



УДК 577.11:595.3.088:547.993

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОВЗБУДИМОЙ  
МЕМБРАНЫ****II. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА РЕЦЕПТОРОВ  
ТЕТРОДОТОКСИНА ИЗ АКСОНАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ КРАБА***Говаленко В. А., Пашиков В. Н., Гришин Е. В.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина  
Академии наук СССР, Москва*

Исследована возможность использования тритона X-100, дезоксихолата и холата натрия, дигитонина, октил- $\beta$ -глюкопиранозида и луброла РХ для солюбилизации рецепторов тетродотоксина из аксональной мембраны камчатского краба. Обнаружена высокая лабильность солюбилизированных рецепторов тетродотоксина. Солюбилизация тритоном X-100, дезоксихолатом натрия и октил- $\beta$ -глюкопиранозидом сопровождается полной инактивацией рецепторов, в то время как холат натрия и дигитонин солюбилизируют их недостаточно эффективно. Наиболее подходит для солюбилизации луброл РХ. Показано, что в присутствии тетродотоксина инактивация его рецепторов замедляется. При фракционировании аксональных мембран, солюбилизированных лубролом РХ, гель-хроматографией, седиментацией в градиенте концентрации сахарозы и ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе обнаружена корреляция между рецептором тетродотоксина и белками с молекулярным весом 77 000, 85 000 и 230 000. Седиментационный анализ выявил существование двух типов рецепторов тетродотоксина с коэффициентами седиментации  $\sim 9,5S$  и  $\sim 16S$ .

Исследование молекулярного механизма передачи нервного возбуждения предусматривает выделение и характеристику компонентов ионных каналов, в первую очередь быстрых натриевых каналов, играющих ключевую роль в функционировании электровозбудимых мембран. Именно эти каналы являются мишенью для большой группы нейротоксинов. Для ряда нейротоксинов (тетродотоксин, сакситоксин, токсины скорпионов и анемон) в препаратах электровозбудимых мембран уже обнаружены специфичные рецепторы, представляющие собой функционально важные компоненты  $Na^+$ -каналов [1, 2]. Эти нейротоксины сейчас служат ценными инструментами для исследования молекулярной организации  $Na^+$ -каналов.

В настоящее время наибольший прогресс достигнут в изучении рецепторов тетродотоксина (ТТХ) и сакситоксина (СТХ). Эти рецепторы, общие для обоих токсинов, расположены на внешней стороне мембраны и, скорее всего, входят в состав структуры, непосредственно образующей ионный канал. Хотя рецепторы ТТХ удалось солюбилизировать еще в 1972 г. [3, 4], их дальнейшая очистка и биохимический анализ тормозилась высокой лабильностью солюбилизированных препаратов [5]. Существенные успехи в очистке рецепторов ТТХ из электрической ткани рыб были достигнуты в 1978 г., когда было найдено, что стабильность солюби-

Принятые сокращения: ТТХ – тетродотоксин, СТХ – сакситоксин, SDS – додецил-сульфат натрия.

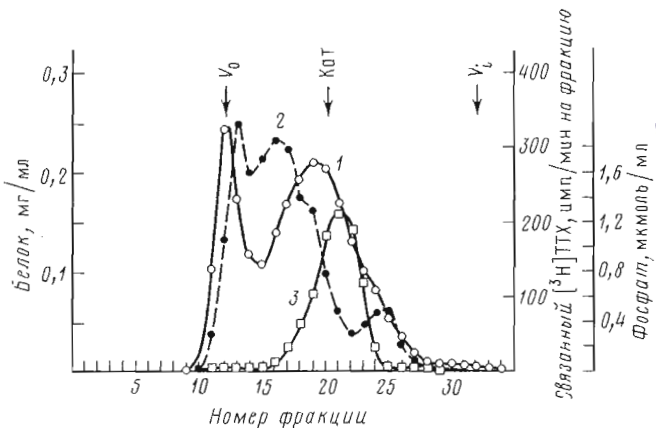


Рис. 1. Кривые элюции белка (1), рецепторов ТТХ (2) и фосфолипидов (3) (определена в отдельном опыте в отсутствие лецитина в элюирующем растворе) при хроматографии на сефарозе CL-6В мембран, солюбилизованных лубролом РХ (колонка (1×4 см) уравновешена с раствором, содержащим 0,1% луброла РХ, лецитин (0,16 моль/моль луброла), 100 мМ холияхлорид, 20 мМ трис-НСl (рН 7,8) и  $5 \cdot 10^{-8}$  М [ $^3\text{H}$ ]ТТХ; наносили 1,2 мл солюбилизата, содержащего 1,8 мг/мл белка, 1% луброла РХ и  $10^{-7}$  М [ $^3\text{H}$ ]ТТХ; скорость элюции 14 мл/ч; объем фракций 1 мл). На хроматограмме отмечен выход голубого декстрана ( $V_0$ ), каталазы (Kat) и ДНФ-аланина ( $V_1$ )

лизированных рецепторов значительно возрастает, если в среде присутствуют лецитин или некоторые другие фосфолипиды [5, 6]. Этот способ стабилизации позволил недавно очистить рецепторы STX из мембраны скелетных мышц [7].

В предыдущей работе [8] сообщалось о выделении и характеристике фракций аксональной мембраны камчатского краба, включая определение в них содержания рецепторов ТТХ. Было показано, что эти мембраны пригодны для выделения компонентов ионных каналов. Настоящая работа посвящена исследованию условий солюбилизации аксональной мембраны, стабильности солюбилизованных рецепторов ТТХ и первым этапам выделения этих рецепторов. Выделение мембранной фракции из нервов краба, использованной в большинстве экспериментов, проводилось на основе метода, описанного в работе [8], который был несколько модифицирован для более полного использования рецепторных компонентов. Эта фракция на 1 мг белка связывает  $\sim 2,5$  пмоль [ $^3\text{H}$ ]ТТХ и содержит 1,5–1,6 мкмоль липидного фосфата.

Для солюбилизации рецепторов ТТХ были испробованы некоторые из наиболее часто применяемых детергентов. Тритон X-100 (1–1,5%), дезоксихолат натрия (0,5–1%) и октил- $\beta$ -глюкопиранозид (1%) солюбилизируют до 70% мембранного белка, но полностью инактивируют рецептор даже в присутствии  $10^{-7}$  М ТТХ. Удаление дезоксихолата натрия диализом не приводило к восстановлению способности препарата связывать ТТХ. Дигитонин (2%) позволил солюбилизовать только 36% белка и приблизительно такую же долю рецепторов ТТХ. Более эффективным был холат натрия (2–2,5%), который солюбилизировал до 50% белка и рецепторной активности. Фракционирование холатного экстракта с помощью сульфата аммония вызывало полную инактивацию рецепторов. Обработка аксональных мембран 8% раствором *n*-бутанола при рН 8,0 приводила к солюбилизации только 23% белка и полностью инактивировала рецепторы ТТХ.

Наиболее удовлетворительный результат был получен при использовании луброла РХ (1–1,5%) в трис-НСl-буфере при рН 8,0. В этих условиях степень солюбилизации белка достигала 60%, а рецептора ТТХ — 70%. В полученных таким методом растворах при 4° С и рН 7,8 половина рецепторов ТТХ инактивируется примерно за 2 ч, что указывает на большую

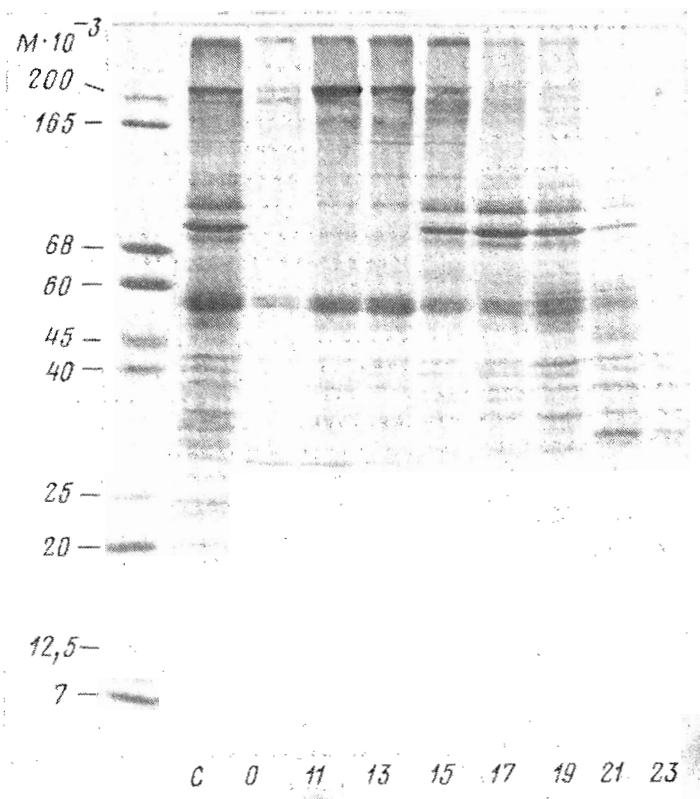
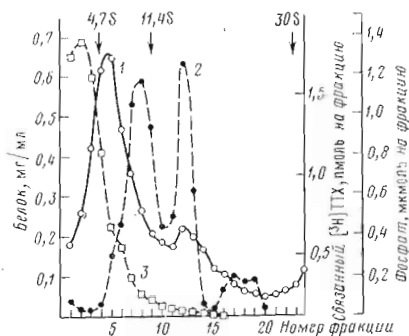


Рис. 2. SDS-электрофорез хроматографических фракций в градиентном (10–17%) полиакриламидном геле. Нумерация отвечает хроматографическим фракциям на рис. 1; *C* – исходный солюбилизиат; *O* – осадок после центрифугирования солюбилизиата (1 ч при 100 000 *g*); слева – смесь стандартных белков (в скобках  $M \cdot 10^3$ ): миозин (200),  $\beta$ -субъединица РНК-полимеразы (165), сывороточный альбумин быка (68), каталаза (60), овальбумин (45), альдолаза (40);  $\alpha$ -химотрипсиноген (25),  $\gamma$ -кристаллин (20), цитохром *c* (12,5), цитотоксин II из яда кобры (7)

лабильность рецепторов аксональной мембраны краба по сравнению с рецепторами электрической ткани [5, 6]. Время жизни рецепторов немного повышается в присутствии таких солей, как 0,1–0,2 М NaCl, NaF, холинхлорид. На стабильность солюбилизованных рецепторов ТТХ в нефракционированном солюбилизиате не влияла замена трис-буфера на фосфатный, а также введение дитиотреита (2 мМ), глицерина (10%), сахарозы (10–20%), аргинина (10 мМ), тиаминдифосфата (5 мМ),  $\alpha$ -токоферола (1 мМ), EDTA (1 мМ), фенилметилсульфонилфторида (0,1 мМ), алкалоидных нейротоксинов вератридина (0,1 мМ) и акопитина (0,1 мМ), а также местного анестетика новокаина (5 мМ). Фосфорилирование аксональных мембран краба перед их солюбилизацией с помощью АТР [9] или неорганического фосфата [10], как и присутствие АТР в солюбилизиате, также не изменяет кинетику инактивации рецепторов ТТХ. Известно, что примеси в коммерческих препаратах неионных детергентов, способные окислять сульфгидрильные группы, могут влиять на свойства солюбилизованных белков [11]. Однако очистка луброла РХ от таких примесей не привела к изменению стабильности рецепторов ТТХ.

Стабильность рецепторов ТТХ значительно возрастает, если солюбилизацию проводить в присутствии  $5 \cdot 10^{-8}$  –  $10^{-7}$  М ТТХ. В этом случае время полуинактивации при 0–1° С составляло около 20–30 ч. Что касается лецитина, то его введение существенно не стабилизирует рецепторы в процессе их солюбилизации (ср. [6]), однако было полезно на последующих

Рис. 3. Кривые седimentации белка (1), рецепторов ТТХ (2) и фосфолипидов (3) при седimentации солиобилизованных мембран в сахарозном градиенте (5–20% сахарозы в растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,8), 0,1% луброла РХ, лецитин (0,16 моль/моль луброла) и  $5 \cdot 10^{-8}$  М  $[^3\text{H}]\text{ТТХ}$ ; центрифугирование в роторе SW-41 (Beckman, США), 8,5 ч, 2° С, 39 000 об/мин). Стрелками указано положение стандартов: сывороточного альбумина быка (4,7S), каталазы (11,4S) и малой субъединицы рибосом *E. coli* (30S)



стадиях очистки (ср. [12, 13]). При введении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  до концентрации 5 мМ инактивация солиобилизованных рецепторов ТТХ аксональной мембраны краба ускоряется независимо от присутствия лецитина (ср. [14]). Время жизни солиобилизованных рецепторов можно увеличить в 10 раз, понижая концентрацию луброла РХ путем его сорбции на смоле Amberlite XAD-4 [15]. Однако при этом изменяются хроматографические свойства рецепторов, вероятно, за счет их агрегации между собой и/или с другими мембранными компонентами. Хотя этот эффект мешал принятым нами методам очистки, такой способ стабилизации представляется весьма перспективным и может найти применение при разработке других способов выделения рецепторов. Способом стабилизации рецепторов ТТХ, наиболее пригодным для процедур фракционирования, описанных в данной работе, оказалось введение ТТХ как в солиобилизат, так и во все растворы на последующих стадиях очистки. Кроме того, для уменьшения скорости инактивации на всех стадиях очистки использовались растворы, содержащие не более 0,1% луброла РХ и лецитин (0,16 моль/моль луброла).

В качестве одного из наиболее быстрых способов фракционирования солиобилизованных мембран была выбрана гель-хроматография. Данные разделения луброльного экстракта на сефарозе CL-6B (рис. 1) показывают, что рецептор ТТХ присутствует в двух фракциях (общий выход рецептора составляет ~50%). Первая фракция выходит из колошки практически одновременно со свободным объемом, а вторая в максимуме соответствует глобулярным белкам с радиусом Стокса 100–120 Å [16]. Эти данные можно использовать лишь для очень приблизительной оценки молекулярного веса рецептора, так как в большинстве случаев хроматографическое поведение мембранных белков зависит от количества связанного детергента, асимметрии молекул и степени их агрегации. Если сравнить результаты хроматографии и SDS-электрофореза (рис. 2), видно, что в первом случае кажущийся молекулярный вес белков заметно больше. Подавляющая доля фосфолипидов при гель-хроматографии четко отделяется от основной массы белка и рецепторов ТТХ.

При седimentации в градиенте сахарозы аксональных мембран, солиобилизованных лубролом, наблюдаются две фракции, связывающие ТТХ (рис. 3). Если припять калибровку по стандартным белкам, одна из этих фракций имеет коэффициент седimentации ~9,5S, а другая ~16S и совпадает с минорным пиком белка. Хотя седimentационное фракционирование продолжительнее хроматографического, инактивация рецепторов при нем меньше (<30%). Этим методом достигается примерно 10-кратная очистка рецепторов ТТХ. Фракция 16S имеет относительно простой полипептидный состав. Доминирующими являются белки, имеющие молекулярный вес 77 000, 85 000, 70 000, 200 000 и 230 000. Из них во фракции 9,5S присутствуют также в качестве доминирующих белки с молекулярным весом 77 000, 85 000, 200 000 и 230 000, однако в целом эта фракция более гетерогенна (см. рис. 4).

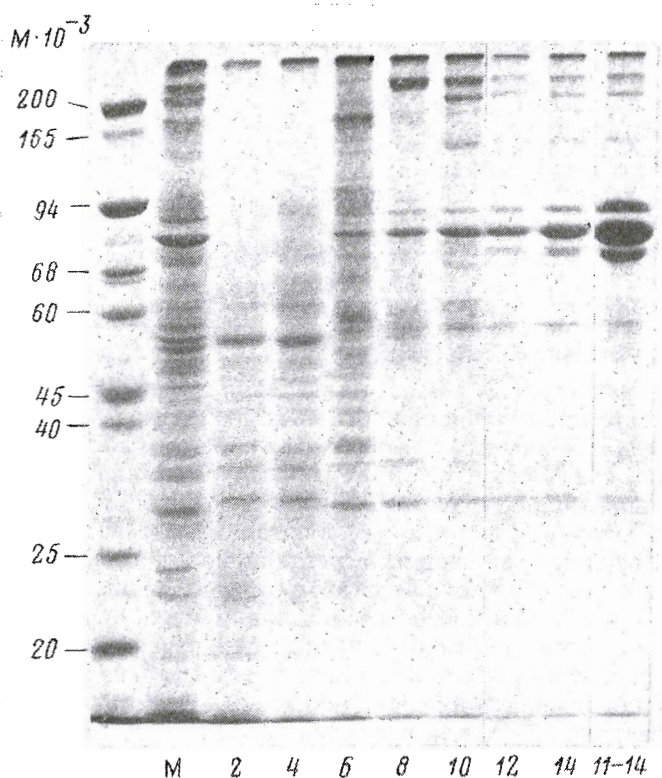


Рис. 4. SDS-электрофорез в 10% полиакриламидном геле фракций, полученных при седиментации солиобилизованных мембран (нумерация соответствует фракциям на рис. 3; *M* – исходные мембраны; обозначения стандартных белков как на рис. 2; полоса 94 – фосфорилаза А)

Для выделения рецепторов ТТХ из электрической ткани Агну и сотр. [6] весьма эффективно применили ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе в присутствии лецитина, но в наших экспериментах аналогичная процедура приводила к полной инактивации рецепторов. Только при добавлении  $5 \cdot 10^{-8}$  М ТТХ в солиобилизат и элюирующие раствором, содержащим 0,1 М NaCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7,6), 0,1% луброла их доля не сорбировалась на колонке. Было найдено, что для хроматографии солиобилизованных белков аксональной мембраны более подходящим сорбентом является DEAE-сефароза CL-6B, уравновешенная с раствором, содержащим 0,1 М NaCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7,6), 0,1% луброла РХ и лецитин (0,16 моль/моль луброла). В этом случае рецепторы ТТХ сорбируются практически полностью и элюируются раствором 0,5 М NaCl (рис. 5). Однако и в этом случае инактивация рецепторов достигала 70%.

По молекулярным весам основных белков фракция, элюируемая раствором 0,5 М NaCl, идентична фракциям 9,5S и 16S, полученным при седиментационном разделении. В ней присутствуют белки с *M* 30 000, 70 000, 77 000, 85 000, 95 000 и 230 000 (рис. 6).

Пропускание солиобилизованных препаратов через колонку с конканавалин-А-сефарозой не приводит к сорбции рецепторов ТТХ на этом геле, что, по-видимому, указывает на отсутствие в молекуле рецептора ТТХ углеводных компонентов, специфичных к конканавалину А, но не исключает тем не менее гликопротеидную природу рецепторов (ср. [7]).

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о возможности солиобилизации рецепторов ТТХ аксональной мембраны камчат-

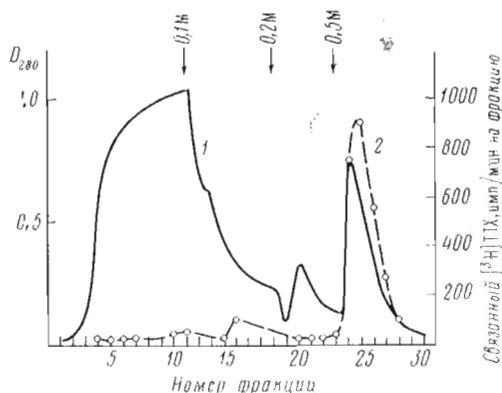


Рис. 5. Кривые поглощения при 280 нм (1) и связывания ТТХ (2) при ионообменной хроматографии солиubilизированных мембран на DEAE-сефарозе CL-6В (колонка 1,5×1,5 см) уравновешена раствором, содержащим 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 100 мМ NaCl, 0,1% луброла, лецитин (0,16 моль/моль луброла); нанесена смесь 7 мл солиubilизата, содержащего 2,3 мг/мл белка и  $10^{-7}$  М [ $^3$ H]ТТХ, с равным объемом уравновешивающего раствора; скорость нанесения и элюции 15 мл/ч; элюирующие растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,1% луброла РХ, лецитин (0,16 моль/моль луброла),  $5 \cdot 10^{-8}$  М [ $^3$ H]ТТХ и указанные концентрации NaCl)

ского краба, однако они менее стабильны, чем рецепторы из электрической ткани угря [5, 6]. Главной причиной быстрой инактивации солиubilизированных рецепторов ТТХ из нервов краба является, по-видимому, не протеолиз и окисление сульфгидрильных групп или липидов, а нарушения взаимодействия рецепторного белка с липидным окружением. В пользу этого говорит зависимость скорости инактивации от типа используемого детергента, а также данные о реконструкции  $\text{Na}^+$ -канала [17, 18] и стабилизирующем действии различных липидов [5]. Причины более высокой лабильности рецепторов ТТХ нервов краба пока не ясны, но они, по-видимому, связаны с видовыми особенностями. Известны, например, большие видовые различия в устойчивости  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-аз к инактивирующему действию детергентов [19].

Сравнение гидродинамических параметров рецепторов ТТХ из нервов краба с рецепторами из электрической ткани угря [6, 20], мозга [14, 18, 21] и скелетных мышц [13] показывает, что один из рецепторных компонентов по своему коэффициенту седиментации совпадает с рецепторами ТТХ или STX, полученными ранее [13, 14], тогда как компонент с коэффициентом седиментации 16S в прежних работах не наблюдался. Следует, однако, иметь в виду, что ранее полученные данные существенно различаются между собой (от 8–9S у рецепторов из электрической ткани угря [6, 20] до ~12S у рецепторов из мозга крысы [21]). Пока не ясно, чем определяются эти различия: видовыми особенностями объектов или методическими причинами. Имеющиеся немногочисленные сведения о белковом составе рецепторов ТТХ и STX дают некоторые основания для предположения о видовых различиях структуры рецепторов. Так, рецепторы ТТХ, выделенные из электрической ткани угря, имели основной белковый компонент с  $M$  260 000 [20], тогда как очищенные рецепторы STX из скелетных мышц состояли из белков с  $M$  53 000, 60 000 и 64 000 [7]. В нашей работе обнаруживается корреляция между содержанием рецепторов ТТХ и по крайней мере нескольких белков с  $M$  77 000, 85 000 и 230 000. Для однозначной идентификации компонентов рецепторов ТТХ необходима их более полная очистка и стабилизация в солиubilизированном состоянии. Интересно, что один из белков, содержащийся в рецепторных фракциях, совпадает по молекулярному весу (77 000) с белком, присутствующим в

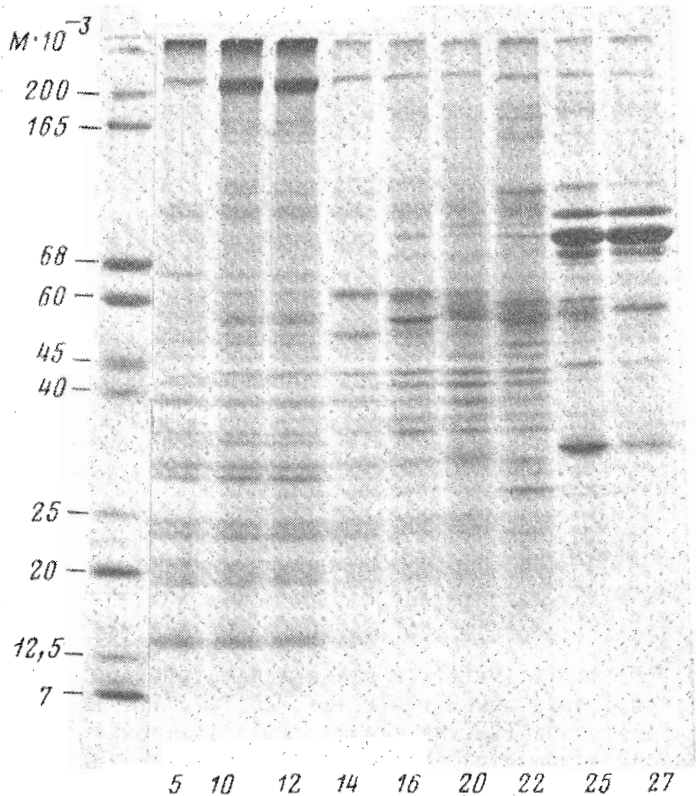


Рис. 6. SDS-электрофорез хроматографических фракций на пластинке градиентного (10–17%) полиакриламидного геля (нумерация соответствует фракциям на рис. 5; смесь стандартных белков та же, что на рис. 2)

аксональной мембране краба и других электровозбудимых мембранах, который, согласно нашим данным [22], специфично взаимодействует с токсином скорпиона.

#### Экспериментальная часть

Лецитин получен из куриных яиц по методу Синглтона и сотр. [23]. Препараты [ $^3\text{H}$ ]ТТХ имели удельную радиоактивность 0,4–0,8 Ки/ммоль [8]. Рабочий раствор хранился в замороженном состоянии и использовался в течение 1–3 мес. В работе без дополнительной очистки использовали дезоксихолат натрия, холат натрия, холинхлорид (Sigma, США), дигитонин (Fluka, Швейцария), октил- $\beta$ -глюкопиранозид (Serva, ФРГ).

Растворы луброла РХ, тритона Х-100 и сахарозы деионизовали на смоле Ag501 $\times$ 8D (Bio-Rad, США). Деионизованные растворы детергентов хранили в замороженном виде и перед использованием подвергали повторной деионизации. Проводимость 20% раствора луброла РХ обычно составляла 3–8 мксм. Такой раствор содержал около 20% исходного количества примесей, окисляющих сульфгидрильные группы [11]. Дальнейшая очистка луброла РХ хроматографией на силикагеле [11] приводила к практически полному удалению этих примесей.

Нервы получали из ходильных ног и клешней камчатских крабов *Paralithodes camtschatica*, выловленных в зал. Петра Великого в сентябре-октябре 1979 г. и январе 1980 г. После препарирования нервы сохраняли в холодной морской воде до 1 ч, а затем замораживали в жидком азоте. Замороженные препараты хранили в закрытых полиэтиленовых флаконах при  $-50^\circ\text{C}$ .

*Выделение мембран* проводили, используя модификацию метода, описанного в предыдущей статье [8]. К гомогенату нервов добавляли сахарозу до концентрации 28% и затем проводили центрифугирование в течение 30 мин со скоростью 18 000 об./мин (Sorvall, США; ротор SS-34). Супернатант разбавляли раствором 10 мМ трис-НСl (рН 7,8) так, чтобы концентрация сахарозы составляла 0,32 М, и центрифугировали 90 мин при 32 000 об./мин (Beckman, США; ротор 35). Осадок, суспендированный в растворе 20 мМ трис-НСl (рН 7,8; концентрация белка 5–8 мг/мл), хранили при 0° С и использовали в течение недели.

*Солюбилизацию* проводили при 2–4° С в сосудах с магнитной мешалкой или в плотно закрытых пробирках на микровстряхивателе в течение 10–30 мин с последующим центрифугированием (60 мин при 100 000g). Дeterгент вводили в виде 20% раствора. Смесь лецитина с лубролом РХ приготавливали, растворяя лецитин в 20% растворе детергента. Дигитонин использовали в виде озвученного 10% раствора. В большинстве экспериментов концентрация белка составляла 3,5 мг/мл.

*Содержание рецепторов ТТХ в солюбилизованных препаратах* определяли быстрой гель-фильтрацией [24]. Порции исследуемого раствора (по 0,4 мл), содержащего  $10^{-7}$  М [ $^3$ Н]ТТХ или  $10^{-7}$  М [ $^3$ Н]ТТХ +  $4 \cdot 10^{-6}$  М ТТХ, наносили на пластиковые микроколонки PD-2 (Pharmacia, Швеция), заполненные 2,5 мл биогеля Р6 (100–200 меш), уравновешенного раствором 20 мМ трис-НСl (рН 7,8). Колонки, подвешенные в нитроцеллюлозных пробирках, центрифугировали 20 с (время разгона ~10 с) на настольной центрифуге Т-22 (Janetzki, ГДР; 2500 об./мин). Элюат (1,2–1,3 мл) смешивали с 10 мл сцинтиллятора тритозол [25]. Выход свободной метки не превышал 1% от нанесенной на колонку. Выход белка составлял от 70 до 100%. Неспецифичное (метка не вытесняется ТТХ) связывание [ $^3$ Н]ТТХ не превышало 20% в случае исходного солюбилизата и практически отсутствовало с очищенными фракциями. Для полного вытеснения ранее добавленного [ $^3$ Н]ТТХ избытком ТТХ препарат выдерживали 1 ч перед нанесением на микроколонки. Все операции проводили при 4° С.

*Определение белка* в мембранах и солюбилизатах, *определение фосфора* и *электрофорез* проводили, как описано в работе [8]. Для определения белка во фракциях с его низкой концентрацией применяли осаждение 7% трихлоруксусной кислотой в присутствии 0,015% дезоксиохолата натрия [26]. Конечный объем измеряемой пробы составлял 0,83 мл, что при использовании полумикрокувет позволяло определять до 1 мкг белка. Образцы для электрофореза приготавливали, встряхивая смесь водного раствора белка с одним объемом метанола и двумя объемами хлороформа около 2 мин и затем центрифугуя. После удаления слоя хлороформа к остатку добавляли ацетон, белок осаждали центрифугированием и растворяли в буфере для образцов. Такой способ подготовки образцов особенно удобен для фракций с низкой концентрацией белка, так как денатурируемый белок концентрируется на границе раздела фаз. Последующая обработка ацетоном позволяет количественно осадить белок и удалить посторонние вещества (сахароза, компоненты буфера и т. п.).

*Определение луброла РХ* осуществляли методом, близким к описанному в работе [27]. Для ускорения растворения осадка детергента вместо раствора 0,5 М НСl использовали смесь 11 М НСl – *n*-бутанол, 1 : 5.

*Удаление луброла РХ* на смоле Amberlite XAD-4 (Serva, ФРГ) проводили в колонке PD-10 (Pharmacia, Швеция), наполненной 3 г смолы (0,3–1 мм), которая предварительно была промыта изопропанолом, водой и раствором 20 мМ трис-НСl (рН 7,6). После двукратного пропускания со скоростью 100 мл/ч 8 мл раствора, содержащего 0,5–1% детергента, концентрация последнего уменьшалась примерно в 50 раз. Выход рецепторов с колонки был количественным, но задерживалось около 10% общего белка.

*Фосфорилирование мембран* осуществляли их инкубированием в тече-



ние 10 мин при 4° С в растворе, содержащем 10 мМ NaCl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ оубаин, 20 мМ трис-HCl (pH 7,4), 5 мкМ АТР или 10 мкМ фосфат. Реакционную смесь разбавляли в 2–3 раза раствором, содержащим 20 мМ трис-HCl (pH 7,7) и 50 мМ NaF, после чего мембраны осаждали центрифугированием (1 ч) при 100 000g. Солюбилизацию мембран проводили в этом же растворе с помощью 1% луброла РХ.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ritchie J. M.* Tetrodotoxin and saxitoxin and the sodium channels of excitable tissue.— *Trends Pharmacol. Sci.*, 1980, v. 1, p. 275–278.
2. *Catterall W. A.* Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes.— *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1980, v. 20, p. 15–43.
3. *Henderson R., Wang J. H.* Solubilization of a specific tetrodotoxin binding component from garfish olfactory nerve membrane.— *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 24, p. 4565–4569.
4. *Benzer T., Raftery M. A.* Solubilization and partial characterization of the tetrodotoxin binding component from nerve axon.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 51, № 4, p. 939–944.
5. *Agnew W. S., Raftery M. A.* Solubilized tetrodotoxin binding component from the electroplax of *Electrophorus electricus*. Stability as a function of mixed lipid-detergent micelle composition.— *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 10, p. 1912–1919.
6. *Agnew W. S., Levinson S. R., Branson J. S., Raftery M. A.* Purification of the tetrodotoxin binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 6, p. 2606–2610.
7. *Barchi R. L., Cohen S. A., Murphy L. E.* Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin binding component of the excitable membrane sodium channel.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 3, p. 1306–1310.
8. *Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В.* Молекулярная организация электровозбудимой мембраны. I. Выделение фракций плазматической мембраны из нервов камчатского краба и их характеристика.— *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 12, с. 1813–1827.
9. *Schoffeniels S., Dandrijsse G.* Protein phosphorylation and sodium conductance in nerve membrane.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 2, p. 812–816.
10. *Sieghart W., Forn J., Greengard P.* Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP regulation phosphorylation of same two membrane-associated proteins specific to nerve tissue.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 5, p. 2475–2479.
11. *Chang H. W., Bock E.* Pitfalls in the use of commercial nonionic detergents for the solubilization of integral membrane proteins: sulfhydryl oxidizing contaminants and their elimination.— *Anal. Biochem.*, 1980, v. 104, № 1, p. 112–117.
12. *Krueger B. K., Ratzlaff R. W., Strichartz G. R., Blaustein M. P.* Saxitoxin binding to synaptosomes, membranes, and solubilized binding sites from rat brain.— *J. Membrane Biol.*, 1979, v. 50, № 3/4, p. 287–310.
13. *Barchi R. L., Murphy L. E.* Size characterization of the solubilized sodium channel saxitoxin binding site from mammalian sarcolemma.— *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 597, № 2, p. 391–398.
14. *Catterall W. A., Morrow C. S., Harshorne R. P.* Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent-solubilized brain membranes.— *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 22, p. 11379–11387.
15. *Cheetham P. S. J.* Removal of triton X-100 from aqueous solution using Amberlite XAD-2.— *Anal. Biochem.*, 1979, v. 92, № 2, p. 447–452.
16. *Ackers G. K.* A new calibration procedure for gel filtration columns.— *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, № 13, p. 3237–3238.
17. *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.
18. *Goldin S. M., Rhoden V., Hess E. J.* Molecular characterization, reconstitution, and «transport-specific fractionation» of the saxitoxin binding protein/Na<sup>+</sup> gate of mammalian brain.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 11, p. 6884–6888.
19. *Brotherus J. R., Jost P. C., Griffith O. H., Hokir L. E.* Detergent inactivation of sodium- and potassium-activated adenosinetriphosphatase of the electric eel.— *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 23, p. 5043–5050.
20. *Agnew W. S., Mooke A. S., Levinson S. R., Raftery M. A.* Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 92, № 3, p. 860–866.

21. *Hartshorne R. P., Coppersmith J., Catterall W. A.* Size characteristics of the solubilized saxitoxin receptor of the voltage-sensitive sodium channel from rat brain.— *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 22, p. 10572–10575.
22. *Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А.* Природа мембранных рецепторов нейротоксина из яда скорпиона.— *Биоорганич. химия*, 1980, т. 6, № 6, с. 914–922.
23. *Singleton W. S., Gray M. S., Brown M. L., White J. L.* Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids.— *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1965, v. 42, № 1, p. 53–56.
24. *Levinson S. R., Curatalo C. J., Reed J., Raftery M. A.* A rapid and precise assay for tetrodotoxin binding to detergent extracts of excitable tissues.— *Anal. Biochem.*, 1979, v. 99, № 1, p. 72–84.
25. *Fricke U.* Tritosol: A new scintillation cocktail based on triton X-100.— *Anal. Biochem.*, 1975, v. 63, № 2, p. 555–558.
26. *Bensadoun A., Weinstein D.* Assay of proteins in the presence of interfering materials.— *Anal. Biochem.*, 1976, v. 70, № 1, p. 241–250.
27. *Jones P., Nickles G.* Characterization of non-ionic detergents of the polyethoxylated type from water systems. I. Evaluation of Amberlite XAD-4 resin as an extractant for polyethoxylated material.— *J. Chromatography*, 1978, v. 156, № 1, p. 87–97.

Поступила в редакцию  
22.IV.1981

**MOLECULAR ORGANIZATION OF ELECTRICALLY EXCITABLE MEMBRANE.  
II. SOLUBILIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF TETRODOTOXIN  
RECEPTORS FROM CRAB AXON MEMBRANE**

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

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

A solubilization of the tetrodotoxin-binding component from Kamchatka crab axon membrane by means of Triton X-100, sodium deoxycholate, sodium cholate, digitonin, octyl- $\beta$ -glucopyranoside and Lubrol PX was studied. The tetrodotoxin receptor was largely inactivated by detergents such as Triton X-100, sodium deoxycholate and octyl- $\beta$ -glucopyranoside, whereas extraction of the tetrodotoxin-binding component by sodium cholate and digitonin was not efficient. Lubrol PX appeared to be the most suitable detergent for solubilization. The receptor inactivation was found to be slowed down in the presence of tetrodotoxin. Partial purification of the tetrodotoxin-binding component was carried out by means of gel filtration, ion exchange chromatography and sucrose density gradient sedimentation. The sedimentation behavior of the tetrodotoxin receptor indicated the presence of two forms of tetrodotoxin-binding component with apparent sedimentation coefficients  $\sim 9.5$  and  $\sim 16 S$ .