



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.088.3 : 591.145.2-544

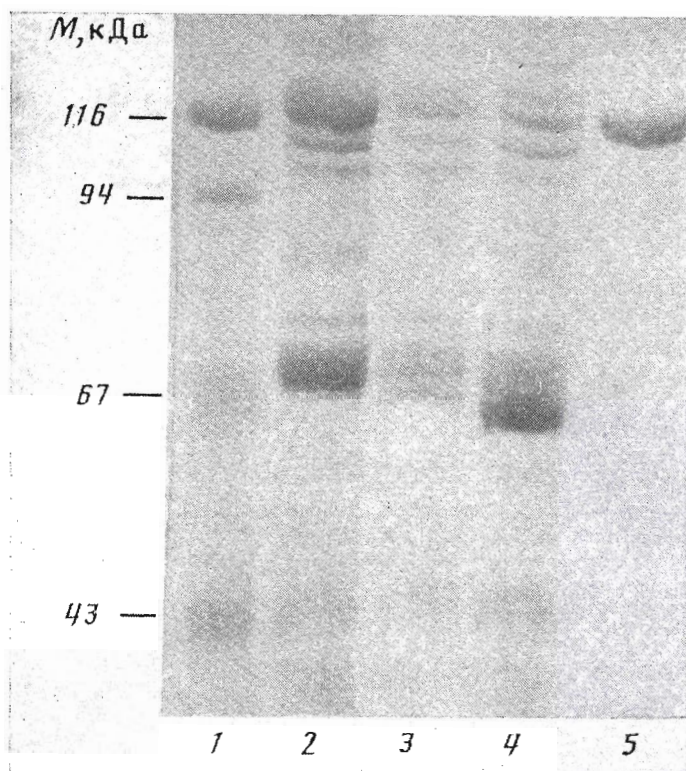
ВЫДЕЛЕНИЕ  $\alpha$ -ЛАТРОТОКСИНА ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА  
С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛПашков В. Н., Ковалевская Г. И., Красноперов В. Г.,  
Булгаков О. В.Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

$\alpha$ -Латротоксин (ЛТ) — токсический компонент яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* (о механизме действия см. [1]) был впервые выделен более 10 лет назад [2, 3]. При очистке использовали последовательно гель- и ионообменную хроматографию на сефадексе и DEAE-сефадексе. Более поздние модификации способа выделения ЛТ [4, 5] основаны также на приведенных выше хроматографических процедурах. Несмотря на то что применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием анионообменной колонки [5] значительно сокращает время выделения ЛТ, методика очистки остается все еще длительной, требует тестирования фракций на наличие ЛТ на промежуточных этапах. С другой стороны, известно, что ЛТ (белок с молекулярной массой более 100 кДа) довольно лабилен, активность его уменьшается в 2 раза за 1—2 недели хранения при 4° С [3]. Подобного рода наблюдения сделаны и нами при работе с радиоактивно меченым ЛТ. Радиоактивная чистота уменьшается, а неспецифическое связывание увеличивается при увеличении продолжительности процедуры выделения ЛТ. Поэтому быстрое выделение ЛТ — актуальная задача.

Для изучения механизма взаимодействия ЛТ с рецептором синаптических мембран мозга млекопитающих нами была получена панель мышинных моноклональных антител против ЛТ (результаты работы будут опубликованы отдельно). Среди антител было выбрано одно — А15, с которого ЛТ элюируется в мягких условиях, полностью сохраняя свою активность. Константа диссоциации при взаимодействии ЛТ с иммобилизованными А15 (подкласс IgG 2b,  $\lambda$ -тип легкой цепи) составляет  $5 \cdot 10^{-9}$  М.

Моноклональные антитела А15 были выращены в асцитах, очищены и конъюгированы с бромциан-сефарозой. Выделение ЛТ осуществляли согласно следующей процедуре: к 0,5 мл сефарозы (2 мг антител/мг геля) добавляли экстракт цельного яда, полученного как в работе [4], вносили 4 М NaCl до конечной концентрации 0,5 М и инкубировали 2—3 ч при 4° С с перемешиванием в центрифужной пробирке. Далее гель промывали 2—3 раза 10 объемами буфера А (20 мМ трис-HCl, pH 8,0), 0,5 М NaCl), переносили в колонку и продолжали промывку до прекращения элюции белка (детектировали при 280 нм). Элюцию сорбированного ЛТ проводили буфером 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, содержащим 0,1 М NaCl, 1 М MgCl<sub>2</sub>, с остановкой протока. Аффинная колонка использовалась многократно, хранилась между выделениями в буфере А с азидом натрия.

Выход ЛТ по белку составлял (в разных партиях яда) 2—3,5% от белка в экстракте яда, повторное нанесение несорбированного материала не приводило к дополнительному извлечению ЛТ из экстракта яда. Такой же (чаще меньший) процент выхода ЛТ мы получали и при выделении ЛТ по методике [4]; более низкие выходы ЛТ по сравнению с приведенными



Электрофоретический анализ этапов выделения ЛТ. Электрофорез в пластинках толщиной 0,5 мм с 10% разделяющим и 4% концентрирующим гелем выполняли по [6]; 1 — маркерные белки (сверху вниз):  $\beta$ -галактозидаза (116 кДа), далее низкомолекулярные стандарты фирмы Pharmacia; 2 — цельный яд, 15 мкг; 3 — несорбированный материал с аффинной колонки, 7 мкг; 4 — экстракт яда, 7 мкг; 5 — ЛТ, элюированный с аффинной колонки, 2 мкг

в работах [2—4] объясняются, по-видимому, качеством имеющегося у нас в наличии яда. Из 20—40 мг лиофилизованного цельного яда (10—20 мг белка) мы выделяли обычно 0,2—0,5 мг ЛТ, при этом предел насыщения колонки не был достигнут. Вся процедура выделения ЛТ занимала 6—10 ч.

ЛТ при очистке аффинной хроматографией в большей степени сохраняет свою активность, чем при хроматографическом выделении по методике работы [4], о чем можно судить по данным радиолигандного анализа связывания меченого иодом-125 ЛТ в стандартных условиях. Так, если очищенный с помощью моноклональных антител меченый ЛТ связывается с мембранами из мозга быка на 95% и осаждается 10% трихлоруксусной кислотой на 100%, то для хроматографически выделенного ЛТ эти величины составляют соответственно 40—70 и 90%. По данным электрофореза в восстанавливающих условиях с додецилсульфатом натрия, ЛТ представляет собой белок с молекулярной массой ~116 кДа (рисунок). Его аминокислотный состав близок к приведенному в работе [4]. *N*-Концевым аминокислотным остатком является глутаминовая кислота. При изоэлектрофокусировании на приборе Multiphor 2117 (ЛКВ, Швеция) с использованием стандартных пластин с градиентом pH 3,5—10 ЛТ представлен тремя близкорасположенными белковыми компонентами с изоэлектрической точкой 5,2—5,4. Характеристики очищенного токсина совпадают с указанными в работах [2—5].

Таким образом, предложенный способ выделения ЛТ позволяет значительно упростить и ускорить получение биологически активного нейротоксина из яда паука каракурта.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук Е. В. Гришину за критическое обсуждение данной работы и канд. хим. наук Т. А. Мурановой за определение аминокислотного состава ЛТ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. 1986. V. 7. № 4. P. 151—155.
2. Grasso A. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 439. № 2. P. 406—412.
3. Frontali N., Ceccarelli B., Gorio A., Mauro A., Siekevitz P., Tzeng M.-C., Hurlbut W. P. // J. Cell Biol. 1976. V. 68. № 3. P. 462—479.
4. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71—80.
5. Гребиножко Э. И., Николаенко А. Н. // Укр. биохим. журн. 1987. Т. 59. № 5. С. 93—96.
6. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступило в редакцию  
17.III.1989

### ISOLATION OF $\alpha$ -LATROTOXIN FROM THE VENOM OF *LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS* BY MEANS OF MONOCLONAL ANTIBODIES

PASHKOV V. N., KOVALEVSKAYA G. I., KRASNOPEROV V. G., BULGAKOV O. V.

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

A method of  $\alpha$ -latrotoxin (LT) isolation from the venom of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* by means of immunoaffinity chromatography on sepharose conjugated with monoclonal antibodies against LT has been developed. This one-step, high-yield, relatively simple and rapid procedure yields active LT for structural and functional studies of its receptor.