

**СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

18-86-64

Г.Г.Абдурашидова <sup>1</sup>, Д.А.Абдушукуров <sup>3</sup>  
Э.И.Будовский <sup>1</sup>, Ю.В.Заневский, Л.Б.Каминир <sup>2</sup>  
В.Д.Пешехонов, А.А.Черный <sup>2</sup>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОСТУПЕНЧАТОЙ  
ЛАВИННОЙ КАМЕРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА  
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ  
ПОСЛЕ ДВУМЕРНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСИ  
МЕЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
Анализ <sup>32</sup>P - меченых олигонуклеотидов**

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина АН СССР, Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

<sup>3</sup> Физико-технический институт им.С.У.Умарова АН ТаджССР, Душанбе

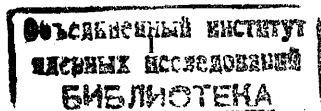
**1986**

Изучение первичной структуры и функциональной топографии нуклеиновых кислот является одной из важнейших задач молекулярной биологии.

Практически при любом методе исследования для достижения необходимой чувствительности в полинуклеотиды вводят радиоактивный фосфор ( $^{32}\text{P}$ ), по наличию которого определяют положение и количество продуктов в геле. Для определения первичной структуры стандартными методами за разумное время необходимо значительное количество  $^{32}\text{P}$  ( $10^5$ – $10^6$  счм) в исходном образце. Использование такой большой величины метки обусловлено тем, что детектирование положения радиоактивности продуктов проводят обычно с помощью радиоавтографии. Очевидно, что применение меньшего количества изотопа в образце позволило бы анализировать соответственно меньшее количество исходного соединения, уменьшить тем самым радиационную опасность работы и авторадиилиз как исходного соединения, так и конечных продуктов.

Ранее было показано, что использование многоступенчатой лавинной камеры (МСЛК) позволяет резко уменьшить количество образца и/или радиоактивности, при анализе соединения меченых  $^{125}\text{I}$ , а также сильно сократить время анализа /1/.

Использование МСЛК также позволяет уменьшить на 2–3 порядка количество исследуемого меченого  $^{32}\text{P}$  соединения и сократить время анализа более чем в 100 раз. При этом не только повышается чувствительность, но и точность анализа, и он переводится с качественного уровня на количественный. Это связано с тем, что полу-



ченная о препарате информация обрабатывается машинным способом, что исключает ошибки, связанные с разрезанием геля или сканированием радиоавтографа.

В настоящей работе продемонстрирована возможность применения МСЛК при определении первичной структуры фрагмента 16S РНК, пришивающегося к рибосомному белку S7 при УФ-облучении 30S субчастицы рибосомы *E. coli*.

#### Материалы и методы

Измерительная система состоит из МСЛК, сопряженной с мини-ЭВМ СМ-4 с помощью блоков, выполненных в стандарте КАМАК. Принцип работы системы описан в статьях [1,2,3]. Разработанный комплекс программ позволяет производить анализ препарата и обработку полученной информации в диалоговом режиме [1].

Эффективность детектора МСЛК ( $E = A(\text{срм}) / A(\text{дрм}) \cdot 100\%$ ) определяли экспериментально измерением излучения от источника известной активности. Для  $^{32}\text{P}$  эффективность, с учетом  $2\pi$ -геометрии детектора, составляет 40-45%.

Пространственное разрешение системы определялось с помощью искусственно сформированных зон  $^{32}\text{P}$  круглой формы диаметром 1 мм. При детектировании получено разрешение 2,5-3,5 мм (FWHM).

Чувствительность. Собственный фон МСЛК составляет 3-5 имп.  $\text{мин}^{-1}\text{см}^{-2}$ . С учетом эффективности детектора для  $^{32}\text{P}$  это эквивалентно 6-12 расп.  $\text{мин}^{-1}\text{см}^{-2}$ , что соответствует количеству радиоактивности 3-6 пКи.  $\text{см}^{-2}$ . Для надежной локализации зон в препарате необходимо 3-кратное превышение метки над фоном. Т.о. для  $^{32}\text{P}$  система позволяет надежно обнаруживать наличие радиоактивности в 10-20 пКи.  $\text{см}^{-2}$ . Общая активность препарата обусловлена быстродействием системы и не должна превышать 0,3 мКи [1].

В работе был использован препарат 30S субчастиц рибосом *E. coli*, любезно предоставленный В.И.Махно.

1,0.е.  $A_{260}$  30S субчастиц в буфере 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ , 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 6.8) облучали в чашках Петри при

интенсивном перемешивании (+4°C) полным светом ртутной лампы (254 нм, интенсивность падающего света 1017 кв.  $\text{см}^{-2}\text{мин}^{-1}$ ). Доза: 25-30 квантов на нуклеотид.

Облученные 30S субчастицы подвергли исчерпывающему гидролизу РНК-азой T1 (PL Biochemicals) (10 ед. акт. T1/1 о.е. 30S  $A_{260}$ ) в буфере 50 mM  $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ , 40 mM ЭДТА (pH 7.2) при +37°C.

Полученные после гидролиза фрагменты 16S РНК и фрагменты 16S РНК с пришитыми белками подвергли 5'-концевому мечению с помощью  $^{32}\text{P}$ -АТФ (Amersham, удельная активность > 3000 Ки/ммоль) и T4-полинуклеотидкиназы (НПО "Фермент", Вильнюс) по [4]. Реакцию проводили в 20 мкл 50 mM  $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$  (pH 9.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ДТТ 50 мкКи  $^{32}\text{P}$ -АТФ и 4 ед. полинуклеотидкиназы при +37°C 30 минут.

Белки, содержащие пришитые меченые олигонуклеотидные фрагменты, разделяли с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле по [5]. Идентификация белков с пришитыми  $^{32}\text{P}$ -мечеными олигопептидными фрагментами проводили сопоставлением радиоактивности с положением рибосомных белков, разделенных в этой же системе и окрашенными Кумасси.

Белок S7 с пришитым  $^{32}\text{P}$ -меченым олигонуклеотидным фрагментом был вырезан из геля и подвергался гидролизу протеиназой К (Serva) в буфере 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ , 25 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 6.8). Концентрация фермента 30 мг/мл.

После протеиназного гидролиза проводили разделение в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.  $^{32}\text{P}$ -олигонуклеотидный фрагмент, содержащий пришитый олигопептид, вырезали из геля и подвергли статистическому гидролизу в 1 M триэтилаmine при +55°C в течение 1,5 часов.

После гидролиза ТЭА упаривали на роторном испарителе досуха. Сухой остаток растворяли в 5 мкл воды. Нуклеотидные карты получали по [6].

Локализацию радиоактивного материала на всех этапах исследования производили с помощью МСЛК.

#### Обсуждение

Действие УФ-излучения на свободные 30S субчастицы рибосом *E. coli* приводит к образованию сшивок между 16S РНК и рядом белков, среди которых преобладает S7 [7]. Для выделения олигонуклеотидного фрагмента, сшитого с S7, была использована сле-

дущая процедура. После облучения, диссоциации облученной 30S субчастицы и гидролиза РНК-азой Т1 олигонуклеотидные фрагменты, ковалентно связанные с белками, подвергаются фосфорилированию с помощью  $^{32}\text{P}$ -АТР, Т4 полинуклеотидкиназы и разделяют в ПАА геле по [5].

Для надежной идентификации (с помощью радиоавтографии) пришитого белка, содержащего  $^{32}\text{P}$ -радиоактивность в 5'-конце фрагмента 16S РНК, ковалентно связанного с белком, необходимо иметь, по крайней мере, 10 о.е.  $A_{260}$  исходных 30S субчастиц, а для того, чтобы получить достаточное для анализа первичной структуры количество пришитого фрагмента, необходимо не менее 100 о.е. исходных 30S субчастиц.

В то же время использование многоступенчатой лавинной камеры для анализа распределения  $^{32}\text{P}$ -радиоактивности после двумерного разделения смеси позволяет уменьшить количество исходного вещества на 2-3 порядка и сократить время экспонирования гелей при анализе препарата с нескольких суток до нескольких минут.

На рис. 1 представлены результаты локализации с помощью МСЛК  $^{32}\text{P}$ -радиоактивности, содержащейся в пришитых белках,



Рис. 1. Распределение  $^{32}\text{P}$ -радиоактивности в полиакриламидном геле после двумерного разделения рибосомных белков, пришитых к 16S РНК. Фотография с экрана телемонитора.

после двумерного деления электрофорезом в ПАА геле. Для идентификации белков было взято 0,1 о.е. 30S субчастиц. Время, необходимое для локализации пришитых белков в геле, не превышает 3-5 минут.

С помощью описываемой системы была определена первичная структура фрагмента 16S РНК, пришитого к белку S7. На рис. 2 представлено распределение  $^{32}\text{P}$  на ПЗИ-целлюлозе, после двумерного разделения олигонуклеотидов (см. Материалы и методы). Исходное количество 30S субчастиц - 0,01 о.е.  $A_{260}$ . Длительность определения распределения радиоактивности в геле 3-4 мин.

Рис. 2. Нуклеотидная карта олигонуклеотидного фрагмента 16S РНК, пришитого к белку S7. Фотография с экрана телемонитора.



### Заключение

Описанная автоматизированная система для экспресс-анализа тонкослойных препаратов, содержащих радиоактивную метку, может быть эффективно использована для анализа смесей олигонуклеотидов, меченых  $^{32}\text{P}$ , разделенных с помощью двумерного геля-электрофореза или двумерной хроматографии. Система позволяет более чем в 100 раз сократить время анализа и на 2-3 порядка уменьшить количество исследуемого вещества, в том числе и радиоактивного, по сравнению с традиционно используемой радиоавтографией, и точно определить количественное распределение радиоактивности по белкам и олигонуклеотидам, не разрушая препарата.

В настоящее время система успешно используется в работах по исследованию структуры и функционирования рибосом, определения первичной структуры олигонуклеотидов, и может быть использована для решения аналогичных биохимических задач.

### Л и т е р а т у р а

1. Абдушукуров Д.А., Абдурашидова Г.Г., Аксентьева М.С., Будовский Э.И., Заневский Ю.В., Каминир Л.Б., Пешехонов В.Д., Черный А.А. ОИЯИ, Р18-85-129, Дубна, 1985.
2. Заневский Ю.В., Иванов А.Б., Каминир Л.Б., Крейнцлин Э.Я., Мовчан С.А., Пешехонов В.Д., Чан Дык Тхань, Черненко С.П., Черный А.А. Биорганическая химия, 1984, т.10, № 6, стр. 776.

3. Абдушукуров Д.А., Абдурашидова Г.Г., Заневский Ю.В., Иванов А.Б., Каминир Л.Б., Крейнцлин Э.Я., Мовчан С.А., Пешехонов В.Д., Чан Дык Тхань, Черненко С.П., Черный А.А. ОИЯИ, P18-84-182, Дубна, 1984.
4. Donic Keller H., Maxam M., and Gilbert W. (1977), *Nucleic Acids Res.* 4, 2527.
5. Metz L.K., Bogorad L. (1984) *Analyt.Biochem.* 57, 200.
6. Silberkland M., Prochianta A., Heenni A.Z., Rajbhandary U.Z. (1977) *Eur.J.Biochem.* 72, 3, 465.
7. Zweib C., Brimacombe R. (1978) *Nucleic Acids Res.* 4, 1189.

## НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
P18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
D2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
D11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
D7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
D2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.
D13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
D2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
D1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
D17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р. 75 к.
D10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983	3 р. 50 к.
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984 /2 тома/	13 р. 50 к.
D4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра, Алушта, 1985.	3 р. 75 к.

Рукопись поступила в издательский отдел  
6 февраля 1986 года

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:  
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79  
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ  
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

Абдурашидова Г.Г. и др.

18-86-64

Использование многоступенчатой лавинной камеры для анализа распределения радиоактивности после двумерного разделения смеси меченых соединений.

Анализ <sup>32</sup>P-меченых олигонуклеотидов

Определены возможности использования многоступенчатой лавинной камеры для анализа распределения радиоактивности /<sup>32</sup>P/ - меченых олигонуклеотидов после двумерного разделения смеси соединений. Показано, что система на основе МСЛК позволяет более чем в 100 раз сократить время анализа и на 2-3 порядка уменьшить количество исследуемого вещества по сравнению с традиционно используемой радиоавтографией.

Работа выполнена в Лаборатории высоких энергий ОИЯИ, Институте биорганической химии АН СССР и Институте молекулярной биологии АН СССР.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод Л.Н.Барабан

Abdurashidova G.G. et al.

18-86-64

The Use of a Multistep Avalanche Chamber for Radioactivity Analysis After Two-Dimensional Separation of Labelled Compound Mixture.

<sup>32</sup>P-Analysis

The possibility is shown of using a multistep avalanche chamber for an analysis of the radioactivity distribution of oligonucleins labelled with a <sup>32</sup>P isotope after a two-dimensional separation of the compound mixture. This system based on the multistep avalanche chamber allows us to reduce the time of the analysis by a factor of 100 and to decrease the amount of analyzed compound by 2-3 orders of magnitude in comparison with autoradiography conventionally used.

This work has been performed at the Laboratory of High Energies, JINR, at the Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Science and at the Institute of Molecular Biology, USSR Academy of Science.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986