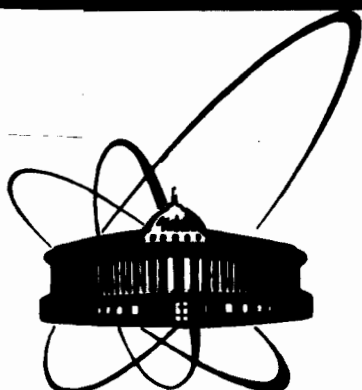


87-289



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

18-87-289

**Ю.С.Анисимов, Д.А.Абдушукуров*,
Ю.В.Заневский, А.Б.Иванов, С.А.Мовчан,
В.Д.Пешехонов, Г.А.Черемухина, С.П.Черненко**

**АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ РАДИОХРОМАТОГРАФЫ
ДЛЯ АНАЛИЗА МЕЧЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ
СОЕДИНЕНИЙ НА ПЛОСКИХ НОСИТЕЛЯХ**

* Физико-технический институт им. С.У.Умарова
АН ТаджССР, Душанбе

1987

1. ВВЕДЕНИЕ

Многие современные методы исследования биохимических веществ базируются на использовании радиоактивных изотопов. Введение радиоактивных изотопов в молекулы биополимеров в подавляющем большинстве случаев не изменяет физико-химических характеристик и физиологической активности этих молекул. Высокая чувствительность методов обнаружения радиоактивности позволяет уменьшить количество используемых в экспериментах препаратов до тысячных долей микрограмма.

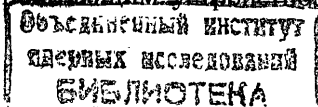
К биохимическим исследованиям, проводимым на плоских носителях, можно отнести следующие: механическое задержание или молекулярную сорбцию на фильтрах, хроматографию и электрофорез на тонкослойных подложках и в гелях. Традиционно используемые методы обработки, такие, как автордиография на рентгеновских пленках и просчет радиоактивности в сцинтилляционных счетчиках, характеризуются большой трудоемкостью и невозможностью одновременного получения информации как о пространственном распределении активности, так и о количественном содержании.

Перспективным является двумерный анализ плоских слоев с помощью многопроволочных позиционно-чувствительных детекторов — пропорциональных камер (МПК) и многоступенчатых лавинных камер (МСЛК). Возможность применения МПК для анализа плоских слоев была впервые показана в работе ^{1/} и реализована затем путем создания ряда установок ^{2-5/}. Эти установки позволяют локализовать и измерять активность в образцах, обеспечивая пространственное разрешение порядка 1 мм для изотопа ³H, 6 мм для ¹⁴C и 12 мм для ³²P ^{6/}. Многоступенчатые лавинные камеры, обладающие "фокусирующим" эффектом ^{7/}, позволяют улучшить пространственное разрешение до 1 мм для ¹⁴C и до 2 мм для ³²P ^{8,9/}.

В ЛВЭ ОИЯИ разработаны и внедрены три радиохроматографа типа РД-01 на основе газовых двумерных позиционно-чувствительных детекторов, работающих на линии с микроЭВМ. Характеристики этих приборов рассмотрены ниже.

2. АППАРАТУРА И ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ РАДИОХРОМАТОГРАФОВ

Радиохроматографы работают на линии с микроЭВМ ДВК-1 и укомплектованы накопителем на гибких магнитных дисках (НМГД) и алфавитно-цифровым ~~печатным устройством~~ (АЦПУ). Блок-схема



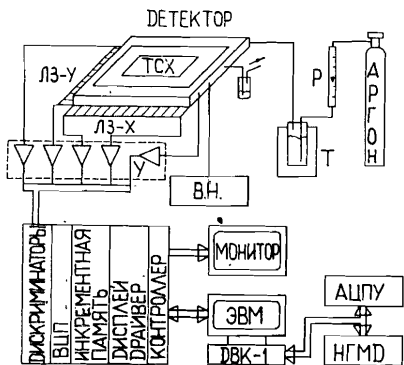


Рис. 1. Блок-схема радиохроматографа. У – усилители, Р – ротаметр, Т – термостат, ВН – высоковольтные источники напряжения.

установок представлена на рис. 1. Координатная информация считывается с двух концов X и Y линий задержек детектора. Сигналы, усиленные маломощными усилителями, подаются на дискриминаторы со следящим порогом, далее производится отбор и кодирование информации. Временицифровыми преобразователями. События запоминаются в памяти с инкрементным каналом, имеющей размерность 256x x256x16 бит. Считывание информации в ЭВМ осуществляется по каналу прямого доступа. Визуализация информации осуществляется цветным ТВ-монитором.

Программное обеспечение радиохроматографов представляет собой оригинальный проблемно-ориентированный комплекс программ, позволяющий проводить качественный и количественный анализ одно- и двумерных образцов. Комплекс работает в диалоговом режиме с использованием тактики "меню, подсказки и умолчания" и выполняет следующие функции: сбор физической информации; статистическую обработку данных, полученных в результате эксперимента; графическое отображение информации в виде одно- и двумерных гистограмм; обмен данными с гибким диском; вывод одно- и двумерных гистограмм на печать в графическом виде; диагностику. Кроме того, комплекс позволяет проводить работу с корректирующими матрицами, что уменьшает разброс эффективности детекторов по площади до 5%.

Физические данные, накопленные во внешнем буфере емкостью 64 К 16-разрядных слов, графически отображаются в виде гистограммы, в которой цветом кодируется уровень интенсивности зарегистрированных в каждом канале событий (8 цветовых градаций).

Далее пользователю предоставляется возможность провести анализ информации с исследуемого образца, получая различные сечения вдоль X- и Y-осей координат, и выявлять зоны, интересные для статистической обработки событий. Зоны выделяются программными марками, управляемыми вводом знака с клавиатуры. При этом вся графическая, статистическая и служебная информация отображается на экране цветного монитора. Для получения так называемых твердых копий изображения используются особенности печатающего устройства D-100 (ПНР), способного работать в режиме 7-иглоочной графики.

3. ДЕТЕКТОР РАДИОХРОМАТОГРАФА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ ТРИТИЯ

Наиболее сложной задачей при регистрации радиоактивности с тонких слоев является регистрация излучения трития. Низкая энергия β -излучения трития ($E_{\text{макс}} = 18 \text{ кэВ}$) диктует необходимость или существенного уменьшения толщины входного окна детектора, или ввода образцов непосредственно в газовый объем. Детектор разработан на базе МПК с дрейфовым промежутком и с выдвигающимся поддоном для размещения образцов 10 . Выдвигающийся поддон в совокупности со шлюзом, герметизирующим камеру, позволяет вводить плоские исследуемые объекты размером до 200 x 200 мм в газовый объем детектора. Схематическое изображение детектора показано на рис. 2. На выдвигающемся поддоне расположена прижимная рамка с проволочным электродом, осуществляющая фиксацию образцов при вводе их в газовый объем детектора. Распределение потенциалов на электродах камеры позволяет осуществлять полный сбор электронов, выходящих из образца за пределы проволочного электрода.

Детектор работает на газовой смеси $\text{Ag} + 20\% \text{ метана} + 3\% \text{ спирта}$. На рис. 3 показано плато счетной характеристики детектора, измеренное при помощи коллимированного источника ^{55}Fe . Протяженность плато составляет величину 350 В. Там же показана зависимость величины собственных шумов детектора от напряжения, в конце плато величина их $\sim 12 \text{ отсчет/мин} \cdot \text{см}^2$. Кривая 2 показывает эффективность регистрации излучения трития ($\epsilon = \text{отсчет/распад}$) из бесконечно тонкого слоя в зависимости от анодного напряжения, которое составляет 13,5 и 21% соответственно для начала и конца плато счетной характеристики. Однородность счета детектора по площади была проверена

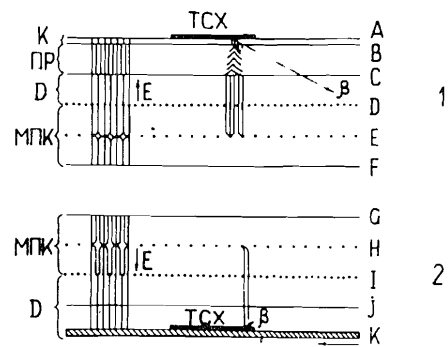


Рис. 2. Схематическое изображение МСЛК (1) и МПК (2). К – конверсионный, ПР – предварительного усиления и Д – дрейфовые промежутки, К – выдвигающийся поддон.

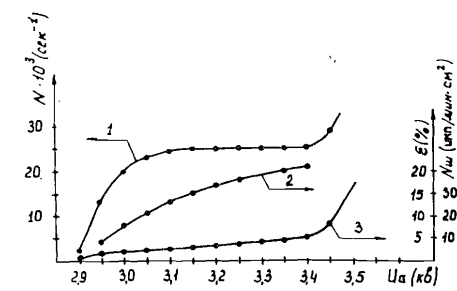


Рис. 3. Плато счетной характеристики (1), эффективность регистрации (2) и собственные шумы МПК.

путем сканирования источником ^{3}H известной активности. Максимальный разброс эффективности по всей площади не превышает 25%. Ввод образцов предполагает временную разгерметизацию камеры, восстановление параметров детектора осуществляется через 15 мин при скорости продува $300 \text{ см}^3/\text{мин}$. Расход газа при однократном измерении $6 \div 10 \text{ л}$. Основные параметры детектора приведены в табл. 1.

Таблица 1

Детектор	МПК
Чувствительная площадь	200 x 200 мм
Газовая смесь	Ar + 20% метан + 3% спирт
Расход газа	$300 \text{ см}^3/\text{мин}$
Время ввода детекторов в режим	15 мин
Пространственное разрешение	0,7 мм
Эффективность регистрации ^3H с бесконечно тонкого слоя	20%
Шумы детектора	12 имп/мин · см ²
Минимальная чувствительность ^3H с подложек фирмы "Merck"	270 пКи/см ²

4. ДЕТЕКТОР РАДИОХРОМАТОГРАФОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ ^{14}C , ^{32}P , ^{125}I

Специфика проводимых экспериментов с использованием изотопов ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S и ^{125}I диктовала необходимость применения многоступенчатых лавинных камер, которыми были укомплектованы эти установки.

Разработанные МСЛК имеют входное окно площадью $180 \times 180 \text{ мм}$, выполненное из Al — майлара толщиной 20 мкм, которое прозрачно для электронов с энергией $\geq 40 \text{ кэВ}$. Конструктивно МСЛК состоит из конверсионного промежутка 0,5 мм, предусилительного промежутка 7 мм. Зазор дрейфового промежутка и межэлектродные расстояния МПК составляют 5 мм (рис. 3). Детектор работает на газовой смеси Ar + 1,5% n-гептана. Для стабилизации режимов работы весь аргон продувается через n-гептан, термостатированный при температуре таящего льда. Коэффициент предварительного усиления выбран $(2 \div 4) \cdot 10^3$, полный коэффициент газового усиления (КГУ) МСЛК $10^6 \div 10^7$. Детекторы обладают хорошей однородностью КГУ по площади и лишь по краям камеры (в пределах 1 см от края) КГУ меньше на 10%. Чувствительная площадь детекторов сканировалась эталонными источниками ^{14}C и ^{125}I . Разброс эффективности регистрации ^{14}C (ШПВ) равен $\pm 5\%$, а

по основанию не превышает $\pm 10\%$. При регистрации излучения ^{125}I с вероятностью 85% регистрируется L_x -излучение с энергией 4 кэВ ^{14}C . Небольшое избыточное давление внутри камеры вследствие прогиба входного окна приводит к увеличению толщины конверсионного слоя в центре детектора, что, в свою очередь, обуславливает разброс по эффективности для ^{125}I $\pm 10\%$ (ШПВ), а по основанию $+20 -15\%$. Следует иметь в виду, что введение корректирующих матриц позволяет уменьшить разброс эффективности до 5%.

Пространственное разрешение детекторов исследовалось при помощи коллимированного источника ^{55}Fe и равно 300 мкм (ШПВ). Для источников ^{14}C , ^{32}P и ^{125}I пространственное разрешение измерялось при помощи фантомов, представляющих собой ряд лунок $\phi 1 \text{ мм}$ в алюминиевой подложке, расположенных с различным шагом. На рис. 4 показаны результаты измерений. По оси ординат указано контрастное отношение $(A1-A2)/A1$, где A1 — высота пика, A2 — высота ложбины между пиками, а по оси абсцисс задано расстояние между границами двух лунок.

Эффективность регистрации ^{32}P и ^{14}C в зависимости от анодного напряжения показана на рис. 5 и определялась как отношение отсчет · мин⁻¹/распад · мин⁻¹. При этом эффективность регистрации ^{14}C измерялась с бесконечно тонкого слоя. Стрелками указан диапазон рабочих напряжений на аноде МПК. Шумы детекторов со всей площади не превышают 10 Гц или 2 имп./мин · см². Основные параметры детекторов приведены в табл. 2.

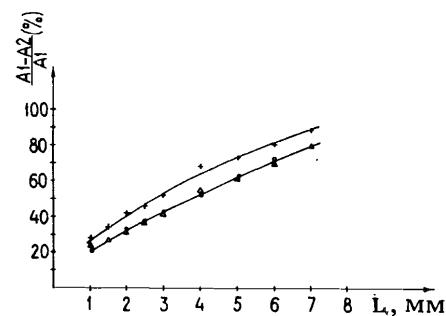


Рис. 4. Контрастное отношение $(A1-A2)/A1$ для МСЛК. Результаты измерения ^{14}C (+), ^{32}P (o), и ^{125}I (Δ).

Рис. 5. Эффективность регистрации ^{32}P и ^{14}C при двух фиксированных напряжениях на промежутке предварительного усиления 8,1 кВ (1) и 8,2 кВ (2).

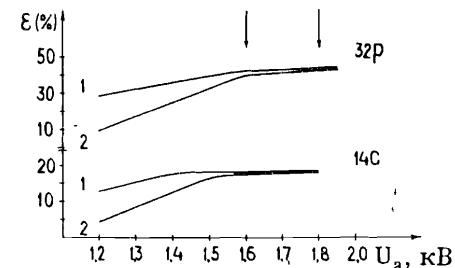


Таблица 2

Детектор	МСЛК
Чувствительная площадь	180 x 180 мм
Входное окно	20 мкм А1 — майлар
Газовая смесь	Ar + 1,5%п — гептан
Расход газа	150 см ³ /мин
Время ввода детектора в режим	30 мин
Пространственное разрешение при контрастном отношении 30%	
¹⁴ C	1 мм
³² P и ¹²⁵ I	2 мм
Эффективность регистрации (Минимальная чувствительность)	
¹⁴ C	18% (16 пКи/см ²)
³² P	44% (7 пКи/см ²)
¹²⁵ I	3,5% (90 пКи/см ²)
Шумы детекторов	2 имп./мин · см ²

5. ПРИМЕНЕНИЕ УСТАНОВОК

Радиохроматографы используются для определения молярной радиоактивности и радиохимической чистоты (РХЧ) меченных тритием соединений, таких, как компоненты нуклеиновых кислот, аминокислот, пептидов, белков, стероидов, углеводов, липидов и др.^{10/}. Практически все органические соединения содержат водород, и замена водорода тритием дает возможность изучать биосинтез, метаболизм и локализацию в живых организмах самых разнообразных классов биологически активных соединений. РХЧ меченных тритием соединений определяется с помощью измерения радиоактивности бумажных и тонкослойных хроматограмм (ТСХ), путем измерения отношения количества радиоактивности в основном веществе и в примесях.

Выход радиоактивности ³H из тонкослойных подложек зависит от их типа и качества исполнения и для пластин с полиэтиленцеллюлозой фирмы "Merck" составляет 10%. Так, "эффективность" регистрации ³H с подложек фирмы "Merck" составляет ~2%. Шумы детектора, усредненные по всей площади, составляют 12 имп./мин · см², что с учетом эффективности детектора определяет чувствительность, соответствующую активности 600 расп./мин · см². Для надежной локализации радиоактивности в препарате необходимо 3-кратное превышение излучения метки над фоном. Таким образом, детектор позволяет надежно идентифицировать радиоактивные зоны с активностью 1800 отс./мин · см² или 270 пКи/см². На рис. 6 представлены результаты обработки препаратов УТФ и сечение одного препарата с РХЧ 52,1%.

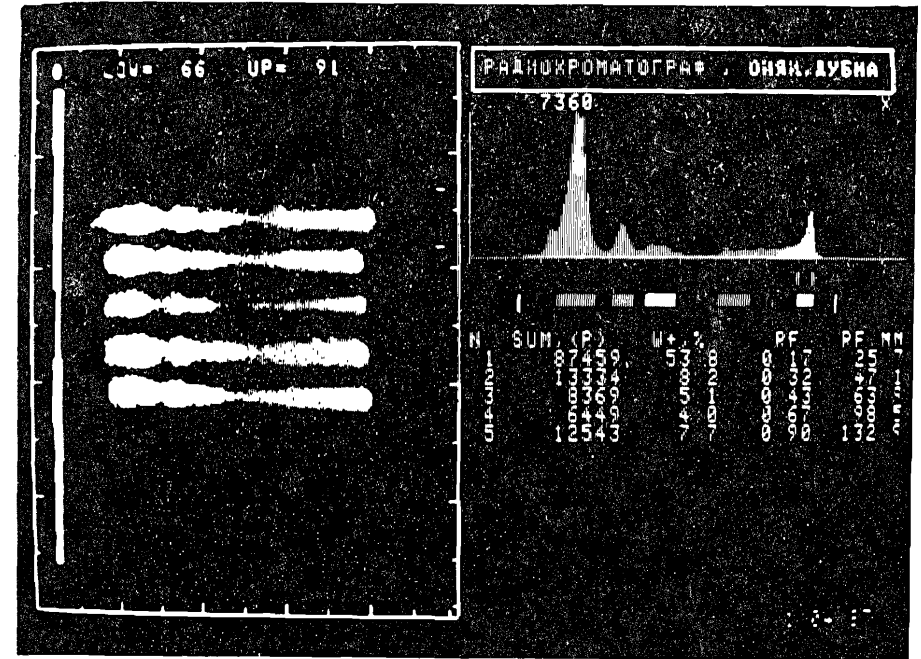


Рис. 6. Результат обработки препаратов УТФ. Снимок с экрана ТВ-монитора.

Радиохроматографы применяются также для анализа длины полипептидов, синтезированных рибосомой *in vitro*, определения гомогенности РНК, меченных ³²P, и для изучения первичной структуры и функциональной топографии нуклеиновых кислот, а также могут быть использованы для твердофазного радиоиммунологического анализа на стандартных 96- и 60-луночных планшетах^{11/}.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и создана малая серия двумерных автоматизированных радиохроматографов для анализа меченных радионуклидами соединений на плоских носителях, работающих на линии с микроЭВМ ДВК-1. Радиохроматограф, предназначенный для работы с образцами, меченными тритием, позволяет регистрировать активности ≥ 270 пКи/см² при пространственном разрешении 0,7 мм. Радиохроматографы на основе многоступенчатых лавинных камер предназначены для работы с изотопами ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S и ¹²⁵I. Они позволят надежно локализовать активные зоны, удаленные друг от друга на расстояние ≥ 1 мм, при использовании ¹⁴C, ³³P, ³⁵S, и 2 мм — для ³²P и ¹²⁵I. Минимальная чувствительность составляет 16, 7 и 90 пКи/см² для изотопов ¹⁴C, ³²P и ¹²⁵I соответственно.

Радиохромографы используются для определения молярной активности и радиохимической чистоты препаратов, а также для анализа и идентификации различных биополимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zanevsky Yu.V. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.*, 1978, 153, p.445.
2. Anisimov Yu.S. et al. - *J. of Chromatogr.*, 1979, 178, p.117.
3. Anisimov Yu.S. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.*, 1980, 176, p.67.
4. Bellazini R. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.* 1981, 190, p.627.
5. Bellazini R. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.*, 1983, 217, p.95.
6. Abdushukurov D.A. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.*, 1983, 217, p.101.
7. Charpak G. and Sanli F. - *Phys. Lett.*, 1978, 78B, No.4, p.523.
8. Абдушукуров Д.А. и др. ОИЯИ, 13-82-216, Дубна, 1982.
9. Abdushukurov D.A. et al. - *Nucl. Instr. and Meth.*, 1985, A238, p.119.
10. Абдушукуров Д.А. и др. ОИЯИ, 18-85-391, Дубна, 1985.
11. Абдушукуров Д.А. и др. ОИЯИ, 18-84-758, Дубна, 1984.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 апреля 1987 года.

Анисимов Ю.С. и др.

18-87-289

Автоматизированные радиохромографы для анализа меченных радионуклидами соединений на плоских носителях

Разработана и создана малая серия двумерных радиохромографов типа РД-01 для анализа меченных радионуклидами соединений на плоских носителях, работающих на линии с микро-ЭВМ ДВК-1. Радиохромограф, предназначенный для регистрации излучения трития, обладает минимальной чувствительностью 270 пКи/см² при пространственном разрешении 0,7 мм. Радиохромографы на основе многоступенчатых лавинных камер предназначены для работы с изотопами ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S и ¹²⁵I. Пространственное разрешение радиохромографов 1÷2 мм при минимальной чувствительности 16, 7 и 90 пКи/см² соответственно для изотопов ¹⁴C, ³²P и ¹²⁵I. Радиохромографы внедрены в ведущие биологические институты АН СССР.

Работа выполнена в Лаборатории высоких энергий ОИЯИ.
Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод О.С.Виноградовой

Anisimov Yu.S. et al.

18-87-289

Automatic Radiochromatographs for the Analysis of Labelled Compounds of Flat Samples

A small series of two-dimensional radiochromatographs of the RD-01 type has been developed and constructed. The radiochromatographs are used for the analysis of compounds labelled by radionuclides on flat samples operating on-line with a DVK-1 microcomputer. A radiochromatograph intended to detect the tritium radiation has a minimum sensitivity of 270 pCi/cm² at a spatial resolution of 0.7 mm. The radiochromatographs based on multistep avalanche chambers are used to operate with ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S and ¹²⁵I isotopes. The spatial resolution of the radiochromatographs is 1-2 mm at a minimum sensitivity of 16.7 and 90 pCi/cm² for ¹⁴C, ³²P and ¹²⁵I, respectively. The radiochromatographs are introduced to all key biological institutes of the USSR Academy of Science.

The investigation has been performed at the Laboratory of High Energies, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987