

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIAŃSKI

Chromatografia jonowymienna biopolimerów z wykorzystaniem jonowymieniaczy opartych na nośnikach z usieciowanych polisacharydów. Cz. II. Technika procesu chromatograficznego

Centralne Laboratorium Aparaturowe AR, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin

W pierwszej części artykułu (5) omówiono chemiczną budowę i właściwości jonowymieniaczy opartych na nośnikach z usieciowanych wielocukrów. Opisano również zasady doboru buforu, wyboru jonowymieniacza oraz jego przygotowanie do przeprowadzenia procesu chromatograficznego polimerycznych składników obiektów biologicznych. Niniejsza część pracy poświęcona jest technice kolumnowej oraz jednostopniowej wymianie jonowej tego procesu.

1. Wybór kolumny

Kolumna chromatograficzna powinna być wykonana z materiału zapobiegającego destrukcji labilnych biopolimerów. Najlepiej do tego celu nadaje się szkło. Przepona, na której opiera się złożo jonowymieniacza, musi być możliwie cienka i tak porowata, aby wykluczała możliwość zatykania się jej materiałem biologicznym. Jeżeli nad przeponą наносimy warstwę piasku, należy się starać, by była ona możliwie najwęższa i w ten sposób nie wpływała na wzrost dyfuzji rozdzielanych frakcji. To samo dotyczy martwej objętości kolumny pod przeponą oraz objętości wężyków odprowadzających eluat z kolumny, które muszą być ograniczone do niezbędnego minimum. Należy stworzyć takie wyjściowe warunki rozdziału chromatograficznego, żeby składniki próby adsorbowały się w 1–2 cm, górnej warstwie jonitu. W takich przypadkach, 20 cm wysokość złoża kolumny wystarcza do przeprowadzenia większości rozdziałów. Dłuższe kolumny wymagane są przy rozdziałach, przy których mamy do czynienia z bardzo złożonymi mieszaninami. Jeżeli wysokość złoża jonitu jest ściśle określona, średnica kolumny może być wyliczona z ilości jonowymieniacza wymaganej do jej upakowania. Średnica ta jest zależna od żądanej pojemności użyteczności złoża jonowymieniacza (wielkość nanszonej próby). Chromatografia jonowymienna biopolimerów wymaga stosunkowo niewielkich kolumn. Większość rozdziałów złożonych mieszanin przeprowadza się na kolumnach o wymiarach od $1,6 \times 20$ cm do 10×45 cm.

2. Upakowywanie kolumny

Jak w innych technikach chromatograficznych, etap upakowywania kolumny jest istotnym etapem wpływającym na rozdział izolowanych polimerów. Zle upakowane kolumny dają nierównomierny przepływ w poszczególnych obszarach jej złoża. Powoduje to w konsekwencji skrzywienie się i rozszerzenie stref izolowanych związków, co znacznie pogarsza ich rozdział. Pakowanie kolumn z jonowymieniaczami jest zwykle łatwiejsze, niż pakowanie żelu w chromatografii sitowej. Wymagana bowiem w drugim przypadku wysokość złoża jest zwykle znacznie większa. Obok znanych powszechnie prawideł postępowania przy upakowywaniu kolumn chromatograficznych, warto wziąć pod uwagę poniższe wskazówki. Spęczniały jonowymieniacz powinien być tak zmieszany z buforem, aby dawał się łatwo przelewać, a nie tworzył gęstej masy zatrzymującej pęcherzyki powietrza. Zwykle taka zawiesina zawiera ok. 75% spęczniałego żelu. W przypadku, gdy jonowymieniacz (Sephadex)

spęczniało w temperaturze pokojowej, zawiesinę należy odpowiednio rozpuścić. Jonit pakować w temperaturze pracy kolumny. Jego zawiesinę wlewać przy pomocy szklanej bagietki lub w inny sposób zapobiegający wytwarzaniu się pęcherzyków powietrza. Kolumnę można napełniać do ustalonej wysokości złoża dwoma sposobami. Przy stosowaniu pierwszego z nich staramy się cały jonit nanieść jednorazowo. Uczynić to można przy pomocy dodatkowego zbiornika, którego wylot podłączony jest do górnej części kolumny. Ilość jonitu dobieramy doświadczalnie. Według drugiego sposobu kolumnę napełniamy do wymaganej wysokości etapami, tak, aby po dodaniu każdej porcji jonitu i spuszczeniu nadmiaru buforu, następną porcję wlewać do kolumny z użyciem mieszadła, szybko obracającego się w pozostałej części płynu i górnej warstwie naniesionego poprzednio żelu. W celu stabilizowania się wysokości słupa złoża, podłączyć górną część kolumny do zbiornika z buforem i ustawić go na takiej wysokości, aby ciśnienie słupa wody (szybkość przepływu buforu przez kolumnę) było nieco większe niż zastosowane potem, w trakcie rozdziału chromatograficznego. Przepuścić 2 objętości kolumnowe buforu dla zrównoważenia i stabilizacji złoża jonitu. Do sprawdzenia równomierności upakowania kolumny nie stosować żadnych substancji barwnych, z uwagi na to, że niemal wszystkie barwniki posiadają ładunek i mogą być wiązane przez jonowymieniacz. Przy braku odpowiedniego adaptora zabezpieczającego górną powierzchnię złoża, na wierzchu jonitu można nanieść ok. 0,5 cm warstwę spęcznionego w ten sam sposób Sephadexu G-25. Kolumnę ustawić z dala od źródeł ciepła, bezpośredniego działania promieni słonecznych oraz miejsc narażonych na przeciągi.

3. Przygotowanie próby

Wielkość próby, jaką mamy nanieść na kolumnę, zależy od pojemności użyteczności jej złoża. Zawartość wiązanych do jonitu składników powinna odpowiadać 10–20% tej pojemności. Tak więc, jeszcze przed dokonaniem rozdziału, należy zdecydować o wielkości próby lub o rozmiarach kolumny. Skład jonowy próby powinien być taki sam jak buforu wyjściowego. Jeżeli jest on odmienny, próbę należy odsolić przez dializę lub techniką chromatografii sitowej z wykorzystaniem Sephadexu G-25. Często wystarczy odpowiednie jej rozcieńczenie buforem wyjściowym.

Jeżeli proces chromatograficzny prowadzi się przez rozwijanie jedynie buforem wyjściowym, objętość próby jest istotna dla rozdziału i nie może przekraczać 1–5% objętości złoża kolumny. Jeśli — jednakże — warunki procesu są tak dobrane, że substancje będą wymywane z kolumny na zasadzie zmiany gradientu pH lub wzrostu siły jonowej, składniki są początkowo adsorbowane na szczycie kolumny. W tym przypadku nie objętość, lecz bezwzględna ilość wiązanych związków w próbce jest daleko ważniejsza dla procesu. Oznacza to, że na kolumnę z jonowymieniaczem można wprowadzać duże objętości rozcieńczonych roztworów biopolimerów, takich np, jak ubogie frakcje z

etapu chromatografii sitowej. Jonowymieniacz pozwala wtedy na zagęszczenie frakcjonowanego składnika. Jeśli substancje zanieczyszczające mają być zaadsorbowane na kolumnie, a interesujący nas związek powinien przez nią przechodzić, objętość próby jest także mniej ważna niż ilość występujących w niej składników wiązanych do jonitu.

4. Wprowadzanie próby do kolumny

Są trzy sposoby wprowadzanie próby do złoża jonitu kolumny.

a) Wprowadzenie próby do żelu z usuniętym buforem. Metoda ta nie wymaga dodatkowego wyposażenia, lecz jest stosunkowo trudna w należyтым wykonaniu. Przeprowadza się ją w następujący sposób: pozostawia się odpływ kolumny otwarty dla spłynięcia buforu, do momentu osuszenia jego górnej powierzchni. Następnie — przy pomocy strzykawki — nanosi się próbę na powierzchnię żelu i pozostawia do spłynięcia do wewnątrz złoża. Kiedy cała próba wnika do jonitu, górną część kolumny przemywa się pewną ilością buforu wyjściowego i kolumnę podłącza do elucji. Sposób ten doprowadza często do zniszczenia powierzchni jonitu. Dlatego dużą pomocą na tej drodze dozowania stanowią, umieszczone na wierzchu złoża, odpowiednie tygielki z porowatym dnem.

b) Wprowadzanie próby pod warstwę buforu. Przy tym sposobie wprowadzania próby pozostawia się nadmiar buforu nad złożem jonitu. Próbę wprowadza się — przy pomocy strzykawki lub pompy perystaltycznej — przez kapilarny wężyk, którego wylot umieszcza się pod buforem tuż nad powierzchnią żelu. Przed dokonaniem takiego dozowania należy mieć na uwadze, aby наносzona próbka miała gęstość nieco większą niż bufor nad jonowymieniaczem. W tym celu, do jej roztworu w buforze wyjściowym, dodaje się małą ilość niejonowej substancji, np. glukozy. Kolumnę łatwo łączy się następnie do zbiornika z buforem i przeprowadza proces rozdzielania.

c) Wprowadzenie próby przez adaptor. Jeżeli kolumna wyposażona jest w adaptor z porowatą przegrodą dociśniętą do złoża żelu, próbę wprowadza się bezpośrednio przy pomocy pipety, strzykawki, dodatkowych dozowników prób lub zlewki z użyciem pompy perystaltycznej, względnie podciśnieniowe zasanie próby. Kolumnę przemywa się jedną objętością kolumnową buforu wyjściowego i rozpoczyna proces elucji interesującej nas substancji.

5. Elucja

Jeśli warunki procesu są tak dobrane, że substancje stanowiące zanieczyszczenia interesującego nas składnika są adsorbowane na kolumnie, wtedy nie dokonuje się żadnych zmian w warunkach elucji, ponieważ izolowana przez nas substancja przechodzi bez przeszkód przez kolumnę. Natomiast, kiedy proces umożliwia wiązanie badanego związku przez jonit kolumny, elucja tego związku musi być dokonana przez zmiany albo pH buforu, siły jonowej lub obu tych cech jednocześnie. Warunki procesu w wielu przypadkach mogą być tak określone, że składniki próby są rozdzielane przez elucję buforem wyjściowym. Sposób taki nazywany jest elucją izokratyczną. Ten rodzaj wypierania związku ze złoża jonowymieniacza jest korzystny, ponieważ proces nie wymaga zastosowania mieszalnika gradientu i — jeśli wszystkie początkowo zatrzymane na kolumnie substancje są także eluowane buforem wyjściowym — nie jest konieczna regeneracja kolumny. Czas rozdzielania przy użyciu elucji izokratycznej jest stosunkowo długi, a niektóre ze składników mogą być zatrzymywane przez jonit w sposób nieodwracalny, tak, że praktycznie do elucji lub regulacji wymagana jest zmiana niektórych warunków.

5.1. Zmiana pH

Jak wspomniano wypadkowy ładunek cząsteczki białkowej zależy od pH buforu, w którym się ona znajduje. Dlatego zmiany pH, wobec punktu izoelek-

trycznego substancji białkowej, przyczyniają się do strat tego ładunku, a więc są powodem odrywania cząsteczek od jonowymieniacza (desorpcji) i ich elucji ze złoża kolumny.

5.2. Zmiana siły jonowej

W warunkach niskich wartości siły jonowej buforu i stosunkowo dużego stężenia izolowanego biopolimeru, współzawodnictwo obu rodzajów cząsteczek w stosunku do naładowanych grup jonowymieniacza zachodzi w minimalnym zakresie, a substancja jest silnie wiązana. Podczas wzrostu siły jonowej układu, wzrasta współzawodnictwo cząsteczek buforu o naładowane grupy jonitu, co w efekcie prowadzi do elucji tych ostatnich cząsteczek z kolumny. Podkreślić należy, że istotnym momentem przed zastosowaniem gradientu siły jonowej, jest przemycie kolumny wyjściowym buforem.

5.3. Wybór rodzaju gradientu

Składniki próby wykazują zwykle różne powinowactwo do jonowymieniacza i dlatego zmiany w pH oraz siły jonowej eluenta mogą wywoływać ich elucję w różnym czasie, a z kolei ich rozdział — jednego od drugiego. Elucję składników można przeprowadzić przy użyciu albo ciągłego, albo skokowego gradientu. Ciągły gradient pH jest trudny do wytworzenia w stałej wartości siły jonowej. Gradient taki nie może być uzyskany przez zmieszanie buforów o różnym pH w liniowych warunkach objętościowych, ponieważ pojemność buforowa uzyskiwanych układów jest zależna od wartości pH. W dodatku bufor, który ustala buforowanie reaguje z jonowymieniaczem. Gradient skokowy jest łatwiejszy do uzyskania i jest bardziej powtarzalny niż gradient liniowy. Za każdym razem, kiedy bufor zrównoważa jonowymieniacz, proces ten zachodzi w krótkim okresie przed osiągnięciem nowego pH. Gradienty pH mogą być w kombinacji z gradientem siły jonowej.

Ciągły gradient siły jonowej jest łatwy do wytworzenia i — w praktyce — bardzo powtarzalny. Dwa bufory o różnej sile jonowej są mieszane razem i jeśli ułamki objętościowe obu roztworów rosną liniowo (oba naczynia mieszalnika gradientu są walcami o tych samych wymiarach), siła jonowa powstałego roztworu zmienia się też w ten sam sposób.

Tab. 1. Kierunek zmiany gradientu w elucji składników ze złoża kolumny chromatograficznej

Jonowymieniacz	Kierunek zmiany gradientu pH	Kierunek zmiany gradientu siły jonowej
Anionit	malejący	wzrastający
Kationit	wzrastający	wzrastający

Gradient skokowy siły jonowej jest wytwarzany przez kolejne użycie tego samego buforu o wrastającej sile jonowej. Kierunek zmiany gradientu, przy elucji składników z kolumny wypełnionej jonitami różnego rodzaju, ujmują tab. 1. Elucja w gradiencie skokowym jest prostsza, lecz posiada pewne ujemne następstwa. Eluowane substancje, w warunkach ostrych zmian pH lub siły jonowej, mają tendencję do elucji razem i dlatego piki posiadają ostre fronty, a wydłużone ogony, ponieważ zawierają więcej niż jeden składnik. Ogonowanie może prowadzić do pojawiania się fałszywych pików, jeśli zmiana buforu jest dokonana za wcześnie. Liniowe gradienty pozwalają na uzyskiwanie w elucji symetrycznych pików należących do poszczególnych składników i dają lepsze rozdzielanie. Różnice między ciągłym i skokowym gradientem przedstawiono na ryc. 1 (2).

Całkowita objętość eluenta w gradiencie powinna być ok. 5× większa niż objętość złoża kolumny.

Gradienty uzyskiwane z większych objętości mogą prowadzić do nadmiernych rozmyć poszczególnych frakcji i ich rozcieńczeń, podczas gdy gradienty otrzymane z objętości mniejszych mogą nie pozwolić na dostateczny rozdział. Elucja gradientowa jest często stosowana w chromatografii biopolimerów, gdyż zapobiega dyfuzji składników w złożu jonowymienia-cza i prowadzi do uzyskiwania ostrych stref (zateń-zania składników).

5.4. Mieszalniki gradientu

Dokładne i powtarzalne gradienty pH oraz siły jonowej (stężenia) są najlepiej wytwarzane przy pomocy odpowiednich mieszalników. Wyłączając z omówienia drogie choć uniwersalne mieszalniki o skomplikowanej budowie elektronicznej, gradienty pH oraz siły jonowej mogą być uzyskiwane w prostych urządzeniach, łatwych do wykonania. Składają się one z dwu komór jednakowej pojemności, połączonych zamykanym przewodem oraz mieszadła elektrycznego. W zależności od kształtu budowy tych komór — w przypadku siły jonowej — otrzymuje się gradient liniowy, bądź określony krzywą wypukłą lub wklęsłą (ryc. 2). Obie komory są w każdym przypadku wypełnione tym samym buforem do tego samego poziomu, lecz o różnej sile jonowej. Komora z mieszalnikiem zawiera bufor wyjściowy (o niższym stężeniu) i jest podłączona do kolumny, zaś druga komora buforem o stężeniu granicznym (o najwyższej dla warunków rozdziału sile jonowej). Jeśli próba zawiera dużą liczbę składników, bufor graniczny powinien mieć siłę jonową najniższą z możliwych, jaka jeszcze może spowodować elucję z kolumny interesującego nas składnika. Powstają wtedy warunki najkorzystniejszego oddzielenia tego składnika od innych — stanowiących zanieczyszczenia. Jeśli próba zawiera tylko parę składników, a rozdział ich jest dobry, bufor graniczny może posiadać wyższą siłę jonową, tak, aby umożliwić usunięcie najmocniej związanych z jonitem substancji i ułatwić regenerację kolumny. Bardziej sztywne jonowymieniacze — DEAE-Sephacel, jonowymieniacze sefarozowe oraz oparte na sefadesie G-25 — mogą być powtórnie równoważone w kolumnie bez jej rozpakowywania. Jonowymieniacze oparte na sefadesie G-50 muszą być przepakowywane do regeneracji, gdyż zmiana gradientu wywołuje kurczenie lub pęcznienie ich ziaren.

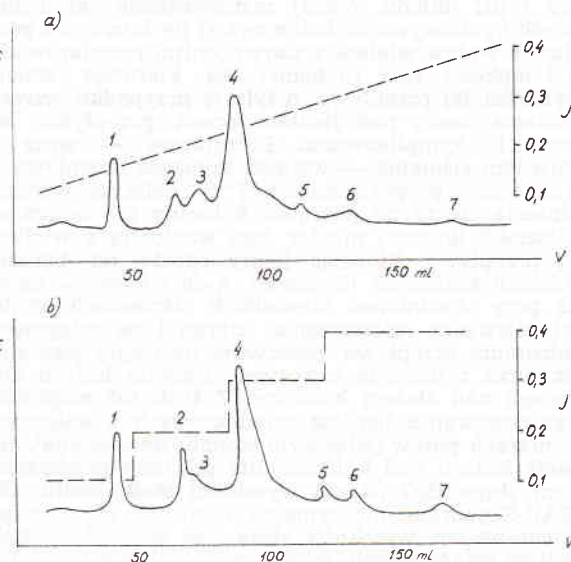
Chociaż żaden z podanych typów mieszalników gradientu nie pozwala na uzyskanie liniowego gradientu pH, każdy z nich może zostać użyty do otrzymania powtarzalnego, ciągłego gradientu pH, z dwu roztworów o różnym pH i podobnej sile jonowej. Szczególnie korzystne jest stosowanie gradientu pH przy rozdzielaniu z jonowymieniaczami sefadesowymi. Także zwilżanie silnych jonitów (QAE i SP) jest niezależne od pH w granicach 2–12 i umożliwia przeprowadzenie na kolumnie zarówno procesu elucji w gradientie pH, jak i regeneracji. Typowy gradient związany z użyciem anionowych jonowymieniaczy (malejący) uzyskuje się z 0,1 M roztworu tris o pH 10,5 i buforu tris-HCl pH 7,5. Gradient wzrastającego pH (dla kationitów) otrzymuje się z 0,1 M roztworu NaH_2PO_4 (pH 4,5) i Na_2HPO_4 (pH 8,9).

5.5. Wybór kształtu krzywej gradientu

Najczęściej zalecanym do rozdziału gradientem jest gradient liniowy. Jeśli, w pewnych warunkach, wymagany jest lepszy rozdział składników, można dokonywać zmiany kształtu krzywej gradientu. Gradient określony krzywą wypukłą może być użyty do doskonalenia rozdziału w ostatniej fazie gradientu lub przyspieszenia rozdziału, kiedy pierwsze frakcje dobrze się rozdzielają, a parę ostatnich rozdziela się w sposób wystarczający. Gradient określony krzywą wklęsłą może być zastosowany do poprawy rozdziału w pierwszej części gradientu lub do skrócenia czasu procesu, kiedy piki związków w ostatniej fazie gradientu są więcej niż dostatecznie rozdzielone.

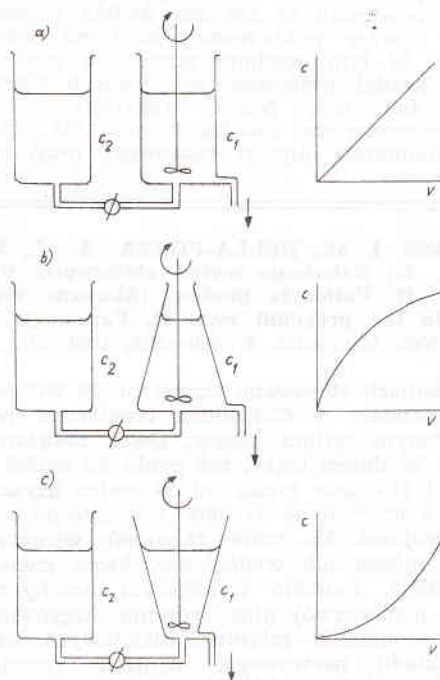
5.6. Szybkość przepływu fazy ruchomej

Szybkość przepływu fazy ruchomej jest jednym z czynników wpływających na warunki ustalania się równowagi chemicznej i w praktyce decyduje o wynikach rozdziału izolowanych składników. Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę może być określana ułamkiem objętości eluatu na jednostkę



Ryc. 1. Chromatografia białek surowicy na kolumnie z DEAE-Sephacel przy zastosowaniu elucji w buforze tris-HCl pH 6,5 i gradientu: a) liniowego, b) skokowego siły jonowej NaCl. Wymiary kolumny 15×10 cm

Objaśnienia: 1 i 2 — IgG; 3 — transferyna; 4 — albumina; 5 — haptoglobiny; 6 — antytrombina III, alfa-antytrypsyna, beta-globulina, składnik C-3; 7 — ceruloplazmina. Linia przerywana zaznaczono zmianę gradientu siły jonowej w wy-cieku kolumny. C — stężenie składników; V — objętość elu-atu; J — siła jonowa.



Ryc. 2. Typy mieszalników i rodzaje uzyskiwanych gradientów siły jonowej

Objaśnienia: C — stężenie czynnika tworzącego gradient siły jonowej ($C_2 > C_1$); V — objętość eluatu.

czasu (ml/godz.) lub jako przepływ liniowy. Przepływ liniowy wyrażany w cm/godz. jest równy przepływowi mierzonomu w ml/cm² powierzchni przekroju kolumny i czasie 1 godziny. Przepływ liniowy zależy od rozmiaru ziaren złoża jonowymieniacza i ich porowatości, wysokości i średnicy tego złoża, ciśnienia cieczy nad jonitem, lepkości fazy ruchomej, a w mniejszym stopniu — innych jeszcze czynników (temperatura i pH układu, rodzaj zastosowanego gradientu, sposób upakowywania kolumny). O ile łatwo jest przewidzieć wpływ wielkości ziaren jonitu, rozmiarów złoża i lepkości fazy ruchomej na kierunek zmiany szybkości jej przepływu, o tyle w przypadku wzrostu ciśnienia cieczy nad jonitem ocena przepływu jest bardziej skomplikowana. Początkowo — wraz ze wzrostem ciśnienia — wzrasta szybkość przepływu — praktycznie proporcjonalnie. Przy dalszym wzroście ciśnienia cieczy na początku kolumny nie osiąga się zależności liniowej między jego wartością a wielkością przepływu. Stosując jonity oparte na bardziej miękkich nośnikach (Sephadex A-50 i C-50) — nawet już przy stosunkowo niewielkich ciśnieniach występuje zjawisko spłaszczenia ziaren i po osiągnięciu maksimum przepływu, obserwuje się ciągły jego spadek wraz z dalszym wzrostem ciśnienia buforu eluującego nad złożem kolumny. Z tych też względów, przy stosowaniu jonitów sefadeksowych o większych wymiarach porów (większym stopniu uwodnienia), ciśnienie buforu nad kolumną nie powinno przekraczać 2 cm słupa H₂O na cm wysokości złoża jonitu. Dla DEAE-Sephacelu maksymalne ciśnienie może sięgać 15 cm na cm wysokości złoża, zaś przy stosowaniu jonitów sefarożowych, jeszcze wyższych wartości. Tak jak i w innych typach chromatografii, optymalny rozdział uzyskuje się jednak przy niższych niż maksymalne szybkościach przepływu fazy ruchomej, a więc przy stosowaniu niższych niż maksymalne ciśnieniach buforu nad złożem kolumny (1).

5.7. Zbieranie i rejestracja frakcji

Wypływający z kolumny eluat zbiera się do probówek z wykorzystaniem automatycznego kolektora frakcji. Poszczególne składniki rozdzielanych mieszanin rejestruje się albo w trakcie elucji, gdy rozprowadza się fotometrem z kufką przepływową i możliwością rejestracji w 280 nm (białka i peptydy) i 254 nm (kwasy nukleinowe), bądź po dokonaniu rozdziału. W tym ostatnim przypadku analizuje się płyn w każdej probówce, w podanych wartościach długości fali, przy pomocy spektrofotometru UV. Spektrofotometryczna analiza innych, niż wymieniono, biopolimerów (lipidy, cukrowce), musi być po-

przedzona wykonaniem reakcji składnika w roztworze każdej probówki ze swoistym odczynnikiem, prowadzącej do powstania kompleksu barwnego. Z uzyskanych wartości sporządza się wykres zależności stężenia składnika od objętości eluatu. Płyny probówek określone jedną symetryczną krzywą (pikiem), zawierające jeden składnik, zlewa się razem i wykorzystuje do dalszych badań.

5.8. Wymiana jonowa jednostopniowa

Nie ma zasadniczych różnic w procedurze rozdzielania składników między chromatografią kolumnową z zastosowaniem elucji skokowej, a postępowaniem w statycznym procesie wymiany jonowej. Tak samo jak w rozdziale dynamicznym albo interesująca nas substancja, albo zanieczyszczenia, mogą być wiązane przez jonowymieniacz. Chociaż statyczna wymiana jonowa jest mniej wydajna niż technika kolumnowa, posiada jednak pewne cechy przewagi, szczególnie w przebiegu procesu na dużą skalę. Statyczna wymiana jonowa jest techniką wymagającą mało czasu, charakteryzującą się poza tym nieskomplikowanym przebiegiem i brakiem trudności, na jakie napotyka proces kolumnowy podczas spęczniania lub kurczenia się niektórych typów jonowymieniaczy. Kurczenie może nawet być tu korzystne w szeregu zastosowań.

Statyczna wymiana jonowa jest prowadzona przez mieszanie jonowymieniacza — zrównoważonego poprzednio w odpowiednim buforze — z roztworem składników próby i doprowadzenie układu do stanu równowagi. Proces ten zabiera zwykle około 1 godziny. Płyn nad osadu jonowymieniacza jest następnie filitrowany, a jonit przemywany buforem wyjściowym. W przypadku niekompletnej adsorpcji składnika, procedura ta powinna być powtórzona (lub powtarzana) przez zmieszanie filtratu z nową porcją jonowymieniacza. Zaadsorbowana substancja może być następnie desorbowana z jonitu, po rozprowadzeniu go w roztworze o wyższej sile jonowej lub zmienionym pH.

Piśmiennictwo

1. DEAE-Sephacel CL-6B, CM-Sephacel CL-6B for ion-exchange chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1976.
2. Hill E.: Laboratory Products Revs. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1978.
3. Ion-exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1980.
4. Sephadex ion exchangers. A guide to ion-exchange chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1976-8.
5. Wierciński J.: Medycyna Wet. 38, 110, 1982.

Adres autora: doc. dr habil. Janusz Wierciński, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.

PEARSONS J. M., DELLA-PORTA A. J., SNOWDON W. A.: Zakażenie owiec ciężarnych wirusem Akabane. II. Patologia płodów. (Akabane virus infection in the pregnant ewe. II. Pathology of the foetus). Vet. Microbiol. 6, 209—224, 1981 (3).

W badaniach stosowano szczep nr 16 wirusa Akabane izolowany z *Culicoides brevitarsis* poddany trzem różnym seriom pasażu. Owce zakażano między 32 a 36 dniem ciąży, zaś płody do badań pobierano 69 i 106 dnia życia. Od 39 owiec uzyskano 55 płodów, z których 44 tj. 80% wykazywało zaburzenia rozwojowe. Na czoło zaburzeń wysuwała się agenezja mózgu lub wodogłowie, które stwierdzono u 43 płodów. Ponadto występował brachygnatyzm, skolioza, niedorozwój płuc, rdzenia kręgowego, zanik i zwyrodnienie mięśni szkieletowych, ośrodkowego układu nerwowego, ogniska rozmiękania, obrzęk i nacieki wokół naczyń mózgowych oraz ogniska mineralizacji w mózgu. Zmiany o podobnym charakterze występowały również w moście.

G.

DELLA-PORTA A. J., Mc PHEE D. A., WARK M. C., ST. GEORGE T. D., CYBIŃSKI D. H.: Badania serologiczne dwóch dodatkowych szczepów wirusa choroby niebieskiego języka CSIRO 154 i CSIRO 156. (Serological studies of two additional Australian blue-tongue virus isolates CSIRO 154 and CSIRO 156). Vet. Microbiol. 6, 233—253, 1981 (3).

Badania serologiczne surowic krów w Północnej Australii wykazały obecność przeciwciał swoistych dla typu 20 wirusa choroby niebieskiego języka (BTV). Przeciwciała były aktywne w odczynie precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym i w odczynie wiązania dopełniacza. Natomiast nie można ich było wykryć w odczynie seroneutralizacji. W 1979 r. podjęto próby izolacji tego typu wirusa, który uprzednio nie występował na terenie Australii. Wysobnione od krów zdrowych szczepy CSIRO 154 i CSIRO 156 nie różniły się od BVT20 w odczynie immunodifuzji i immunofluorescencji. Dalsze badania w odczynie seroneutralizacji, teście hamowania i redukcji łyśinek wykazały identyczność szczepu CSIRO 154 z BVT1 i duże podobieństwo szczepu CSIRO 156 z wirusem BVT6.

G.