



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009134850/10, 18.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.09.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.09.2009

(45) Опубликовано: 27.06.2011 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2238756, 07.05.2010. BROWNHILL T.J. ET AL. The inactivation of ribonuclease during the isolation of ribonucleic acids and ribonucleoproteins from yeast. Biochem J, 1959, v.73, n.3, p.434-438. БЕРЕЗОВСКАЯ В.А. Биохимия. Лабораторный практикум для студентов направления 552400 «Технология продуктов питания» и специальности 27100 (см. прод.)

Адрес для переписки:

109431, Москва, ул. Авиаконструктора
Миля, 14, кв.100, С.А.Парастаеву

(72) Автор(ы):

Витвицкий Виктор Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с Ограниченной
Ответственностью "РусИнкор-Мед" (RU)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЯДЕРНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ (РНП) ИЗ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

Изобретение предназначено для выделения низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов (РНП) из тканей млекопитающих с использованием нетоксичных и недорогих реагентов. Указанный результат достигается за счет того, что используется нейтральный детергент цетавлон для выделения и очищения фракции низкомолекулярных рибонуклеопротеидов от ДНК и высокомолекулярной РНК. Цетавлон образует с ДНК и РНК нерастворимые в воде соли, благодаря чему из раствора можно последовательно осадить ДНК и высокомолекулярные РНК. В результате в растворе остается фракция низкомолекулярных

рибонуклеопротеидов, которую затем осаждают с помощью цетавлона. Полученный осадок растворяют в этаноле для осаждения чистых рибонуклеопротеидов. Цетавлоновые соли нуклеиновых кислот устойчивы к действию ферментов РНКаз, благодаря чему данный способ может быть разбит на стадии с большими временными промежутками (до нескольких суток) без потери биологических свойств выделяемых рибонуклеопротеидов. Данный способ выделения позволяет получать низкомолекулярные рибонуклеопротеиды высокой чистоты (содержание РНП в полученных образцах - 90%) в препаративных количествах.

(56) (продолжение):

«Технология рыбы и рыбных продуктов», 2005, из-во КамчатГТУ, с.24-29, найдено в интернет <URL: <http://window.edu.ru/window/library?p rid=68540>>, 16.05.2010. MARNELL L.L. ET AL.: "Characterization of the phosphorylated small enzyme subunit, NS, of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase, The journal of biological chemistry, v.259, n.10, p.13518-13534.

R U 2 4 2 2 5 3 2 C 2

R U 2 4 2 2 5 3 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12P 19/30 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009134850/10, 18.09.2009**

(24) Effective date for property rights:
18.09.2009

Priority:

(22) Date of filing: **18.09.2009**

(45) Date of publication: **27.06.2011 Bull. 18**

Mail address:

**109431, Moskva, ul. Aviakonstruktora Milja, 14,
kv.100, S.A.Parastaevu**

(72) Inventor(s):

Vitvitskij Viktor Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s Ogranichennoj Otvetstvennost'ju
"RusInkor-Med" (RU)**

(54) METHOD OF RECOVERY LOW-MOLECULAR NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIDS (RNP) FROM TISSUES AND ORGANS OF MAMMALS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: neutral detergent Cevtalone is used for recovery and purification of a low-molecular ribonucleoprotein fraction from DNA and high-molecular RNA. Cevtalone forms from water-insoluble salts with DNA and RNA thereby enables consistent precipitation of DNA and high-molecular RNA from the solution. As a result, the solution contains the low-molecular ribonucleoprotein fraction which then precipitated with Cevtalone. The produced precipitate is dissolved in ethanol for pure ribonucleoprotein precipitation. Cevtalone salts of

nucleic acids are resistant to ribonuclease enzymes thereby the given method can be staged with great time intervals (up to several days) without loss of biological properties of recovered ribonucleoproteids. The given method of recovery allows to producing high-purity low-molecular ribonucleoproteids (the ribonucleoprotein contents in the prepared samples is 90 %) in preparative amounts.

EFFECT: recovery of low-molecular nuclear ribonucleoprotein from tissues of mammals with using non-toxic and low-cost reagents.

1 ex

R U 2 4 2 2 5 3 2 C 2

R U 2 4 2 2 5 3 2 C 2

Изобретение относится к области биохимии, молекулярной биологии, ветеринарии и медицины.

Предлагается новый способ выделения препаративных количеств рибонуклеопротеидов (РНП) с использованием нейтрального детергента цетавлона, ранее применяемого только для очистки аналитических количеств РНК и ДНК.

В качестве источников РНП используют ткани и органы молодых (1-2 года) животных (крупный рогатый скот), которые подвергают гомогенизации с последующим выделением ядер клеток. Затем осуществляют лизирование ядер детергентом и очистку препарата от белков, ДНК и высокомолекулярных РНК с использованием концентрированных растворов NaCl и нейтрального детергента цетавлона, образующего с ДНК и высокомолекулярными РНК нерастворимые в воде соли. Конечный продукт переосаждают этанолом, лиофилизируют и хранят в запаянных ампулах при 4°C.

Низкомолекулярные ядерные рибонуклеопротеиды (РНП) являются генетическими регуляторами, набор которых специфичен для клеток каждой ткани и для каждой стадии онтогенетического развития организма. РНП содержатся в клетках нормальных здоровых организмов, поэтому не обладают токсическим эффектом и слабо отличаются от одного вида животных к другому. В настоящее время они активно исследуются на предмет применения в качестве лекарственных средств и адаптогенов для лечения различных заболеваний человека.

Известные на сегодняшний момент способы выделения рибонуклеопротеидов (Kirkby K.S. A new method for the isolation of nucleic acids from mammalian tissues, 1956, Biochem. J., 64, 405 (1); Feramisco J.R., Helfman D.M., Smart J.E., Burrige K., Thomas G.P., 1982, Coexistence of vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle, J. Biol. Chem. (2); Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук, 1984, Методы генетической инженерии, «Мир», Москва, стр.191-192 (3)) обладают следующими недостатками:

1. Использование высокотоксичных реагентов: требуется спецоборудование и средства защиты персонала.

2. Дорогостоящие операции по утилизации фенола и хлороформа, что приводит к значительному удорожанию получаемого продукта.

3. Конечная очистка получаемых препаратов от токсических примесей значительно усложняет процедуру и увеличивает время выделения.

Целью настоящего изобретения является разработка легковоспроизводимого, нетоксичного способа выделения препаративных количеств низкомолекулярных рибонуклеопротеидов (РНП) высокой степени очистки, стабильно сохраняющих активность, пригодных для введения в организм млекопитающих.

В качестве прототипа предлагаемого способа выделения низкомолекулярных рибонуклеопротеидов можно рассматривать способы получения низкомолекулярных рибонуклеопептидов из ядер клеток тканей и органов крупного рогатого скота, описанные Витвицким В.Н. и соавторами в патенте RU 2238756, опубликованном 27.10.2004 (заявка на выдачу патента РФ №2003101855 от 24.01.2003). Для получения низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов в известном способе ткань (например, печени) крупного рогатого скота (молодых здоровых животных) отделяют от соединительнотканых оболочек, сосудов, жировых прослоек и отмывают от клеток крови в физиологическом растворе. Обработанную таким образом ткань гомогенизируют при низкой температуре в растворе, содержащем Трис-буфер, хлористый кальций, ЭДТА и Тритон X-100. Гомогенат центрифугируют,

осадок промывают в том же растворе, но без Тритона X-100, суспензируют в растворе ацетата натрия, содержащем Трис-HCl буфер (pH 5,0), ЭДТА и додецилсульфат натрия. Затем приливают смесь фенола : хлороформа (1:1) и прогревают на водяной бане. После охлаждения систему центрифугируют, отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к ней снова приливают смесь фенола : хлороформа (1:1), прогревают, охлаждают и центрифугируют. Эту процедуру повторяют несколько раз при последовательно увеличивающейся температуре прогревания. Полученные фазы центрифугатов снова депротеинизируют, удаляя большую часть белков, ДНК и высокомолекулярных РНК, которые удаляют центрифугированием из растворов после добавления к ним натрия хлорида до 1-2 М. К полученным фазам центрифугата для осаждения целевого продукта приливают охлажденный этанол, осадок отделяют, промывают этанолом. После стерилизующей фильтрации целевой продукт разливают в ампулы и лиофильно высушивают. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят в холодильнике.

Существо предложения заявителя, направленного на выделение препаративных количеств низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов с помощью доступных простых технологических приемов без использования токсичных реагентов с высокой степенью очистки, обеспечивающей возможность введения в организм человека и животных, состоит в следующем.

Для выделения низкомолекулярных фракций рибонуклеопротеидов использовали ткани органов молодых (1-2 года) животных (крупный рогатый скот). Ткань освобождали от жировой клетчатки и соединительнотканых слоев, гомогенизировали и центрифугировали для получения отдельных клеток. Клетки лизировали с помощью нейтрального детергента Тритон X-100 для выделения клеточных ядер. Полученные ядра гомогенизировали в присутствии додецилсульфата Na (SDS) и затем полученный гомогенат освобождали от белков и ДНК с помощью растворов NaCl и нейтрального детергента цетавлона. Разработанная методика может быть разбита по этапам, между которыми возможны перерывы на одни и более сутки.

Поскольку растворимость цетавлоновых солей одноститиевых и двунитиевых молекул нуклеиновых кислот в водных растворах различна и зависит от концентрации NaCl, то цетавлон ранее использовался в основном для очистки препаратов ДНК от примесей РНК и других высокомолекулярных соединений (Сулимова, 1978, Сулимова и др., 1976, 1978; Дохиим, 1977; Хвойка и др., 1978). В данном способе выделения цетавлон используется как основной компонент, позволяющий отделить низкомолекулярные рибонуклеопротеиды от примесей ДНК и высокомолекулярной РНК, ранее цетавлон не использовался для этих целей.

Подробное изложение осуществления способа

Ниже описаны условия (температурный режим, концентрация реагентов, параметры центрифугирования), оптимальные для получения максимального выхода низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов с высокой степенью очистки из ткани печени и почек.

Очищенную ткань ресуспендируют в 0,01 М Трис-буфере (pH=7,0), содержащем 0,35 М сахарозы и 0,01 М хлорида кальция. После чего добавляют Тритон X-100 до конечной концентрации 1% и гомогенизируют получившуюся смесь. Полученную суспензию центрифугируют 7 минут при 7000 об/мин, 4°C.

Супернатант отбрасывают, а полученный осадок ядер ресуспендируют в 0,1 М Трис-HCl буфере (pH=7,6), содержащем ЭДТА (0,05 М) с добавлением к нему SDS до

конечной концентрации 1% и 5 М NaCl до конечной концентрации 1 М, после чего оставляют данную смесь инкубироваться на 30 мин, 60°C.

К полученной суспензии добавляют 5 М ацетата калия до конечной концентрации 1 М, после чего смесь инкубируют на холоде в течение 1,5 часов для осаждения SDS и комплекса SDS-белок.

Получившуюся суспензию центрифугируют 25 минут при 6000 об/мин, 10°C.

К супернатанту, полученному в результате центрифугирования, добавляют равный объем 1% раствора цетавлона и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре.

Получившуюся суспензию центрифугируют 10 минут при 4000 об/мин, 15°C.

К супернатанту, полученному в результате центрифугирования, добавляют равный объем 0,5% раствора цетавлона и инкубируют в течение 2,5-3 часов при комнатной температуре.

Получившуюся суспензию центрифугируют 20 минут при 10000 об/мин, 15°C.

Осадок растворяют в 1 М NaCl, после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные ядерные РНП 2,5 объемами охлажденного этанола.

Полученный осадок растворяют в дистиллированной воде и лиофилизируют.

Лиофильно высушенный препарат представляет собой гигроскопичный белый порошок без запаха и вкуса. Сохраняет активность в течение одного года при хранении при температуре не выше 4°C, хорошо растворим в воде.

Выход препарата: из 1 г ткани получают обычно около 1,2 мг конечного препарата.

Общее время выделения занимает около 6-7 часов.

Использование электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле, спектрофотометрического анализа и специфической реакции на определение нуклеиновых кислот (по Шмидту-Таунхаузеру) показало, что характеристики препарата, получаемого по данному способу, и препарата, получаемого с помощью фенольного метода, близки и оба препарата имеют сходную чистоту и соотношение РНК/ДНК. Препарат содержит 90% низкомолекулярных рибонуклеопротеидов, а также примеси ДНК и белка.

Способ может быть разбит по этапам, между которыми возможны перерывы на 24 и более часа, что обеспечивает технологичность процесса.

Данным способом можно выделять низкомолекулярные рибонуклеопротеиды из других органов и тканей, по такому же принципу. При этом такие параметры выделения, как режимы центрифугирования, концентрации отдельных реагентов (Тритон X-100, SDS) и т.п., можно варьировать для получения максимального выхода целевого продукта из конкретного вида ткани. Основные параметры процесса, такие как последовательность стадий, используемые концентрации и соотношения цетавлона и натрия хлорида, являются общими для выделения низкомолекулярных рибонуклеопротеидов из различных тканей и органов млекопитающих.

Данный способ исключает использование токсичных реагентов для выделения высокоочищенных препаратов РНП, годных для введения в организм человека и животных, при этом позволяет за одно выделение получать препаративные количества РНП (более 100 мг).

Формула изобретения

Способ получения низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов (РНП) из тканей и органов млекопитающих, включающий выделение фракции клеточных ядер с помощью нейтрального детергента Тритона-Х100 с последующим их лизисом

посредством додецилсульфата Na (SDS), освобождение полученного гомогената ядер от белков и ДНК с выделением целевого продукта - низкомолекулярных ядерных РНП и переосаждение его этанолом, отличающийся тем, что освобождение полученного гомогената ядер от белков и ДНК осуществляют с помощью концентрированных растворов NaCl и нейтрального детергента цетавлона (цетилтриметиламмоний бромид), при этом к гомогенату клеточных ядер добавляют 5М ацетата калия до конечной концентрации 1М, инкубируют полученную смесь на холоду в течение 1,5 ч, после чего центрифугируют, к полученному супернатанту добавляют равный объем 1%-ного раствора цетавлона и инкубируют в течение 30 мин, получившуюся суспензию центрифугируют, отделяют супернатант, добавляют к нему равный объем 0,5%-ного раствора цетавлона и инкубируют в течение 2,5-3 ч, получившуюся суспензию центрифугируют, полученный осадок растворяют в 1М NaCl, после чего переосаждают целевой продукт охлажденным этанолом.

20

25

30

35

40

45

50