

技术与方法

一种适用于AAV病毒包装的低内毒素质粒提取方法

何金声 陆艺桢 张玉雪 韦雅露 高浩坤 何榕晏 长孙东亭 罗素兰*

(广西特色生物医药重点实验室, 广西大学医学院, 南宁 530004)

摘要 该研究旨在建立一种适用于腺相关病毒载体包装的低成本、高效率的转染用低内毒素质粒提取方法。基于相分离的浊点萃取原理, 对传统碱裂解缓冲液体系进行优化, 整合了裂解液与内毒素清除剂, 简化了操作流程。通过吸光度检测、酶切与琼脂糖凝胶电泳分析、鲎试剂检测、实时荧光定量PCR方法, 综合评价所提取质粒的质量、内毒素残留水平与生物学活性, 并与商品化试剂盒进行对比。结果表明, 该方法质粒产率较高, 纯度、序列完整性良好, 内毒素残留低于1 EU/ μ g, 可满足病毒包装需求, 所制备病毒在体外具备良好活性; 该方法每次提取操作中内毒素清除成本与商品化内毒素清除剂相比下降85%以上, 且可减少提取时间30 min。该方法在保证质粒质量的同时显著简化操作流程, 对腺相关病毒载体的生产具有较高的实用价值和推广潜力。

关键词 质粒提取; 内毒素; 浊点萃取; 曲拉通X-114; 腺相关病毒

An Optimized Low-Endotoxin Plasmid Extraction Method for AAV Vector Packaging

HE Jinsheng, LU Yizhen, ZHANG Yuxue, WEI Yalu, GAO Haoshen, HE Rongyan, ZHANGSUN Dongting, LUO Sulan*
(Guangxi Key Laboratory of Special Biomedicine, School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract This study aimed to establish a low-cost, high-efficiency, transfection-grade plasmid extraction method with low endotoxin levels, suitable for AAV (adeno-associated virus) vector packaging. Based on the principle of phase separation via cloud point extraction, the traditional alkaline lysis buffer system was optimized by integrating lysis and endotoxin removal into a simplified workflow. The quality, endotoxin level, and biological activity of the extracted plasmids were comprehensively evaluated using UV spectrophotometry, restriction enzyme digestion, agarose gel electrophoresis, limulus amoebocyte lysate assay, and quantitative real-time PCR. The performance of the method was also compared with that of commercial plasmid purification kits. The results demonstrated that this method yields plasmids with high productivity, good purity, and intact sequences, with endotoxin residues below 1 EU/ μ g, meeting the requirements for AAV packaging. The resulting AAV vectors exhibited good *in vitro* activity. Notably, the cost of endotoxin removal per extraction representing a reduction of over 85% compared

收稿日期: 2025-05-07

接受日期: 2025-05-21

广西重点研发计划“带土移植”人才引进计划(批准号: 桂科AA25069003)、广西自然科学基金重点项目(批准号: 2024GXNSFDA999003)、国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(批准号: 2022YFE0132700)、国家自然科学基金重点国际合作项目(批准号: 82320108019)和国家自然科学基金(批准号: 42376112、82360698)资助的课题

*通信作者。Tel: 0771-3949335, E-mail: sulan2021@gxu.edu.cn

Received: May 7, 2025

Accepted: May 21, 2025

This work was supported by the “Dai Tu Yi Zhi” Project of Key R&D Program of Guangxi (Grant No. GUIKE AA25069003), the Key Project of Natural Science Foundation of Guangxi (Grant No. 2024GXNSFDA999003), the Major Intergovernmental Joint Research Project of National Key R&D Program of China (Grant No. 2022YFE0132700), the Major International Joint Research Project of National Natural Science Foundation of China (Grant No. 82320108019) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 42376112, 82360698)

*Corresponding author. Tel: +86-771-3949335, E-mail: sulan2021@gxu.edu.cn

to commercial reagents, and the protocol shortened the extraction time by approximately 30 min. This method significantly simplifies the operation while ensuring plasmid quality and offers practical value and broad applicability for AAV vector production.

Keywords plasmid extraction; endotoxin; cloud point extraction; Triton X-114; adeno-associated virus

内毒素(endotoxin), 是革兰氏阴性细菌在生长过程中或死亡后释放到环境中的一类物质, 来源于细菌的细胞壁, 其化学本质是一类分子量为10~20 kDa的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 具有强烈的免疫原性。LPS的结构由疏水性的脂质A与亲水性的多糖链组成, 不同的菌株产生的LPS, 其多糖链复杂多样, 而脂质A的核心构成则相对保守。其中, 脂质A以磷酸化的N-乙酰氨基葡萄糖二聚体为骨架, 连接有6~7条饱和脂肪酸侧链, 是内毒素的毒性来源基团, 能够激活宿主免疫系统; 多糖链又分为核心寡糖链及O-特异性多糖链两部分, 后者的功能与细菌的免疫逃逸能力有关, 也是菌株血清型的判断依据^[1], 根据其有无, 可将LPS进一步分为包含O-特异性多糖链的光滑型与缺失的粗糙型两类。内毒素进入体内后, 首先由脂多糖结合蛋白呈递至分化簇14(cluster of differentiation 14, CD14), 再由CD14呈递至Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4), 其共受体骨髓分化因子-2(myeloid differentiation factor-2, MD-2)直接识别并结合脂质A结构, 引发TLR4二聚化, 进而激活下游信号通路, 促使细胞产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子, 启动强烈的免疫应答^[2]。在生物体内, 内毒素可引起一系列炎症反应, 包括发热、血压下降、免疫抑制等, 严重时可引发脓毒症、全身炎症反应综合征甚至器官衰竭^[3], 注射给药时5 EU(内毒素计量单位, 每EU相当于0.1 ng)的内毒素即有可能引发致命性副反应^[4]。在生物制品的生产过程中, 内毒素的检测十分复杂, 且易受到多种因素干扰^[5], 内毒素清除的操作则往往伴随着产率损失^[6]。而在分子生物学与细胞生物学实验中, 内毒素的清除也显得尤为重要。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)属于细小病毒科依赖病毒属, 是一种无包膜、单链DNA病毒^[7]。AAV因其独特的低免疫原性、安全性、良好的感染效率和较为持久的基因表达能力, 逐渐被开发为一种极具前景的基因递送载体, 在分子生物学、药理学研究和基因治疗中受到广泛关注。重

组腺相关病毒(recombined adeno-associated virus, rAAV)是由腺相关病毒进行改造而得的工具病毒, 其对野生型AAV的基因组加以改造, 仅保留ITR序列、编码衣壳蛋白及负责复制组装的序列, 并将其分割为多个质粒, 包装完成后的rAAV颗粒只具有感染细胞和表达外源基因的能力, 不能在宿主细胞内自主复制, 亦失去了整合能力, 安全性有了进一步提升。在rAAV的改造中, 通过对病毒衣壳蛋白的突变, 开发出了多种不同血清型的rAAV, 使之能够靶向特定组织部位递送目的片段, 极大提升了rAAV的应用价值^[8]; 同时, 由于rAAV的细胞毒性较小, 基因组结构稳定, 在动物体内感染后, 导入的基因可维持较长时间的表达^[9], 因而在基因编辑、基因治疗等方面获得了广泛应用^[10]。

目前, 基于HEK-293细胞平台的三质粒共转染包装法是运用最为广泛的rAAV包装系统, 其核心工艺为将2种辅助质粒与携带插入序列的重组载体质粒利用脂质体或PEI等试剂转染入HEK-293细胞中, 进而在细胞中包装病毒颗粒^[11]。这一工艺需要使用大量的转染级质粒, 而质粒中的内毒素残留水平会对rAAV载体的生产与体内表达效率造成影响。有研究认为, 低内毒素水平的质粒不仅可以提升转染与病毒包封效率, 更能降低rAAV制剂在体内的免疫原性, 进而提升基因递送的效率^[12]。同时, 在rAAV包装时引入的内毒素会残留至病毒下游纯化阶段, 需要增加专门的内毒素清除与检测步骤以满足生物制品安全性相关规定^[13]。以上研究充分表明, 控制质粒内毒素残留水平对病毒载体的生产具有明显的意义。

随着基因编辑、基因治疗的研究与应用不断推广, rAAV相关研究得到了越来越多的重视, 与之相伴的, 对于低内毒素质粒的需求也不断增加。目前, 基于两亲性表面活性剂的内毒素清除剂及与之配套的试剂盒是实验室提取低内毒素质粒的主流工具, 但其操作相对繁琐, 提取过程包含悬浮菌体、碱裂解、酸中和沉淀、离心分离、低温内毒素吸附、水浴加热分相、离心分离、异丙醇疏水、柱吸附、洗脱等步骤, 其中内毒素的清除需要反复降温升温, 操

作繁琐费时,对质粒的产率及拓扑构象均存在不利影响^[14]。本研究设计了优化的低内毒素质粒提取方案,通过引入优化型碱裂解液IIT,将传统的碱裂解法中的裂解与内毒素抽提步骤归并,无需水浴加热,大幅简化了低内毒素质粒的提取工艺,同时提高了超螺旋质粒占比,内毒素残留水平及各项质量指标与商品化无内毒素质粒大规模提取试剂盒相当,且成本较为低廉,有利于推进rAAV相关研究。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞与引物

本实验所用pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1质粒、pAAV-ZsGreen1质粒、AAV-293细胞由广西特色生物医药重点实验室提供,ND7/23大鼠/小鼠神经元融合细胞系由中国科学院分子细胞科学卓越创新中心提供。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂耗材包括:限制性内切酶*Sma* I(货号:1629)、RNAiso Plus试剂(货号:9109)、DL 10 000 DNA Marker(货号:3584A)购自宝日医生物技术(北京)有限公司;无内毒素质粒大提试剂盒(货号:DC202)、cDNA逆转录预混液(HiScript III RT SuperMix for qPCR)(货号:R212)、染料法qPCR预混液(ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)(货号:Q711)、胎牛血清(货号:F102)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DMEM高糖细胞培养液(货号:G4511)、L-谷氨酰胺溶液(货号:G4211)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;PEI Max转染试剂(货号:19850)购自美国Polyscience公司;凝胶法萤试剂(货号: BK-T04)购自湛江博康海洋生物有限公司;Triton

X-114(货号:T818622)购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

主要仪器包括:低温冷冻离心机(日本Hitachi公司)、微量紫外可见分光光度计(美国DeNovix公司)、水平电泳系统(美国Bio-Rad公司)、倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)、实时荧光定量PCR仪(德国Analytik Jena公司)。

1.3 质粒提取方案优化

为探索含Triton X-114体系的浊点影响因素,改善相分离条件,优化去内毒素质粒大规模流程,基于脂肪醇及盐离子浓度对浊点会造成显著影响的原理,设计了异丙醇浓度不同的、含Triton X-114的裂解液II体系,具体配比如表2所示。

取0.25 mL裂解液I、0.5 mL裂解液II、0.25 mL裂解液III,混合后于室温、6000 ×g下离心1 min,将上清液收集至新离心管中,转移至恒温循环水浴锅中,由4 °C至40 °C,以1 °C为梯度,对各组模拟裂解液浊点进行测定,根据测定结果对裂解液体系进行优化选择。

1.4 质粒提取与质量检测

试剂盒法提取流程参照说明书进行,优化的碱裂解法提取流程如下。优化型裂解液IIT的配比为:30 g/L Triton X-114,10 g/L SDS,10%(V/V)异丙醇,0.2 mol/L NaOH。裂解液I、裂解液III及清洗液WB与传统碱裂解法或商品化试剂盒相同。

取1 L经过夜培养的、含有目标质粒的DH5α工程菌菌液,将其平均分为4份,以250 mL菌液作为1次提取反应,进行质粒提取。菌液于室温、3 000 ×g离心5 min收集菌体,使用STE缓冲液洗涤菌体后,以相同条件再次离心。向菌体中加入10 mL裂解液I,涡旋分散,插入冰浴中预冷。加入20 mL预冷的裂解液

表1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

基因及登录号 Gene and NCBI accession No.	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length /bp
<i>Chrna6</i> (NM_057184.2)*	F: ACT CTT CGC CCA CTA CAA CC R: CTG TAG TCC TTC CAG ACG TGA	163
<i>Actb</i> (NM_031144.3)*	F: GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT G R: CCA CCG ATC CAC ACA GAG TAC TT	98
CMV promoter (KC152484.1)*	F: TTC CTA CTT GGC AGT ACA TCT ACG R: GTC AAT GGG GTG GAG ACT TGG	127

*: 登录号来自NCBI数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)。
*: accession numbers are from NCBI database (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

表2 裂解液II异丙醇浓度梯度体系配比
Table 2 Isopropanol concentration gradient in lysis buffer II

异丙醇比例 Isopropanol concentration	异丙醇/ μL Isopropanol / μL	200 g/L SDS / μL	10 mol/L NaOH / μL	100 g/L Triton X-114 / μL	水/ μL H_2O / μL
6%	30	25	10	150	270
8%	40	25	10	150	260
10%	50	25	10	150	250
12%	60	25	10	150	240
14%	70	25	10	150	230
16%	80	25	10	150	220
18%	90	25	10	150	210

IIT, 在冰浴中裂解 5 min, 期间数次颠倒振荡离心管使溶液充分混合。加入 10 mL 裂解液 III, 轻轻振荡混合均匀, 恢复至室温、溶液明显浑浊后, 于室温、 $9\,000\times g$ 离心 15 min。收集上清, 加入 0.5 倍体积的异丙醇混匀, 分批加入吸附柱中, 于室温、 $3\,000\times g$ 离心 2 min, 弃去所有滤过液。加入 8 mL 洗涤液 WB, 于室温、 $3\,000\times g$ 离心 2 min, 弃去滤过液, 重复洗涤离心 1 次, 将吸附柱置于超净台中风淋干燥 30 min, 令残留的乙醇完全挥发。在吸附膜的中间部位加入 1 mL 预热至 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的注射用水, 孵育 5 min 后, 于室温、 $3\,000\times g$ 离心 1 min, 将洗脱液加回吸附柱中, 重复洗脱 1 次, 收集合并洗脱液。使用微量紫外可见分光光度计对质粒样品进行吸光度 (D) 值检测, 通过 D_{260}/D_{280} 及 D_{260}/D_{230} 值判断质粒溶液中 RNA、无机盐、杂蛋白的残留情况。

1.5 质粒酶切检测

取相当于 1 μg DNA 的质粒溶液, 转移至 200 μL PCR 管中, 向其中加入 5 μL 10 $\times$ QuickCut Green 缓冲液, 1 μL 限制性内切酶 *Sma* I, 以去离子水稀释至 50 μL , 混匀后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 切割 1 h。在 1% 琼脂糖凝胶中对切割产物进行电泳分离, 对照 DNA Marker 及质粒图谱, 验证酶切效率。

1.6 质粒内毒素残留半定量检查

使用凝胶法鲎试剂对质粒溶液进行内毒素半定量检查, 检测限设置为 10 EU/ μg 、1 EU/ μg 、0.5 EU/ μg 、0.1 EU/ μg , 每组重复 2 管。在无内毒素安瓿瓶中, 利用内毒素检查用水对内毒素标准样品及供试品质粒溶液进行稀释, 配制 1 EU/mL 内毒素标准液以及 50 ng/ μL 、10 ng/ μL 、5 ng/ μL 、0.5 ng/ μL 供试质粒溶液。取灵敏度 0.5 EU/mL 的鲎试剂, 加入 0.1 mL 无菌注射用水充分溶解, 阳性对照组加入 0.1 mL 1 EU/mL 内毒素标准液, 阴性对照组加入 0.1 mL 内毒素检查

用水, 实验组加入 0.1 mL 经梯度稀释的供试质粒溶液, 轻轻混匀。用封口膜封闭安瓿瓶, 转移至金属浴中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。小心取出并倒转安瓿瓶, 观察凝胶形成情况, 如形成坚实凝胶、倒转后未出现滑脱, 则为阳性结果, 表明内毒素含量超限; 如未形成凝胶或凝胶松散, 则为阴性结果, 表明内毒素含量未超限。

1.7 细胞培养

AAV-293 细胞培养温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 二氧化碳浓度为 5%。待细胞生长至 80% 汇合后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化液于室温消化 30 s, 细胞悬液于室温、 $160\times g$ 离心 5 min, 吸去上层消化液后以完全培养基重悬细胞, 以 1:3 比例传代扩大培养。转染前 24 h, 将细胞消化、重悬、计数后, 向每个 9 cm 细胞培养皿中接种相当于 1×10^7 个细胞的细胞悬液, 转染当日, 细胞应达到 70% 汇合, 细胞量达到约每皿 2×10^7 个。

ND7/23 细胞是小鼠神经母细胞瘤和大鼠背根神经节神经元的杂交细胞株, 因其能够通过转染实现电压门控钠离子通道 Nav1.8^[15] 及 Nav1.9^[16] 的功能性异源表达, 从而成为了神经生理学研究的工具。ND7/23 细胞培养温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 二氧化碳浓度为 5%。待细胞生长至 80% 汇合后, 以移液器吹打脱离分散, 细胞悬液于室温、 $160\times g$ 离心 5 min, 吸去上层培养基后以完全培养基重悬细胞, 以 1:3 比例传代扩大培养。感染前 2 h, 使用 6 孔细胞培养板培养, 将细胞悬浮、计数后向每个孔中加入相当于 1×10^6 个细胞的悬浮液, 细胞自然贴壁后应达到 70% 汇合。

1.8 质粒转染效率检测

将 ND7/23 细胞培养板中旧培养基更换为 DMEM 高糖培养基, 取 1.5 μL 1 g/L PEI Max 溶液, 0.5 μg

目的质粒,分别以DMEM高糖培养基稀释后轻柔混合,于37℃孵育15 min后滴入孔板中,对两种方法提取的质粒进行转染。转染6 h后,将培养基更换为低血清维持培养基,继续培养48 h后,利用倒置荧光显微镜观察拍摄荧光情况,随机选取4个视野,对荧光面积进行分析。

1.9 腺相关病毒包装与滴度检测

将AAV-293细胞培养皿中培养基更换为经预热至37℃的DMEM高糖培养基。取81 μL 1 g/L PEI Max溶液,以DMEM高糖培养基稀释至500 μL,轻柔吹打混匀。按照摩尔比1:1:1的比例,取适量pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1质粒、pAdDeltaF6辅助质粒、pUCmini-iCAP-PHP.S辅助质粒溶液,使质粒总量为27 μg,混合后以DMEM高糖培养基稀释至500 μL,加入稀释的PEI Max溶液,轻柔吹打数次,于37℃孵育15 min后,将转染复合物分散滴入培养皿中,轻晃混匀。于37℃培养箱中孵育6 h后,将培养基更换为低血清维持培养基,培养72 h后收集病毒液,使用0.22 μm孔径水系微孔滤膜针式过滤器过滤,取样检测后按需分装。粗病毒液可直接感染细胞,或将其贮存于-80℃冰箱备用。

选取pAAV-ZsGreen1质粒(分子量 3.66×10^6 Da)作为质粒标准品,准确测定浓度后,梯度稀释为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/10 μL的标准溶液。取10 μL 2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、各1 μL 2.5 μmol/L CMV启动子上、下游引物(表1)溶液、1 μL质粒标准溶液、7.5 μL灭菌水,混合后进行qPCR扩增检测,循环程序为:95℃预变性5 min;98℃变性10 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环40次后使用qPCR仪默认程序进行熔解曲线分析。利用质粒拷贝数与扩增循环数进行拟合,建立病毒基因组标准曲线。将所获rAAV粗病毒液以核酸酶处理,消化外源核酸及未包封质粒,梯度稀释 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 倍后,依相同程序进行qPCR检测,根据扩增循环数与标准曲线计算粗病毒液病毒滴度。

1.10 腺相关病毒体外感染与表达效率检测

参考基于体外感染的AAV体外活性检测方法^[17],使用以两种提取方法所获质粒包装的、表达Zs-Green1绿色荧光蛋白报告基因及大鼠*Chrna6*基因的AAV-*Chrna6*病毒进行感染对比实验。将ND7/23细胞培养板中旧培养基更换为DMEM高糖培养基,按照病毒液滴度加入粗病毒液,轻轻摇晃培养板,令病毒与细胞充分接触。37℃培养箱中孵育6 h后,将培

养基更换为低血清维持培养基,继续培养48 h后取出,利用倒置荧光显微镜观察荧光情况,随机选取4个视野,对荧光面积进行分析。

参考RNAiso Plus提取试剂说明书,对感染后的ND7/23细胞进行总RNA提取,并通过微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳对总RNA浓度及质量进行测定。参照反转录试剂说明书,取相当于1 μg RNA的细胞总RNA溶液,加入4 μL 4× gDNA wiper Mix,以DEPC处理水补充至12 μL,于42℃孵育2 min,除去残留的细胞基因组DNA及质粒DNA后,加入4 μL 5× HiScript II qRT SuperMix II,混匀后于42℃孵育15 min,于85℃孵育5 s,进行反转录,所得cDNA用于qPCR检测。

取10 μL 2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、各1 μL 2.5 μmol/L上、下游引物(表1)溶液、0.5 μL cDNA模版、7.5 μL灭菌水,混合后进行qPCR扩增检测,循环程序为:95℃预变性5 min;98℃变性10 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环40次后使用qPCR仪默认程序测定熔解曲线。以大鼠*Actb*基因作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*Chrna6*基因相对表达量。

1.11 统计学分析

每组数据至少进行3次重复实验。使用ImageJ软件对荧光图像进行分析,使用GraphPad Prism 10软件,以*t*检验或单因素方差分析对所获结果数据进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为显著性差异结果,无显著性差异:ns;显著性差异:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。数据以平均值±标准误(mean±SEM)表示。

2 结果

2.1 质粒提取条件优化

模拟裂解液浊点测定结果如图1所示。由结果可知,在选取的异丙醇浓度范围内,模拟裂解液的浊点与裂解液II中异丙醇的比例呈线性正相关。考虑浊点变化、提取操作便利性等条件,最后确定改良型裂解液IIT的配比为:30 g/L Triton X-114、10 g/L SDS、10%(V/V)异丙醇、0.2 mol/L NaOH。该裂解液IIT与菌体混悬液混合后能在冰浴中维持两相融合状态,令内毒素脂多糖分子在释放后与表面活性剂分子快速结合;裂解菌体完成、加入裂解液III、体系温度恢复至15℃以上后,有机相与水相即可快速分离,实现在较低温度下内毒素的浊点萃取,并能

防止在离心过程中因温度下降而导致有机相与水相再次融合。同时由于水相中加入了密度较小的异丙醇,两相分离后的有机相密度显著大于水相,在离心后,有机相中的内毒素可以与杂蛋白、基因组DNA等杂质共同沉降除去。

2.2 质粒提取与质量检测

目标质粒的试剂盒法及优化碱裂解法大规模提取结果如表3所示,由吸光度结果可知,优化碱裂解法质粒产率高于试剂盒法,质粒的RNA残留水平、蛋白残留水平等纯度指标方面与试剂盒法相同。两种质粒的琼脂糖凝胶电泳分离结果如图2A、图2B所示,由电泳条带可见,优化碱裂解法提取质粒电泳条带以迁移率最高的超螺旋条带为主。优化碱裂解法提取所获质粒的*Sma* I酶切验证结果如图2C所示,pAAV-ZsGreen1-T质粒中含有2对紧邻的*Sma* I酶切位点,切割后产生2个分别为3 409 bp、2 681 bp的长片段及2个11 bp的短片段,由泳道5、6对比可见,环状质粒被切割成2个线性化片段,酶切完全,且条带位置与理论值相符;pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1-T质

粒中含有2对紧邻的*Sma* I酶切位点及1个单独的*Sma* I酶切位点,切割后产生3个分别为3 409 bp、2 681 bp、1 281 bp的长片段及2个11 bp的短片段,由泳道7、8对比可见,环状质粒被切割成3个线性化片段,酶切完全,且条带位置与理论值相符。以上结果表明,优化碱裂解法对质粒拓扑构象、酶切效率无不良影响。

经实际测定菌体裂解与内毒素清除部分操作时长,在处理1 L菌液时,试剂盒法耗时75 min,优化碱裂解法耗时45 min,后续吸附、洗脱操作耗时相同,表明优化碱裂解法提高了质粒提取效率。

2.3 质粒内毒素限度检查

质粒内毒素限度检查结果如表4所示,优化碱裂解法及试剂盒法提取的质粒内毒素残留量均低于1 EU/μg,表明这两种方法提取所获质粒均满足病毒包装的要求。

2.4 质粒转染效率检测

两种方法提取所获pAAV-ZsGreen1质粒对ND7/23细胞转染后48 h后荧光图像与面积分析结果如图3所示。试剂盒法提取质粒转染后荧光面积占

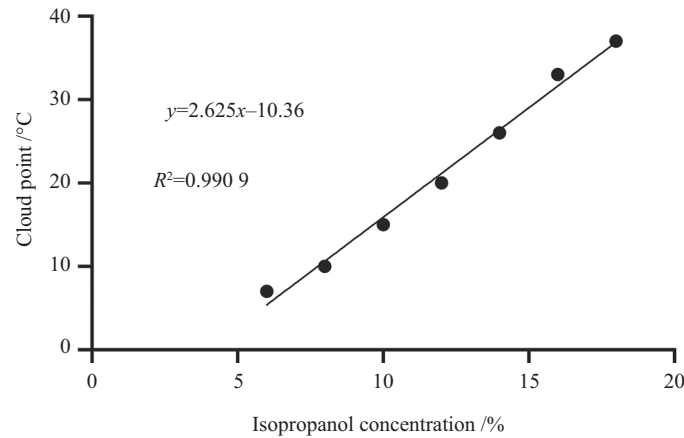


图1 模拟裂解液浊点测定结果

Fig.1 Cloud point temperature of simulated lysis solution

表3 质粒提取结果

Table 3 Results of plasmid extraction

质粒名称 Plasmid name	产量/mg Yield /mg	D_{260}/D_{230}	D_{260}/D_{280}
pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1-T	1.00	2.27	1.95
pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1-K	0.89	2.23	1.92
pAAV-ZsGreen1-T	0.84	2.36	1.95
pAAV-ZsGreen1-K	0.82	2.44	1.91

后缀T: 优化碱裂解法提取的质粒, 后缀K: 试剂盒法提取的质粒, 下同。质粒产量为1 L菌液进行提取的结果。
Suffix T: plasmid extracted by optimized alkaline lysis; suffix K: plasmid extracted by test kit. The same below. The plasmid yield is the result of extraction from 1 L culture.

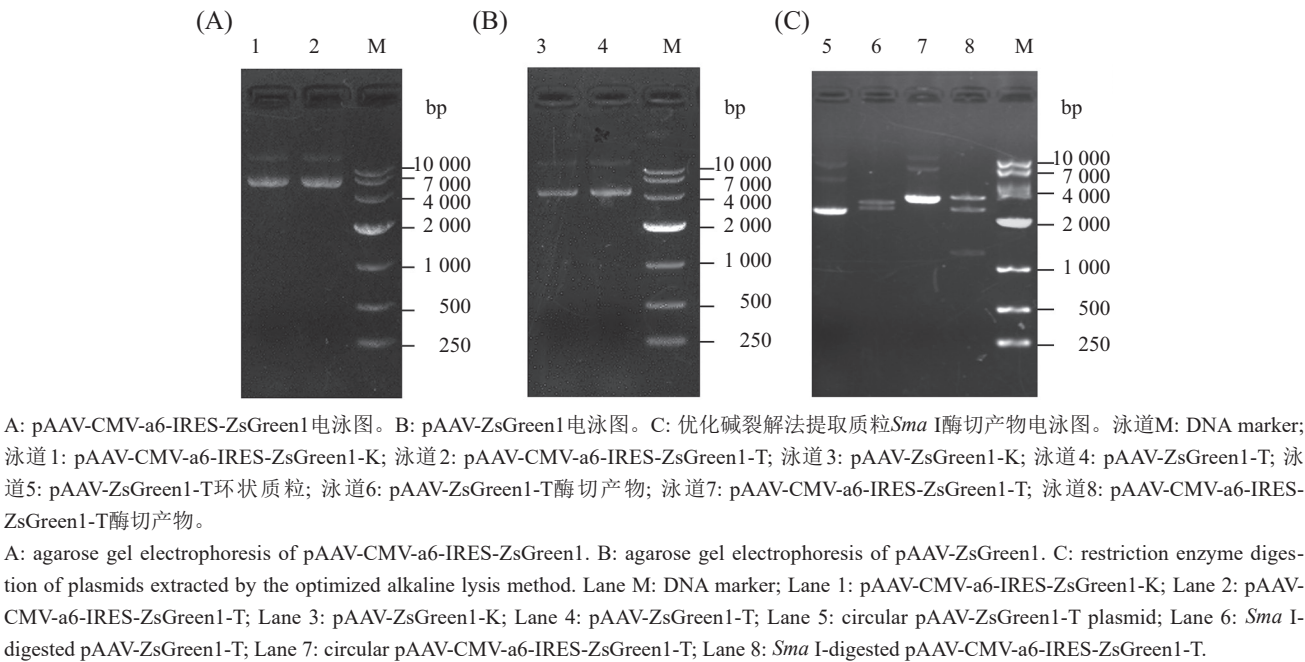


图2 质粒及*Sma* I酶切产物电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis images of plasmids and *Sma* I enzyme digestion

表4 内毒素限度检查结果

Table 4 Results of endotoxin limit test

质粒 Plasmid	内毒素限度 Endotoxin limit			
	10 EU/μg	1 EU/μg	0.5 EU/μg	0.1 EU/μg
pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1-T	-/-	-/-	-/-	+/+
pAAV-ZsGreen1-T	-/-	-/-	-/+	+/+
pAAV-CMV-a6-IRES-ZsGreen1-K	-/-	-/-	-/-	+/+
pAAV-ZsGreen1-K	-/-	-/-	-/-	-/+

每个样品进行2次鲎试剂检测。+/+: 两次结果均为阳性; -/-: 两次结果均为阴性; -/+: 一次结果阴性, 一次结果阳性。
Each sample was tested twice by limulus amebocyte lysate assay. +/+ : both results are positive; -/- : both results are negative; -/+ : one result is negative and the other is positive.

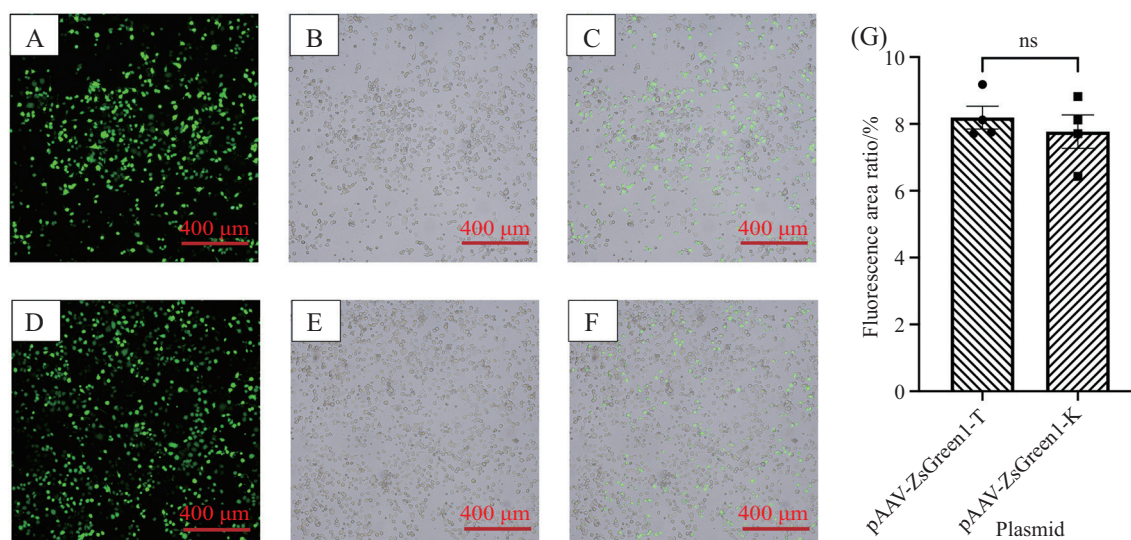
比为(7.77±0.50)%, 优化碱裂解法提取质粒转染后荧光面积占比为(8.19±0.34)%, 二者无显著性差异($P=0.546$ 6)。结果表明这两种方法提取所获质粒均能高效转染细胞。

2.5 腺相关病毒载体包装效率检测

两种方法提取所获质粒在 AAV-293 细胞平台中的病毒包装滴度检测结果如图 4 所示。由结果可知, 在包装条件相同时, 在 AAV-293 细胞平台中, 使用优化碱裂解法提取的质粒包装收获的病毒液滴度为 $(1.76 \pm 0.17) \times 10^{10}$ vg/mL, 商品化试剂盒提取的质粒包装收获的病毒液滴度为 $(1.45 \pm 0.13) \times 10^{10}$ vg/mL, 前者滴度较高, 但未表现出显著性差异($P=0.756$ 6), 表明这两种方法提取所获质粒均能高效包装 rAAV 病毒载体。

2.6 腺相关病毒载体体内活性测定

两种方法提取所获质粒包装的 AAV-Chrna6 病毒对 ND7/23 细胞感染结果如图 5 所示, AAV-CMV-Chrna6-T 病毒感染组荧光面积比为 $(1.59 \pm 0.05)\%$, AAV-CMV-Chrna6-K 病毒感染组荧光面积占比为 $(1.45 \pm 0.03)\%$, 二者无显著性差异($P=0.513$ 6)。感染后 48 h ND7/23 细胞中 *Chrna6* 基因相对表达量变化如图 5 所示, AAV-CMV-Chrna6-T 病毒感染组 *Chrna6* 基因相对表达量上调至对照组的 24.75 ± 1.05 倍, AAV-CMV-Chrna6-K 病毒感染组 *Chrna6* 基因相对表达量上调至对照组的 23.15 ± 1.17 倍, 二者无显著性差异($P=0.458$ 6)。上述结果表明, 在相同的感染条件下, 两种方法提取所获质粒包装获得的粗病毒液均能有效感染目的细胞, 且二者体外感染效率、表达

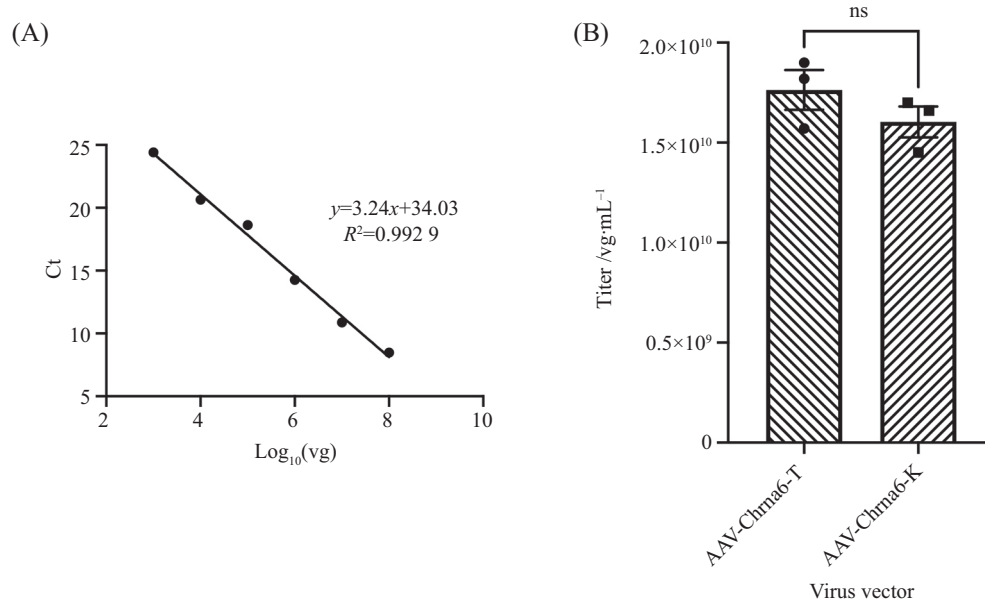


A: pAAV-ZsGreen1-T转染ND7/23细胞荧光图像; B: 明场图像; C: 叠加图像; D: pAAV-ZsGreen1-K转染ND7/23细胞荧光图像; E: 明场图像; F: 叠加图像; G: 荧光面积对比, 使用 t 检验分析。ns表示无显著性差异。 $n=4$ 。

A: fluorescent image of ND7/23 cells transfected with pAAV-ZsGreen1-T; B: corresponding bright-field image; C: merge image; D: fluorescent image of ND7/23 cells transfected with pAAV-ZsGreen1-K; E: corresponding bright-field image; F: merge image; G: comparison of fluorescent area. All data were analyzed by t test. ns: no significance. $n=4$.

图3 ND7/23细胞中质粒转染效率对比

Fig.3 Comparison of plasmid transfection in ND7/23 cell



A: rAAV滴度标准曲线; B: rAAV滴度测定结果, 使用 t 检验分析。ns表示无显著性差异。 $n=3$ 。

A: standard curve of rAAV titer; B: result of rAAV titration. All data were analyzed by t test. ns: no significance. $n=3$.

图4 rAAV粗病毒液滴度测定结果

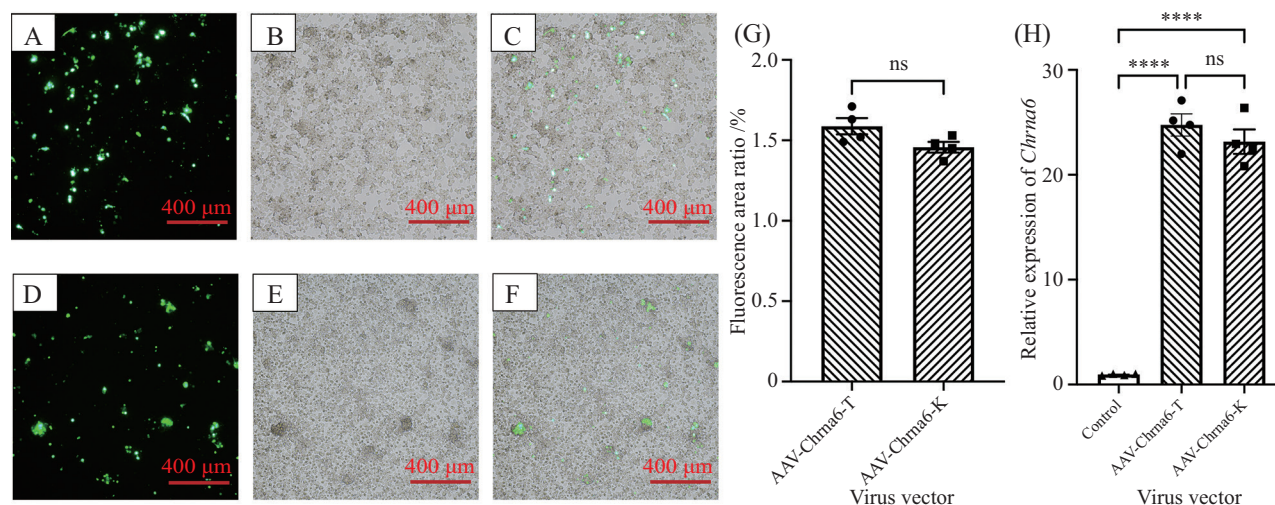
Fig.4 Titration result of crude rAAV

效率无显著性差异。

3 讨论

在重组病毒载体的包装过程中, 质粒残留内毒

素对转染效率、包装效果、下游纯化的危害性已为研究者所普遍认知, 去内毒素质粒已经成为了病毒包装流程中的标准配置。但近年来, 病毒包装中的内毒素限度控制标准也得到了进一步讨论。有实验



A: AAV-Chrna6-T感染ND7/23细胞荧光图像; B: 明场图像; C: 叠加图像; D: pAAV-ZsGreen1-K转染荧光图像; E: 明场图像; F: 叠加图像; G: 荧光面积对比, 使用 t 检验分析。ns表示无显著性差异。n=4; H: *Chrna6*相对表达水平, 经单因素方差分析对结果进行分析。ns表示无显著性差异, **** $P < 0.0001$ 。n=4。

A: fluorescent image of ND7/23 cells infected with AAV-Chrna6-T; B: corresponding bright-field image; C: merge image; D: fluorescent image of ND7/23 cells infected with AAV-Chrna6-K; E: corresponding bright-field image; F: merge image; G: comparison of fluorescent area. All data were analyzed by t test. ns: not significant. n=4; H: relative expression of *Chrna6*. All data were analyzed by One-Way ANOVA. ns: no significance, **** $P < 0.0001$. n=4.

图5 ND7/23细胞中rAAV载体感染效果

Fig.5 Infection effects of rAAV vectors in ND7/23 cell

表明, HEK-293F细胞、CHO细胞在质粒内毒素残留不超过2 000 EU/μg的情况下, 转染效率不受影响^[18]。一项基于阿达利单抗HEK-293细胞真核表达体系的条件优化研究表明, 原始状态与接受质粒瞬时转染的HEK-293工程细胞均能在培养基内毒素加入量不高于500 EU/mL的环境下正常生长, 在5~50 EU/mL的极低水平内毒素加入量情况下, 其蛋白表达水平有所上升^[19]。本研究的结果也初步表明, 在基于AAV-293细胞平台的三质粒共转染法病毒包装过程中, 质粒内毒素控制在1 EU/μg以下时, 收获粗病毒液的滴度受内毒素残留量的影响并不显著, 这提示可以在病毒工程中引入更加简洁的内毒素清除方案, 以达到质粒提取效率与病毒包装产率的平衡。

目前, 多种基于不同原理的内毒素清除方案已被引入质粒提取方案中。ROZKOV等^[20]结合Triton X-114相分离法与离子交换色谱法, 实现了低内毒素质粒的大规模制备。ONGKUDON等^[21]利用二价阳离子强度诱导LPS分子自发聚集, 以提升内毒素清除效率。RAZDAN等^[22]开发了一种聚己内酯纳米微球, 可实现对LPS的高效捕集。在各种低内毒素生产工艺中, 对设备要求较低的、基于表面活性剂的相分离浊点提取法在实验室规模的病毒包装中得到

了广泛应用, 但其中的加热分相操作对于质粒的拓扑构象存在不利影响, 已有研究证实, 质粒拓扑构象在25 °C以上即会发生转变, 而质粒超螺旋占比会直接影响转染与表达效率^[23]。同时, 对于Triton X-114体系的浊点影响因素, 目前相关研究尚存在不足。GU等^[24]首先测定了不同离子对Triton X-114体系浊点的影响, 发现SDS的存在将大幅上调体系浊点, 而阳离子的加入则可下调体系的浊点。NIKAM等^[25]研究了脂肪醇对体系浊点的影响, 发现低浓度区间内, 体系浊点随醇浓度的增加而上升, 在高浓度区间内, 这一关系则发生了反转。基于这一原理, MA等^[26]首先利用SDS与NaCl调节Triton X-114体系的浊点, 开发了不需反复加热的等温相分离法内毒素清除方案, 大大简化了无内毒素质粒的提取流程。但这一方案只能对纯化质粒溶液进行处理, 难以有效清除成品中残留的SDS与Triton X-114, 有研究表明, 经相分离法清除内毒素后的样本溶液中仍有约0.12%的Triton X-114残留, 这一残留水平足以干扰基于重组因子C的内毒素定量检测, 造成假阴性结果^[27]; 同时, 高于0.006%的Triton X-114残留即会降低THP-1细胞的活力^[8], 表明转染质粒中表面活性剂的残留会对转染效率与细胞活性造成影响, 对成品质粒溶液进

行去内毒素处理需要增加下游检测与纯化步骤。

在前人成果的基础上,本研究基于相分离法的原理,对传统碱裂解法质粒提取裂解液的配方进行了改进,通过异丙醇浓度、离子强度及SDS浓度调节Triton X-114体系浊点,在碱裂解液II中加入了表面活性剂Triton X-114与异丙醇,该优化型裂解液IIT在与菌体混悬液混合后,裂解体系能在冰浴条件下维持两相融合状态,令内毒素脂多糖分子在释放后与表面活性剂分子快速结合;裂解菌体完成、加入裂解液III后,体系浊点降至15℃以下,有机相与水相可在室温下快速分离,实现了内毒素与杂蛋白、基因组DNA的一步法除去,无需反复加热,保证了质粒的质量和产率,同时选择通过对裂解液而非终产物进行浊点提取,避免了向成品质粒中引入表面活性剂残留。

本研究开发了一种新的低内毒素质粒提取方案,所获质粒经吸光度检测、琼脂糖凝胶电泳、酶切、鲎试剂内毒素限度检查,显示其纯度、拓扑构象良好,内毒素残留低于1 EU/ μ g;经rAAV病毒包装效率、病毒体外表达效率对比实验验证,显示其生物活性与使用商品化无内毒素大规模提取试剂盒提取的质粒相当。优化裂解液配方与商品化试剂盒兼容,与试剂盒搭配使用时,单次提取操作时间可节省30 min。在实验室规模的应用条件下,本方法与商品化内毒素清除剂相比,每次质粒大规模提取反应中内毒素清除成本下降超过85%,如进行商业化转化,成本有望进一步降低。应用本提取方法,可以大幅节约低内毒素质粒提取消耗的人力物力,适用于腺相关病毒、慢病毒包装等需要大量转染级质粒的研究,为基因编辑、基因治疗等研究提供了有力的帮助。

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越创新中心鲍岚研究员、中国科学院分子细胞科学卓越创新中心干细胞库陈跃磊博士提供ND7/23大鼠/小鼠神经元融合细胞系。

参考文献 (References)

- [1] VIRZÌ G M, MATTIOTTI M, DE CAL M, et al. Endotoxin in sepsis: methods for LPS detection and the use of omics techniques [J]. *Diagnostics*, 2022, 13(1): 79.
- [2] DI LORENZO F, DUDA K A, LANZETTA R, et al. A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides [J]. *Chem Rev*, 2022, 122(20): 15767-821.
- [3] DE CHIARA S, DE SIMONE CARONE L, CIRELLA R, et al. Beyond the Toll-Like receptor 4. structure-dependent lipopolysaccharide recognition systems: how far are we [J]? *ChemMedChem*, 2025, 20(6): e202400780.
- [4] SHERABA N S, HESHAM A, FAWZY M, et al. Advanced approaches for endotoxin detection and removal from snake antivenoms [J]. *Toxicon*, 2023, 222: 107003.
- [5] VAN BELLEGHEM J D, MERABISHVILI M, VERGAUWEN B, et al. A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations [J]. *J Microbiol Methods*, 2017, 132: 153-9.
- [6] WESPEL M, GEISS M, NÄGELE M, et al. The impact of endotoxin masking on the removal of endotoxin during manufacturing of a biopharmaceutical drug product [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1671: 462995.
- [7] FLOTTE T R. Birth of a new therapeutic platform: 47 years of adeno-associated virus biology from virus discovery to licensed gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 1976-81.
- [8] ISSA S S, SHAIMARDANOVA A A, SOLOVYEVA V V, et al. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: an overview [J]. *Cells*, 2023, 12(5): 785.
- [9] WANG J H, GESSLER D J, ZHAN W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 78.
- [10] 代新岳, 张磊. 血友病AAV载体基因治疗研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(DAI X Y, ZHANG L. Research progress of AAV-mediated gene therapy for hemophilia [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(1): 87-92.
- [11] XIAO X, LI J, SAMULSKI R J. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus [J]. *J Virol*, 1998, 72(3): 2224-32.
- [12] ZHENG Q, WANG T, ZHU X, et al. Low endotoxin *E. coli* strain-derived plasmids reduce rAAV vector-mediated immune responses both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 22: 293-303.
- [13] ZHAO H, MEISEN W H, WANG S, et al. Process development of recombinant adeno-associated virus production platform results in high production yield and purity [J]. *Hum Gene Ther*, 2023, 34(1/2): 56-67.
- [14] ADAMCÍK J, VÍGLASKÝ V, VALLE F, et al. Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(19): 3300-9.
- [15] ZHANG Z N, LI Q, LIU C, et al. The voltage-gated Na⁺ channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the beta3 subunit [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 19): 3243-52.
- [16] VANOYE C G, KUNIC J D, EHRING G R, et al. Mechanism of sodium channel Nav1.9 potentiation by G-protein signaling [J]. *J Gen Physiol*, 2013, 141(2): 193-202.
- [17] ARONSON S J, BAKKER R S, MOENIS S, et al. A quantitative *in vitro* potency assay for adeno-associated virus vectors encoding for the UGT1A1 transgene [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 250-8.
- [18] BUTASH K A, NATARAJAN P, YOUNG A, et al. Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(3): 610-9.
- [19] FAUST C, BEIL C, DITTRICH W, et al. Impact of lipopolysaccharides on cultivation and recombinant protein expression in hu-

- man embryonal kidney (HEK-293) cells [J]. *Eng Life Sci*, 2021, 21(11): 778-85.
- [20] ROZKOV A, LARSSON B, GILLSTRÖM S, et al. Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(3): 557-66.
- [21] ONGKUDON C M, HODGES E, MURPHY K, et al. Removal of endotoxins from plasmid DNA: analysis of aggregative interaction of mobile divalent metal cations with endotoxins and plasmid DNA [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(22): 3208-16.
- [22] RAZDAN S, WANG J C, BARUA S. PolyBall: a new adsorbent for the efficient removal of endotoxin from biopharmaceuticals [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8867.
- [23] BETTOTTI P, VISIONE V, LUNELLI L, et al. Structure and properties of DNA molecules over the full range of biologically relevant supercoiling states [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6163.
- [24] GU T, GALERA-GÓMEZ P A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants [J]. *Colloids Surfaces A*, 1995, 104(2): 307-12.
- [25] NIKAM B K, JADHAV V B, BORSE M S. Influence of alcohols on the lower consolute behavior and thermodynamic approach of Triton X-114 aqueous two-phase systems [J]. *J Indian Chem Soc*, 2022, 99(8): 100572.
- [26] MA R, ZHAO J, DU H C, et al. Removing endotoxin from plasmid samples by Triton X-114 isothermal extraction [J]. *Anal Biochem*, 2012, 424(2): 124-6.
- [27] TEODOROWICZ M, PERDIJK O, VERHOEK I, et al. Optimized Triton X-114 assisted lipopolysaccharide (LPS) removal method reveals the immunomodulatory effect of food proteins [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173778.