



УДК 577.112:543.52

**ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ С ВЫСОКИМ  
ПРОСТРАНСТВЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ИОДИРОВАННОЙ  
СМЕСИ БЕЛКОВ НА ПЛОСКИХ НОСИТЕЛЯХ**

*Заневский Ю. В., Иванов А. Б., Мовчан С. А.,  
Пешехонов В. Д., Чан Дык Тхань, Черненко С. П.,  
Калишир Л. В.,\* Крейндли Э. Я.,\* Черный А. А.\**

*Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна;  
\* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Показана возможность проведения экспресс-анализа иодированной  $^{125}\text{I}$  смеси белков на плоских носителях с помощью установки типа «Уран», разработанной на основе многопроволочной пропорциональной камеры. Чувствительность метода выше 200 имп/мин на  $1\text{ см}^2$ , а пространственное разрешение  $\sim 1\text{ мм}$ . Время проведения экспресс-анализа не превышает десятков минут.

В последние годы при анализе смесей белков с помощью электрофореза для повышения чувствительности широко практикуется введение радиоактивного иода. Иодирование белков с помощью хлорамина [1], хлористого иода [2] и лактопероксидазы [3] обычно не сказывается на их физических и функциональных свойствах [4].

При использовании промышленных препаратов  $^{125}\text{I}$  с удельной радиоактивностью до  $1,3\text{--}1,8\text{ Ки/мкмоль}$  в полиакриламидном геле надежно обнаруживается с помощью радиоавтографии несколько нанोगرامмов белка. Однако при малом количестве вещества (менее  $5 \cdot 10^3$  расп./мин на  $1\text{ см}^2$

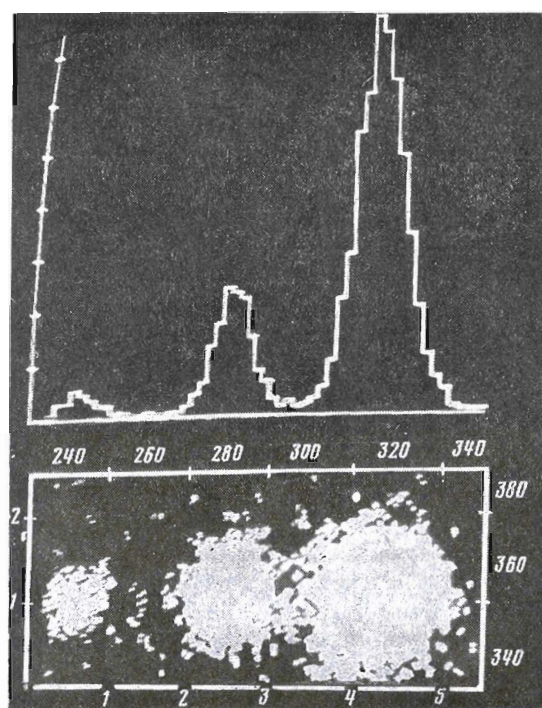


Рис. 1. Фотография с экрана телевизионного монитора, иллюстрирующая чувствительность метода

геля) необходима длительная (несколько суток) экспозиция, что существенно задерживает получение результатов. Кроме того, радиоавтография дает только качественную картину распределения радиоактивности в геле. Прямое измерение радиоактивности в каждом участке после элюирования или разрезания геля обеспечивает возможность количественных измерений и более высокую чувствительность, но характеризуется значительной трудоемкостью и низкой воспроизводимостью.

Необходим метод, сочетающий воспроизводимость и надежность локализации радиоавтографии с высокой чувствительностью и точностью, свойственной способу определения вещества, содержащего радиоактивную метку, с помощью сцинтилляционных счетчиков. Таким методом является определение распределения в геле белков, меченных  $^{125}\text{I}$ , с помощью установки типа «Уран», сопряженной с электронной вычислительной машиной.

Возможность использования многопроволочной пропорциональной камеры для анализа радиохроматограмм и электрофореграмм, показанная впервые в работе [5], была в дальнейшем реализована путем создания ряда установок «Уран» [6–8]. Эти приборы, предназначенные для экспресс-анализа препаратов, меченных  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , позволяют определять локализацию радиоактивных зон и измерять их активность. Для проведения измерений исследуемые препараты вводят в газовый объем детектора.

Рассмотрим возможность анализа образцов, меченных радиоактивным иодом.

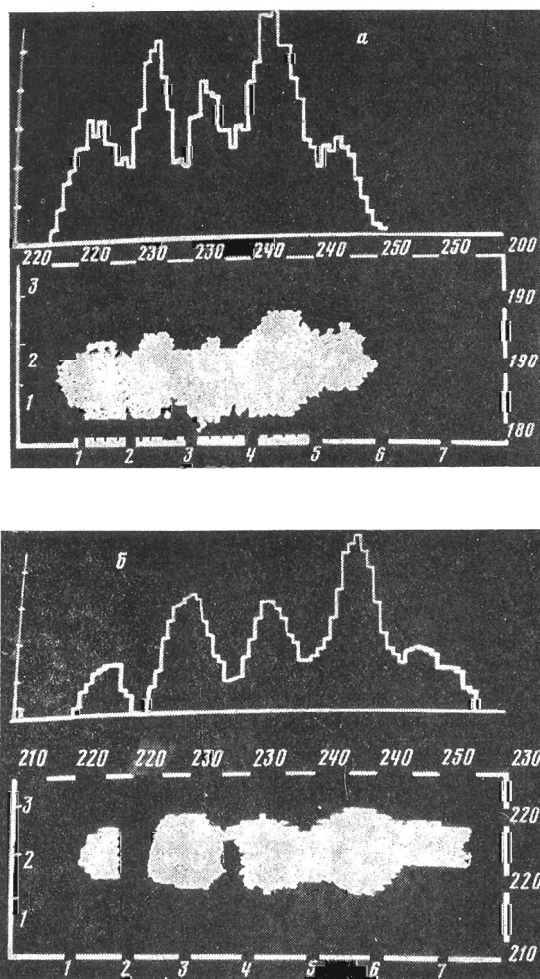


Рис. 2. Фотография с экрана телевизионного монитора, показывающая локализацию пятен диаметром 1,3 мм при расстоянии между их центрами 3,5 (а) и 2,5 мм (б)

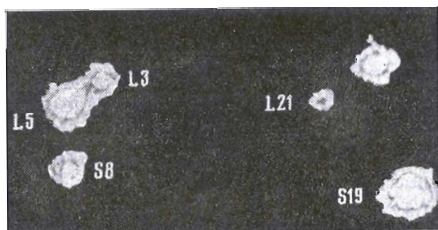


Рис. 3. Фотография с экрана телевизионного монитора, показывающая локализацию зон меченых рибосомных белков, разделенных с помощью двумерного гель-электрофореза (условия разделения см. [10])

Радионуклид  $^{125}\text{I}$  превращается посредством захвата электрона в  $^{125}\text{Te}$ , переход которого из возбужденного состояния сопровождается испусканием гамма-излучения с энергией 35,5 кэВ. Этот переход конвертирован в 93% превращений, что приводит к сложной цепи распада (испускаются фотоны характеристического излучения, электроны внутренней конверсии и Оже). В таблице приведено соотношение испускаемых фотонов и электронов на распад  $^{125}\text{I}$  [9]. Для электронов указана величина средней энергии.

При введении иодированных образцов в чувствительный объем детектора, работающего на газовой смеси на основе аргона, детектирование электронов, выходящих из образца, происходит с эффективностью, близкой к 1, а для фотонов с энергией 4 кэВ — с эффективностью  $\sim 0,6$ .

Излучение, испускаемое при распаде  $^{125}\text{I}$

Излучение	Энергия, кэВ	Среднее число частиц на распад
Гамма	35	0,07
Характеристическое излучение	$K_{\alpha}, K_{\beta}$	1,36
	$L$	0,21
Электроны	$\sim 3$	5,83
	$\sim 31$	0,39

Для проверки чувствительности и величины пространственного разрешения метода изготавливали специальные образцы. На металлическую подложку наносили растворы веществ, содержащих  $^{125}\text{I}$  определенной активности, в виде пятен заданной геометрии. Затем образцы помещали в детектор, а результаты экспресс-анализа представлялись на экране телевизионного монитора (рис. 1—3) и выводились на печатающее устройство.

На рис. 1 показана локализация трех пятен с активностями 100, 500, 1500 имп/мин и гистограммы сечений по их центрам. Время экспозиции 14 мин, интегральный счет в каждом пятне составил 290, 1620, 5180 событий. Полученные результаты указывают на достаточно высокую чувствительность метода.

Для проверки пространственного разрешения в углублении диаметром 1,3 мм на металлической подложке наносились микроколичества  $\text{K}^{125}\text{I}$ , близкие по активности. Полученные результаты (см. рис. 2) свидетельствуют о хорошем разделении пятен.

На рис. 3 приведены результаты разделения с помощью двумерного электрофореза смеси рибосомных белков. Подвижность меченных радиоактивным  $^{125}\text{I}$  белков совпадает с подвижностью их немеченных аналогов (последнее определяется с помощью специфической окраски белков кумасси).

Приведенные результаты указывают на то, что, используя приборы на основе многопроволочной пропорциональной камеры, можно проводить экспресс-анализ смесей иодированных белков с высокой чувствительностью. В большинстве реальных случаев время экспозиции не превышает несколько десятков минут (часто оказывается достаточным экспонирование в течение 5—10 мин). Пространственное разрешение составляет  $\sim 1$  мм.

Предложенный метод в настоящее время успешно применяется для идентификации рибосомных белков, взаимодействующих с тРНК и рибосомными РНК на различных этапах трансляции.

Авторы выражают глубокую признательность проф. Э. И. Будовскому (ИБХ АН СССР) за проявленный интерес к работе и оказанную помощь, а также Г. Г. Абдурашидовой (ИБХ АН СССР) за оказанную помощь и предоставленный препарат смеси меченых белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hunter W. M., Greenwood F. C. *Nature*, 1962, v. 194, № 4830, p. 495-496.
2. Roholt O. A., Pressman D. N. *Methods in Enzymology*, 1972, v. 25, p. 438-444.
3. Luis L. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 96, № 1, p. 93-97.
4. Carlsen J., Christensen M., Josefsson L. *Anal. Biochem.*, 1979, v. 92, № 1, p. 46-54.
5. Zanevsky Yu. V., Chernenko S. P., Ivanov A. B., Kaminir L. B., Peshekhonov V. D., Senchenkov E. P., Tyapkin I. A., Kalinin V. N. *Nuclear Instruments and Methods*, 1978, v. 153, № 2-3, p. 445-447.
6. Anisimov Yu. S., Chernenko S. P., Ivanov A. B., Kalinin V. N., Peshekhonov V. D., Senchenkov E. P., Tyapkin I. A., Zanevsky Yu. V. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 178, № 1, p. 117-124.
7. Anisimov Yu. S., Chernenko S. P., Ivanov A. B., Kheiker D. M., Peshekhonov V. D., Skvaril J., Zanevsky Yu. V. *Nuclear Instruments and Methods*, 1980, v. 176, № 1-2, p. 67-69.
8. Балдин А. М., Заневский Ю. В., Пешехонов В. Д., Семеновикин И. И. Препринт ОИЛИ, 18-81-48, Дубна 1981.
9. Parker R. P., Smith P. H. S., Taylor D. M. In: *Basis science of nuclear medicine*/Ed. Churchill Livingstone, London: Churshill Livingstone, 1978, p. 41.
10. Abdurashidova G. G., Turchinsky M. F., Budowsky E. J. *FEBS Letters*, 1981, v. 129, p. 59-61.

Поступила в редакцию  
28.IX.1983  
После доработки  
22.XI.1983

#### SENSITIVE HIGH RESOLUTION EXPRESS ANALYSIS OF IODINATED PROTEIN MIXTURES ON A FLAT SUPPORT

ZANEVSKY Yu. V., IVANOV A. B., MOVCHAN S. A.,  
PESHEKHONOV V. D., CHAN DIK TKHAN, CHERNENKO S. P.,  
KAMINIR L. B.\*, KREYNDLIN E. Ya.\*, CHERNYI A. A.\*

*Joint Institute for Nuclear Research, Dubna; \*Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A possibility of express analysis of  $^{125}\text{I}$ -labeled protein mixtures on a flat support using a setup of the «URAN» type developed on the basis of a multiwire proportional chamber has been demonstrated. The sensitivity of the method is higher than 200 cpm/cm<sup>2</sup>, and spatial resolution is about 1 mm. The time required for express analysis is within several dozens minutes.