

РСТВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюроМЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(51) Международная классификация изобретения⁶: G01N 33/68, 33/543	A1	(11) Номер международной публикации: WO 00/04385 (43) Дата международной публикации: 27 января 2000 (27.01.00)
(21) Номер международной заявки: РСТ/RU98/00371 (22) Дата международной подачи: 12 ноября 1998 (12.11.98) (30) Данные о приоритете: 98113214 17 июля 1998 (17.07.98) RU (71)(72) Заявитель и изобретатель: МАЛЫШЕВ Игорь Юрьевич [RU/RU]; 125315 Москва, ул. Балтийская, д. 8, кв. 201 (RU) [MALYSHEV, Igor Jurievich, Moscow (RU)]. (74) Агент: ГРУНИНА Алла Ефимовна; 121165, Москва, Г-165, а/я 15 (RU) [GRUNINA, Alla Efimovna, Moscow (RU)].		(81) Указанные государства: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), патент ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), патент OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Опубликована <i>С отчётом о международном поиске.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETECTING PROTEINS (54) Название изобретения: СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ (57) Abstract The present invention pertains to the field of biology, more precisely to that of biochemistry and molecular biology, and can be used in experimental or clinical medicine. This invention can be used for simultaneously detecting a large number of different proteins (up to 1000 designations) in a single probe, or for detecting a single protein in a large number of probes. According to the method of the present invention, a nitrocellulose membrane is divided into a plurality of cells (up to 1000) having a size of between 3 and 5 mm, wherein the cells are marked according to a pair of co-ordinates. This method further involves depositing predetermined antibodies at the centre of each cell in the membrane, immobilising said antibodies and, after washing the membrane, applying on the same some proteins which have been previously labeled in a probe. The membrane is allowed to stand for 1 to 2 hours and is then washed in order to remove the excess. The protein content is determined according to a radiographic method, while the proteins are identified according to the number of the cell (to the antibody).		

биохимии и молекулярной биологии и может найти

применение в экспериментальной и клинической медицине.

Техническим результатом изобретения является обеспечение

возможности определить одновременно большое количество

разных белков (до 1000 наименований) в одной пробе или

один и тот же белок в большом количестве проб. Сущность

изобретения: нитроцеллюлозную мембрану разбивают на

ячейки (до 1000) размером 3-5 мм. Ячейки маркируют в 2-х

координатах, в середину каждой ячейки мембраны наносят

определенные антитела, иммобилизуют их, а после отмывки

мембраны наносят на нее предварительно меченые белки в

пробе. Выдерживают в течение 1-2 часов и отмывают

мембрану от излишков. Содержание белков определяется

радиографически. Идентификацию белков осуществляют по

номеру ячейки (антителу).

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AL	Албания	GE	Грузия	MR	Мавритания
AM	Армения	GH	Гана	MW	Малави
AT	Австрия	GN	Гвинея	MX	Мексика
AU	Австралия	GR	Греция	NE	Нигер
AZ	Азербайджан	HU	Венгрия	NL	Нидерланды
BA	Босния и Герцеговина	IE	Ирландия	NO	Норвегия
BB	Барбадос	IL	Израиль	NZ	Новая Зеландия
BE	Бельгия	IS	Исландия	PL	Польша
BF	Буркина-Фасо	IT	Италия	PT	Португалия
BG	Болгария	JP	Япония	RO	Румыния
BJ	Бенин	KE	Кения	RU	Российская Федерация
BR	Бразилия	KG	Киргизстан	SD	Судан
BY	Беларусь	KP	Корейская Народно-Демократическая Республика	SE	Швеция
CA	Канада	KR	Республика Корея	SG	Сингапур
CF	Центрально-Африканская Республика	KZ	Казахстан	SI	Словения
CG	Конго	LC	Сент-Люсия	SK	Словакия
CH	Швейцария	LI	Лихтенштейн	SN	Сенегал
CI	Кот-д'Ивуар	LK	Шри Ланка	SZ	Свазиленд
CM	Камерун	LR	Либерия	TD	Чад
CN	Китай	LS	Лесото	TG	Того
CU	Куба	LT	Литва	TJ	Таджикистан
CZ	Чешская Республика	LU	Люксембург	TM	Туркменистан
DE	Германия	LV	Латвия	TR	Турция
DK	Дания	MC	Монако	TT	Тринидад и Тобаго
EE	Эстония	MD	Республика Молдова	UA	Украина
ES	Испания	MG	Мадагаскар	UG	Уганда
FI	Финляндия	MK	Бывшая югославская Республика Македония	US	Соединенные Штаты Америки
FR	Франция	ML	Мали	UZ	Узбекистан
GA	Габон	MN	Монголия	VN	Вьетнам
GB	Великобритания			YU	Югославия
				ZW	Зимбабве

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

ОПИСАНИЕ

Область техники

- 5 Изобретение относится к биологии, в частности, к биохимии и молекулярной биологии и может найти применение в различных отраслях промышленности и науки.

Предшествующий уровень техники

- Широко известны различные методы разделения
10 белков, основанные на различии молекул по размеру: это диализ, ультрафильтрация, центрифугирование и гель-хроматография, электрофорез и ионообменная хроматография.

- На биоселективном взаимодействии с лигандами,
15 фиксированными на носителе, основано разделение белков с помощью афинной хроматографии. Взаимодействие белка с лигандом облегчается встраиванием между лигандом и матрицей гибкой “ножки”. В качестве матрицы применяются агароза, пористое стекло, целлюлоза, сшитые декстрины и
20 др. Афинная хроматография нашла широкое применение при

разделении белков (Х.-Д.Якубке, Х.Ешкайт "Аминокислоты. Пептиды. Белки.", М., Мир, 1985, с. 345-356).

Наиболее близким способом определения белков является метод Вестерн-блот анализа с использованием
5 антител против данного белка. Указанный метод включает 9 основных стадий: заливка гелей, электрофорез, перенос белков из геля на мембрану, забивку мест неспецифического связывания на мембране, инкубацию с первыми антителами, отмывку, инкубацию со вторыми антителами, вторую отмывку
10 и проявление вторых антител.

(Harlow E., Jane D. Antibodies, a laboratory manual. 1988, р.1-3, Cold Spring, Harbor Laboratory.)

Недостатками указанных способов является сложность осуществления, использование дорогостоящего
15 стационарного оборудования и, соответственно, невозможность проведения исследований в полевых условиях, в условиях космического полета и малых клиниках, использование большого количества разных реактивов, включая вредные и канцерогенные, ограниченная
20 возможность одновременного определения содержания

разных белков или одного и того же белка в разных пробах (не более чем 20-25 белков или образцов).

Раскрытие технической сущности

Техническим результатом заявленного способа является

- 5 устранение вышеуказанных недостатков и возможность определять одновременно большое количество разных белков (до 1000 видов) в одной пробе или один и тот же белок в большом количестве проб.

Для достижения указанного технического результата в

- 10 способе определения белков, включающем нанесение пробы на мембрану с антителами, забивку мест неспецифического связывания на мембране и отмывку мембраны, согласно изобретению, мембрану разбивают на ячейки, ячейки маркируют в 2-х координатах, в середину каждой ячейки
- 15 мембраны наносят определенные антитела, иммобилизуют их, забивают места неспецифического связывания, а после отмывки мембраны наносят на нее предварительно меченые белки в пробе с последующей выдержкой в течение 1-2 часов и отмывкой мембраны от несвязавшихся белков.
- 20 Идентификацию связавшихся с антителами белков

осуществляют по номеру ячейки (по антителу), а содержание
- методами радиографии.

Согласно изобретению, используют, например,
нитроцеллюлозную мембрану, а в качестве жидкости для
5 забивки мест неспецифического связывания используют
молоко порошкообразное 5%-ной концентрации или TWIN-20.

Предпочтительный вариант реализации способа

Способ осуществляется следующим образом. Вся
площадь нитроцеллюлозной мембраны разбивается на
10 ячейки, например, размером 3-5 мм. Количество ячеек на
одной мембране может достигать 1000 и выше. Каждая
ячейка маркируется с помощью цифровых и буквенных
координат. В середину каждой ячейки наносятся и
иммобилизуются антитела к разным белкам по одному виду
15 антител в одну ячейку или, в зависимости от задачи, во все
ячейки один и тот же вид антител. Диаметр пятна нанесенных
антител составляет ≈ 3 мм. После этого осуществляют
забивку мест неспецифического связывания на мембране
порошкообразным молоком 5%-ной концентрации или TWIN-
20 20. На следующем этапе на иммобилизованные антитела
наносят пробы, содержащие меченые радиоактивные

ой меткой белки. Далее, например, через 1-2 часа, в течение которых происходит взаимодействие белков со специфическими антителами, производят отмывку мембраны от несвязавшихся белков пробы. На мембране в конкретной

5 ячейке остаются только белки, связавшиеся со своими антителами. Дальше определяют количество белка, связавшегося с каждым типом антител, с помощью стандартных методов подсчета радиоактивности счетчиком или радиографии на пленке с последующим

10 денситометрированием.

Для подтверждения принципиальной возможности использования нового метода были иммобилизованы антитела к стресс-белкам из семейства HSP70 (1:1000). В качестве пробы использовался лизат клеток печени крысы в

15 увеличивающемся разведении - 1:1, 1:2 и 1:4 для ячеек 1А, 1В и 1В соответственно. С увеличением разведения пробы и, соответственно, уменьшения количества HSP70 в пробе, снижается интенсивность окрашивания пятна.

Таким образом, заявленный способ значительно проще

20 и требует меньше времени для анализа. Кроме того, способ не требует дорогостоящего стационарного оборудования. Это

позволяет использовать новый способ в полевых и специфических (космический полет) условиях, а также в малых клиниках. Заявленный способ позволяет одновременно определять практически неограниченное количество разных белков.

Формула

1. Способ определения белков, включающий нанесение
пробы на мембрану с антителами, забивку мест
неспецифического связывания на мембране и отмывку
5 мембраны, отличающийся тем, что мембрану разбивают на
ячейки, ячейки маркируют в 2-х координатах, в середину
каждой ячейки мембраны наносят определенные антитела,
иммобилизуют их, а после отмывки мембраны наносят на нее
предварительно меченые белки в пробе с последующей
10 выдержкой в течение времени достаточного для
взаимодействия антител с белками и, отмывкой мембраны от
несвязавшихся белков и идентификацией связавшихся с
антителами белков.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что
15 идентификацию белков осуществляют по антителу в
соответствующей ячейке.
3. Способ по п.п.1 или 2, отличающийся тем, что в
ячейке определяют количество соответствующего белка.
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что количество
20 белка в ячейке определяют методом радиографии.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют нитроцеллюлозную мембрану.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве жидкости для неспецифического связывания используют
5 молоко порошкообразное 5% концентрации или TWIN-20.

7. Способ по п. 1, отличающейся тем, что мембрану разбивают на ячейки размером 3-5 мм.

8.Способ по п.1, отличающийся тем, что указанную выдержку осуществляют в течение 1-2 часов.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 98/00371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: G01N 33/68, 33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6:G01N 33/53,33/543, 33/68, C07K 16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHARD T, Radio immunologicheskie metody, under editorship, Ya. M, Varshavskogo, Moscow, iizd. « MIR », 1988, page 126.	1-2,4,6-8
Y	KRUSTALEVA N.A. , Vydelenie, ochistka, nekotorye fizikokhimicheskie svoystva leitsinaminopeptidazy mielina i diagnosticheskoe znachenie etogo fermenta pri demielinizirujuschikh zobolevanyakh, Avtoreferat dissertatsii Moscow, Universitet druzhby narodov, 1987, pages 6-7, 10-11.	1,7-8
Y	WO 95/25543 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 28 September 1995 (28.09.95), the abstract, pages 51-52 of the description.	1-2,4
Y	RU 2038600 C1(INSTITUT IMMUNOBIOTEKHNOLOGII) 27 june 1995 (27.06.95).	1-2,5
Y	RU 2095815 C1 (PADJUKOV Leonid Nikolaevich et al) 10 November 1997 (10.11.97).	1,5-6,8
Y	SU 1603301 A1 (KARAGANDINSKY GOSUDARSTVENNY MEDITSINSKY INSTITUT) 30 October 1990 (30.10.90)	1,7



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier document but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“C” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March 1999 (16.03.99)

Date of mailing of the international search report

24 March 1999 (24.03.99)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 98/00371

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/68, 33/543

Согласно международной патентной классификации (МПК-6)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-6:

G01N 33/53,33/543,33/68, C07K 16/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ЧАРД Т., Радиоиммунологические методы, под ред. Я.М. Варшавского, Москва, изд. "Мир", 1981, с.126	1-2,4,6-8
Y	ХРУСТАЛЕВА Н. А., Выделение,очистка,некоторые физико-химические свойства лейцинаминопептидазы миеллина и диагностическое значение этого фермента при демиелинизирующих заболеваниях, Автореферат диссертации, Москва, Университет дружбы народов, 1987, с.6 -7,10 -11	1,7-8
Y	WO 95/25543 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 28 September 1995 (28.09.95), реферат, с.51-52 описания	1-2,4
Y	RU 2038600 C1 (ИНСТИТУТ ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИИ) 27.06.95	1-2,5
Y	RU 2095815 C1 (ПАДЮКОВ Леонид Николаевич и др.) 10.11.97	1,5-6,8
Y	SU 1603301 A1 (КАРАГАНДИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ) 30.10.90	1,7

☐ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

"У" документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска

16 марта 1999 (16.03.99)

Дата отправки настоящего отчета о международном

поиске 24 марта 1999 (24.03.99)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

Федеральный институт промышленной собственности,
Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1

Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

Н.Литвиненко

Телефон №: (095)240-5888

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (июль 1992)