



УДК 577.11:595.3.088:547.993

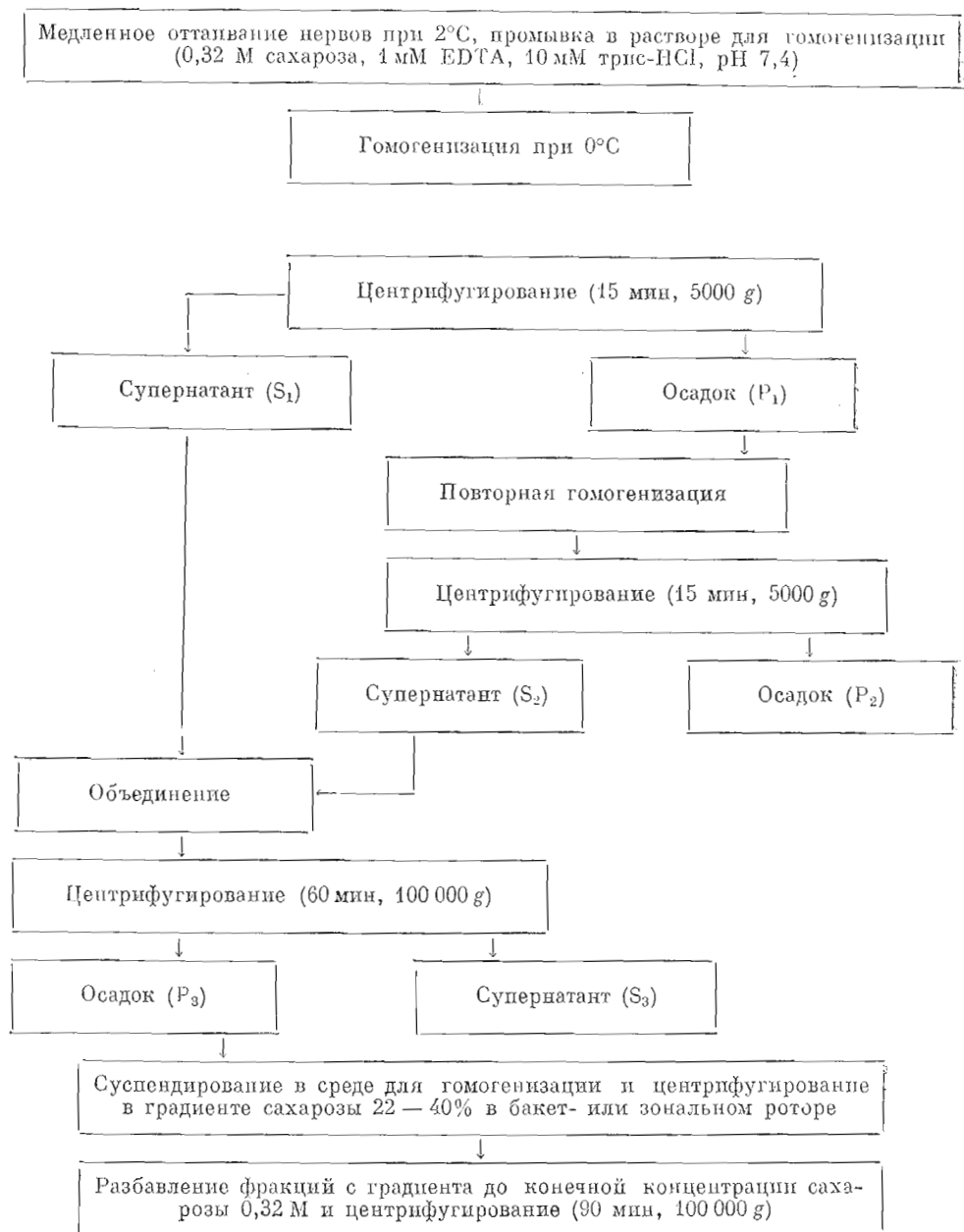
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОВЗБУДИМОЙ
МЕМБРАНЫI. ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ИЗ НЕРВОВ
КАМЧАТСКОГО КРАБА И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА*Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработан метод выделения мембран из аксонов камчатского краба. Выделены и охарактеризованы три различные мембранные фракции; проведен анализ их белкового, липидного и углеводного состава. Определена концентрация рецепторов тетродотоксина во всех мембранных фракциях. Найдено, что самая легкая фракция наиболее обогащена плазматическими мембранами. Эта фракция характеризуется высоким содержанием липидов и содержит более 4 пмоль рецепторов тетродотоксина на 1 мг белка. Сделан вывод, что нервные волокна камчатского краба могут быть использованы для препаративного выделения аксональной мембраны с высокой концентрацией быстрых натриевых каналов. Изучено влияние различных нейротоксинов на функциональную активность ионных каналов. С этой целью исследована проницаемость двух основных везикуляризованных фракций плазматической мембраны для ряда физиологически важных ионов, а также возможность создания трансмембранных потенциалов и регистрации их на везикулах. Для группы нейротоксинов аксонального действия не обнаружено селективного влияния на ионную проницаемость везикул.

Изучение молекулярной организации электровозбудимых мембран в настоящее время неразрывно связано с поиском и детальным анализом их основных функциональных компонентов — ионных каналов, ответственных за передачу нервного импульса. Для проведения подобного рода исследований больше всего подходят фракции аксональных мембран из крупных немиелинизированных волокон некоторых морских животных [4—8]. Использование таких волокон позволяет выделять аксональную мембрану в достаточно чистом виде, и некоторые из выделенных препаратов являются наиболее обогащенным источником ионных каналов. С помощью радиоактивно меченого тетродотоксина (ТТХ) наибольшая концентрация быстрых натриевых каналов (5—13 пмоль/мг белка) найдена в очищенных мембранах из двигательных нервов краба и омара [3, 6]. В связи с этим определенный интерес представляли первые волокна одного из самых крупных представителей членистоногих — камчатского краба *Paralithodes camtschatica*, имеющего промысловое значение, но тем не менее не использовавшегося ранее для этих целей. Этот краб привлекается возможностью получения больших количеств аксональных волокон; из ног животного средне-

Принятые сокращения: тетродотоксин — ТТХ, додецилсульфат натрия — SDS.

Схема фракционирования аксональных волокон краба



го размера (3–5 кг) путем относительно несложного препарирования можно получить 2–3 г волокон.

Нами были выделены и охарактеризованы фракции аксональной плазматической мембраны из двигательных нервов камчатского краба, а также исследована возможность применения везикулированных мембранных препаратов для анализа некоторых функциональных свойств ионных каналов на субклеточном уровне.

В предварительных экспериментах были опробованы различные способы гомогенизации нервных волокон и условия дифференциального и градиентного центрифугирования, после чего был выбран относительно простой метод фракционирования плазматической мембраны (схема). Он со-

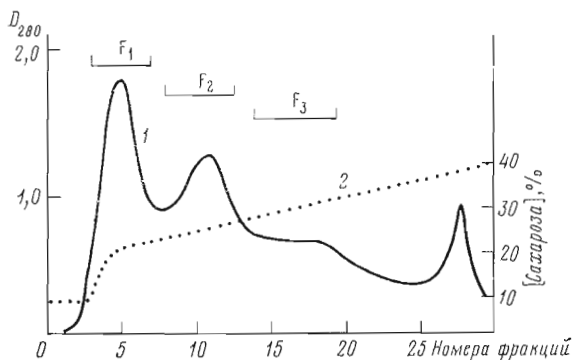


Рис. 1. Кривая оптической плотности при 280 нм (1) и концентрации сахарозы (2) при седиментации фракции P_3 (ротатор SW-27, 27 000 об./мин, 5 ч)

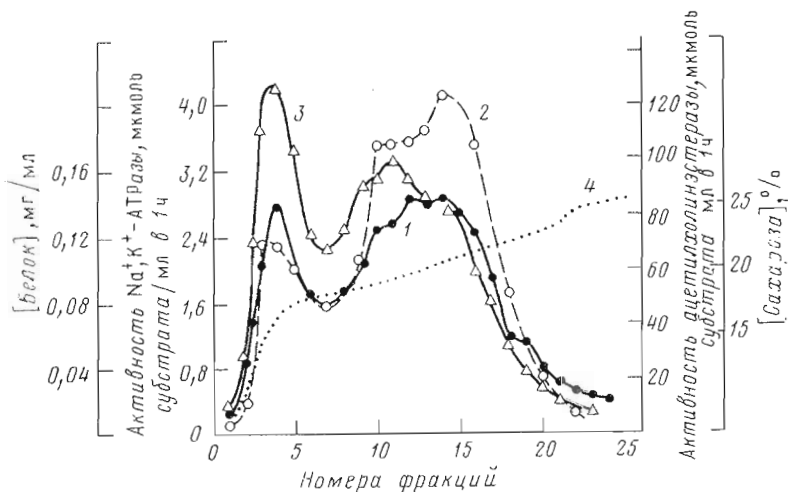


Рис. 2. Кривая распределения белка (1), Na^+ , K^+ -АТФ-азы (2), ацетилхолинэстеразы (3) и сахарозы (4) при седиментационном разделении фракции F_1 (ротатор SW-27, 27 000 об./мин, 5 ч)

стоит из двух стадий низкоскоростного центрифугирования гомогената волокон для удаления соединительной ткани и неразрушенных фрагментов волокон и последующего высокоскоростного центрифугирования, которое приводит к осаждению общей мембранной фракции P_3 . Дальнейшее фракционирование мембран осуществлялось седиментацией в линейном градиенте плотности сахарозы (рис. 1). При этом достигалось четкое разделение двух мембранных фракций F_1 (22% сахарозы) и F_2 (28% сахарозы). Фракция F_3 , наиболее тяжелая, обычно распределяется в более широком интервале плотности сахарозы. Следует отметить, что аналогичное разделение мембранных фракций достигается и в препаративном варианте при использовании зонального ротора.

Конечная стадия выделения мембран состоит в медленном разбавлении фракций 10 мМ трис-хлоридным буферным раствором до концентрации сахарозы 0,32 М и осаждении при 100 000 g. При этом около 50% белка фракции F_1 и 30% белка фракции F_2 остается в супернатанте. Такое осаждение мембран не сопровождается пропорциональным увеличением активности главного маркерного фермента Na^+ , K^+ -АТФ-азы в осадке. Это указывает на присутствие в супернатанте легких фрагментов мембран, значительную часть которых можно осадить седиментацией в среде, содержащей 20 мМ MgCl_2 [8]. Однако в этом случае активность Na^+ , K^+ -АТФ-

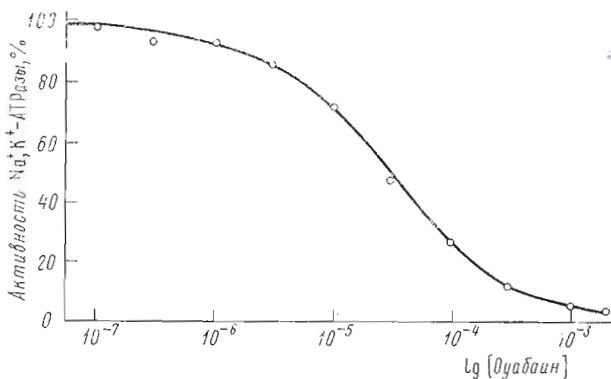


Рис. 3. Зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы от концентрации оубаина. Смеси, содержащие фракцию F_1 (20 мг белка / / 0,45 мл), перед запуском реакции инкубировали 16 ч с оубаином при 4°C

азы в осадке значительно ниже, и поэтому в дальнейших экспериментах осаждение мембран в присутствии MgCl_2 не производилось.

Выход белка и активность различных ферментов в мембранных фракциях представлены в табл. 1. Как и ожидалось, наибольшая активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы и ацетилхолинэстеразы сосредоточена в самой легкой фракции F_1 . Около 95% активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы во фракции F_1 и около 90% во фракции F_2 ингибируется оубаином. В то же время в среде, не содержащей ионов калия, активность фермента подавляется почти полностью. Эти данные свидетельствуют о том, что мембранные фракции F_1 и F_2 состоят в основном из плазматической мембраны с незначительными примесями эндоплазматического ретикулума и митохондрий. На это указывают также низкие значения активностей Ca^{2+} -АТФ-азы, цитохром-с-оксидазы и отсутствие ингибирующего действия на активность АТФ-азы азда натрия.

Другие ферменты, характерные для плазматических мембран из различных источников, в том числе из некоторых электровозбудимых тканей, такие, как 5'-нуклеотидаза и тиаминпирофосфатаза [9, 10], имеют очень низкую активность во всех фракциях нервных волокон краба, включая фракцию F_1 . Активность 5'-нуклеотидазы в мембранных фракциях не превышает 0,15 мкмоль/мг белка в 1 ч, а у Mg^{2+} - и Ca^{2+} -активируемой тиаминпирофосфатазы она составляет не более 0,2 мкмоль/мг белка в 1 ч. Поэтому эти ферменты не могут служить критерием степени очистки плазматической мембраны нервов краба.

В супернатанте после осаждения мембран из объединенных фракций F_1 и F_2 обнаруживается ~25% исходной активности ацетилхолинэстеразы и всего ~4% активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы. При дальнейшем разделении фракции F_1 в линейном градиенте концентрации сахарозы (15–25%) ацетилхолинэстераза концентрируется в легких субфракциях, а Na^+ , K^+ -АТФ-аза — в тяжелых (рис. 2). Этот эффект, по-видимому, связан с гетерогенностью аксональной плазматической мембраны, ранее обнаруженной при выделении мембран из электрического органа угря [11].

Интересно, что Na^+ , K^+ -АТФ-аза аксональной мембраны слабо ингибируется оубаином. Найденная константа ингибирования $3 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 3) — примерно в 100 раз больше соответствующих констант у Na^+ , K^+ -АТФ-аз большинства других тканей, но меньше, чем у фермента из аксональной мембраны краба *Cancer pagurus* ($2 \cdot 10^{-7}$ М [6]). Поскольку у плазматической мембраны шванновских клеток нет надежных маркеров, оценить количество этих мембран в выделенных фракциях пока не представляется возможным. Однако, учитывая значительное преобладание в нервных

Распределение белка и активности ферментов по мембранным фракциям

Исследованные свойства	Фракция			
	F ₃	F ₁	F ₂	F ₃
Белок, мг/г ткани	5,50	0,79	0,60	0,48
Na ⁺ , K ⁺ -АТФ-аза *	14,4	25,9	18,3	12,5
K ⁺ - <i>n</i> -нитрофенилфосфатаза *	2,70	4,75	3,04	2,70
Ацетилхолинэстераза *	294,0	632,0	434,0	204,0
Ca ²⁺ -АТФ-аза *	2,60	0,55	1,65	3,73
Цитохром-с-оксидаза *	0,032	Следы	0,013	0,040
Связывание [³ H]тетродотоксина, пмоль/мг белка	2,74	4,20	2,30	0,97

* Активность ферментов измерена в мкмоль/мг белка в 1 ч.

Таблица 2

Химический состав мембранных фракций

Фракция	Белок, %	Фосфолипиды		Холестерин		Углеводы		Холестерин/ фосфолипиды, молярное отношение
		%	мг/мг белка	%	мг/мг белка	%	мг/мг белка	
F ₁	26,7	50,2	1,88	18,9	0,71	4,0	0,15	0,73
F ₂	30,8	45,9	1,51	16,1	0,53	7,4	0,24	0,68
F ₃	36,4	40,6	1,10	12,9	0,35	10,8	0,29	0,61

волокон краба аксональных клеток над шванновским *, а также данные по плавучей плотности мембран шванновских клеток [12, 13], можно предположить, что содержание этих мембран, по крайней мере во фракции F₁, весьма незначительно.

Данные электронной микроскопии свидетельствуют о преобладании во фракциях F₁ и F₂ мембранных везикул и об отсутствии таких клеточных элементов, как митохондрии, рибосомы, фибриллярные структуры и т. п. (рис. 4). Размеры везикул колеблются от 0,1 до 1 мкм; во фракции F₁ чаще встречаются везикулы размером 0,3–0,7 мкм.

Результаты химического анализа мембранных фракций (табл. 2) хорошо согласуются с составом фракций аксональной мембраны краба [6] и омара [3, 5, 12]. Для фракций F₁ и F₂ характерно значительное содержание липидов с типичным для плазматических мембран отношением холестерина — фосфолипиды. Легкая мембранная субфракция, выделенная из F₁ (рис. 2), имеет еще большее содержание фосфолипидов (2,24 мг/мг белка) и холестерина (1,04 мг/мг белка).

Среди идентифицированных фосфолипидов во фракциях F₁ и F₂ более 96% составляют фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидовая кислота, фосфатидилсерин и фосфатидилинозит. Обращает на себя внимание необычно высокое содержание фосфатидовой кислоты, достигающее в некоторых образцах 13%. Значительное количество фосфатидовой кислоты найдено также в общем экстракте липидов, полученном как из свежемороженых нервных волокон, так и сразу после их препарирования. Согласно предварительным данным, высокое содержание фосфатидовой кислоты не является результатом расщепления липидов фосфолипазой D, так как активность этого фермента в гомогенате нервов очень низка. Во фракциях плазматической мембраны камчатского краба найдены лишь следовые количества сialовой кислоты, что подтверждает

* Неопубликованные данные.

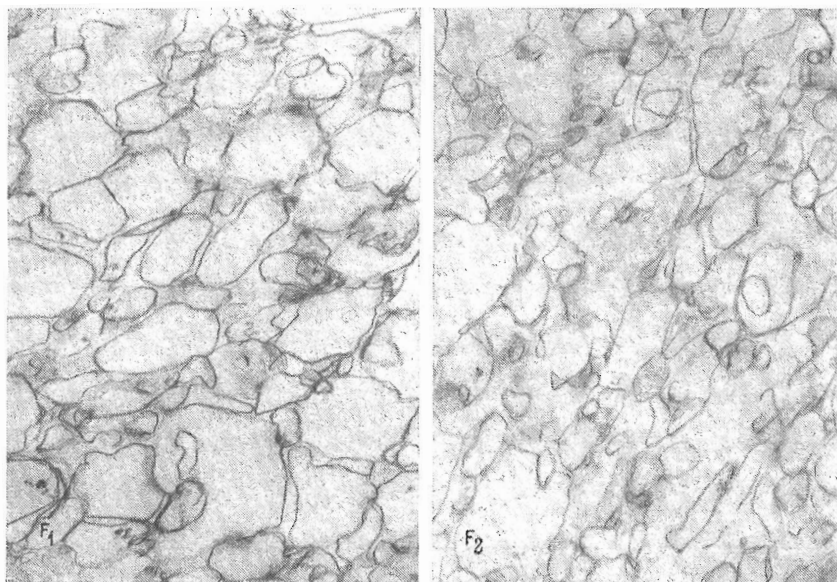


Рис. 4. Электронные микрофотографии тонких срезов препаратов из мембранных фракций F₁ и F₂

данные о низком содержании ганглиозидов в аксональной мембране [6].

С помощью SDS-электрофореза в мембранных фракциях было обнаружено около 30 различных белковых компонентов с молекулярным весом от 12 000 до 240 000 (рис. 5). Число белков во всех фракциях примерно одинаково, но интенсивность окраски соответствующих полос различна. Фракции F₁ и F₂ содержат около 15 главных компонентов, из которых наиболее интенсивно окрашиваются белки с M 220 000±10 000, 87 000±±2000, 79 000±2000, 72 000±2000, 63 000±2000, 50 000±1000, 45 000±±1000, 42 000±1000, 34 000±1000, 29 000±1000. Фракция F₃ обогащена полипептидами с молекулярным весом 12 000—15 000 (рис. 5, 6). Не исключено, что некоторые из этих полипептидов являются продуктами расщепления более высокомолекулярных компонентов мембраны, поскольку их доля в препаратах слегка колеблется. Молекулярный вес некоторых главных белков мембран совпадает с молекулярным весом сократительных белков (миозина, актина и тропомиозина), высокое содержание которых в аксональной мембране предполагалось и ранее [6]. После обработки фракции F₁ раствором 1 M хлористого лития и последующего центрифугирования при 100 000 g осадок содержит все главные белковые компоненты, т. е. эти белки связаны с мембранами не только электростатическими взаимодействиями. Сходство полипептидного состава различных фракций

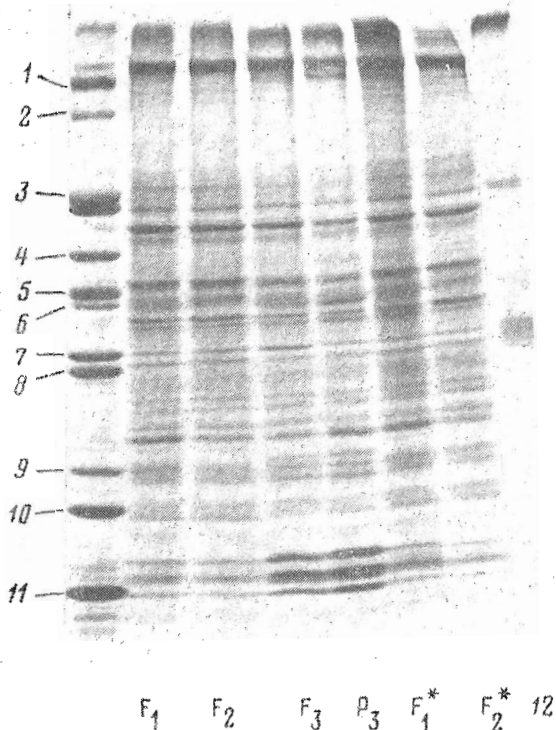
Таблица 3

Проницаемость везикул из аксональной мембраны краба

Фракция	Внутренний объем, мкл/мг белка *	Время полууравновешивания метки, мин							
		²² Na+	⁸⁶ Rb+	⁴⁵ Ca ²⁺	[¹⁴ C]холлин+	³⁵ SO ₄ ²⁻	³⁶ Cl-	[³ H]АТФ	[³ H]оубаин
F ₁	6±1,5	18±3	30±5	50±10	120±30	210±20	30±5	30±5	30±5
F ₂	4±1	12±3	20±5			30±5	30±5		

* Рассчитан по данным для ²²Na+ и ⁸⁶Rb+.

Рис. 5. SDS-электрофорез мембранных фракций в градиентном (9–25%) полиакриламидном геле. Образцы, помеченные звездочкой, отвечают фракциям, предварительно экстрагированным смесью хлороформ – метанол. Слева – смесь белков. 1 – миозин (M 200 000); 2 – β' -субъединица РНК-полимеразы (M 165 000); 3 – фосфоорилаза А (M 94 000); 4 – сывороточный альбумин быка (M 68 000); 5 – каталаза (M 60 000); 6 – тубулин из мозга (M 55 000); 7 – актин из мозга (M 43 000); 8 – альдолаза (M 40 000); 9 – γ -кристаллин (M 20 000); 10 – химотрипсиноген А (M 25 000); 11 – цитохром с (M 12 500); образец 12 справа – Na^+ K^+ -АТФ-аза



свидетельствует о том, что их главной составной частью является плазматическая мембрана.

Степень очистки препаратов аксональной мембраны можно оценить по количеству рецепторов ТТХ, которое эквивалентно числу быстрых натриевых каналов. Наибольшая концентрация рецепторов ТТХ (4,2 пмоль/мг белка) обнаружена во фракции F₁. Это еще раз доказывает, что данная фракция наиболее обогащена аксональной плазматической мембраной. Учитывая выход общей мембранной фракции P₃, в которой сосредоточено основное количество рецепторов ТТХ, можно подсчитать, что в 1 г исходных нервных волокон содержится не менее 12 пмоль рецепторов. Следовательно, нервные волокна камчатского краба сравнительно богатый источник быстрых натриевых каналов.

Анализ связывания [³H]ТТХ с фракцией F₁ по Скетчарду (рис. 7) показывает, что константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса равна $1,9 \cdot 10^{-8}$ М. Это близко к значению, найденному ранее для мембран интактного аксона омара [14] и электрического органа угря [15], но несколько выше, чем у мембран из ряда других тканей [3, 6, 16, 17].

Способность связывать радиоактивно меченный ТТХ остается у мембранных препаратов длительное время при хранении при -50°C . Обработка фракции F₁ разбавленными растворами неионных детергентов, тритона X-100 или луброла WX приводит к увеличению связывания [³H]ТТХ на 10–20%. Поскольку рецепторы локализованы на внешней стороне плазматической мембраны, можно предположить, что основная часть везикул во фракции F₁ имеет правильную ориентацию.

Везикулы, образованные аксональной мембраной, можно было бы использовать для анализа функциональных свойств ионных каналов и исследования влияния различных нейротоксинов на мембранную проницаемость. Данные о проницаемости везикул из аксональной мембраны

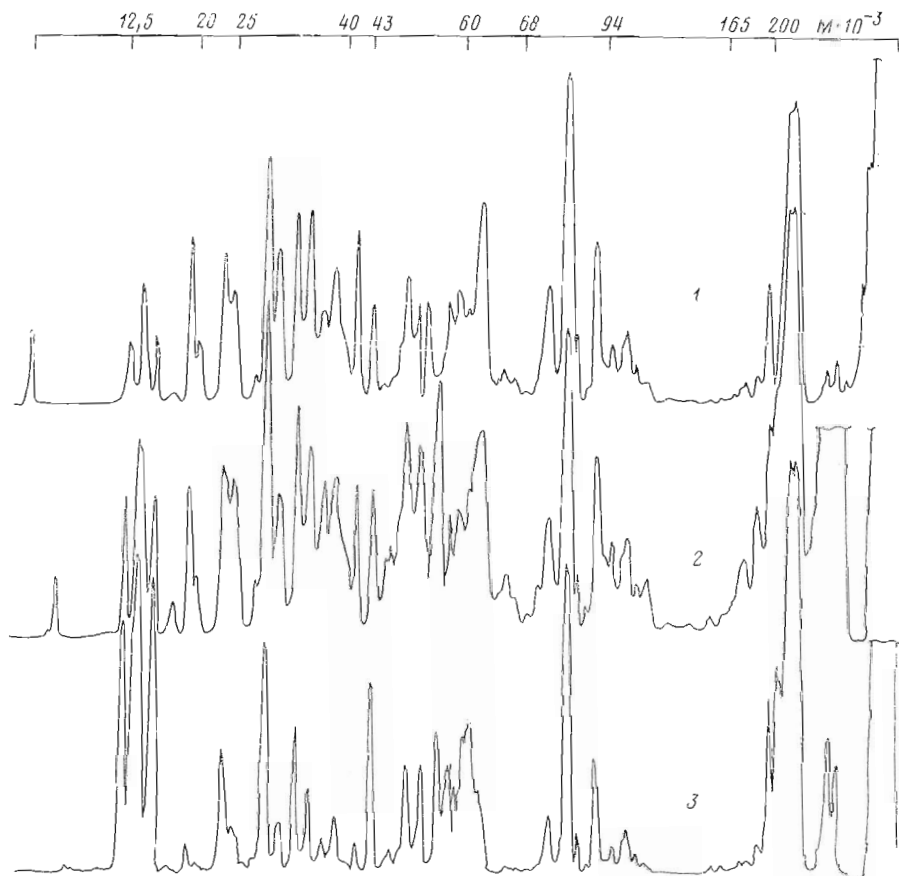


Рис. 6. Сравнение денситограмм при 585 нм гелей после SDS-электрофореза мембранных фракций F_1 (1), F_2 (2) и F_3 (3)

графа для некоторых ионов и веществ (табл. 3) свидетельствуют, что фракции F_1 и F_2 имеют большой осмотически чувствительный внутренний объем и медленную кинетику обмена ионов. Это делает их весьма удобным объектом для исследования ионных потоков.

В серии экспериментов было изучено действие аксональных нейротоксинов (ТТХ, аконитин, вератридин, токсины скорпиона и морской анемоны), а также цитотоксинов из яда кобры на проницаемость везикул из аксональной мембраны для $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Оказалось, что нейротоксины не влияют на катионную проницаемость везикул, а цитотоксины увеличивают проницаемость везикул как для катионов, так и для анионов. Чтобы изучить действие нейротоксинов на мембраны, находящиеся в состоянии, более близком к нативному, были получены везикулы с искусственно созданным трансмембранным потенциалом разного знака (см. «Экспериментальную часть»). С помощью антибиотиков-ионофоров можно создать на мембране везикул достаточно долго живущую разность потенциалов, регистрируемую по изменению флуоресценции потенциалчувствительных зондов: цианинового красителя diS-C_8 -(5) при отрицательном потенциале внутри везикул и оксолового красителя diVA при обратной полярности (рис. 8). Оказалось, однако, что нейротоксины аксонального типа не влияют на ионную проницаемость везикул и при наличии трансмембранного потенциала (рис. 8). При изучении везикул из электрических органов угря [17] также не удалось обнаружить влияния

ТТХ и вератридина на мембранную проницаемость (см., однако, [18, 20]). Результаты нашей работы и предыдущих исследований [19, 21, 22] показывают, что функциональная активность натриевых каналов в мембранных везикулах весьма лабильна и требуется специальная модификация мембран [22] и особые методы реконструкции с добавлением липидов [23], чтобы обнаружить специфическое влияние нейротоксинов на ионную проницаемость натриевых каналов.

Следует отметить высокую проницаемость везикул из аксональной мембраны краба для $[^3\text{H}]$ АТР и $[^3\text{H}]$ оуабанина (табл. 3). Ранее было показано, что АТР способен проникать через мембрану гигантского аксона кальмара и фосфорилировать аксональные белки [24]. Это позволяет предположить, что обнаруженная в наших экспериментах высокая проницаемость мембраны везикул для АТР характерна и для нативной мембраны аксона краба.

Таким образом, плазматические мембраны аксонов камчатского краба сравнительно легко получать в препаративном масштабе. Они характеризуются достаточно высокой концентрацией быстрых натриевых каналов и, следовательно, могут быть использованы для идентификации и выделения компонентов каналов.

Экспериментальная часть

В работе использованы реактивы для SDS-электрофореза (Bio-Rad, США), цитохром с, химотрипсиноген А, овальбумин, бычий сывороточный альбумин, альдолаза, каталаза, фосфорилза *a* (Serva, ФРГ), ТТХ (Calbiochem, США), $[^{14}\text{C}]$ холин, $[^3\text{H}]$ оуабанин, $^{45}\text{CaCl}_2$, $[^3\text{H}$ -ацетил]инулин (Amersham, Англия). Препарат Na^{36}Cl очищен на смоле Chelex 100 (Bio-Rad, США). Для приготовления растворов использовали сахарозу марки х.ч., дополнительно очищенную на смоле AG 501X8D (Bio-Rad, США). АТР (Koch-Light, Англия) очищали перекристаллизацией из 48% этанола при pH 3,5. Флуоресцентные зонды dis-C₃-(5) и diBA-C₃-(5) получены от А. Вагнера (США) и А. И. Толмачева (ИОХ, АН УССР).

Меченые ТТХ тритием осуществляли бомбардировкой атомарным тритием, полученным с помощью электрического разряда в вакууме [25]. Лабильный тритий из препарата удаляли многократным растворением в метаноле с последующей отгонкой последнего. Очистку меченого продукта проводили трехкратной хроматографией на катионообменнике «Bio-Rex 70» в условиях, описанных Бензером и Рафтери [26]. Препараты $[^3\text{H}]$ ТТХ были электрофоретически гомогенны [27] и имели удельную радиоактивность 0,4–0,8 Ки/ммоль. Определение концентрации $[^3\text{H}]$ ТТХ по его конкуренции за рецепторы с немеченым ТТХ [17] дало значения, совпадающие в пределах 10% со значениями, полученными флуоресцентным методом [28]. Выход меченого токсина составлял 20–30%.

Нервные волокна получали из ног крабов *Paralithodes camtschatica* обоего пола, выловленных в зал. Петра Великого в сентябре-октябре 1977 и 1978 гг. Препарирование проводили сразу после отлова крабов. Нервные волокна выделяли из двух главных члеников ног, мышечные волокна тщательно удаляли. Волокна находились в растворе 10% сахарозы или в морской воде в течение 30–60 мин, а затем порциями по 10–20 г быстро замораживались в жидком азоте и хранились при -50°C .

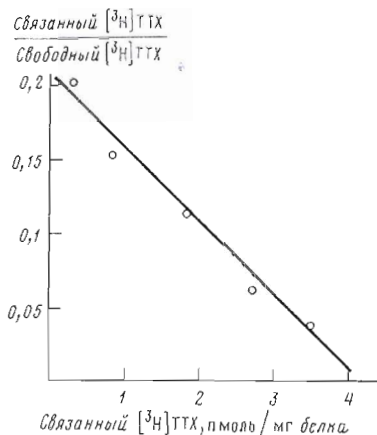


Рис. 7. Кривая Скетчарда для связывания $[^3\text{H}]$ ТТХ с фракцией F_1

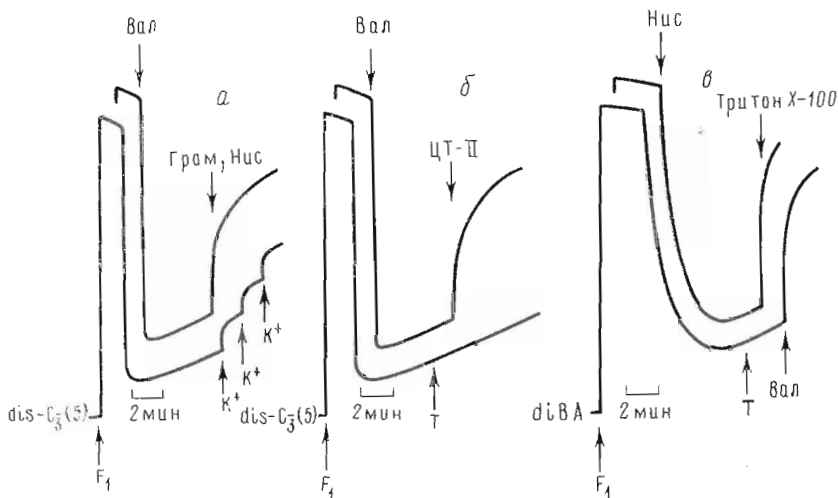


Рис. 8. Изменение интенсивности флуоресценции потенциал-чувствительных зондов $\text{dis-C}_3(5)$ (а, б) и diVA (в) при различных добавках к мембранной фракции F_1 : Вал – валиномицин, Грам – грамицидин, Нис – нистатин, ЦТ-II – цитотоксин II среднеазиатской кобры; Т – различные нейротоксины (аконитин, вератридин, ТГХ, токсины скорпиона и морской анемоны)

Порции нервов по 20 г после медленного размораживания до 4°C промывали раствором 0,32 М сахарозы, содержащим 10 мМ трис- HCl (pH_{20} 7,3) и 1 мМ EDTA, и подвергали гомогенизации в 180 мл этого же раствора (модифицированный гомогенизатор «Polytron»; 8000 об./мин; 2×30 с; 0°C). Центрифугирование проводили при $0-2^\circ\text{C}$ в центрифугах RC2B (Sorvall, США) и J21B (Beckman, США) и на ультрацентрифугах L-5 (Beckman, США). Для создания линейного градиента сахарозы в пробирках использовали градиентный насос «Dialag-rad» (ISCO, США). Отбор фракций осуществляли либо вытеснением градиента раствором 50% сахарозы со дна пробирки в коллектор фракций (Ultrac, LKB, Швеция) с непрерывной регистрацией оптической плотности при 280 нм, либо вручную с помощью цельностеклянного шприца. Фракции разбавляли в течение 10–20 мин раствором 10 мМ трис- HCl (pH 7,4) так, чтобы концентрация сахарозы достигла 0,32 М, и центрифугировали 90 мин при $100\,000g$. Осадок осторожно суспендировали в буферном растворе с помощью шприца со стеклянным капилляром (с внутренним диаметром не менее 0,4 мм) так, чтобы концентрация белка составила 4–7 мг/мл. Чтобы получить везикулы с большим внутренним объемом, следует избегать продавливания суспензии через тонкие капилляры и не подвергать везикулы в ходе выделения осмотическому шоку. Фракции хранили при 0° и для большинства опытов использовали в течение 5 дней. Замену среды в мембранных препаратах производили разбавлением или диализом.

При препаративном выделении мембран исходное количество нервов составляло 50 г. Разделение фракций проводили в зональном роторе Ti-14 (Beckman, США).

Ферментативные активности. Для измерения активности Na^+ , K^+ -АТФазы использовали раствор, содержащий 150 мМ NaCl , 25 мМ KCl , 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ EDTA и 50 мМ трис- HCl (pH_{20} 7,5). Определяли разность АТФазной активности препарата в этом растворе и в растворе без KCl или в присутствии 1 мМ оубаина. Суспензию мембран (5–20 мкг белка в 0,45 мл раствора) инкубировали 10–15 мин при 25°C и добавляли 2 мМ АТФ. Через 5–15 мин реакцию останавливали добавлением 6 объемов охлажденного раствора 0,25% HClO_4 . Неорганический фосфат определяли с использованием малахитового зеленого [29] вручную или на автоматическом

анализаторе «Technikon». Ca^{2+} -АТФ-азную активность определяли в среде, содержащей 150 мМ КСl, 25 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂ и 50 мМ трис-HCl (pH₂₀ 7,5). Для определения активности 5'-нуклеотидазы использовали раствор 100 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl (pH 7,6) и 1 мМ АМР. Mg^{2+} -зависимую тиаминпирофосфатазную активность определяли в растворе 50 мМ трис-малеата (pH 7,2), 5 мМ MgCl₂ и 2 мМ тиаминдифосфата; Ca^{2+} -зависимую активность — в растворе 50 мМ трис-HCl (pH 8,8), 4 мМ CaCl₂ и 2 мМ тиаминдифосфата.

n-Нитрофенилфосфатазную активность определяли в растворе, содержащем 10 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl (pH 7,8) и 5 мМ субстрат. Концентрацию образовавшегося *n*-нитрофенола измеряли спектрофотометрически при 412 нм, после того как реакцию останавливали добавлением равного объема раствора 0,5 М NaOH, 0,5% SDS и 20 мМ EDTA. Активность ацетилхолинэстеразы определяли методом Эльмана при концентрации ацетилтихолина в реакционной смеси 0,8 мМ [6]. Активность цитохром-с-оксидазы оценивали по скорости окисления цитохрома с, предварительно восстановленного Na₂S₂O₄ или NaBH₄ в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0).

Химические анализы. Липиды экстрагировали из лиофильно высушенных мембран смесью хлороформ — метанол (2 : 1), а из водной суспензии мембран — методом Блайта и Дайера [30]. Для определения содержания холестерина в экстрактах использовали метод, описанный в работе [31]. Количество фосфолипидов оценивалось по содержанию неорганического фосфата после сжигания образцов в растворе 72% HClO₄. ТСХ фосфолипидов производили в 0,2-мм слое силикагеля 60 (Merck, ФРГ), используя систему растворителей, описанную Чако и сотр. [12]. Сialовые кислоты определяли тиобарбитуровым методом Уоррена [32] после гидролиза мембран в растворе 0,05 М H₂SO₄ (1 ч, 80° С). Для определения общих сахаров использовали фенольный метод [33].

Белок определяли модифицированным методом Хартри [34], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Белок осаждали в растворе 7,5% трихлоруксусной кислоты; выпавший осадок растворяли при 55° С в растворе 0,5 М NaOH и 2,5% SDS. Модификация метода Хартри заключалась в использовании реактива В, не содержащего NaOH, и прогреве в течение 5 мин с реактивом Фолина при 55° С. Концентрацию ТТХ определяли флуоресцентным методом [28] после прогрева в течение 25—30 мин при 80° С в присутствии 2,7 М NaOH. Нижний порог чувствительности этого метода 0,5 мкгМ.

Электрофорез проводили на пластинках с толщиной полиакриламидного геля 1,5 мм в приборе фирмы «Bio-Rad 220» (США), используя модифицированную буферную систему Леммли [35]. Кроме обычных компонентов гели содержали 5% глицерина и 2 мМ EDTA. Концентрирующий гель (1,5 см) содержал 3—5% полиакриламида, а разделяющий гель (9 см) представлял собой линейный градиент (9—25%) полпакриламида. Образцы для нанесения (~40 мкг белка) приготавливали добавляем к соответствующему раствору концентрированной суспензии мембран или осадка, полученного из мембран обработкой смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и ацетоном, и последующим нагреванием (3—5 мин) в кипящей водяной бане. Электрофорез проводили при токе 10 мА на пластинку до достижения краской границы разделяющего геля, а затем при токе 20—25 мА на пластинку до достижения краской нижней границы геля. Гели фиксировали в течение ночи в растворе 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты, затем их окрашивали в течение 3—4 ч в таком же растворе, содержащем 0,1% кумаси бриллиантового синего R-250. Гели обесцвечивали электрофоретически или вымачиванием в растворе 10% изопропанола и 10% уксусной кислоты. Денситометрирование гелей производили при 575 нм на сканирующем денситометре (Orton, ФРГ).

Связывание [³H]ТТХ. Суспензию мембран (0,4—0,8 мг белка/мл) инкубировали 60 мин при 4° С в растворе, содержащем 150 мМ холин, 50 мМ

NaCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂, 10 мМ трис-НCl (рН₂₀ 7,4) и [³H]ТТХ, а затем центрифугировали 1,4 ч при 44 000 об/мин (ротор SW-50 или SW-60, Beckman, США). Супернатант тщательно сливали, стенки пробирок осторожно высушивали фильтровальной бумагой, осадок суспендировали в 1 мл указанного раствора; из этой суспензии далее отбирали аликвоту для измерения радиоактивности. Специфичное связывание токсина определяли по разности счета между пробой, в которую был введен только [³H]ТТХ, и такой же пробой, содержащей дополнительно 3·10⁻⁶ М немеченого ТТХ. Объем жидкой фазы в осадке, которая содержит несвязанный [³H]ТТХ, оценивали с помощью [¹⁴C-ацетил]инулина (обычно 15—18 мкл/мг белка). Количество рецетсров ТТХ в разных фракциях оценивали при концентрации [³H]ТТХ 1,6·10⁻⁷ М, когда величина неспецифичного связывания не превышала 40%.

Проницаемость везикул для ионов ²²Na⁺, ⁸⁶Rb⁺, ⁴⁵Ca²⁺, ³⁶Cl⁻, ³⁵SO₄²⁻, [¹⁴C]холина⁺ оценивали по скорости вытекания метки, используя принцип, предложенный Касаи и Шанже [36]. Концентрированную суспензию мембран в растворе, содержащем метку (50—70 мк/мл, 3—6 мг белка/мл), инкубировали при 0—2° С не менее 12 ч для ²²Na⁺, ⁸⁶Rb⁺ и ⁴⁵Ca²⁺ и не менее 24 ч для ³⁵SO₄²⁻ и [¹⁴C]холина⁺. После быстрого разбавления в 50—80 раз буферным раствором при 4° С аликвоты, содержащие 40—80 мкг белка, фильтровали через питроцеллюлозные фильтры с порами диаметром 0,45 мкм (HAWP, Millipore, США) и промывали в течение 20 с двумя порциями охлажденного раствора. В некоторых экспериментах проницаемость везикул оценивали по скорости втекания метки. В этом случае к концентрированной суспензии мембран добавляли раствор метки и через необходимое время аликвоту разбавляли и фильтровали, как описано выше. Для измерения скорости втекания применяли также быстрое отделение метки, не поглощенной везикулами, на маленькой колонке с дауэксом 50×8 [37]. Все три метода дали совпадающие значения проницаемости везикул. Проницаемость везикул для [³H]оуабайна и [³H]АТР оценивали по скорости втекания метки. В этих экспериментах использовали следующие буферные растворы: ²²Na⁺, ⁸⁶Rb⁺, ³⁶Cl⁻, ⁴⁵Ca²⁺ — 150 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 3 мМ MgSO₄, 2 мМ CaCl₂, 20 мМ трис-НCl (рН 7,4); [¹⁴C]холин⁺ — 150 мМ холин, 5 мМ NaCl, 3 мМ MgSO₄, 2 мМ CaCl₂, 20 мМ трис-НCl (рН 7,3); ³⁵SO₄²⁻ — как для ²²Na⁺, но вместо трис-НCl использовали трис-Н₂SO₄; [³H]оуабайн — 150 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂; 20 мМ трис-НCl, 1 мМ EDTA (рН 7,4) и 5·10⁻⁴ М оуабайн; [³H]АТР — как для оуабайна, но без MgCl₂ (в этих условиях АТР не гидролизует; общая концентрация АТР в смеси 1 мМ).

Расчет внутреннего объема везикул (мкл/мг) проводили по формуле

$$V = \frac{R_{15}(n-1)}{n \cdot m \cdot R_1}$$

где R₁₅ — радиоактивность пробы, отфильтрованной через 15 с после разбавления суспензии; R₁ — радиоактивность 1 мкл суспензии до разбавления; n — кратность разбавления суспензии; m — количество белка на фильтре в мг.

При изучении влияния токсинов на ионную проницаемость их вводили либо при инкубации везикул с меткой, либо до начала измерения проницаемости, либо в момент разбавления.

Измерения радиоактивности проводили в жидкостных сцинтилляционных счетчиках LS-100 (Beckman, США) или SL-30 (Intertechnique, Франция). Активность ²²Na⁺, ⁸⁶Rb⁺ определяли на фильтрах в толуольном сцинтилляторе, содержащем PPO+диметил-РОРОР; ⁴⁵Ca²⁺, ³⁶Cl⁻, ³⁵SO₄²⁻, [¹⁴C]холин — в сцинтиляторе «Unisolve 1» (Koch-Light, Англия). Активность тритиевых меток в растворе или на фильтрах определяли в сцинтиляторе «Unisolve 1». Перед добавлением сцинтиллятора фильтры выдерживали 1 ч в метаноле или этилацетате.

Создание и регистрация мембранного потенциала на везикулах. Суспензию мембран (3—5 мг белка/мл) диализовали при 1—2°С 12—18 ч против раствора 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 2 мМ MgSO₄ и 150 мМ KCl (раствор А) или против раствора 20 мМ трис-Н₂SO₄ (рН 7,5), 2 мМ MgSO₄ и 75 мМ K₂SO₄ (раствор В). Для создания трансмембранного потенциала (минус — внутри везикулы) в термостатируемую (10°С) измерительную кювету, содержащую 8 мл раствора 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 2 мМ MgSO₄ и 150 мМ NaCl (раствор В), последовательно добавляли 10—15 мкл этанольного раствора красителя dis-C₃-(5) [38] (0,1 мг/мл), через 30 с суспензию диализованных везикул (20—30 мкл) и еще через 1—2 мин 10 мкл раствора 10⁻⁶ М валиномицина. Флуоресценцию измеряли на приборе, описанном ранее [39] (λ_{возб} 529,5 нм; λ_{исп} 580 нм). Судя по калибровке, основанной на измерении флуоресцентного ответа от K⁺-градиента, начальный мембранный потенциал составлял в этих условиях ~70 мВ. Для создания мембранного потенциала обратного знака суспензию мембран (10—30 мкл) в растворе В разбавляли 8 мл раствора В, но содержащего ранее добавленный краситель diBa (15 мкл раствора, 0,1 мг/мл). Потенциал создавали добавлением через 1—2 мин 8 мкл раствора 2,5·10⁻⁴ М нистатина. Измерения флуоресценции производили при λ_{возб} 546 нм и λ_{исп} 620 нм. Время половинного спада потенциала составило около 15 мин с валиномицином и около 20 мин с нистатином.

Действие токсинов на ионную проницаемость в присутствии мембранного потенциала проверяли в разных условиях. Они добавлялись: 1) только в суспензию мембран после диализа; 2) в раствор до внесения мембран; 3) через разные промежутки времени после внесения антибиотиков-ионофоров. Исследовали аконитин (10⁻⁶—5·10⁻⁴ М), вератридин (10⁻⁶—5·10⁻⁴ М), ТТХ (10⁻⁷—10⁻⁶ М), токсины среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* (10⁻⁷—10⁻⁶ М), токсин II морской анемоны *Anemonia sulcata* (10⁻⁷—10⁻⁶ М), кардиотоксины среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (10⁻⁶—10⁻⁷ М), новокаин (5·10⁻³ М); D₆₀₀ (10⁻⁵—10⁻⁶ М). Проверляли также совместное действие алкалоидных и пептидных нейротоксинов.

Выражаем глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, Е. А. Филатову за помощь при получении меченого тетродотоксина, И. С. Литвинову за измерение флуоресценции потенциал-чувствительных красителей, В. В. Сове за помощь в организации отлова крабов и получении препаратов нервов и Д. А. Мошкову за проведение электронно-микроскопического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Camejo G., Villegas G. M., Barnola F., Villegas R. Characterisation of two different membrane fractions isolated from the first stellar nerve of the squid *Dosidicus gigas*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1969, v. 193, № 1, p. 247—259.
2. Fischer S., Cellino M., Zambrano F., Zampighi G., Felleznagel M., Marcus D., Caneva-Fischer M. The molecular organisation of nerve membranes. I. Isolation and characterisation of plasma membranes from the retinal axons of the squid: an axolemma-rich preparation.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1970, v. 138, № 1, p. 1—15.
3. Barnola F. V., Villegas R., Camejo J. Tetrodotoxin receptor in plasma membranes isolated from lobster nerve fibers.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 298, № 1, p. 84—94.
4. Chacko G. K., Goldman D. E., Malhotra H. C., Dewey M. M. Isolation and characterisation of plasma membrane fraction from garfish *Lepisosteus osseus* olfactory nerve.— *J. Cell. Biol.*, 1974, v. 62, № 3, p. 831—843.
5. Chacko G. K., Villegas G. M., Barnola F. V., Villegas R., Goldman D. E. The polypeptides and the phospholipid components of axon plasma membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 443, № 1, p. 19—32.
6. Balerna M., Fosset M., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M. Constitution and properties of axonal membranes of crustacean nerves.— *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 25, p. 5500—5511.
7. Uchara S., Uyemura K. Isolation of neural plasma membranes from the crayfish *Procambarus clarkii* with an aqueous two phase polymer system followed by

- sucrose density gradient centrifugation.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 556, № 1, p. 96–104.
8. *Denburg J. L.* An axon plasma membrane preparation from the walking legs of lobster *Homarus americanus*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 282, № 1, p. 453–458.
 9. *Barr L., Connor J. A., Dewey M. M., Aprille J., Johnston P. V.* The isolation of plasma membrane from frog cardiac muscle cells.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 345, № 3, p. 336–342.
 10. *Iwata H., Baba A., Matsuda T., Terashita Z.* Properties of thiamine di- and triphosphatases in rat brain microsomes: effect of chlorpromazine.— *J. Neurochem.*, 1975, v. 24, № 6, p. 1209–1213.
 11. *Rosenberg P., Silman J., Ben-David E., de Vries A., Condrea E.* Characterisation of membranes obtained from electric organ of the electric eel by sucrose gradient fractionation and by microdissection.— *J. Neurochem.*, 1977, v. 29, № 3, p. 561–578.
 12. *Chacko G. K., Barnola F. V., Villegas R.* Phospholipid and fatty acid composition of axon periaxonal cell plasma membranes of lobster leg nerve.— *J. Neurochem.*, 1977, v. 28, № 2, p. 445–447.
 13. *Poduslo S. E.* The isolation and characterisation of plasma membrane and myelin fraction derived from oligodendroglia of calf brain.— *J. Neurochem.*, 1975, v. 24, № 4, p. 647–654.
 14. *Hafjeman D. R.* Binding of radioactive tetrodotoxin to nerve membrane preparation.— *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 266, № 2, p. 548–556.
 15. *Grünhagen H. H., Rack M., Stämpfli R., Fasold H., Reiter P.* Chemically tritiated tetrodotoxin. Physiological activity and binding to Na⁺-channels.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1980, v. 206, № 1, p. 198–204.
 16. *Chacko G. K., Barnola F. V., Villegas R., Goldman D. E.* The binding of tetrodotoxin to axonal membrane fraction isolated from garfish olfactory nerve.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 373, № 2, p. 308–312.
 17. *Reed J. K., Raftery M. A.* Properties of the tetrodotoxin binding to component in plasma membrane isolated from *Electrophorus electricus*.— *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 5, p. 944–953.
 18. *Barnola F. V., Villegas R.* Sodium flux through the sodium channels of axon membrane fragments isolated from lobster nerve.— *J. Gen. Physiol.*, 1976, v. 67, № 1, p. 81–90.
 19. *Villegas R., Villegas G. M., Barnola F. V., Racker E.* Incorporation of the sodium channel of lobster nerve into artificial liposomes.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 79, № 1, p. 210–217.
 20. *Lishko V. K., Malysheva M. K., Stefanov A. V.* In vitro demonstration of sodium channels in nervous tissues.— *Neuroscience*, 1977, v. 2, p. 1043–1048.
 21. *Matthews J. C., Albuquerque E. X., Eldejravi M. E.* Influence of batrachotoxin, veratridin, grayanotoxin I and tetrodotoxin on uptake of ²²Na by rat brain membrane preparations.— *Life Sci.*, 1979, v. 25, № 19, p. 1651–1658.
 22. *Grünhagen H. H.* Na⁺-channels in membrane fragments from *Electrophorus electricus*: biochemical studies.— *Neurochem. Int.*, 1980, v. 2, № 1, p. 73–80.
 23. *Goldin S. M., Roden V., Hess E. J.* Molecular characterisation, reconstitution, and «transport-specific fractionation» of saxitoxin binding protein/Na⁺ gate of mammalian brain.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 4, p. 6884–6888.
 24. *Pant H. C., Terakawa S., Joshioka T., Tasaki J., Guiner H.* Evidence for the utilisation of extracellular [γ -³²P]ATP for the phosphorylation of intracellular proteins in the squid giant axon.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 528, № 1, p. 107–114.
 25. *Шушков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Улукевич М. С., Гольдацкий В. И., Несмеянов А. Е.* Получение меченых тритием биологически активных соединений.— *Доки. АН СССР*, 1976, т. 228, № 5, с. 1237–1239.
 26. *Benzer T. J., Raftery M. A.* Partial characterisation of a tetrodotoxin-binding component from nerve membrane.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, № 12, p. 3634–3637.
 27. *Colquhoun D., Henderson R., Ritchie R.* The binding of labelled tetrodotoxin to non-myelinated nerve fibers.— *J. Physiol.*, 1972, v. 227, № 1, p. 95–126.
 28. *Núñez M. T., Fischer S., Jamovich E.* A fluorimetric method to determine tetrodotoxin.— *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 2, p. 320–325.
 29. *Stewart D. J.* Sensitive automated method for phosphate and Na⁺, K⁺-ATPase.— *Anal. Biochem.*, 1974, v. 62, № 2, p. 349–362.
 30. *Blight E. G., Dyer W. J.* A rapid method of total lipid extraction and purification.— *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 1959, v. 37, № 8, p. 911–917.
 31. *Zlathis A., Zak B.* Study of a new cholesterol reagent.— *Anal. Biochem.*, 1969, v. 29, № 1, p. 143–148.
 32. *Warren L.* The thiobarbituric acid assay of sialic acids.— *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 234, № 8, p. 1971–1975.
 33. *Hodge J. E., Hofreiter B. T.* Determination of reducing sugars and carbohydrates.— In: *Methods in carbohydrate chemistry* / Eds Whistler R. L., Wolfrom M. L. New York — London: Acad. Press, 1962, v. 1, p. 380–394.

34. Hartree E. F. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.— *Anal. Biochem.* 1972, v. 72, № 2, p. 422–427.
35. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— *Nature*, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.
36. Kasai M., Changeux J.-P. In vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. I. Pharmacological properties of the excitable membrane fragments.— *J. Membrane Biol.*, 1971, v. 6, № 1, p. 1–23.
37. Gasko O. D., Knowles A. F., Shertzer H. G., Suolinna E.-M., Racker E. The use of ion-exchange resins for studying ion transport in biological systems.— *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1/2, p. 57–65.
38. Sims P. J., Waggoner A. S., Wang C.-H., Hoffman J. F. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidyl choline vesicles.— *Biochemistry*, 1964, v. 13, № 16, p. 3315–3330.
39. Печатников В. А., Ризванов Ф. Ф., Лёкова М. Н., Плетнев В. В., Афанасьев В. Н. Исследование проницаемости саркоплазматического ретикулума с помощью флуоресцентных зондов.— *Биофизика*, 1980, т. 25, вып. 6, с. 1048–1055.

Поступила в редакцию
22.IV.1981

**MOLECULAR ORGANIZATION OF ELECTRICALLY EXCITABLE MEMBRANE.
I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLASMA MEMBRANE
FRACTIONS FROM KAMCHATKA CRAB NERVES**

KOVALENKO V. A., PASHKOV V. N., GRISHIN E. V.

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

An isolation procedure for membranes from the Kamchatka crab nerve fibres was developed. Three different membrane fractions were obtained on sucrose density gradient sedimentation and characterized in respect of the enzymatic markers, protein patterns, lipid and carbohydrate content. It was found that the lightest fraction was enriched in plasma membranes and possessed a high level of lipid content as well as of tetrodotoxin binding sites (more than 4 pmole of tetrodotoxin per mg of protein). So, the crab nerve fibres can be used as a suitable source for large scale isolation of axonal membranes having a high content of fast sodium channels. To study the influence of different neurotoxins on the ionic channels, the passive permeability of two vesicle fractions of plasma membranes for physiologically important ions was investigated. The artificial membrane potential was reconstituted in crab nerve membrane vesicles. Treatment of the membrane vesicles with different neurotoxins that selectively affect fast sodium channels did not influence their ion permeability.