



УДК 577.112.088.3:595.44-114.52

© 1990 г.

А. Г. Петренко, О. Г. Шамотиенко, И. Н. Суркова,
В. А. Коваленко, Е. В. Гришин

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА НЕЙРОТОКСИНА ПАУКА КАРАКУРТА

1. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО И СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОГО РЕЦЕПТОРА ИЗ МОЗГА БЫКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва

Меченный иодом-125 α -латротоксин из яда среднеазиатского паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* специфично связывается рецептором мембран из коры мозга быка, образуя прочный, медленно диссоциирующий комплекс с $K_d = 1,6 \cdot 10^{-10}$ М. Максимальное количество участков связывания составляет 0,5 пмоль/мг белка. Обратимая диссоциация связанного мембранами токсина наблюдается при обработке растворами с высокой ионной силой и щелочным значением pH. Поликлональные антитела к токсину не вызывают заметного ускорения диссоциации связанного токсина. Лектин из зародышей пшеницы и конканавалин А ингибируют связывание латротоксина с мембранным рецептором. Осуществлена солиubilизация рецептора ионными и неионными детергентами, разработаны методы анализа связывания латротоксина с солиubilизированным рецептором. Показано, что солиubilизированный рецептор сохраняет высокое сродство к токсину, связывающая активность в неионных детергентах весьма стабильна, но критично зависит от присутствия ионов Ca^{2+} . Характер взаимодействия с рядом хроматографических сорбентов предполагает, что рецептор является кислым гликопротеином.

Пресинаптическая мембрана нервных окончаний — сравнительно малоисследованная часть нервных клеток. Этот специализированный участок мембран осуществляет секрецию нейромедиаторов, являющуюся важным звеном передачи нервного импульса. В настоящее время ведется поиск белков, участвующих в выполнении данной функции пресинаптической мембраны [1, 2]. Наиболее перспективный подход в этом направлении заключается в использовании нейротоксинов, специфично воздействующих на секреторную функцию нервного окончания.

Нейротоксины с пресинаптическим действием, т. е. тем или иным путем влияющие на секрецию медиаторов, обнаружены в различных организмах: бактериях [3], змеях [4, 5], морских червях [6], насекомых [7], пауках [8]. С нашей точки зрения, наиболее перспективен для идентификации и выделения пресинаптических белков, участвующих в нейросекреции, нейротоксин из яда паука каракурта рода *Latrodectus* — α -латротоксин [9]. Этот высокомолекулярный белковый токсин (молекулярная масса 118 000) — сильный активатор нейросекреторного процесса в различных синапсах млекопитающих. Латротоксин высокоспецифично связывается с участком на внешней стороне пресинаптической мембраны [10] и вызывает массивный выброс из нервных окончаний таких медиаторов, как ацетилхолин, γ -аминомасляная кислота, норадреналин, серотонин [11]. Действие латротоксина связано с активацией процесса слияния синаптических везикул с активными зонами пресинаптической мембраны. Одновременно подавляется процесс регенерации везикул. Показано, что сам латротоксин способен встраиваться в липидные мембраны и индуцировать образование катион-селективных ионных каналов [12]. Предполагается наличие у латротоксина фузогенной активности [13].

С помощью меченого иодом-125 латротоксина идентифицированы и изучены специфичные мембранные рецепторы из мозга ряда животных и культивируемых секреторных клеток РС-12 [14, 15]. Недавно предприняты первые шаги в направлении очистки рецептора [16] и анализа его функциональной роли путем реконструкции в искусственных мембранных системах [17]. Согласно полученным результатам, рецептор латротоксина может обладать функцией катионного, преимущественно кальциевого, канала, индуцируемого при действии молекул токсина. Получены также данные, указывающие на взаимосвязь рецептора латротоксина с метаболизмом фосфоинозитидов и системой фосфолипидзависимого фосфорилирования [18]. Высказывались гипотезы о связи рецептора латротоксина с системой цитоскелетных элементов первого окончания, регулирующих транспорт синаптических везикул [19]. Дальнейший прогресс в изучении рецептора латротоксина неразрывно связан с более детальным исследованием входящих в его состав компонентов.

Данная статья является первой в серии работ, посвященных изучению белков мембран мозга, связывающих латротоксин. Она включает результаты первых этапов биохимической характеристики рецептора.

Некоторые свойства мембранного рецептора

В настоящей работе в качестве источника для выделения рецептора латротоксина выбрана кора больших полушарий крупного рогатого скота. В мембранной фракции коры мозга, полученной дифференциальным центрифугированием гомогената, содержится около 0,3–0,5 пмоль рецепторных участков для [¹²⁵I]латротоксина на 1 мг мембранного белка. Это в 2–3 раза больше, чем в аналогичной фракции из целого мозга или в мембранах из мозжечка. При 4°С связывание [¹²⁵I]латротоксина с мембранами достигает равновесия за 20 мин.

Константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса составляет $1,6 \cdot 10^{-10}$ М (рис. 1), что соответствует литературным данным [11]. Основное количество (не менее 80%) специфично связанного [¹²⁵I]латротоксина диссоциирует очень медленно. Время диссоциации связанной метки ($t_{1/2}$) после удаления свободного токсина в разбавленной суспензии мембран составляет более 48 ч. Добавление избытка немеченого латротоксина (до 10^{-8} М) увеличивает скорость диссоциации, но и в этом случае $t_{1/2}$ составляет не менее 24 ч. Поликлональные моноспецифичные антитела к латротоксину, добавленные к мембранам после связывания токсина (до 10 мкг/мл), увеличивают скорость диссоциации в сравнительно небольшой степени (около 20%), тогда как преинкубация антител с токсином перед добавлением к мембранам подавляет специфичное связывание практически полностью.

Сложный характер взаимодействия латротоксина с рецептором отражается в существовании ряда веществ, способных модифицировать токсин-рецепторное взаимодействие [15, 20]. Особый интерес представляет поиск эффективных активаторов и ингибиторов связывания латротоксина рецептором, которые могут быть использованы для осуществления аффинной хроматографии рецептора на сорбентах с иммобилизованным токсином.

Существенное влияние на специфическое связывание латротоксина с мембранами коры мозга быка оказывают ионы Ca^{2+} . CaCl_2 в концентрации 0,5–2 мМ повышает связывание [¹²⁵I]латротоксина в 2 раза по сравнению с контролем. На уровень неспецифического связывания ионы Ca^{2+} влияния не оказывают. Добавление комплексонов ионов Ca^{2+} — EDTA или EGTA — в концентрации 4–8 мМ снижает связывание по сравнению с контролем на 30–40%, однако полного подавления связывания даже при более высоких концентрациях EDTA или EGTA в случае мембранного рецептора не наблюдается.

NaCl либо KCl в концентрации 0,1–0,3 М не снижают специфическую рецепцию [¹²⁵I]латротоксина; при более высоких концентрациях

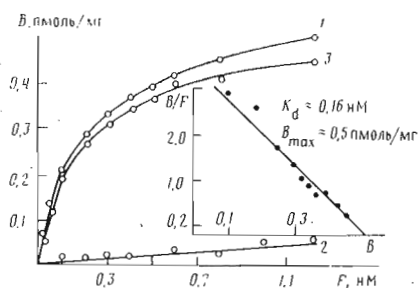


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость уровня связывания $[^{125}\text{I}]$ латротоксина синаптосомальными мембранами из мозга быка от концентрации $[^{125}\text{I}]$ латротоксина: 1 — общее, 2 — неспецифическое, 3 — специфическое связывание. Вставка: рецепция $[^{125}\text{I}]$ латротоксина мембранами в координаатах Скэтчарда. B — количество связанного $[^{125}\text{I}]$ латротоксина, F — концентрация свободного $[^{125}\text{I}]$ латротоксина

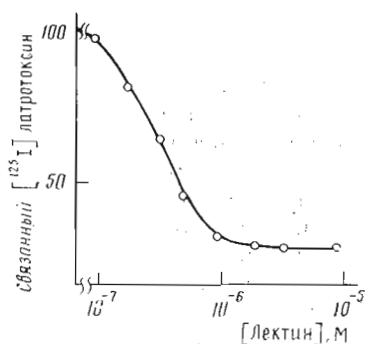


Рис. 2

Рис. 2. Ингибирование специфического связывания $[^{125}\text{I}]$ латротоксина синаптосомальными мембранами из мозга быка в присутствии лектина из зародышей пшеницы

солей (0,7—1 М) наблюдается подавление связывания на 50—60% (в присутствии 2 мМ CaCl_2).

При слабощелочном значении pH (до 8,0) токсин-рецепторный комплекс выдерживает инкубацию в растворах с высокой концентрацией солей, по крайней мере до 2 М NaCl или KCl . При pH 9,5 в присутствии 3 М NaCl наблюдается существенная (более 80%) диссоциация комплекса, которая носит полностью обратимый характер. При возврате к физиологическому составу среды связывающая активность мембран восстанавливается до исходного уровня, а инкубация $[^{125}\text{I}]$ латротоксина в этих диссоциирующих условиях лишь в незначительной степени уменьшает его активность.

При предварительной обработке лектином из зародышей пшеницы нейрональных мембран наблюдается ингибирование рецепции ими $[^{125}\text{I}]$ латротоксина. Максимальная степень ингибирования достигает 70% от контроля, концентрация лектина, при которой наблюдается 50% эффект его действия, составляет $3 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 2). N-Ацетилглюкозамин в концентрации 50 мМ полностью блокирует действие лектина из зародышей пшеницы. С другой стороны, лектин даже в высокой концентрации (до 1 мМ) не влияет на скорость диссоциации токсин-рецепторного комплекса. По всей видимости, лектин не конкурирует с латротоксином за один и тот же центр связывания, а создает стерические затруднения для рецепции токсина.

На связывание латротоксина с мембранами не оказывают влияния суммарные ганглиозиды из мозга быка, которые ингибируют действие пресинаптических нейротоксинов бактериального происхождения: столбнячного и ботулинического токсинов [3].

Рецепторная активность в мембранах необратимо инактивируется при высокой температуре (50° С и выше в течение 15—20 мин), что свидетельствует в пользу белковой природы рецептора латротоксина.

Солюбилизация токсин-рецепторного комплекса

Предварительно возможность солюбилизации рецептора оценивали по извлечению $[^{125}\text{I}]$ латротоксин-рецепторного комплекса из мембран, предполагая, что при обработке детергентами не происходит диссоциации прочно связанного токсина и что солюбилизация комплекса не отличается от солюбилизации свободного рецептора. Основное внимание было уделено анализу солюбилизирующего действия двух распространенных неионных детергентов: луброла РХ и Тритона Х-100. Оба неионных детергента показали близкую эффективность солюбилизации. При концентрации бел-

ка 5 мг/мл в 20 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,5, и концентрации детергентов 0,5–1% в раствор переходит 50–60% связанной токсиновой метки и около 40% белка мембран. Дальнейшее повышение концентрации детергентов не вызывает существенного увеличения степени солиubilизации. Близкая картина наблюдается при солиubilизации мембран, предварительно экстрагированных буферным раствором с 1 М NaCl. Луброльный экстракт мембран, как правило, сильнее опалесцирует.

Для доказательства того, что в детергентных экстрактах извлекаемая радиоактивная метка действительно находится в составе токсин-рецепторного комплекса, а не свободного токсина, был проведен анализ взаимодействия солиubilизированного радиоактивного материала с лектином из зародышей пшеницы, иммобилизованным на сефарозе 4В. Как отмечалось выше, этот лектин подавляет связывание токсина с рецептором, что позволило предположить гликопротеиновую природу рецептора. Латротоксин не является гликопротеином, и его [¹²⁵I]меченое производное не связывается с лектиновым сорбентом. В то же время радиоактивная метка, экстрагированная из мембран 1% Тритоном X-100 или лубролом РХ, способна поглощаться лектин-сефарозой на 60–70% и специфично элюироваться раствором N-ацетилглюкозамина. Результаты экспериментов по взаимодействию солиubilизированного рецептора с лектином из зародышей пшеницы однозначно свидетельствуют о его гликопротеиновой природе. Солиubilизированный токсин-рецепторный комплекс связывается также с конканавалин-А-сефарозой и элюируется 0,2 М метил- α -D-маннозидом.

При солиubilизации комплекса посредством 0,5% дезоксихолата натрия экстрагируется около 80% радиоактивной метки, однако с лектиновым сорбентом связывается всего 40% экстрагированного радиоактивного материала. По-видимому, это обусловлено распадом токсин-рецепторного комплекса в присутствии дезоксихолата натрия. Некоторые указания на возможность диссоциирующего действия пониженных детергентов получены ранее [16].

Методы анализа связывания латротоксина с солиubilизированным рецептором

Наличие быстрого и удобного метода анализа солиubilизированного рецептора — необходимая предпосылка для очистки и характеристики выделяемого рецепторного препарата. Однако большая молекулярная масса токсина и его кислый характер (изоэлектрическая точка равна 5,2 [20]) создают ряд препятствий на пути разработки таких методов. Первое свойство не позволяет эффективно использовать методы отделения связанного токсина, основанные на принципе быстрой гель-фильтрации, второе — использовать ионообменные сорбенты, поскольку рецептор, так же как токсин, является кислым белком (см. далее).

Нами были разработаны три метода анализа связывания [¹²⁵I]латротоксина с солиubilизированным рецептором.

1. Отделение свободного токсина от токсин-рецепторного комплекса с помощью высокоэффективной гель-фильтрации на колонке TSK-4000 SW. Метод дает воспроизводимые результаты, однако пригоден для анализа лишь ограниченного числа образцов.

2. Ультрафильтрация через мембраны XM-300, преимущественно пропускающие молекулы с молекулярной массой не более 300 кДа. Основная масса (~98%) меченого токсина проходит через поры данной мембраны, в то время как токсин-рецепторный комплекс через поры не проникает. Метод значительно менее трудоемок, чем первый, и пригоден для серийных анализов. К недостаткам этого метода относится невысокая воспроизводимость (особенно при повторном использовании фильтров), что затрудняет получение количественных результатов.

3. Твердофазный метод, использующий сорбционные свойства нитроцеллюлозы. Метод является альтернативой ранее предложенного твердофазного метода, в котором рецептор сорбируется в поливинилхлоридных плашках, покрытых полилизинном [16]. Преимущество нитроцеллюлозы

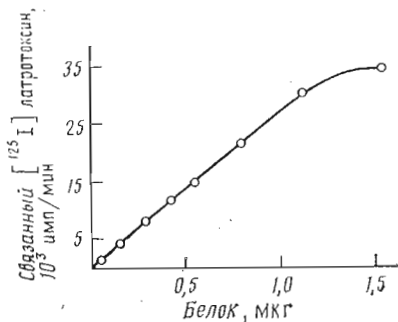


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость специфического связывания [^{125}I]латротоксина солибилизирующим рецептором, сорбированным на нитроцеллюлозе, от количества внесенного белка

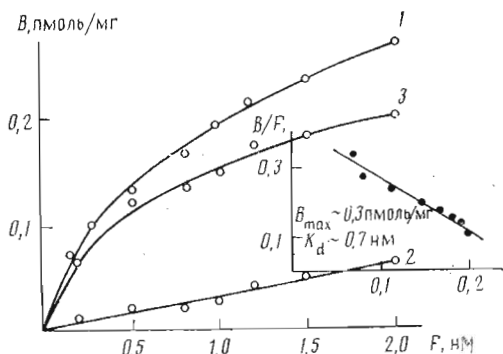


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость уровня связывания [^{125}I]латротоксина тритоновым экстрактом синапсомальных мембран от концентрации [^{125}I]латротоксина. Вставка: рецепция [^{125}I]латротоксина в координатах Скэтчарда. Обозначения как на рис. 1

в данном случае заключается в сорбции всего внесенного анализируемого белка из очень разбавленных растворов, что не очевидно для плашек, покрытых полилизинном. Специальные эксперименты показали, что на сорбцию рецептора нитроцеллюлозой не влияет Тритон X-100 (по крайней мере до 0,1%) и соли (по крайней мере до 1 М). Фоновое связывание [^{125}I]латротоксина нитроцеллюлозой невелико и обычно не превышает 0,5%. В каждом случае необходимы специальные эксперименты для определения области линейной зависимости связывания [^{125}I]латротоксина от количества внесенного белка (рис. 3). Метод характеризуется высокой воспроизводимостью, однако пока остается не вполне ясным, все ли сорбированные на нитроцеллюлозе молекулы активного рецептора способны связывать латротоксин.

При анализе связывания латротоксина с солибилизированными мембранами данным методом и ультрафильтрацией через мембраны ХМ-300 получены близкие результаты. Твердофазный метод использовали в качестве основного количественного метода оценки связывания [^{125}I]латротоксина с солибилизированным рецептором.

Свойства солибилизованного рецептора

Солибилизация мембран неионным детергентом тритоном X-100 не приводит к большому изменению сродства токсина к рецептору. Константы диссоциации мембраносвязанного и солибилизованного токсин-рецепторного комплексов (рис. 4) очень близки — соответственно $1,6 \cdot 10^{-10}$ и $7 \cdot 10^{-10}$ М. Количество участков связывания латротоксина, определенное твердофазным методом, немного занижено, что, как указывалось выше, может быть связано с ограничениями самого метода анализа. Связывающая активность солибилизованного рецептора весьма стабильна. Так, мембраны, солибилизированные тритоном X-100 в присутствии 2 мМ EDTA и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида, сохраняют способность связываться с [^{125}I]токсидом на постоянном уровне по крайней мере в течение 2 нед при 10° С и не менее 12 ч при комнатной температуре.

Выше отмечалось, что токсин-рецепторный комплекс является гликопротеином, взаимодействующим с лектином из зародышей пшеницы и с конканавалином А. Хроматография солибилизованных мембран на лектиновых сорбентах с последующим анализом связывания [^{125}I]латротоксина еще раз подтвердила гликопротеиновую природу рецептора. Так, при хроматографии солибилизованных мембран на иммобилизованном лектине зародышей пшеницы специфично сорбируется не менее 80%

рецептора и около 3–4% общего белка. Рецептор может быть далее элюирован буферными растворами, содержащими N-ацетилглюкозамин, причем выход очищенного таким образом рецептора не очень высок (20–30%) и зависит от ионной силы элюирующего буфера.

Солюбилизованный рецептор частично (на 40–50%) сорбируется на анионообменнике DEAE-Toyorearl 650 M при концентрации KCl 0,15 M в 20 mM трис-HCl-буфере, pH 7,5. В этих условиях с ионообменным гелем связывается около 20% белка. Сорбированный рецептор элюируется при повышении концентрации KCl до 0,4 M. При более низкой ионной силе возможна практически полная сорбция рецептора на анионообменнике, однако при этом не удается достичь какой-либо очистки рецептора. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мембранный рецептор латротоксина может быть солюбилизован в активной форме, а для его частичной очистки возможно применение лектинспецифичной и анионообменной хроматографии.

Экспериментальная часть

Материалы. Лиофилизированный яд паука *Latrodectus mactans tetricim-guttatus* поставлялся Ашхабадским и Алма-Атинским зоокомбинатами. Мозг крупного рогатого скота получали на мясокомбинате в течение 1 ч после забоя животных. Мозг транспортировали на льду и сразу же после доставки проводили препарирование коркового слоя больших полушарий. Кора использовалась сразу или замораживалась и хранилась при -70°C до 4 мес.

Лектин зародышей пшеницы выделен по методу [21] и иммобилизован на активированной бромцианом сефарозе 4B (Pharmacia, Швеция) с плотностью 5–6 мг/мл геля.

Источники основных химических реагентов и способы их дополнительной очистки указаны в работах [22, 23].

Выделение латротоксина проводили на основе ранее предложенного метода [20] с небольшими модификациями. Вместо второй хроматографической стадии с рециклизацией использовали ВЭЖХ на колонке TSK 4000 SWG (Toyo Soda, Япония), уравновешенной 0,2 M натрий-фосфатным буфером, pH 7,1. Концентрацию латротоксина рассчитывали, исходя из того, что $A_{280/1\text{ см}}$, равное 1,2 ОЕ, соответствует 1 мг/мл.

Поликлональные антитела к латротоксину выделяли из сыворотки кроликов, иммунизированных латротоксином (20 мкг в полном адьюванте Фрейнда) подкожно 3–4 раза с интервалом в 2 нед. Для выделения моноспецифичных антител использовали всю сыворотку или сульфат-аммониевую фракцию (35% насыщения). 40 мл сыворотки или эквивалентное количество сульфат-аммониевой фракции в 10 mM натрий-фосфатном буфере (pH 7,2) с 150 mM NaCl смешивали 60–90 мин при 20°C с 5–8 мл аффинного сорбента, полученного иммобилизацией латротоксина на активированной CN-сефарозе (Pharmacia, Швеция) с плотностью 0,5 мг токсина/мл геля. Сорбент отмывали тем же буфером и антитела элюировали раствором, содержащим 0,1 M глицин-HCl, pH 2,4. Элюат на выходе с колонки нейтрализовали путем непрерывной подачи 1,5 M трис-HCl, pH 8,8, и диализовали против 10 mM натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, со 150 mM NaCl. Выход аффинно-очищенных антител составлял 0,1–0,2 мг из 1 мл исходной сыворотки.

Иодирование латротоксина изотопом ^{125}I осуществляли хлораминовым методом [20]. Иодирование проводили в буфере, содержащем 0,25 M трис-HCl, pH 8,2. Для отделения свободного иода и низкомолекулярных компонентов реакционной смеси использовали быструю гель-фильтрацию центрифугированием на колонке с 2 мл биогеля Р-6 (100–200 меш) (Bio-Rad, США). Удельная радиоактивность препаратов составляла 200–1000 Ки/ммоль. Иодированный токсин использовали без разбавления или разбавляли в 3–10 раз немеченым токсином. Отсутствие нековалентно связанного ^{125}I в препаратах проверялось осаждением белка трихлоруксусной кислотой (7,5%) с дезоксихолатом натрия (0,015%) [24]. Доля

активного меченого токсина определялась сорбцией избытком мембран. Обычно в свеженодированном препарате доля активного токсина составляла не менее 80%, а кислотой осаждалось более 90% радиоактивной метки.

Выделение мембран. Кору мозга быка гомогенизировали с помощью пожевого гомогенизатора Уоринга (Cole-Parmer, США) в 10 объемах раствора, содержащего 0,32 М сахарозу, 10 мМ трис-НСl (рН 7,8), 2 мМ EDTA и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид. Гомогенат центрифугировали при 15 000g 40 мин. Осадок (без окрашенного нижнего слоя) подвергали осмотическому шоку путем суспендирования в гомогенизаторе Поттера в 20 объемах (от объема исходной ткани) раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,7), 2 мМ EDTA и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид. Суспензию перемешивали 15 мин на магнитной мешалке, после чего мембраны осаждали центрифугированием при 15 000g в течение 1 ч. Мембраны суспендировали в том же буфере, но без EDTA.

Солюбилизацию мембран проводили путем добавления к полученной суспензии мембран 20% (по весу) раствора детергента до необходимой концентрации. Суспензию перемешивали 20 мин при 4°С на магнитной мешалке, после чего несолубилизованный материал осаждали центрифугированием при 100 000g 60 мин либо при 58 000g 2 ч.

Анализ связывания меченого латротоксина мембранами. К суспензии мембран (25–100 мкг) белка в 200–500 мкл буферного раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 100 мМ КСl и 2 мМ СаСl₂, добавляли 5–20 мкл раствора [¹²⁵I]латротоксина. Конечная концентрация токсина составляла 0,05–0,5 нМ. Для определения неспецифического связывания метки в контрольные пробирки предварительно вносили 50-кратный избыток немеченого латротоксина. Смеси инкубировали 20 мин при 4°С, после чего центрифугировали 10 мин на настольной центрифуге, модель 5413 (Eppendorf, ФРГ). Супернатант тщательно отсасывали. В осадке, а также в супернатанте (в случае определения константы диссоциации) измеряли радиоактивность на гамма-счетчике Ultrogamma (LKB, Швеция) в течение 1 мин.

Для анализа влияния солей, рН, лектинов, антител и других веществ на диссоциацию комплекса осадок мембран, содержащих связанный [¹²⁵I]латротоксин, суспендировали в 0,5 мл необходимого раствора и после инкубации осаждали повторно.

Анализ связывания токсина с солюбилизованным рецептором проводили с использованием гель-фильтрации, ультрафильтрации и твердофазного метода. *Гель-фильтрация* образца солюбилизованных мембран с добавленным [¹²⁵I]латротоксином проводили на колонке TSK 4000 SW в буфере, содержащем 0,1 М трис-НСl, 2 мМ СаСl₂ и 0,1% луброла РХ. Скорость элюции 400 мкл/мин, объем фракций 200 мкл. В собранных фракциях просчитывали радиоактивность, в контрольных экспериментах в анализируемую смесь добавляли 50-кратный избыток немеченого латротоксина.

Анализ связывания методом ультрафильтрации проводили на мембранах XM-300 (Amicon, США) диаметром 25 мм. На влажные мембраны, поджимаемые за счет вакуума к гладкой поверхности из пористого стекла, наносимые 100–200 мкл анализируемого образца (не более 50 мкг белка). Фильтрация обычно протекала 2–5 мин, после чего на фильтры для промывки наслаивали 200 мкл буферного раствора. После просасывания промывочного раствора фильтры помещали в стеклянные стаканчики и задержанный белок смывали на встряхивающей платформе в течение 5 мин при комнатной температуре 3 порциями по 0,7 мл 2,5% раствора додецилсульфата натрия. Радиоактивность просчитывали в объединенных смывах. Фильтры, как правило, использовали многократно.

Для определения связывания латротоксина *твердофазным методом* небольшие аликвоты (до 20 мкл) анализируемых растворов наносили на квадратички нитроцеллюлозы BA-85 (Schleicher and Schüll, ФРГ) с площадью 1 см². Все процедуры проводились в 24-луночных планшетах для клеточных культур. После сорбции белка нитроцеллюлозные квадратички

промывали 20 мМ трис-НСI-буфером, рН 7,5, с 0,1 М КСI и 2 мМ СаСI₂ и инкубировали 30–60 мин в этом же буфере, содержащем 1,5% бычьего сывороточного альбумина, для блокировки остаточных центров связывания. Меченый и немеченый токсин вносили в буфере того же состава и инкубировали 30 мин, после чего полоски промывали указанным раствором 3 раза по 1 мл в течение 20 мин. Радиоактивность полосок просчитывали в гамма-счетчике. В экспериментах по определению констант диссоциации оценивали распределение всей внесенной радиоактивности: связанной с нитроцеллюлозой и оставшейся в несвязанном виде, включая радиоактивность, удаляемую при промывке.

Хроматография солибилизированных мембран на сефарозе 4В с иммобилизованным лектином из зародышей пшеницы. Около 40 мл детергентного экстракта мембран, содержащего 0,1 М КСI и 2 мМ СаСI₂, наносили на колонку с 10 мл сефарозы со скоростью 10 мл/ч. После промывки сорбента буфером с тем же ионным составом белки элюировали добавлением в раствор N-ацетилглюкозамина до концентрации 50 мМ и КСI до 0,4 М.

Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке с 20 мл DEAE-Toyorearl 650M (Toyo Soda, Япония). Предварительно к экстракту солибилизированных мембран добавляли раствор КСI до концентрации 0,15 М. После промывки сорбента буфером с той же концентрацией солей элюцию проводили повышением концентрации КСI до 0,4 М.

Белок определяли модифицированным [22] методом Лоури.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reichardt L. F., Kelly R. B. // Ann. Rev. Biochem. 1983. V. 32. P. 871–926.
2. Brown D. A. // Trends NeuroSci. 1986. V. 9. № 10. P. 468–470.
3. Simpson L. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1986. V. 26. P. 427–454.
4. Aird S. D., Kaiser I. I., Levis R. V., Kruggel W. G. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 25. P. 7054–7058.
5. Rugolo M., Dolly J. O., Nicholls D. G. // Biochem. J. 1986. V. 233. № 2. P. 519–523.
6. Bon C., Saliou B., Thieffry M., Manaranche R. // Neurochem. Int. 1985. V. 7. № 1. P. 63–75.
7. Crosland R. D., Hsiao T. H., McClure W. D. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 7. P. 734–741.
8. Frontali N., Ceccarelli B., Gorio A., Mauro A., Siekevitz P., Tzeng M.-C., Hurlbut W. P. // J. Cell Biol. 1976. V. 68. № 3. P. 462–479.
9. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharm. Sci. 1986. V. 7. P. 151–155.
10. Valtorta F., Madeddu L., Meldolesi J., Ceccarelli B. // J. Cell Biol. 1984. V. 99. № 1. P. 124–132.
11. Hurlbut W. P., Ceccarelli B. // Neurotoxins, tools in neurobiology/Eds Ceccarelli B., Clementi F. New York: Raven Press, 1979. P. 87–115.
12. Finkelstein A., Rubin L. L., Tzeng M.-C. // Science. 1976. V. 193. № 4257. P. 1009–1011.
13. Sokolov Y. V., Chanturia A. N., Lishko V. K. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 900. № 2. P. 295–299.
14. Meldolesi J. // Investigation of membrane located receptors/Eds Ried E., Cook G. M. W., Moore D. J. N. Y.: Plenum Publ., 1984. P. 469–479.
15. Meldolesi J., Huttner W. B., Tsien R. Y., Pozzan T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 2. P. 620–624.
16. Scheer H., Meldolesi J. // EMBO J. 1985. V. 4. № 2. P. 323–327.
17. Scheer H., Prestipino G., Meldolesi J. // EMBO J. 1986. V. 5. № 10. P. 2643–2648.
18. Vicentini L. M., Meldolesi J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 121. № 2. P. 538–544.
19. Tzeng M.-C., Cohen R. S., Siekevitz P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 8. P. 4016–4020.
20. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71–80.
21. Bassett E. W. // Prep. Biochem. 1978. V. 5. № 5/6. P. 461–477.
22. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1813–1827.
23. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1828–1837.
24. Bensadoun A., Weinstein D. // Anal. Biochem. 1976. V. 70. № 1. P. 241–250.

Поступила в редакцию
12.V.1989

A. G. PETRENKO, O. G. SHAMOTIENKO, I. N. SURKOVA,
V. A. KOVALENKO, E. V. GRISHIN

STUDIES ON THE RECEPTOR FOR NEUROTOXIN FROM BLACK
WIDOW SPIDER VENOM. I. CHARACTERISATION OF MEMBRANE-BOUND
AND SOLUBILIZED RECEPTOR STATES FROM BOVINE BRAIN

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

Iodine-125 labelled α -latrotoxin from the venom of Central Asia black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus* binds specifically to the bovine brain membrane receptor producing a stable slowly dissociating complex with $K_d=1.6 \cdot 10^{-10}$ M and $B_{max}=0.5$ pmol/mg protein. Treatment of the complex with alkaline high-salt buffer induces reversible dissociation of the bound toxin. The antitoxin polyclonal antibody does not increase the dissociation rate of the bound toxin. Wheat germ lectin as well as concanavalin A inhibit the toxin binding to the membrane receptor. The receptor is solubilized with ionic and non-ionic detergents, and methods of latrotoxin binding assay are developed. The solubilized receptor is shown to retain high affinity to toxin, its binding activity being stable but critically dependent on the presence of calcium ions. Chromatographic properties of the receptor suggest its glycoprotein nature.