

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI

Chromatografia jonowymienna biopolimerów z wykorzystaniem jonowymiennicy opartych na nośnikach usieciowanych polisacharydów

Cz. I. Przygotowanie procesu chromatograficznego

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

Wyodrębnianie ze złożonych mieszanin ustrojowych oraz rozdział blisko spokrewnionych z sobą polimerycznych składników żywych organizmów, stanowi jeden z kluczowych problemów badań biochemicznych, wymagających użycia wysoko rozdzielczych metod laboratoryjnych. Jedną z najbardziej użytecznych do tego celu stała się chromatografia jonowymienna. Głównym czynnikiem warunkującym rozdział w tej technice rozdzielczej jest różnica w wielkości i rodzaju ładunków niesionych przez rozpuszczone cząsteczki. Dla przeprowadzenia procesu wystarczają już stosunkowo niewielkie odchylenia w wielkości tego ładunku, wywołane np. różnicą jednego aminokwasu w białkach i dlatego ta technika posiada ogromną zdolność rozdzielczą (3). Ponieważ cząsteczki prawie wszystkich składników biologicznych posiadają ładunek lub są polarne, chromatografia jonowymienna może być dla tych związków powszechnie stosowana. Pewną dodatkową zaletą chromatografii z wykorzystaniem jonowymiennicy (jonitów) jest to, że może ułatwić zagęszczanie składników znajdujących się w niskich stężeniach objętościowo dużych prób. Proces rozdziału charakteryzuje się prostotą, dużym stopniem powtarzalności, powszechności zastosowań (na skalę laboratoryjną i techniczną), a jonowymiennice są stosunkowo łatwo dostępne w handlu i trwałe w użytkowaniu.

Zachodząca w procesie wymiana jonowa może być prowadzona dwoma sposobami: jako adsorpcja jedno-stopniowa w układzie statycznym (jonit — roztwór próby) lub jako proces dynamiczny — w postaci kolumnowej chromatografii (adsorpcja jonowa podzielnymi składnikami z fazy ruchomej na nieruchomych ziarnach jonowymiennicy).

Adsorpcja w układzie statycznym polega na zmieszaniu jonowymiennicy z roztworem próby i pozostawieniu układu do ustalenia się równowagi. Zaadsorbowany na jonicie interesujący nas składnik może być następnie wymyty w formie zateżonej przy użyciu buforu o odmiennym pH lub wyższej sile jonowej. Kolumnowa chromatografia jonowymienna wymaga natomiast jonowymiennicy o odpowiednich właściwościach hydrodynamicznych, pozwalających na należyte upakowanie złoza kolumny i warunkujących odpowiedni przepływ fazy ruchomej, dużej ich zdolności wiążącej, co w sumie umożliwia wysoki stopień rozdziału izolowanych składników mieszanin. Większość jonowymiennicy stosowanych w dynamicznej technice rozdzielczej jest z tych względów wytwarzana w kulistym uziarnieniu. Wysoka zdolność wiążąca jonowymiennicy jest niezbędna dla zmniejszenia wymiarów stosowanych kolumn, obniżenia stopnia rozcieńczenia frakcji z wyizolowanym składnikiem, zapewnienia warunków dla wysokiego przepływu, a stąd do szybkiego przeprowadzenia procesu rozdziału i regeneracji jonitu.

Jonowymiennicę składa się z mierzalnego nośnika (matrycy, szkieletu), do którego sprzęga się kowalennie narażone grupy. Te grupy są zobojętniane prostymi jonami o znaku przeciwnym (przeciwjonami). W przebiegu chromatografii przeciwjony wymieniane są odwracalnie na posiadające taki sam ła-

dunek biopolimeryczne składniki fazy ruchomej, a proces ten nie ma wpływu na zmiany właściwości nośnika. Nośnik może być tworzony ze związków nieorganicznych, żywie syntetycznych, polisacharydów, itp. Rodzaj i właściwości nośnika określają fizyczne właściwości jonowymiennicy także jak: mechaniczną odporność, charakterystykę przepływu fazy ruchomej, a także zachowanie się w stosunku do substancji biologicznych i — w dużym stopniu — jego zdolność wiążącą.

Początkowo jonowymiennice wytwarzano na gęsto usieciowanych hydrofobowych nośnikach z żywie syntetycznych. Posiadały one dużą liczbę wbudowanych grup jonowych i wykazywały wysoką zdolność wiążącą dla małych jonów. Dzięki dużej ilości wiązań poprzecznych w usieciowaniu wykazywały one znaczną odporność mechaniczną lecz zbyt niską porowatość dla rozdzielanych białek i innych makrocząsteczek. Z uwagi na wysoką gęstość ładunków (dużą siłę wiązania) oraz właściwości hydrofobowe prowadziły one często do denaturacji izolowanych labilnych składników ustrojowych.

Pierwszymi jonowymiennicami pozbawionymi ujemnego wpływu na rozdzielane biopolimery stały się jonity oparte na celulozie, opracowane przez Petersona i Sobera (8). Ze względu na hydrofilny charakter nośnika celulozowego posiadają one małą tendencję do denaturacji białek. Do ujemnych cech jonowymiennicy celulozowych należały początkowo stosunkowo mała zdolność wiążąca i ograniczone własności przepływu spowodowane nieregularną postacią ich włókien.

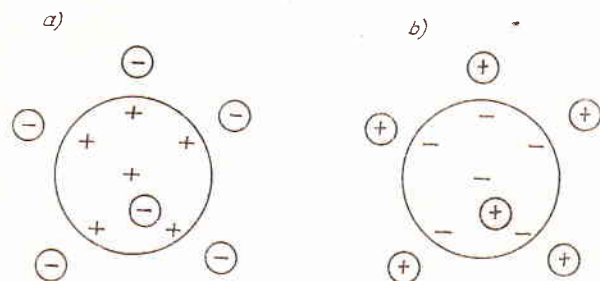
Jonowymiennice oparte na usieciowanym nośniku dekstranowym a następnie te, oparte na usieciowanej agarozie, były pierwszymi w chromatografii jonowymiennicy, które warunkowały uzyskanie kulistego uziarnienia jonitu, połączonego z wysoką porowatością tych ziaren (6). Takie cechy jonitu prowadziły do polepszenia warunków przepływu fazy ruchomej w kolumnie i zwiększały zdolność wiążącą w stosunku do rozdzielanych makrocząsteczek. Z tych względów większość jonowymiennicy stosowanych w chromatografii biopolimerów oparta jest na nośnikach z usieciowanych polisacharydów. Głównym eksporterem jonitów polisacharydowych do naszego kraju jest szwedzka firma Pharmacia Fine Chemicals. Chromatografii jonowymiennicy biopolimerów z wykorzystaniem takich właśnie jonowymiennicy poświęcony jest poniższy artykuł.

Technika izolacji i rozdziału polimerycznych składników żywych organizmów przy pomocy jonitów nie jest osiągnięciem ostatnich lat. W ciągu ostatniego ćwierćwiecza — nieco krócej w naszym kraju — stosuje się ją z powodzeniem do wydzielania i frakcjonowania białek i kwasów nukleinowych. Na drodze do szerszego wykorzystania tej techniki w krajowych badaniach biochemicznych leżą przeszkody uwarunkowane m.in. brakiem polskojęzycznych opracowań poświęconych omówieniu całości zagadnień metodycznych. Artykuł niniejszy ma na celu wyeliminowanie tej luki.

1. Właściwości jonowymieniaczy

1.1. Grupy czynne

Obecność naładowanych grup czynnych jest podstawową własnością jonowymieniacza. Rodzaj grupy określa typ siły wiążącej (typ jonowymieniacza), jej całkowitą wartość i użyteczną zdolność wiążącą jonitu przy wychwytywaniu i rozdzieleniu interesujących nas substancji. Jest możliwe uzyskać zarówno dodatnie, jak i ujemne naładowane jonowymieniacze. Jonowymieniacze z dodatnio naładowanymi grupami posiadają zdolność wiązania ujemnie naładowanych jonów (anionów) i dlatego nazywane są anionitami. Ujemnie naładowane jonowymieniacze posiadają zdolność wiązania i rozdzielenia dodatnio naładowanych jonów (kationów) i dlatego noszą nazwę kationitów (ryc. 1).



Ryc. 1. Budowa cząsteczki jonowymieniacza: a) anionitu z wymiennalnym przeciwjonem, b) kationitu z wymiennalnym przeciwjonem

Szereg grup, które mogą być wybrane do użycia w jonowymieniaczach stosowanych w chromatografii biopolimerów zestawiono w tab. 1. Grupy sulfonowe i aminozwartorzędowe są wykorzystywane do wytwarzania silnych jonowymieniaczy, grupy fosforanowe tworzą jonowymieniacze o pośredniej sile, zaś inne grupy warunkują powstawianie słabych jonitów. Określenie silny i słaby odnoszą się do zmiany stopnia jonizacji tych grup wraz ze zmianami pH układu. Silne jonowymieniacze są całkowicie zdysocjowane w szerokim zakresie pH, podczas gdy stopień dysocjacji słabych jonowymieniaczy, a wraz z nim zmiany zdolności wiążącej ulegają znacznemu ograniczeniu wraz ze zmianami pH.

1.2. Zdolność wiążąca

Zdolność wiążąca (pojemność wiążąca) jonitu może być ilościowo oznaczona jego zdolnością do wychwytywania wymiennalnego przeciwjonu i dlatego jest ważną wielkością. Zdolność ta może być wyznaczona jako wiążąca zdolność całkowita lub użyteczna.

Całkowita zdolność wiążąca jest liczbą ładunków potencjalnie naładowanych grup na gram suchej masy jonowymieniacza i jest wielkością stałą. Wiążąca zdolność użyteczna jest zdolnością aktualną, uzyskiwaną dla określonej substancji w specyficznych warunkach doświadczenia. Określa się ją w walach (lub mg) na jednostkę masy (objętości) jonowymieniacza. Wiążąca zdolność użyteczna zależy od ogólnej liczby naładowanych grup i ich dostępności (porowatości jonowymieniacza), powinowactwa tych grup do rozdzielanych substancji, natury izolowanych związków oraz ich stężenia oraz siły jonowej w fazie ruchomej. Na wiążącą zdolność użyteczną jonowymieniacza wpływa w dużym stopniu pH oraz temperatura układu, szczególnie dotyczy to słabych kationitów i słabych anionitów. Użyteczna zdolność jonitu jest ważną wielkością, niezbędną dla ustalenia ilości wprowadzanych i rozdzielanych substancji w kolumnie chromatograficznej. Orientacyjne dane na temat zdolności wiążącej omawianych jonowymieniaczy w stosunku do biopolimerów podano w tab. 2.

2. Przygotowanie procesu chromatograficznego

Rozdział lub izolacja biopolimerów w chromatografii jonowymiennej zachodzą na drodze odwracalnej adsorpcji jonowej (7). Większość procesów rozdzielczych przeprowadza się w dwu zasadniczych etapach. W pierwszym z nich następuje dozowanie próby i adsorpcja jej składników w złożu jonowymieniacza kolumny. Niezwiązane substancje usuwa się z jej złoża przy użyciu jednej objętości kolumnowej buforu wyjściowego. W następnym etapie substancje są eluowane z kolumny i rozdzielane jedna od drugiej. Rozdział ten następuje dlatego, ponieważ różniące się w swym ładunku substancje wykazują różne powinowactwo do jonowymieniacza. Schematyczny przebieg procesu chromatograficznego ujęty jest na ryc. 2. Powinowactwa te mogą być regulowane przez zmiany warunków w układzie chromatograficznym, takich jak siła jonowa i pH. Dzięki zmianom tych warunków możemy wybrać drogę związania interesującej nas substancji, podczas gdy inne przejdą do eluatu lub drogą zaadsorbowania występujących w próbce zanieczyszczeń, a przepuszczenie substancji jaką zamierzamy izolować. Ogólnie biorąc, postępowanie pierwsze jest korzystniejsze, ponieważ pozwala na osiągnięcie wyższego stopnia oczyszczenia badanej substancji.

2.1. Wybór jonowymieniacza

Mimo ciągłych poszukiwań uniwersalnego jonowymieniacza, żaden z dotąd opracowanych nie nadaje się do izolacji i rozdziałów wszystkich biopolimerów. Który z jonowymieniaczy lepiej będzie spełniać swą rolę dla określonej grupy związków, zależy to bę-

Tab. 1. Składniki chemicznej budowy jonowymieniaczy polisacharydowych

Typ jonowymieniacza	Rodzaj jonowymieniacza	Nośnik	Grupa funkcyjna	Przeciwjon
Anionity słabo zasadowe	DEAE-Sephadex A-25 i A-50 DEAE-Sephacel CL-6B DEAE-Sephacel	Usieciowany dekstran Usieciowana agarozą Usieciowana ziarnista celuloza	Dwuetylo-aminoetyl	Chlorkowy
Anionit silnie zasadowy	QAE-Sephadex A-25 i A-50	Usieciowany dekstran	Dwuetylo-(2-hydroksypropylo) aminoetyl	Chlorkowy
Kationity słabo kwasowe	CM-Sephadex C-25 i C-50 CM-Sephacel CL-6B	Usieciowany dekstran Usieciowana agarozą	Karboksymetyl	Sodowy
Kationit silnie kwasowy	SP-Sephadex C-25 i C-50	Usieciowany dekstran	Sulfopropyl	Sodowy

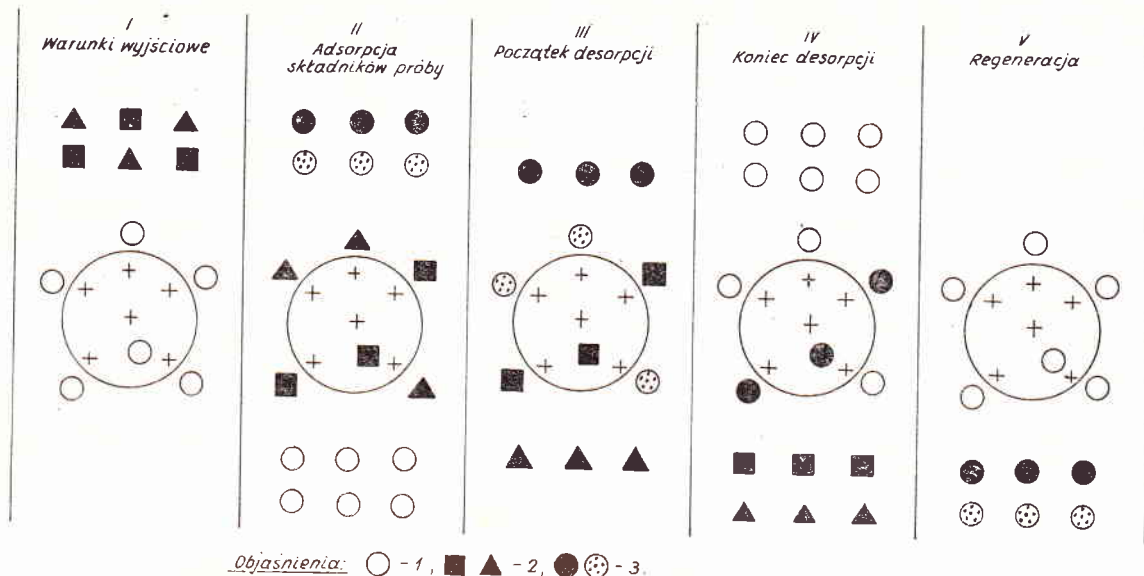
Tab. 2. Fizyko-chemiczne własności jonowymieniaczy opartych na nośnikach węglowodanowych

Typ jonitu	Postać handlowa	Odporność chemiczna	Odporność na czynniki fizyczne	Spęcznieanie	Warunki przepływu	Regeneracja
Jonowymieniacze sefadeskowe	Suchy proszek w opakowaniach 100 i 500 g	Nie rozpuszczalne w większości rozpuszczalników. Trwałe w wodnych roztworach soli, rozpuszczalników organicznych, alkaliach oraz roztworach słabo kwaśnych. W silnie alkalicznych i silnie kwaśnych roztworach hydrolizują. Ulegają wpływow silnych utleniaczy i dekstranaz	Wytrzymują w autoklawie warunki 120°C przez 30 min., w pH obojętnej w roztworze soli. Podczas jałowienia mogą być uwalniane drobne ilości węglowodanów, które należy odmyć buforem.	Podobnie do żelów Sephadex G. Czas zwilżania A-50 dłuższy niż A-25. Stopień spęcznieania zależy od siły jonowej (maleje wraz z jej wzrostem) i pH. Ze wzrostem pH stopień spęcznieania DEAE — maleje, CM — rośnie. Spęcznieanie QAE i SP nie zależy praktycznie od pH.	Maksymalnie: 30 ml/cm ² /godz. dla A-25 i 60 ml/cm ² /godz. dla A-50 przy ciśnieniu słupa wody 2 cm/cm wysokości złoża kolumny	Regenerowanie większych ilości jonitu poza kolumną. Zwykle przemycie jonitu roztworem soli zawierającym ten sam przeciwjon, o wzrastającej sile jonowej do 2. Silnie związane lipidy, białka, itp. usuwa się przez przemycie 0,1 N NaOH, następnie wodą i buforem wyjściowym do usunięcia resztek zasady
Jonowymieniacze sefarozytowe	Zawieszona w 0,5 M NaCl, w opakowaniach 500 ml. Stabilizowana w środowisku 0,01% habitanu (DEAE) i 0,01% mertiolatu (CM)	Nie rozpuszczalne w większości rozpuszczalników. Trwałe w wodzie, roztworach soli, rozpuszczalników org., w przedziale pH 3—10. Mogą być używane w roztworach niejonowych detergentów (Triton X-100) i silnie dysocjujących rozpuszczalnikach (7M mocznik). Stosunkowo odporne na działanie mikrobów	Stosunkowo wysoko odporne na działanie czynników fizycznych. Objętość złoża kolumny nie ulega zmianom ze wzrostem siły jonowej i pH. Łatwo przywraca się równowagę kolumny. Może być wykorzystywany w temp. do 70°C i jałowiony w pH 7 w temp. 110—120°C	Rozprowadzane są w stanie spęczniealym	Maksymalnie: 100—120 ml/cm ² /godz. przy ciśnieniu słupa wody 15 cm/cm wysokości opakowania kolumny	Regeneracja w kolumnie przez przemycie kolejno następującymi roztworami: DEAE: 1 — 1 × obj. złoża 1 M octanu sodu pH 3,0 2 — 1,5 obj. złoża 0,5 M NaOH, zostawić na noc 3 — 1,5 obj. złoża 1 M octan sodu pH 3,0 4 — zrównoważyć buforem wyjść. CM: regenerować na kolumnie jak jonity sefadeskowe, potem przemycić buforem wyjść.
DEAE-Sephacel	Zawieszona w 24% etanolu w opakowaniach 500 ml	Trwałe w wodnych roztworach w granicach pH 2—12. W silnie kwaśnych i silnie alkalicznych hydrolizuje. Silne utleniacze rozkładają jonit. Łatwo ulega działaniu drobnoustrojów, szczególnie wobec fosforanów oraz hydrolaz wiązań beta glukozydowych	Jak celuloza drobnociarna. Złoże kolumny nie ulega wpływow zmian pH i siły jonowej buforów układu, Kolumna łatwa do zrównoważenia. Może być jałowiony w pH 7 przez 30 min. w temp. 120°C	Rozprowadzana w formie gotowej do użycia	Przepływ liniowy w ciągłym gradiencie: do 10 cm/godz. przy ciśnieniu słupa wody 30 cm	Zwykle poza kolumną roztworami o wysokim stężeniu soli Silnie związane substancje są usuwane 0,1 M NaOH lub kationowymi detergentami. Końcowe przepłukanie w obu przypadkach wodą i buforem wyjść.

dzie od następujących czynników: a) rodzaju i trwałości składników próby, b) rozmiarów cząsteczek (M.cz.) jej składników i c) wymagań specjalnych.

Ad a). Składniki próby są związane do jonowymieniacza, gdy wykazują ładunek przeciwny do tego, jaki posiada jonit. Wiązanie to jest typu elektrosta-

tycznego, a związki łączą się z jonitem w sposób odwracalny. Niektóre z izolowanych substancji posiadają tylko jeden rodzaj naładowanych grup. W tym przypadku wybór jonowymieniacza jest prosty. Sprawa komplikuje się natomiast, gdy składniki, które rozdzielamy posiadają zarówno dodatnio jak i ujem-



Ryc. 2. Schematyczny przebieg chromatografii jonowymiennej

Objaśnienia: I—V — kolejne fazy procesu chromatografii, 1 — jony buforu wyjściowego, 2 — jony rozdzielanych substancji, 3 — jony gradientu.

nie naładowane grupy (amfolyty), a ich ładunek wypadkowy zależy od pH układu. W pewnej wartości pH substancja może wykazywać sumaryczny ładunek zerowy. Ta wartość pH jest określana punktem izoelektrycznym (pI), a substancja znajdująca się w takim punkcie nie jest wiązana z żadnym jonowyminiaczem. Wybór pH buforu wyjściowego ma na celu ustalenie sumarycznego ładunku amfoterycznej substancji. Z tych względów do procesu chromatografii jonowymiennej amfolitów można użyć albo anionitu albo kationitu. Jednakże w praktyce możemy dokonywać wyboru pH układu wyjściowego w dość ograniczonym zakresie. Wiele bowiem polimerycznych składników ustrojowych ulega denaturacji w pH wykraczającym poza pewien przedział. Dla tych związków wybór jonowyminiacza jest ograniczony warunkami ich trwałości. Poniżej swojego punktu izoelektrycznego białka posiadają wypadkowy ładunek dodatni i dlatego mogą być adsorbowane (i rozdzielane) na kationitach. Powyżej swego pI amfolyty te mają sumaryczny ładunek ujemny i mogą być izolowane z wykorzystaniem anionitów. Jednakże większość tych biopolimerów jest trwała w stosunkowo wąskim przedziale pH 5—8 i dlatego używa się do ich chromatografii jonowyminiaczy anionowych. Ogólnie biorąc, pH buforu wyjściowego powinno być około 1 jednostki wyższe lub niższe od punktu izoelektrycznego związku, w zależności od tego czy stosujemy jonowyminiacz anionowy czy kationowy.

Jeśli punkt izoelektryczny izolowanej substancji nie jest znany, należy przeprowadzić prosty test dla oznaczenia wyjściowego pH układu chromatograficznego:

- przygotować szereg próbek,
- do każdej z nich dodać 0,1 g jonowyminiacza sefadeksowego lub po 1,5 ml jonowyminiacza sefarożowego albo celulożowego,
- zrównoważyć żel w każdej próbówce przez 10-krotne przemycie go 0,5 M buforem. Dla anionitów stosować bufor w zakresie pH 5—9, dla kationitów — w przedziale 4—8, co 0,5 j. pH odstepu między próbkami,
- zrównoważyć żel w każdej próbówce buforem o niskiej sile jonowej przez 5-krotne przemycie żelu 10 ml buforu wyjściowego o tym samym pH lecz stężeniu 0,05 M — dla jonowyminiaczy sefadeksowych i 0,10 M — dla sefarożowych i celulożowych,

- dodać stałą ilość próby do każdej z próbek,
- zmieszać ich zawartość przez 5—10 min,
- pozostawić próbki do opadnięcia żelu,
- przeanalizować supernatant na obecność badanej substancji.

Należy wybrać to pH dla wyjściowego buforu układu chromatograficznego, w warunkach którego substancja wiąże się całkowicie z jonowyminiaczem lecz powinno być ono najbliższe takiemu wykładnikowi jonów wodorowych, przy którym ta substancja jest słabo uwalniana z jonitu i pozostaje w teście częściowo w supernatancie. Jeśli pH okazałoby się za niskie (lub za wysokie przy innym typie jonowyminiacza), elucja związku z kolumny byłaby utrudniona i należałoby stosować wyższe stężenia soli do jej przeprowadzenia. Wartość wyjściowego pH może decydować o tym, czy użyjemy w procesie rozdziału słaby czy silny jonowyminiacz.

Silne jonowyminiacze są zjonizowane w szerszym zakresie pH niż jonity słabe. Te ostatnie zaczynają tracić swój ładunek w pH poniżej 6 (kationity) lub powyżej 9 (anionity). Silne jonowyminiacze np. QAE lub SP-Sephadex powinny być używane do rozdzielania słabo jonizujących substancji. Natomiast jonity słabe — z wbudowanymi grupami DEAE lub CM — są zalecane do rozdzielania bardzo labilnych biopolimerów. Trwałość składników — poddawanej rozdzielaniu próby — zależy także od siły jonowej stosowanego układu. Jeśli składnik ulega zmianom w roztworze o niskim stężeniu soli, należy wtedy wybrać jonowyminiacze sefadeksowe z uwagi na ich wyższe zdolności wiążące w warunkach zwiększonej siły jonowej.

Ad b). Cząsteczki rozdzielanych składników wiązane są przez naładowane grupy nie tylko na zewnątrz powierzchni ziaren lecz także w porach jonowyminiacza. Wielkość porów nośnika nie wpływa na mechanizm wiązania poddawanych chromatografii składników lecz odbija się na zdolności wiążącej jonitu, ponieważ naładowane grupy wewnątrz ziaren jonowyminiacza raz mogą być dostępne — w innych przypadkach nie — dla izolowanych związków, w zależności od rozmiarów ich cząsteczek.

Składniki niskocząsteczkowe (oligopeptydy, nukleotydy. M.cz. 10 000). Najbardziej użyteczne do rozdzielania tych substancji są jonowyminiacze sefadeksowe o małych porach typu C-25 lub A-25. Posiadają one najlepsze relacje między rozdziałem takich

Tab. 3. Zdolność wiążąca jonowymieniaczy w stosunku do białek (1, 2, 9)

Rodzaj jonowymieniacza	Pojemność ogólna		Pojemność użyteczna		
	mval/g żeluz	mval/100 ml żeluz	dla hemoglobiny		dla albuminy
			w g/g żeluz	w g/100 ml żeluz	w g/100 ml żeluz
DEAE-Sephadex A-25	3,5 ± 0,5	50	0,5	7	3,1
A-50		17,5	5	25	10,2
DEAE-Sepharose CL-6B	1,4 ± 0,1	15 ± 2	0,3	10	11,4
DEAE-Sephacel		17,1		5	8,6
QAE-Sephadex A-25	3,0 ± 0,4	50	6	20	
A-50		10	6	20	
CM-Sephadex C-25	4,5 ± 0,5	56	0,4	5	
C-50		17	9	35	
CM-Sepharose CL-6B	2,3 ± 0,3	12	0,2	10	
SP-Sephadex C-25		30		3	
C-50	9	7	27		

związków a warunkami przepływu fazy ruchomej oraz są bardzo ekonomiczne w użyciu.

Związki zbudowane z cząsteczek średniej wielkości (proste białka M.cz. 10 000—100 000). Najlepsze rezultaty w rozdziale tych związków osiąga się przy pomocy jonowymieniaczy sefarozytowych oraz DEAE-Sephacelu. Jonity sefadeksowe typu A-50 lub C-50, chociaż posiadają bardzo wysokie zdolności wiążące dla takich cząsteczek, mają ziarna bardziej miękkie i gorsze własności przepływu fazy ruchomej (tab. 2).

Związki wielkocząsteczkowe (białka, kompleksy białkowe, kwasy nukleinowe. M.cz. >100 000). Dla substancji, których cząsteczki przekraczają rozmiary określone masą cząsteczkową powyżej 100 000 daltonów, najbardziej sprawdzają się jonowymieniacze sefarozytowe lub DEAE-Sephacel, gdyż posiadają strukturę o najszerszych porach. Dotyczy to jednak tylko tych substancji, których cząsteczki posiadają masę molową nie przekraczającą 4×10^6 daltonów (2). Pory tych jonowymieniaczy nie są dostępne dla makrocząsteczek wykazujących większe rozmiary, ponieważ tak wielkie molekuly nie będą zatrzymywane przez pory żadnego z jonitów. Cząsteczki takie mogą reagować tylko z naładowanymi grupami umieszczonymi jedynie na powierzchni ziaren jonowymieniacza. Ponieważ jonity sefadeksowe A-25 i C-25 mają najmniejsze rozmiary ziaren, ich powierzchnie podstawiania (gęstość ładunku) na jednostkę masy będą najwyższe w porównaniu z pozostałymi typami jonowymieniaczy. Dlatego też te jonity najlepiej zdają egzamin do rozdzielania związków o najwyższej masie cząsteczkowej.

Lipidy. Ta część z lipidowych połączeń, których cząsteczki posiadają ładunek może być izolowana i frakcjonowana metodą chromatografii jonowymiennej. Z uwagi na to, że związki te są rozpuszczalne tylko w rozpuszczalnikach organicznych, proces ich chromatografii należy prowadzić na jonitach ulegających stosunkowo małym zmianom fizycznym wobec tych rozpuszczalników. Są to DEAE-Sepharoza i DEAE-Sephacel.

Substancje o nieznanym masie cząsteczkowej. W przypadku, gdy nie jest nam znana masa cząsteczkowa rozdzielanych składników zaleca się używać jonowymieniaczy sefarozytowych lub DEAE-Sephacelu, ponieważ te jonity są łatwe w przygotowaniu i posiadają stosunkowo dobrą użyteczną zdolność wiążącą w całym zakresie spotykanych mas cząsteczkowych. Zdolność ta nie jest jednakowa dla biopolimerów o różnej wielkości cząsteczek. Zależność między masą cząsteczkową rozdzielanych związków a użyteczną zdolnością wiążącą jonitów ujmują tab. 4 (5).

Tab. 4. Zmiany użytecznej zdolności wiążącej jonowymieniaczy w zależności od wielkości rozdzielanych cząsteczek (M.cz.). Dane uzyskane w 0,01 M buforze tris-HCl, pH 8,0 (5)

Jonowymieniacz	Alfa-laktoalbumina M.cz. 14 000		Albumina M.cz. 67 000		Ferrytyna M.cz. 440 000	
	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g	mg/ml	mg/g
DEAE-Sephadex A-25	191	1324	31	215	2	14
DEAE-Sephadex A-50	10	741	102	7556	1	74
DEAE-Sepharose CL-6B	45	546	115	1397	4,3	52
DEAE-Sephacel	38	367	86	830	8,6	83

Ad c). Przy stałym dokonywaniu rozdzielów tej samej próby, proces może być powtarzany wielokrotnie na tej samej kolumnie. Dotyczy to szczególnie wypełnień z jonowymieniaczy opartych na Sepharozie CL-6B i DEAE-Sephacelu. Jonity te wykazują bowiem niewielkie zmiany objętości w różnych warunkach pH i siły jonowej stosowanych buforów, a kolumny wypełnione tymi żelami są gotowe do powtórnego użycia po zakończonym procesie rozdzielania, bez rozpakowania.

2.2. Dobór buforu

Przystępując do doboru buforu wyjściowego należy wziąć pod uwagę skład mieszaniny buforowej, wartość jego pH i siły jonowej. Jeśli jony mieszaniny buforowej niosą ładunek przeciwny do ładunku grup funkcyjnych jonowymieniacza, mogą one brać częściowo udział w procesie wymiany jonowej i wywoływać miejscowe zakłócenia w pH układu chromatograficznego. Z tych też względów korzystniej jest używać bufor kationowy z jonowymieniaczem anionowym i anionowy bufor przy prowadzeniu rozdzielania na kationicie. Szereg przykładów takich układów zawiera tab. 5 (5).

Wartość pH buforu wyjściowego i jego siła jonowa powinny być tak dobrane, aby substancja, którą chcemy wyizolować ze złożonej mieszaniny, była wiązana przez jonowymieniacz umieszczony w kolumnie. pH buforu wyjściowego należy ustalić w pierwszej ko-

lejności. Winno mieć ono taką wartość, żeby rozpuszczona w nim substancja posiadała wypadkowy ładunek przeciwny do ładunku jonowymieniacza. Wyjściowe pH powinno być około 1 j. wyższe od pI substancji izolowanej na anionicie i ok. 1 j. poniżej pI substancji wyosabnianej na kolumnie z kationitem. Ustalenie to wynika z faktu, iż substancje tracą wiązanie z jonowymieniaczem około 0,5 j. pH od wartości ich punktów izoelektrycznych przy sile jonowej buforu w granicach 0,1 (9). Buforowe pH powinno także uwzględniać trwałość naładowanych grup jonowymieniacza.

Natomiast jeśli chodzi o siłę jonową buforu wyjściowego to przy jej ustalaniu stosujemy następującą zasadę. Wybieramy zawsze najwyższą wartość siły jonowej, która umożliwi jeszcze związanie interesującej nas substancji z jonowymieniaczem, a jednocześnie stanowi najniższą siłę jonową powodującą elucję substancji z kolumny. W takich warunkach siły jonowej uzyskuje się pewność, że izolowany związek adsorbuje się, a maksymalna ilość niepożądanych substancji jest usuwana z jonitu (lub pozostaje na jonowymieniaku po elucji pożądaných składników). Przy wyborze siły jonowej należy mieć także na uwadze, że sole odgrywają dużą rolę w stabilizacji struktury rozdzielanych białek i dlatego staje się ważne aby siła jonowa buforów nie była zbyt niska i zabezpieczała izolowane białka przed denaturacją. Wszystkie jonowymieniacle tu omawiane warunkują dość wysoką zdolność wiążącą i umożliwiają rozdział przy stosunkowo dużych siłach jonowych buforów. Dlatego nie zachodzi obawa znacznego stopnia dezaktywacji rozdzielanych na nich związków białkowych. Test próbówkowy dla ustalenia siły jonowej buforu wyjściowego:

- przygotować szereg próbek z jonowymieniaczem, jak przy teście mającym na celu ustalenie pH buforu wyjściowego,
- zrównoważyć jonowymieniacle w każdej próbce przy pomocy 0,5 M buforu o ustalonym wcześniej pH (przemycie 10×10 ml)
- zrównoważyć jonit w każdej próbce przy użyciu roztworów NaCl o sile jonowej odpowiadającej stężeniu od 0,05 M do 0,5 M — dla jonowymieniaczy sefadeksowych i od 0,01 M do 0,3 M NaCl — dla jonitów sefarożowych i DEAE-Sephacelu — o tym samym — wybranym wcześniej pH (przemycie 5×10 ml). Wystarczająco odstępy między stężeniami NaCl równe 0,05 M,
- dodać próbkę do wszystkich próbek i sprawdzić supernatant na jej zawartość, jak w poprzednich testach.

Wszystkie bufory powinny być przed użyciem odpowiedzione.

Tab. 5. Bufory stosowane w chromatografii jonowymiennej biopolimerów

Jonowymieniacz	Zalecane jony buforu	Wyjściowe pH
Anionity	Kationowe: alkilaminy, alkohol aminoetylowy, amoniak, etyleno-dwuamina, imidazol, tris, pirydyna, itd.	1 jednostka pH powyżej pI białka lub jak oznaczono doświadczalnie
Kationity	Anionowe: octan, barbituran, cytrynian, fosforan, glicyna, itd.	1 jednostka poniżej pI białka lub pH oznaczone doświadczalnie

2.3. Przygotowanie jonowymieniacza

Mając wybrany odpowiedni jonowymieniacz należy zrównoważyć go buforem wyjściowym. Wszystkie omawiane jonowymieniacle dostarczane są przez producenta w formie soli i nie wymagają traktowania kwasami i zasadami przed zrównoważeniem. Postępowania dla zrównoważenia jonowymieniaczy sefadeksowych, którą są rozprawdane w postaci suchych proszków, różni się nieznacznie od tego, jakie stosujemy dla jonowymieniaczy sefarożowych i DEAE-Sephacelu — znajdujących się w handlu już w formie sęczipnialej.

Jonowymieniacle sefadeksowe powinny być sęczipniane w roztworze o takim pH i sile jonowej, jakie zostaną zastosowane na początku rozdziału. Całkowite sęczipnianie zabiera 1—2 dni, gdy proces prowadzimy w temperaturze pokojowej lub 2 godz. (w pH 7) na wrzącej łaźni wodnej. Sęczipnianie w podwyższonej temperaturze powoduje jednocześnie odpowietrzenie żelu. Podczas sęczipniania zaleca się intensywne i ciągłe mieszanie (np. przy pomocy mieszadła magnetycznego), aby zapobiec zlepianiu się ziaren jonowymieniacza. Bufor do powyższego procesu musi zawierać ten sam przeciwjon, jaki znajduje się w jonowymieniaku. Podczas sęczipniania należy kilkakrotnie usunąć supernatant i uzupełnić go świeżym buforem.

Jonowymieniacle sefarożowe i DEAE-Sephacel rozprawdane są w stanie zwilżonym. Jeżeli dalsza procedura przygotowawcza nie wymaga zmiany przeciwjonu, postępowanie przygotowawcze obejmuje tylko zrównoważenie jonitu buforem wyjściowym. W przypadku gdy zrównoważenie to wymaga buforu o niskiej sile jonowej, osiąga się je znacznie szybciej, jeśli przemyje się jonit najpierw $10 \times$ bardziej stężonym roztworem buforu, a potem paroma objętościami buforu wyjściowego o tym samym pH. Natomiast gdy proces chromatograficzny wymaga wprowadzenia innego przeciwjonu, zamiast oryginalnie występującego (tj. innego niż sodowy lub chlorowy), postępujemy wg niżej opisanej procedury. Wymaganą ilość jonowymieniacza rozprawdza się w nadmiarze 0,5—1,0 M roztworu soli nowego przeciwjonu. Po opadnięciu i dekantacji zawiesiny jonowymieniacza dolewa się następną porcją roztworu nowej soli. Proces zmiany roztworu soli i dekantacji żelu jonitu powtarza się kilkakrotnie. Po ostatniej dekantacji jonowymieniacz nadaje się do dalszego wykorzystania.

Ilość jonowymieniacza, wymagana dla określonego rozdziału, zależy od wielkości próby poddawanej procesowi chromatografii oraz użytecznej zdolności wiążącej jonitu w stosunku do składników tej próby. Najlepsze warunki rozdziału mają miejsce wtedy, gdy wykorzystuje się nie więcej niż 10—20% tej zdolności wiążącej. Wartość ta może być przekroczona tylko w takich przypadkach, kiedy rozdział między składnikami jest wyjątkowo dobry. Użyteczna zdolność wiążąca jonowymieniacza — w stosunku do substancji poddawanych pierwszy raz rozdziałowi chromatograficznemu — może być oznaczona w prosty sposób. Wystarczy przez małą kolumnę o znanej ilości jonowymieniacza przepuszczać roztwór próby w warunkach wyjściowych doświadczenia, aż do momentu pojawienia się składnika w wycieku. Z objętości przepuszczonego roztworu, stężenia składników i ilości jonowymieniacza łatwo teraz wyliczyć ilość składnika związanego na kolumnie, przypadającego na jednostkę masy (objętości) jonitu — co równoważne jest jego użytecznej zdolności wiążącej. Alternatywnie można przeprowadzić test próbówkowy, podobny do opisanych poprzednio, z tym że jedyną teraz zmienną ma być ilość wprowadzonej próby. Uzyskana wartość zdolności wiążącej powinna być pomnożona przez 5—10, aby otrzymać ilość jonowymieniacza potrzebnego do danego procesu chromatograficznego. Tak wyliczona ilość jonitu wystarcza zarówno do statycznego sposobu wymiany jonowej, jak i procesu prowadzonego w sposób dynamiczny — tj. w chromatografii kolumnowej.

Mając za sobą wszystkie czynności przygotowawcze, można przystąpić teraz do właściwego procesu chromatografii jonowymiennej biopolimerów. Metodyce tego procesu poświęcona zostanie cz. II artykułu.

Piśmiennictwo

1. DEAE-Sephacel, beaded cellulose ion exchanger, Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1977.
2. DEAE-Sephacel CL-6B, CM-Sephacel CL-6B for ion exchange chromatography. Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1976.
3. Hill E.: Laboratory Products Revs. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1978.
4. Huisman T. H., Dozy A. M.: J. Chromatogr. 19, 160, 1965.
5. Ion exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1980.
6. Male C.: Methods Med. Res. 12, 221, 1970.
7. Morris C. J., Morris P.: Separation Methods in Biochemistry. Wiley-Interscience, New York, 1964.
8. Peterson E., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 751, 1956.
9. Sephadex ion exchangers. A guide to ion exchange chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1978.

Adres autora: doc. dr hab. Janusz Wierciński, ul. Sowińskiego 8/31. 20-040 Lublin.

KONRAD MALICKI, ELŻBIETA MALICKA, MARIA KATKIEWICZ

Morfologiczne i cytochemiczne obserwacje komórek linii IB-RS-2 namnożonych metodami stacjonarną i rotacyjną

Zakład Wirusologii i Zakład Patologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Uzyskana przez Marię Pereria de Castro (2) w Instytucie Biologicznym w Sao Paulo ustalona linia komórek nerki świni, nazwana zgodnie z zasadami terminologii hodowli tkanek (4) linią IB-RS-2, wykazuje wielką przydatność do izolacji i seryjnego namnażania wielu wirusów. Jest ona dość powszechnie stosowana w wirusologicznych pracowniach w wielu krajach i w Polsce do wykonywania różnych rutynowych badań wirusologicznych. Duża wzrostowa aktywność linii IB-RS-2 oraz względnie proste i niedrogo podłoże wzrostowe stosowane do jej namnażania wydają się przynajmniej teoretycznie wskazywać na przydatność tej linii do produkcyjnego namnażania wirusa i wykonywania badań kontrolnych w produkcji różnych wirusowych szczepionek.

Celem pracy była porównawcza obserwacja morfologicznych i cytochemicznych właściwości komórek posiadanej linii IB-RS-2, namnożonych metodami stacjonarną i rotacyjną. Badania te były powiązane z obserwacją dynamiki namnażania komórek linii IB-RS-2 po wyjęciu z banku komórek oraz z oceną przydatności butelek do plazmy w rotacyjnej metodzie namnażania komórek, co stanowi treść oddzielnej publikacji (7).

Materiał i metody

Hodowle komórek linii IB-RS-2. Z banku komórek przechowywanych w ciekłym azocie wyjmowano ampulki zawierające zamrożoną zawiesinę komórek linii IB-RS-2 i po właściwym odrożeniu (8) komórki namnażano w temperaturze 37°C, stacjonarnie w butelkach Legroux lub butelkach Roux 1000 ml. Notowano wyniki mikroskopowych obserwacji dotyczących ogólnej morfologii komórek i szybkości rozwoju jednowarstwowej hodowli. Po 4—5 przeszczepieniach hodowli, wykonanych w stosunku 1:2, uzyskiwano w subkulturach pulę potomnych komórek wystarczającą do założenia porównywalnych hodowli i przeprowadzenia zasadniczych obserwacji. Zawiesinę o gęstości ok. 3×10^5 komórek/ml w płynie namnażającym o składzie: podłoże Eagle'a 1959 (MEM) 90%,

surowica cielęca 10%, antybiotyki (penicylina i streptomycyna) po 100 j.m./ml, sporządzano metodą rutynową i rozdzielano po 100 ml do: butelek Roux 1000 ml — hodowle stacjonarne (I), butelek do plazmy 500 ml — hodowle rotacyjne zwykłe (II) i butelek do plazmy 250 ml, ściśle wypełnionych szklanymi perełkami — hodowle rotacyjne o zwiększonej powierzchni (III). Komórki w butelkach Roux inkubowano w cieplarni CWE-2, a w butelkach do plazmy w aparacie „Virutor” zaopatrzone w specjalne uchwyty (7).

Lamelkowe preparaty. W celu uzyskania preparatów do badań morfologicznych i cytochemicznych, przed dodaniem zawiesiny komórek do naczyń hodowlanych, na ich wewnętrznej powierzchni przyczepiano kropelkami twardej parafiny od 3 do 6 szkiełek przykrywkowych, dających się później łatwo wyjąć w określonym czasie. Bezpośrednio po wyjęciu z płynu wzrostowego płukano je w buforowanym roztworze fizjologicznym (PBS) i dalsze postępowanie uzależniano od przewidywanej metody badania.

Obserwacje morfologiczne i cytochemiczne. Preparaty utrwalano w roztworach odpowiednich dla danej metody badania: w 4% buforowanej formalinie do barwienia metodą przeglądową hematoksyliną — eozyną, w płynie Carnoy'a do barwienia oranżem akrydynowym na zawartość kwasów nukleinowych metodą wg Bertalanffy'ego (1) oraz w płynie Bakera dla badania aktywności kwaśnej fosfatazy metodą wg Gomori'ego (5). Hodowle nie utrwalone poddawano badaniu aktywności dehydrogenazy kwasu bursztynowego metodą wg Nachlasa (10). W preparatach barwionych hematoksyliną — eozyną oceniano gęstość pokładu komórek i morfologię komórek, określano indeks mitotyczny (liczba mitoz na 1000 komórek, ustalana jako średnia arytmetyczna z 3 pomiarów, wykonywanych dla każdej doświadczanej grupy oddzielnie) oraz wielkość jąder komórkowych. Pomiar wielkości jąder wykonywano aparatem Mop AM 03 firmy Kontrom, bezpośrednio z filmu negatywowej błony fotograficznej, uzyskanego w mikroskopie NU-2 Zeissa. Wyniki pomiarów jąder opracowano statystycznie testem t Studenta, przy poziomie istotności 0,05 oraz 0,01. Obliczenia wykonano na mini-komputerze PDP 11/34 Digital Equipment Co. Zawartość kwasu rybonukleinowego oceniano w preparatach barwionych oranżem akrydynowym na podstawie intensywności fluorescencji w promieniach ultrafioletowych, emitowanych lampą HBO 200, w mikroskopie NU-2 Zeissa. Ocenę aktywności badanych enzymów przeprowadzano na podstawie obserwacji ziarnistego strątu, powstającego w komórkach jako produkt reakcji.