

# 重组鲎C因子(rFC)替代鲎血制备鲎试剂的研究进展

杨绍宇,温芝婷,荣冬颖,卢楚群,罗杰雄,王红\*

(北部湾大学海洋学院,广西钦州 535000)

**摘要:** 鲎试剂广泛用于检测医药产品中的细菌内毒素,但由于鲎资源稀缺,制约了鲎试剂的生产。重组鲎C因子(rFC)作为鲎试剂的替代品,通过基因工程表达获得,可特异性检测内毒素,不依赖动物资源。综述了rFC的检测机制、发展历程及药典认可情况。研究表明,rFC方法具有特异性强、不依赖动物资源等优点,已渐被药典认可,是解决鲎试剂供应短缺的可靠方案,具有重要的应用前景。

**关键词:** 鲎C因子;基因工程;鲎试剂;药典

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1674-8646(2024)08-0118-03

## Research Progress of Recombinant Limulus C Factor(rFC) Replacing Limulus Blood in Preparation of Limulus Reagents

Yang Shaoyu, Wen Zhiting, Rong Dongying, Lu Chuqun, Luo Jiexiong, Wang Hong\*

(College of Marine Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou 535000, China)

**Abstract:** Limulus reagents are widely used to detect bacterial endotoxins in pharmaceutical products, but the production of limulus reagents is restricted due to the scarcity of limulus resources. As a substitute for limulus reagents, recombinant limulus C factor(rFC) can be obtained by gene engineering and can specifically detect endotoxins without dependence on animal resources. The study reviews the detection mechanism, development history and pharmacopoeia approval of rFC. Studies have shown that rFC method has the advantages of strong specificity and independent of animal resources, and has been gradually recognized by pharmacopoeia as a reliable solution to solve the shortage of limulus reagents. It has important application prospects.

**Key words:** Limulus C factor; Genetic engineering; Tachypleus Amebocyte Lysate; Pharmacopoeia

## 0 引言

享有海洋活化石之称的鲎是一种具有重要药用价值的海洋生物资源,从鲎血中制备的鲎试剂主要用于检测疫苗、医疗器械等医用产品的细菌内毒素,但由于长期过度捕捞,鲎处于濒临灭绝的危险境地。2021年,《国家重点保护野生动物名录》将鲎列入国家二级保护动物,标志着我国正式进入鲎保护时代。受此影响,鲎试剂产业面临着原料短缺而停产的巨大挑战。

鲎试剂的产生源于医疗过程中抗内毒素治疗及内毒素检测的一项基本需求。患者疾病快速诊断、相关药品内毒素测定及注射药品、食品、药品、饮用水的检测等都需要对内毒素进行测定<sup>[1]</sup>。鲎试剂被认为是检测内毒素最为高效且速度最快的方法,具有应用范围广的优点。而家兔热源检测法具有操作繁琐、费时、灵敏度低等缺点,故市场上90%都是应用鲎试剂法进行内毒素的检测。但纵观全球鲎试剂供应市场,鲎血

的原材料是通过捕获活化石生物鲎,从鲎的蓝色血液中分离出变形细胞、提取细胞溶解物、通过低温冷冻干燥过程制成鲎试剂,其中最主要的成分为鲎C因子。但由于沿海地区城市发展、围填海工程而造成鲎的繁殖和生活环境受到破坏甚至消失,加之人们对鲎的了解较少,保护意识淡薄,甚至市场上出现了买卖鲎、餐厅食用鲎和制造鲎的工艺制品等现象,导致鲎的数量急剧下降,因此全球鲎试剂市场存在原材料短缺、成本高且不稳定等问题,其中最突出的问题是鲎血资源的稀缺。鲎血非常宝贵,但在全球范围内拥有鲎资源的国家屈指可数。我国鲎资源占全球的95%,广泛分布于沿海地区,特别是东海、黄海和南海等地,包括多个品种和不同规格的鲎类,如刺参、黄鳍参、黄金参等。但是从20世纪90年代后,全球鲎存活量急剧下降。2019年,中国鲎已被世界自然保护联盟列为濒危物种。

## 1 国内毒素检测市场对鲎试剂的巨大需求

国内大型试剂生产企业年产量可达1000万支/年。以企业每生产150万支鲎试剂为单位,需要提供5000对(共计10000只)成年鲎作为血源<sup>[2]</sup>,因此鲎C因子

收稿日期:2023-12-28

基金项目:项目得到国家自然科学基金(42266004)和广西高校  
中青年教師科研基础能力提升项目(2020KY10011)  
资助

的替代品寻求路径迫在眉睫。鲎试剂主要应用于药品生产企业、医疗器械制造企业、药品检验机构、第三方检测认证机构等药品检测领域及医院、疾病预防控制中心、临床检验中心、血站和血液中心等临床应用领域。需要使用鲎试剂进行细菌内毒素检测的种类不断增加,国内医药市场对鲎试剂的需求也随之增加。据

统计,2020年鲎试剂全球的市场规模为1347.23亿元,每5年的增长速度达到33.67%的年均复合增长率。我国鲎试剂检测的市场规模为242.8亿元,每5年的增长速度达到12.23%的年均复合增长率。如果考虑到全球鲎资源枯竭等因素,鲎试剂的市场价值将变得更加难以预测<sup>[3]</sup>。

表1 几种内毒素检测方法比较

Tab.1 Comparison of several endotoxin detection methods

方法	特点	优势	劣势
家兔法	将一定剂量的待测样品经由静脉注射到家兔体内,在规定时间内观察家兔体温是否上升,进行实验	最早的检测方法且结果精确,在1953年中国药典纳入了该方法	个体差异大、重复性差、价格昂贵
酶联免疫吸附试验法(ELISA)	基于内毒素的致热原理,即当内毒素刺激巨噬细胞时会引发内热原物质的产生,采用ELISA来定量	该法灵敏度较高,可检测很低剂量的内毒素	方法开发时间长、精确度还需验证
气相色谱和质谱联用法(GC-MS)	利用检测内毒素的3-羟基脂肪酸来定量检测内毒素的含量	成本低,具有可持续性	由于仪器的限制,很难成为常规检测方法
鲎试剂法	目前药典规定的内毒素检测的主流方法包括凝胶法和光度测定法	鲎试剂法简单、快速、灵敏、准确,已广泛用于临床、制药工业等方面	试剂原料短缺而将面临停产危机

## 2 鲎试剂的活性成分鲎C因子

鲎试剂的主要活性成分鲎C因子是一种分子量为123kD的丝氨酸蛋白酶原,其Sushi区域在N末端的CES段表现出特异性,能与内毒素结合而被激活发出荧光,根据荧光强弱可以定量测定内毒素含量。鲎试剂含有凝血原和由微量细菌内毒素和真菌葡聚糖激活的凝血原,在制药、临床及科研领域得到了广泛应用,用于检测细菌内毒素和真菌葡聚糖。目前使用的鲎试剂分为两种,即来自美国的鲎试剂和东方鲎试剂。生物医学产品的质量控制在1942年,当时兔热原测试(RPT)缓慢、费力且昂贵。1977年,美国FDA批准了鲎状细胞裂解物(LAL)测试<sup>[4]</sup>。但LAL测试需要收获和放血濒临灭绝的中华鲎,破坏了生态系统。

## 3 生物技术的发展为rFC代替鲎试剂提供了技术支持

生物重组技术的不断发展为rFC代替LAL提供了技术支持。Humulin是第一个商业重组的人胰岛素,从此以后,出现了数十种重组活性大分子,如生长因子、血液因子、细胞因子、激素和疫苗。如果重组分子的结构与天然蛋白质相同,被证明重复蛋白与天然蛋白的功能是等效的。rFC测定具有以下优点:内毒素检测特异性,通过重组技术,鲎试剂中的 $\beta-1$ 被成功消除,3-葡聚糖导致的假阳性结果的干扰被消除。无需依赖动物源性成分,这种方法在供应安全性方面提供了更高的保障。通过重组表达生产,产品在不同批次间具有良好的一致性。终点荧光测定,不易受到干扰。灵敏度范围0.005~5 EU/mL,消除了对动物源试剂的依赖,符合3R的替代原则。

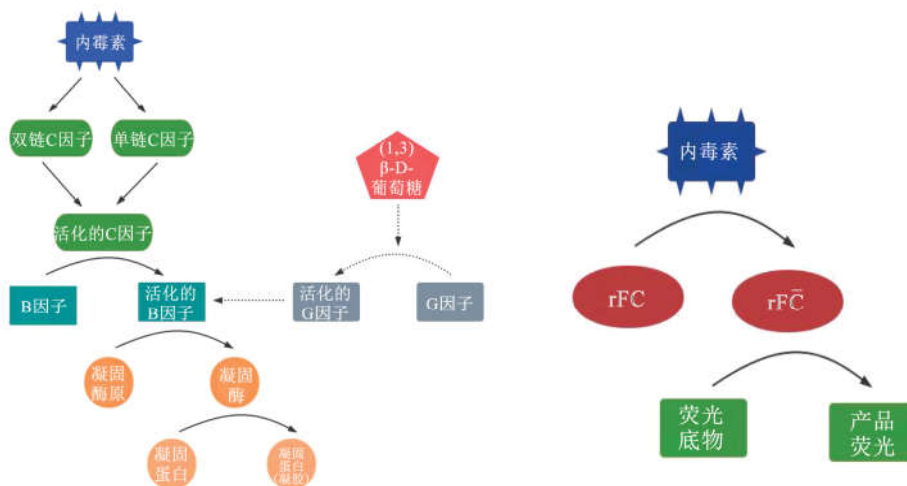


图1 传统鲎试剂(左)与rFC(右)检测内毒素的机制比较

Fig.1 Comparison of endotoxin detection mechanism between traditional limulus lysate (left) and rFC (right)

## 4 重组鲎 C 因子方法被药典认可

各国研究者利用各种宿主(细菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞或家蚕)表达功能重组鲎 C 因子(rFC)。rFC 对细菌内毒素具有特异性,只需比色或荧光底物来产生颜色或荧光读数,以测量内毒素<sup>[5]</sup>。rFC 不受其他 LAL 蛋白的干扰,具有很高的商业潜力。采用可靠的替代检测方法(如 rFC)进行水、原材料及过程测试至关重要,将取代高达 90% 的 LAL 使用量。2011 年,第一个针对内毒素的 rFC 测试已经上市。

表 2 重组鲎 C 因子方法被药典认可

Tab.2 Method of recombinant limulus C factor approved by pharmacopoeia

时间	rFC 药典监管许可
2012 年 6 月	FDA 发布了《行业指南:热原和内毒素检测问答》,允许使用基于 rFC 的检测方法替代基于 LAL 的检测
2015 年 7 月	欧洲药典在 5.1.10 章新草案中正式认可 rFC 作为 LAL 和免热原试验的内毒素检测的替代法
2016 年 7 月	第 5.1.10 章正式生效,510(K)申请文件被美国食品药品监督管理局批准,使用 PyroGeneTMREC 测定作为最终放行试验。美国制造商龙沙提交了一份全面的 FDA 主文件
2018 年 12 月	欧洲药典发布了他们新的药典章节 2.6.32 的草案,专门用于 rFC 方法
2019 年 1 月	继欧洲药典、日本药典和 USP(草案)之后,在中国药典中,rFC 被列为细菌内毒素检查的新药典方法。《中国药典》第 4 版 2020 年生效
2019 年 12 月	第 165 届欧洲药典委员会宣布,预计将纳入第 26.32 章(使用 rFC 测试细菌内毒素)作为下一版本的 4 个章节之一
2020 年 6 月	中国药典在新版本中公布了章节《9251 细菌内毒素检查法应用指导原则》,其中包括 rFC 方法作为一种现在可用的内毒素检测方法
2020 年 7 月	欧洲药典出版了第 26.32 章 - 使用 rFC 检测细菌内毒素将于 2021 年 1 月 1 日生效

## 5 结束语

rFC 的应用将有效促进内毒素检测领域的可持续发展,不存在对濒危动物资源的依赖,具有重要的社会和商业价值。当产业实现规模化生产后,rFC 试剂有望成为内毒素检测的优先选项。未来还需继续优化 rFC 的表达方式、检测系统,以进一步提高性价比和市场渗透率。

### 参考文献:

[1] 洪水根. 中华鲎生物学研究[M]. 厦门:厦门大学出版社,2011.  
[2] 陈章波,范航清,廖永岩,等. 面临生存困境的动物活化石——鲎[J]. 科学,2015, 67(03):60-62.

2016 年,欧洲药典正式认可了 rFC 并将其列为细菌内毒素的一项检测手段<sup>[6]</sup>。2020 年 9 月,美国药典委员会(USP)详细论述了重组试剂的内毒素检测方法。我国 2020 版药典《9251 细菌内毒素检查法应用指导原则》中提出可以使用 rFC 法进行内毒素检查。目前美国 Lonza、Soluble Biotech 公司及法国 bioMérieux 公司生产的 rFC 试剂盒占据了全球市场绝大部分份额,美国最大的鲎试剂公司查尔斯实验室(Charles River Laboratories)也在积极研发中<sup>[7]</sup>。

[3] 赵忠浩,常雪晴,王有基,等. 中国鲎血蓝蛋白提纯及其纯化物的液相色谱串联质谱分析[J]. 水产学报,2021(03):1-9.  
[4] 颜明艳,李琼珍,宋洁,等. 基于 MAXENT 模型评估北部湾潮间带中国鲎和圆尾鲎稚鲎的潜在地理分布及种群保育对策[J]. 生态学报,2019,39(09):3100-3109.  
[5] Liao YY, Hsieh HY, Xu SQ, et al. Wisdom of crowds reveals clear decline of Asian horseshoe crabs in Beibu Gulf[J]. China Oryx,2019, 53:222-229.  
[6] Williams KL. Cleanroom technology, “recombinant factor C assay to aid demand for LAL endotoxin testing” 9 March 2020 [EB/OL]. [2023-12-16]. [https://www.cleanroomtechnology.com/news/article\\_page/Recombinant\\_Factor\\_C\\_assay\\_to\\_aid\\_demand\\_for\\_LAL\\_endotoxin\\_testing/163099](https://www.cleanroomtechnology.com/news/article_page/Recombinant_Factor_C_assay_to_aid_demand_for_LAL_endotoxin_testing/163099).  
[7] 张铁岭,祁静,张春,等. 昆虫细胞表达鲎 C 因子内毒素活性检测的研究生物技术[J]. 生物技术,2017,27(05):478.

(上接第 117 页)

[20] 唐艳. “FAST”用于我国脑卒中公众教育可行性研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2015.  
[21] 孙蓓蓓,姚博,房彩,等. 三种卒中筛查量表在社区疑似卒中患者快速转诊中应用价值的对比研究[J]. 中国卒中杂志,2020, 15(02):126-129.  
[22] 嵇海娇. 两种筛查量表在急诊预检分诊时对早期识别急性脑卒中患者的应用研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(62):50.  
[23] 黄俊. 急诊预检分诊时两种筛查量表对早期识别急性脑卒中患者的影响[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(54):30-31.  
[24] 钟楚锋,周环,萧嘉颖. G-FAST 评分在急性脑梗死患者 rt-PA 静脉溶栓疗效评估中的应用[J]. 中国现代药物应用,2021, 15(20):77-79.

[25] 桑贵蕊. ROSIER 量表和 FAST 量表对急诊疑似卒中患者筛选价值的研究[D]. 芜湖:皖南医学院,2015.  
[26] 刘琴琴,杨丽,赵秋利,等. 国际脑卒中识别量表及其性能比较[J]. 中国康复医学杂志,2020,35(06):753-757.  
[27] 陈晓辉,茅海峰,莫均荣,等. 三种脑卒中筛查量表对急诊疑似卒中患者应用价值的研究[C]//中华医学会,中华医学会急诊医学分会(Chinese Society for Emergency Medicine). 中华医学会急诊医学分会第 17 次全国急诊医学学术年会论文集,2014:418.  
[28] 王凯,荣良群,魏秀娥,等. FAST 量表联合 MLAPSS 量表在社区居民脑卒中院前急救中的作用研究[C]//中国研究型医院学会介入神经病学专业委员会,中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组,江苏省卒中学会神经介入专业委员会. 中国介入神经病学大会 2019 - 第 15 届国际脑血管病高峰论坛论文汇编,2019:169-171.