



УДК 577.112.5:595.44-114.5.088

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ЯДА ПОГРЕБНОГО
ПАУКА *SEGESTRIA FLORENTINA*Сагдиев Н. Ж., Валиева Л. А., Корнеев А. С.,
Садыков А. А., Салихов Ш. И.

Институт биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент

Из яда погребного паука *Segestria florentina* выделены два нейротоксина и инсектотоксин. Гомогенность их доказана с помощью диск-электрофореза, изоэлектрического фокусирования и анализа N-концевых аминокислотных остатков. Показано, что выделенные нейротоксины представляют собой полипептиды с молекулярной массой ~5000 Да. Для инсектотоксина, содержащего 35 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 3988 Да установлена полная первичная структура.

Уникальные свойства нейротоксинов позволили в последнее время успешно использовать их в качестве своеобразных «инструментов» для анализа организации и функционирования биологических мембран. К настоящему времени описана большая группа белковых токсинов, специфически взаимодействующих с потенциалчувствительными Na-каналами возбудимых мембран. К этой группе относятся нейротоксины, выделенные из ядов скорпионов и морских актиний, избирательно действующие на определенные систематические группы животных, вызывая деполяризацию возбудимых мембран [1], усиление секреции медиатора [2] и prolongation потенциала действия за счет инактивации Na-каналов [3]. Недавно обнаружено, что аналогичные эффекты вызывает цельный яд паука *Segestria florentina* [4]. В настоящей работе проведено исследование физико-химических свойств цельного яда паука *S. florentina*, выделение и характеристика индивидуальных физиологически активных компонентов яда, изучение их свойств и строения.

Цельный яд паука *S. florentina* влияет на потенциал действия поверхностных волокон портняжной мышцы лягушки [4], вызывает паралич тараканов при внутрибрюшинном введении и не обладает гемолитической, холинестеразной и протеолитической активностями. Анализ цельного яда с помощью электрофореза и изоэлектрического фокусирования обнаружил не менее 25 компонентов белково-пептидной природы. По-видимому, в цельном яде содержится несколько веществ с различной функцией, которые целесообразно было бы выделить в индивидуальном состоянии и изучить.

Для оценки молекулярной массы активных компонентов цельного яда была проведена гель-фильтрация на предварительно калиброванной колонке с сефадексом G-100. Определение биологической активности показало, что эффекты цельного яда, а именно prolongation потенциалов действия за счет замедления инактивации натриевого канала, воспроизводят компоненты с молекулярной массой менее 10 000 Да. Препаративное разделение цельного ядра проводили методом гель-фильтрации на колонке с гидрофильным гелем Тоуо Pearl HW 55F (рис. 1). При этом оказалось целесообразным использовать летучие буферы с низкой молярностью, так как при этом существенно улучшается разрешающая способность данного геля. Как видно из рис. 1, при гель-фильтрации было получено 11 фракций. Исследование их биологических свойств показало, что фракции A₆ и A₇ обладали наибольшей нейротоксической активностью на портняжной мышце лягушки, а фракция A₁₁ не обладала нейротоксической активностью, но вызывала паралич тараканов.

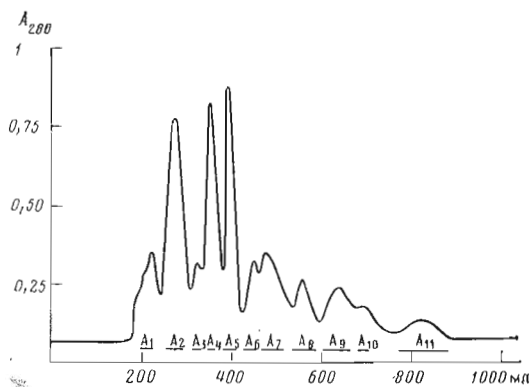


Рис. 1

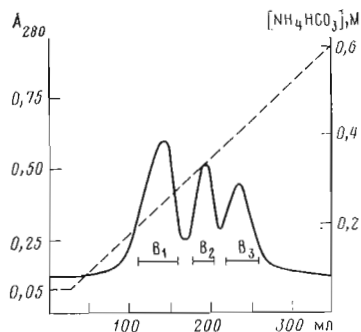


Рис. 2

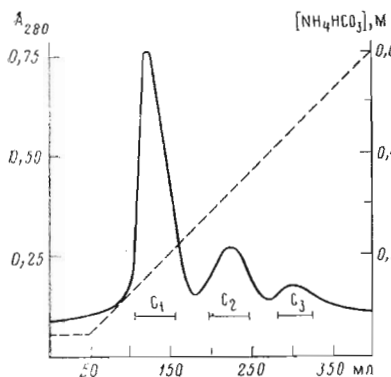


Рис. 3

Рис. 1. Гель-фильтрация цельного яда паука *S. florentina* (340,0 мг) на колонке (2,6×100 см) с гелем Toyo Pearl HW 55 F в 0,05 М NH_4HCO_3 , pH 8,2. Скорость потока 60 мл/ч

Рис. 2. Ионообменная хроматография фракции A_6 (см. рис. 1) на колонке (1,5×10 см) с QAE-A-25-сефадексом в градиенте концентрации NH_4HCO_3 , pH 8,2. Скорость потока 10 мл/ч

Рис. 3. Ионообменная хроматография фракции A_7 (см. рис. 1) на колонке (1,5×10 см) с QAE-A-25-сефадексом в градиенте концентрации NH_4HCO_3 , pH 8,2. Скорость потока 10 мл/ч

По данным изоэлектрического фокусирования, фракции A_6 и A_7 содержали в себе по три компонента с кислыми и нейтральными значениями pI , а фракция A_{11} представляла собой практически гомогенный полипептид, обозначенный нами как SIT, с pI 5,6. Исходя из данных изоэлектрического фокусирования, дальнейшее разделение фракций A_6 и A_7 проводили с помощью ионообменной хроматографии. Ранее, при разделении фракции A_6 на DEAE-целлюлозе, были получены две фракции, причем активностью обладала лишь фракция, элюируемая 0,15 М NH_4HCO_3 , pH 8,2, которая содержала в себе гомогенный нейротоксин с изоэлектрической точкой 4,75 [5]. Однако выход токсина, обозначенного нами как Sf-1, был низким (0,35%). С целью увеличения выхода нейротоксина для очистки фракции A_6 была использована хроматография на QAE-A-25-сефадексе в градиенте молярности аммоний-бикарбонатного буфера с pH 8,2 (рис. 2). В результате были получены три фракции, из которых лишь фракция B_3 обладала нейротоксической активностью и содержала нейротоксин Sf-1 в гомогенном состоянии. Выход пептида составил 0,5%.

Для разделения фракции A_7 был также использован QAE-A-25-сефадекс. В результате разделения были получены три фракции (рис. 3), из которых нейротоксической активностью обладали фракции C_1 и C_3 . Фракция C_1 представляла собой гомогенный нейротоксин, названный нами Sf-2, с pI 6,0, а фракция C_3 являлась нейротоксином Sf-1, идентифицированным по физико-химическим параметрам (изоэлектрическому фокусированию, аминокислотному анализу и N-концевой аминокислоте).

Нейротоксическое действие токсинов исследовали в опытах на нервно-мышечном препарате портняжной мышцы лягушки. Нейротоксин Sf-1 в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ г/мл вызывал увеличение амплитуды потенциалов концевой пластинки в 3 раза в течение 20 мин, что связано с увеличением потенциала действия, приходящего в нервное окончание [5], а нейротоксин Sf-2 в той же концентрации постепенно снижал амплитуду ПКТП

**Аминокислотный состав химо триптических пептидов
инсектотоксина SIT**

Аминокислота	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5
Cys (Cm)	0,71 (1)	1,15 (2)	0,68 (1)		
Asp	1,85 (2)	4,28 (4)		1,25 (1)	
Thr		0,85 (1)			
Ser	4,06 (1)		1,15 (1)		
Glu	2,18 (2)				1,23 (1)
Pro				1,08 (1)	
Gly		2,52 (2)			
Ala			1,02 (1)	1,03 (1)	
Val	1,73 (2)				
Met	0,65 (1)				
Ile		0,77 (1)			
Leu		0,95 (1)			0,95 (1)
Tyr	0,84 (1)				
Phe					
His			0,93 (1)		
Lys		0,86 (1)	0,85 (1)		
Arg	1,35 (1)		1,20 (1)		
Trp				(1)	
Всего	11	12	6	4	2
N-Концевая	Arg	Ile	Arg	Ala	Glu

Таблица 3

**Структура химо триптических пептидов инсектотоксина из яда паука
*Segestria florentina***

Анализируемый пептид	Результаты анализа
Ch-1	Arg-Gln-Asp-Met-Val-Asp-(Glu, Ser, Val, Cys (Cm), Tyr)
Ch-2	Ile-Thr-Asp-Asn-Asn-Cys (Cm)-Asn-(Gly ₂ , Lys, Cys (Cm), Leu)
Ch-3	Arg-Ser-Lys-Ala-Cys (Cm)-His
Ch-4	Ala-Asp-Pro-Trp
Ch-5	Glu-Leu

Для инсектотоксина SIT нами установлена полная аминокислотная последовательность с использованием классических приемов и методов определения структуры белков. Первоначально проводили восстановление дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп монодуксусной кислотой. Деградацию нерасщепленного CM-SIT* осуществляли на автоматическом жидкофазном секвенаторе (рис. 4). С помощью карбоксипептидазы Y удалось установить C-концевую последовательность CM-SIT: -Cys-His-Ala-Asp-Pro-Trp-Glu-Leu-OH.

С целью определения неидентифицированных аминокислот в структуре CM-SIT проводили расщепление его полипептидной цепи с помощью химо трипсина. Разделение полученной смеси пептидов осуществляли ВЭЖХ на колонке Zorbax PSM60 (рис. 5). Каждая фракция была охарактеризована тонкослойной хроматографией на целлюлозе. Для окрашивания пептидов, содержащих остатки Trp, Tyr и His, были использованы качественные цветные реакции. Аминокислотный состав пептидов определяли после элюции с целлюлозных пластинок и гидролиза их в смеси соляной и трифторуксусной кислот (табл. 2). Результаты определения структуры пептидных фрагментов (табл. 3), данные, полученные с секвенатора, и данные по C-концевому анализу позволили реконструировать полную аминокислотную последовательность молекулы SIT (рис. 4).

* CM-SIT – карбоксиметилированный инсектотоксин SIT.

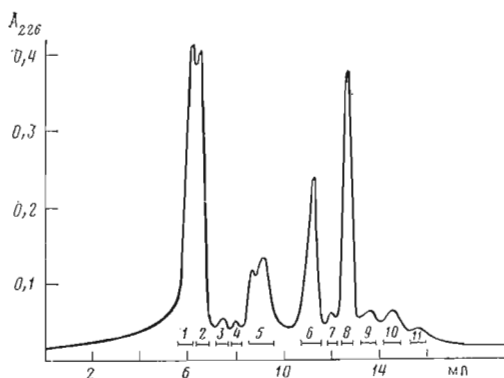


Рис. 5. Разделение химотриптических пептидов на колонке (0,62×60 см) Zorbax PSM 60 в 0,1% трифторуксусной кислоте с 1% *n*-пропанола. Скорость потока 1 мл/мин

Экспериментальная часть

В работе использован химотрипсин (Worthington, США), карбоксипептидаза Y (Sigma, США). Для хроматографии применяли сефадекс G-100, сефадекс QAE A-25 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия), гель Toy Pearl HW 55F (Toyo Soda, Япония), целлюлозные пластинки размером 20×20 см (Merck, ФРГ). Разделение химотриптических пептидов ВЭЖХ осуществляли на хроматографе 8800 (Du Pont, США), использовали колонку Zorbax PSM 60 (Du Pont, США).

Цельный яд паука *S. florentina* получали электрической стимуляцией челющей, лиофильно высушивали и использовали в работе. Сухой яд хранился до использования при 0°С в течение нескольких месяцев без заметной потери биологической активности.

Об активности цельного яда и полученных фракций судили по их влиянию на параметры потенциалов действия поверхностных волокон портянковой мышцы лягушки, отводимых при помощи микроэлектродов, заполненных 3 М раствором KCl (10–20 мОм). Нейротоксическое действие гомогенных токсинов исследовали в опытах на нервно-мышечном препарате портянковой мышцы лягушки.

Потенциалы концевой пластинки регистрировали внутриклеточно с использованием стандартной микроэлектродной техники [6, 7]. Инсектотоксичность определяли введением водного раствора яда и отдельных фракций тараканам *Nauphoeta cinerea* (Olivier) в брюшко под третий сегмент [8]. При тестировании на насекомых проводили оценку дозы D_{100} , вызывающей устойчивый паралич у 100% особей.

Гемолитическую активность цельного яда определяли по методу Димика [9] с использованием крови крысы, стабилизированной гепарином; протеолитическую активность — по методике, описанной Норстроном и др. [10], холинэстеразную — по методу Элмана, описанному в работе Бресткина и др. [11].

Изоэлектрическое фокусирование проводили на стандартных пластинках с градиентом pH амфолинов от 3,5 до 9,5 (ЛКВ, Швеция) по методике Карлссона [12] на приборе Multiphor 2117 (ЛКВ, Швеция). Окрашивание белков после изоэлектрического фокусирования осуществляли по Ригетти и Чилемми [13].

Денситограммы получали на лазерном денситометре Ultrosan 2202 (ЛКВ, Швеция).

Гомогенность и молекулярную массу компонентов контролировали с помощью диск-электрофореза в градиентном 10–18% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины, по методу Хашимото и др. [14]. Для определения молекулярных масс пептидов использовали набор стандартных фрагментов мюглобина с диапазоном масс от 2500 до 17 000 Да (ЛКВ, Швеция) и бромциановый гидролизат цитохрома с с диапазоном масс от 1800 до 12 300 Да. ПААГ после электрофореза окрашивали нитратом серебра по Меррилу и др. [15].

Аминокислотный состав определяли с помощью аминокислотного анализатора LC 7000 (Biotronic, ФРГ), для чего ~10–20 нмоль белков гидролизовали в течение 24, 48, 72 ч 0,5 мл 5,7 н. HCl в запаянных вакуумированных ампулах при 110°С. Гидролиз пептидов проводили в смеси трифторуксусной кислоты и 5,7 н. HCl (1:2) в вакуумированных ампулах при 166°С в течение 50 мин.

Восстановление и карбоксиметилирование инсектотоксина проводили по методике Крестфила и др. [16].

Гидролиз карбоксиметилированного инсектотоксина CM-SIT (1 мкМ) химотрипсином осуществляли в течение 4 ч в 2 мл 0,1 М раствора бикарбоната аммония, pH 8,2, при соотношении фермент — субстрат 1:50 и температуре 37°С.

Тонкослойную хроматографию проводили на целлюлозных пластинках 20×20 см (Merck, ФРГ) с использованием системы растворителей *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15:12:10:3. Элюцию пептидов с тонкого слоя целлюлозы осуществляли смесью *n*-бутанол — вода — уксусная кислота — метанол, 5:4:1:3. Для обнаружения пептидов использовали инцидирин-коллиндиновый краситель следующего

состава: 0,14% раствор нингидрина (Мерск, ФРГ) в растворе этанол — коллидин — уксусная кислота, 60 : 1 : 20. Для обнаружения пептидов, содержащих остатки тирозина, триптофана, гистидина, использовали качественные цветные реакции [17].

Для установления последовательности аминокислотных остатков в молекуле CM-SIT использовали метод жидкофазной автоматической деградации на секвенаторе 890 С (Beckman, США) с использованием программы, аналогичной описанной в работе [18].

Структуру химотриптических пептидов устанавливали деградацией по Эдману в ручном варианте с идентификацией Dns- и Pth-производных аминокислот [19]. Определение N-концевых аминокислотных остатков токсинов и пептидов в виде их Dns-производных проводили по методу Грея [20]. Производные аминокислот идентифицировали с помощью двумерной хроматографии по методике Б. Г. Белецкого [21] на пластинках (6×6 см) с закрепленным слоем силикагеля марки КСК.

Авторы выражают благодарность П. Б. Усманову, Т. И. Славновой и Д. Каликулову за проведение электрофизиологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adam K. R., Weis Ch.-Mem. // Inst. Bulantan. Symp. Internac. 1966. V. 33. № 2. P. 603-614.
2. Zlotcin E., Shulov A. S. // Toxicon. 1969. V. 7. № 1. P. 217-221.
3. Koppenhöfer E., Schmidt H. // Experientia. 1968. V. 24. № 1. P. 41-43.
4. Tashmukhamedov B. A., Usmanov P. B., Kozakov Y., Kalikulov D., Yukelson L. Y., Atakuziev B. U. // Toxins as Tools in Neurochemistry/Eds Puchco F., Ovchinnikov Yu. A. B.—N. Y.: Walter de Gruyter. 1983. P. 321-323.
5. Сагдиев Н. Ж., Садыков А. А., Усманов П. Б., Каликулов Д., Ташмухамедов Б. А., Садыков А. С. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 1. С. 463-465.
6. Magazanič L. G., Slavnova T. I. // Physiologia Bohemoslov. 1978. V. 27. № 1. P. 421-429.
7. Магазанич Л. Г., Славнова Т. И., Салихов Ш. И., Садыков А. С. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 265. № 3. С. 748-751.
8. Гришин Е. В., Солдатов П. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4. № 4. С. 450-461.
9. Dimick K. R. // J. Biol. Chem. 1943. V. 149. № 1. P. 389-393.
10. Нортрон Д., Купитц М., Херриот В. Кристаллические ферменты. М.: ИЛ, 1950. С. 296-309.
11. Брескин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. // Биохимия. 1970. Т. 35. № 2. С. 382-393.
12. Karlsson C. // I.K.V. Application Note. 1973. № 75.
13. Righetti P. G., Chillemi F. // J. Chromatogr. 1978. V. 157. № 1. P. 243-251.
14. Hoshimoto F., Horigome T., Kanbayashi M., Yoshida K., Sugano H. // Anal. Biochem. 1983. V. 129. № 1. P. 192-199.
15. Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. N. // Science. 1981. V. 211. № 211. P. 1437-1438.
16. Crestfeld A. M., Moor S., Stein W. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 2. P. 622-627.
17. Бейли Дж. // Методы химии белков. М.: Мир, 1965. С. 27.
18. Henkappiler M. W., Hood L. E. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2124-2133.
19. Tarr G. E. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 1. P. 361-370.
20. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. XI. P. 469-475.
21. Белецкий В. Г., Гапкина Э. С., Нестеров В. В. // Докл. АН СССР. 1967. Т. 172. С. 91-93.

Поступила в редакцию
28.VII.1986

После доработки
28.XI.1986

A STUDY OF VENOM TOXIC COMPONENTS OF THE CELLAR SPIDER *SEGESTRIA FLORENTINA*

SAGDIEV N. J., VALIEVA L. A., KORNEEV A. S., SADYKOV A. A.,
SALIKHOV Sh. I.

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Two neurotoxins and one insectotoxin have been isolated from venom of the cellar spider *Segestria florentina*, their homogeneity being proved by disk electrophoresis, isoelectric focusing, and analysis of N-terminale amino acid residues. The neurotoxins are polypeptides with molecular mass about 5000 D. For the insectotoxin, containing 35 amino acid residues with molecular mass 3988 D, the total primary structure is established.