



УДК 577.112.083.3 : 595.44-114.52

© 1990 г.

*А. Г. Петренко, И. Н. Суркова, О. Г. Шамотинско,
В. А. Коваленко, В. Н. Красноперов, Л. А. Третьяков*,
Ю. А. Ушкарев, Е. В. Гришин*

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА НЕЙРОТОКСИНА ПАУКА КАРАКУРТА

II.* ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРА ИЗ МЕМБРАН МОЗГА БЫКА

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;
* Институт биохимии им. В. И. Палладина АН УССР, Киев*

Получены и исследованы биоспецифичные сорбенты для выделения рецептора латротоксина. Показано, что связывание рецепторных компонентов, солибилизированных из мембран коры мозга быка, с иммобилизованным токсином критично зависит от наличия ионов кальция, а также ионной силы раствора. Разработан метод полупрепаративного выделения высокоактивного очищенного рецептора из солибилизированных тритоном X-100 мембран (удельное связывание [125 I]латротоксина 0,9 нмоль/мг белка, $K_d=9 \cdot 10^{-10}$ М). Показано, что связывающая активность выделенного рецептора подавляется при нагревании, а также при действии протеиназ и денатурирующих агентов. По данным электрофоретического анализа в присутствии SDS, в состав рецептора входят белковые компоненты молекулярной массы 200, 160, 79 и 43 кДа, причем компоненты 200 и 160 кДа являются гликопротеинами.

Наличие в мозге млекопитающих специфичного рецептора α -латротоксина впервые обнаружено около 10 лет назад [2]. С помощью иммуноцитохимических методов установлено, что рецепторные участки локализованы на наружной стороне пресинаптической мембраны нервного окончания [3]. В экспериментах с препаратами синапсом найдена прямая корреляция между связыванием токсина и стимуляцией выброса нейромедиаторов [4]. В 1985 г. сообщено о солибилизации рецептора и возможности использования аффинной хроматографии для выделения рецепторных молекул. Показано, что при хроматографии солибилизированных мембран из мозга быка на иммобилизованном латротоксине специфично сорбируются белки с молекулярной массой 200 и 54 кДа, причем первый после восстановления дисульфидных связей образует полипептиды с молекулярной массой около 66 кДа [5]. Полученные рецепторные препараты использованы для реконструкции латротоксинзависимых кальциевых каналов в бислойных липидных мембранах и липосомах [6]. Согласно другим данным, рецептор латротоксина в синапсоммах из мозга крыс обладает молекулярной массой около 95 кДа [7]. Однако, поскольку эти работы носили аналитический характер, окончательный вывод о молекулярных характеристиках рецептора пока сделать сложно.

Ранее была показана возможность использования ионообменной и лектинспецифичной хроматографии для частичной очистки рецептора латротоксина [1]. Настоящая работа посвящена дальнейшему исследованию путей очистки рецептора, описанию полупрепаративного метода его выделения, а также характеристике токсинсвязывающих свойств и белкового состава полученных препаратов очищенного рецептора.

* Сообщение I см. [1].

Выделение рецептора

Ввиду низкого содержания рецептора латротоксина в мембранах коры мозга (0,3–0,5 пмоль/мг белка) наиболее эффективным способом его очистки и препаративной наработки представляется биоспецифическая хроматография на сорбентах с иммобилизованным латротоксином. Однако на начальном этапе препаративного выделения рецептора возникает необходимость переработки больших объемов (1–2 л) солиобилизованных мембран. Поэтому для уменьшения объемов препаратов, наносимых на аффинный сорбент, а также для возможно более полного удаления посторонних белков проводили предварительную очистку рецептора двумя хроматографическими стадиями. Исходя из свойств солиобилизованного рецептора [1] нами были выбраны анионообменная и лектинспецифичная хроматографии (табл. 1).

Нанесение солиобилизованных мембран на ионообменный сорбент DEAE-Toyorearl 650M и последующую промывку геля проводили в буфере с 0,15 М KCl. Следует отметить, что 30–40% исходной рецепторной активности обнаруживалось в не сорбированном на геле материале, и это не изменялось даже при понижении ионной силы до 75 мМ. Более высокие концентрации соли, начиная с 0,2 М, вызывали десорбцию рецептора. Эти данные позволяют предположить наличие по крайней мере двух форм рецептора, различающихся по заряду молекул. Сорбция рецептора на геле не зависела от скорости нанесения солиобилизованного препарата мембран (200–800 мл/ч на 400 мл геля).

При хроматографировании материала, элюированного с DEAE-сорбента, на сефарозе с иммобилизованным лектином из зародышей пшеницы было обнаружено, что на геле сорбируется, как правило, 65–70% количества наносимого рецептора. Для более полной элюции рецептора с

Таблица 1

Выделение рецептора латротоксина трехстадийным методом

Этап выделения	Количество белка		Рецепторная активность		Удельная связывающая активность, пмоль */мг
	мг	%	пмоль *	%	
Мембраны	6500	100	2100	100	0,32
Тритонный экстракт	2800	43	840	40	0,3
Ионообменная хроматография	560	8,6	420	20	0,75
Лектинспецифичная хроматография	100	1,5	300	14	3
Иммуноспецифичная хроматография	0,25	0,004	100	5	400

* Приведено количество [¹²⁵I]латротоксина, связываемого рецептором.

Таблица 2

Выделение рецептора аффинной хроматографией на латротоксин-сефарозе

Этап выделения	Количество белка		Рецепторная активность		Удельная связывающая активность, пмоль */мг
	мг	%	пмоль *	%	
Мембраны	6500	100	2100	100	0,32
Тритонный экстракт	2800	43	840	40	0,3
1 М KCl/10 мМ EDTA элюат	0,4	0,006	240	12	600

* Приведено количество [¹²⁵I]латротоксина, связываемого рецептором.

лектин-сефарозы в элюирующий буфер необходимо было включить 0,4 М КСl. Две последовательные хроматографические стадии были достаточно эффективны как для частичной очистки рецептора (в 10–15 раз), так и для более чем 10-кратного уменьшения объема препарата (табл. 1).

Дальнейшее выделение рецептора было основано на использовании иммуносорбента, полученного путем ковалентной сшивки моноспецифичных поликлональных антител к латротоксину с белок-А-сефарозой. Ранее нами было показано, что антитела к латротоксину не усиливают существенно диссоциацию комплекса [125 I]латротоксин–рецептор [1]. Полученный на основе антител иммуносорбент способен связывать как свободный иодированный токсин, так и солюбилизированный комплекс [125 I]латротоксин–рецептор (75% радиоактивной метки в течение 3 ч). Связь латротоксин–антитело более прочная, чем связь латротоксин–рецептор (при обработке комплекса иммуносорбента с [125 I]латротоксином буфером, содержащим 3 М NaCl, 50 мМ этанолами, рН 9,5, в течение 3 ч диссоциирует не более 5% токсина). Поэтому после связывания токсин-рецепторного комплекса с иммуносорбентом возможна элюция рецептора в условиях, разрушающих токсин-рецепторный комплекс, но при которых латротоксин остается связанным с иммобилизованными антителами.

Перед нанесением на иммуносорбент к препарату частично очищенного рецептора добавляли латротоксин в количестве, приблизительно соответствующем активности содержащегося в препарате рецептора. После инкубации полученного раствора с сорбентом проводили промывку и элюцию рецептора в условиях, когда токсин остается связанным с гелем. При последующих использованиях аффинного сорбента количество латротоксина, добавляемого к препарату рецептора, снижали вплоть до его полного исключения. Такой иммуносорбент, насыщенный ориентированно-связанным латротоксином, служит в дальнейшем уже как высокеемкий сорбент, способный специфично связывать рецептор. Емкость его в 2–3 раза выше, чем у сорбента, полученного путем ковалентной сшивки латротоксина с иммуносорбентом по методу, предложенному ранее [5]. Возможно, это объясняется тем, что при осуществлении методики [5] часть токсина связывается с антителами по детерминантам, участвующим во взаимодействии с рецептором, и после ковалентной сшивки уже неспособна взаимодействовать с рецептором.

Результаты анализа отдельных стадий выделения позволили предположить, что некоторые рецепторные белки теряются в процессе выделения. Для проверки этого, а также для максимального ускорения процесса выделения рецептора проводили также в одну стадию, непосредственно наноса солюбилизированные мембраны на аффинный сорбент. В этом случае сорбент получали иммобилизацией латротоксина на BrCN-активированной сефарозе. Связывающая емкость такого сорбента меньше, чем у иммуносорбента с аналогичным количеством нековалентно связанного токсина, тем не менее он достаточно эффективен (табл. 2). В целом анализ разных аффинных сорбентов позволяет предположить, что сродство латротоксина к рецептору мало зависит от способа его иммобилизации. Имеющиеся отличия касаются в основном емкости и неспецифического фона сорбентов.

Важным условием успешного проведения аффинной хроматографии является правильный выбор элюирующего агента. Отсутствие низкомолекулярного лиганда, конкурирующего с латротоксином за связывание с рецептором, и невозможность использовать токсин для элюции рецептора с аффинного сорбента делают необходимым поиск альтернативных способов десорбции. При разработке способа элюции исходили из данных по влиянию ионной силы на диссоциацию комплекса [125 I]латротоксин–рецептор и критической зависимости специфического связывания [125 I]латротоксин солюбилизированным рецептором от присутствия ионов кальция. Повышение ионной силы среды в отсутствие ионов кальция приводит к быстрому обратимому распаду комплекса [125 I]латротоксин–рецептор (рис. 1).

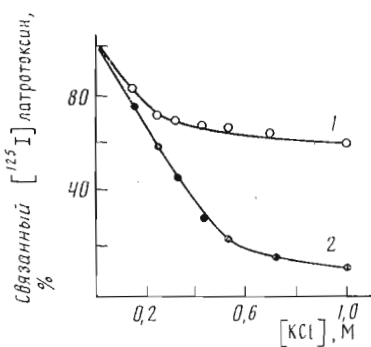


Рис. 1

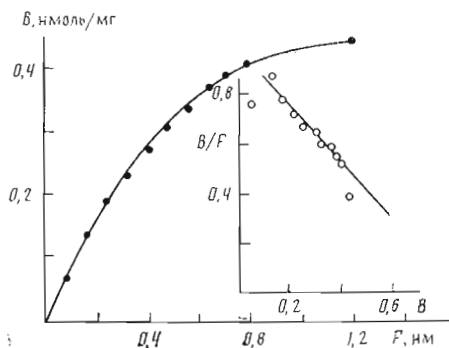


Рис. 2

Рис. 1. Влияние концентрации KCl на степень диссоциации комплекса солиubilизированного рецептора с $[^{125}\text{I}]$ латротоксина в присутствии 2 мМ CaCl_2 (1) и 5 мМ EDTA (2)

Рис. 2. Зависимость уровня специфического связывания $[^{125}\text{I}]$ латротоксина очищенным рецептором от концентрации $[^{125}\text{I}]$ латротоксина. Вставка: рецепция $[^{125}\text{I}]$ латротоксина очищенным рецептором в координатах Скэтчарда; B — количество связанного $[^{125}\text{I}]$ латротоксина; F — концентрация свободного $[^{125}\text{I}]$ латротоксина

Рис. 3. Температурная инактивация $[^{125}\text{I}]$ латротоксинсвязывающей активности очищенного рецептора

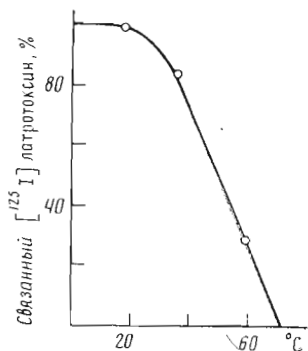


Рис. 3

Следует отметить, что мембраносвязанный и солиubilизированный рецепторы заметно различаются в устойчивости токсин-рецепторного комплекса к диссоциирующему воздействию ионной силы. Существенное усиление диссоциации связанного с мембранами токсина наблюдается при высоких концентрациях солей (1–3 М) в щелочных условиях ($\text{pH} > 9,5$) [4], тогда как в случае солиubilизированного рецептора диссоциация токсина в отсутствие ионов Ca^{2+} уже заметна при 0,2 М концентрации KCl. При использовании элюирующего раствора, содержащего 1 М KCl и 10 мМ EDTA, полная диссоциация токсин-рецепторного комплекса протекает в течение 15 мин. После десорбции рецептора в таких условиях обработка аффинных сорбентов 2% SDS и последующий анализ показали, что на них остаются лишь следовые количества белка.

Эти данные показывают, что элюция рецептора может быть осуществлена в мягких условиях без использования мочевины, как предложено в [5]. Нами найдено, что обработка очищенного рецептора в течение 1 ч при 4°C 8 М мочевиной или 4 М гуанидингидрохлоридом вызывает практически полную необратимую потерю им токсинсвязывающей активности. Обработка свободного $[^{125}\text{I}]$ латротоксина 8 М мочевиной в течение 1 ч при 4°C также приводит к его полной инактивации.

Исследование связывающей активности выделенного рецептора

Полученный в результате как трех-, так и одностадийного метода очистки рецептор обладает способностью связывать $[^{125}\text{I}]$ латротоксин после диализа против буферов с низкой ионной силой в присутствии ионов кальция при pH 7–8. Для анализа токсинсвязывающей активности препаратов рецептора использовали метод сорбции на нитроцеллюлозе, описанный ранее [4].

Согласно полученным результатам (рис. 2), параметры связывания очищенного рецептора характеризуются значением константы диссоциации $K_d = 9 \cdot 10^{-10}$ М, и максимальным количеством участков связывания ($B_{\text{max}} = 0,9$ нмоль/мг белка). График Скэтчарда имеет характер прямой

Влияние ферментов на латротоксинсвязывающую активность очищенного рецептора

Фермент	Весовое соотношение фермент : рецептор	[¹²⁵ I]латротоксинсвязывающая активность, %	Фермент	Весовое соотношение фермент : рецептор	[¹²⁵ I]латротоксинсвязывающая активность, %
Трипсин	0	100	Протеиназа V8	0	100
	1 : 100	60-70		1 : 40	80-90
	1 : 50	40-50		1 : 20	60-70
	1 : 20	10-20			
	1 : 10	0			
Термолизин	0	100	Нейраминидаза	0	100
	1 : 40	80-90		1 : 20	100
	1 : 20	60-70		1 : 10	100

линии, что свидетельствует о наличии участков связывания с одинаковым средством к латротоксину. Систематический анализ удельного связывания [¹²⁵I]латротоксина очищенным рецептором давал величины в интервале 0,5-0,8 нмоль/мг белка. Причины разбросов окончательно неясны. Возможно, одна из причин — протеолиз связывающего компонента в ходе очистки рецептора.

Связывающая активность очищенного рецептора весьма стабильна, и при 4° С связывание [¹²⁵I]латротоксина сохраняется на постоянном уровне более 2 нед. При 20° С рецептор сохраняет исходную активность в течение по крайней мере 10 ч. При повышенных температурах происходит необратимая инактивация рецептора (рис. 3). Проведение трех циклов замораживания-оттаивания заметно не сказывается на активности рецептора. Полное подавление рецепторной активности наблюдалось при действии 1% SDS либо 4 М гуанидин-НСl. Как и в случае с мембраносвязанным рецептором [1], лектин зародышей пшеницы способен ингибировать связывание [¹²⁵I]латротоксина очищенным рецептором с $K_i = 3 \cdot 10^{-7}$ М.

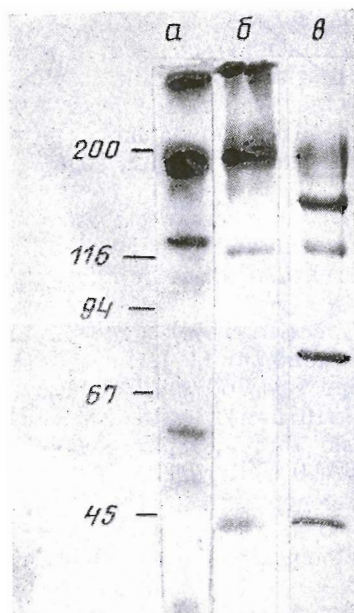
Связывающая активность очищенного рецептора уменьшается в присутствии протеиназ (табл. 3). Обработка очищенного рецептора нейраминидазой не вызывает его инактивации, однако приводит к исчезновению средства к лектину зародышей пшеницы.

Совокупность полученных результатов позволяет предположить, что полученный препарат представляет собой очищенную солюбилизованную форму мембранного рецептора латротоксина, который имеет гликопротеиновую природу.

Белковый состав препаратов выделенного рецептора

Относительно большие количества (несколько сотен мкг) полученного очищенного препарата рецептора латротоксина позволили более подробно, чем ранее [5, 7], провести его электрофоретический анализ. Анализ нескольких десятков белковых препаратов, полученных при трехстадийной схеме выделения, позволил сделать вывод, что наиболее характерный белковый компонент, присутствующий практически во всех препаратах, мигрирует диффузной полосой и обладает молекулярной массой ~200 кДа. В некоторых препаратах также обнаруживались белки с молекулярными массами около 120 (по-видимому, примесь латротоксина, десорбированного с иммунного сорбента), 79, 66, 55, 43 кДа, а также ряд мнорных компонентов, вероятно, являющихся неспецифичным фоном колодки, количество которых не коррелировало со связывающей активностью очищенного рецептора. Фоновый набор белков сильно возрастал при уменьшении времени отмывки аффинного сорбента. Контроль-

Рис. 4. Электрофоретический анализ белкового состава очищенного рецептора: а, б — выделенного трехстадийным методом; в — выделенного аффинной хроматографией на латротоксин-сефарозе. Приведены позиции белков-маркеров с молекулярной массой, выраженной в кДа



ные эксперименты по проверке специфичности аффинной хроматографии показали, что в отсутствие латротоксина белок, обладающий рецепторной активностью, на иммуносорбенте не задерживается, количество белка, элюируемого буфером с 1 М КСl и 10 мМ EDTA, меньше 20% от количества белка, элюируемого с сорбента, содержащего иммобилизованный токсин, а в получаемом препарате отсутствуют основные белковые компоненты рецептора, перечисленные выше.

В случае одностадийной схемы выделения с использованием латротоксин-сефарозы белковый состав получаемого препарата существенно стабильнее и представляет собой набор белков с молекулярной массой 200, 160, 79, 43 и двух близких минорных компонентов около 120 кДа (рис. 4). Поскольку данный белковый состав рецептора сохраняется и при его выделении в присутствии ряда ингибиторов протеиназ (0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 1 мМ о-фенантролина, 5 мкг/мл пепстатина и 10 мкг/мл лейпептина), а удельная связывающая активность очищенного рецептора составляет ~0,6–0,8 нмоль/мг белка, есть основания полагать, что он отражает истинный состав комплекса рецептора латротоксина или по крайней мере его части. Остается открытым вопрос: какая субъединица осуществляет непосредственно связывание токсина, а также какова функциональная роль остальных белковых компонентов?

Как было отмечено выше, высокомолекулярный компонент рецептора мигрирует в полиакриламидном геле в виде диффузной полосы, характерной для гликопротеинов, как это имеет место, например, в случае α -субъединицы натриевого канала [8]. Гликопротеиновая природа компонентов рецептора латротоксина (160 и 200 кДа) была подтверждена в экспериментах по электрооблоттингу, когда полученные реплики окрашивали биотинилированным лектином из зародышей пшеницы.

Экспериментальная часть

Источники основных химических реагентов и способы их дополнительной очистки указаны в работах [9, 10]. Выделение мембран из коры головного мозга быка и солиubilизацию рецептора неионным детергентом тритон X-100 проводили согласно работе [1]. Активность рецептора во всех стадиях очистки контролировали по связыванию [¹²⁵I]латротоксина методом сорбции на нитроцеллюлозных фильтрах [4]. Все эксперименты, связанные с получением мембран, их солиubilизацией и дальнейшим выделением рецептора, осуществляли при 4° С.

Синтез иммуноаффинного сорбента. К 5 мл геля белок-А-сефарозы (Pharmacia, Швеция) добавляли раствор 7,5 мг моноспецифичных антигенов к латротоксину [1] и инкубировали 30 мин при перемешивании. При этом связывалось не менее 5 мг белка. Затем проводили ковалентную фиксацию антигенов сшивающим реагентом по описанной методике [5]. Сорбент промывали буфером, содержащим 0,5 М NaCl и 20 мМ трис-HCl, pH 8,2.

Синтез латротоксин-сефарозы. Иммуобилизацию латротоксина на BrCN-активированной сефарозе 4В (Pharmacia, Швеция) с плотностью 0,5–0,6 мг токсина/мл геля проводили согласно методике, предлагаемой фирмой.

Очистка рецептора. а) *Ионообменная хроматография.* 1,5 л солиобилизованных мембран (1–2 мг белка/мл), содержащих 0,15 М KCl, наносили со скоростью 700 мл/ч на колонку с 400 мл DEAE-Toyopearl 650 M (Toyo Soda, Япония). После нанесения образца колонку промывали с той же скоростью 2 л буфера, содержащего 0,15 М KCl, 20 мМ трис-HCl, 2,5 мМ EDTA, 0,1% луброла PX, pH 7,7. Элюцию проводили буфером того же состава, содержащим 0,4 М KCl, со скоростью 300–400 мл/ч. Детекцию белков осуществляли по поглощению элюата при 280 нм.

б) *Лектинспецифичная хроматография.* Элюат с DEAE-сорбента (600–700 мл) наносили на колонку со 100 мл сефарозы 4В с иммобилизованным лектином из зародышей пшеницы [1] со скоростью 60 мл/ч. После нанесения образца гель промывали 500 мл буфера, содержащего 0,4 М KCl, 2,5 мМ EDTA, 20 мМ трис-HCl, 0,1% луброла PX, pH 7,7. Элюцию гликопротеинов проводили раствором 50 мМ N-ацетилглюкозамина в буфере, содержащем 0,4 М KCl, 2,5 мМ CaCl₂, 20 мМ трис-HCl, 0,1% луброла PX, pH 7,7. Детекцию белков осуществляли по поглощению элюата при 280 нм.

в) *Иммуноаффинная хроматография.* Перед проведением аффинной хроматографии элюат с лектиновой колонки разбавляли в 2 раза буфером, содержащим 20 мМ трис-HCl, 2,5 мМ CaCl₂, pH 7,7, чтобы концентрация KCl не превышала 0,2 М. Полученный образец концентрировали до объема 100 мл ультрафильтрацией на мембранах XM-100 (Amicon, США). Затем добавляли 0,5 мг латротоксина и инкубировали 30 мин, смешивали с 5 мл иммуносорбента и инкубировали с перемешиванием в течение ночи. Гель переносили в хроматографическую колонку, промывали 30 мл буфера, содержащего 0,2 М KCl, 2,5 мМ CaCl₂, 20 мМ трис-HCl, 0,1% луброла PX, pH 7,7. Элюирование очищенного рецептора проводили раствором, содержащим 3 М KCl, 50 мМ триэтаноламин-HCl, 0,1% луброла PX, pH 9,5. Детекцию белков осуществляли по поглощению элюата при 280 нм. После 3–4 хроматографий на одном образце иммуносорбента латротоксин к фракции очищенных гликопротеинов не добавляли.

Аффинная хроматография солиобилизованных мембран. К 1,5 л солиобилизованных в Triton X-100 мембран добавляли раствор KCl до конечной концентрации 0,2 М и раствор CaCl₂ до конечной концентрации 2,5 мМ. Полученный раствор наносили на колонку (1,5×20 см, Whatman, Англия) с 10 мл латротоксин-сефарозы со скоростью 50 мл/ч. Колонку после нанесения образца промывали 100 мл буфера, содержащего 0,2 М KCl, 2,5 мМ CaCl₂, 20 мМ трис-HCl, pH 7,7, с 0,1% лубролом PX-100, с той же скоростью. Сорбированные белки элюировали буфером, содержащим 1 М KCl, 10 мМ EDTA, 20 мМ трис-HCl, 0,1% луброла PX, pH 7,7. Детекцию белков осуществляли по поглощению элюата при 280 нм.

Действие протеиназ на очищенный рецептор. К образцу очищенного рецептора, диализованного против буфера, содержащего 0,1 М KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,8, добавляли растворы ферментов (трипсин, термолизин (Serva, ФРГ); протеиназа V8 (Miles, США); нейраминидаза из *Vibrio cholerae* (Sigma, США)) в соотношениях, указанных в табл. 3. Инкубацию проводили при 37°С в течение 1 ч. Реакцию останавливали охлаждением смесей при 0°С.

Электрофоретический анализ образцов в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по модифицированной [8] системе Лэммли. Детекцию белков осуществляли окрашиванием кумасси R-250.

Белок определяли модифицированным [9] методом Лоури.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петренко А. Г., Шамотиенко О. Г., Суркова И. Н., Коваленко В. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 149–156.
2. Tzeng M.-C., Siekevitz P. // J. Neurochem. 1979. V. 33. P. 263–274.
3. Valtorta F., Madeddu L., Meldolesi J. // J. Cell Biol. 1984. V. 93. P. 124–132.
4. Meldolesi J. // J. Neurochem. 1982. V. 38. № 6. P. 1559–1569.
5. Scheer H., Meldolesi J. // EMBO J. 1985. V. 4. № 2. P. 323–327.
6. Scheer H., Prestipino G., Meldolesi J. // EMBO J. 1986. V. 5. № 9. P. 2643–2648.
7. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71–80.
8. Гришин Е. В., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Шамотиенко О. Г. // Биол. мембраны 1984. Т. 1. № 8. С. 858–867.
9. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1813–1827.
10. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1828–1837.

Поступила в редакцию
26.V.1989

A. G. PETRENKO, I. N. SURKOVA, O. G. SHAMOTIENKO, V. A. KOVALENKO,
V. N. KRASNOPEPOV, L. A. TRETJYAKOV*, Yu. A. USHKARYOV, E. V. GRISHIN

STUDIES ON THE RECEPTOR FOR NEUROTOXIN FROM BLACK WIDOW SPIDER VENOM. II. ISOLATION AND PROPERTIES OF THE RECEPTOR FROM BOVINE BRAIN MEMBRANE

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

** V. I. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

Biospecific sorbents for isolation of the latrotoxin receptor have been obtained and studied. Binding of the receptor components solubilized from the bovine cerebral cortex membrane to the immobilized toxin critically depends on the presence of calcium ions and the solution ionic strength. The procedure for semipreparative isolation of the highly active receptor preparation with $K_d=9 \cdot 10^{-10}$ M and $B_{max}=0.9$ nmol/mg has been developed. Binding activity of the isolated receptor is inhibited by heating as well as by proteases and denaturing agents. According to electrophoretic analysis in the presence of SDS the receptor complex contains protein components of molecular mass 200, 160, 79, 43 kDa, the former two being glycoproteins.