



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005103265/13, 08.02.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
08.02.2005

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2006

(45) Опубликовано: 27.02.2007 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: КАГРАМАНОВА К.А, ЕРМОЛЬЕВА З.В., Сравнительная характеристика методов определения лизоцима, Антибиотики, М., Медицина, 1966, Т.11, №10, с.9117-9119. БУХАРИН О.В., ВАСИЛЬЕВ Н.В., Лизоцим и его роль в медицине, Томск, 1974, с.32-41. RU 2170932 C1, 20.07.2001. SU 1028334 A1, 20.03.1981. SU 1143778 A1, 07.03.1985. SU 1041934 A1, 15.09.1983.

Адрес для переписки:

460000, г.Оренбург, ул. Советская, 6, ГОУ ВПО  
ОргМА МЗ РФ, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Соловых Галина Николаевна (RU),  
Минакова Виктория Валерьевна (RU),  
Коробов Владимир Петрович (RU),  
Лемкина Лариса Марковна (RU),  
Карнаухова Ирина Владимировна (RU),  
Рябцева Елена Александровна (RU),  
Кануникова Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

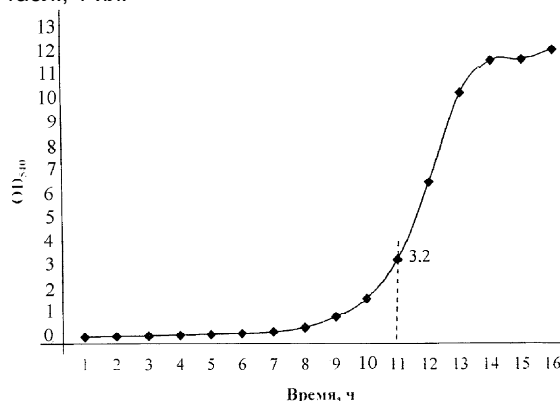
Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
"Оренбургская государственная медицинская  
академия" Министерства здравоохранения  
Российской Федерации" (RU)

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу определения лизоцимной активности биологических объектов, и может быть использовано для оценки антимикробного иммунитета организма, экологической толерантности организмов к факторам окружающей среды. Способ предусматривает выращивание тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Тарасевича на жидкой питательной среде при температуре 27°C до оптической плотности 3,2-3,4. Подвергают лиофильной сушке. Из выращенной тест-культуры готовят суспензию, которую вносят в исследуемый биологический объект. После чего проводят вычисление лизоцимной активности биологического объекта по известному методу.

Изобретение позволяет получить более точные, достоверные и сопоставимые сведения об уровне лизоцимной активности в биологическом объекте. 3 табл., 1 ил.





FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/02* (2006.01)*G01N 33/48* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005103265/13, 08.02.2005**(24) Effective date for property rights: **08.02.2005**(43) Application published: **20.07.2006**(45) Date of publication: **27.02.2007 Bull. 6**

Mail address:

**460000, g.Orenburg, ul. Sovetskaja, 6, GOU  
VPO OrGMA MZ RF, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Solovykh Galina Nikolaevna (RU),  
Minakova Viktorija Valer'evna (RU),  
Korobov Vladimir Petrovich (RU),  
Lemkina Larisa Markovna (RU),  
Karnaukhova Irina Vladimirovna (RU),  
Rjabtseva Elena Aleksandrovna (RU),  
Kanunikova Elena Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
"Orenburgskaja gosudarstvennaja meditsinskaja  
akademija" Ministerstva zdravookhraneniija  
Rossijskoj Federatsii" (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINATION OF LYSOZYME ACTIVITY OF BIOLOGICAL OBJECTS**

(57) Abstract:

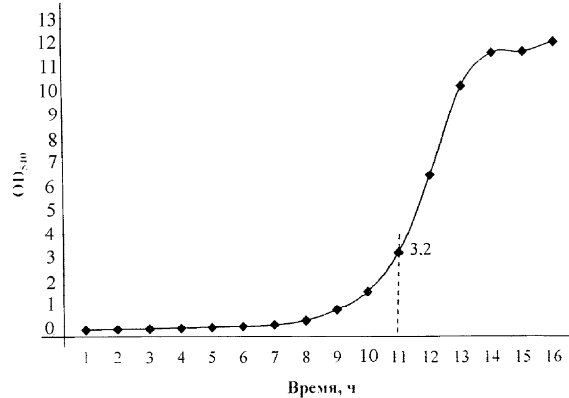
FIELD: biotechnology, microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for determination of lysozyme activity of biological objects. Method involves culturing *Micrococcus lysodeicticus* № 2665 GISK named for Tarasevich as a test-culture on liquid nutrient medium at temperature 27°C to value of optical density 3.2-3.4 followed by lyophilic drying the grown culture. Suspension is prepared from the grown test-culture and this suspension is added to analyzed biological object followed by calculation of lysozyme activity of biological object by the known method. Invention provides obtaining the more precise, reliable and comparable data concerning the level of lysozyme activity in biological object. Invention can be used in evaluation of antibacterial immunity of

organism, ecological tolerance of organisms to environment factors.

EFFECT: improved assay method.

3 tbl, 1 dwg, 1 ex



Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины и экологии, в частности к микробиологии и микроэкологии, а именно к способам определения лизоцима.

В частности, способ предназначен для определения уровня лизоцимной активности  
5 тканей, биологических жидкостей с целью оценки уровня антимикробной защиты организмов.

Таким образом, заявляемый способ предназначен для использования в  
бактериологических, экологических и иммунологических лабораториях, решающих вопросы  
10 оценки антимикробного иммунитета организма, а также оценки экологической толерантности организмов к факторам окружающей среды.

В настоящее время накоплено достаточно много материала о широком распространении  
антимикробного фермента - лизоцима у беспозвоночных, позвоночных животных и  
человека, у микроорганизмов (О.В.Бухарин, Н.В.Васильев, 1974; В.М.Подборнов,  
А.Бердыев, 1991; Э.Купер, 1980).

15 Присутствие данного фермента связывают с проявлением естественной резистентности организмов, особенно к грамположительным бактериям (О.В.Бухарин, Н.В.Васильев, 1974). Кроме того, в работах Г.Н.Соловых (1995), Г.П.Алехиной (1996), Н.В.Немцевой (1998) показано, что лизоцим является одним из наиболее важных факторов, принимающих участие в формировании гидробиоценозов, а также может быть одним из факторов  
20 адаптации организмов в биоценозе, и поэтому оценка уровня лизоцимной активности биологических объектов дает представление о резистентности организма или биоценоза к неблагоприятным факторам окружающей среды, как биотической, так и абиотической природы. В связи с этим, разработка методов определения уровня лизоцимной активности для оценки уровня резистентности организмов к факторам среды или возбудителям  
25 болезней является актуальной.

В основе общепринятых методов определения лизоцимной активности лежит  
способность экстрактов тканей, жидкостей организма (слюна, кровь, лимфа) лизировать  
in vitro суспензию клеток чувствительного штамма *Micrococcus lysodeicticus* штамм  
№2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича. По уровню лизоцимной активности биологических  
30 объектов можно судить о степени защиты организмов к микробной нагрузке в биоценозе или в организме. Поэтому для точной оценки уровня лизоцимной активности различных биологических объектов необходима стандартизация используемого индикаторного микроорганизма *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Анализ фактического материала, касающегося определения лизоцимной активности,  
35 затрудняется разнообразием методик, используемых различными авторами, тем более что многие из них имеют полуколичественный характер, а поэтому не дают точной оценки уровня лизоцимной активности.

Все это свидетельствует об актуальности разработки весьма чувствительных  
количественных методов определения уровня активности лизоцима.

40 Уровень техники

Известен «Способ выделения комплекса литических ферментов» (авторское  
свидетельство №1755581 от 20.08.1995), в котором используется суспензия  
лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им.

Л.А.Тарасевича для определения бактериологической активности в выделенном комплексе  
45 ферментов. С этой целью используют 2 мл лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича в 0,01 М Трис-буфере pH 8,4-8,5 с концентрацией 0,5-0,6 ед оптической плотности (ФЭК - 56М,  $\delta_{\text{кюв}}$  3 мм, с/ф №6), прогретой в течении 10 мин, при 37°C, добавляют 0,1 мл пробы, смесь инкубируют 5 мин, при 37°C.

Недостатком данного способа является то, что в нем предполагается стандартизация  
50 используемой лиофилизированной индикаторной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича только по оптической плотности (мутности).

Известно, что такая форма стандартизации используемой культуры весьма субъективна:  
культуру тестового микроорганизма постепенно смешивают с разбавителем. Полученную

взвесь микроорганизмов интенсивно встряхивают, добиваясь полного и равномерного распределения клеток. При визуальном несоответствии мутности приготовленной суспензии ее доводят добавлением разбавителя. После каждого вносимого изменения суспензию тщательно встряхивают, т.е. приготовленная суспензия, используемая для

5 определения, неточная и сугубо субъективная, зависящая от восприятия исследователя. Кроме того, такую сугубо субъективную стандартизацию необходимо проводить перед каждым определением бактериологической активности, поэтому получаемые результаты в разных сериях эксперимента не являются сопоставимыми, т.к. имеют разную степень

10 достоверности из-за использования нестандартизированной лиофилизированной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича в каждой серии определения.

В данном способе нет указаний о том, с какой фазы роста взяты клетки микроорганизма *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для приготовления суспензии, не указаны оптимальные условия выращивания культуры. Кроме того, не указан

15 штамм *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича и откуда он получен, что также является помехой в стандартизации микроорганизмов.

Вследствие чего, результаты нескольких серий опытов могут значительно отличаться между собой и не дают точных результатов.

Известен турбидиметрический метод определения активности лизоцима

20 (К.А.Каграманова, З.В.Ермольева, 1966). Метод (прототип) основан на способности лизоцима, добавленного к ацетоновому порошку тест-бактерий *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича, лизировать последних в одном и том же временном интервале. Для регистрации изменений оптической плотности суспензии используют пробирочный электрофотокалориметр с рабочей длиной волны 570 нм.

Тест-культуру *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича выращивают в течении 48 часов при 37°C на агаре Хоттингера, суспендируют в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, трижды отмывают дистиллированной водой, четырежды - ацетоном на холоду и высушивают при комнатной температуре. Полученный порошок можно длительно хранить при 4-6°C. Однако недостатком использования ацетонового

30 порошка тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича является высокая агрегированность бактериальных клеток, а следовательно, достаточно низкая степень дисперсности суспензии клеток (ее неоднородность) и снижение чувствительности клеток к бактериолитическому действию лизоцима. Все это ведет к снижению точности и эффективности количественного определения уровня лизоцимной

35 активности (табл.1).

Таблица 1. Пример использования ацетонового порошка тест-культуры *M.lysodeikticus* для определения лизоцимной активности яичного лизоцима.

Ацетоновый порошок тест-культуры <i>Micrococcus lysodeicticus</i> штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича	Яичный лизоцим		Контроль	
	1 серия	2 серия	1 серия	2 серия
$D_{нач}$	0,780	0,545	0,663	0,641
$D_{конеч}$	0,571	0,366	0,640	0,620
$D$ (30 мин)	0,209	0,179	0,023	0,021
ед.а.	6,97	5,97	-	-

В табл.1 показано использование одного и того же ацетонового порошка для

45 определения лизоцимной активности. В качестве объекта исследования был взят коммерческий препарат яичного лизоцима фирмы «Ферейн». Как видно из таблицы, уже на первом этапе определения начальной оптической плотности одна и та же суспензия клеток тест-культуры, приготовленная с использованием ацетонового порошка микрококка, дала

50 разные результаты (0,780 - 1 серия; 0,545 - 2 серия). Естественно, что на дальнейших этапах определения эта разница прослеживалась. И, как результат, две серии опыта, параллельно проведенные с использованием одной и той же ацетонированной тест-культурой *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича, дали разные данные об уровне активности фермента: 6.97 ед.а. и 5,97 ед.а., что наглядно

подтверждает невысокую точность и достоверность данного способа. Кроме того, при использовании ацетонового порошка тест-культуры наблюдается падение оптической плотности и в контрольных пробах, что также является одним из доказательств неточности данного способа.

5 Другим серьезным недостатком данного метода является его трудоемкость и длительность выполнения, что обусловлено необходимостью построения калибровочной кривой для количественной характеристики активности лизоцима в растворах с неизвестной концентрацией белка, а также тем, что калибровочную кривую необходимо строить перед проведением каждой серии исследований, данный процесс является  
10 длительным по времени, достаточно трудоемким и во многом зависит от имеющегося опыта исследователя.

Кроме того, в способе также нет указаний о том, с какой фазы роста взяты клетки микроорганизма *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для приготовления суспензии и не указаны оптимальные условия выращивания культуры.

15 Эти недостатки заставляют искать более точные, чувствительные и менее трудоемкие способы определения уровня лизоцимной активности.

Новизной заявляемого способа является то, что он направлен на повышение точности определения уровня лизоцимной активности из-за использования культуры, находящейся в одной фазе роста бактериальных клеток, и на сопоставимость полученных в разных сериях  
20 определения результатов.

Существенным отличием предлагаемого способа является то, что перед процессом лиофилизации культуру *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича выращивают на жидкой питательной среде при 27°C до оптической плотности 3,2-3,4, что соответствует фазе логарифмического роста микроорганизма - 11-ый час  
25 выращивания, что приводит к ее стандартизации.

1. Нами изменены условия культивирования индикаторной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича, выращивание культуры при 37°C приводит к достаточно быстрому лизису клеток микрококка и, следовательно, он не может  
30 быть использован для определения уровня лизоцимной активности. Нами предложена более оптимальная температура для его роста -27°C (Дж. Хоулт, 1997).

2. Для получения массы бактериальных клеток, подвергающихся лиофилизации, культура выращивается на жидкой питательной среде - мясопептонный бульон (МПБ) - где ее рост идет более равномерно.

3. Работая с биологическими объектами и определяя уровень лизоцима, содержащегося  
35 в тканях и жидкостях объекта, крайне важно, чтобы погрешность при измерении уровня лизоцимной активности была минимальной, а это возможно лишь при использовании высокостандартизированной индикаторной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Поэтому перед культивированием *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им.  
40 Л.А.Тарасевича нами была построена кривая роста данной культуры и установлено, что фаза логарифмического роста наступает через 6 часов после засева на среду и заканчивается на 13-ом часу культивирования (чертеж). А как известно, находясь в фазе логарифмического роста, интенсивно растущие клетки бактерий наиболее чувствительны к  
45 внешним воздействиям, которым можно считать и биотический фактор - лизоцим. Для лиофилизации нами берется жидкая культура с оптической плотностью 3,2-3,4: данная оптическая плотность достигается на 11-ом часу выращивания. Поэтому нами рекомендовано использовать для лиофилизации массу бактериальных клеток, находящихся в одной фазе - фазе логарифмического роста, а именно взятых на 11-ом часу  
50 культивирования культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Подводя итог данному разделу описания изобретения, следует указать, что заявляемый способ не известен из уровня техники, т.е. является новым.

Пример конкретного выполнения

Соответственно, при реализации способа фотометрического определения лизоцимной активности с использованием стандартизированной лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича характеристика действий, порядка их выполнения и условий осуществления представляется следующим образом:

На первом этапе осуществляется стандартизация и приготовление лиофилизированной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича:

1. 100  $\mu$ l клеток живой культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича с исходной плотностью 0,015 вносят в жидкую питательную среду (МПБ) и выращивают при 27°C на ротационном шейкере УМТВ-12-250 при перемешивании 100-150 об/мин.

2. На 11-ом часу культивирования культуру снимают с шейкера. Выращенную жидкую культуру вносят в ампулы по 1,5 мл.

3. Лиофилизацию осуществляют в лабораторном сублиматоре ОЕ-960 (Венгрия).

Лиофилизированную культуру *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича хранят в холодильниках при температуре 4-12°C.

На втором этапе полученную стандартизированную лиофилизированную тест-культуры используют для приготовления суспензии необходимой для определения лизоцимной активности:

Для фотометрического определения уровня лизоцимной активности используют суспензию клеток лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича с оптической плотностью 0,6-0,62.

Для этого ампулу со стандартизированной лиофилизированной тест-культурой разводят в 7,5 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 6,0 (т.к. в ампулу помещалась жидкая тест-культура с оптической плотностью 3,2-3,4 объемом 1,5 мл, то разведением ампулы в 5 раз - доведением объема до 7,5 мл - получаем необходимую для измерения оптическую плотность 0,6-0,62).

На третьем этапе проводят измерение уровня лизоцимной активности исследуемых объектов:

1. К 1 мл исследуемого препарата добавляют 6 мл приготовленной для измерения суспензии с оптической плотностью 0,6-0,62 (в целях уменьшения расхода материала для кювет объемом 3 мл предлагается следующее соотношение: 0,4 мл (400  $\mu$ l) исследуемого препарата и 2,4 мл приготовленной для измерения суспензии).

2. Сразу же измеряют начальную оптическую плотность и после 30-минутного инкубирования при 37°C - конечную оптическую плотность. Измерение проводят при длине волны 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм с использованием спектрофотометра СФ-46.

3. Изменение оптической плотности вычисляем по формуле:

$$\Delta D = D_{\text{конеч}} - D_{\text{нач}}$$

4. Параллельно с опытом ставится контроль, который содержит 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (вместо исследуемого препарата) и 6 мл приготовленной для измерения суспензии лиофилизированной культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

На четвертом этапе проводят определение содержания (концентрации) белка в исследуемых объектах: содержание (концентрацию) белка в исследуемых объектах измеряют по методу Лоури (Lowry et al., 1951), который сочетает в себе биуретовую реакцию и реакцию Фолина (на S-содержащие аминокислоты - тирозин и триптофан).

Используемые реактивы: 2% раствор карбоната натрия, приготовленный на 0,1 М растворе гидроксида натрия (реактив 1); 0,5% раствор сульфата меди, приготовленный на 1% растворе цитрата натрия (реактив 2); реактив 3 (1 мл реактива 1 смешивают с 50 мл реактива 2), готовят непосредственно перед употреблением; реактив Фолина-Чокальтеу.

Ход определения: исследуемый объект объемом 0,4 мл (400  $\mu$ l) смешивают с 2 мл

реактива 3 и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. Добавляют 0,2 мл (200 µl) реактива Фолина-Чокальтеу, перемешивают и через 30-40 минут измеряют оптическую плотность при 750 нм на спектрофотометре или на фотоэлектрокалориметре.

На пятом этапе проводится вычисление уровня лизоцимной активности исследуемых объектов с использованием величины - удельная единица активности (у.ед.а).

За единицу лизоцимной активности (ед.а.) исследуемого препарата принимают такое его количество, которое вызывает снижение величины начальной оптической плотности суспензии клеток тест-культуры на 0,001 за 1 минуту:

$$\text{ед.а.} = \frac{\Delta D}{0,001 \times \tau_{(\text{инкубирования})}} \quad (1), \text{ где}$$

$\Delta D$  - изменение оптической плотности,

$\tau_{(\text{инкубирования})}$  - время инкубирования (в минутах).

Поскольку исследуемые биологические жидкости различаются по содержанию белка, то значение уровня лизоцимной активности в единицах активности (ед.а.) не может отражать истинную активность лизоцима, содержащегося в исследуемых препаратах. Поэтому необходим пересчет уровня лизоцимной активности с учетом количества (содержания) белка в исследуемых препаратах. В связи с чем, мы используем общеизвестную формулу определения активности ферментов - удельную единицу активности (у.ед.а.), которую выражают в ед.а./мг белка (авторское свидетельство №1811854 от 30.04.1993) и

рассчитывают по формуле:

$$\text{у.ед.а.} = \text{ед.а.} / [\text{Б}] \quad (2)$$

или подставив в формулу (2) формулу (1), можно получить формулу (3)

$$\text{у.ед.а.} = \frac{\Delta D}{[\text{Б}] \times 0,001 \times \tau_{(\text{инкубирования})}} \quad (3), \text{ где}$$

[Б] - концентрация белка в исследуемом объекте (мг/мл).

В качестве примера для расчета уровня лизоцимной активности взяты экстракты жаберной ткани двусторчатых моллюсков вида *Unio pictorum* и *Anodonta cygnea* с одинаковым значением  $\Delta D$ , но отличающиеся по содержанию белка:

Пример расчета лизоцимной активности экстракта жаберной ткани двусторчатого моллюска *Unio pictorum*

Пример расчета лизоцимной активности экстракта жаберной ткани двусторчатого моллюска *Anodonta cygnea*

$$\Delta D - 0,329$$

$\tau_{(\text{инкубирования})}$  - 30 минут

[Б] - 4,5 мг/мл

$$\text{ед.а.} = 0,329 / 0,001 \times 30 \text{ мин};$$

$$\text{ед.а.} = 0,329 / 0,03;$$

$$\text{ед.а.} = 10,97$$

$$\text{у.ед.а.} = 0,94 / 4,5 \text{ мг/мл};$$

$$\text{у.ед.а.} = 2,44 \text{ ед.а./мг белка}$$

$$\Delta D - 0,329$$

$\tau_{(\text{инкубирования})}$  - 30 минут

[Б] - 10,4 мг/мл

$$\text{ед.а.} = 0,329 / 0,001 \times 30 \text{ мин};$$

$$\text{ед.а.} = 0,329 / 0,03;$$

$$\text{ед.а.} = 10,97$$

$$\text{у.ед.а.} = 10,94 / 10,4 \text{ мг/мл};$$

$$\text{у.ед.а.} = 1,05 \text{ ед.а./мг белка}$$

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Для опытного обоснования факта использования стандартизированной лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для определения лизоцимной активности были проведены две серии сравнительных экспериментов по использованию ацетонированной и лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для определения лизоцимной активности препаратов лизоцима различного происхождения: яичного лизоцима и лизоцима моллюсков *Unio pictorum*. Результаты исследований представлены в таблицах 2, 3.

Пример 1. Результаты использования лиофилизированной и ацетонированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для определения активности яичного лизоцима.

Таблица 2.						
Тест-культура <i>Micrococcus lysodeicticus</i> штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича	Яичный лизоцим		Яичный лизоцим		Контроль	
	лиофилизиров. (1 серия)	лиофилизиров. (2 серия)	ацетониров. (1 серия)	ацетониров. (2 серия)	лиофилизиров.	ацетониров.

D <sub>нач</sub>	0,605	0,62	0,545	0,780	0,6	0,663
D <sub>конеч</sub>	0,385	0,397	0,366	0,571	0,597	0,640
D (30 мин) Δ	0,220	0,223	0,179	0,209	0,003	0,023
ед.а.	7,33	7,43	5,97	6,97	-	-
[Б] (мг/мл)	1	1	1	1	-	-
у.ед.а. (ед.а./мг белка)	7,33	7,43	5,97	6,97	-	-

Из цифровых данных таблицы 2 видно, что при использовании стандартизированной лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича уже на первом этапе определения начальной оптической плотности результаты двух серий опыта незначительно отличаются между собой (0,605 и 0,62), и как результат - незначительные различия в уровне активности лизоцима: 7,33 ед./мг белка (1 серия) и 7,43 ед. мг белка (2 серия). В то время как при использовании ацетонированной тест-культуры результаты сильно отличаются (0,545 и 0,780), что, естественно, ведет к различию в оценке уровня активности данного препарата: 5,97 ед. мг белка (1 серия) и 6,97 ед./мг белка (2 серия).

Пример 2. Результаты использования стандартизированной лиофилизированной и ацетонированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича для определения активности лизоцима моллюска *Unio pictorum*.

Тест-культура <i>Micrococcus lysodeicticus</i> штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича	Лизоцим моллюска <i>Unio pictorum</i>		Лизоцим моллюска <i>Unio pictorum</i>		Контроль	
	лиофилизиров. (1 серия)	лиофилизиров. (2 серия)	ацетониров. (1 серия)	ацетониров. (2 серия)	лиофилизиров.	ацетониров.
D <sub>нач</sub>	0,6	0,62	0,702	0,521	0,62	0,641
D <sub>конеч</sub>	0,44	0,456	0,570	0,419	0,616	0,620
D (30 мин) Δ	0,16	0,164	0,132	0,102	0,004	0,021
ед.а.	5,33	5,46	4,4	3,4	-	-
[Б] (мг/мл)	0,23	0,23	0,23	0,23	-	-
у.ед.а. (ед.а./мг белка)	23,2	23,7	19,1	14,7	-	-

Для подтверждения достоверности результатов опытов была проведена оценка уровня активности лизоцима моллюска *Unio pictorum*. Из результатов, представленных в таблице 3, следует, что при использовании стандартизированной лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича уже на первом этапе определения начальной оптической плотности результаты двух серий опыта незначительно отличаются между собой (0,6 и 0,62), и как результат - незначительные различия в оценке уровня активности препарата: 23,2 ед./мг белка (1 серия) и 23,7 ед./мг белка (2 серия). В то время как при использовании ацетонированной тест-культуры результаты сильно отличаются (0,702 и 0,521), что, естественно, ведет к различию в оценке уровня активности исследуемого препарата: 19,1 ед./мг белка (1 серия) и 14,7 ед./мг белка (2 серия).

Кроме того, оптическая плотность в контрольных пробах суспензии ацетонированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича значительно изменялась (0,023 и 0,021), а в контрольных пробах лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича изменения были незначительны (0,003 и 0,004), что еще раз подтверждает преимущества заявляемого способа.

Таким образом, использование стандартизированной лиофилизированной тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича дает более точные, достоверные и сопоставимые сведения об уровне лизоцимной активности исследуемых биологических объектов.

#### Литература

1. Алехина Г.П. Лизоцимная и антилизоцимная активность альгофлоры в водных биоценозах. // Автореф. дисс. канд. биол. наук. - Оренбург, 1996. - 24 с.

2. Бухарин О.Б., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. - Томск: Изд-во Томск, ун-та, 1974. - 208 с.

3. Ежов В.А., Троицкая Л.В., Рухлова Л.П., Кулаев И.С., Северин А.И., Абрамочкин Г.В., Комарова Г.В., Синявина О.С., Жбанова В.И. Способ выделения комплекса  
5 литических ферментов. /Авт. Свидетельство №1755581 от 20 августа 1995, Бюл. №23.

4. Каграманова К.А., Ермольева З.В. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима. // Антибиотики. - 1966. - Т.11, №10. - С.9117-9119.

5. Купер Э. Сравнительная иммунология. - М.: Мир, 1980. - 422 с.

6. Немцова Н.В. Микробиологическая характеристика биоценологических  
10 взаимоотношений гидробионтов и ее значение в санитарной оценке водоемов. // Автореф. дисс. доктора мед. наук. - Челябинск, 1998. - 38 с.

7. Определитель бактерий Берджи. // Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П., Стейли Дж., Уилльямса С. - М.: Мир, 1997. - Т.2, с.539.

8. Подборнов В.М., Бердыев А. Защитные механизмы иксодоидных клещей и их  
15 прокормителей. - Ашхабад: Ылым, 1991. - 240 с.

9. Соловых Г. Н. Система лизоцим-антилизоцим микроорганизмов в формировании водных сообществ пресных водоемов. // Автореф. дисс. доктора биол.наук. - Челябинск, 1995. - 216 с.

10. Щербакова Л.Н., Игнатюк Т.Е., Рыльцев В.В., Филатов В.Н., Лизонец М.Н., Толстых  
20 П.И., Брюсов П.Г. Способ получения текстильного материала с иммобилизованными ферментами. /Авт.свидетельство №1811854 от 30 апреля 1993, Бюл. №16.

#### Формула изобретения

Способ определения лизоцимной активности биологических объектов,  
25 предусматривающий использование тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* штамм № 2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича и вычисление лизоцимной активности, отличающийся тем, что используют тест-культуру *Micrococcus lysodeicticus* штамм № 2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича, выращенную на жидкой питательной среде при температуре 27°C до оптической плотности 3,2-3,4 и подвергнутую лиофилизации.

30

35

40

45

50