

Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒在家蚕幼虫中表达重组鲎 C 因子

祁静¹, 刘涛¹, 李珍², 贡成良², 吴海苹³, 张春¹

1 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 苏州市分子诊断与治疗技术重点实验室, 江苏 苏州 215163

2 苏州大学基础医学与生命科学学院, 江苏 苏州 215006

3 厦门市鲎试剂实验厂有限公司, 福建 厦门 361022

祁静, 刘涛, 李珍, 等. Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒在家蚕幼虫中表达重组鲎 C 因子. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1594-1601.

Qi J, Liu T, Li Z, et al. Expression of limulus Factor C in silkworm larvae by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1594-1601.

摘要: 鲎 C 因子是鲎血细胞中一种对内毒素具有高亲和力的丝氨酸蛋白酶, 被内毒素激活后可水解人工合成的三肽底物, 因而能替代传统的鲎试剂用于内毒素检测。通过 RT-PCR 从东方鲎血细胞中扩增出鲎 C 因子基因 (*factor C*) 序列, 利用 Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒表达系统在家蚕幼虫中表达该蛋白, 并对其活性测定。结果显示: 被感染的家蚕血清稀释后能检测到 Factor C 活性, 稀释 500 倍的血清可以用于内毒素检测, 且其灵敏度能达到 0.2 EU/mL, 有望开发新型的、低成本的内毒素检测试剂。

关键词: 鲎 C 因子, 家蚕幼虫, Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒表达系统, 内毒素检测试剂

Received: December 25, 2013; **Accepted:** January 27, 2014

Supported by: Suzhou Science and Technology Committee (No. ZXY2012011).

Corresponding author: Chun Zhang. Tel/Fax: +86-512-69588327; E-mail: chunzhang@sibet.ac.cn

苏州市科技局项目 (No. ZXY2012011) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130660.html>

Expression of limulus Factor C in silkworm larvae by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system

Jing Qi¹, Tao Liu¹, Zhen Li², Chengliang Gong², Haiping Wu³, and Chun Zhang¹

¹ Suzhou Municipal Key Laboratory of Molecular Diagnostics and Therapeutics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

² School of Biology and Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China

³ Chinese Horseshoe Crab Reagent Manufactory, Co., Ltd., Xiamen 361022, Fujian, China

Abstract: Limulus Factor C, a serine protease zymogen from the amoebocytes of the limulus, has high affinity for endotoxin. When Factor C is activated by endotoxin, it hydrolyses artificial tripeptide substrate and measurable products are released, so it can be used as an alternative reagent for endotoxin analysis. Factor C gene of *Tachypleus tridentatus* was obtained through RT-PCR and the recombinant protein was expressed by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system in silkworm larvae. The activity of Factor C was detected with diluted serum of silkworm larvae, and the sensitivity of endotoxin detected was 0.2 EU/mL when the serum was diluted at 1:500. The silkworm larvae expressed limulus Factor C could be used to develop a new low-cost endotoxin test reagent.

Keywords: limulus Factor C, silkworm larvae, Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system, endotoxin test reagent

内毒素又称之“热原”，其主要成分为脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)。热原进入人体内后可导致发热、休克甚至死亡，因而内毒素检测是药厂制药和医疗设备制造中必须的一道程序^[1-2]。鲎试剂 (Limulus Amebocyte Lysate, LAL/Tachypleus Amebocyte Lysate, TAL) 是国际上至今为止检测内毒素的金标准，具有简单、快速、灵敏度高等特点。然而鲎数量有限，鲎血中 G 因子干扰以及鲎试剂批次间不均一性等局限性，迫切需要开发鲎试剂的替代品^[3-5]。

鲎 C 因子 (Factor C) 是鲎血细胞中对 LPS 具有高亲和力的一种丝氨酸蛋白酶，LPS 激活 Factor C 后，活化的 C 因子能起始鲎血细胞中的凝集反应，并且其丝氨酸酶活性可以切割含精氨酸 (Arg) 的三肽底物^[6-7]。早期有研究人员在不同的表达系统中表达过鲎 C 因子，并证实该蛋白在昆虫细胞中表达时具有完全的生物学

功能^[8-11]。

杆状病毒表达系统具有高效表达，安全性好，表达产物稳定，后加工修饰等优点^[12]，与细菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统并列为公认的基因工程 4 大表达系统^[13]。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 和家蚕杆状病毒 (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 是最常用的两类杆状病毒表达载体。前者利用无血清培养基在昆虫细胞中表达蛋白，可用于生产和纯化分泌蛋白^[14-15]。后者利用家蚕生物反应器表达重组蛋白，相比前者具有表达产量高、成本低、易形成自主产业等特点^[16-18]。Wang 等^[11]利用 AcNPV 在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 Sf9 细胞中表达 Factor C，可用于检测内毒素，其反应原理如图 1 所示。

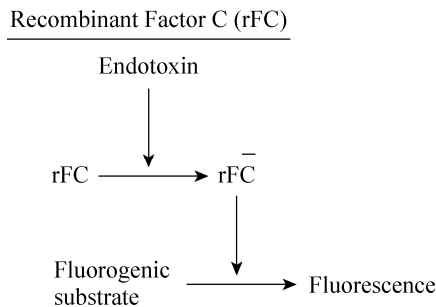


图1 重组Factor C检测内毒素原理图

Fig. 1 Endotoxin detection mechanism of recombinant Factor C.

Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒表达系统是2005年由 Motohashi 等^[19]首次建立的, 相比传统的 BmNPV 表达系统, 生产重组蛋白的周期大大缩短^[20]。本研究利用该系统表达鲎C因子, 并分析表达产物的生物学活性, 旨在为开发低成本新型内毒素检测试剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞

pFastBacHTb 载体、大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 由本实验室保存。*E. coli* BmDH10Bac^[21]、家蚕细胞系 BmN 和家蚕品种青松 \times 皓月由苏州大学基础医学与生命科学学院贡成良实验室保存。东方鲎血细胞由厦门鲎试剂厂馈赠。

1.1.2 试剂和酶

RT 逆转录试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司。KOD-plus-neo DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。Trizol 试剂、Grace 细胞培养基、胎牛血清、cellfectin II Reagent 均购自 Gibco 公司。荧光底物购自 Sigma 公司。引物由上海生工有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 重组 pFastbacHTb-Factor C 载体的构建

用 trizol 试剂提取东方鲎血细胞中的总 RNA, 逆转录成 cDNA。设计一对特异性引物扩增 *factor C* 基因片段 (P1 和 P2, 见表 1)。并且在上下游引物 5'末端分别引入 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 2 min ;98 $^{\circ}$ C 10 s , 59.5 $^{\circ}$ C 30 s , 68 $^{\circ}$ C 3 min , 35 个循环。PCR 产物用 1%琼脂糖电泳, 胶回收。用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切胶回收产物和 pFastbacHTb 载体, 纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 感受态, 挑取转化子经 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后抽提质粒, 酶切鉴定并测序。

1.2.2 重组 bacmid-Factor C 的构建

将测序正确的 pFastbacHTb-Factor C 质粒转化含有 bacmid 和 helper 质粒的 BmDH10Bac 感受态, 蓝白斑筛选出阳性克隆, 抽提重组 bacmid, 用 M13 通用引物 PCR 鉴定 (P3 和 P4, 见表 1)。

1.2.3 重组杆状病毒的获取

将鉴定正确的 bacmid-Factor C 用 cellfectin II Reagent 转染六孔板中的 BmN 细胞, 细胞密度为 60%–70%, 120 h 后收集培养上清, 1 000 r/min 离心 5 min, 得到的上清即为 P1。取 P1 按 MOI

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P1	TGCTCTAGAATGGTCTTAGCGTCGT TTTTGGT
P2	GGGGTACCTCAAATGAACTGCCTAA TCCATGAT
P3	CCCAGTCACGACGTTGTAACACG
P4	AGCGGATAACAATTTACACACAGG

值 0.1 连续感染 BMN 细胞两次后获得高滴度的 P3 病毒。

1.2.4 杆状病毒表达 Factor C 的鉴定

取 MOI 1、5、10 感染六孔板中的 BMN 细胞, 48、72 h 后收集细胞, 1 000 r/min 离心, 用无内毒素水洗两遍。细胞沉淀裂解后, 上清用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。浓度胶浓度 5%, 分离胶浓度 10%。一抗为小鼠抗 6×His 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的抗体。

1.2.5 重组 Factor C 在家蚕幼虫中的表达

参照 Yue 等^[22]报道的方法, 2 μL P3 野生型 (Wild) 病毒和重组 Factor C 病毒 (10⁸ pfu/mL) 皮下注射到五龄第 1 天家蚕体内, 当家蚕出现典型的病变特征后每天收集家蚕血清, 4 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 上清冻于 -20 °C。

1.2.6 重组 Factor C 的活性鉴定

参照 Ding 等^[23]报道的方法, 家蚕血清用无内毒素水稀释 100、500、1 000 倍, 利用动态荧光法检测重组 Factor C 活性。在无内毒素的 96 孔板中依次加入 LPS (0–10 EU/mL), 0.01% 吐温 20, 稀释的蚕血, 75 μmol/L 荧光底物 Boc-Val-Pro-Arg-MCA, 总体积 200 μL。设定酶标仪的反应温度为 37 °C, 激发波长 360 nm, 发射波长 460 nm, 检测荧光信号。每个浓度做 3 个复孔, 设置阴性对照 2 个。

2 结果

2.1 重组 pFastbacHTb-Factor C 载体的构建

东方萤 *factor C* 基因全长 3 060 bp, 编码 1 019 个氨基酸。以逆转录的 cDNA 为 PCR 模板扩增目的基因。琼脂糖凝胶电泳显示目的基因的大小在 3 000 bp 附近 (图 2A)。*factor C* 基

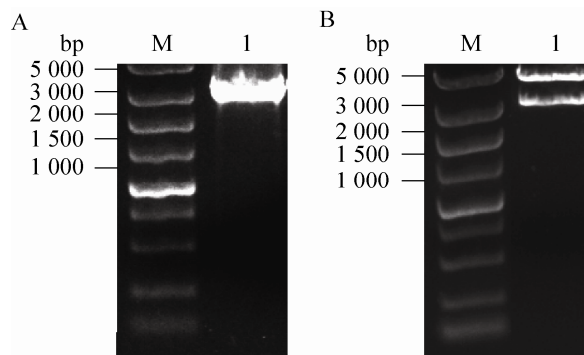


图 2 *Factor C* 基因的克隆和 pFastbacHTb-Factor C 的构建

Fig. 2 Cloning of *factor C* and construction of pFastbacHTb-Factor C. (A) RT-PCR cloning of *factor C*. M: DNA marker DS 5 000; 1: PCR fragment of *factor C*. (B) Identification of pFastbacHTb-Factor C by restrictive enzyme digestion. M: DNA marker DS 5 000; 1: pFastbacHTb-*factor C* digested with *Xba* I /*Kpn* I.

因通过 *Xba* I 和 *Kpn* I 插入到 pFastbacHTb 载体中, 转化后抽提质粒双酶切鉴定, 可切下 4.8 kb 和 3 kb 左右预期大小的条带 (图 2B)。酶切鉴定正确的质粒送去测序, 与 GenBank 中已报道的东方萤 *factor C* 基因序列 (D90271) 比对, 显示仅仅编码的第 823 个氨基酸不一样, 但与同一亚科的圆尾萤 *factor C* 基因序列该位点的氨基酸一致 (S77063), 说明得到的基因序列是正确的。

2.2 重组 bacmid-Factor C 的鉴定

以野生型 bacmid 和重组 bacmid-Factor C 为模板, M13 上下游引物做 PCR 扩增, 鉴定重组杆状病毒 DNA。结果显示, 野生型 bacmid 在 250 bp 附近有目的条带 (图 3A), 与预期的 300 bp 一致。重组 bacmid 在 5 000–6 000 bp 之间有目的条带 (图 3B), 与预计的 5 500 bp 结果一致。

2.3 重组杆状病毒的获取

重组 bacmid 转染 BmN 细胞后, 72 h 后可

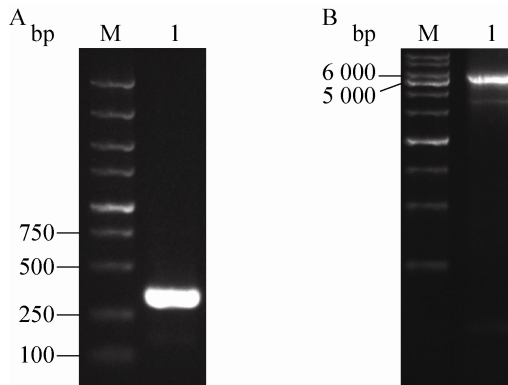


图 3 PCR 鉴定重组 bacmid

Fig. 3 Identification of recombinant bacmid by PCR. (A) M: DNA marker DS 5 000; 1: wild bacmid. (B) M: 1 kb DNA marker; 1: recombinant bacmid.

以观察到明显的病变，表现在细胞停止生长，形状由梭形变成圆形。120 h 大部分细胞飘起来，并裂解（图 4）。此时可以收集到成熟的杆状毒 P1。

2.4 重组 Factor C 在 BmN 细胞中的表达

用抗 his 标签的单克隆抗体检测 BmN 细胞中表达的重组 Factor C，同时用未感染的 BmN 细胞和野生型病毒感染的 BmN 细胞作对照。结果显示，相比对照，重组病毒感染的 BmN 细胞在 100 kDa 处有预期大小的条带（图 5）。

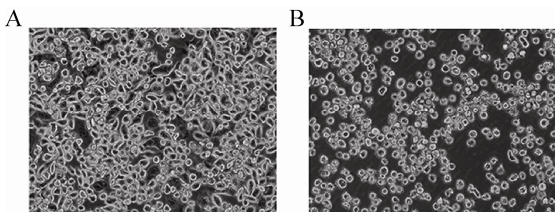


图 4 正常细胞和 bacmid 转染后的细胞

Fig. 4 Normal BMN and BMN cells transfected with bacmid. (A) Normal BMN cells. (B) BMN cells transfected with recombinant bacmid after 120 h.

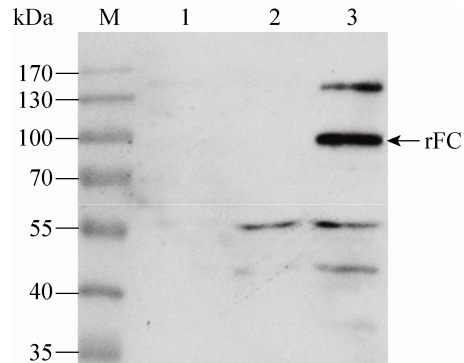


图 5 抗 His 标签单抗对重组 rFC 的 Western blotting 检测

Fig. 5 Identification of rFC expressed in BmN cells by Western blotting using anti-his-tag antibody. M: PageRuler™ prestained protein ladder; 1: normal BmN cells; 2: BmN cells infected by wild virus; 3: BmN cells infected with recombinant virus.

2.5 重组 Factor C 在家蚕幼虫中的表达

杆状病毒注射到家蚕幼虫后，72 h 后家蚕出现典型的感染症状，即食欲下降，生长缓慢，并出现身体肿胀，关节处最为明显（图 6）。144 h 后感染的家蚕幼虫陆续开始死亡。收集 72、96、120、144 h 的家蚕血清，用于后续 Factor C 的活性测定。

2.6 重组 Factor C 的活性鉴定

取病毒感染的家蚕血清稀释 100、500、1 000 倍，测定其中 Factor C 的活性。结果显示

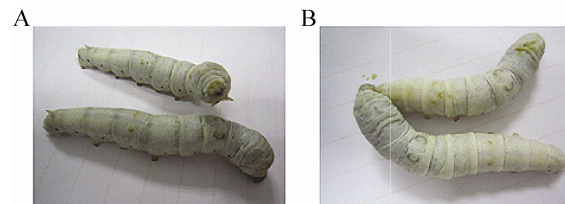


图 6 正常家蚕幼虫和病毒感染后的家蚕幼虫

Fig. 6 Normal silkworm larvae and infected silkworm larvae. (A) Normal silkworm larvae. (B) Silkworm larvae infected by recombinant virus after 72 h.

5 d 时收集的蚕血稀释 500 倍时检测的信噪比较高,且灵敏度较高(表 2)。取病毒感染 5 d 后的家蚕血清做 500 倍稀释,内毒素梯度为 0.2、0.5、1、2、5、10 EU/mL,动态荧光法检测 Factor C 活性。结果显示,随着内毒素浓度的增加以及反应时间的延长,检测到的荧光信号增强(图 7A)。以内毒素浓度和荧光强度做标准曲线, R^2 值为 0.997,因而表达的重组 Factor C 可以用来检测内毒素,且灵敏度达到了 0.2 EU/mL(图 7B)。

3 讨论

重组萤 C 因子具有 LPS 结合活性和丝氨酸蛋白酶活性,因而可作为新型内毒素检测试剂,解决萤数量有限,萤血中 G 因子旁路干扰^[24],萤试剂各批次不稳定性的缺点。早期有研究者在细菌,酵母中表达重组 C 因子,均不能得到有丝氨酸酶活性的蛋白,后证实该重组蛋白在昆虫细胞中表达后具有完整的生物学活性^[11]。昆

表 2 病毒感染家蚕幼虫不同时间点后 C 因子相对活性的比较

Table 2 Relative activity of Factor C at different times after infection by virus

Diluted ratio	Time (h)	Δ RFU	S/N
1:100	72	564	2.05
	96	624	2.35
	120	716	2.86
	144	586	2.34
1:500	72	237	3.50
	96	335	6.01
	120	405	7.14
	144	319	5.32
1:1 000	72	127	2.56
	96	140	2.90
	120	151	3.31
	144	132	3.10

Δ RFU: The increased value of relative fluorescence intensity after incubation with 10 EU/mL LPS for 90 min. S/N: the ratio of Δ RFU using 10 EU/mL and 0 EU/mL LPS.

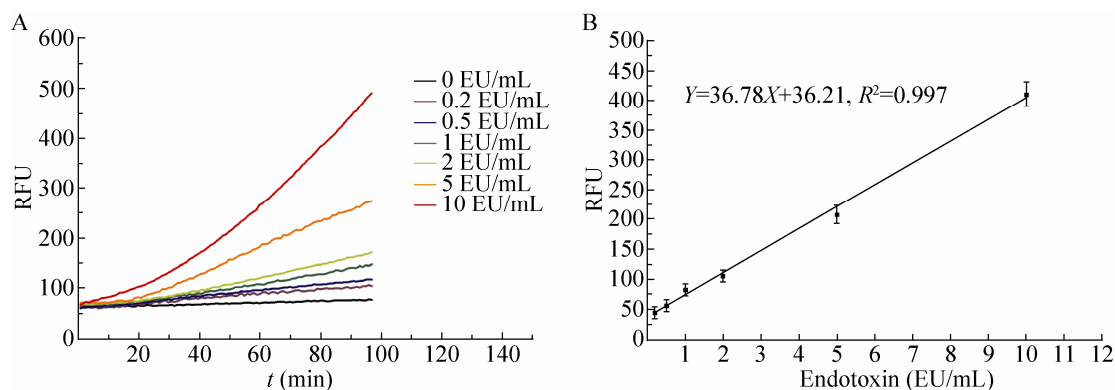


图 7 重组 Factor C 的活性检测

Fig. 7 Activity detection of recombinant Factor C. (A) Dynamic curve of endotoxin detection. (B) Standard curve of endotoxin detection.

虫表达系统具有容量大、周期短、表达量高、翻译后加工等优点。Ding 等^[25]在昆虫细胞 sf9 中表达了重组 C 因子,用培养上清检测内毒素,灵敏度可到 0.01 EU/mL,达到了高灵敏度的鲎试剂检测水平(0.06–0.015 EU/mL)。但利用该方法产业化生产试剂,需要无血清,悬浮培养大量细胞,成本较高。Usami 等^[26]比较了多种重组蛋白在昆虫细胞 sf9 和家蚕幼虫中的表达水平,结果显示,家蚕幼虫中重组蛋白的表达量比细胞表达量平均高达 70 倍。此外,利用家蚕为宿主,相比昆虫细胞具有成本低,易形成自主产业等优势。

本研究通过 RT-PCR 获得了东方鲎的 *factor C* 基因序列,利用 Bac-to-Bac/BmNPV 表达系统,首次在家蚕幼虫中表达了重组 Factor C,并用动态荧光法检测到了 Factor C 的活性。由于家蚕血清中的某些丝氨酸蛋白酶也能非特异切割荧光底物,产生荧光信号,对血清进行稀释能降低干扰。研究显示,病毒感染的家蚕血清稀释 100、500、1 000 倍时均能够检测到重组 Factor C 的活性。其中,稀释 500 倍时检测的信噪比较高,且具有较高灵敏度,表明了重组 Factor C 在家蚕幼虫中有较高的表达。Factor C 表达载体的 N 端带有 6 个组氨酸 (his),用重组病毒感染 BmN 细胞和家蚕幼虫,用抗 his-标签的抗体对细胞裂解液和血清做 Western blotting 分析。前者能检测到 100 kDa 的目的带,后者未能检测到 his 标签,推测重组 Factor C 在家蚕幼虫中表达时 N 端的 his 标签随信号肽一起被切除后,蛋白分泌到血清中。由于环境中内毒素的存在,以及稀释倍数较高,表达的重组 Factor C 对 LPS 的灵敏度目前只能到 0.2 EU/mL,但仍达到了普通鲎试剂的检测水平(0.5–0.125 EU/mL)。如何

有效降低家蚕血清中的干扰,以及获得更高的检测灵敏度,还需要进一步的研究。本研究为开发低成本新型内毒素检测试剂奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol*, 1978, 93(2): 526–618.
- [2] Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 635–700.
- [3] Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 1964, 115: 265–274.
- [4] Hu JC, Yu WB, Ma YY. Research progress of endotoxin. *Med Recapit*, 2000, 5: 222–224 (in Chinese).
胡金川, 于文彬, 马越云. 细菌内毒素检测方法的研究进展. *医学综述*, 2000, 5: 222–224.
- [5] Wang L, Gao H, Cai T, et al. Research and development of tachypleus amebocyte lysate. *Chin J Pharm Anal*, 2007, 6: 938–942 (in Chinese).
王莉, 高华, 蔡彤, 等. 鲎试剂的研究及应用进展. *药物分析杂志*, 2007, 6: 938–942.
- [6] Nakamura T, Tokunaga F, Morita T, et al. Intracellular serine-protease zymogen, Factor-C, from horseshoe-crab hemocytes-its activation by synthetic lipid-a analogs and acidic phospholipids. *Eur J Biochem*, 1988, 176(1): 89–94.
- [7] Tokunaga F, Miyata T, Nakamura T, et al. 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. *Eur J Biochem*, 1987, 167(3): 405–416.
- [8] Pui AWM, Ho B, Ding JL. Yeast recombinant Factor C from horseshoe crab binds endotoxin and causes bacteriostasis. *J Endotoxin Res*, 1997, 4(6): 391–400.
- [9] Roopashree SD, Chai C, Ho B, et al. Expression of *Carcinoscorpius rotundicauda* factor C cDNA.

- Biochem Mol Biol Int, 1995, 35(4): 841–849.
- [10] Roopashree SD, Ho B, Ding JL. Expression of *Carcinoscorpius rotundicauda* Factor C in *Pichia pastoris*. Mol Mar Biol Biotechnol, 1996, 5(4): 334–343.
- [11] Wang J, Ho B, Ding JL. Functional expression of full length limulus Factor C in stably transformed Sf9 cells. Biotechnol Lett, 2001, 23(1): 71–76.
- [12] Jarvis DL. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. Virology, 2003, 310(1): 1–7.
- [13] Wei YL, Li YN, Zhang ZF, et al. Advance in research and application of baculovirus express system. Biotechnol Bull, 2010, 10: 1–7 (in Chinese).
韦永龙, 李轶女, 张志芳, 等. 杆状病毒表达系统及其应用进展. 生物技术通报, 2010, 10: 1–7.
- [14] Khodabandehloo M, Shamsi Shahrabadi M, Keyvani H, et al. Cloning and expression of simian rotavirus spike protein (VP4) in insect cells by baculovirus expression system. Iran Biomed J, 2009, 13(1): 9–18.
- [15] Li CL, Shen H, Lin MQ, et al. Expression of murine interleukin 12(mIL-12) in insect cells. Acta Biol Experim Sin, 1998, 31(2): 171–178 (in Chinese).
李昌麟, 沈惠, 林明群, 等. 鼠白细胞介素 12(mIL-12)在昆虫细胞中的表达. 实验生物学报, 1998, 31(2): 171–178.
- [16] Wu D, Murakami K, Liu N, et al. Expression of biologically active recombinant equine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. Cytokine, 2002, 20(2): 63–69.
- [17] Tao T, Su SK, Miao YG, et al. Expression of apalbumin1 of *Apis cerana cerana* in the larvae of silkworm, *Bombyx mori*. J Agric Food Chem, 2008, 56(20): 9464–9468.
- [18] Han J, Zang Y, Lu H, et al. A novel recombinant dual human SCF expressed in and purified from silkworm, *Bombyx mori*, possesses higher bioactivity than recombinant monomeric human SCF. Eur J Haematol, 2004, 72(4): 273–279.
- [19] Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, et al. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 564–569.
- [20] Yao LG, Liu ZC, Zhang XM, et al. A highly efficient method for the generation of a recombinant *Bombyx mori* nuclear-polyhedrosis-virus Bacmid and large-scale expression of foreign proteins in silkworm (*B. mori*) larvae. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 48(Pt 1): 45–53.
- [21] Zhang X, Shen W, Lu Y, et al. Expression of UreB and HspA of *Helicobacter pylori* in silkworm pupae and identification of its immunogenicity. Mol Biol Rep, 2011, 38(5): 3173–3180.
- [22] Yue W, Miao Y, Li X, et al. Cloning and expression of manganese superoxide dismutase of the silkworm, *Bombyx mori* by Bac-to-Bac/BmNPV Baculovirus expression system. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(1): 181–186.
- [23] Ding JL, Ho B. Assays for endotoxin: US, 6645724. 2003-11-11.
- [24] Seki N, Muta T, Oda T, et al. Horseshoe crab (1,3)-beta-D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to beta-glucan-binding proteins. J Biol Chem, 1994, 269(2): 1370–1374.
- [25] Ding JL, Ho B. Endotoxin detection-from limulus amebocyte lysate to recombinant factor C. Subcell Biochem, 2010, 53: 187–208.
- [26] Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, et al. Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm. J Biochem, 2011, 149(2): 219–227.

(本文责编 郝丽芳)