

重组 C 因子法测定注射用重组 III 型 人源化胶原蛋白溶液中的细菌内毒素

李玲¹, 程潇¹, 王建^{1*}, 连凯娜¹, 张蕻¹, 范毓慧¹, 孙丹丹¹, 于玉凤²

(1. 山西锦波生物医药股份有限公司 功能蛋白山西省重点实验室, 太原 030032; 2. 山西医科大学 基础医学院, 太原 030001)

摘要 **目的:** 建立重组 C 因子检测注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液细菌内毒素含量的方法。**方法:** 通过采用生物梅里埃重组 C 因子试剂盒、龙沙重组 C 因子试剂盒, 分别对 3 批注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液进行了测定, 并进行方法验证。**结果:** 2 种试剂盒的标准曲线浓度点 ≥ 3 个, 线性 $r > 0.980$; 阴性对照的 ΔRFU 值小于标准曲线最低点的 ΔRFU 值; 细菌内毒素含量均 $< 6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 重复性良好, 细菌内毒素的回收率在 50%~200%, 符合《中华人民共和国药典》标准要求。**结论:** 注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液中细菌内毒素含量采用 2 个试剂盒测定的结果分别为 $< 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $< 0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 符合产品细菌内毒素的标准要求。该方法可用于注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液中细菌内毒素含量的测定。本文为采用重组 C 因子法测定重组蛋白产品中内毒素的相关研究提供参考。

关键词: 重组 C 因子; 注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液; 细菌内毒素; 重组胶原蛋白; 试剂盒

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)03-0530-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0498

Determination for the bacterial endotoxin of recombinant type III humanized collagen solution for injection by the recombinant C-factor method

LI Ling¹, CHENG Xiao¹, WANG Jian^{1*}, LIAN Kai-na¹, ZHANG Hong¹,
FAN Yu-hui¹, SUN Dan-dan¹, YU Yu-feng²

(1. Key Laboratory of Functional Proteins of Shanxi Province, Shanxi Jinbo Biopharmaceutical Co., Ltd, Taiyuan 030 032, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030 001, China)

Abstract **Objective:** To establish a recombinant C-factor method to detect the content of bacterial endotoxin in recombinant type III humanized collagen solution for injection. **Methods:** Three batches of injectable recombinant type III humanised collagen solutions were determined and method validation by using the BIOMERIEUX recombinant C-factor kit and the lonza recombinant C-factor kit, respectively. **Results:** The results showed that about the two kits the concentration points of the standard curve were ≥ 3 , and the linear correlation coefficient was $r > 0.980$, the ΔRFU value of the negative control was smaller than that of the lowest point of the standard curve; the bacterial

* 通信作者 Tel: 18635146525; E-mail: Wj7520991@163.com

第一作者 Tel: 15110338498; E-mail: 397230757@qq.com

endotoxin contents were all $< 6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$. The reproducibility was good, the recoveries of bacterial endotoxin were in the range of 50%–200%, which was in accordance with the standard requirements of the ChP. **Conclusion:** The bacterial endotoxin content in the solution of recombinant type III humanized collagen solution for injection is determined by the two kits. The results were $< 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $< 0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, which are in accordance with the standard requirements for bacterial endotoxin in the product, respectively. The method can be used for the determination of bacterial endotoxin content in the solution of recombinant type III humanized collagen solution for injection. This study provides a reference for the research related to the determination of endotoxin in recombinant protein products using recombinant C-factor method.

Keywords: recombinant C-factor; recombinant type III humanized collagen solution for injection; bacterial endotoxin; recombinant collagen; limulus reagent

目前,重组胶原蛋白作为生物医学材料领域的突破性成果,在医疗美容和生物材料应用方面占重要地位。近年来,我国重组胶原蛋白产业实现跨越式发展,其相关产品凭借卓越的生物相容性和安全性,日益受到临床机构和消费者的青睐。注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液是继冻干纤维剂型后,又一款按照 III 类医疗器械进行管理的新款重组胶原蛋白的医美针剂,是由重组 III 型人源化胶原蛋白和 0.9% 生理盐水组成,采用的重组胶原蛋白生物材料其氨基酸序列的重复单元与人胶原的氨基酸序列特异性功能区 100% 一致,具有细胞黏附性好、生物活性高、透皮吸收率高的生物学性能^[1]。独特的自组装能力可形成胶原蛋白纤维网状结构,对细胞、组织起支撑作用,这类新型的重组胶原蛋白生物材料在化妆品、医美、医疗器械等领域展现出更广阔的应用前景^[2-3]。

重组胶原蛋白在工业化生产过程中多为细菌或真菌进行发酵生产,细菌内毒素的质量控制是保障产品安全的重要组成部分。目前,细菌内毒素的检测方法主要有凝胶法和光度法,这 2 种方法主要依赖于鲎试剂。传统凝胶法反应的原理是鲎试剂中的 C 因子被细菌内毒素激活而使得鲎试剂产生凝集反应^[4-7]。然而鲎试剂的唯一来源是鲎的血液,随着鲎资源的短缺,采用生物重组技术获取的重组 C 因子目前可以作为鲎血液的代替品,重组 C 因子法测定细菌内毒素的原理是重组 C 因子被细菌内毒素激活,被激活后的重组 C 因子可切割荧光素底物,从而产生荧光化合物,根据底物的荧光差异与样品中的内毒素浓度成比例原理,可测量出样品中的细菌内毒素浓度^[8-12]。该方法已在欧洲药典收录并且也写进了美国 FDA 在 2012 年发布的指导原则中,目前我国也将重组 C 因子

写入了 2020 年版《中华人民共和国药典》(9251 细菌内毒素检查法应用指导原则),我国相关监管部门也对重组 C 因子法测定进行了一部分探索和研究^[13-17],但是有关重组 C 因子法应用范围的研究仍然不够全面。

本文利用重组 C 因子法,对注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液中的细菌内毒素进行测定,从该方法的灵敏度试验、标曲可靠性试验、初筛试验、干扰试验进行验证。

1 材料

1.1 试验样品 注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液(批号 20201102、20201201、20201202,规格 $1 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$),产品型号 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,山西锦波生物医药股份有限公司生产。

1.2 试剂及设备 酶标仪(型号: HIM)购自 Bio-Tek 公司; ENDONEXT 试剂盒(Lot: 609033)购自 BIOMERIEUX 公司; Pyro Gene™ Recombinant Factor C(Lot: 0001079736)购自 Lonza 公司。细菌内毒素检查用水(Lot No. 22096004)和无内毒素玻璃试管(带盖)购自厦门鲎试剂生物科技股份有限公司。

2 实验方法

2.1 样品前处理

2.1.1 最大有效稀释倍数确定 供试品细菌内毒素含量限值 L 为 $< 6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,浓度(C)为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,则经单位换算供试品细菌内毒素含量限值 L 可表述为 $3 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$,测定时将供试品浓度稀释为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,ENDONEXT 试剂盒灵敏度为 $0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,Pyro Gene™ Recombinant Factor C 试剂盒灵敏度为 $0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$,最大有效稀释倍数(maximum valid dilute double, MVD)按照公式: $\text{MVD} = LC/\lambda$,计算可

得 2 款试剂盒的最大有效稀释倍数分别 60 倍和 600 倍。

2.1.2 供试品溶液制备 取供试品原液于无热原试管中, 根据 ENDONEXT 试剂盒和 Pyro Gene™ Recombinant Factor C 试剂盒的灵敏度, 用细菌内毒素检查用水分别对应逐步稀释至 20、40、60 倍和 200、400、600 倍, 每一步最大稀释倍数 ≤ 10 , 每一步稀释后旋涡振荡 2 min。

2.1.3 细菌内毒工作标准品系列溶液的制备 取 ENDONEXT 试剂盒内工作标准品, 用细菌内毒素检查用水溶解至 $500 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按照表 1 再逐步梯度稀释至 50、5、0.5、0.05 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 于 4 支无热原试管中。

取 PyroGene™ Recombinant Factor C 试剂盒内工作标准品, 用细菌内毒素检查用水溶解至 $20 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按照表 1 再逐步梯度稀释至 5、0.5、0.05、0.005 $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 于 4 支无热原试管中。

表 1 工作标准品系列溶液的制备

Tab. 1 Preparation of working standard series solutions

试剂盒 (test kit)	细菌内毒素工作标准品溶液浓度 (concentration of bacterial endotoxin standards) / ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细菌内毒素检查用水添加量 (bacterial endotoxin test water addition) / mL	细菌内毒素工作标准品溶液添加量 (addition of endotoxin standards solution) / mL
ENDONEXT	50	0.9	0.1 ($500 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	5	0.9	0.1 ($50 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.5	0.9	0.1 ($5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.05	0.9	0.1 ($0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
PyroGene™ Recombinant Factor C	5	0.75	0.25 ($20 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.5	0.9	0.1 ($5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.05	0.9	0.1 ($0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.005	0.9	0.1 ($0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.1.4 干扰试验供试品溶液制备 按照表 2 进行制备, 其中 ENDONEXT 试剂盒和 PyroGene™ Recombinant Factor C 分别选择 60 倍稀释和 600 倍稀释的供试品溶液作为系列 A, 含有细菌内毒素浓度

为 $5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液作为系列 B; 取表 1 中各试剂盒对应的细菌内毒工作标准品系列溶液作为系列 C, 取细菌内毒素检查用水作为系列 D。

表 2 干扰试验供试品溶液制备

Tab. 2 Preparation of test solution for interference test

编号 (number)	细菌内毒素浓度 (bacterial endotoxin concentration)	添加细菌内毒素的溶液 (solution to which bacterial endotoxin has been added)	平行试样 (number of parallel samples)
A	未添加 (none)	供试品溶液 (test solution)	至少 2 个平行 (at least two parallels)
B	标准曲线中点或靠近中点的浓度 (设为 λ_m) (concentration at or near the midpoint of the standard curve set as λ_m)	供试品溶液 (test solution)	至少 2 个平行 (at least two parallels)
C	至少 3 个浓度 (浓度最低点为 λ) (at least 3 concentrations and the lowest point set as λ)	细菌内毒素检查用水 (water for BET)	每个浓度至少 2 个平行 (at least two parallel per concentrations)
D	未添加 (none)	细菌内毒素检查用水 (water for BET)	至少 2 个平行 (at least two parallels)

2.2 操作步骤

2.2.1 ENDONEXT 试剂盒 在每个试样孔中加入供试品溶液 $100 \mu\text{L}$ 然后再加入结合液 $20 \mu\text{L}$, 用封板膜封板后在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度连续震荡

温育 120 min。启动酶标仪, 确保工作温度在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。温育后快速翻转 96 孔板, 将液体倒出。用纸巾小心地拍干 96 孔板, 使用移液枪向每个孔中添加洗涤液 $150 \mu\text{L}$, 放置 1 min, 倒出。重复清洗 2 次。

底物试剂制备:提前取出各试剂,使其温度平衡至室温;按照 1:1 的比例混合分析缓冲液(AB)、底物(SUB)、酶(ENZ),轻轻地充分混合,切勿旋涡混合。

检测步骤:准备足量的底物试剂,向每个试样孔中底物试剂。将 96 孔板放入酶标仪,等待 1 min,以调整温度。读取时间点 0 处的荧光值,记为 RFU₀。在酶标仪中 37 °C 下温育 90 min 后读取荧光值记为 RFU₉₀。仪器参数设置:激发波长 380 nm,发射波长 445 nm,温度 37 °C。

按公式 $\log(\Delta\text{RFU})=\log(\text{RFU}_{90}-\text{RFU}_0)$ 计算,再以细菌内毒素工作标准品溶液浓度的对数为横坐标,净 ΔRFU 的对数为纵坐标绘图并进行线性拟合, $\log(\Delta\text{RFU})=A\log C+B$ 。其中 A 为线性回归方程斜率;B 为线性回归方程截距;C 为细菌内毒素浓度; ΔRFU 表示反应终点荧光值与 0 点荧光值的差值。

2.2.2 PyroGene™ Recombinant Factor C 试剂盒 底物试剂制备:提前 30 min 取出各试剂,使其温度平衡至室温,按照 5:4:1 的比例混合 Fluorogenic Substrate、rFC Assay Buffer、rFC Enzyme Solution,轻轻地充分混合,切勿旋涡混合。

检测步骤:在每个试样孔中加入 100 μL 供试品,在 37 °C ± 1 °C 的酶标仪中预热 10~20min,向每个试样孔中添加 100 μL 底物试剂。底物试剂加入后立即读取时间点 0 小时的荧光值记为 RFU₀。将微孔板放在 37 °C ± 1 °C 的酶标仪中,孵育 60 min 后进行时间点 60 min 的荧光值读数记为 RFU₆₀。采用 380 nm 作为激发波长,440 nm 作为发射波,温度 37 °C 进行孵育。

按公式 $\log(\Delta\text{RFU})=\log(\text{RFU}_{60}-\text{RFU}_0)$ 计算,再以细菌内毒素工作标准品溶液浓度的对数为横坐标,

净 ΔRFU 的对数为纵坐标绘制曲线图并进行线性拟合, $\log(\Delta\text{RFU})=A\log C+B$ 。

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线可靠性试验 将内毒素工作标准品用无热原水稀释成系列浓度标准溶液,按照“2.2”项下操作步骤进行测定,以 $\log\Delta\text{RFU}$ 对细菌内毒素浓度的对数值进行线性拟合并计算。

2.3.2 初筛试验 将供试品用无热原水稀释成系列浓度供试品溶液,按照“2.2”项下操作步骤进行测定并以 $\log\Delta\text{RFU}$ 对细菌内毒素浓度的对数值进行线性拟合并计算。

2.3.3 干扰试验 按照“2.1.4”项下方法准备好干扰试验样品,按照“2.2”项下步骤进行测定,以 $\log\Delta\text{RFU}$ 对细菌内毒素浓度的对数值进行线性拟合并计算。

2.3.4 统计分析 标准曲线可靠性试验中当阴性对照的荧光值低于标准曲线最低点的荧光值,将全部数据进行线性回归分析。根据线性回归分析,标准曲线的相关系数(*r*)的绝对值应大于或等于 0.980 时表明试验方法有效。干扰试验中当细菌内毒素的回收率在 50%~200% 时,则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。

3 实验结果

3.1 标曲可靠性试验结果

ENDONEXT 和 PyroGene™ Recombinant Factor C 2 个试剂盒标准曲线可靠性试验线性回归结果如图 1 所示,试验结果见表 3,结果显示 2 个试剂盒阴性对照的荧光值低于标准曲线最低点的荧光值,线性相关系数均 > 0.980,重复性 RSD 均小于 3%,标准曲线可靠性试验结果稳定。

表 3 标准曲线可靠性试验结果

Tab. 3 Results of standard curve reliability test

试剂盒 (test kit)	标准曲线 (standard curve) $\log(\Delta\text{RFU})=A\log C+B$	<i>r</i>	RSD	线性范围 (linear range)/ EU · mL ⁻¹	阴性对照荧光值 (negative control) /RFU	标准曲线最低点荧光值 (lowest point of the standard curve)/RFU
ENDONEXT	$Y=0.801\ 9X+4.374\ 1$	0.997 1	0.54	0.05~50	2 619	3431
	$Y=0.777\ 2X+4.393\ 3$	0.997 0			1 723	3607
	$Y=0.759\ 2X+4.536\ 3$	0.992 4			2 351	4364
PyroGene™ Recombinant Factor C	$Y=1.071\ 4X+5.438\ 1$	0.997 3	0.61	0.005~5	19 378	22 183
	$Y=1.032\ 6X+5.451\ 1$	0.991 3			19 183	29 092
	$Y=1.051\ 3X+5.502\ 4$	0.994 5			18 732	31 137

3.2 初筛试验结果

对注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液逐步进

行稀释,稀释过程中回收率逐渐提高说明干扰明显减小,且 ENDONEXT 和 PyroGene™ Recombinant Factor

C 2 个试剂盒分别在 60 倍稀释和 600 倍稀释下回收率均符合 50%~200%, 试验结果见表 4。最终选择 60

倍和 600 倍稀释作为注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液的最佳稀释倍数。

表 4 初筛试验结果

Tab. 4 Preliminary screening test results

试剂盒 (test kit)	批号 (sample batch number)	稀释倍数 (dilution multiple)	加入内毒素浓度 (addition of endotoxin concentration)/ (EU · mL ⁻¹)	供试品溶液内毒素含量 (endotoxin content of test solutions)	含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量 (endotoxin content of test solutions containing standard endotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/%
ENDONEXT	20201002	20	5	N/A	4.0	80.2
		40	5	N/A	3.4	68.8
		60	5	N/A	6.2	124.2
PyroGene TM Recombinant Factor C	20201002	200	0.5	N/A	0.19	38.4
		400	0.5	N/A	0.24	47.4
		600	0.5	N/A	0.35	70.0

3.3 干扰试验结果

采用 ENDONEXT 和 PyroGeneTM Recombinant Factor C 2 个试剂盒分别进行 3 次重复测定, 试验结果见表

5。结果表明在干扰试验过程中, 2 种试剂盒的细菌内毒素的回收率均在 50%~200%, 在此实验条件下供试品溶液不存在干扰作用。

表 5 干扰试验结果

Tab. 5 Interference test results

试剂盒 (test kit)	批号 (sample batch number)	稀释倍数 (dilution multiple)	加入内毒素浓度 (addition of endotoxin concentration)/ (EU · mL ⁻¹)	供试品溶液内毒素含量 (endotoxin content of test solutions)	含标准内毒素的供试品溶液中的内毒素含量 (endotoxin content of test solutions containing standard endotoxin)/ (EU · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/%
ENDONEXT	20201002	60	5	N/A	7.88	157.6
				N/A	6.97	139.5
				N/A	6.22	124.2
	20201003	60	5	N/A	6.34	126.7
				N/A	4.51	90.1
				N/A	6.86	136.8
	20201101	60	5	N/A	6.84	136.8
				N/A	4.74	94.9
				N/A	7.12	142.3
PyroGene TM Recombinant Factor C	20201002	600	0.5	N/A	0.45	90.6
				N/A	0.35	70.0
				N/A	0.45	89.3
	20201003	600	0.5	N/A	0.36	71.0
				N/A	0.32	63.6
				N/A	0.31	61.5
	20201101	600	0.5	N/A	0.52	105.2
				N/A	0.33	66.7
				N/A	0.38	75.3

3.4 样品测定结果

试验考察结果表明 ENDONEXT 和 PyroGeneTM

Recombinant Factor C 2 个试剂盒经验证, 标准曲线的浓度点 ≥ 3 个; 阴性对照值的 Δ RFU 均低于标准曲

线最低点的 Δ RFU; 线性相关系数 $|r| > 0.980$; 细菌内毒素回收率在 50%~200%, 2 个试剂盒的标准曲线可靠性试验、初筛试验以及干扰试验均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》细菌内毒素检查法验证标准。可采用经验证的这 2 种试剂盒对注射用重组 III 型人源化胶原蛋白溶液在 60 倍稀释和 600 倍稀释的条件下进行细菌内毒素检查。现分别对 3 批次供试品细菌内毒素进行 3 次重复试验测定, 测定结果见表 6。结果表明, 在该试验温度下, 供试品溶液中所有平行管的平均内毒素含量乘以溶液稀释倍数计算所得的细菌内毒素检测结果低于测定试剂盒标准曲线的最低点 (ENDONEXT 和 PyroGene™ Recombinant Factor C 标准曲线的最低点分别为 $< 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $< 0.005 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 符合供试品细菌内毒素标准要求 ($< 6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

表 6 供试品检测结果

Tab. 6 Test results of the sample

试剂盒 (test kit)	批号 (sample batch number)	稀释倍数 (dilution multiple)	检测结果 (test result) / ($\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
ENDONEXT	20201002	60	< 0.05
			< 0.05
			< 0.05
	20201003	60	< 0.05
			< 0.05
			< 0.05
PyroGene™ Recombinant Factor C	20201101	60	< 0.05
			< 0.05
			< 0.05
	20201002	600	< 0.005
			< 0.005
			< 0.005
20201003	600	< 0.005	
		< 0.005	
		< 0.005	
20201101	600	< 0.005	
		< 0.005	
		< 0.005	

4 讨论与结论

目前, 鲎作为国家珍稀动物, 保护力度逐渐加大, 为了减少鲎试剂的使用并且满足一些特殊产品细菌内毒素检查的需求, 除了传统的凝胶法、光度法外, 重组 C 因子法、重组级联试剂显色法等新的细菌内毒素检测方法不断出现, 在 2020 年版《中华人民共和国

药典》中 (9251 细菌内毒素检查法应用指导原则) 也收录了重组 C 因子法。C 因子是一种具有特异性的蛋白对细菌内毒素敏感, 它存在于鲎试剂中, 当与含有细菌内毒素的产品反应时, 可以选择性地识别到细菌内毒素。而重组 C 因子是采用基因重组的方式表达的 C 因子重组蛋白 (recombinant factor C, rFC) 当测定存在细菌内毒素的样品时, 细菌内毒素会与重组 C 因子结合并使得重组 C 因子获得游离的荧光基团, 可以通过反应混合物中的细菌内毒素含量与其孵育结束后的荧光数值之间存在的定量关系来确定细菌内毒素的含量, 该技术可对相应的产品中细菌内毒素含量进行定量检测, 定量检测的数据可以用来分析产品测定结果的趋势, 追踪产品质量及评估工艺的稳定性, 起到产品质量风险的监测、预警的作用, 还可为产品在生产工艺过程中的污染风险评估提供有效数据。

在细菌内毒素检测领域, 重组 C 因子法因其广泛的适用性和高灵敏度而受到青睐。与传统的凝胶法相比, 重组 C 因子法能够通过回收率分析来揭示产品的干扰趋势。得益于其宽广的标准曲线范围, 该方法允许对干扰样本进行稀释, 以降低干扰。随着回收率的逐步提升, 表明产品干扰逐渐减少, 从而帮助确定最佳的稀释倍数。这一特性对于处于检验技术研发阶段的企业来说, 尤其具有优势。与动态显色法相比, 重组 C 因子法在准确度、精密性、专属性和耐用性方面表现更为出色^[18-19]。重组 C 因子法不会与 β 葡聚糖发生反应, 而动态显色法则会, 这表明在特定条件下, 重组 C 因子法具有更高的专属性。因此, 对于那些使用凝胶法无法消除干扰的样本, 或者存在 β 葡聚糖干扰的样本。重组 C 因子法是一个值得考虑的选择。不同生产厂家在设计生产试剂盒时灵敏度和抗干扰能力不同, 在实际检测中, 最大稀释倍数需要根据标准曲线最低点灵敏度进行调整; 在初筛试验中 ENDONEXT 试剂盒在 20、40、60 的稀释倍数下回收率均在 50%~200%, PyroGene™ Recombinant Factor C 试剂盒在 200、400 倍的稀释倍数下回收率小于 50%, 600 倍的稀释倍数下回收率在 50%~200%, 2 个试剂盒不同稀释倍数下回收率的差异, 表明 ENDONEXT 试剂盒的抗干扰能力更强。

在胶原蛋白表达系统中, 大肠杆菌表达系统是最早被研究的, 也是目前最成熟的表达系统之一, 以其快速的细胞繁殖, 高产出以及 IPTG 诱导表达的简

便性而成为生产重组蛋白的常用系统^[20-21]。然而,该系统可能会产生内毒素等致热源,并且大肠杆菌本身含有可能会混入最终产品的内毒素和有毒蛋白^[22]。因此,在胶原蛋白生产过程中,去除细菌内毒素至关重要。

本实验选取了使用大肠杆菌表达系统生产的注射用重组Ⅲ型人源化胶原蛋白溶液作为研究对象,具有一定的代表性,经验证,重组 C 因子法在测定该产品时结果均能满足 2020 年版《中华人民共和国药典》规定,说明重组 C 因子法可应用于注射用重组Ⅲ型人源化胶原蛋白溶液。

本研究为生产企业在产品细菌内毒素质量控制方面提供新的方法,并为新产品应用提供了数据支持。

参考文献

- [1] GU L, SHAN T, MA YX, *et al.* Novel Biomedical applications of crosslinked collagen [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37 (5): 464
- [2] CHEN ZY, FAN DD, SHANG LJ. Exploring the potential of the recombinant human collagens for biomedical and clinical applications: a short review [J]. *Biomed Mater*, 2020, 16 (1): 12001
- [3] RAMSHAW JA, PENG YY, GLATTAUER V, *et al.* . Collagens as biomaterials [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, 20 (Supp1 1): S3
- [4] LEVIN J, BANG FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood [J]. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 1964, 115: 265
- [5] LEVIN J, BANG FB. Clottable protein in limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin [J]. *Thromb Diath Haemorrh*, 1968, 19 (1): 186
- [6] MUTA T, ODA T, IWANAGA S. Horseshoe crab coagulation factor B: a unique serine protease zymogen activated by cleavage of an Ile-Ile bond [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (28): 21384
- [7] IWANAGA S, KAWABATA S, MUTA T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions [J]. *J Biochem*, 1998, 123 (1): 1
- [8] LOVEROCK B, SIMON B, BURGENSEN A, *et al.* A recombinant factor C procedure for the detection of gram-negative bacterial endotoxins [J]. *Pharmacop Forum*, 2010, 36 (1): 321
- [9] TINDALL B, DEMIRCIOGLU D, UHLIG T. Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution [J]. *Biotechniques*, 2021, 70 (5): 290
- [10] BOLDEN J, SMITH K. Application of recombinant factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2017, 71 (5): 405
- [11] BOLDEN J, KNUTSEN C, LEVIN J, *et al.* Currently available recombinant alternatives to horseshoe crab blood lysates: are they comparable for the detection of environmental bacterial endotoxins? a review [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2020, 74 (5): 602
- [12] ABATE W, SATTAR AA, LIU J, *et al.* Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay [J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66 (7): 888
- [13] 裴宇盛, 蔡彤, 陈晨, 等. 中国药典 2020 年版细菌内毒素检查法补充方法应用研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (6): 822
PEI YS, CAI T, CHEN C, *et al.* Study on the application of supplementary methods of bacterial endotoxin test in Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39 (6): 822
- [14] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 178
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 178
- [15] 裴宇盛, 蔡彤, 高华. 细菌内毒素检查新方法进展 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34 (3): 392
PEI YS, CAI T, GAO H. Progress on new methods of bacterial endotoxin test [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34 (3): 392
- [16] CAI T, PEI YS, CHEN C, *et al.* Establishment of the 8th national standard of endotoxin [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2017, 26 (10): 771
- [17] 裴宇盛, 蔡彤, 陈晨, 等. 重组 C 因子法检测细菌内毒素的方法适用性研究 [J]. *中国药业*, 2019, 28 (7): 19
PEI YS, CAI T, CHEN C, *et al.* Study on the applicability of recombinant factor C method for detection of bacterial endotoxin [J]. *China Pharm*, 2019, 28 (7): 19
- [18] 裴宇盛, 蔡彤, 陈晨, 等. 细菌内毒素重组 C 因子检测方法的验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33 (1): 76
PEI YS, CAI T, CHEN C, *et al.* Validation of a determination method for recombinant factor C of bacterial endotoxin [J]. *Chin J Biol*, 2020, 33 (1): 76
- [19] 隋馨, 叶晓燕, 黄麒麟, 等. 重组 C 因子细菌内毒素检测法应用于医疗器械的建议 [J]. *中国医疗器械信息*, 2023, 29 (7): 27
SUI X, YE XY, HUANG QY, *et al.* Suggestion on application of recombinant c factor bacterial endotoxin assay to medical devices [J]. *China Med Device Inf*, 2023, 29 (7): 27
- [20] 苏鹏, 龚国利. 重组蛋白表达技术的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2016, 35 (10): 9
SU P, GONG GL. Research progress of recombinant protein expression technology [J]. *China Brew*, 2016, 35 (10): 9
- [21] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略 [J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43 (9): 33
MAO CY, DU L, WANG JQ, *et al.* Soluble expression strategy of recombinant protein in *Escherichia coli* system [J]. *China Biotechnol*, 2023, 43 (9): 33
- [22] WILKE K, MAMAT U, BRAMHILL D, *et al.* Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins [J]. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 57

(本文于 2024 年 8 月 8 日收到)