

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY STRZEŻEK, ALEKSANDER WOŁOS

Wskaźniki biochemiczne w zastosowaniu do oceny jakości nasienia zwierząt gospodarskich. IV. Właściwości biochemiczne 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia tryka

Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt WSR w Olsztynie
Dyrektor: prof. dr W. MINAKOWSKI

Spośród enzymów nasienia zwierząt poważną grupę stanowią fosfatazy (fosfohydrolazy). Spełniają one ważną rolę w metabolizmie estrów fosforanowych cukrów, kwasów nukleinowych i nukleotydów oraz szeregu innych estrów fosforanowych, będących metabolitami przemian enzymatycznych zachodzących w nasieniu.

Stosunkowo duża aktywność fosfatazowa nasienia pochodzi z plazmy. Najbardziej poznane są dotychczas fosfatazy kwaśne i zasadowe plazmy, które są obecne również i w plemnikach (6).

Fosfatazy z grupy tzw. nukleaz, biorące udział w przemianach kwasów nukleinowych i nukleotydów są mało jeszcze poznane. Ich funkcja w nasieniu wiąże się z tempem biosyntezy kwasów nukleinowych podczas spermatogenezy (11, 12). Potwierdzały to fakt wykrycia niektórych nukleaz w tkance jądrowej (3). Istnieją również przypuszczenia, że zaburzenia przemian kwasów nukleinowych, zwłaszcza DNA plemników, powodowane są zmianami aktywności enzymów nukleolitycznych (1). Jak wiadomo ma to odzwierciedlenie w zaburzeniu płodności rozplodników (1, 9).

W ostatnim czasie stwierdzono w nasieniu buhaja aktywność rybonukleazy (4). Znacznie wcześniej sygnalizowano obecność kilku typów ATPaz oraz 5'-nukleotydyazy (6). Aktywność 5'-nukleotydyazy nasienia zwierząt jest wyższa od aktywności pozostałych nukleaz. Głównym źródłem tego enzymu u buhaja są pęcherzyki nasienne.

Mimo, że enzym ten został wyizolowany z plazmy nasienia buhaja oraz określono jego właściwości (2), to rola jego w nasieniu nadal pozostaje niewyjaśniona.

Stosowane skróty: 5'-AMP — adenozyjno-5'-monofosforan, 5'-dAMP — 2-dezoksyadenozyno-5'-monofosforan, 3'-AMP — adenozyjno-3'-monofosforan, 5'-GMP — guanozyjno-5'-monofosforan, 5'-UMP — urydyno-5'-monofosforan, 5'-TMP — tymidyno-5'-monofosforan, 5'-dCMP — 2-dezokscytydyno-5'-monofosforan, 3'-CMP — cytydyno-3'-monofosforan; ATP-aza — adenozynotrójfosfataza (fosfohydrolaza ATP).

Brak jest również danych odnośnie 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia tryka, u którego nasienie procesów metabolicznych w nasieniu jest szczególnie intensywne. Należy przypuszczać, że enzymy plazmy tryka, między innymi 5'-nukleotydyaza, różnią się nie tylko budową i aktywnością, ale i mechanizmem działania.

Dlatego celem niniejszej pracy była próba izolacji 5'-nukleotydyazy z plazmy nasienia tryka i określenie niektórych jej właściwości biochemicznych.

Materiał i metody

Nasienie tryka otrzymane na sztuczną pochwę, o dobrej koncentracji i ruchliwości plemników, odwirowywano dwukrotnie w ciągu 15 minut przy 13 000 obr./min. Plazmę nasienia zlewano z nad osadu plemników i przechowywano w temp. 253° K. Po zgromadzeniu 110 ml plazmy, dokonano izolacji 5'-nukleotydyazy wg metody Heppela i Hilmoa (2), z niewielkimi modyfikacjami własnymi.

Aktywność 5'-nukleotydyazy oznaczono wg przyrostu ilości nieorganicznego fosforu w inkubowanych próbach w temp. 310° K i wyrażano w μ molach fosforu, uwolnionego podczas 15-minutowej inkubacji, na mg białka. Fosfor nieorganiczny oznaczano wg metody Fiske i Subbarow.

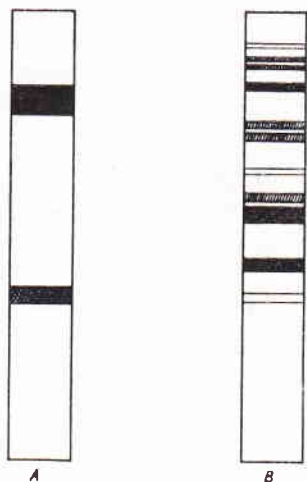
Jako substratów użyto preparatów 5'-AMP (f-my Koch), oraz 5'-dAMP, 3'-AMP, 5'-dCMP, 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-TMP (f-my Calbiochem). Rozdziałów elektroforetycznych otrzymanego preparatu 5'-nukleotydyazy dokonano na żelu poliakrylamidowym wg Daviesa. Zawartość białka oznaczano metodą biuretową wg Weichkselbauma.

Ciężar molekularny uzyskanego preparatu enzymatycznego określono metodą cienkowarstwowej chromatografii na żelu Sephadex G-200 (Superfine) wg instrukcji f-my Pharmacia. Jako białek standardowych użyto cytochrom c (f-my Fluka i Buchs), albuminę surowicy bydłowej oraz kazeinę (f-my BDH).

Wyniki

Obserwacje elektroforetyczne na żelu poliakrylamidowym uzyskanego preparatu 5'-nukleotydyazy wykazały obecność jednej dużej frakcji w obrębie gamma-globulin oraz drugiej, o mniejszym stężeniu, o ruchliwości albumin (ryc. 1).

Aktywność specyficzna uzyskanego preparatu enzymatycznego była 9-krotnie wyższa od aktywności wyjściowej plazmy nasienia przy użyciu 5'-AMP jako substratu.



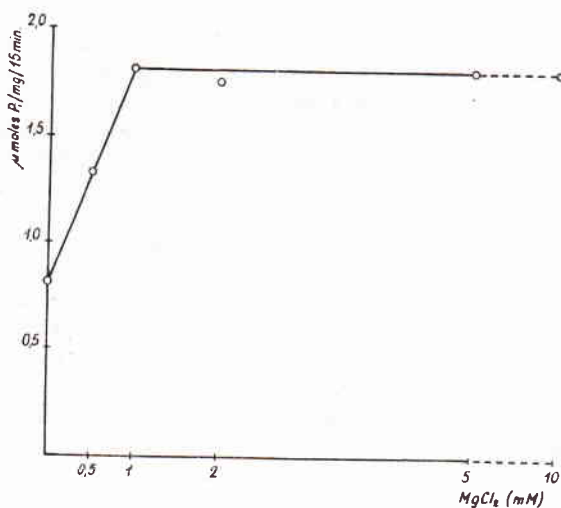
A 5' nucleotidase preparation from ram seminal plasma
B ram seminal plasma

Ryc. 1. Schemat rozdziłu elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym.

Ryc. 2 przedstawia aktywujący wpływ jonów Mg^{++} . Stężenie 1 mM $MgCl_2$ okazało się stężeniem optymalnym, które powoduje wzrost aktywności 5'-nukleotydyazy o 123% w porównaniu z próbami nie zawierającymi jonów Mg^{++} . Wzrost stężenia tych jonów do 10 mM nie powoduje dalszego wzrostu aktywności enzymu.

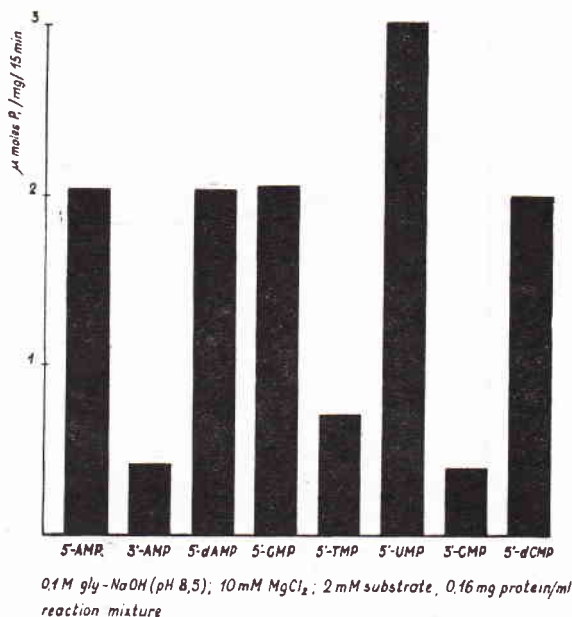
Badania dotyczące powinowactwa substratowego 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia tryka przedstawia ryc. 3.

5'-nukleotydaza hydrolizuje w jednakowym stopniu zarówno 5'-rybonukleotydy jak i 5'-de-



0,1M gly - NaOH (pH 8,5); 0,7mM 5'-AMP; 0,16mg protein/ml reaction mixture

Ryc. 2. Wpływ stężenia jonów magnezowych na aktywność 5'-nukleotydyazy.



Ryc. 3. Aktywność 5'-nukleotydyazy w zależności od rodzaju nukleotydu.

zoksyrybonukleotydy, z wyjątkiem 5'-UMP oraz 5'-TMP. W przypadku bowiem 5'-UMP enzym wykazuje o 34% wyższą aktywność aniżeli wobec 5'-AMP jako substratu oraz o ponad 66% niższą aktywność wobec 5'-TMP. 3'-fosforany nukleozydów (np. 3'-AMP, 5'-CMP) są hydrolizowane przez ten enzym prawie 5-krotnie słabiej niż 5'-AMP.

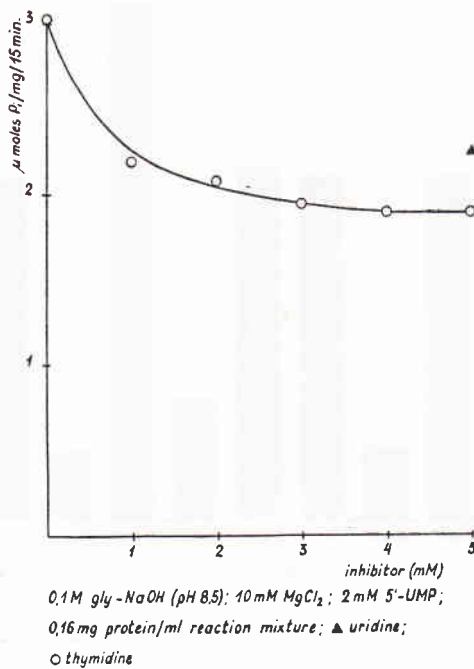
Podjęto próby wyjaśnienia małego powinowactwa 5'-nukleotydyazy do 5'-TMP dokonując oznaczeń aktywności tego enzymu w obecności tymidyny i urydyny.

Wyniki przedstawione na ryc. 4 wskazują, że aktywność enzymu, oznaczona wobec 5'-UMP jako substratu, obniża się bardziej w obecności tymidyny niż w obecności urydyny, przy takim samym stężeniu nukleozydu. Tymidyna, w stężeniu 5 mM, zmniejsza bowiem aktywność enzymu o 36% (tj. do poziomu aktywności 5'-nukleotydyazy oznaczonej wobec 5'-AMP), podczas gdy urydyna obniża aktywność tego enzymu tylko o 25%.

Maksymalną szybkość hydrolizy 5'-AMP przez enzym zaobserwowano przy 2 mM stężeniu 5'-AMP. Szybkość ta utrzymuje się praktycznie do 4 mM stężenia 5'-AMP. Przy 5 mM pojawia się słabe hamowanie substratowe, które 10 mM stężeniu substratu dochodzi do 35% (ryc. 5).

Stała Michaelisa-Menten, wyznaczona przy pomocy pochyłej Lineweavera-Burka, wynosi $3,25 \times 10^{-4}$ M (ryc. 6).

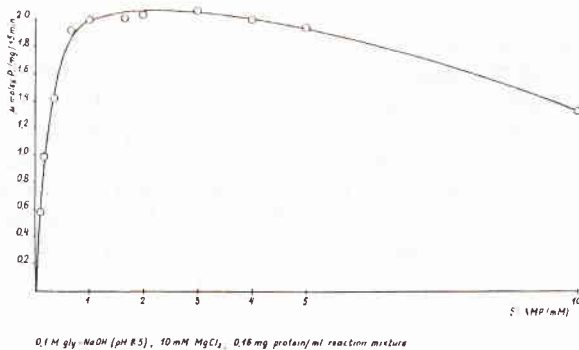
Na ryc. 7 przedstawiono zachowanie się aktywności 5'-nukleotydyazy w zależności od pH (przy użyciu jako substratu 5'-AMP), w obecności jonów M^{++} jak i w przypadku ich nieobecności. Z ryc. 7 wynika, że enzym ten



Ryc. 4. Wpływ nukleozydów na aktywność 5'-nukleotydyazy

posiada dwa optima pH: 8,5—9,1 oraz 9,7 i to w obu w/w przypadkach.

Wyniki dotyczące oznaczania ciężaru molekularnego preparatu 5'-nukleotydyazy plazmy nasienia tryka wskazują, że główna frakcja (o ruchliwości gamma — globulin) posiada ciężar około 110 tys. Natomiast druga frakcja, występująca w bardzo niskim stężeniu, posiada ciężar około 50 tys.

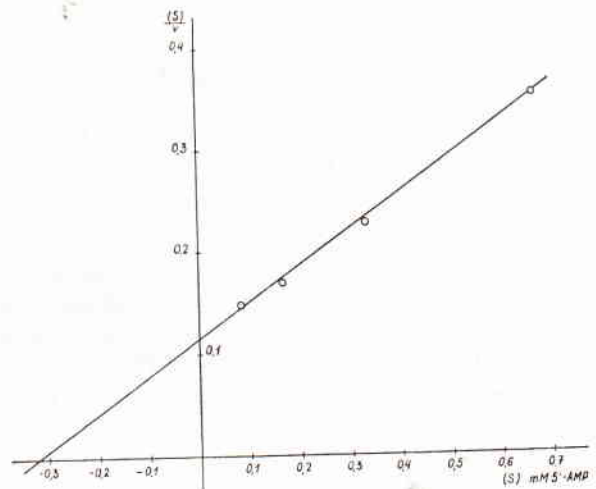


Ryc. 5. Wpływ stężenia substratu na aktywność 5'-nukleotydyazy

Omówienie wyników

Już w trakcie izolacji 5'-nukleotydyazy z plazmy nasienia tryka stwierdzono pewne cechy tego enzymu, różniące go od enzymu występującego w plazmie nasienia buhaja. Przy frakcjonowaniu bowiem etanolem zastosowano dwukrotnie wyższe jego stężenia w dializacie (po traktowaniu siarczanem amonu), w porównaniu do stężenia etanolu stosowanego przez Heppela i Hilmoe (2) przy izolacji enzymu z plazmy buhaja.

Tak jak prawie wszystkie fosfatazy, zarówno 5'-nukleotydyaza plazmy tryka jak i plazmy nasiennej buhaja są aktywowane jonami Mg⁺⁺. Należy jednak zaznaczyć, że aktywacja enzymu tryka tymi jonami jest prawie o 50% wyższa od aktywacji notowanej przez Heppela i Hilmoe (2) dla enzymu buhaja. Levin i Bodansky (5) natomiast stwierdzają aktywację 5'-nukleotydyazy różnymi jonami dwuwartościowymi, za wyjątkiem jonów Fe⁺⁺, Ni⁺⁺ oraz Zn⁺⁺, które hamowały aktywność enzymu o 20—40%. Należy przypuszczać, że zwłaszcza jony Mg⁺⁺, obecne w normalnej plazmie nasienia rozplodników, są niezbędne dla hydrolytycznego rozszczepiania nukleotydu uczestnicząc w połączeniach enzym — substrat.

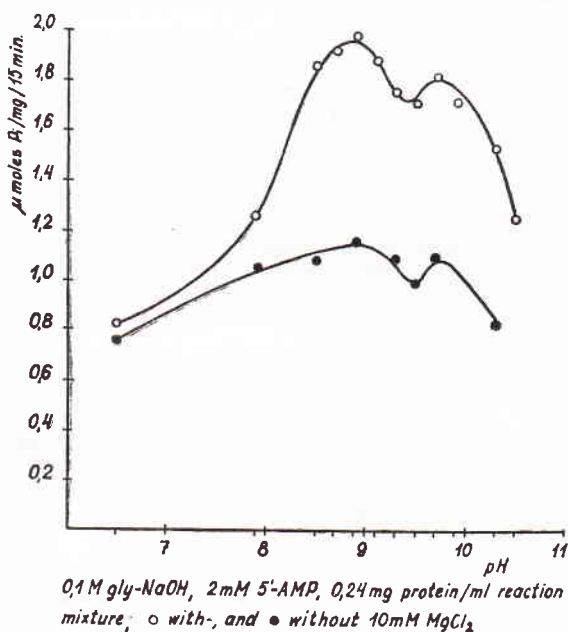


Ryc. 6. Graficzne wyznaczenie stałej Michaelisa — Menten wg Lineweavera — Burka.

Analizując powinowactwo izolowanego przez nas enzymu tryka w stosunku do poszczególnych rybonukleotydu i dezoksyrybonukleotydu należy podkreślić, że enzym ten w odróżnieniu od enzymu buhaja, z nielicznymi wyjątkami, hydrolizuje wszystkie 5'-nukleotydy. Ta właściwość różni go od enzymu buhaja, który wg Heppela i Hilmoe (2) oraz Levina i Bodanskiego (5) posiada wysoką specyficzną substratową w stosunku do 5'-rybonukleotydu, natomiast 4—10 razy niższą w stosunku do dezoksyrybonukleotydu. Wskazywałoby to na inny mechanizm hydrolytycznego rozszczepiania 5'-nukleotydu przez enzym tryka. Hipoteza Levina i Bodansky'ego zakłada mianowicie, dla 5'-nukleotydyazy plazmy buhaja wiązanie się substratu z centrum aktywnym enzymu poprzez cukrową część nukleotydu przy udziale tlenu w pozycji 2'. Autorzy ci podkreślają ponadto niepoślednią rolę jonów Mg⁺⁺ przy tworzeniu kompleksu enzym — substrat w procesie hydrolyzy nukleotydu. Jony magnezu wiązałyby resztę fosforanową nukleotydu z odpowiednim miejscem centrum aktywnego 5'-nukleotydyazy, przy czym wiązanie to two-

rybyłoby się lub dysocjowało w zależności od pH środowiska.

Nasze badania wskazują na mniejszą specyficzność 5'-nukleotydyazy tryka, ponieważ posiada ona jednakowe powinowactwo zarówno do 5'-rybonukleotydów jak i 5'-dezoksyrybonukleotydów. Z uwagi jednakże na małe powinowactwo do 3'-nukleotydów, byłby raczej możliwy do przyjęcia dla tego enzymu typ wiązania wodorowego między atomem tlenu w pozycji 3'-rybozy (lub dezoksyrybozy) a grupą NH fragmentu peptydowego aktywnego centrum enzymu. Podobny model podali Tonomura i wsp. (10) dla ATP-azy miozynowej mięśnia poprzecznie prążkowanego. Należy również przypuszczać, że małe powinowactwo enzymu do 5'-TMP, jakie zaobserwowaliśmy, spowodowane jest obecnością grupy metylowej w pozycji 5'-pierścienia pirymidynowego. Przypuszczenie to potwierdzałby fakt, że aktywność 5'-nukleotydyazy, oznaczana wobec 5'-UMP jako substratu, obniża się bardziej w obecności nukleozydu — tymidyny niż urydyny, przy takim samym ich stężeniu.



Ryc. 7. Wpływ pH na aktywność 5'-nukleotydyazy.

Biorąc pod uwagę aktywność 5'-nukleotydyazy w zależności od pH środowiska, należy stwierdzić stosunkowo dużą tolerancję enzymu na zmiany pH. Mimo, że Heppel i Hilmoie (2) stwierdzili jedno optimum pH dla 5'-nukleotydyazy plazmy buhaja, to w ostatnim czasie Levin i Bodansky (5) podają dwa optima pH uzależnione od obecności jonów Mg^{++} .

Jedno optimum pH występowało przy $pH=7,5-8,0$, drugie natomiast przy $pH=9,1-9,3$. W nieobecności jonów Mg^{++} autorzy ci stwierdzili jedynie jedno optimum przy $pH=7,5-8,0$. Dla 5'-nukleotydyazy tryka stwierdziliśmy

dwa optima pH występujące zarówno w obecności jonów Mg^{++} , jak i ich braku, mimo proporcjonalnie obniżonej aktywności enzymu w ostatnim przypadku.

Levin i Bodansky (5) odrzucają hipotezę obecności dwóch izoenzymów 5'-nukleotydyazy plazmy buhaja z różnymi optimami pH. Sugerują natomiast obecność 4 różnych miejsc aktywnych zależnych od pH środowiska. Należy zaznaczyć, że autorzy ci badali tylko kilka właściwości izolowanego preparatu 5'-nukleotydyazy.

Nasze badania nad enzymem nasienia tryka wskazują wyraźnie na występowanie w uzyskanym preparacie dwóch białek o aktywności 5'-nukleotydyazy. Ostatnio Buruiana i Dema (1) dla izolowanego enzymu plazmy buhaja, stosując sączenie na żelu Sephadex G-200, stwierdzili kilka izoenzymów 5'-nukleotydyazy. Badania immunologiczne, jakie zapoczątkowaliśmy, powinny w pełni wyjaśnić to zagadnienie.

Mając na względzie praktyczne zastosowanie badań nad 5'-nukleotyduzą należy zasygnalizować, że istnieją powiązania między aktywnością androgenną jąder a aktywnością nukleotydyazy.

Shirley i wsp. (8) badając mianowicie wpływ diety białkowej na aktywność 5'-nukleotydyazy, zawartość kwasu cytrynowego i fruktozy zaobserwowali spadek wszystkich badanych wskaźników u buhajków z obniżoną dietą białkową. Prawdopodobnie, tak jak w przypadku aktywności 5'-nukleotydyazy nadnercza szczurów (7), również i 5'-nukleotyduza nasienia znajduje się pod kontrolą testosteronu. Zwłaszcza, że głównym źródłem 5'-nukleotydyazy nasienia są pęcherzyki nasienne, których aktywność wydzielnicza znajduje się pod kontrolą androgenów. Należy przypuszczać, że aktywność 5'-nukleotydyazy może być również wskaźnikiem stanu czynnościowego pęcherzyków nasiennych.

Interesujące dane zawiera praca Buriana i Dema (1). Autorzy stwierdzili mianowicie obecność dwóch typów 5'-nukleotyduz w plazmie nasienia buhaja w zależności od stanu układu rozrodczego. W stanach patologicznych mających odzwierciedlenie w niepłodności rozplodników lub obniżonej płodności, pojawia się bowiem w plazmie enzym o zupełnie odmiennych właściwościach biochemicznych w porównaniu z enzymem nasienia normalnego. Aktywność jego rosła proporcjonalnie w miarę dodawania substratu (5'-AMP) aż do stężenia 12 μ moli. Normalny typ 5'-nukleotydyazy, występujący u 98% analizowanych prób nasienia, obniża swoją aktywność przy stężeniu 4 μ moli 5'-AMP. Nasze wstępne obserwacje dla nasienia pochodzącego od tryków niepłodnych wskazują natomiast na wyraźnie obniżoną aktywność 5'-nukleotydyazy w plazmie.

Mając na uwadze udział 5'-nukleotydyazy w biosyntezie kwasów nukleinowych, prawdopo-

dobnie poprzez genetycznie uwarunkowane powinowactwa enzymu do różnych 5'-nukleotydów, należy przypuszczać, że większa lub mniejsza aktywność 5'-nukleotydazy w stanach patologicznych, znajduje swoje odzwierciedlenie w niskich lub wysokich poziomach DNA w plemniku. Byłoby to również wyjaśnieniem stwierdzonych anomalii w ilości DNA w plemnikach osobników nieplodnych (9).

Sprawa nie jest ostatecznie wyjaśniona.

Badań wymagają także właściwości immunologiczne enzymu ze względu na możliwość immunizacji samców w przypadkach zmian czynnościowych układu rozrodczego. Można przypuszczać, że 5'-nukleotydaza należy nie tylko do antygenów plazmy nasienia, ale również do tzw. antygenów okrywowych plemnika.

Piśmiennictwo

1. Buruiana L. M., Dema A.: *Revue roumaine de biochimie* 2, 91, 1963.
2. Heppel L. A., Hilmoe R. J.: *J. Biol.* 133, 665, 1951.
3. Iosifow K., Cekowa E., Kostadinow D.: *Weterinarnomed. nauki* 7, 47, 1970.
4. Libonati M., Floridi A.: *European J. Biochem.* 3, 81, 1969.
5. Levin S. J., Bodansky O.: *J. Biol. Chem.* 241, 51, 1966.
6. Mann T.: *Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen, London, 1964.
7. Negri L., Weber G.: *Excerpta. Med. sect. V*, 8, 457, 1955.
8. Shirley R. L., Meacham T. N., Warnick A. C., Heutges J. F. W., Cunha T. J.: *Anim. Sci.*, 22, 14, 1963.
9. Strzeżek J.: *Med. wet.* 9, 552, 1970.
10. Tonomura Y., Kubo S., Imamura K.: *Molecular Biology of Muscular Contraction* s. 11, Tokyo, 1965.
11. Wachstein M., Meisel E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 2, 137, 1954.
12. Wolf A., Kabat E., Newman W.: *Amer. J. Path.*, 19, 423, 1943.

Adres autora: dr Jerzy Strzeżek, Olsztyn-Kortowo, WSR.

Стжежек Е., Волос А. — Биохимические показатели качества семени сельскохозяйственных животных. IV. Биохимические свойства 5'-нуклеотидазы из семенной плазмы барана.

В приготовленном из плазмы семени барана препарате 5'-нуклеотидазы обнаружили присутствие двух фракций. Главная фракция продвигающаяся с гамма-глобулинами имела молекулярный вес около 110 тыс.; вторая выступающая в низких концентрациях около 50 тыс. Присутствие двух фракций подтвердили также электрофоретическим анализом. Ионы магния активировали 5'-нуклеотидазу семенной плазмы барана. При концентрации этих ионов 1—10 мМ наблюдали максимальную активность фермента: она была выше на 123% чем в отсутствии Mg^{++} . Максимальную скорость гидролиза ферментов 5-АМФ отмечали при 2 мМ концентрации этого субстрата. При концентрации субстрата выше 4 мМ обнаружили субстратное торможение, которое при 10 мМ концентрации 5' АМФ достигало 35%. Михаэлис-Ментен для 5'-нуклеотидазы барана составляла $3,25 \times 10^{-4} M$. 5'-нуклеотидаза гидролизовала в равной степени все 5'-рибонуклеотиды и 5'-дезоксирибонуклеотидазы, за исключением 5'-УМФ и 5'-ТМФ. Активность 5'-нуклеотидазы в отношении к субстратом 5'-УМФ была на 34% выше и на 66% ниже чем в отношении к 5'АМФ. 3-нуклеотиды были гидролизованы ферментом 5'-кратно слабее чем 5'-АМФ. Обнаружили два оптимума рН для 5'-нуклеотидазы барана: рН = 8,5—9,1 и рН = 9,7. Полученные результаты указывают, что 5'-нуклеотидаза из семенной плазмы барана по своим биохимическим свойствам значительно отличается от этого фермента из плазмы быка.

Strzeżek J., Wołos A. — Biochemical indices applied to the evaluation of the semen quality of farm animals. IV. Biochemical properties of 5'-nucleotidase in the semen plasma of ram.

Two fractions were found in 5'-nucleotidase obtained from the semen plasma of ram. The main fraction of gamma globulin mobility possessed the molecular weight of about 110 000. The second fraction of low concentration had the weight of about 50 000. The enzyme was inactivated by Mg^{++} . At the concentration of Mg^{++} from 1 to 10 mM, the activity of 5'-nucleotidase was higher of 123% in relation to the activity of the enzyme without Mg^{++} . The maximal rate of 5-AMP hydrolysis under the influence of the enzyme was at a 2 mM concentration of the substrate. At the concentration of 10 mM 5-AMP. Michaelis-Menten's constant for 5'-nucleotidase of the ram was $3.25 \times 10^{-4} M$. The enzyme hydrolysed to the same extent 5'-ribonucleotidase as well as 5'-desoxyribonucleotidase except of 5'-UMP and 5'-TMP. The activity of 5'-nucleotidase determined against 5'-UMP was of about 34% higher and 66% lower against 5'-TMP than against 5'-AMP as a substrate. Instead 3-nucleotides were hydrolyzed 5 times less than 5'-AMP. There were noted two pH optimal values for 5'-nucleotidase of semen plasma of ram, e.g. pH 8.5-9.1 and 9.7. The results of the investigations indicated that 5'-nucleotidase of semen plasma of ram differed in many biochemical respects from 5'-nucleotidase of bull.

ŽUFFA A., BANDA I., ŽAK O., KONRAD J.: Kombi-nowane szczepienie norek przeciwko chorobie Aujeszky i botulizmowi. (Combined inoculation of minks against Aujeszky's disease and botulism). *Vet. Čas. (Košice)* 13, 141—151, 1970 (5).

Wykorzystano żywą niezdadliwą szczepionkę pko chorobie Aujeszky (zimny wariant szczepu Buc, Te 300/9,2, namnożony na hodowli komórek embrionów kury) oraz adsorbowaną anatoksynę Cl. botulinum C i ewent. D. Przebadano wyniki podania obu szczepionek oddzielnie, simultan i w postaci mieszanki. Jako wskaźnik odporności przyjęto miano neutralizujące surowicy.

Doświadczenia na morskich świnkach i norkach wykazały nieszkodliwość i skuteczność wszystkich trzech metod.

Autorzy zalecają stosowanie u norek metody kombinowanej, polegającej na 2-krotnym szczepieniu zwierząt w odstępie 4 tygodni, liofilizowaną szczepionką Aujeszky rozpuszczoną w płynnej szczepionce botulinowej.

J.

ČERNÍK K.: Wybór adjuwantów przy produkcji inaktywowanej szczepionki pko pomorowi rzekomemu kur. (The selection of adjuvants for the preparation of inactivated vaccine against Newcastle Disease). *Vet. Čas. (Košice)* 13, 179—187, 1970 (6).

Wirus namnażano na zarodkach kurzych (szczep Hertsfordshire i La Sota) lub na hodowli komórek zarodków kury (szczep Roakin 50 pasaż na hodowli komórek). Miana wyniosły: H — 107.9 — $10^{9.4}$; La Sota — $10^{6.55}$ — $10^{6.66}$; R — 107.28 . Inaktywację przeprowadzano przez dodanie 0,05% betapropiolaktonu (2 godz., 37°C). Zawiesinę adsorbowano na wodorotlenku glinu (10 i 25%), fosforanie wapnia (10%) lub dodawano oleju Bayol F z 10% Arlancel A w ilości 90%, 60% i 30%.

Badania wykazały, że najlepsze wyniki ze względu na aktywność i łatwość użycia dają szczepy H i La Sota z 90% oleju i 10 lub 25% $Al(OH)_3$ ora R/TC50 adsorbowany na 10 lub 25% $Al(OH)_3$. Dodatek 10% $Al(OH)_3$ adsorbuje 84,5% wirusa a 25% $Al(OH)_3$ — 99,63% wirusa.

J.