دوازدهمین کنگره ملی سراسری
فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران
12th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran
senaconf.ir

کاهش بارآلودگی به اندوتوکسین(LPS) قبل از تخلیص محصولات نوترکیب بیان شده در باکتری های گرم منفی با استفاده از طراحی آزمون

شاهین حدادیان[۱]، مینا سپاهی[۲]،محدثه شیخ عباسی[۳]، اکرم عیدی[۴]

[۱] انستیتوپاستورایران،بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران hadadian@yahoo.com
[۲] انستیتوپاستورایران،بخش نانوبیوتکنولوژی، تهران m_sepahi@pasteur.ac.ir
[۳] دانشگاه آزاد واحد علوم وتحقیقات ، گروه زیست شناسی، تهران moh1995abbasi@gmail.com
[۴] دانشگاه آزاد واحد علوم وتحقیقات ، گروه زیست شناسی، تهران eidi@srbiau.ac.ir

چکیده:

در این تحقیق تلاش گردید که بعد از مرحله القاء و بیان پروتئین هدف و قبل از مرحله شکست سلولی، از روش استخراج با فنل داغ با EDTA در جهت حذف اندوتوکسین یا همان LPS (لیپوپلی‌ساکارید) از دیواره باکتری اشرشیاکلی حاوی ژن بیان کننده پروتئین ضد میکروبی تترامر S3 استفاده شد. سلول جدا شده از محیط کشت در شرایط استریل در محلول Tris-HCl انکوبه گردید و سپس با افزودن EDTA یون‌های Ca^{2+}/Mg^{2+} که مسئول اتصال LPS (لیپوپلی‌ساکارید) به غشاء سلولی هستند، شلاته شدند. این فرآوری باعث سست شدن اتصال LPS به دیواره سلولی و در نتیجه آزاد شدن LPS گردید. با سانتریفیوژ کردن نمونه، LPS به صورت محلول جدا شده و بعد از شکست سلولی، احتمال چسبندگی LPS به پروتئین و در نتیجه بارآلودگی محصول کاهش یافت.

برای این منظور شرایط فرآوری سلول نوترکیب با EDTA، شامل غلظتTris-Hcl مدت زمان فرآوری با Tris-Hcl، غلظت EDTA، مدت زمان تماس با EDTA، به کمک متدلوژی طراحی آزمونها محاسبه و بهینه‌سازی گردید. در نهایت، سلول نوترکیب بعد از فرآوری بهینه با EDTA ، با استفاده از بافر لیز سلولی و سونیکاسیون شکسته گردید و آلودگی اندوتوکسینی آن به طور قابل ملاحظه ایی کمتر از محصول حالت شکست معمولی بود.

واژهای کلیدی: لیپوپلی ساکارید، حذف اندوتوکسین، استخراج با فنل داغ،تترامر S3

مقدمه :

از سال ۱۹۸۰ با معرفی انسولین انسانی نوترکیب به عنوان اولین پروتئین نوترکیب به بازار مصر ف(۱) تا کنون حدود ۲۳۹ پروتئین و پپتید دارویی جهت مقاصد درمانی توسط FDA تایید شده است. با در نظر گرفتن فرمهای مختلف تجاری این پروتئینها، تا سال ۲۰۱۷میزان محصولات دارویی تایید شده و موجود در بازار به ۳۸۰ مورد رسیده است(۲). علاوه بر پروتئینهای نوترکیب تایید شده، حدود ۱۳۰۰ پروتئین نوترکیب دیگر نیز در فازهای مختلف تحقیقاتی و مطالعات بالینی قرار دارند(۳). جهت بیان این پروتئینهای نوترکیب از سلولهای میزبان مختلفی از جمله باکتری‌ها، مخمرها، سلولهای جانوری، حشرات و گیاهان استفاده می‌شود. در دهه ۱۹۸۰ میلادی باکتری گرم منفی *E. coli* بیشترین آمار استفاده به عنوان سلول میزبان را داشت به عنوان مثال تا سال ۲۰۱۵ برای بیان حدود ۶۹ درصد از پروتئینهای ضد توموری تایید شده (۶۴ مورد) از باکتری *E.*coli به عنوان سلول میزبان استفاده شده است(۳).

در باکتری‌های گرم منفی، شکست دیواره سلولی باعث آزاد شدن مقادیر زیادی لیپوپلی ساکارید در محیط می‌شود، به عنوان مثال هر سلول باکتری E.coli به ازای هر سلول ۲ میلیون ملکول LPS دارد(۴) و لذا لزوم حذف این آلودگی از معضلات اصلی استفاده از باکتری‌های گرم منفی به عنوان سلول میزبان میباشد. (۵)

اندوتوکسین باکتریایی یا همان لیپوپلی‌ساکارید (LPS) در برابر گرما مقاوم بوده و از فیلترهای سترون‌کننده نیز عبور می‌کند و به دلیل عوارض خطرناک آن در موجود زنده، همواره بخشی از مراحل تخلیص پروتئین هدف به حذف این عامل مزاحم از محصول مربوط می‌شود(۶).

روش‌های تخلیص زیادی جهت حذف آلودگی اندوتوکسینی وجود دارند که از آن جمله می‌توان به استخراج دو فازی، اولترافیلتراسیون، کروماتوگرافی تمایلی خاص و تعویض یون آنیونی اشاره نمود. درروش‌های استخراج دو فازی، افزودن دترجنت‌های غیر یونی مانند Triton X-100به نمونه حاوی اندوتوکسین ضروری است(۷). این روش در مورد پروتئینهای بازی که در سطح خود دارای بار مثبت زیاد میباشند و یا به علت غلظت زیاد پروتئین احتمال تجمع آنها وجود دارد، به علت جذب اندوتوکسین به سطح پروتئین یا در لابلای فرمهای متجمع آن، کارآمد نمیباشد(۸). در سایر روش‌های اولترافیلتراسیون و تعویض یونی، برای شکست پل کلسیمی ایجاد شده و همچنین برای شکستن واحدهای متجمع اندوتوکسین، استفاده از دترجنت غیر یونی نظیر تریتون یا سدیم دزوکسی‌کلات ضروری می‌باشد. از آنجایی که مقادیر اندک باقی‌مانده دترجنت در محصول مجاز نمی‌باشد، استفاده از ستون‌های جاذب دترجنت جهت حذف مقادیر اندک باقی‌مانده یا اثبات عدم حضور دترجنت در صورت استفاده از سایر روش‌های تعویض بافر، اجتناب ناپذیر است. از طرفی روش‌های فوق از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه نبوده و اولترافیلتراسیون نیز باعث تغلیظ بیش از حد پروتئین و در نتیجه aggregation و در نتیجه اتلاف محصول می‌گردد. روش‌های کروماتوگرافی تعویض تمایلی خاص بر اساس جذبLPS به لیگاندهای هیستیدین، پلی میکسینB(Polymyxin B)و پلیε- لیزین (poly lysine)

محدودیت‌های مختلف عملیاتی نظیر pH عملیاتی خنثی و غلظت نمکی پایین، بازیابی پایین و اتلاف زیاد پروتئین در هنگام حذف اندوتوکسین از پروتئین‌های اسیدی (مانند آلبومین) و یا سمیت برای سلول‌های انسانی را دارا می‌باشند(۹). برای این منظور میتوان از(Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA استفاده نمود. در سال ۱۹۶۵ برای اولین بار محققان انستیتو بیماری‌های متابولیکی آمریکا دریافتند که تماس باکتری E.coli با EDTA بدون تاثیر منفی بر روی رشد سلول‌ها باعث افزایش نفوذپذیری دیواره می‌شود(۱۰). در سال ۱۹۷۷، Bayer و همکارش دریافتند که EDTA باعث تغییرات فیزیکی در ساختار غشاء بیرونی باکتری می‌گردد. سایر محققان نیز در خصوص تغییرات ساختاری این ماده بر روی باکتری‌های گرم منفی مقالاتی چاپ کرده‌اند اما به‌طور اختصاصی در سال ۲۰۱۶ محققان انستیتوتکنولوژی هند، از این روش در ترکیب با روش مرسوم فنل داغ به صورت ترکیبی، متدی دو مرحله‌ای را برای استخراج لیپوپلی ساکارید به کار بردند. (۱۱).

در این تحقیق تلاش می‌شود که بعد از مرحله القاء و بیان پروتئین هدف و قبل از مرحله شکست سلولی، ازEDTA برای حذف LPS از دیواره باکتری نوترکیب استفاده شود. EDTA با شلاته کردن یون‌های +Ca2+/Mg2 که مسئول اتصالLPS به غشاء سلولی هستند، باعث سست شدن اتصال LPS به دیواره سلولی می‌گردد. افزودن آمپی‌سیلین نیز باعث شکننده شدن غشاء و در نتیجه آزاد شدن LPS می‌گردد و با بهینه‌سازی شرایط آزمایشگاهی این عملیات، تاثیر این روش بر بار آلودگی اندوتوکسینی محصول مرحله شکست سلولی بررسی شود. برای این

منظور سلول باکتری گرم منفی نوترکیب حاوی ژن بیان کننده باکتری نوترکیب مطابق شرایط معمول کشت داده شده و در زمان مناسب القاء میشوند. در این قسمت میتوان از هر نوع باکتری گرم منفی مولد هر نوع پروتئین نوترکیبی استفاده نمود ولی از آنجایی که احتمال اتصال LPS آزاد شده از دیواره سلولی به پروتئینهای دارای بار مثبت بیشتر است، در این تحقیق از سلول نوترکیب مولد پروتئین (پلی پپتید) ضد میکروبی استفاده می‌شود که بتوان با استفاده از تیمار سلول با EDTA و با استفاده از روش طراحی آزمون، شرایط حذف LPS آن را بهینه‌سازی کرده و آلودگی اندوتوکسین آن را به حداقل رسانید.

روش کار :

القاء و بیان پروتئین نوترکیب در *E.coli* :

سویه باکتری نوترکیب مولد پروتئین نوترکیب تترامر S3 در محیط کشت مایع LB دارای آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا رسیدن به OD = 0.6 در طول موج ۶۰۰ نانومتر رشدداده شد. سپس با استفاده از افزودنIsopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside IPTG (در غلظت 0.1 mM) باکتری‌ها القا شده و ۴ ساعت بعد از القاء، برای جداسازی بیومس از محیط کشت، از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت پانزده دقیقه در دمای ۴ درجه استفاده می‌شود. سپس دیواره سلولی در محلول لیز کننده (tris- HCl 20 میلی مولار pH = 8 حاوی ۰/۵ میلی مولار DTT) و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک شکسته شده و آلودگی اولیه اندوتوکسین اینکلوژن بادی حاصله، با استفاده از آزمون اندازه گیری کمّی اندوتوکسین با کیت کروموژنیک، اندازه گیری شده و به عنوان بار اولیه آلودگی محصول مرحله شکست سلولی ثبت می‌شود. سپس پلت های اینکلوژن بادی با استفاده از محلول اوره ۶ مولار و Tris- HCl ۰,۰۲ مولار با pH = ۸ با استفاده از همزن، به شکل سوسپانسیون یکنواخت گردیده و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سوپرناتانت جمع‌آوری و پلت‌ها دور ریخته می‌شوند. آلودگی اندوتوکسینی نمونه حاصل از این مرحله به عنوان بار اولیه آلودگی محصول مرحله محلول‌سازی اینکلوژن بادی‌ها در شرایط معمولی، ثبت می‌گردد. سپسمطابق با روش Laemmli به هریک از نمونه‌ها بافر لودینگ پروتئین (pH 6.8 و ۱۰۰ mM Tris.Cl و mM dithiothreitol ۲۰۰ و SDS ۴٪ و bromophenol blue ۰.۲ درصد و Glycerol ۲۰٪) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ˚C ۹۵ جوشانده می‌شوند. سپس در کنار مارکر وزن مولکولی پروتئینی، بر روی ژل پلی اکریل آمید ۲۰% نمونه‌گذاری و رنگ امیزی گردید.

اندازه گیری اندوتوکسین به روش آزمون ژل کلات:

ویالهای از پیش آماده آزمون ژل کلات موجود در بازار با محدوده سنجش ۰/۲۵ Eu/ml میباشند و بعد از افزودن نمونه به هر ویال و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، تشکیل ژل در ویال بیانگر غلظت اندوتوکسین بیشتر از محدوده سنجش کیت میباشد. برای این منظور، با استفاده از آب فاقد اندوتوکسین ، سه رقت متوالی از هر نمونه (۵۰۰ میکرولیتر) تهیه می‌شود و به صورت تکرار دوتایی به هر یک از ویالهای کیت ژل کلات، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه می‌شود. ویالها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به دور از هر گونه تکان یا استرس انکوبه میشوند و بعد از گذشت این زمان، از انکوباتور خارج شده و با چرخش ۱۸۰ درجه ویالها (رو به پایین)، تشکیل ژل در هر ویال بررسی می‌شود(۱۲). با توجه به تشکیل یا عدم تشکیل ژل در هر رقت، محدوده میزان اندوتوکسین هر نمونه تخمین زده می‌شود. جهت اطمینان از صحت عملکرد کیت، در هر بار آزمون، نمونه اندوتوکسین استاندارد نیز در غلظت ۰/۱ و ۱ Eu/ml نیز به صورت تکرار دوتایی آزمایش می‌شود.

آزمون اندازه گیری کمّی اندوتوکسین با استفاده از کیت کروموژنیک:

در کیت‌های اندازه‌گیری اندوتوکسین با سوبسترای کروموژنیک، سوبسترا یک عامل رنگی (پارا نیترو آنیلین pNA) است که از طریق پیوند آمیدی به یک پپتید با توالی مشابه جایگاه تاثیر آنزیم لخته‌ساز فعال شده بر روی کوآگلوژن متصل شده است. با حضور اندوتوکسین، مسیر فعال شدن فاکتور C (گرفته شده از آمبوسیت خرچنگ نعل اسبی) پیش رفته و باعث فعال شدن آنزیم لخته‌ساز می‌شود. این آنزیم

فعال شده باعث شکستن پیوند سوبسترا و پراانیتروآنیلین می‌شود و در نتیجه ماده رنگی در محیط آزاد گشته و قابل ردیابی و اندازه‌گیری می‌شود. این آزمون با رقت‌های مشخصی از اندوتوکسین استاندارد تکرار می‌شود و با رسم منحنی استاندارد، مقادیر رنگ مربوطه با مقادیر اندوتوکسین ارتباط داده می‌شوند. بنابراین هر چه اندوتوکسین نمونه مورد آزمون بیشتر باشد، فاکتور C بیشتری فعال گردیده و در نتیجه میزان عامل سنجش افزایش می‌یابد(۱۳). پارانیتروآنالین در طول موج ۴۰۵ nm با رنگ زرد مشخص می‌شود و معمولاً حساسیت کیت نقطه نهایی با این سوبسترا در محدوده ۰/۱ الی ۱ Eu/ml می‌باشد(۱۴). برای انجام این آزمون، ۵۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده به صورت تکرار دوتایی و نمونه استاندارد در رقتهای ۱، ۰,۵، ۰,۲۵ و ۰,۱ به صورت تکرار سه تایی در چاهکهای پلیت ۹۶ تایی سترون دپیروژن ریخته شده و سپس ۵۰ میکرولیتر ماده واکنشگر کیت (lysate) که حاوی فاکتور C حاصله از آمبوسیت خرچنگ نعل اسبی میباشد به آن اضافه گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه می‌شود. سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای کیت به هر یک از چاهکهای اضافه گردیده و بعد از ۶ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، واکنش با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۲۰ درصد یا SDS ۱۰ درصد متوقف شده و با قرار دادن پلیت در الایزا ریدر، شدت طیف نمونه ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت می‌گردد. با رسم منحنی استاندارد بر اساس OD و غلظت اندوتوکسین و تعیین رابطه خطی آن، غلظت اندوتوکسین نمونه مجهول قابل محاسبه میباشد.

تعیین سطوح انتخابی پارامترهای موثر:

پاسخ هدف این طرح، میزان آلودگی اندوتوکسین اینکلوژن بادی تترامر نوترکیب S3 می‌باشد که برای به حداقل رساندن آن، پارامترهای موثر شامل زمان انکوباسیون با Tris- HCl، غلظت EDTA و مدت زمان انکوباسیون سلول با EDTA دردوسطح مطابق جدول زیر ارزیابی، مدلسازی و بهینه سازی شدند.

جدول۱- فاکتورها و سطوح انتخابی جهت آزمایش

عنوان پارامتر	سطح ۱	سطح ۲
غلظت Tris/ HCl	۵۰ میلی مولار	۸۵ میلی مولار
زمان انکوباسیون با Tris/ HCl	۱۰ دقیقه	۳۰ دقیقه
مدت زمان انکوباسیون با EDTA	۱۰ دقیقه	۳۰ دقیقه
غلظت EDTA	۱۰ میلی مولار	۵۰ میلی مولار

نتایج:

بر اساس سطوح و فاکتورهای انتخابی در جدول ۱ تمامی پارامترها مورد آزمایش و تعیین اندازه اندوتوکسین قرار گرفتو نتایج زیر مندرج در جدول حاصل گردید.

جدول ۲- شرایط فرآوردی سلولها بر حسب طراحی آزمایشها و نتایج مربوطه

فاکتور ۱	فاکتور ۲	فاکتور۳	فاکتور ۴	نتایج
غلظت Tris/ HCl	زمان انکوباسیون با Tris/ HCl	مدت زمان انکوباسیون با EDTA	غلظت EDTA	Endotoxin of IB
میلی مولار	دقیقه	میلی مولار	دقیقه	اندوتوکسین در میلی لیترEU/ml
50	15	85	10.0	119954.8
68	20	68	7.5	17493.1
68	20	68	7.5	23002.0

85	15	85	5.0	18005.8
50	25	85	5.0	16804.2
68	20	33	7.5	41005.4
85	25	85	10.0	405037.5
68	20	68	7.5	10107.2
85	25	85	5.0	16003.1
68	20	68	7.5	19207.4
50	15	50	5.0	100728.8
50	15	85	5.0	36812.6
68	20	68	2.5	77983.1
85	25	50	5.0	18999.1
85	15	50	5.0	42030.8
68	10	68	7.5	16003.1
68	30	68	7.5	18903.0
85	15	85	10.0	242024.4
85	25	50	10.0	170504.2
68	20	68	7.5	14993.7
50	25	85	10.0	138022.1
50	15	50	10.0	30404.0
103	20	68	7.5	239909.5
85	15	50	10.0	106496.6
50	25	50	10.0	60231.3
33	20	68	7.5	129947.2
50	25	50	5.0	36812.6
68	20	103	7.5	128024.6
68	20	68	12.5	218568.7

محاسبات اماری نتایج حاصل از جدول ۲ موجب بدست آوردن شرایط تخمینی بهینه با حداقل اندوتوکسین گردی که در جدول ۳ ثبت گردید.

جدول۳- شرایط تخمینی جهت رسیدن به حداقل آلودگی اندوتوکسین

غلظت Tris/ HCl	زمان انکوباسیون با Tris/ HCl	مدت زمان انکوباسیون با EDTA	غلظت EDTA	مقدار اندوتوکسین در انکلوژن بادی
71.053	29.492	59.38	5.142	984.786

بحث:

با توجه به نتایج حاصله میتوان پیش بینی نمود که حالت حداقل آلودگی اندوتوکسین اینکلوژن بادیها در شرایط غلظتهای متوسط تریس و زمان انکوباسیون بیشتر و همچنین غلظت متوسط EDTA و زمان انکوباسیون کوتاهتر اتفاق بیفتد. بر طبق نتایج مقایسه مقدار LPS حاصل از بیومس فرآوری شده در شرایط بهینه و بیومس بدون فرآوری، اختلاف آماری معنی داری بین نتایج آزمایشگاهی و شرایط تخمینی توسط مدل مشاهده نشد که نشانه معتبر بودن مدل انتخابی بود. بر این اساس در شرایط بهینه، اینکلوژن بادی فراوری شده فقط حاوی مقدار

میانگین ۱۵۶۹٫۵ EU/ml اندوتوکسین بود که بیانگر این است که در شرایط بهینه فرآوری سلول با EDTA، قابلیت حذف ۹۹٫۸٪ حذف آلودگی اندوتوکسینی بایومس را داشته و باعث کاهش این آلودگی به اندازه ۲٫۷ log میگردد. بنابراین استفاده از ۷۰ میلی مولار Tris-HCl ، ، زمان تماس با آن ۳۰ دقیقه، غلظت EDTA معادل ۶۰ میلی مولار و زمان تماس با EDTA معادل ۵ دقیقه برای فرآوری سلول قبل از انجام مرحله شکست سلولی بدست آمد.

منابع:

.۱ Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979;76(1):106-10.
.۲ Usmani SS, Bedi G, Samuel JS, Singh S, Kalra S, Kumar P, et al. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. PLoS ONE. 2017 07/31
/۰۷/۱۲received
/۰۶/۰۷accepted;12(7):e0181748. PubMed PMID: PMC5536290.
.۳ Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N ,Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. Microbial Cell Factories. 2016 02/09
/۰۳/۱۲received
/۰۱/۰۲accepted;15:33. PubMed PMID: PMC4748523.
.۴ Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna T ,Pessoa Jr A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. J Pharm Pharm Sci. 2007;10(3):388-404.
.۵ Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiological reviews. 1996;60(3):512-3.۸
.۶ Machado CAD, Souza ACA, Loureiro C, Martinho FC, Cintra LTÂ, Dezan E, et al. Comparison of two rotary systems in bacteria/lps removal from endodontic infections: randomized clinical trial. Brazilian oral research. 2019;33.
.۷ Lopes AM, Magalhães PO ,Mazzola PG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JC, Penna TC, et al. LPS removal from an E. coli fermentation broth using aqueous two-phase micellar system. Biotechnology progress. 2010;26(6):1644-53.
.۸ Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, de Lencastre Novaes LC, Molino JVD, Barbosa LRS, Pessoa A, et al. LPS–protein aggregation influences protein partitioning in aqueous two-phase micellar systems. Applied microbiology and biotechnology. 2013;97(14):6201-9.
.۹ Rietschel ET, Brade L, Holst O, Kulshin V, Lindner B, Moran A, et al. Molecular structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. Endotoxin research series. 1990;1:15Y32.
.۱۰ Leive L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E., coli. Biochemical and biophysical research communications. 1965;21(4):290-6.

.۱۱ Ahamad N, Katti DS. A two-step method for extraction of lipopolysaccharide from Shigella dysenteriae serotype 1 and Salmonella typhimurium: an improved method for enhanced yield and purity. Journal of microbiological methods. 2.۵۰-۱۲۷:۴۱;۰۱۶
.۱۲ Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT™ and PYROGENT™ Plus user guide. In: Lonza Walkersville I, editor.: Lonza; 2014. p. 13.
.۱۳ Shahin Hadadian LP, Mina Sepahi, Seyedeh Marziyeh Hosseini. Pyrogeinicity: continual challenge of research, development and production of bio- pharmaceuticals. 1 ed. Sari, Iran: Academic Center for Education, Culture and Research of Mazandaran; 1397.
.۱۴ Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™ user guide. In: Lonza Walkersville I, editor.: Lonza; 2014. p. 1.۷