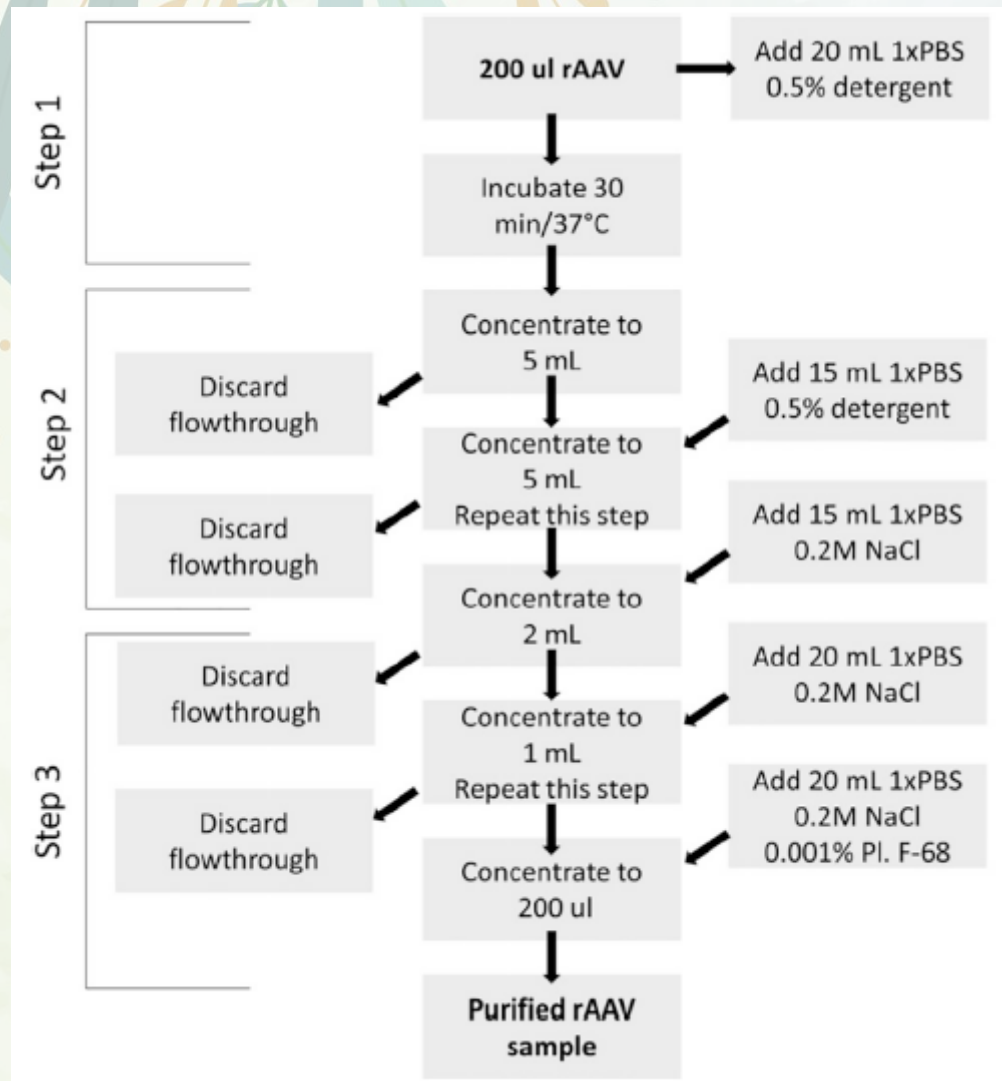


基因工程產品的 內毒素去除方法

基因工程產品的內毒素去除方法

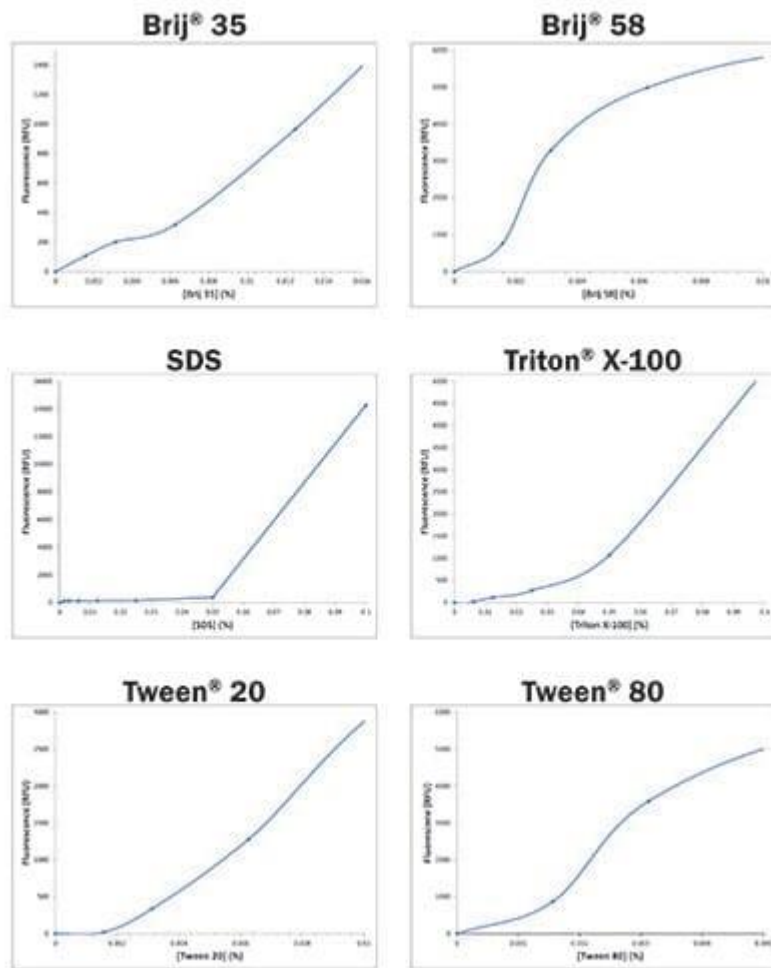
內毒素是一種存在於革蘭氏陰性菌外膜的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)，由 O-antigen、core oligosaccharide 和 lipid A 組成。雖然 LPS 對細菌來說主要是作為保護作用和組成結構，但對於生物體會引起發燒、腹瀉甚至死亡，因此目前對用於治療的相關藥物、器具及耗材都被認定需要做內毒素控管。LPS 在結構特性上是具有淨負電荷的化學穩定分子，可以抵抗高壓、極端溫度和 pH 值，單體的分子量為 10-20 kDa，在水溶液中，尤其當二價陽離子存在時，如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ，可形成穩定的聚集體 (Micelles)。當洗滌劑 (Detergent) 存在時，有助於將 LPS 聚集體分解成更小的結構 (sub-units)，是目前針對蛋白質樣品最常使用的 LPS 去除方法。然而當洗滌劑存在時，除了會影響樣品的純度與效能，可能會導致後續對於內毒素含量分析時的干擾，因此如何以最少量的去汙劑有效達到去除 LPS，成為製程上的一個重要的衡量因素。

Adeno-associated virus (AAV) 是一種將單鏈 DNA (ssDNA) 基因組整合到蛋白質外殼中的病毒，常用於將特定 DNA 遞送至目標細胞的基因工程試驗，被認為是基因治療最安全的策略之一。不過在整個試驗的過程中，非常容易受到來自一般實驗材料、環境中 LPS 污染，及最直接的是來自 *E. coli* 純化出的 plasmid DNA。在文獻中顯示，以含有 0.5% 洗滌劑 (Triton X-100 or Na-DC) 並且經 37 °C 預熱的 PBS 緩衝液，混合樣品後在 37 °C 持續作用 30 分鐘，達 2 次處理，有助於將 LPS 從中分離。接著以高鹽 (0.2M NaCl) 緩衝液進行清洗殘留的洗滌劑達 3 次，以 100 k 的濃縮管 (Sartorius # VS2042) 在轉速 2,000 $\times g$ 下收集 AAV。此流程有助於將 LPS 從大約 1,000 EU/mL 降低到低於 2.5 EU/mL 的含量。



圖一 Recombinant AAV樣品的LPS去除流程

在整個洗滌過程中，使用CMC-535™ Detergent Assay (G-Bioscience)進行洗滌劑定量，由於與 CMC-535™螢光染劑的相互作用，導致螢光信號的增強會與洗滌劑濃度成正比。此外該測定法與大多數水性緩衝液兼容，僅對於含有磷酸鹽的緩衝液除外，包括釋放磷酸鹽的分子(即 ADP 和 ATP)。因此在文獻中改以乳酸林格溶液 (Lactated Ringer' s Solution)代替PBS緩衝液進行洗提流程，並且以Triton X-100在280 nm下的吸收特性去評估與定量，同時搭配標準稀釋曲線0.1%-0.0016%在 PBS-0.2 M NaCl 的控制組測定。發現在此洗滌流程之後，樣品中的Triton X-100殘留濃度低於 0.00003%，遠小於造成細胞毒性的濃度0.009% (0.15 mM)。



圖二 CMC-535™ Aaasy (G-Bioscience)是常用於洗滌劑(Detergent)定量分析的方法

內毒素的去除總是需要仰賴一系列的處理流程, 其中”各種類型的洗滌劑”是最常用到的方式, 為避免過多的洗滌劑殘留影響產品品質, 以最少量及最簡易的流程, 從源頭端降低使用量的方法是最有效的, 而這同時也有助於去除後續對內毒素檢測的干擾。