



УДК 591.145.2.044:543.426

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОТОКСИНОВ
С ВОЗБУДИМОЙ МЕМБРАНОЙ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *****Гришин Е. В., Ефремов Е. С., Солдатов Н. М.,
Подрезова Е. И., Петренко А. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Метод дифференциальной флуоресцентной спектроскопии использован для определения равновесных параметров связывания различных нейротоксинов с препаратами первичных мембран. На примере мембранных везикул нервов крабов, синапсом мозга и культуры клеток нейробластомы показано, что рецепция тетродотоксина, аконитина и нейротоксинов яда скорпиона сопровождается насыщаемым эффектом гашения флуоресценции остатков триптофана, локализованных в мембране. В случае токсинов скорпиона этот процесс зависит от мембранного потенциала и может быть зарегистрирован по изменению флуоресценции 3-нитроэтил-5-тетрагидропиридина. Предложен механизм взаимодействия аконитина с первичными клетками, включающий в себя на первой стадии связывание с мембранными липидами.

Использование разнообразных природных нейротоксинов, способных специфично воздействовать на натриевые каналы возбудимой мембраны, позволило в настоящее время установить ряд особенностей механизма функционирования этих структур [2]. Среди таких нейротоксинов можно выделить три группы веществ:

а) специфичные блокаторы натриевого канала — тетродотоксин [3] и сакситоксин [4];

б) алкалоиды, вызывающие деполяризацию возбудимой мембраны за счет увеличения натриевой проницаемости: батрахотоксин [5], вератридин [6, 7], грайянетоксин [8] и аконитин [9, 10];

в) белковые нейротоксины морских анемонов [11, 12] и скорпионов [13], селективно ингибирующие процесс инактивации натриевого канала [14, 15].

Однако исследование рецепторов большинства нейротоксинов аксонального действия затруднено вследствие низкой плотности натриевых каналов на мембране (до 100 на 1 μm^2) [16], трудной доступности самих токсинов и сложности получения их радиоактивных аналогов. Анализ параметров связывания токсинов осложняется также высоким уровнем неспецифичной сорбции, что особенно характерно для белковых токсинов третьей группы. Кроме того, недавно [14, 15] появились данные о зависимости констант сродства токсинов скорпионов к рецепторам от

* Предварительные результаты настоящей работы были доложены на IV Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов [1].

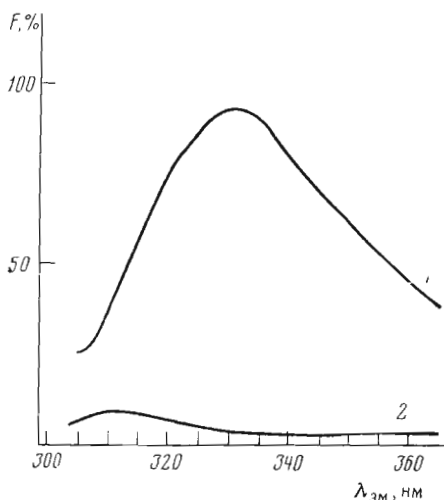


Рис. 1

Рис. 1. Спектры эмиссии, скорректированные по длинам волн, при $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм, 35° С: 1 — суспензия мембран из нервов крабов (20 мкг мембранного белка/мл) в буфере, рН 7,4 (160 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl); 2 — буферный раствор

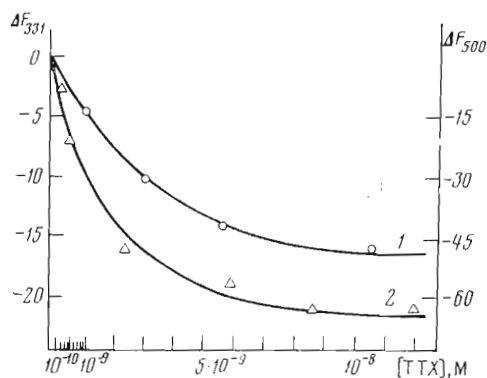


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость изменения флуоресценции суспензии мембран нервов крабов (20 мкг/мл) под действием ТТХ при 35° С; $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм; $\lambda_{\text{эм}}$ 331 нм (1) и кривая изменения светорассеяния первых мембран в тех же условиях; $\lambda_{\text{возб}}$ 500 нм, $\lambda_{\text{эм}}$ 500 нм (2)

мембранного потенциала, что заставляет использовать для изучения связывания этих токсинов энергизованные препараты плазматических мембран. Очевидно, именно поэтому данные о взаимодействии токсинов с натриевыми каналами возбудимых мембран к настоящему времени определены главным образом при измерении зависимости «доза — ответ» с использованием нативных волокон или клеток.

Настоящая работа посвящена анализу изменений собственной флуоресценции остатков триптофана в мембранных везикулах при взаимодействии с нейротоксинами, определению параметров этих взаимодействий и исследованию природы рецептирующих структур.

Для работы использовали плазматические мембраны из нервов крабов [18], культивируемые клетки нейробластомы клона N18A5, а также синаптосомы из мозга крыс [19].

На рис. 1 приведен прямой скорректированный по длинам волн спектр эмиссии ($\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм) суспензии плазматических мембран из нервов крабов (20 мкг мембранного белка/мл) в буфере, рН 7,4 (160 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl). Наблюдаемый максимум эмиссии при 331 нм характерен для остатков триптофана, расположенных внутри белковой глобулы в гидрофобном окружении [20]. Анализ формы спектра позволяет предположить наличие в мембране чрезвычайно гетерогенной по своему характеру популяции триптофановых остатков. Об этом свидетельствует ярко выраженная асимметрия полосы флуоресценции, коротковолновое положение максимума и большая полуширина спектра $\Delta\lambda$, достигающая 48 нм. Нагревание мембран при 80° С в течение 30 мин не вызывает изменения характера спектра.

Поскольку некоторая доля наблюдаемых остатков триптофана, по-видимому, может принадлежать рецепторам токсинов, допустимо предположение, что связывание приведет к гашению триптофановой флуоресценции пропорционально доле связавшихся молекул токсина. В пользу такого предположения свидетельствует ряд данных, полученных для некото-

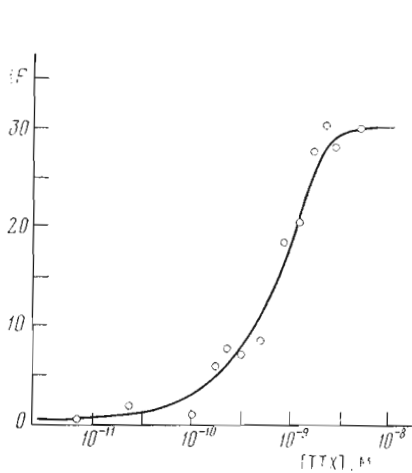


Рис. 3

Рис. 3. Концентрационная зависимость гашения триптофановой флуоресценции тетродотоксином в дифференциальном режиме

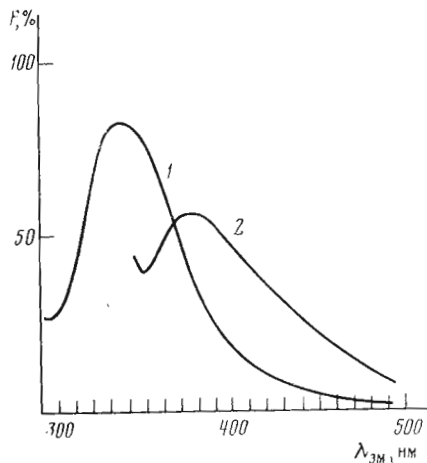


Рис. 4

Рис. 4. Спектры флуоресценции $5 \cdot 10^{-7}$ М раствора M_6 в буфере, рН 7,4 (160 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl), при 25°C , $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм (1) и 10^{-7} М раствора I- M_6 в том же буфере при 25°C , $\lambda_{\text{возб}}$ 314 нм (2)

рых гормонов [21–24] и флуоресцентных аналогов холинергических эф- фекторов [25, 26].

Для анализа специфичности наблюдаемых эффектов был выбран один из наиболее изученных блокаторов натриевых каналов — тетродотоксин (ТТХ) [3]. Измерение проводили на приборе Aminco SPF-1000 CS (США) в дифференциальном режиме с коррекцией по длинам волн. Для этого равные объемы суспензии мембран (0,01–0,04 мг/мл) в соответствующем физиологическом буферном растворе помещали в термостатируемые кюветы образца и сравнения. В кювету образца добавляли микролитровые аликвоты раствора токсина в том же буфере. Для компенсации эффекта разбавления в кювету сравнения добавляли равные аликвоты буфера. Измерение флуоресценции остатков триптофана проводили в максимуме волны эмиссии ($\lambda_{\text{эм}}$).

На рис. 2 приведена кривая 1 изменения флуоресценции (ΔF) суспензии нервных мембран в зависимости от концентрации ТТХ. Та же зависимость, измеренная в отсутствие мембран, совпадала с осью абсцисс. В области физиологических концентраций ТТХ (10^{-10} – $5 \cdot 10^{-8}$ М) наблюдается насыщаемый эффект гашения флуоресценции остатков триптофана мембраны, сопровождающийся сходным эффектом снижения светорассеяния (кривая 2). При этом добавки ТТХ до концентрации $6 \cdot 10^{-7}$ М не вызывают сдвига максимума эмиссии в спектрах мембран.

В дальнейшем для коррекции полученные функции типа 2а вычитали из кривых изменения флуоресценции в отсутствие мембран. Полученная зависимость в полулогарифмических координатах (рис. 3) имеет типичный вид кривой насыщаемой адсорбции. В случае ТТХ точка перегиба, аппроксимирующая K_D , составляет $\approx 8 \cdot 10^{-10}$ М. Полученные для ТТХ параметры взаимодействия с нервной мембраной позволяют сделать вывод, что наблюдаемое гашение флуоресценции мембранных триптофановых остатков отражает насыщаемый процесс специфичной сорбции (рецепции) ТТХ.

Анализ полученных данных проводили, предполагая, что величина гашения флуоресценции (ΔF) пропорциональна концентрации комплекса

«токсин — рецептор» ($[LR]$). Тогда, согласно работам [27, 28],

$$\frac{\Delta F}{F_{\infty}} = \frac{[LR]}{[R_0]}$$

где F_{∞} — максимальное гашение флуоресценции при бесконечном увеличении концентрации токсина [28], а $[R_0]$ — исходная концентрация рецептора.

Полагая в общем случае [29], что

$$\frac{[LR]}{[L]} = \frac{K[R_0]}{1+K[L]}$$

($[L]$ — равновесная концентрация токсина, K — равновесная константа ассоциации токсина с данным типом участка связывания), получаем уравнение, позволяющее связать гашение флуоресценции с исходной концентрацией токсина $[L_0]$ при фиксированной концентрации рецептора:

$$\frac{[L_0]}{[L_0] - \frac{\Delta F[R_0]}{F_{\infty}}} - \frac{K[R_0]}{1 + K\left([L_0] - \frac{\Delta F[R_0]}{F_{\infty}}\right)} - 1 = 0. \quad (1)$$

Отсюда из экспериментально измеренной зависимости методом наименьших квадратов с минимизацией соответствующего функционала удается определить параметры взаимодействия F_{∞} , K , а также $[R_0]$, соответствующее концентрации рецептора в предположении, что токсин взаимодействует с рецептором в мольном соотношении 1:1 (см. «Экспериментальную часть»).

Таким образом, для ТТХ найдены следующие параметры связывания с нервной мембраной крабов: $K_D = 4,8 \pm 1,2$ нМ и число участков связывания 34 ± 29 пмоль/мг мембранного белка. Полученные значения хорошо соответствуют данным, имеющимся в литературе и найденным независимыми методами нейрофизиологии, радиолигандного анализа и т. д. [3, 16, 32].

В то же время в диапазоне концентраций ТТХ 10^{-11} – 10^{-10} М наблюдался автономный эффект гашения, проходящий через экстремум при $\sim 6 \cdot 10^{-11}$ М ТТХ. Строгий анализ наблюдаемого явления провести нельзя вследствие незначительности изменения флуоресценции, связанного с этим эффектом, а также из-за относительно высокого уровня шума, неизбежного при измерении флуоресценции мембран в дифференциальных условиях. Тем не менее можно предположить, что оно обусловлено наличием в мембране небольшой доли высокоаффинных участков связывания.

Уже на примере рецепции ТТХ очевидны преимущества описанного метода: параметры рецепции удается определять, не нарушая условий равновесия. При этом расход как мембранных препаратов, так и токсинов незначителен, и не требуется введения радиоактивных, флуоресцентных или иных меток, так что все компоненты рецептирующей системы находятся в нативном состоянии.

Следующая часть нашего исследования связана с изучением взаимодействия токсинов M_6 [13] и M_{10} [30] из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* с различными препаратами плазматических мембран.

В отличие от ТТХ эти токсины полипептидной природы флуоресцируют при $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм, поскольку содержат в своем составе 2–5 остатков триптофана (рис. 4, 1). В общем виде зависимость изменения ΔF мембран от концентрации токсина скорпиона подобна кривой, полученной для ТТХ. Интересно, что следующие за насыщением добавки токсина приводят к значительному батохромному сдвигу максимума триптофановой флуоресценции, что, по-видимому, обусловлено накоплением в системе остатков триптофана, принадлежащих несвязанному токсину. Это в свою

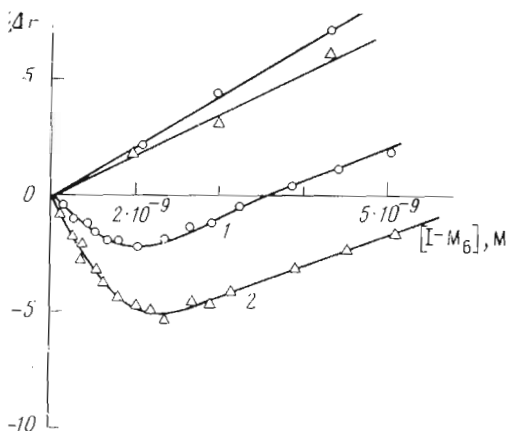


Рис. 5

Рис. 5. Кривые изменения флуоресценции суспензии мембран нервов крабов (7,6 мкг/мл) при титровании I-M₆ (25° С). Измерение проводили при λ_{возб} 314 нм, λ_{эм} 375 нм (1) и при λ_{возб} 280 нм, λ_{эм} 331 нм (2). В верхней части спектра проведены кривые, полученные в отсутствие мембран

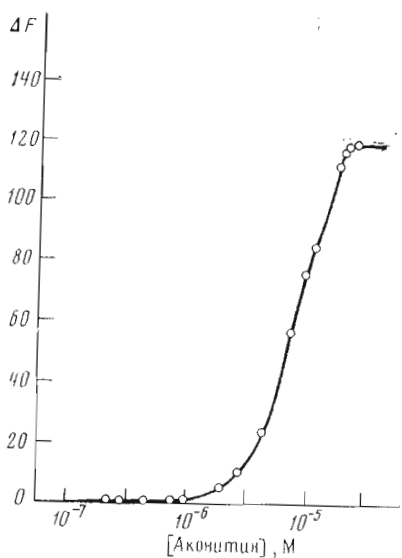


Рис. 6

Рис. 6. Концентрационная зависимость гашения триптофановой флуоресценции суспензии синапсом (20,5 мкг/мл) аконитином при 20° С в дифференциальном режиме

очередь вызывает появление соответствующего насыщению экстремума кривой гашения флуоресценции мембран, которая в дальнейшем сближается с кривой, измеренной в отсутствие мембран. Как и в случае ТТХ, взаимодействие токсинов скорпионов с мембранами приводит к снижению светорассеяния суспензии, причем этот эффект совпадает в точке насыщения с экстремумом кривой гашения флуоресценции. Нагревание мембран при 80° С в течение 15 мин элиминирует все наблюдаемые эффекты.

Гашение флуоресценции остатков триптофана не наблюдается также при титровании суспензии лецитиновых везикул токсином M₁₀ в широком диапазоне концентраций.

Согласно полученным данным, связывание токсина M₁₀ с суспензией культуры клеток нейробластомы линии N-18A5 происходит с K_D 2,8 · 10⁻⁸ М, причем концентрация рецептора составляет в среднем 40 пмоль/мг мембранного белка.

Описанный метод вполне пригоден для исследования рецепции с использованием других флуоресцирующих групп, например иодтирозила. На рис. 4, 1 приведен прямой спектр флуоресценции иодированного производного токсина M₆ (далее I-M₆) с максимумом эмиссии при 375 нм (λ_{возб} 314 нм), характерным для 3-иодтирозильного остатка в белке [20]. Иодирование проводили по методу [31] с использованием лактопероксидазы при мольном соотношении M₆-NaI, равном 1:1, и в присутствии следов Na¹²⁵I. После хроматографии на СМ-целлюлозе полученное производное I-M₆ содержало один атом иода на молекулу токсина и обладало биологической активностью.

На рис. 5 приведены зависимости гашения флуоресценции при титровании суспензии мембран нервов краба токсином I-M₆ с измерением эмиссии как 3-иодтирозина (кривая а), так и триптофана (кривая б). Оба эффекта появляются в одном и том же диапазоне концентраций и характеризуются идентичными насыщающими концентрациями. Разная

интенсивность гашения объясняется различным квантовым выходом иодтирозина и триптофана [20].

Следует заметить, что при измерении иодтирозиновой флуоресценции не наблюдается сдвигов максимума эмиссии флуорофора при увеличении концентрации I-M₆. Согласно измерениям 3-иодтирозиновой и триптофановой флуоресценции, константы связывания I-M₆ с мембранами червов крабов соответственно составляют $(3,2 \pm 2,0) \cdot 10^{-8}$ и $(1,8 \pm 1,0) \cdot 10^{-8}$ М. В случае нативного токсина M₆ константа связывания оказалась равной $(11,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$ М. Согласно полученным данным, концентрация рецептора для нативного и модифицированного токсина M₆ составляет в среднем 60–70 пмоль/мг мембранного белка.

Описанные для M₆ результаты получены с использованием неэнергизованных мембранных препаратов. Однако в случае токсинов скорпионов нам представлялось интересным проанализировать также влияние мембранного потенциала на параметры связывания. С этой целью мы провели титрование синапсом мозга крысы токсином M₁₀. Буфер, способствующий поддержанию мембранного потенциала везикул, содержал 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ Na₂EDTA, 20 мМ трис-HCl, pH 7,4. Для деполяризации синапсосомы ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 160 мМ KCl и 20 мМ трис-HCl, pH 7,4.

Как следует из полученных данных, деполяризация мембраны приводит к увеличению константы сродства токсина M₁₀ от $(4,9 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$ до $(8,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$ М, что вполне согласуется с литературными данными [14, 15]. Найденная потенциал-зависимость связывания токсина скорпиона служит дополнительным свидетельством корректности описанного метода.

На рис. 6 приведена зависимость изменения флуоресценции синапсом от концентрации токсина растительного происхождения — аконитина. Этот токсин в диапазоне эффективных концентраций $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-3}$ М вызывает деполяризацию возбудимой мембраны, а также стимулирует выброс медиаторов из первых окончаний [9, 10].

При титровании синапсом аконитином в том же диапазоне концентраций мы наблюдали подобный ТТХ насыщаемый эффект гашения флуоресценции локализованных в мембране остатков триптофана, максимум эмиссии которых находился при 325 нм. Эффект гашения в данном случае необычайно высок, что свидетельствует о значительной доле триптофановых остатков, участвующих в процессе. Анализ полученных данных позволил определить следующие параметры взаимодействия аконитина с синапсосомами: K_D $(4,0 \pm 2,1) \cdot 10^{-5}$ М, а число участков связывания достигает $4,6 \pm 0,6$ мкмоль/мг мембранного белка.

Высокая рецептирующая емкость мембраны позволяет предполагать, что, по-видимому, имеет место насыщение аконитином липидной фазы мембраны, где и локализован рецептор токсина. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что обработанные протеолитическими ферментами (трипсином, проназой) синапсосомы сохраняют те же параметры гашения флуоресценции аконитином, что и нативные. С другой стороны, для функционального аналога аконитина — вератридина найдено высокое сродство к фосфолипидам нервной мембраны краба [32]. Возможно, что из числа молекул аконитина, проникших в липидную фазу, лишь небольшая доля функционально важна для модификации натриевого канала.

Таким образом, в настоящей работе с помощью метода дифференциальной флуоресцентной спектроскопии измерены основные параметры равновесного связывания ряда нейротоксинов аксонального действия с нервной мембраной. Полученные значения близко совпадают с результатами, найденными другими независимыми методами. По-видимому, метод дифференциальной флуоресцентной спектроскопии может быть использован для изучения взаимодействия многих физиологически активных веществ с их рецепторами.

Авторы выражают глубокую признательность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, Э. А. Бурштейну (Институт биофизики АН СССР) за критическое обсуждение результатов исследования, а также Т. Н. Игнатовой (Институт цитологии АН СССР) за предоставление клеток культивируемой нейробластомы клона N-18A5.

Экспериментальная часть

Плазматические мембраны из двигательных нервов дальневосточных крабов *Paralithodes camtschatica* получали по методу [18], а синапсомы из мозга крыс — по методике [19]. Определение мембранного белка проводили по методу Лоури [33], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ).

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Aminco SPF-1000 CS (США). Эмиссионные спектры получали в скорректированном режиме. При дифференциальном титровании по 2 мл суспензии мембраны (7–40 мкг мембранного белка/мл) помещали в термостатируемые кюветы (слой 1 см), снабженные магнитными мешалками. Поглощение суспензии в диапазоне длин волн возбуждения не превышало 0,050 ОЕ. С помощью шприцев емкостью 10 мкл (Hamilton, Швейцария) в кювету образца и кювету сравнения добавляли равные объемы соответственно раствора токсина и буфера. Измерение флуоресценции проводили через 1 мин после добавления токсина. Общий объем добавленного раствора не превышал 5% объема кюветы. Измерение триптофановой флуоресценции проводили при $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм; щели монохроматоров возбуждения 5 нм, эмиссии — 10 нм.

Интенсивность флуоресценции при титровании суспензии мембран из нервов крабов токсинами измеряли при 331 нм в буфере, рН 7,4, содержащем 160 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl. Титрование суспензии культивируемых клеток нейробластомы N-18A5 проводили при 325 нм в буфере, рН 7,2 (164 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgSO₄, 10 мМ трис-HCl), а суспензии синапсом — в буфере, рН 7,4, содержащем 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, 10 мМ Na₂EDTA, 5 мМ KCl. Для деполяризации синапсом и клеток нейробластомы использовали буфер, содержащий 160 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, рН 7,4.

Тетродотоксин (Calbiochem, США), хлоридрат аконитина (Институт химии растительных веществ АН УЗССР), а также токсины M₆ [13] и M₁₀ [30] растворяли в соответствующем буфере. Концентрацию белковых токсинов скорпиона определяли по данным аминокислотного анализа гидролизатов в 5,7 н. HCl (110° С, 24 ч) на анализаторе «Dugum» (США).

Измерение светорассеяния при титровании токсинами проводили в дифференциальных условиях согласно описанной методике измерения флуоресценции при длинах волн эмиссии и возбуждения 500 нм. Щели монохроматоров возбуждения 2 нм и эмиссии 5 нм.

Иодирование токсина M₆. К раствору 1 мг M₆ в 570 мкл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,5) добавляли эквимольное количество NaI (ос.ч.), содержащего следы Na¹²⁵I (Amersham, Англия) и 0,5 мг лактопероксидазы (Calbiochem, США) в 50 мкл воды. С интервалом в 1 мин при перемешивании к смеси добавляли 34,5 мМ перекись водорода (4×20 мкл). Реакцию останавливали прибавлением 0,5 мл 0,05 М аммоний-ацетатного буфера (рН 5,5) и смесь наносили на колодку с 2 мл СМ-целлюлозы СМ-32 (Whatman, Англия), уравновешенной тем же буфером. Хроматографию проводили в линейном градиенте 0,05–0,5 М ацетата аммония (рН 5,5) при скорости элюирования 45 мл/ч. Фракцию, содержащую I-M₆, собирали при молярности буфера 0,19 и дважды лиофильно сушили. По данным измерения радиоактивности, I-M₆ содержал один атом иода на молекулу токсина.

Измерение флуоресценции 3-йодтирозина при титровании нервных мембран I-M₆ проводили при λ_{возб} 314 нм, λ_{эм} 375 нм.

Расчет кривых титрования. Для *m* пар экспериментальных точек {Δ*F*_{*i*}, [L₀]_{*i*}} проводили минимизацию функционала Φ

$$\Phi = \sum_{i=1}^m [\Delta F_i - \Delta \bar{F}([L_0]_i)]^2,$$

где Δ*F*([L₀]_{*i*}) определяется уравнением (1). Для расчета составляли программу на языке «Фортран IV» для ЭВМ ЕС-1040.

При обработке данных проводили начальную минимизацию Φ путем применения алгоритма Хука — Дживса [34]. Дальнейшую минимизацию Φ и определение доверительных интервалов для параметров рецепции осуществляли по алгоритму Гаусса — Ньютона с модификацией Маркуардта [35]. Если в результате вычисленного шага происходило увеличение Φ, проводили поиск минимума по направлению этого шага. Процесс минимизации ускоряли за счет перехода к логарифмическим переменным *K* и [R₀]. Расчет предусматривает начальное приближение параметров *F*_∞, *K* и [R₀], которые выбирали по предварительным оценкам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солдатов Н. М., Гришин Е. В., Ефремов Е. С., Солдатова Л. Н., Адамович Т. Б., Коваленко В. А., Подрезова Е. И. (1977) Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов, с. 36, Млнск.
2. Hille B. (1978) *Biophys. J.*, **22**, 283–294.
3. Narahashi T. (1974) *Physiol. Rev.*, **54**, 813–889.
4. Ritchie J. M., Rogart R. B., Strichartz G. (1976) *J. Physiol.*, **261**, 477–494.
5. Albuquerque E. X., Daly J. W., Witkop B. (1971) *Science*, **172**, 995–1002.
6. Ulbricht W. (1969) *Ergeb. Physiol. Pharmacol.*, **61**, 48–71.
7. Ohta M., Narahashi T., Keeler R. F. (1973) *J. Pharm. Exp. Ther.*, **184**, 143–154.
8. Seyama I., Narahashi T. (1973) *J. Pharm. Exp. Ther.*, **184**, 299–307.
9. Herzog W. H., Feibel R. M., Bryant S. H. (1964) *J. Gen. Physiol.*, **47**, 719–733.
10. Можжаева Г. Н., Наумов А. П., Негуляев Ю. А. (1976) *Нейрофизиология*, **8**, 152–160.
11. Béress R., Béress L., Wunderer G. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 409–414.
12. Barry J., Fosset M., Lazdunski M. (1977) *Biochemistry*, **16**, 3850–3855.
13. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. (1978) *Биоорганической химии*, **4**, 450–461.
14. Можжаева Г. Н., Наумов А. П., Солдатов Н. М., Гришин Е. В. (1979) *Биофизика*, **24**, 235–241.
15. Catterall W. A. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 5528–5536.
16. Armstrong C. M. (1975) *Quart. Rev. Biophys.*, **7**, 179–210.
17. Ray R., Morrow C. S., Catterall W. A. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7307–7313.
18. Гришин Е. В., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Литвинов И. С., Овчинников Ю. А. (1979) Тезисы докладов I Советско-швейцарского симпозиума по биологическим мембранам, с. 69, Тбилиси.
19. Abita J.-P., Chicheportliche R., Schweitz H., Lazdunski M. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1838–1844.
20. Бурштейн Э. А. (1977) Собственная люминесценция белка. Сб. «Итоги науки и техники», сер. «Биофизика», т. 7, ВИНТИ, М.
21. Rubin M. S., Swislocki N. I., Sonenberg M. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **157**, 252–259.
22. Лакин В. В., Бельых А. Г. (1976) *Фармакология и токсикология*, **39**, 212–216.
23. Imae T., Fasman G. D., Hinkle P. M., Tashjian Jr. A. H. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **63**, 923–932.
24. Imae T., Fasman G. D., Tashjian Jr. A. H. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **552**, 103–113.
25. Cohen J., Changeux J. P. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4855–4864.
26. Waksman G., Fournié-Zaluski M.-C., Roques B., Heidmann T., Grünhagen H.-H., Changeux J. P. (1976) *FEBS Lett.*, **67**, 335–342.
27. Cheung H. C., Morales M. F. (1969) *Biochemistry*, **8**, 2177–2182.
28. Zierler K. (1977) *Biophys. Struct. Mechanism*, **3**, 275–289.
29. Priore R. L., Rosenthal H. E. (1976) *Anal. Biochem.*, **70**, 231–240.
30. Grishin E. V., Soldatov N. M., Soldatova L. N., Ovchinnikov Yu. A. (1979) *Toxicon*, **17**, supplement N 1, 60.
31. Morrison M., Bayse G. S., Webster R. G. (1971) *Immunochemistry*, **8**, 289–297.

32. Balerna M., Fosset M., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5500—5511.
33. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275.
34. Hooke R., Jeeves T. A. (1962) *J. Assoc. Computer Mach.*, **8**, 212.
35. Marquardt D. W. (1963) *J. SIAM*, **11**, 431.

Поступила в редакцию
6.IX.1979

A STUDY OF THE NEUROTOXIN INTERACTION WITH EXCITABLE MEMBRANE BY DIFFERENCE FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

GRISHIN E. V., EFREMOV E. S., SOLDATOV N. M.,
PODREZOVA E. I., PETRENKO A. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A method of difference fluorescence spectroscopy has been used for estimating the parameters of neurotoxin equilibrium binding with nerve membrane particles. The studies of crab membrane vesicles, rat brain synaptosomes, and neuroblastoma cells in culture showed that the reception of tetrodotoxin, aconitine, and of scorpion neurotoxins induces a saturable quenching of the membrane tryptophan fluorescence. In the case of scorpion neurotoxins this effect depends on the membrane potential and can be detected by means of quenching of the 3-iodotyrosine fluorescence of iodinated toxins. A mechanism is proposed for the interaction of aconitine with the nerve membrane, whereby the first stage involves binding to membrane lipids.
