

УДК 577. 37

БИОФИЗИКА

М. П. БОРИСОВА, Л. Н. ЕРМИШКИН, А. Я. ЗИЛЬБЕРШТЕЙН

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОДИНОЧНОГО КАНАЛА ПРОВОДИМОСТИ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

(Представлено академиком Г. М. Франком 25 I 1974)

За последние четыре года в ряде работ (<sup>1-4</sup>) были описаны свойства одиночных каналов ионной проводимости, образуемых в бимолекулярных липидных мембранах бактериальным рибонуклеопротеидом (<sup>5</sup>) ЕІМ (excitability inducing material). Было показано, что проводящий канал избирательно проницаем для ионов щелочных металлов, причем коэффициенты проницаемости для них относятся как соответствующие подвижности в воде (<sup>3</sup>). Канал имеет несколько состояний (от двух до четырех в зависимости от липидного состава мембраны) (<sup>4</sup>) с разной проводимостью. Канал переходит из состояния в состояние резким скачком. При больших потенциалах более вероятны состояния с меньшей проводимостью, поэтому вольт-амперная характеристика мембраны, содержащей много каналов ЕІМ, имеет участок с отрицательным дифференциальным сопротивлением (<sup>2</sup>).

Настоящая работа была предпринята с целью детального изучения свойств одиночного канала проводимости, образованного ЕІМ в липидном бислое (мембраны из раствора 67% яичного лецитина, 30% холестерина и 3% фосфатидной кислоты в концентрации 20 мг смеси липидов в 1 мл *n*-декана). ЕІМ получали из *Aerobacter cloacae* по методу, описанному Мюллером и др. (<sup>6</sup>). Мембраны образовывали на отверстии площадью 0,2 мм<sup>2</sup> в стенке тefлонового стаканчика. Обычно растворы содержали 0,1 М NaCl и 5 мМ гистидинхлорида, рН 6,8 (стандартный раствор). Ток

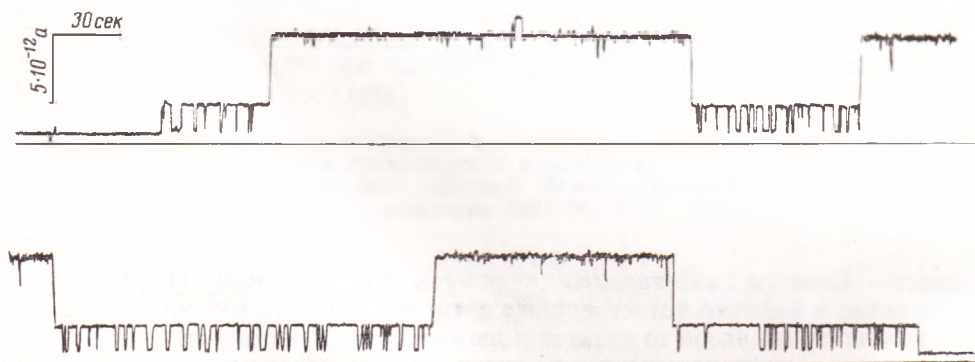


Рис. 1. Изменение во времени тока через мембрану с одним каналом ЕІМ. Нижняя запись — продолжение верхней. Растворы стандартные (см. текст). Напряжение на мембране 29 мВ. Прямые линии отмечают нуль тока

через мембрану измеряли электрометрическим усилителем У1-2 и регистрировали потенциометром КСП-4. Потенциал внутреннего раствора принят равным нулю. Мембранный потенциал всюду указан как потенциал внешнего раствора. ЕІМ вводили во внешний раствор. Все измерения проведены при комнатной температуре (20—23°).

Типичная запись тока через одиночный канал при постоянном напряжении на мембране 29 мв приведена на рис. 1. Канал имеет три дискретных состояния I, II и III с проводимостями 10, 70 и 250 пмо ( $1 \text{ пмо} = 10^{-12} \text{ ом}^{-1}$ ). В начале записи виден ток через мембрану без проводящих каналов, которая имеет проводимость 20—25 пмо. Происходят частые переходы между состояниями I и II. Значительно реже происходят переходы между состояниями II и III. Непосредственные переходы канала между состояниями I и III не наблюдались. Средние времена жизни в состояниях I, II и III равны соответственно 0,8; 3,3 и 140 сек.

На рис. 1 показана только часть записи, продолжавшейся 40 мин. За это время характер переходов не изменился, а величины проводимости канала в трех состояниях в конце измерения были такими же, как и в начале. За 40 мин. канал совершил более 500 переходов из состояния I в II и столько же обратных переходов. На рис. 2 приведены гистограммы, показывающие распределение времени жизни канала в состояниях I и II. Огибающая каждой гистограммы хорошо аппроксимируется одной экспонентой, что указывает на случайный характер переключений; иными словами, вероятность перехода не зависит от времени жизни канала в исходном состоянии. При мембранном потенциале 29 мв вероятность перехода за 1 сек. из I

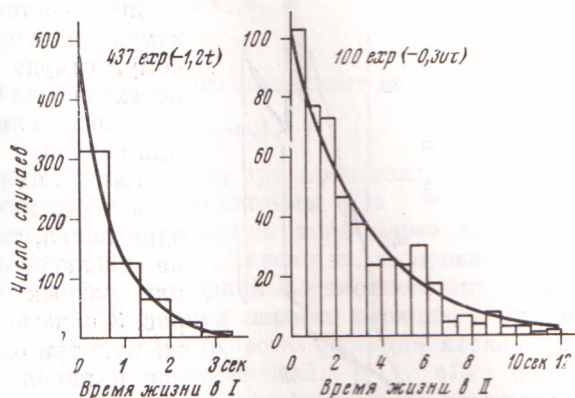


Рис. 2. Гистограммы времени жизни канала в состоянии I и II. Канал тот же, что и на рис. 1. Амплитуды и постоянные времени экспонент найдены из соответствующих графиков в полулогарифмическом масштабе

распределение времени жизни канала в состояниях I и II. Огибающая каждой гистограммы хорошо аппроксимируется одной экспонентой, что указывает на случайный характер переключений; иными словами, вероятность перехода не зависит от времени жизни канала в исходном состоянии. При мембранном потенциале 29 мв вероятность перехода за 1 сек. из I

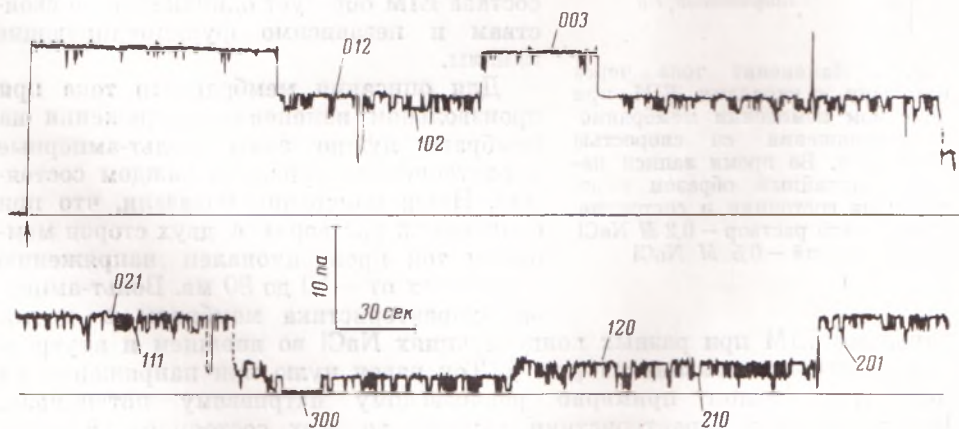


Рис. 3. Изменение во времени тока через мембрану с тремя каналами ЕИМ. В момент, указанный стрелкой, включено постоянное напряжение 20 мв. Нижняя запись — продолжение верхней. Растворы стандартные. Тройки цифр около стрелок показывают комбинации состояний трех каналов в данный момент

в II равна  $1,2 \text{ сек}^{-1}$ , вероятность обратного перехода  $0,30 \text{ сек}^{-1}$ . Обе вероятности слабо зависят от мембранного потенциала. Напротив, вероятности переходов между состояниями II и III сильно зависят от приложенного к мембране напряжения. Поскольку переходы между II и III очень редки, не удастся количественно охарактеризовать эту зависимость. Каче-

ственно эта зависимость была исследована на мембране, содержащей около 20 каналов. После приложения 60 мв наблюдается спад тока во времени, связанный со сдвигом равновесия между состояниями II и III в сторону менее проводящего состояния II. О переключении состояний свидетельствует большой уровень шума тока. После скачкообразного изменения напряжения от 60 до 13 мв ток нарастает за счет перехода части каналов в высоко проводящее состояние III. При этом характер изменений тока близок к экспоненциальному, откуда следует, что вероятности перехода между состояниями II и III тоже не зависят или слабо зависят от предыстории канала.

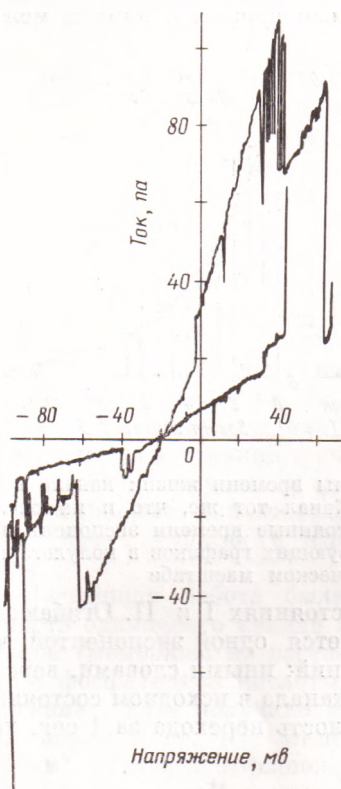


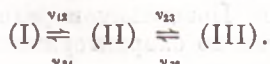
Рис. 4. Изменение тока через мембрану с каналами ЕИМ при линейном изменении мембранного напряжения со скоростью 25 мв/мин. Во время записи каналы случайным образом переходят из состояния в состояние. Внутренний раствор — 0,2 М NaCl, внешний — 0,5 М NaCl

каналами ЕИМ при разных концентрациях NaCl во внешнем и внутреннем растворах показана на рис. 4. Ток равен нулю при напряжении на мембране, равном примерно равновесному натриевому потенциалу. Вольт-амперные характеристики каналов во всех состояниях линейны. Ток через мембрану с большим числом каналов равен

$$I = n_1 I_1 + n_2 I_2 + n_3 I_3, \quad (1)$$

где  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  — число каналов в состояниях I, II и III соответственно;  $I_1$ ,  $I_2$  и  $I_3$  — токи через канал в трех состояниях. В нашем случае  $I_j = g_j(\varphi - \varphi_0)$ , где  $g_j$  и  $\varphi_0$  — функции концентраций проникающих ионов.

Переходы канала из состояния в состояние можно представить в виде линейного графа



Запись на рис. 1 показывает изменения тока через мембрану, содержащую только один канал, так как на этой записи нигде не наблюдается наложения одинаковых или разных уровней проводимости. На рис. 3 показан ток через мембрану, содержащую три одинаковых канала, таких же, как и канал на рис. 1. Такая мембрана может иметь уже десять дискретных уровней проводимости. Стрелки на записи показывают различные уровни проводимости. Тройки цифр около стрелок указывают комбинации состояний трех каналов. Например, 201 означает, что два канала находятся в первом состоянии, каналов в состоянии II нет и один канал — в состоянии III. На записи наблюдаются все возможные комбинации кроме 030. Отсюда следует, что в мембранах данного липидного состава ЕИМ образует одинаковые по свойствам и независимо функционирующие каналы.

Для описания мембранного тока при произвольном изменении напряжения на мембране нужно знать вольт-амперные характеристики канала в каждом состоянии. Наши измерения показали, что при одинаковых растворах с двух сторон мембраны ток пропорционален напряжению в пределах от —80 до 80 мв. Вольт-амперная характеристика мембраны с двумя



Вероятности переходов между состояниями  $v_{jk}$  не зависят от времени жизни в исходном состоянии и мгновенно принимают новые значения при изменении напряжения на мембране. Если в мембране имеется постоянное число  $N$  каналов ( $n_1+n_2+n_3=N$ ), то в соответствии с графом изменения во времени числа каналов в трех состояниях описывается системой уравнений

$$\begin{aligned}\dot{n}_1 &= -v_{12}n_1 + v_{21}n_2, \\ \dot{n}_2 &= v_{12}n_1 - (v_{23} + v_{21})n_2 + v_{32}n_3, \\ \dot{n}_3 &= v_{23}n_2 - v_{32}n_3.\end{aligned}\quad (2)$$

Окончательное выражение для мембранного тока имеет вид

$$I = (n_1g_1 + n_2g_2 + n_3g_3)(\varphi - \varphi_0), \quad (3)$$

где зависящие от времени значения  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  при произвольном изменении мембранного потенциала определяются из системы (2).

Хочется отметить, что формальное описание тока через мембрану с ЕИМ не совпадает с моделью Ходжкина — Хаксли, т. е. проводимость представляется не как степенная функция одной переменной, определяемой линейным дифференциальным уравнением первого порядка, и не как произведение таких функций. Проводимость есть функция нескольких переменных, связанных системой линейных уравнений.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пуццано-на-Оке

Поступило  
17 I 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. C. Bean, W. C. Shepherd et al., J. Gen. Physiol., v. 53, 741 (1969). <sup>2</sup> G. Ehrenstein, H. Lecar, R. Nossal, J. Gen. Physiol., v. 55, 119 (1970). <sup>3</sup> R. La Torre, G. Ehrenstein, H. Lecar, J. Gen. Physiol., v. 60, 72 (1972). <sup>4</sup> R. C. Bean, J. Membr. Biol., v. 7, 15 (1972). <sup>5</sup> L. D. Kushnir, Biochim. et biophys. acta, v. 150, 285 (1968). <sup>6</sup> P. Mueller, J. Phys. Chem., v. 67, 534 (1963).