 32000135); 陕西省重点研发计划(2022QCY-LL-52)

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (32170164, 32000135) and the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2022QCY-LL-52).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xuxd@nwsuaf.edu.cn

Received: 2025-01-04; Accepted: 2025-02-24; Published online: 2025-02-25

Baculovirus expression system-based expression of horseshoe crab factor C and its activity

LAN Lan^{1#}, LIU Huanlei^{2,3,4,5,6#}, NAN Hao^{1,4}, HE Sijun¹, SONG Wangcheng^{1,7},
WANG Yunlong^{2,3,4,5}, FAN Xinjuan^{2,3,4,6}, WAN Xiangbo^{2,3,4,5}, XU Xiaodong^{1*}

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Tianjian Laboratory of Advanced Biomedical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

3 Academy of Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

4 Henan Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

5 Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

6 Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

7 Shaanxi Sky Pet Biotechnology Co., Ltd., Xi'an 710086, Shaanxi, China

Abstract: Endotoxins are common exogenous pyrogens. Excessive endotoxins in medical devices and injections can lead to serious consequences such as sepsis, septic shock, and even death. Therefore, endotoxin detection plays a crucial role in medical, pharmaceutical, and food sectors. The wide application of *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) has led to a sharp decline in the number of horseshoe crabs. Moreover, the LAL assay has limitations such as interbatch variations and difficulty in quantification. The recombinant factor C (rFC) assay is stable between batches, highly sensitive, and capable of quantitation, and thus it can be used as an alternative for the LAL assay. However, the high cost and complex procedures involved in producing recombinant factor C have limited the widespread application of this method. In order to simplify the preparation and reduce the production cost of recombinant factor C, this study focuses on the production of recombinant factor C based on the baculovirus expression system. Multiple measures such as a high-yield and anti-apoptotic vector qBac-IIIg, the optimal signal peptide, and the optimized codon were used to reach the goal of endotoxin detection with cell supernatant. This method simplifies the steps of protein purification. The sensitivity of the supernatant reached 0.05 EU/mL in a 1-L fermentation system, and 500 000 detecting reactions can be supported per liter of fermentation broth. This study increases the yield and activity of recombinant factor C, simplifies the procedures of protein purification, and reduces the cost, laying a foundation for the promotion and application of recombinant factor C in endotoxin detection.

Keywords: endotoxin detection; recombinant factor C; baculovirus expression system; *Tachypleus tridentatus*

内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的组成成分，能维持细菌细胞的结构完整性并保护其免受外界化学物质攻击。19 世纪末在热灭活的霍乱弧菌中发现了这种热稳定的毒素^[1]，命名

为内毒素。1935 年首次从革兰氏阴性菌中分离出内毒素，因其由脂类和多糖组成，又称“脂多糖”^[2-3]。在细胞分裂、外膜囊泡脱落或细菌细胞死亡等过程中释放大量内毒素，进入血液后

引发促炎免疫反应,导致脓毒血症甚至死亡^[4]。因此,内毒素的检测在医疗、制药和食品相关行业至关重要。

内毒素的检测方法主要有家兔检测法、鲎试剂(*Limulus ameboyte lysate*, LAL)检测法和重组 C 因子(recombinant factor C, rFC)检测法。家兔热源检测法因周期长、个体差异和无法定量等原因限制了其应用^[5-6]。20 世纪 60 年代,研究人员根据鲎血淋巴裂解物遇内毒素后会发凝固的现象,发明了鲎试剂检测法^[7-8]。1977 年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了基于 LAL 的内毒素检测方法^[9],然而鲎试剂检测法仍存在一些局限性,如鲎血作为鲎试剂的天然原料会有批次间差异, β -1,3-葡聚糖等干扰因素会增强或抑制该反应活性和特异性^[10-12]。生物制药行业的快速发展推动了内毒素检测需求,鲎血过度采集导致野生鲎数量急剧下降,中华鲎和圆尾鲎于 2021 年被列为国家二级保护动物^[13],开发鲎试剂检测法的替代方案刻不容缓。

C 因子是鲎试剂级联反应中的第 1 个内毒素结合因子,经内毒素活化后的 C 因子能够与底物发生反应,从而产生与内毒素浓度成比例的荧光信号,因此重组 C 因子检测法可以用来检测内毒素,替代依赖鲎血的鲎试剂检测法^[14]。基于重组 C 因子的内毒素检测法具有以下优势:特异性强(单步反应避免假阳性)、重复性好(异源表达的蛋白纯度高、批次稳定^[15])、可定量检测(通过荧光值计算内毒素含量)、安全性高(无动物源成分)。然而重组 C 因子的生产成本居高不下,复杂的制备工艺会带来内毒素污染的风险,所以亟需借助基因工程等生物技术来解决重组 C 因子检测法的发展困境,开发出可替代传统鲎试剂内毒素检测法的更优方案。

本研究利用杆状病毒表达系统制备重组 C

因子,通过优选杆状病毒表达载体、优选高效信号肽和优化密码子等策略,高效表达具有天然活性的重组 C 因子。分泌至培养基中的重组 C 因子易于收集,省去了蛋白纯化步骤,降低引入内毒素的风险,大幅简化生产工艺从而降低生产成本。本研究旨在优化重组 C 因子的表达,解决当前困境,缓解鲎的生存压力,保障内毒素检测试剂供给,助力医疗制药等行业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞

质粒 pQB3a、pQB4t 和杆状病毒表达载体 qBac-I、qBac-IIIG 购自陕西杆粒生物科技有限公司。草地贪夜蛾 *Sf9* 细胞系由本实验室保存。大肠杆菌 Mach1-T1 克隆菌株购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂

本研究所用 PCR 引物(表 1)由北京擎科生物科技股份有限公司合成。基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。2×Phanta Flash Master Mix 和 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。限制性内切酶 *Xba* I、*Bgl* II、*Bsp* E I 和 *Nco* I 均购自纽英伦生物技术(北京)有限公司。SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Anti His-Tag Mouse Monoclonal Antibody 和 Goat Anti-Mouse IgG, HRP Conjugated 购自康为世纪生物科技有限公司。FuGENE HD 转染试剂购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。昆虫细胞培养基 IB905 购自浙江壹生科生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

PCR 核酸扩增仪(Bio-Rad 公司, T100 Thermal

Cycler), 低温冷冻离心机(Eppendorf 公司), 细菌培养箱(上海精宏实验设备有限公司), 昆虫细胞培养箱(上海精宏实验设备有限公司), 摇床(SUKUN 公司), 半干转膜仪(北京六一生物科技有限公司), 化学发光成像仪(Tanon 公司), 酶标仪(Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建重组质粒

以中华鲎(*Tachypleus tridentatus*) C 因子序列(GenBank 登录号: D90271)为参考序列, 委托南京金斯瑞生物科技有限公司基因合成。以合成的基因为模板, 设计并合成带有 pQB3a 载体同源臂的上游引物 pQB3a-rFC-His-F 和下游引物 pQB3a-rFC-His-R, 通过 PCR 扩增得到有同源臂的 rFC 片段。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的片段。使用限制性

内切酶 *BspE* I 和 *Nco* I 双酶切质粒 pQB3a, 酶切产物切胶回收线性化载体。切胶回收的 PCR 产物和线性化载体同源重组, 重组产物转化至大肠杆菌 Mach1-T1 感受态中涂板培养过夜, 随机挑取单菌落, 使用引物 ORF603-Seq 和 rFC-TR 进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定阳性的菌小量抽提质粒, 质粒送至北京擎科生物科技股份有限公司进一步测序确认, 测序正确的质粒命名为 pQB3a-rFC-His。

Fib 信号肽片段用 pQB3a-Fib-F 和 pQB3a-Fib-R2 引物以 pQB3a-Fib-R1 为模板 PCR 扩增获得。GP64 信号肽片段扩增步骤同上, PCR 引物分别为 pQB3a-GP64-F 和 pQB3a-GP64-R2, 模板为 pQB3a-GP64-R1。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的片段。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bgl* II 对质粒 pQB3a-rFC-His

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pQB3a-rFC-His-F	AAACCTATAAATATCTAGATAAAAAACCGCCACCATGGTCTTAGCGTCGTTTTTGGTGT
pQB3a-rFC-His-R	ATGGTGATGGTGATGGTGGTGTCCGGAAATGAACTGCCTAATCCAT
ORF603-Seq	TGTCTGCGAGCAGTTGTTTG
rFC-TR	GTTGAACACATAGCCTGG
pQB3a-Fib-F	AAACCTATAAATATCTAGATAAAAAACCGCCACCATGGTCTTAGCGTCGTTTTTGGTGT
pQB3a-Fib-R1	GTATAAGCGACATACTGCAGAGCGCAGCACAAGATCACAAAGGTTTTGACTCTCATGGT
pQB3a-Fib-R2	TCGTTTCATCACACAAGCCAGATCTACTCCTCTTGCAATTTGTATAAGCGACATACTGC
pQB3a-GP64-F	AATAAAAAAACCTATAAATATCTAGATAAAAAACCGCCACCATGGTAAGCGCTATTGT
pQB3a-GP64-R1	AGGCAGAATGCGCCGCCGCCGCAAAAGCACATATAAAACAATAGCGCTTACCATGGT
pQB3a-GP64-R2	TCGTTTCATCACACAAGCCAGATCTACTCCTCTCGCAAAGGCAGAATGCGCCGCCGC
rFC-F	CTAAAAAACCGCCACCATGGTCTTAGCGTCGTTTTTG
rFC-R	GTGGTGTCCGGAGAATTCAAATGAACTGCCTAATCC
optDL-F	CTAAAAAACCGCCACCATGGTGCTGGCTAGCTTCC
optDL-R	GTGGTGTCCGGAGAATTCAAATGAACTGTCTGATCCAAG
4t-F	GAATTCTCCGGACACCAC
4t-R	CCATGGTGGCGGTTTTTTAG
QPCR-gp41-F	CGTAGTGGTAGTAATCGCCGC
QPCR-gp41-R	AGTCGAGTCGCGTCGCTTT

进行酶切,酶切产物切胶回收线性化载体。随后与前述信号肽编码序列同源重组、转化、PCR 鉴定、质粒提取和测序。测序正确的质粒命名为 pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His。

以 pQB3a-rFC-His 为模板, rFC-F 和 rFC-R 为上下游引物,通过 PCR 扩增得到 rFC 片段;以合成的 rFC-opt 和 rFC-optDL 为模板, rFC-F、rFC-R 和 optDL-F、optDL-R 为上下游引物,通过 PCR 扩增得到密码子优化的 rFC 片段 rFC-opt 和 rFC-optDL。载体以 pQB4t 为模板, 4t-F 和 4t-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段。随后进行同源重组、转化、PCR 鉴定、质粒提取和测序。测序正确的质粒命名为 pQB4t-rFC、pQB4t-rFCopt 和 pQB4t-rFCoptDL。

1.2.2 包装重组杆状病毒

将 Sf9 细胞以汇合度 60%的密度均匀铺入 12 孔板。1.5 mL 离心管中加入 50 μ L 无菌水、150 ng 重组质粒和 5 ng qBac-I 或 qBac-IIIG。另一离心管中加入 50 μ L 无菌水和 3 μ L 转染试剂。混匀后,将稀释的转染试剂加入含 DNA 的离心管中,混合后静置 20 min,随后加入铺好细胞的细胞培养板中。28 $^{\circ}$ C 培养 4–6 d,细胞有明显病变后收集细胞培养上清液,得到 P0 代重组杆状病毒。

1.2.3 重组杆状病毒的增殖与滴度检测

将 Sf9 细胞以汇合度 70%的密度均匀铺入 12 孔板。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.05 的病毒量感染细胞,28 $^{\circ}$ C 培养 4–5 d,细胞有明显病变后收集细胞培养上清液,得到 P1 代重组杆状病毒。P1 代重组杆状病毒和已知滴度的标准样品(4×10^8 PFU/mL)以 10 倍梯度稀释至 10^4 。以稀释后的病毒为模板进行实时定量 PCR 检测。20 μ L 实时定量 PCR 体系:0.4 μ L 上游引物 QPCR-gp41-F (10 μ mol/L),

0.4 μ L 下游引物 QPCR-gp41-R (10 μ mol/L), 5 μ L 病毒液,10 μ L 2 $\times$ SYBR qPCR Mix, 4.2 μ L 水。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火与延伸 30 s, 40 个循环;熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。各稀释度下标准样品滴度的对数为横坐标,对应的 C_t 值为纵坐标,由标准曲线计算出对应的直线方程,将待测病毒的 C_t 值代入方程中,即可计算出 P1 代重组杆状病毒的病毒滴度。

1.2.4 蛋白表达和检测

贴壁细胞蛋白表达是将 Sf9 细胞以汇合度 90%的密度均匀铺入 12 孔板,以 MOI=5 的病毒量感染细胞,28 $^{\circ}$ C 培养 4–5 d。悬浮细胞蛋白表达是在发酵罐中加入 1 L 细胞悬液,细胞总量为 1×10^9 。发酵罐转速设置为 100 r/min,罐温设置为 28 $^{\circ}$ C,溶氧(dissolved oxygen, DO)设置为 60%,病毒按 1:100 的体积加入发酵罐中,培养 3 d。

收集细胞培养上清液后,用 PBS 重悬细胞,分别取 80 μ L 样品与 20 μ L 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液混合。样品在金属浴中 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后进行蛋白表达检测。根据 SDS-PAGE 说明书制备 8%的分离胶和 4%的浓缩胶,加入样品后以先 80 V 30 min 后 100 V 90 min 的条件电泳。使用半干转膜仪进行转膜,以 60 mA 恒流转膜 75 min。封闭时将硝酸纤维素(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜浸于 5%的脱脂奶粉中,水平摇床室温封闭 2 h。TBST 洗后加入一抗(Anti His-Tag Mouse Monoclonal Antibody),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗后加入二抗(Goat Anti-Mouse IgG, HRP Conjugated),水平摇床室温孵育 2 h。TBST 洗后加入显色液, PVDF 膜置于化学发光成像仪中曝光,检测蛋白表达。

1.2.5 重组 C 因子活性检测

用 2 mL 无内毒素水溶解 10 EU 内毒素标准

品, 得到 5 EU/mL 的内毒素标准品溶液。随后依次 10 倍梯度稀释得到 0.5、0.05、0.005 EU/mL 的内毒素标准品溶液, 在无内毒素酶标板中每孔加入 100 μ L 内毒素标准品溶液。在无内毒素离心管中以 5:4:1 加入荧光底物溶液、缓冲液和 rFC 酶溶液, 混匀后加入已加内毒素标准品的酶标板中。酶标仪温度设置为 37 $^{\circ}$ C, 激发波长 380 nm, 发射波长 440 nm。读取 0 h 的数值, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后再次记录数值^[16]。以 1 h 的数值减去 0 h 数值, 差值记为 Δ RFU (relative fluorescence unit)。

2 结果与分析

2.1 杆状病毒表达载体抗凋亡策略对 rFC 表达量的影响

2.1.1 重组质粒与重组杆状病毒的制备

载体 pQB3a 通过限制性内切酶 *BspE* I 和 *Nco* I 酶切进行线性化, 切胶回收获得纯化后的线性化载体。PCR 扩增的 rFC 片段、菌落 PCR 鉴定和质粒抽提结果如图 1A 所示。对重组质粒进一步测序鉴定, 结果显示重组质粒 pQB3a-rFC-His 序列正确。

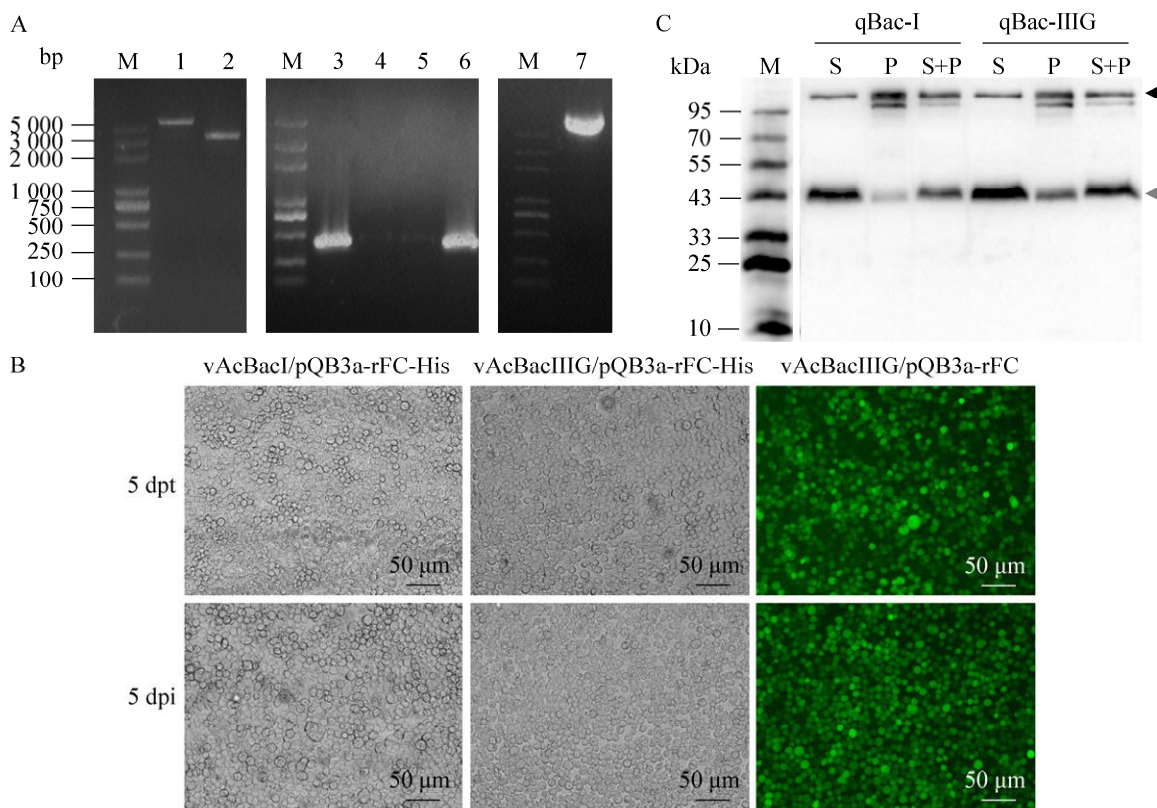


图1 杆状病毒表达载体对 rFC 表达量的影响 A: 重组质粒的构建。M: DNA marker; 泳道 1: 载体 pQB3a 双酶切; 泳道 2: rFC PCR 产物; 泳道 3–6: pQB3a-rFC-His 的菌落 PCR 鉴定; 泳道 7: pQB3a-rFC-His 重组质粒。B: 重组杆状病毒的制备。dpt: 转染后天数; dpi: 感染后天数。C: rFC 蛋白表达检测。S: 上清; P: 沉淀。图中箭头所指示的位置为目标蛋白的条带位置, 黑色箭头为 rFC 全长, 灰色箭头为 rFC 轻链。

Figure 1 Effect of baculovirus expression vector on rFC expression. A: Identification of recombinant expression vector pQB3a-rFC-His. M: DNA marker; Lane 1: *BspE* I and *Nco* I double digestion of pQB3a; Lane 2: PCR product of rFC; Lane 3–6: Identification of pQB3a-rFC-His by colony-PCR; Lane 7: Recombinant plasmid pQB3a-rFC-His. B: Preparation of recombinant baculovirus vAcBacI/rFC and vAcBacIIIIG/rFC. dpt: Days post transfection; dpi: Days post infection. C: Western blotting analysis of rFC expression. S: Supernatant; P: Pellet. The black arrow is the full length of rFC and the gray arrow is the light chain.

重组质粒 pQB3a-rFC-His 分别与 qBac-I 和 qBac-IIIIG 共转染 *Sf9* 细胞, 在 *Sf9* 细胞内同源重组制备重组杆状病毒 vAcBacI/rFC-His 和 vAcBacIIIIG/rFC-His, 转染 5 d 后细胞病变情况如图 1B 所示。细胞整体变圆, 部分细胞变大。两组细胞对比可见 qBac-IIIIG 具有明显的抗凋亡效果。qBac-IIIIG 载体骨架上含有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, *GFP*)基因, 因此可以在荧光显微镜下通过 *GFP* 荧光观察病毒感染情况。为获得滴度更高的 P1 代重组杆状病毒用于后续实验, 用 P0 代重组杆状病毒 vAcBacI/rFC-His 和 vAcBacIIIIG/rFC-His 感染 *Sf9* 细胞, 感染 5 d 后细胞病变情况如图 1B 所示。实时定量 PCR 检测 P1 代重组杆状病毒 vAcBacI/rFC-His 和 vAcBacIIIIG/rFC-His 的病毒滴度分别为 2.4×10^8 PFU/mL 和 3.0×10^8 PFU/mL。

2.1.2 蛋白表达检测

P1 代重组杆状病毒 vAcBacI/rFC-His 和 vAcBacIIIIG/rFC-His 以 MOI=5 感染 *Sf9* 细胞, 5 d 后收集细胞培养上清液和细胞样品, 检测分泌至胞外和胞内 rFC 的蛋白表达量。Western blotting 结果可见, 主要有 2 条特异性条带(图 1C)。重组 C 因子以单链(123 kDa)和双链(80 kDa 的重链和 43 kDa 的轻链)这 2 种形式存在^[17], 推测 2 条带分别是重组 C 因子的轻链和单链全长形式。Western blotting 结果显示, vAcBacIIIIG/rFC-His 组的分泌和胞内样品中 rFC 的蛋白表达量均高于 vAcBacI/rFC-His 组中 rFC 的蛋白表达量, 说明杆状病毒表达载体的抗凋亡策略可以提高 rFC 的蛋白表达量。除此之外, 病毒感染细胞后细胞裂解会释放蛋白酶, 降解培养基上清中的 rFC, 有激活 rFC 活性的潜在风险, 而 qBac-IIIIG 杆状病毒表达载体具有抗细胞凋亡的特性^[18], 更适合 rFC 的表达。

2.2 不同信号肽对 rFC 分泌效率的影响

2.2.1 不同信号肽的重组质粒与重组杆状病毒的制备

PCR 扩增获得 Fib 信号肽片段 SP_{Fib} (139 bp) 和 GP64 信号肽片段 SP_{GP64} (135 bp)。线性化载体 pQB3a-rFC-His 与信号肽片段通过同源重组获得质粒 pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His。PCR 扩增的信号肽片段、菌落 PCR 鉴定和质粒抽提结果如图 2A 所示。对重组质粒进一步测序鉴定, 结果显示重组质粒 pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His 序列正确。

重组质粒 pQB3a-rFC-His、pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His 分别与 qBac-IIIIG 共转染 *Sf9* 细胞, 在 *Sf9* 细胞内同源重组制备重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFC-His、vAcBacIIIIG/SP_{Fib}-rFC-His 和 vAcBacIIIIG/SP_{GP64}-rFC-His。用 P0 代重组杆状病毒感染 *Sf9* 细胞收获 P1 代重组杆状病毒。极限稀释法检测 P1 代重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFC-His、vAcBacIIIIG/SP_{Fib}-rFC-His 和 vAcBacIIIIG/SP_{GP64}-rFC-His 的病毒滴度分别为 3.9×10^8 PFU/mL、 2.1×10^8 PFU/mL 和 2.5×10^8 PFU/mL。

2.2.2 不同信号肽的重组 C 因子蛋白表达检测

P1 代重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFC-His、vAcBacIIIIG/SP_{Fib}-rFC-His 和 vAcBacIIIIG/SP_{GP64}-rFC-His 以 MOI=5 感染 *Sf9* 细胞, 感染 5 d 后收集细胞培养上清液和细胞样品, 检测分泌和胞内 rFC 的蛋白表达量。Western blotting 结果显示, rFC 原生信号肽的分泌效率高于 GP64 和 Fib 信号肽, 约为 GP64 信号肽的 1.2 倍、Fib 信号肽的 1.5 倍(图 2B)。此外, 无论是使用 rFC 的原生信号肽还是杆状病毒表达系统中常用的 GP64 和 Fib 信号肽, 均有较多 rFC 蛋白未能分泌至细胞培养上清液。

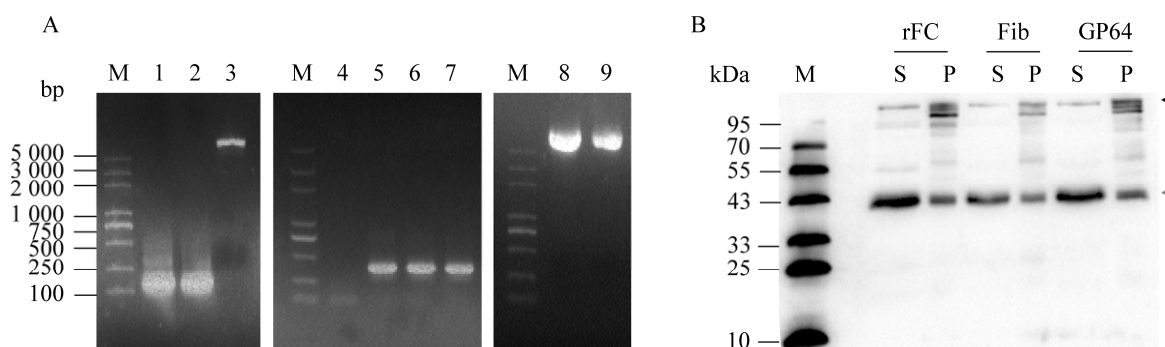


图 2 信号肽对 rFC 分泌效率的影响 A: 重组质粒的构建。M: DNA marker; 泳道 1: Fib 信号肽 PCR 产物; 泳道 2: GP64 信号肽 PCR 产物; 泳道 3: 载体 pQB3a-rFC-His 双酶切; 泳道 4-7: pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His 的菌落 PCR 鉴定; 泳道 8-9: pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His 和 pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His 重组质粒。B: rFC 蛋白表达检测。S: 上清; P: 沉淀。图中箭头所指示的位置为目标蛋白的条带位置, 黑色箭头为 rFC 全长, 灰色箭头为 rFC 轻链。

Figure 2 Effect of baculovirus expression vector on rFC expression. A: Identification of recombinant expression vector pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His and pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His. M: DNA Marker; Lane 1: PCR product of Fib; Lane 2: PCR product of GP64; Lane 3: *Xba* I and *Bgl* II double digestion of pQB3a-rFC-His; Lane 4-7: Identification of pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His and pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His by colony-PCR; Lane 8-9: Recombinant plasmid pQB3a-SP_{Fib}-rFC-His and pQB3a-SP_{GP64}-rFC-His. B: Western blotting analysis of rFC expression. S: Supernatant; P: Pellet. The black arrow is the full length of rFC and the gray arrow is the light chain.

2.3 密码子优化对 rFC 酶活的影响

2.3.1 不同密码子的重组质粒与重组杆状病毒的制备

对 rFC 的序列进行密码子优化, rFCopt 的优化策略是将信号肽以外编码区的 6 个稀有密码子(ctt, cta, cgt, cga, cgg, ggg)替换成次优密码子。rFCoptDL 是用草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, Sf)基因组编码数据, 用深度学习的方法训练模型, 然后对 FC 进行优化获得的序列^[19]。委托南京金斯瑞生物科技有限公司基因合成, 构建野生型和密码子优化的重组质粒 pQB4t-rFC、pQB4t-rFCopt 和 pQB4t-rFCoptDL。重组质粒分别与 qBac-IIIIG 共转染 Sf9 细胞, 制备重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFC、vAcBacIIIIG/rFCopt 和 vAcBacIIIIG/rFCoptDL。用 P0 代重组杆状病毒感染 Sf9 细胞, 感染 5 d 后收集 P1 代病毒。极限稀释法检测 P1 代重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFC、vAcBacIIIIG/rFCopt 和 vAcBacIIIIG/

rFCoptDL 的病毒滴度分别为 3.9×10^8 PFU/mL、 3.9×10^8 PFU/mL 和 5×10^8 PFU/mL。

2.3.2 不同密码子的重组 C 因子活性检测

对野生型和密码子优化的 rFC 进行酶活检测, 通过与内毒素标准品反应的荧光差值, 检测 rFC 的酶活水平, 优选活性更高的 C 因子编码序列。用表达 EGFP 的重组杆状病毒作为阴性对照(Control), 检测结果表明 rFCopt 的活性优于野生型和 rFCoptDL (图 3A)。

为了测定每个检测反应 rFC 的用量, 每个检测反应分别加 2、1、0.5 μ L rFCopt 的细胞培养上清液。结果表明 2 μ L 和 1 μ L 反应前后荧光差值显著, 可以用于内毒素检测, 0.5 μ L 样品荧光差值小, 不能进行内毒素检测(图 3B)。

为检测悬浮培养 Sf9 细胞的培养上清液中 rFC 的酶活, 用 2 L 发酵罐悬浮培养 1 L 的 Sf9 细胞, 重组杆状病毒 vAcBacIIIIG/rFCopt 感染 3 d 后取发酵液进行酶活检测, 以商业化试剂盒

中的 rFC 酶溶液为对照。用 2 μL 的 rFCopt 发酵液检测 0.5、0.05、0.005 EU/mL 的内毒素标准品。结果表明,所有实验组的信号值都高于商业化试剂盒。0.5、0.05 EU/mL 样品的荧光差值显著,0.005 EU/mL 的荧光差值较小,说明 2 μL 的 rFCopt 发酵液检测内毒素的灵敏度至少为

0.05 EU/mL (图 3C)。以内毒素浓度和荧光差值的对数为横纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的 R^2 大于 0.98,表明线性关系良好(图 3D)。发酵液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 6 个月后检测其 rFC 酶活,结果显示酶活稍有降低,但内毒素检测灵敏度仍可达到 0.05 EU/mL (图 3E)。

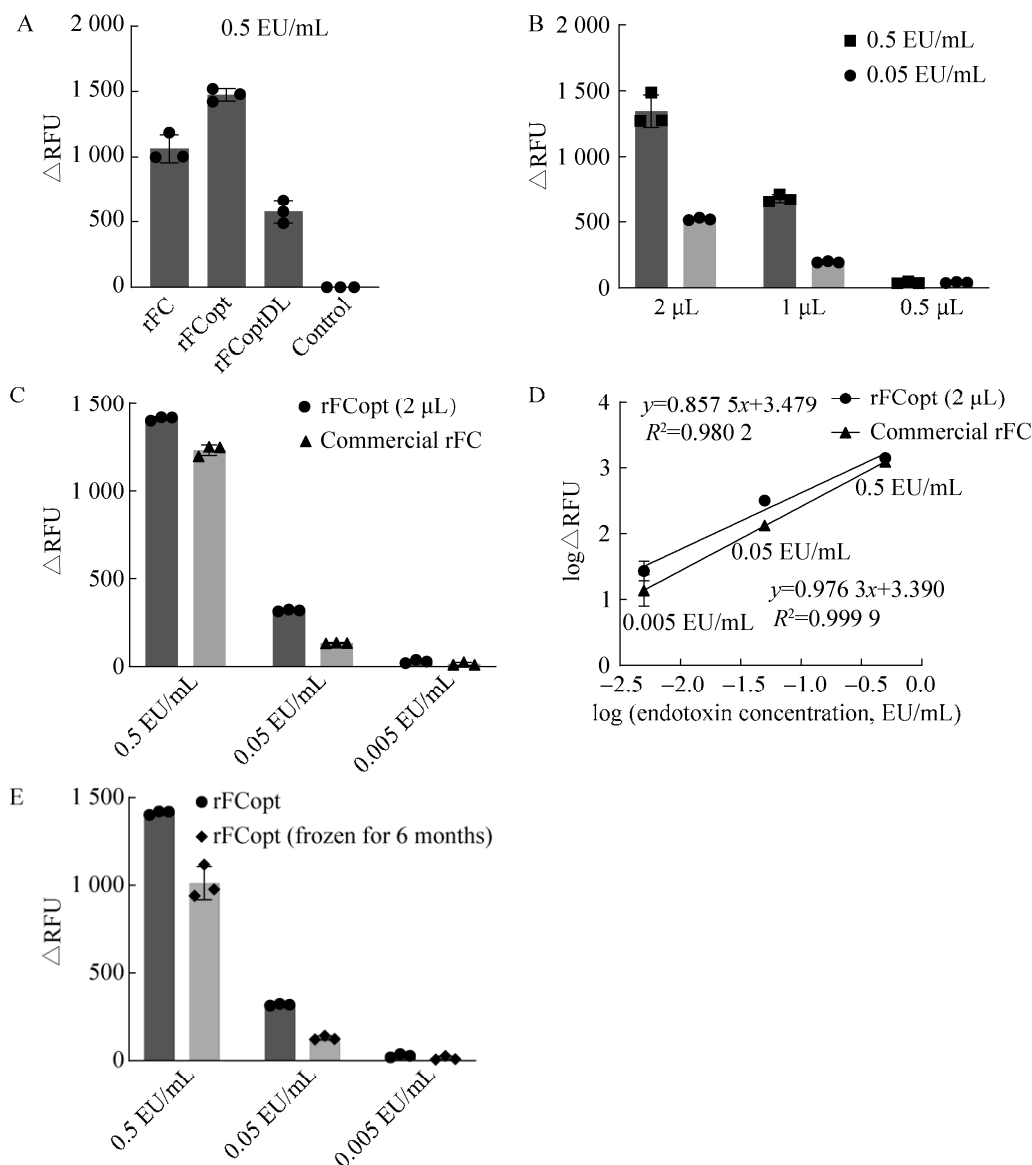


图3 重组C因子活性检测 A: 不同密码子的rFC活性检测。B: 不同用量的rFC活性检测。C: 发酵液中rFC的灵敏度检测。D: rFC内毒素检测标准曲线。E: rFC冷冻保存6个月后的活性检测。

Figure 3 Recombinant factor C activity assay. A: rFC activity detection of different codons. B: rFC activity detection of different dosages. C: Sensitivity detection of rFC in fermentation broth. D: Standard curve of endotoxin detection. E: rFC activity detection after frozen for 6 months.

3 讨论

重组 C 因子已在不同的表达系统中成功表达, 包括: 毕赤酵母表达系统^[20]、哺乳动物细胞表达系统^[21-22]和杆状病毒昆虫表达系统。毕赤酵母表达系统经济、快速, 且具有较高的表达量, 但其外源蛋白分泌能力不足, 并且甲醇作为诱导物可能影响产物的安全性。哺乳动物细胞表达系统具有完整的翻译后修饰功能, 但该方法需要通过转染获得 rFC 重组蛋白, 成本相对较高, 且相对于其他表达系统, 蛋白表达量较低。柯文锋等^[23]在哺乳动物细胞 Expi293F 中表达 rFC, 纯化后的蛋白在不外加内毒素的情况下, 仍与荧光底物反应, 作者推测是表达过程和纯化过程引入的内毒素使得 rFC 全部被提前激活。杆状病毒表达系统能够完成部分翻译后修饰, 表达量相对较高, 且成本较低、易于操作。早在 2001 年研究人员就尝试用昆虫细胞表达系统表达 C 因子^[24], 国内也有研究组用昆虫细胞^[16]或蚕蛹^[25]表达 C 因子, 这些尝试都取得了不同程度的成功。然而, 如何降低生产成本依旧是重组 C 因子应用领域亟待解决的问题。本研究中分泌至细胞培养上清液的 rFC 酶活足以支持内毒素检测反应, 无需进行蛋白纯化, 因此也避免了操作过程中引入内毒素。

本研究基于杆状病毒表达系统, 从杆状病毒表达载体、信号肽和密码子这 3 方面进行了一系列的优化, 以达到用细胞培养上清液即可检测内毒素的目的。通过重组杆状病毒感染贴壁 Sf9 细胞和悬浮 Sf9 细胞表达重组 C 因子, 用细胞培养上清液直接检测内毒素, 灵敏度可达到 0.05 EU/mL。首先选用抗凋亡杆状病毒表达载体 qBac-IIIIG 表达重组 C 因子。相比于野生型的杆状病毒表达载体 qBac-I, qBac-IIIIG 可以显著提高重组蛋白的蛋白表达量。qBac-IIIIG

杆状病毒表达载体具有抗细胞凋亡的特性, 减少细胞裂解后释放的蛋白酶对 rFC 和检测底物的降解, 降低检测时的本底信号。其次是优选分泌效率高的信号肽。由于本研究的目的是用细胞培养上清液直接检测内毒素, 因此对重组 C 因子的分泌效率有较高的要求。通过对 rFC 原生信号肽、GP64 信号肽和蚕丝蛋白重链信号肽的分泌效率进行平行比较, rFC 信号肽的分泌效率略高于其他信号肽。表明 C 因子原生信号肽适合 C 因子在昆虫细胞中分泌。最后是通过密码子优化提高重组 C 因子的表达量和检测内毒素的灵敏度。蛋白密码子的优化通常能够提高表达量, 但高频密码子的引入通常也会导致蛋白可溶性的降低和三维结构的破坏, 所以密码子优化策略的选择应持审慎的态度, 应实现在维持蛋白质活性的前提下进行表达量的提升。核糖体在 mRNA 上移动需要特定的“节奏”以保证多肽链能正确折叠成不同的结构。本研究在对稀有密码子进行替换时, 没有选择最优密码子, 而选用了次优密码子, 就是考虑尽可能保持原有的翻译“节奏”。事实上, 优化后确实具有比较好的活性。通过深度学习优化的序列(rFCoptDL)几乎对整个序列进行了重编码, 结果蛋白表达量/活性明显低于野生型, 说明密码子优化需要合理的策略。通过优选的 rFCopt 序列, 用 2 μ L 上清液直接检测内毒素, 灵敏度可达到 0.05 EU/mL。以此估算每 L 发酵液可以支持 50 万个检测反应。如果后续增加蛋白纯化的步骤, 可以进一步提升灵敏度。

如今对于各类无菌产品的内毒素检测需求不断增加, 内毒素检测的市场需求持续上升。本研究从杆状病毒表达载体、信号肽和密码子这 3 个方面进行了优化, 优选了杆状病毒表达载体、信号肽和密码子。可以直接用细胞培养上清液检测内毒素, 省去了蛋白纯化的步骤,

降低了引入内毒素的风险,大大降低了内毒素检测的成本。本研究制备重组 C 因子的方法易操作、灵敏度高且成本低,具有工业化应用的前景。

4 结论

基于杆状病毒表达系统表达重组 C 因子,利用杆状病毒表达载体 qBac-IIIIG 高产抗凋亡特性、优选信号肽和优化密码子,达到了用细胞培养上清液检测内毒素的目的,节省了蛋白纯化的步骤。用发酵罐 1 L 发酵体系时,发酵液的内毒素检测灵敏度可达到 0.05 EU/mL,每 L 发酵液可以支持 50 万个检测反应,在-20 °C 保存 6 个月不影响其检测灵敏度。

致谢

感谢西北农林科技大学生命科学院生物学教学科研平台(范宁娟老师、陈惜燕老师、段慧老师、魏兰兰老师)的技术支持。

作者贡献声明

兰兰、刘焕蕾:实验操作、数据管理、初稿写作;南昊:数据管理、初稿写作、经费支持;何思骏:实验操作、数据管理;宋望成:实验操作、经费支持;王云龙、范新娟、万香波:监督指导、稿件润色修改;许晓东:方案设计、监督指导、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有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。

REFERENCES

- [1] PFEIFFER R. Untersuchungen über das choleragift[J]. Zeitschrift Für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1892, 11(1): 393-412.
- [2] MORGAN WT. Studies in immuno-chemistry: the isolation and properties of a specific antigenic substance from *B. dysenteriae* (shiga)[J]. Biochemical Journal, 1937, 31(11): 2003-2021.
- [3] GOEBEL WF, BINKLEY F, PERLMAN E. Studies on the flexner group of dysentery bacilli: i. the specific antigens of *Shigella paradysenteriae* (flexner)[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1945, 81(4): 315-330.
- [4] MARTICH GD, BOUJOUKOS AJ, SUFFREDINI AF. Response of man to endotoxin[J]. Immunobiology, 1993, 187(3/4/5): 403-416.
- [5] GRANT R, HIRSCH JD. Pyrogen fever in rabbits: effects of adrenalectomy[J]. American Journal of Physiology, 1950, 161(3): 528-533.
- [6] Van DIJCK P, van de VOORDE H. Factors affecting pyrogen testing in rabbits[J]. Developments in Biological Standardization, 1977, 34: 57-63.
- [7] LEVIN J, BANG FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood[J]. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 1964, 115: 265-274.
- [8] LEVIN J, BANG FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin[J]. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1968, 19(1): 186-197.
- [9] NOVITSKY TJ. Biomedical applications of *Limulus* amoebocyte lysate[M]. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Boston, MA: Springer US, 2009: 315-329.
- [10] OBAYASHI T. The plasma (1→3)-β-D-glucan assay, a Japanese contribution to the diagnosis of invasive fungal infection[J]. Medical Mycology Journal, 2017, 58(4): J141-J147.
- [11] KAWABATA S, KOSHIBA T, SHIBATA T. The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab[J]. Invertebrate Survival Journal, 2009, 6(1): 59-77.
- [12] PERDOMO-MORALES R, PARDO-RUIZ Z, SPREITZER I, LAGARTO A, MONTAG T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin[J]. ALTEX, 2011, 28(3): 227-235.
- [13] 黄文静, 张敬, 崔林青, 赵辉. 海洋活化石: 鲎的研究进展[J]. 生物资源, 2022, 44(4): 344-354.
- [14] HUANG WJ, ZHANG J, CUI LQ, ZHAO H. Advances in the study of marine living fossil-horseshoe crab[J]. Biotic Resources, 2022, 44(4): 344-354 (in Chinese).
- [15] DING JL, HO B. Endotoxin detection: from *Limulus* amoebocyte lysate to recombinant factor C[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2010, 53: 187-208.
- [16] TINDALL B, DEMIRCIOGLU D, UHLIG T. Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution[J]. BioTechniques, 2021, 70(5): 290-300.
- [17] 张铁岭, 祁静, 张春, 刘晓玫. 昆虫细胞表达鲎 C 因子内毒素活性检测的研究[J]. 生物技术, 2017, 27(5): 478-483.
- [18] 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] TOKUNAGA F, MIYATA T, NAKAMURA T, MORITA T, KUMA K, MIYATA T, IWANAGA S. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) of horseshoe crab hemocytes. Identification and alignment of proteolytic fragments produced

- during the activation show that it is a novel type of serine protease[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 167(3): 405-416.
- [18] ZHANG XY, ZHAO KX, LAN L, SHI N, NAN H, SHI YN, XU XD, CHEN HY. Improvement of protein production by engineering a novel antiapoptotic baculovirus vector to suppress the expression of Sf-caspase-1 and Tn-caspase-1[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(8): 2977-2989.
- [19] FU HG, LIANG YB, ZHONG XQ, PAN ZL, HUANG L, ZHANG HL, XU Y, ZHOU W, LIU Z. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17617.
- [20] PUI AWM, HO B, DING JL. Yeast recombinant Factor C from horseshoe crab binds endotoxin and causes bacteriostasis[J]. *Journal of Endotoxin Research*, 1997, 4(6): 391-400.
- [21] DWARAKANATH RS, HO B, DING JL. Recombinant COS-1 cells express carinoscorpius rotundicauda Factor C[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(4): 357-362.
- [22] MIZUMURA H, OGURA N, AKETAGAWA J, AIZAWA M, KOBAYASHI Y, KAWABATA SI, ODA T. Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification[J]. *Innate Immunity*, 2017, 23(2): 136-146.
- [23] 柯文锋, 李诗洁, 郑梦林, 白仲虎, 杨艳坤. Expi293F 表达重组鲎 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).
- [24] WANG J, HO B, DING JL. Functional expression of full length Limulus Factor C in stably transformed Sf9 cells[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(1): 71-76.
- [25] 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鲎 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).