

(19)



(10) **LT 3422 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3422**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 9/36,
A61K 37/48**

(21) Paraiškos numeris: **IP594**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 12 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 09 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 90/00140, 1990 01 08**

(72) Išradėjas:
Peter Herrmann, CH
Peter Klein, CH

(73) Patento savininkas:
NIKA HEALTH PRODUCTS LTD., Steadtle 36, 9490 Vaduz, LI

(74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Lizocimo dimerų gavimo būdas

(57) Referatas:

Šiame išradime aprašomas būdas, skirtas labai gerai išvalytam lizocimo dimerui gauti, kuriame numatoma lizocimo monomero dimerizacija, panaudojant suberimidatinį sujungiantįjį reagentą buferiniame tirpale, kurio pH nustatomas lygus 10; dimerizacijos reakcija nutraukiama reikiamu laiko momentu, sumažinant pH iki 7, pridėjus HCl arba kitos rūgšties; dimerizuotas lizocimas valomas, panaudojant keletą viena po kitos einančių eliuavimo stadijų, per chromatografinę kolonėlę, užpildytą jonitine derva. Išėigos padidimui po dimerizacijos likę nedimerizuoti lizocimo monomerai vėl grąžinami į procesą. Siūlomas būdas, palyginus su kitais būdais, turi tą privalumą, kad leidžia efektyviai ir gana nebrangiai gauti didelius išvalyto lizocimo dimero kiekius. Be to, taip gautas lizocimo dimeras gali būti naudojamas, gydant virusinius ir/arba bakterinius susirgimus, nes jis neturi citotoksinio poveikio, charakteringo lizocimo monomerinei formai.

Išradimas apima lizocimo dimero, kuris, beja, gali būti naudojamas virusinių ir bakterinių infekcijų gydymui, gavimo ir valymo būdus.

5 Vis didėjantis bakterinių kamienų ir virusinių susirgimų atsparių antibiotikams, skaičius sąlygoja poreikį ieškoti naujų vaistų žmonėms ir gyvuliams gydyti. Tarp daugelio šiuolaikinių priemonių, skirtų įvairių susirgimų gydymui, naudojami ir monomerinės
10 formos fermentai. Fermentai yra katalitiškai aktyvūs baltymai, atsakingi beveik už visus organizme vykstančius gyvybinius procesus. Dauguma fermentų, tiek atskirai paimtų, tiek įvairiose kombinacijose buvo išskirti, remiantis jų fizikocheminėmis, fiziologinėmis
15 ir biologinėmis savybėmis.

Dabartiniu metu buvo parodyta, kad lizocimas, žinomas nuo 1922 m. šalia kitų fermentų, turinčių gydantįjį efektą, gali būti naudojamas gydyti įvairiems susir-
20 gimams, kuriems reikalingas fiziologinis ir biologinis poveikis. Buvo rasta, kad lizocimas pasižymi įvairiomis terapinėmis savybėmis, tokiomis kaip antivirusinis, antibakterinis, priešuždegiminis ir antihistamininis efektas. Antibakterinis lizocimo efektas, matyt, yra
25 sąlygotas β -1-4-glikozidinio ryšio tarp N-acetilmuramino rūgšties ir N-acetigliukozamino, esančių bakterijų apvalkalėliuose, hidrolizės.

Deja, milžiniškas lizocimo galimo gydomojo poveikio potencialas nepanaudojamas pirmiausia dėl jo žymaus citotoksinio efekto, charakteringo šio fermento monome-
30 rinei formai. Pavyzdžiui, bandymuose su fibroblastų kultūromis buvo pastebėtas žymus net ir labai mažų lizocimo monomerinės formos dozių citotoksinis
35 veikimas. Taigi, maksimalaus šio fermento gydančiojo efekto išnaudojimo paieškos, ieškant būdų apriboti monomero citotoksines savybes, tampa vis aktualesnės.

Neseniai buvo rasta, kad antivirusiniai arba antibakteriniai preparatai, neturintys citotoksinio poveikio, gali būti gauti lizocimo pagrindu, t.y. gaminant kompozicijas, turinčias fermento dimerinę formą. Lizocimo dimero panaudojimas leidžia sukurti preparatą, tinkamą eilei infekcinių susirgimų gydyti ir neturinti stiprių citotoksinių savybių, kuriomis pasižymi lizocimo monomerai. Lizocimo dimerų panaudojimas įvairiuose terapiniuose preparatuose aprašytas šiuo metu nagrinėjamoje paraiškoje PCT US 88/01785.

Nors dimerinės formos iš monomerų gavimo būdai yra žinomi, tačiau išlieka aktualus nebrangaus ir efektyvaus lizocimo dimerų didelių kiekių gavimas. Tokiu būdu, be galo svarbu sukurti išvalyto lizocimo, neturinčio monomerinės arba polimerinės formos bei kitų priemaišų, didelių kiekių gavimo technologiją ir analizės metodą.

Pagal šį išradimą, siūlomas lizocimo dimero efektyvus gavimo būdas, susidedantis iš šių stadijų:

a) lizocimo tirpalo paruošimas, pridedant lizocimo monomerą į buferinį tirpalą, kurio pH yra mažiausiai 9;

b) sujungiančio reagento - suberimidato, tokio kaip dimetilsuberimidatas, skirto sukelti lizocimo monomerų dimerizaciją tirpale, kurio pH palaikomas apie 9 ir daugiau, pridėjimas;

c) pH sumažinamas iki apytikriai 7, kad dimerizacijos reakcija nutrūktų reikiamu laiko momentu;

d) dimerizuoto lizocimo tirpalo valymas, panaudojant pirmąją eliuavimo stadiją, kurioje tirpalas perleidžiamas per jonitinę kolonėlę ir surenkamos frakcijos, turinčios pagrindinai lizocimo dimerinę formą;

5 e)frakcijų, surinktų pirmojo valymo stadijoje, filtravimas, panaudojant antrąją eliuavimą, kuriame surinktos frakcijos vėl perleidžiamos per jonitinę kolonėlę;

f)gerai išvalyto lizocimo dimero, gauto antrojoje išskyrimo stadijoje, surinkimas.

10 Aukščiau aprašytu metodu galima gauti didelius kiekius išvalyto lizocimo dimero, kuris gali būti panaudotas gydant eilę virusinių ir bakterinių susirgimų.

Trumpas pridedamų brėžinių aprašymas

15

1.brėž. atvaizduota eliuavimo kreivė, gauta šio išradimo pirmojoje eliuavimo stadijoje.

20

2.brėž. atvaizduota eliuavimo kreivė, gauta šio išradimo antrojoje eliuavimo stadijoje.

Tinkamiausio gavimo būdo smulkus aprašymas

25

Pagal šį išradimą, pradine medžiaga lizocimo dimerams gauti gali būti naudojami bet kokie tinkami šiam tikslui monomerai. Šiame išradime lizocimo monomerinė forma buvo gauta iš Serva Feine Biochemica, GmbH Heidelberg, kataloginis Nr. 28260. Prieš pridedant sujungiantįjį reagentą, lizocimo monomeras buvo ištirpintas menzūroje fosfatiname buferyje, kambario temperatūroje, visą laiką maišant mažiausiai 2 valandas. Naudotas fosfatinis buferis turėjo 0,1 M dinatrio hidrofosfato dihidrato. Šis buferinis tirpalas gaminamas, ištirpinant 70 g dinatrio hidrofosfato dihidrato 1000 ml vandens. Nors tikri reagentų ir tirpiklių, naudojamų šiame išradime kiekiai gali skirtis, dimerizacijos reakcija, pagal šį išradimą,

35

buvo vykdoma, naudojant apytikriai nuo 40 iki 60 g lizocimo monomero, ištirpinto cheminėje stiklinėje 5 litruose dinatrio hidrofosfato dihidrato buferio. Būtina, kad monomero tirpalo pH būtų palaikoma
5 mažiausiai 9, geriau 10. pH reguliavimui gali būti naudojamas šarmo tirpalas, pvz. 1 N NaOH.

Dimerizacijos reakcija buvo vykdoma, pridedant sujungiančiojo reagento - suberimidato - reikiamomis propor-
10 cijomis į lizocimo monomerą, o pH palaikomas apie 9 ir daugiau. Pagal šį išradimą, geriausia naudoti dime-
tilsulberimidatą. Į aukščiau aprašytu būdu pagamintą tirpalą pridedama 4-6 g dimetilsulberimidato; jis iš-
tirpsta per apytikriai 1 minutę. Polimerizacijos reak-
15 cija vyksta 60 min. kambario temperatūroje ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$),
nepertraukiamai maišant magnetiniu maišikliu, arba kitokio tipo maišikliu.

Dimerizacijos reakcija gali būti sustabdyta reikiamu
20 momentu, sumažinant pH iki 7 ($\pm 0,2$), pridėjus 1 M HCl ir/arba 0,2 M amonio acetato tirpalo (apytikriai 250 ml). Toks amonio acetato tirpalas gaunamas, ištirpinant 15 g medžiagos 1000 ml vandens. Kaip taisyklė, dimerizacijos
reakcija vyksta 1 val., nors šis laikotarpis gali būti
25 didesnis arba mažesnis, priklausomai nuo tikslaus
pridedamų medžiagų kiekio ir naudojamų reagentų ir
tirpalų prigimties.

Šioje stadijoje būtina reakcijos mišinį, kuris, kaip
30 taisyklė, yra gana drumstas, praleisti per membraninį
filtrą ir atskirti netirpias daleles. Paprastai tai yra
būtina operacija, nes šioje stadijoje tirpalas turi
netirpių polimerų priemaišų. Polimerų ir kitų neiš-
tirpusių dalelių atskyrimui reikia naudoti filtrus,
35 kurių porų dydis yra apie 0,4-0,5 μ .

Buvo atlikta mėginių, paimtų tam tikrais laiko tarpais po sujungiančiojo reagento pridėjimo į lizocimo monomero tirpalą, analizė gel-elektroforezės metodu. Tyrimai parodė, kad nors monomerinė forma ir aiškiai matoma

5 beveik visuose analizuojamuose mėginiuose, juostelė, atitinkanti dimerinę lizocimo formą, jau matoma po 10 minučių nuo reakcijos pradžios ir, reakcijai vykstant, ji vis intensyvėja. Lizocimo molekulinis svoris - apie 14 000, o dimero juostelė atitinka molekulinį svorį

10 lygų 30 000. Kaip parodė elektroforezės tyrimai, susidaro taip pat ir polimerinės formos.

Norint gauti didesnius išvalyto lizocimo dimero kiekius, pageidautina, kad tirpalas praeitų mažiausiai dvi

15 valymo stadijas, kuriose būtų išskiriamas lizocimo dimeras ir pašalinami lizocimo monomerai arba kitokios priemaišos. Šiame išradime siūloma atskirtus nedimerizuotus lizocimo monomerus surinkti ir vėl leisti į ciklą, kad būtų padidintas lizocimo dimero gamybos

20 efektyvumas.

Pirmoji valymo stadija atliekama, panaudojant jonų mainų chromatografiją. Šiame etape lizocimo dimero tirpalas, gautas dimerizacijos reakcijoje aukščiau

25 aprašytu būdu, įleidžiamas į kolonėlę su jonitine derva, tokia kaip Sefarozė arba kiti katijonitai. Tinkamiausiame variante kolonėlė, kurios diametras apie 10 cm ir aukštis - 25 cm, užpildoma S-Sefarozė FF (Farmacia); kolonėlės tūris - apie 2,1 l, ji plaunama 4,2 l

30 50 mM K-fosfato buferiu, kurio pH 7, kol pasiekia pusiausvyrą. Apie 5 l dimerizuoto tirpalo leidžiama per jonitinę kolonėlę, ir tinkamiausias eliuavimo greitis yra 60 ml/min. Pageidautina, kad eliuavimas būtų vykdomas, panaudojant druskos gradientą $-0,1 \pm 1 \text{ M NaCl}$ 50 mM

35 K-fosfatiniame buferyje. Šioje stadijoje frakcijos buvo renkamos frakcijų kolektoriumi (LKB 2211 Suprec markės), ir laikomas steriliose kolbose. Eliuavimo kreivės

buvo registruojamos, naudojant saviraštį LKB 2210, registravimo greitis 1 mm/min. Gauta eliuavimo kreivė gali būti panaudota, nustatant tikslią surinktų frakcijų sudėtį. Surinktų tirpalų absorbciją geriausia
5 matuoti, esant $\lambda=280$ nm, LKB 2238 UVICOR SII prietaisu.

Tikslus baltymų kiekis kiekvienoje pirmojo aukščiau aprašyto eliuavimo stadijos frakcijoje analizuojamas gel-elektroforezės metodu, pvz., panaudojant poliakrilamidinį gelį su SDS (SDS-PAGE), kurią aprašė Thomas ir kt. PNAS, 72, 2626 (1979). Tokiems elektroforezės tyrimams apie 50 μ l kiekvienos frakcijos sumaišoma su 50 μ l sensibilizuojančio buferio, ir mišinys šildomas 10 min. apytikriai 95°C temperatūroje. Po to, 25 μ l šio
10 mišinio įleidžiama į gelio duobutę. Po elektroforezės, kuri truko apie 4 val., esant 20-35 mA srovei, baltymo juostelės atsiskiria ir tampa matomos, dažant tokiais dažais, kaip Kumasi mėlynasis (Coomassie-Blue R 250 (Merck)).
15

Naudojant SDS-elektroforezę, galima išskirstyti lizocimo monomerus, dimerus ir polimerus. Elektroforezės analizė gali būti panaudota surinktų frakcijų, kurios pagrindinai turi lizocimo dimerus, identifikavimui.
20 Frakcijos, kuriose pagrindinai yra lizocimo dimerai, surenkamos ir koncentruojamos geriausia iki 800 ml tangentinio srauto sistemoje.
25

Šioje stadijoje, norint geriau išvalyti dimerinį produktą, tikslinga atlikti antrąjį filtravimo etapą. Tinkamiausiame išradimo realizavimo variante, pirmojoje eliuavimo stadijoje surinkti lizocimo produktai koncentruojami, panaudojant tangentinio srauto sistemą, ir vėl leidžiami per jonitinę kolonėlę. Šiuo atveju geriausia naudoti kolonėlę, užpildytą Sefadeksu (Sephadex G-50F (Pharmacia)). Kolonėlės diametras - apie 25 cm, aukštis - 120 cm. Kolonėlė plaunama 60 l 50 mM amonio
30
35

acetato buferio, kol gaunama pusiausvyra; šis buferis palaiko pH lygų apytikriai 5. Toks amonio acetato buferis buvo pagamintas iš 4 g amonio acetato ir 1000 ml vandens; jo pH gautas lygus 5, pridedant 3 g acto rūgšties tirpalą 1000-je ml distiliuoto vandens.

Lizocimo dimero tirpalas, surinktas pirmojoje eliuavimo stadijoje ir sukonzentruotas tangentinio srauto sistemoje, perleidžiamas per jonitinę kolonėlę, kurioje išlyginančio buferio tekėjimo greitis yra 70 ml/min. Kaip ir pirmojo eliuavimo atveju, frakcijos renkamos ir sukaupiamos, ir maždaug 50 μ l kiekvienos frakcijos analizuojama SDS-PAGE metodu taip, kaip aprašyta aukščiau. Be to, eliuavimo kreivės vėl registruojamos saviraščiu, kurio registracijos greitis yra apie 0,5 mm/min. Absorbciija taip pat matuojama, esant $\lambda=280$ nm. Eliuavimo kreivė, gauta frakcijoms po antrojo valymo etapo, turi tris pikus, bet pagrindinai kreivėje matomas vidurinysis pikas, atitinkantis lizocimo dimerus. Šiame etape matomi tik minimalūs polimerinių ir monomerinių lizocimo formų kiekiai. Gerai išvalytos dimerinės frakcijos, kaip matyti iš viduriniųjų kreivės pikų, surenkamos ir vėl sukonzentruojamos tangentinio srauto sistemoje. Galų gale, surinktas išvalytas dimeras liofilizuojamas ir laikomas iki panaudojimo.

Visas šis procesas gali būti kartojamas tiek kartų, kiek reikia, kad būtų gaunamas reikiamas dimerinio produkto kiekis. Atskiros išvalytos frakcijos gali būti ištirpintos distiliuotame vandenyje, o po to liofilizuotos. Taip galima gauti homogenines partijas lizocimo, kuris gali būti efektyviai panaudotas, gydant daugelį virusinių ir bakterinių susirgimų. Šalia lizocimo antivirusinių ir antibakterinių savybių, jo dimerinė forma turi ir kitokią terapinę poveikį, tokį kaip priešuždegiminis arba antihistamininis; be to, jis neturi citotoksinio veikimo, charakteringo monomerinei

lizocimo formai. Taigi, siūlomas būdas gali būti naudojamas didelių kiekių išvalyto naudingo produkto - lizocimo dimero - efektyviai gamybai. Kadangi dimerinis produktas, gautas šiame išradime pasiūlytu būdu, turi savybę ardyti bakterijas, jo efektyvumas gali būti nustatytas, įvedant lizocimo dimerą į mikroorganizmų suspensiją ir po to stebint mikroorganizmų kiekio mažėjimą spektrofotometru. Šiuo metodu atlikti tyrimai parodė, kad lizocimo dimerai, gauti išradime aprašytu būdu, turi vertingas savybes, kurios gali būti panaudojamos virusinių ir bakterinių susirgimų gydymui.

Šio išradimo iliustracijai duodami pavyzdžiai, kurie, vienok, neriboja šio išradimo apimties.

1 pavyzdys

Lizocimo dimero gavimas

50 g lizocimo monomero (Serva, Feine, kataloginis Nr.28260) ištirpinama uždaramame inde 5 l 0,1 M dinatrio hidrofosfato dihidrato buferinio tirpalo, nepertraukiamai maišant 2 val. 25°C temperatūroje. Fosfatinis buferis gaminamas iš 70,98 g dinatrio hidrofosfato dihidrato (Merck P.A.) ir 1000 ml vandens. Tirpalo pH lygus 10 nustatytas, pridedant 1N Na OH. Po to, į baltymo tirpalą pridedama 5 g sujungiančiojo reagento - dimetilsuberimidato (Sigma) ir pH pastoviai palaikoma lygus 10. Reagentas visiškai ištirpsta per 1 minutę, o dimerizacijos reakcija vyksta 60 minučių kambario (25°C) temperatūroje, visą laiką maišant magnetiniu maišikliu. Reakcija nutraukiama, sumažinant tirpalo pH iki 7, pridėjus 1M HCL ir apie 250 ml 0,2 M amonio acetato tirpalo. 0,2 M amonio acetato tirpalas gautas iš 15,42 g amonio acetato (Merck P.A.) ir 1000 ml vandens. Šioje stadijoje visas tirpalas buvo labai drumstas, todėl neištirpusioms dalelėms atskirti jis

buvo perleistas per membraninį filtrą, kurio porų dydis buvo 0,45 μ . Neištirpusios dalelės buvo polimerai; tai nustatyta SDS-gel-elektroforezės metodu.

- 5 Pridėjus sujungiantįjį reagentą, iš reakcijos mišinio tam tikrais laiko tarpais buvo imami mėginiai ir analizuojami gel-elektroforezės metodu. Kiekviename mėginyje buvo aiškiai matoma monomerinė lizocimo forma. Ji buvo stebima, kaip apatinė juostelė, kurios santykinis molekulinis svoris yra 14000 (lizocimo molekulinis svoris yra 14386). Antrajame mėginyje, paimtame po 10 min. nuo reakcijos pradžios, stebima dviguba dimero juostelė; vykstant reakcijai, ji tampa vis didesnė. Dimero juostelė atitinka molekulinį svorį 15 apytikriai 30000. Be to, paskutiniuose mėginiuose buvo galima pastebėti ir polimero juostelę.

- Preliminarinio valymo tikslais 5 l gauto produkto buvo leidžiama per katijonitinę kolonėlę su S-Sefaroze FF (Pharmacia). Kolonėlė, kurios diametras yra 10 cm ir 20 aukštis - 25 cm, turi 2,1 l tūrį. Ji išlyginama 4,2 l 40 mM K-fosfatinio buferio, kurio pH 7; 5 l dimerizuoto tirpalo įleidžiama į kolonėlę ir eliuuojama, esant srauto greičiui 60 ml/min., o NaCl gradientui K-fosfatiniame buferyje 0,15 $\pm$ 1M, pH lygus 7. 25

- Druskos gradientas buvo nustatomas ir kontroliuojamas maišytuvu panaudojant LKB 2152 reguliatorių tokiu būdu. Pirmasis paruoštas tirpalas (A tirpalas) buvo 50 mM K-fosfatinis buferis, kurio pH 7, ir nulinis NaCl kiekis; 30 antrasis tirpalas (B tirpalas) buvo 50 mM K-fosfatinis buferis, kurio pH 7, ir jis turėjo 1 M NaCl. Pradiniu laiko momentu (t_0) B tirpalo kiekis eliuavimo buferyje sudarė 15%; po 1 val. (t_1) B tirpalo dalis palaipsniui 35 didėjo iki 50% 3,5 val. bėgyje ($t_{4,5}$); po to 30 min. buvo laikomas vienodas (t_5). Toliau vieną valandą (t_6) tirpalo dalis didėjo iki 100% ir buvo laikoma pastovi

dar vieną valandą (t_7). Po to, 5 minučių bėgyje ($t_{0,5}$) šio tirpalo dalis mažėjo iki apytikriai 0%. Po to, kolonėlė buvo plaunama 90 min. ($t_{8,35}$) tirpalu, turinčiu 0% NaCl.

5

Po eliuavimo per katijonitą - S-Sefarozę - per 10 min. iš srauto atrinktos maždaug 600 ml frakcijos ir surinktos steriliose 2 l talpos šoto kolbose. Frakcijų surinkimui naudotas frakcijų kolektorius (LKB 2211 Suprec).

10

Eliuavimo kreivė registruota saviraščiu LKB 2210B, dirbančiu 1 mm/min. greičiu. Absorbacija buvo matuojama LKB UVICOR SII, esant $\lambda=280$ nm. Eliuavimo kreivė, užrašyta pirmojoje eliuavimo stadijoje, parodyta 1 brėž. Frakcijos, turinčios dimerinę lizocimo formą, 1 brėž.

15

pažymėtos punktyru po stora linija. Druskos gradientas pavaizduotas plona linija.

20

Kiekvieno mėginio baltymų sudėtis analizuota SDS-PAGE gel-elektroforezės metodu pagal Thomas ir kt., PNAS, 72, 2626 (1975) metodiką. Tam tikslui 50 μ l kiekvienos frakcijos sumaišyta su 50 μ l sensibilizuojančio buferio ir šildyta 10 min. 95°C temperatūroje. Po to, 25 μ l gauto mišinio įleista į gelio duobutes. Kaip baltymų mišinys naudotas standartinis baltymų mišinys Standart

25

IV (Merck).

Buferis-nešėjas susidėjo iš šių komponentų:

0,72 g tris-HCl (0,06 M)

30

0.136 g EDTA(III) (5 mM)

0.18 g glicerino (10%)

5 g SDS (5%)

pH nustatytas lygus 7,2 (pridėta 90 ml H₂O)

10 ml β -merkaptioetanolio (10%)

35

Gel-elektroforezei buvo gaminamas 18% skirstantysis gelis, ant kurio uždėtas 3,9% koncentruojančio gelio sluoksnis. Skirstančiojo 18% akrilamidinio gelio tirpale buvo šios komponentės:

5

9 akrilamido

0,045 g bis-akrilamido

0,136 g tris-HCl, kurio pH 8,8 (0,325 mM)

0,03 g SDS

10

200 µl 10% amonio persulfato tirpalo

20 µl TEMED.

Koncentruojančiojo 3,9% akrilamidinio gelio tirpale buvo šios komponentės:

15

0,39 g akrilamido

10,4 mg bis-akrilamido

10 mg SDS

100 µl 10% amonio persulfato tirpalo

10 µl TEMED.

20

SDS-PAGE gelis buvo gaminamas taip: dvi stiklo plokštelės (20x20 cm) buvo gerai nuplaunamos, perplau-
namos etanoliu ir uždedamos viena ant kitos. Dvi ski-
riančiosios juostelės, kurių storis yra 1 mm (ilgis -
20 cm, plotis - 1 cm) idėtos tarp plokštelių, kad
susidarytų tarpas, kuris bus užpildomas geliu.

25

Juostelės idėtos dešiniajame ir kairiajame krašte tarp
stiklo plokštelių. Apatinis kraštas užklijuojamas
lipnia juoste, ir visi trys kraštai sutvirtinami

30

spauštukais. Pakraščiai papildomai hermetizuojami 1%
agarozės tirpalu. Kai agarozė sustingsta, skirstančiojo
gelio tirpalas supilamas tarp vertikalčiai pastatytų

plokštelių taip, kad liktų maždaug 3 cm iki viršutinio stiklinių plokštelių krašto, ir Pastero pipete ant viršaus užpilama vandens. Gelis susipolimerina per 30 min. Po to, vandens sluoksnis nupilamas, ir gelio kraštas
5 perplaunamas koncentruojančiojo gelio tirpalu, aprašytu anksčiau.

Po to, iki viršutinio krašto pripilama koncentruojančiojo gelio tirpalo ir įstatomas tefloninės šukos
10 taip, kad apatinis mėginio duobutės kraštas būtų 1 cm aukščiau, negu skirstančiojo gelio sluoksnio kraštas. Maždaug po 15 min. koncentruojantis geli susiplomerina, ir šukos išimamos. Tada nuimama lipni juostelė, ir
15 vertikaliai pastatytas gelis sujungiamas su elektroforezės prietaisu. Buferio kamera užpildoma elektroforezės buferiu (6 g tris-bazės (0,05 M), 28,5 g glicino (0,38 M), 1 g SDS (0,1%) ir 1000 ml vandens), o gelio duobutė perplaunama vieną kartą apipurškiant
20 buferiu. Lizocimo dimero pavyzdžiai pašildomi apie 10 min. buferyje-nešėjuje ir įleidžiami į konteinerį arba duobutę, skirtą testuojamam pavyzdžiui.

Elektroforezė buvo vykdoma, esant apie 20 mA srovei, apie 4 valandas. Tais atvejais, jeigu reikėjo vykdyti
25 elektroforezę per naktį, srovė buvo sumažinta iki 6-8 mA. Kad būtų matomas judantis frontas, į buferį-nešėją pridedama 0,02% bromfenolio mėlio. Kai judantis frontas pasiekia gelio kraštą, elektroforezė nutraukiama. Skirstantysis gelis atpjaunamas, dažomas 30 min. fiksuojančiame tirpale, o po to išblukinamas 2 val. laikotarpyje išblukinančiame tirpale, į kuri įeina 400 ml metanolio, 140 ml acto rūgšties ir 2000 ml vandens. Fiksuojantysis tirpalas gaunamas, sumaišant 500 ml išblukinančio tirpalo su 12 ml dažo tirpalo, į kuri įeina
30 1 g Kumasi mėlio (R 250, Merck), 50 ml H₂O ir 50 ml metanolio. Nudažant aukščiau aprašytu būdu, baltymo juostelės tampa matomos. Preparatuose, gautuose SDS-

PAGE metodu, aiškiai matomas laipsniškas lizocimo dimero kiekio didėjimas; paskutinių frakcijų pavyzdžiuose buvo matomi ir polimerai. Frakcijos, kuriose pagrindinai buvo lizocimo dimerinė forma, buvo surinktos ir sukonzentruotos tangentinio srauto sistemoje iki 800 ml. Įrenginys, pagamintas firmos Millipore, susideda iš filtro Filtron 10000d, slėgiui atsparios anglia-

5 vandenilinės membranos, kuri gali atlaikyti 7 barų slėgį, ir Verder 80 W (tipas 20-2 Nr.60079) siurblio. Įėjimo slėgis buvo 2 barai, o išėjimo - minimalus, mažiau negu 0,2 baro. Darbo našumas buvo apie 1 litras/val. Sistema turi 400 ml balastinį tūrį, taigi, baigiant darbą ir perplovus membraną 400 ml tirpalo, bendras tirpalo tūris yra 1200 ml.

10

15 Po to, lizocimo dimerai buvo valomi, filtruojant per jonitinę kolonėlę, užpildytą Sefadeksu G 50F (Pharmacia). Šiam tikslui kolonėlė (diametras - 25,2 cm, aukštis - 120 cm) buvo išlyginama 60 l 50 mM amonio acetato buferio, kurio pH 5. Visas tirpalas, kurio

20 tūris 1,2 litro, įleidžiamas į kolonėlę ir eliuuojamas išlyginančiu buferiu, esant srauto greičiui 70 ml/min. Renkamos apie 700 ml tūrio frakcijos ir iš kiekvienos frakcijos imama 50 μ l ir analizuojama aukščiau aprašytu

25 SDS-PAGE elektroforezės metodu.

Šiame filtravimo etape eliuavimo kreivės buvo užrašomos saviraščiu 0,5 mm/min. greičiu, o absorbcija matuojama, esant $\lambda=280$ nm. Gauta eliuavimo kreivė parodyta 2 brėž.

30 2 brėž. stora linija atvaizduota lizocimo tirpalų absorbcija, esant jautresniam detektavimui, negu plona linija nubrėžta kreivė. Nors ši eliuavimo kreivė ir turi tris pikus, vidurinysis iš jų yra žymiai aukštesnis, negu likusieji; jis atitinka dimerinės frakcija.

35 Pirmasis ir paskutinis pikai atitinka mažesnius polimerinės ir monomerinės lizocimo formas kiekius, kurie lieka nešėjyje.

Pagaliau frakcijos, kurios yra gerai išvalyti lizocimo dimerai (eliuavimo kreivės 8-13 frakcijos), surenkamos ir koncentruojamos aukščiau aprašytoje sistemoje. Sukoncentruotas išvalytas dimeras liofilizuojamas. Daug
5 kartų pakartojus procedūrą, gautos atskiros dimero frakcijos buvo valomos, ištirpinamos distiliuotame vandenyje ir vėl liofilizuojamos. Taip buvo gauta vienalytė lizocimo dimerų partija.

10 2 pavyzdys

Fermento aktyvumo nustatymas

Lizocimo dimero, gauto pagal šiame išradime aprašytą būdą, fermentinis aktyvumas gali būti nustatytas pagal
15 Vierkamme ir kt., International Pharmacy Journal, 2, 5 (1988) aprašytą metodiką. Šis testas paremtas mikroorganizmų *Micrococcus luteus* suardymu iki tirpių skilimo produktų, kurių sukelia fermentas, ardydamas
20 mikroorganizmų ląstelių apvalkalėlių. Laipsniškas mažėjimas arba visiškas drumstumo išnykimas, matuojant spektrofotometru, kai $\lambda=450$ nm, yra fermento aktyvumo rodiklis.

Šiam tikslui buvo pagaminta *Micrococcus luteus* suspensija. Apie 30 mg *M. luteus* (ATCC 4698, gyvi, liofilizuoti, Boehringer Mannheim) susmulkinama, sudedama į 25 ml fosfatinio buferio 100 ml talpos Erlenmejerio kolboje ir lėtai maišoma magnetiniu maišikliu 2 val.
25 kambario temperatūroje. Po to, suspensija centrifuguojama 1 min., esant 500 apsisukimų per minutę, ir supernatantas nudekantuojamas į kitą indą. Nedideli nesuspenduotų bakterijų konglomeratai liko nuosėdose. Po to, suspensija buvo maišoma, ir kad vėl nenusėstų,
30 praskiedžiama fosfatinio buferiu. Palyginimui buvo naudotas oras; kiuvetės sluoksniu storis - 1 cm. Kontroliniams matavimams buvo paimti atitinkami tipiški

mėginiai, maišomi ir praskiedžiami taip, kaip buvo aprašyta aukščiau.

5 Pavyzdžių, turinčių lizocimo dimerus, tirpalai paruošti taip, kad jų koncentracija būtų 1 mg/ml vandens. Tiriamas pavyzdys tirpinamas vandenyje prieš pat matavimą, ir jų aktyvumas sumažinamas, praskiedžiant vandeniu iki 1:250 arba 1:25. Matavimai atliekami pastovioje 25°C temperatūroje. Šiam tikslui visi 10 tirpalai turi būti termostatuojami 25°C temperatūroje, o matavimas atliekamas termostatuojamoje kiuvetėje. Kiuvetės tūris yra 3 ml, tiriamo tirpalo sluoksnio storis - 1 cm, drumstumo mažėjimas, kai $\lambda=450$ nm, buvo matuojamas 7 minutes. Drumstumo mažėjimas per minutę 15 buvo matuojamas spektrofotometru (Spectronik 1001, Beausch and Lamb). Reakcijos mišinys buvo gaminamas iš 2,95 ml *M. luteus* suspensijos ir 0,05 ml tiriamo pavyzdžio. Kiekvienas matavimas buvo kartojamas du sykius ir iš gautų rezultatų vedamas vidurkis.

20 Fermentinis aktyvumas, nustatomas pagal drumstumo mažėjimą, išmatuojamas iš pradinės tiesinės dalies ir išreiškiamas $\Delta E/\text{min}$. (E - bakterijų ekstinkcija). Dydis $\Delta E/\text{min}$ turi būti mažesnis už 0,03; (pavyzdžius reikia 25 praskiesti taip, kad būtų gaunamas toks dydis). Taip pat nustatomas ir kontrolinio pavyzdžio (*M. luteus* vandenyje) drumstumo sumažėjimas, ir šio matavimo metu gautas dydis turi būti atimamas iš reikšmių, gautų matuojant tiriamus pavyzdžius.

30 Tokiu metodu atliktas testavimas parodė, kad *M. luteus* suspensija su dimero tirpalu rodo didelį jo fermentinį aktyvumą, nepastebimą kontroliniuose bandymuose, kur *M. luteus* suspensija buvo sumaišyta su vandeniu.

35

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išvalyto lizocimo dimero gavimo būdas, b e s i -
5 s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš šių
stadijų:

- a) lizocimo tirpalo paruošimo, pridedant lizocimo mono-
mera į buferinį tirpalą, kurio pH yra mažiausiai apie 9;
- 10 b) suberimidatinio sujungiančiojo reagento pridėjimo,
kad lizocimo monomerai dimerizuotųsi tirpale, kurio
pH palaikomas mažiausiai 9;
- c) dimerizacijos reakcijos sustabdymo reikiamu laiko
momentu, sumažinant tirpalo pH iki apytikriai 7;
- 15 d) dimerizuoto lizocimo tirpalo valymo, panaudojant
pirmąją eliuavimo stadiją, kurioje tirpalas leidžia-
mas per jonitinę kolonėlę ir renka frakcijas,
turinčias pagrindinai dimerines lizocimo formas;
- e) surinktų pirmojoje filtravimo stadijoje frakcijų
20 antrinio eliuavimo, kurio metu surinktas iš pirmosios
valymo stadijos frakcijas vėl leidžia per jonitinę
kolonėlę; ir
- f) gerai išvalyto lizocimo dimero, gauto antrojoje valy-
mo stadijoje, surinkimo.

25

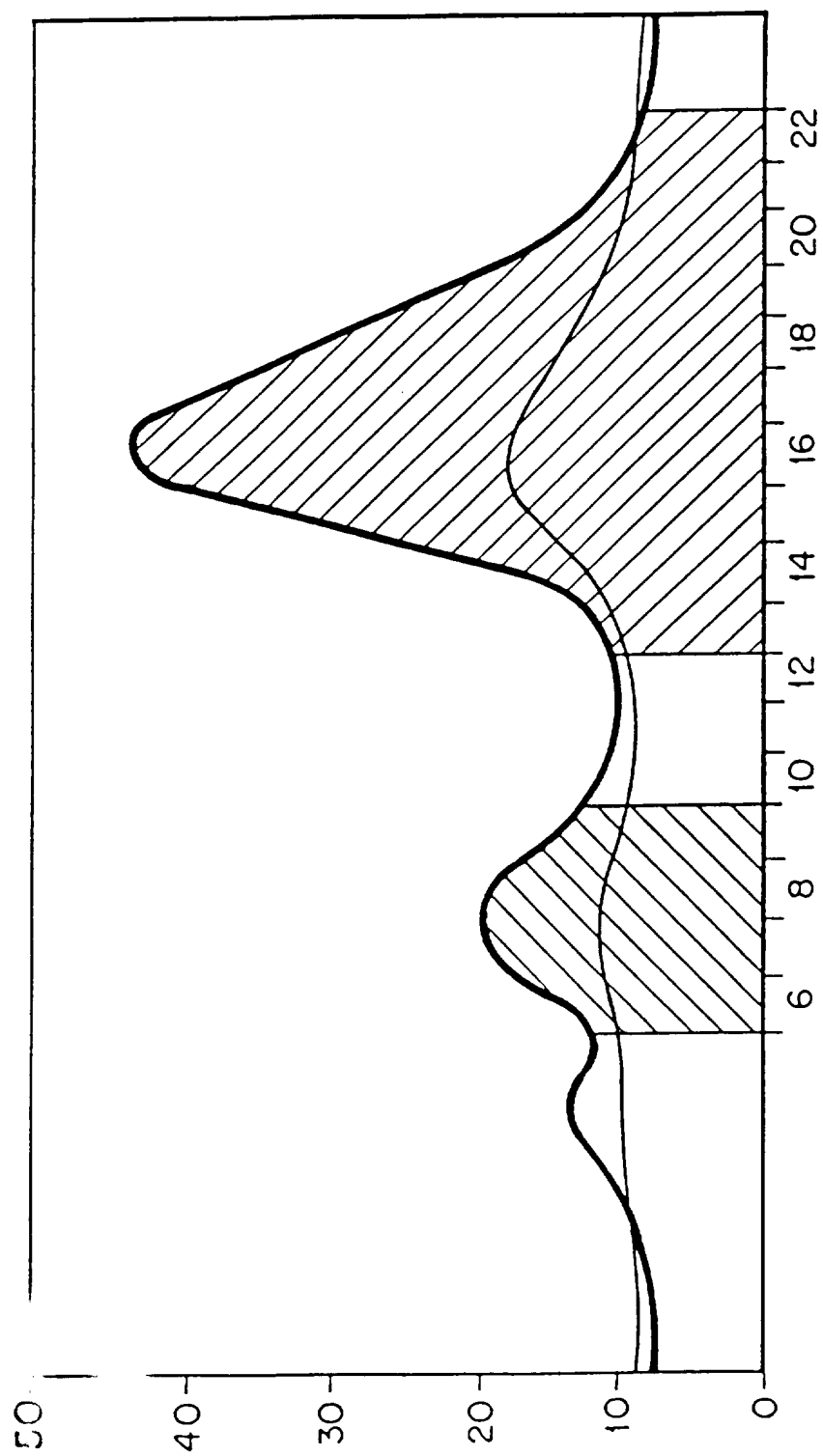
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad nustato lizocimo monomero tirpalo pH lygų 10.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
30 tuo, kad lizocimo monomero tirpalo pH, lygų 10, nustato
pridedant NaOH.

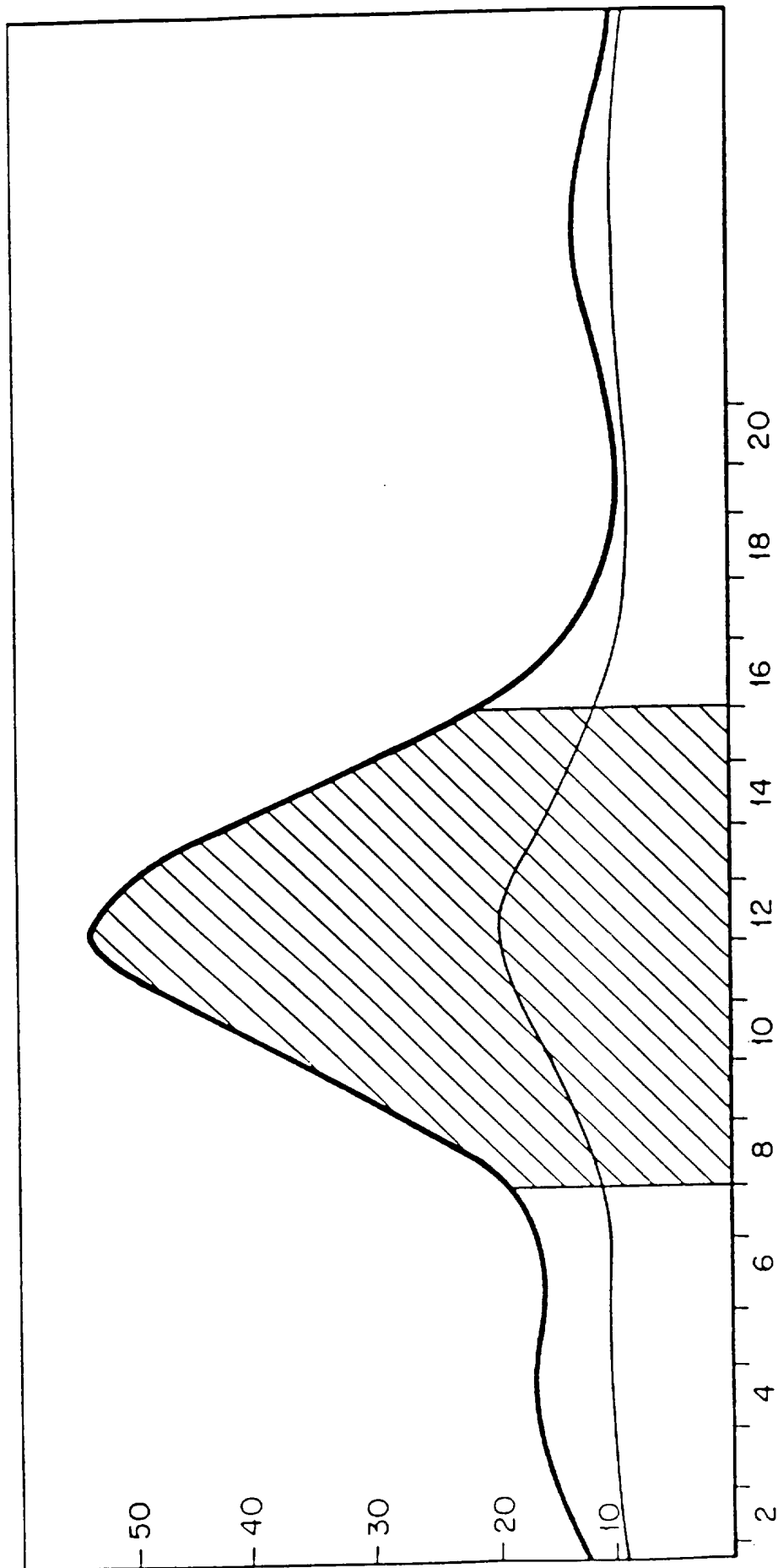
4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
35 tuo, kad buferinį tirpalą gamina iš dinatrio hidro-
fosfato dihidrato.

5. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prideda sujungiantįjį reagentą, palaikant pH lygų apie 10.
- 5 6. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad suberimidatinis reagentas yra dimetilsuberimidatas.
- 10 7. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dimerizaciją atlieka kambario temperatūroje.
- 15 8. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dimerizaciją atlieka visą laiką maišant tirpalą.
- 20 9. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dimerizacijos reakciją nutraukia, pridėdant ingradientą, parinktą iš grupės, į kurią įeina: HCl, amonio acetato tirpalas arba jų kombinacija.
- 25 10. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad numato neištirpusių po dimerizacijos reakcijos dalelių filtravimą, panaudojant poringą filtrą.
- 30 11. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad filtro porų dydis yra apytikriai 0,4-0,5 .
- 35 12. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad numato nedimerizuotų lizocimo monomerų surinkimą po dimerizacijos stadijos ir jų gražinimą į ciklą pakartotinai dimerizacijai.
13. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lizocimo monomero tirpalas susideda iš 40-60 g lizocimo monomero ir 4-6 l buferio, į kurį prideda apie 4-6 g sujungiančiojo reagento.

14. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad eliuuoja per jonitinę kolonėlę, užpildytą
sefaroze.
- 5 15. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad eliuuoja per jonitinę kolonėlę, užpildytą se-
fadeksu.
- 10 16. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad po pirmosios eliuavimo stadijos analizuoja
lizocimo kiekį frakcijose, panaudojant gel-elektro-
forezę.
- 15 17. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad po antrosios eliuavimo stadijos analizuoja
lizocimo kiekį frakcijose, panaudojant gel-elektro-
forezę.
- 20 18. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad koncentruoja frakcijas, surinktas pirmojoje
eliuavimo stadijoje, praleidžiant jas per tangentinio
srauto sistemą.
- 25 19. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad koncentruoja frakcijas, surinktas antrojoje
eliuavimo stadijoje, praleidžiant jas per tangentinio
srauto sistemą.
- 30 20. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad liofilizuoja išvalytą lizocimo dimerą, surink-
tą antrojoje eliuavimo stadijoje.



Brěž. 1



Bréž. 2