

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

18-85-129

ПРИМЕНЕНИЕ
МНОГОСТУПЕНЧАТОЙ ЛАВИННОЙ КАМЕРЫ
ДЛЯ АНАЛИЗА
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ
ПОСЛЕ ДВУМЕРНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ
МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Анализ

^{125}I -меченых белков 30S-субчастиц рибосом

Направлено в "J. of Chromatography"

1985

Г.Г.Абдурашидова¹, Д.А.Абдушукуров², М.С.Аксентьева¹,
Э.И.Будовский¹, Ю.В.Заневский, Л.Б.Каминир³, В.Д.Пешехонов,
А.А.Черный³

1. ВВЕДЕНИЕ

При анализе смеси белков с помощью электрофореза для повышения чувствительности практикуется введение радиоактивного иода. Существенно, что иодирование с помощью хлорамина^{1/1/}, хлористого иода^{2/2/} и лактопероксидазы^{3/3/} обычно не сказывается на физических и функциональных свойствах белков^{4/4/}.

При использовании промышленных препаратов ¹²⁵I с удельной активностью до 13-18 мКи/мкг с помощью радиоавтографии в полиакриламидном геле надежно обнаруживается несколько нг белка. Однако при малом количестве вещества /5x10³ расп./мин. см² геля/ необходима длительная /несколько суток/ экспозиция. Это существенно задерживает получение результатов. Кроме того, радиоавтограмма дает только качественную картину распределения радиоактивности в геле. Прямое измерение радиоактивности с помощью сцинтилляционных счетчиков в каждом участке после элюирования или разрезания геля обеспечивает возможность количественных измерений и более высокую чувствительность, но характеризуется трудоемкостью и низкой воспроизводимостью.

Оптимальным является метод, сочетающий воспроизводимость и надежность локализации радиоактивности в препарате с высокой точностью и чувствительностью измерения количества изотопа, получаемого с помощью сцинтилляционных счетчиков. Именно таким преимуществом обладает анализ распределения в геле ¹²⁵I - меченых белков с помощью многоступенчатой лавинной камеры /МСЛК/, сопряженной с электронной вычислительной машиной.

Ниже продемонстрирована возможность применения упомянутого метода для количественного анализа сложной смеси иодированных (¹²⁵I) белков. Авторы использовали набор белков /21 молекула/ 30S -субчастиц рибосомы E.coli.

2. ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА

Измерительная система состоит из МСЛК, сопряженной с мини-ЭВМ СМ-4. Система позволяет оперативно получать информацию о пространственном распределении радиоактивных зон по площади препарата и их относительной активности. Принцип работы описан в^{5-8/}. Разработанный комплекс программ позволяет производить весь процесс анализа в диалоговом режиме. В качестве внешних устройств ЭВМ используются алфавитно-цифровой дисплей, цветной телевизионный монитор, графопостроитель, алфавитно-цифровое печатающее устройство.

¹ Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
АН СССР, Москва

² Физико-технический институт им. С.У.Умарова

АН ТаджССР, Душанбе

³ Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Методика выделения 30S-субчастицы рибосом *E.coli* и получения тотального белка 30S-субчастицы описана в ^{9,10/}. Иодирование белка с помощью хлорамина Т проводилось согласно ^{1/}. Двумерный гель-электрофорез белков 30S-субчастицы в полиакриламидном геле проводили описанным в ^{11/} методом.

Одновременно можно регистрировать излучение, образующееся в результате распада радиоактивного изотопа ¹²⁵I, на образце площадью 160x160 мм².

Эффективность (ϵ) МСЛК, определяемая как $\epsilon = A(\text{срт})/A(\text{фрт}) \times 100\%$, экспериментально измерялась с помощью источника известной активности. Для ¹²⁵I эффективность составляет 3,5%.

Пространственное разрешение системы определялось при помощи тестовых образцов с искусственно сформированными радиоактивными зонами диаметром 1 мм. Расстояние между зонами было различным, их активности примерно одинаковы. Система позволяла отдельно идентифицировать зоны, расстояние между границами которых превышало 1 мм ^{6/}.

Неоднородность детектора по площади определялась сканированием чувствительной площади МСЛК источником размером 1x1 см². По результатам сканирования построена карта неоднородности чувствительности, на основании которой составлена матрица поправочных коэффициентов. Использование матрицы при обработке результатов анализа позволяет автоматически корректировать неоднородность по всей площади детектора /160x160 мм²/ и свести ее к величине, не превышающей 5%.

Чувствительность системы определяется величиной собственного фона МСЛК, который составляет 3 ÷ 5 имп./мин см². С учетом эффективности детектора это эквивалентно активности примерно 40 ÷ 60 пКи/см². Для надежной локализации радиоактивных зон в препарате необходимо 3-кратное превышение излучения метки над фоном. Система, таким образом, позволяет с высокой достоверностью обнаруживать наличие активности 120 ÷ 180 пКи/см².

Быстродействие системы, определяемое временем регистрации и обработки события, составляет 2,5 · 10⁵ событий в минуту.

Длительность накопления информации определяется активностью той зоны препарата, которая содержит наименьшее количество изотопа. Для получения результата с ошибкой $\delta = \sqrt{N}/N$ /где N - количество регистрируемых событий на зону/ не более 5%, необходимо накопить не менее 300 событий для каждой локализованной зоны. При минимальной регистрируемой активности ~150 пКи/см² для этого требуется около 25 мин.

Установка обладает хорошей воспроизводимостью результатов измерений. Расхождения в определении радиоактивности при повторных анализах одного и того же препарата не превышают 3-5%.

3. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Система позволяет, не разрушая препарата, производить точный количественный анализ распределения изотопов по зонам: полу-

чать информацию об относительной активности зон, значении и координатах максимума в зоне, координатах центра тяжести зоны. Результаты анализа представляются в виде двумерной матрицы, каждый элемент которой равен количеству событий, зарегистрированных элементом площади камеры размером 0,5x0,5 см². Размерность матрицы равна 320x320, она может быть перестроена в различных масштабах $K/K=1,2,3,\dots/$, при этом каждый ее элемент содержит информацию соответственно с участков площади МСЛК размерами $K \cdot 0,5 \times K \cdot 0,5$ мм². Матрица выводится на экран цветного телевизионного монитора в виде полутоновой карты распределения активности по площади препарата. Количество цветов - 7, количество полутонов - 12, общее число градаций карты 84.

Для улучшения визуального восприятия карты предусмотрена возможность преобразования ее цифровыми фильтрами ^{12/}, что позволяет делать карту более контрастной и избавиться от случайных шумовых импульсов.

На экран цветного телемонитора можно выводить карту не только всего препарата, но и отдельных его участков, интересующих пользователя. Имеется также возможность выводить на экран телемонитора или графопостроителя карту в объемном виде /рис.1/ и профили сечений по двум координатам. Это часто позволяет исследователю определить наличие отдельных фракций даже в том случае, когда они разделились далеко не полностью. Сечение можно производить как по одной строке /столбцу/ матрицы, так и полосой в несколько строк /столбцов/, вплоть до ширины всего препарата.

Для определения количественного распределения изотопа по зонам пользователь обводит курсором на экране телемонитора интересующие его участки /границы участков определяются визуально/, после чего ЭВМ производит статистическую обработку обведенных зон. Результат обработки оформляется в виде таблицы на АЦПУ.

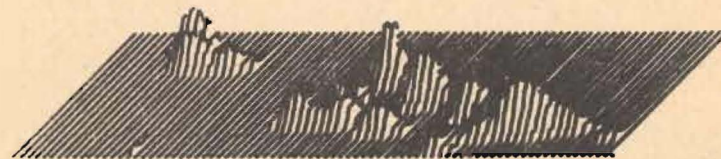


Рис.1. Объемная интерпретация карты радиоактивности, построенная с помощью графопостроителя.

ОБСУЖДЕНИЕ

30S-субчастица рибосомы *E.coli* содержит одну молекулу 16S-РНК и 21 молекулу белков с молекулярными весами от 8000 до 61000. С помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле ^{10/} можно разделить все белки 30S-субчастицы. Для надежного обнаружения белков с помощью окраски куасси необходимо 200 мкг тотального белка 30S-субчастиц. Иодирование

^{125}I белков до электрофореза и последующая радиоавтография позволяет уменьшить количество белка, необходимого для анализа. С помощью $\text{ICI}^{1/2}$ или хлорамина $\text{T}^{1/1}$ можно ввести до 10^7 Бк на 1 мкг белка при удельной радиоактивности ^{125}I 13-18 мКи/мкг. Учитывая, что степень иодирования разных белков различна, для надежного обнаружения всех белков в этом случае достаточно ~20 мкг тотального белка, т.е. ~1 мкг наименее иодированного белка в пятне диаметром 3 мм при длительности экспонирования 70 ч.

Как известно, радиоавтография дает возможность определить положение и форму пятен, а также приближенно оценить соотношение радиоактивности в пятнах. Для количественного определения радиоактивности в белках необходимо, ориентируясь по окраске или по радиоавтографу, вырезать соответствующие участки геля и просчитать их. Эта процедура весьма трудоемка и сопряжена с ошибками из-за неточного определения границ пятна, невозможности надежного учета фона и т.д. На рис.2 приведена фотография радиоавтографа, полученного с полиакриламидного геля после двумерного разделения ^{125}I -меченных белков 30S-субчастиц рибосом *E.coli*. Время экспонирования рентгеновской пленки 10 сут. За это время на пленке проявились только белки S1, S3/4, S7, S9/11, S19/20. Для локализации остальных белков необходима более длительная экспозиция рентгеновской пленки, либо увеличение количества анализируемого материала.

Рис.2. Фотография радиоавтографа с геля, содержащего двумерно разделенные с помощью электрофореза белки 30S-субчастицы рибосомы *E.coli*. Время экспонирования рентгеновской пленки 10 суток. Проявились только белки: S1, S3/4, S7, S9/11, S19/20.

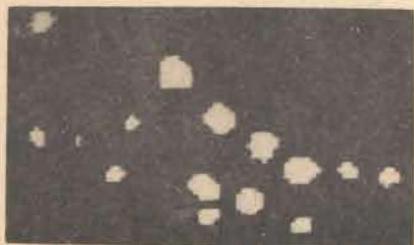


Рис.3. Карта распределения радиоактивности в этом же препарате, полученная с помощью описываемой системы. Время накопления информации 15 минут. Фотография с экрана телемонитора.

Этот же гель был подвергнут анализу с помощью описываемой системы. Карта радиоактивности, построенная в результате анализа, представлена на рис.3. Из рис.3 видно, что времени, затраченного на анализ /15 мин/, вполне достаточно для локали-

зации всех белков 30S-субчастицы рибосомы, что наглядно демонстрирует высокую чувствительность используемого метода.

С помощью описываемой системы было определено относительное распределение метки по белкам. Совпадение данных, полученных в результате анализа на описываемой системе, с данными о распределении метки в белках 30S-субчастицы рибосомы *E.coli*, меченных ^{125}I с помощью хлорамина Т, полученными при подсчете на счетчике "Intertechnic", говорит об адекватности используемого метода для решения подобных задач. Следует отметить, что в отличие от традиционных методов анализа здесь не требуется разрезания геля, благодаря чему он остается пригодным для дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описываемая автоматизированная система для экспресс-анализа тонкослойных препаратов, содержащих радиоактивную метку, может быть эффективно использована для анализа смесей белков и других соединений, меченных ^{125}I , разделенных с помощью двумерного гелевого электрофореза или двумерной хроматографии. Система позволяет более чем в 100 раз сократить время анализа по сравнению с традиционно используемой радиоавтографией и получать информацию о распределении метки по белкам, не разрушая препарата.

В настоящее время система успешно используется в работах по исследованию структуры и функционирования рибосом и может быть применена для решения аналогичных биохимических задач.

Авторы благодарят Ю.С.Анисимова, А.Б.Иванова, С.А.Мовчана, С.П.Черненко за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hunter W.M., Greenwood E.C. Nature, 1962, 194, p. 495-496.
2. Roholt O.A., Pressman D.N. Methods in Enzymology, 1972, 25, p. 439-444.
3. Luis L. Eur. J. Biochem., 1979, 96, p. 93-97.
4. Carlsen J., Christensen M., Josefsson L. Anal.Biochem., 1979, 92, 1, p. 46-54.
5. Zanevsky Yu.V. et al. Nucl.Instr. and Meth., 1978, 153, p. 445.
6. Абдушукуров Д.А. и др. ОИЯИ, 18-84-182, Дубна, 1984.
7. Заневский Ю.В. и др. ОИЯИ, 18-83-534, Дубна, 1983.
8. Abdushukurov D.A. et al. Nucl.Instr. and Meth., 1983, 217, p.101.
9. Семенов Ю.А., Махно В.И., Кириллов С.В. Мол.биол., 1976, 10, с. 754-763.
10. More G. et al. Mol.Gen.Genet., 1971, 112, p. 229-242.
11. Metz L.Y., Vogorad L. Analit. Biochem., 1974, 57, p. 200-220.
12. Прэтт У. Цифровая обработка изображений. "Мир", М., 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел
19 февраля 1985 года.

Абдурашидова Г.Г. и др.

18-85-129

Использование многоступенчатой лавинной камеры для анализа распределения радиоактивности после двумерного разделения смеси меченых соединений. Анализ ^{125}I -меченых белков 30S -субчастиц рибосом

Рассмотрена возможность применения многоступенчатой лавинной камеры, работающей на линии с ЭВМ, для анализа распределения радиоактивности после двумерного разделения смеси меченых белков. Высокая чувствительность установки позволяет надежно идентифицировать ~20 мкг тотального белка 30S -субчастицы рибосомы *E.coli* и ~1 мкг наименее иодированного белка при длительности экспонирования ~30 мин. Установка позволяет более чем в 100 раз сократить время анализа по сравнению с традиционно используемой радиографией и получать информацию о распределении метки по белкам, не разрушая препарата.

Работа выполнена в Лаборатории высоких энергий ОИЯИ и ИМБ АН СССР.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод Л.Н.Барабаш

Abdurashidova G.G. et al.

18-85-129

The Use of a Multistep Avalanche Chamber for Analyzing the Distribution of Radioactivity after Two-Dimensional Separation of a Mixture of Labelled Compounds

The possibility is considered of using a multistep avalanche chamber, operating on-line with a computer, for analysis of the radioactivity distribution after two-dimensional separation of a mixture of labelled proteins. A high sensitivity of the chamber allows one to identify reliably ~20 mcg of the total protein from *E.coli* ribosomal 30S subunits and ~1 mcg of the least iodized protein when the exposure takes ~30 min. The chamber makes it possible to decrease the analysis time by a factor of 100 as compared to conventional radioautography and to obtain information on label distribution among proteins without destroying the sample.

The investigation has been performed at the Laboratory of High Energies, JINR, IMB of the Academy of Science of USSR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985