



УДК 547.993.04

ПРИРОДА МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОТОКСИНА
ИЗ ЯДА СКОРПИОНА *

Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследовано взаимодействие радиоактивного фоточувствительного производного нейротоксина M_{10} из яда скорпиона *Vuthus eurus* с препаратами возбудимых мембран. Установлено, что при фотоактивации специфичное присоединение ^{125}I -ДНФА- M_{10} ** к рецепторным компонентам мембран составляет 45% от общего связывания. Нативный нейротоксин M_{10} и токсин анемоны конкурентно ингибируют связывание ^{125}I -ДНФА- M_{10} синапсосомами мозга крыс. При электрофоретическом анализе ковалентного токсин-рецепторного комплекса синапсом мозга крыс, клеток нейробластомы и плазматических мембран нервов краба обнаружено, что ^{125}I -ДНФА- M_{10} в каждом случае специфично связывается с двумя мембранными белковыми компонентами молекулярного веса ориентировочно 76 000 и 51 000.

Быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран принимают непосредственное участие в передаче нервного импульса. Предполагается, что натриевые каналы представляют собой трансмембранные белковые комплексы с различными функциональными компонентами, причем один из компонентов выполняет роль потенциалзависимого воротного механизма [2]. Нейротоксины яда скорпионов селективно воздействуют на воротный механизм каналов, замедляя скорость их инактивации [3]. Это позволяет считать, что рецепторы токсинов скорпионов являются функционально важными составными частями системы, обеспечивающей трансмембранный перенос ионов натрия через электровозбудимую мембрану.

Одним из наиболее эффективных способов локализации рецепторов токсинов является прямое ковалентное связывание их радиоактивных меченых фоточувствительных аналогов с возбудимыми мембранами. Ранее нами было описано [4] использование динитрофторфенилазида для синтеза фоточувствительного производного нейротоксина M_{10} (ДНФА- M_{10}) из яда среднеазиатского скорпиона *Vuthus eurus*. Методом фиксации потенциала было показано, что фоточувствительное производное обладает высоким уровнем биологической активности и при фотоактивации необратимо связывается с компонентами натриевых каналов клеток нейробластомы. Кроме того, было установлено, что иодирование модифицированного нейротоксина не сопровождается заметной потерей биологической активности и позволяет получать производное ДНФА- M_{10} с высоким уровнем удельной радиоактивности [4].

* Предварительные результаты данной работы были представлены на VI Международном симпозиуме по животным, растительным и микробным токсинам в Уппсале, Швеция [1].

** ^{125}I -ДНФА- M_{10} — иодированное динитрофенилазидное производное нейротоксина M_{10} из яда скорпиона *Vuthus eurus*.

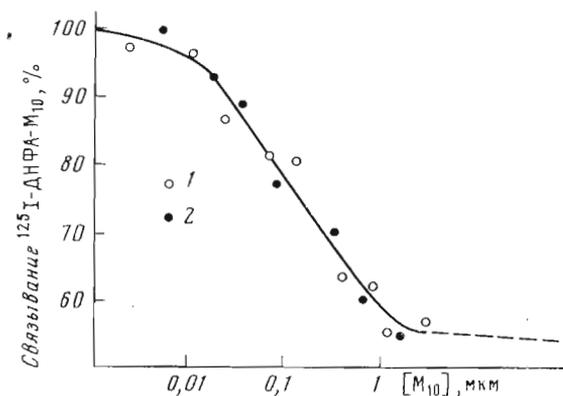


Рис. 1. Зависимость фотиндуцированного связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} с синапсосомами из мозга крыс от содержания токсина M_{10} в инкубационной смеси. Синапсосомы — 0,835 мг общего белка/мл, [^{125}I -ДНФА- M_{10}] 2,5 нМ; количество связанного ^{125}I -ДНФА- M_{10} определяли фильтрованием через стеклофильтры (1) и центрифугированием (2)

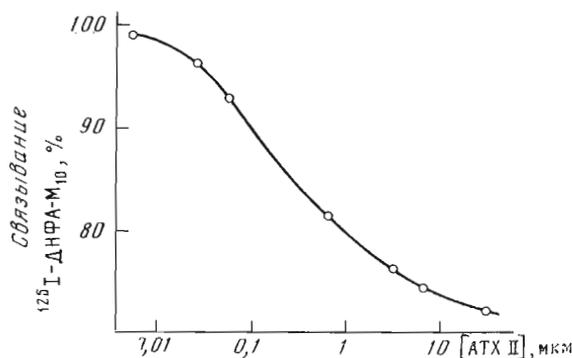


Рис. 2. Зависимость связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} с синапсосомами от содержания токсина АТХ II в инкубационной смеси. Синапсосомы — 0,835 мг общего белка/мл, [^{125}I -ДНФА- M_{10}] 2,5 нМ; анализ методом фильтрации

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия ^{125}I -ДНФА- M_{10} с препаратами возбудимых мембран, доказательству специфичности связывания модифицированного нейротоксина и выяснению природы мембранных рецепторов нейротоксина яда скорпиона.

При взаимодействии ^{125}I -ДНФА- M_{10} с возбудимыми мембранами наряду с образованием равновесного комплекса токсин—рецептор может осуществляться и неспецифичное связывание модифицированного токсина с разнообразными мембранными компонентами. Долю специфичного связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} можно оценить вытеснением его с мембранных рецепторов избытком нативного токсина. Кроме того, конкуренция за связывание между модифицированным и нативным токсинами является доказательством присоединения ^{125}I -ДНФА- M_{10} именно к рецепторным компонентам возбудимых мембран.

Ковалентное присоединение модифицированного токсина к мембранам проводилось освещением при длине волны больше 320 нм, так как, согласно электрофизиологическим данным, в этих условиях не происходило нарушения свойств быстрых натриевых каналов [4]. Для уменьшения неспецифичной сорбции ^{125}I -ДНФА- M_{10} и защиты мембранных рецепторов от возможного влияния лизолипидов [5] в состав инкубационной среды включали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Согласно полученным результатам (рис. 1), с увеличением концентрации токсина M_{10} уровень связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} снижается приблизительно на 45%. Таким образом, доля специфичного связывания модифицированного токсина не превышает 50%. В предположении, что связывание токсина с рецептором происходит в соотношении 1:1, число участков связывания составляет 100 ± 20 фмоль/мг общего белка синапсом. В задачу настоящей работы не входило определение максимальной рецептирующей емкости мембран для токсина. Согласно литературным данным, эта величина составляет 30–60 [6] или 594 [7] фмоль/мг общего белка синапсом.

Кажущаяся равновесная константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса ($K_{0,5}$) для M_{10} составляет $\sim 10^{-7}$ М, что близко совпадает с данными, полученными при исследовании взаимодействия этого токсина с мембраной клетки нейроblastомы методом фиксации потенциала [4].

Одним из критериев специфичности связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} с мембранными рецепторами может служить конкуренция за участки связывания с полипептидными нейротоксинами, выделяемыми из стрекательных клеток морских анемонов [8]. Ранее было показано [9, 10], что нейротоксин II *Anemonia sulcata* (АТХ II) [11] конкурирует с радиоактивно мечеными токсинами скорпиона за связывание с клетками нейроblastомы. Согласно нашим данным (рис. 2), токсин АТХ II специфично ингибирует связывание ^{125}I -ДНФА- M_{10} с синапсом, причем $K_{0,5}$ для АТХ II составляет $\sim 2 \cdot 10^{-7}$ М.

Таким образом, связывание ^{125}I -ДНФА- M_{10} специфично подавляется нативным токсином M_{10} , а также его функциональным аналогом — токсином анемоны, что прямо свидетельствует о сохранении биологической активности фоточувствительного производного. Эти данные, а также результаты анализа фотиндуцированного присоединения ДНФА- M_{10} к клеткам нейроblastомы в условиях фиксации потенциала [4] позволяют сделать вывод о том, что гиперлируемые при освещении радикалы модифицированного токсина присоединяются именно к рецепторным компонентам возбудимой мембраны. Отсюда представлялось возможным охарактеризовать рецепторы нейротоксина скорпиона, а также провести сравнительный анализ этих компонентов для мембран из различных источников — синапсом мозга крыс, клеток нейроblastомы и плазматических мембран нервов краба.

Выяснение природы рецепторов нейротоксина скорпиона проводилось при помощи электрофореза препаратов возбудимых мембран, ковалентно связанных с модифицированным нейротоксином. Идентификация мембранных компонентов, специфично связывающих ^{125}I -ДНФА- M_{10} , осуществлялась анализом разностного профиля радиоактивности полиакриламидных гелей, полученных после электрофоретического разделения в присутствии додецилсульфата натрия [12] мембранных препаратов, содержащих и не содержащих специфично связанный модифицированный токсин (см. «Экспериментальную часть»). При этом воспроизводимость полученных результатов доказывалась статистическим анализом. Так, например, для изучения взаимодействия ^{125}I -ДНФА- M_{10} с синапсом мозга крыс было проведено более 20 параллельных экспериментов.

На рис. 3 приведены денситограмма и соответствующий ей разностный профиль распределения радиоактивности в геле после электрофореза синапсом, обработанных ^{125}I -ДНФА- M_{10} . Основная зона радиоактивности присутствует в области белков с M до 20 000. По величине она соответствует уровню связанного ^{125}I -ДНФА- M_{10} , составляющему десятки пмоль/мг общего белка синапсом. Поскольку экстракция модифицированных мембран в процессе их получения водным буфером, ацетоном или смесью хлороформа и метанола не приводит к существенному снижению радиоактивности этой зоны при последующем электрофорезе, можно предположить, что в ней содержится модифицированный нейротоксин, связанный с липид-

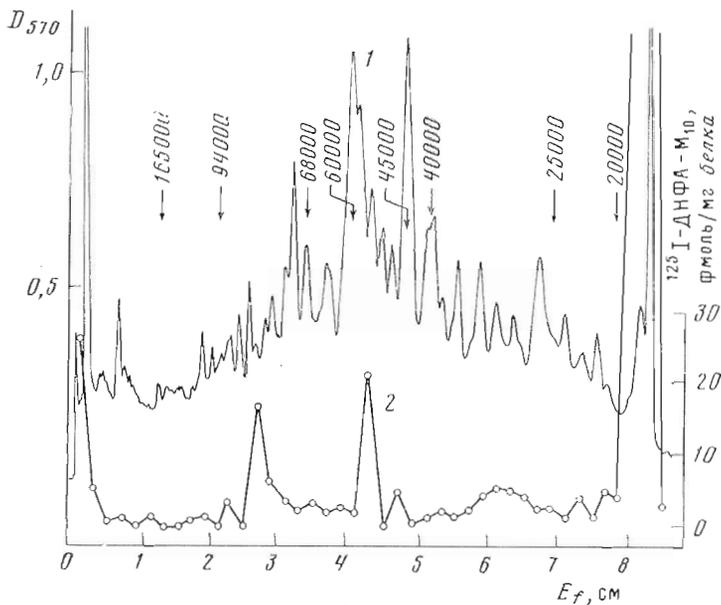


Рис. 3. Денситограмма (1) и разностный профиль распределения радиоактивности в геле (2) при электрофорезе синапсом, модифицированных ^{125}I -ДНФА- M_{10} . Синапсомы — 0,84 мг общего белка/мл, $[^{125}\text{I}$ -ДНФА- $M_{10}]$ 66 нМ; в контрольный раствор добавляли, кроме того, 3,3 мкМ M_{10} . Здесь и далее стрелки с цифрами означают положение и молекулярные веса маркерных белков

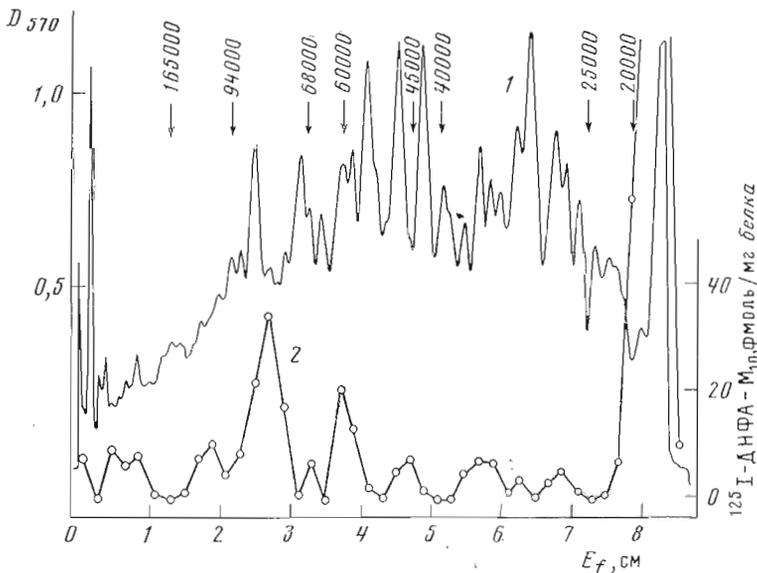


Рис. 4. Денситограмма (1) и разностный профиль распределения радиоактивности в геле (2) при электрофорезе клеток нейробластомы, модифицированных ^{125}I -ДНФА- M_{10} . Клетки — 1 мг общего белка/мл, $[^{125}\text{I}$ -ДНФА- $M_{10}]$ 66 нМ; в контрольный раствор добавляли, кроме того, 2 мкМ M_{10} и 2 мМ CaCl_2

ными компонентами мембран. По-видимому, именно этот тип взаимодействия обуславливает также и высокую степень неспецифического связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} с мембранными препаратами.

В то же время практически во всех 20 параллельных опытах наблюдались две специфично подавляемые избытком пативного токсина M_{10} зоны связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} с M 84 000 и 58 000. Величины радиоактивности этих зон вместе с доверительным интервалом превышают фоновую радио-

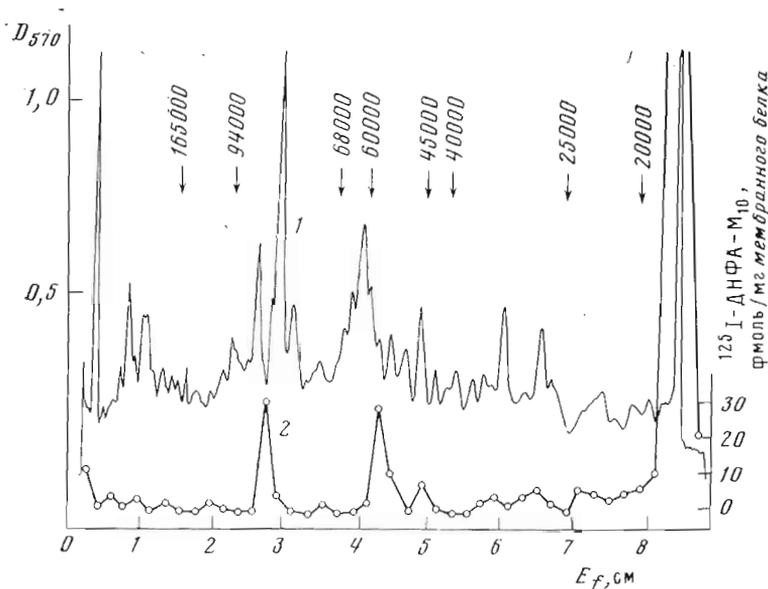


Рис. 5. Денситограмма (1) и разностный профиль распределения радиоактивности в геле (2) при электрофорезе плазматических мембран из нервов краба. Мембранный белок — 0,84 мг/мл, [^{125}I -ДНФА- M_{10}] 0,133 мкМ; в контрольный раствор добавляли еще 3,3 мкМ M_{10}

активность профиля более чем в 3 раза. Для каждой из зон уровень связывания ^{125}I -ДНФА- M_{10} составляет 10–30 фмоль/мг. Отсюда общее связывание модифицированного токсина обоими компонентами составляет 20–60 фмоль/мг белка. Эта величина вполне соответствует связывающей емкости рецепторов токсина скорпиона на мембране, если учесть, что для вытеснения ^{125}I -ДНФА- M_{10} в контрольном опыте мы использовали 50-кратный избыток нативного токсина, подавляющий специфичное связывание модифицированного токсина на 50–60% (рис. 1).

Полагая, что связывание ^{125}I -ДНФА- M_{10} с рецептором проходит в соотношении 1:1 и молекулярный вес аналога нейротоксина составляет 7000, истинные молекулярные веса найденных компонентов составляют 77 000 и 51 000. Эти значения близко соответствуют предварительным данным [13], полученным для рецепторов токсина АТХ II в мембране двигательного нерва рака.

Интересно, что, несмотря на значительное отличие клеток нейробластомы от синапсомы по белковому составу, при их фотомодификации ^{125}I -ДНФА- M_{10} также наблюдается присутствие двух специфично связывающих компонентов с M 73 000 и 52 000 (рис. 4). Это может служить дополнительным доказательством достоверности полученных выше результатов, так как клетки нейробластомы и синапсомы принадлежат близким видам млекопитающих. Для клеток нейробластомы суммарный уровень связывания токсина обоими компонентами составляет ~55 фмоль/мг общего белка.

Известно, что рецепция токсинов скорпиона зависит от уровня мембранного потенциала и деполаризация мембраны снижает сродство токсинов в 30–50 раз [14], не изменяя число участков связывания [7]. Поэтому в равновесных условиях в присутствии высокой концентрации ^{125}I -ДНФА- M_{10} также можно было ожидать детектируемые уровни ковалентной модификации рецепторов неэнергизованных мембран. Действительно, при фотомодификации препаратов плазматических мембран из нервов краба также наблюдалось два компонента с M 78 000 и 51 000, специфично связывающих ^{125}I -ДНФА- M_{10} (рис. 5). Следовательно, наличие

двух компонентов, связывающих токсин скорпиона, характерно для возбудимых мембран и млекопитающих, и ракообразных.

Следует отметить, что в данной работе определены «кажущиеся» значения молекулярных весов мембранных компонентов, причем ошибка измерения составляет ~3000. Поэтому, допуская, что указанные рецепторные компоненты идентичны для всех исследованных мембран, кажущийся молекулярный вес большой субъединицы составляет ~76 000, а малой — 51 000.

Таким образом, из результатов настоящей работы следует, что биологически активный фоточувствительный аналог нейротоксина яда скорпиона специфично связывается с мембранным рецептором, состоящим по крайней мере из двух субъединиц, молекулярные веса которых ориентировочно составляют 76 000 и 51 000. Поскольку, согласно электрофизиологическим данным, ДНФА- M_{10} взаимодействует непосредственно с быстрым натриевым каналом, рецептор нейротоксина скорпиона является его составной частью. Сходство молекулярных весов рецептора токсина скорпиона для возбудимых мембран разных классов животных свидетельствует о структурном подобии их натриевых каналов. Есть все основания полагать, что использование фоточувствительного аналога нейротоксина скорпиона позволит получить существенную информацию о молекулярной организации натриевых каналов возбудимых мембран.

Экспериментальная часть

Токсин M_{10} выделяли из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* [15]. Синтез ДНФА- M_{10} и его последующее радиомаркирование с использованием $Na^{125}I$ (Amersham, Англия) и лактопероксидазы (Boehringer-Mannheim, ФРГ) проводили согласно работе [4]. Удельная радиоактивность ^{125}I -ДНФА- M_{10} составляла 70 Ки/ммоль. Токсин II из яда *Anemonia sulcata* получен в дар от проф. М. Лаздунского (университет Ниццы, Франция) и проф. Л. Бересса (университет г. Киля, ФРГ)*. Синапсомы из мозга крыс выделяли согласно методике [16], а плазматические мембраны из нервов крабов *Paralithodes kamtchatica** — по методу [17]. Клетки нейробластомы клона N-18 A5 [18] получали из Института цитологии АН СССР*.

Концентрацию белковых токсинов в исходных водных растворах определяли аминокислотным анализом гидролизатов этих белков (5,7 н. HCl, 110° С) на анализаторе модель D-500 (Durrum, США). Определение концентрации мембранного белка проводили по методу Лоури [19] с использованием в качестве стандарта БСА (Serva, ФРГ).

Растворы акриламида, бисакриламида (Rio-Rad, США), глицерина и сахарозы (ч.д.а., «Союзреактив», СССР) предварительно пропускали через дауэкс AG 501-X8 (D), 20–50 меш (Bio-Rad, США).

Влияние M_{10} на связывание ^{125}I -ДНФА- M_{10} с синапсомами. Исследование конкуренции ^{125}I -ДНФА- M_{10} с нативным токсином за рецепторы на мембране синапсом проводили при 20° С в инкубационном буфере, содержащем 130 мМ холинхлорид (Serva, ФРГ), 50 мМ HEPES**-трис, рН 7,4 (Pierce, США), 5,5 мМ глюкозу, 0,8 мМ $MgSO_4$, 5,4 мМ KCl (все реактивы марки ос.ч., «Союзреактив», СССР), 0,1% БСА и 1 мкМ ТТХ** (Calbiochem, США). По 0,75 мл суспензии синапсом, содержащей 0,625 мг мембранного белка, инкубировали в темноте с 2,5 пМ ^{125}I -ДНФА- M_{10} и токсином M_{10} (0–3,5 мкМ). Через 30 мин после добавления метки каждый образец

* Авторы выражают глубокую благодарность проф. М. Лаздунскому и проф. Л. Берессу за предоставление токсина анемоны, Т. Н. Игнатовой за предоставление клеток нейробластомы и В. А. Коваленко за приготовление препаратов мембран из нервов краба.

** HEPES — N-2-оксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, ТТХ — тетродоксин.

переносили в кварцевую кювету QS-115 (Gilford, Франция) и освещали 10 мин на приборе ОИ-18 (ЛОМО, СССР) ртутной лампой СВД-120А, пропускающая свет через фильтр БС-6.

Для отделения несвязанного токсина проводили фильтрование аликвот суспензии по 300 мкл через стеклянные фильтры типа GF/F (Whatman, Англия) на приборе FH 224v (HSI, США) при давлении 10–15 мм рт. ст. Фильтры предварительно инкубировали ночь при 4°С в растворе, содержащем 164 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES-трис, pH 7,4, и 1% БСА для уменьшения сорбции метки. Перед нанесением мембран фильтры промывали 3 мл охлажденного до 4°С буфера, содержащего 161,9 мМ холинхлорид, 5 мМ HEPES-трис (pH 7,4), 1,8 мМ CaCl₂, 0,8 мМ MgSO₄, 0,55 мМ глюкозу, 0,54 мМ KCl и 0,1% БСА. Синаптосомы на фильтре промывали 3 раза по 3 мл того же буфера. Радиоактивность фильтров измеряли на гамма-счетчике Ultrogamma (ЛКВ, Швеция) в канале для ¹²⁵I в течение 1 мин.

Для отделения несвязанного ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ использовали также метод высокоскоростного осаждения. Суспензию синаптосом после освещения разбавляли равным объемом инкубационного буфера и центрифугировали 30 мин при 20 000 об/мин, 4°С в роторе SW-50 на центрифуге L5-50 (Beckman, США). Осадок ресуспендировали в 4,5 мл буфера, используемого для промывки фильтров, и мембраны повторно осаждали в тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл воды и измеряли радиоактивность двух аликвот суспензии каждого образца по 95 мкл.

Каждое измерение проводили 2–3 раза. Полученные результаты рассчитывали в виде зависимости вытеснения связанного ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ (в %) от концентрации нативного токсина М₁₀ (рис. 1).

Влияние токсина АТХ II на связывание ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ с синаптосомами исследовали методом фильтрации, как описано выше: 2,5 нМ меченый токсин вводили после добавления в суспензию мембран 0–3,5 мкМ токсина АТХ II (рис. 2).

Анализ специфично модифицируемых компонентов синаптосом. Ковалентную модификацию синаптосом проводили по описанной выше схеме в присутствии $6,6 \cdot 10^{-8}$ М ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀. После освещения суспензию разбавляли 7 мл 5 мМ трис-НСl, pH 7,4, содержащего 5 мМ CaCl₂. Синаптосомы лизировали замораживанием суспензии при –20°С и быстрым оттаиванием при 35°С в термостате. При этом ионы Ca²⁺ и деполаризация мембран способствовали диссоциации несвязанного токсина. Мембраны осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 18 000 об/мин, 4°С в роторе JA-21 на центрифуге JA-21В (Beckman, США). Для удаления ионов Ca²⁺ осадок ресуспендировали в 8 мл 0,32 М сахарозы, содержащей 1 мМ Na₂EDTA и 5 мМ трис-НСl, pH 7,4, и повторно осаждали. Дальнейшее увеличение числа последовательных промывок не приводит к существенному снижению радиоактивности, связанной с мембранами. С другой стороны, при экстракции осадка ацетоном или смесью хлороформа и метанола (2 : 1) в раствор переходит менее 0,2% радиоактивности.

Параллельно проводили контрольный опыт, используя для подавления специфичного связывания ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ 50-кратный избыток токсина М₁₀.

Полученные осадки мембран ресуспендировали в 0,32 М сахарозы, содержащей 5 мМ трис-НСl, pH 7,4, так, чтобы концентрация мембранного белка составляла 4 мг/мл. К полученным образцам добавляли равный объем 125 мМ трис-НСl, pH 6,8, содержащего 20% глицерина, 4 мМ Na₂EDTA, 4% додецилсульфата натрия, 10% β-меркаптоэтанола (Bio-Rad, США) и 0,002% бромфенолового синего (Serva, ФРГ). Для растворения мембран образцы нагревали 5 мин на кипящей водяной бане.

Электрофорез полученных растворов проводили на приборе Bio-Rad 220 (США) в системе Лаеммли [12] в блоках полиакриламидного геля толщиной 1,5 мм. 10% разделяющий гель высотой 9 см содержал 0,375 М трис-НСl, pH 8,8, а 5% концентрирующий гель высотой 1,5 см — 0,125 М

трис-НСl, рН 6,8. В состав обеих гелей входили также 0,1% додецилсульфата натрия, 2 мМ Na₂EDTA и 5% глицерина. В каждую из ячеек геля вносили 150–200 мкг мембранного белка. Электрофорез проводили 1,5 ч при 30 мА (60–70 В), а затем при 50 мА (120–150 В) в течение 3,5–4 ч. Гели фиксировали почь в 10% АсОН, 10% изопропанолом, а затем окрашивали 2–4 ч в том же растворе, содержащем 0,25% гумасси бриллиантового голубого R-250 (Bio-Rad, США). Обескрашивание гелей проводили в фиксирующем растворе в течение 4–6 ч.

Для определения молекулярных весов использовали следующую смесь маркерных белков (в скобках указан молекулярный вес): γ -кристаллин (20 000, Институт белка АН СССР), химотрипсиноген А (25 000), альдолаза (40 000), овалбумин (45 000), каталаза (60 000), БСА (68 000), все — Pierce (США), фосфоорилаза А (94 000, Sigma, США) и β' -субъединица РНК-полимеразы из *E. coli* (165 000, ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР).

Анализ электрофорезграмм мембран. Концентрирующие гели отделяли и разделяющие гели сканировали при 570 нм на спектрофотометре Gifford (Франция), а затем разрезали на кусочки по 2 мм бритвенным слайсером для гелей (модель 120, Bio-Rad, США). Радиоактивность каждого кусочка измеряли 4–6 раз по 1 мин в γ -счетчике. Из найденных усредненных значений радиоактивности каждого кусочка геля индивидуально вычитали предварительно измеренную фоновую радиоактивность вкладышей. Полученный профиль радиоактивности приводили в соответствие с кривой сканирования и затем вычитали профиль радиоактивности контрольного образца. При этом пики радиоактивности, превышающие вместе с доверительным интервалом фоновые значения более чем в 3 раза, принимались за зоны специфично связывающих меченый токсин компонентов мембраны.

Модификация клеток нейробластомы. Через 3 сут после посева клетки нейробластомы клона N-18 А5 снимали со стенок раствором Версеа (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР) и осаждали (700 об/мин, 5 мин) в центрифуге К-23 (Janetzki, ГДР). Осадок ресуспендировали в инкубационном буфере и повторно осаждали в тех же условиях. К осадку клеток добавляли инкубационный буфер до концентрации общего белка 1 мг/мл. Ковалентную модификацию проводили согласно методу, описанному выше. В контрольных опытах для подавления специфичного связывания ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ использовали 2·10⁻⁶ М токсин М₁₀ и 2 мМ СаСl₂. Для отделения несвязанного токсина клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в 10 мл инкубационного буфера, содержащего 2 мМ СаСl₂, и центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Для удаления ионов Са²⁺ клетки промывали 10 мл раствора Версеа. Дальнейшую обработку и электрофоретический анализ проводили по описанной выше схеме.

Модификацию плазматических мембран из нервов краба проводили в 20 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащем 160 мМ холинхлорид, 5 мМ КСl, 0,1% БСА, 1 мМ ТТХ и 1,33·10⁻⁷ М ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀. Концентрация мембранного белка в суспензии составляла 0,84 мг/мл. В контрольном опыте для подавления специфичного связывания меченого токсина к суспензии добавляли 3,3·10⁻⁶ М М₁₀. После инкубации и освещения в условиях, описанных выше, к суспензии добавляли 2 мМ СаСl₂ и мембраны осаждали центрифугированием при 110 000g (45 мин, 4° С). Осадок ресуспендировали в 1 мл 0,32 М сахарозы, содержащей 5 мМ Na₂EDTA и 5 мМ трис-НСl, рН 7,4. К полученной суспензии добавляли 1 мл метанола и 2 мл хлороформа и для разделения фаз смесь центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин в центрифуге К-23. Нижний слой удаляли, не затрагивая пленку белка, расположенную между слоями. К остатку добавляли ~2 мл ацетона до получения однородной фазы. Белок осаждали 5 мин центрифугированием при 5000 об/мин. Осадок растворяли в 62,5 мМ трис-НСl,

pH 6,8, содержащем 2% додецилсульфата натрия, 2 mM Na₂EDTA, 10% глицерина, 5% β-меркаптоэтанола и 0,001% бромфенолового синего. Полученный раствор, содержащий 2 мг мембранного белка/мл, подвергли электрофорезу и дальнейшему анализу по описанной выше схеме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grishin E. V., Soldatov N. M., Soldatova L. N., Ovchinnikov Yu. A. (1979) *Toxicon*, **17**, suppl. 4, 60.
2. Hille B. (1978) *Biophys. J.*, **22**, 283-294.
3. Okamoto H., Takahashi K., Yamashita N. (1977) *Nature*, **266**, 465-467.
4. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А., Можяева Г. Н., Наумов А. П., Зубов А. Н., Нисман Б. Х. (1980) *Биоорганическая химия*, т. 6, 724-730.
5. Chacko G. K. (1979) *J. Membrane Biol.*, **47**, 285-301.
6. Jover E., Martin-Moutot N., Couraud F., Rochat H. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **85**, 377-382.
7. Ray R., Morrow C. S., Catterall W. A. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7307-7313.
8. Béress L., Béress R., Wunderer G. (1975) *FEBS Lett.*, **50**, 311-314.
9. Catterall W. A., Béress L. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7393-7396.
10. Couraud F., Rochat H., Lissitzky S. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1525-1530.
11. Wunderer G. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1193-1201.
12. Laemli U. K., Favre M. (1973) *J. Mol. Biol.*, **80**, 575-599.
13. Hucho F., Stengelin S., Bandini G. (1979) in: *Recent Advances in Receptor Chemistry* (Gualtieri F., Giannella M., Melchiorre C., eds), pp. 37-58, Elsevier /North-Holland Biomed. Press, Amsterdam.
14. Можяева Г. Н., Наумов А. П., Солдатов Н. М., Гришин Е. В. (1979) *Биофизика*, **24**, 235-241.
15. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Шахпаронов М. И., Казаков В. К. (1980) *Биоорганическая химия*, т. 6, 714-723.
16. Abita J.-P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazdunski M. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1838-1844.
17. Гришин Е. В., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Литвинов И. С. (1979) Тезисы докладов I Советско-швейцарского симпозиума «Биологические мембраны. Структура и функция», с. 69, Тбилиси.
18. Беспалова М. А., Нисман Б. Х., Мухина А. П., Игнатова Т. Н., Туманова С. Ю. (1979) *Вестн. ЛГУ*, № 15, вып. 3, 51-54.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Поступила в редакцию
5.II.1980

THE NATURE OF THE MEMBRANE RECEPTORS FOR SCORPION VENOM NEUROTOXIN

GRISHIN E. V., SOLDATOV N. M., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Photoaffinity labeling of excitable membranes has been carried out using a radioactive photosensitive derivative of the scorpion (*Buthus eupeus*) neurotoxin M₁₀. The specific portion of the photoinduced binding of this derivative to membrane receptors constitutes 45% of the total binding. Both native neurotoxin M₁₀ and the sea anemone toxin competitively inhibit reception of the scorpion toxin derivative by rat brain synaptosomes. With the synaptosomes and neuroblastoma cells or crab nerve plasma membranes, the electrophoretic analysis revealed that the covalent toxin-receptor complexes are composed of two protein components having the molecular weights of 76 000 and 51 000.