



УДК 577.112.088.3 : 591.145.2-544

© 1990 г.

*В. Г. Красноперов* \*, *О. Г. Шамотиенко*, *Е. В. Гришин* \*  
СПЕЦИФИЧНЫЙ ДЛЯ РАКООБРАЗНЫХ НЕЙРОТОКСИН  
ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА  
*LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS*

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,  
г. Пушкино Московской обл.;

\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,  
Москва

Яд паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* является богатым источником высокоспецифичных нейротоксинов. Наряду с хорошо изученным  $\alpha$ -латротоксином — пресинаптическим нейротоксином, стимулирующим секрецию нейромедиаторов из синаптических окончаний нервных клеток позвоночных, в нем содержится ряд белковых токсических компонентов, влияющих на пресинаптическую активность нервных клеток беспозвоночных [1, 2]. Ранее нами был разработан метод выделения из яда пяти инсектоспецифических нейротоксинов [3]. Данная работа посвящена выделению и характеристике нейротоксина, оказывающего токсическое действие на ракообразных.

Тестирование яда и его фракций на содержание токсических для ракообразных компонентов проводили на однолетних особях речного рака *Procambarus cubensis*. Образцы в объеме 5—10 мкл инъецировали животным в область перикарда. Проявление действия образцов начиналось на 13—15-й мин после инъекции и сопровождалось выраженным нейропаралитическим эффектом. При высоких дозах вводимого материала смерть наступала на 20—25-й мин. Одновременно с тестированием на раках выделяемые фракции испытывали на личинках 5-й возрастной стадии большой воцинойной моли *Galleria mellonella* и мышах линии Balb/c.

Экстракцию токсических компонентов из ядра каракурта осуществляли трис-НСl-буфером, рН 8,0. В качестве первой стадии разделения цельного экстракта использовали хроматографию на колонке Mono Q (Pharmacia, Швеция). Элюцию сорбированных белков осуществляли линейными градиентами концентраций NaCl (0—300 и 300—1000 мМ) (рис. 1). Токсические для раков компоненты присутствовали во фракциях 18—25 (80—140 мМ NaCl). Инсектоспецифические нейротоксины распределялись в виде двух групп фракций. Первая группа включала фракции 30—43 (190—270 мМ NaCl), вторая — 47—52 (310—400 мМ NaCl). Как было показано в предыдущей работе [3], первая группа содержит  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -латроинсектотоксины, вторая —  $\Delta$ -латроинсектотоксин. Токсическая для мышей активность, обусловленная  $\alpha$ -латротоксином, присутствовала во фракциях 48—53. Фракции, содержащие токсические для раков компоненты, объединяли и диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,4.

В качестве второй стадии очистки фракции, токсичной для ракообразных, использовали хроматографию на колонке Mono S (Pharmacia). Сорбированные белки элюировали линейным градиентом концентраций 0—400 мМ NaCl. Токсическая активность присутствовала во фракциях, элюируемых при 120—140 мМ NaCl. Окончательную очистку специфического для раков нейротоксина проводили с помощью хроматографии на колонке Phenyl-Superose (Pharmacia). Токсин содержался во фракции, элюируемой 700 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . На рис. 2 представлен электрофоретический анализ выделенного токсина. Его молекулярная масса составляет 120 кДа.

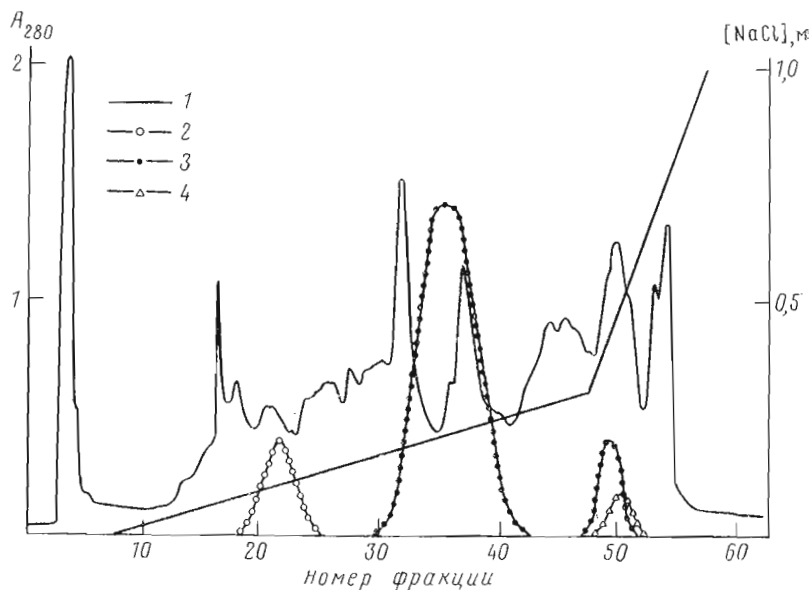


Рис. 1. Хроматография цельного экстракта яда паука каракурта на колонке Моно Q. Показано поглощение фракции при 280 нм (1), распределение по фракциям токсической активности, специфичной для ракообразных (2), для насекомых (3) и для позвоночных (4). Объем фракции 0,3 мл

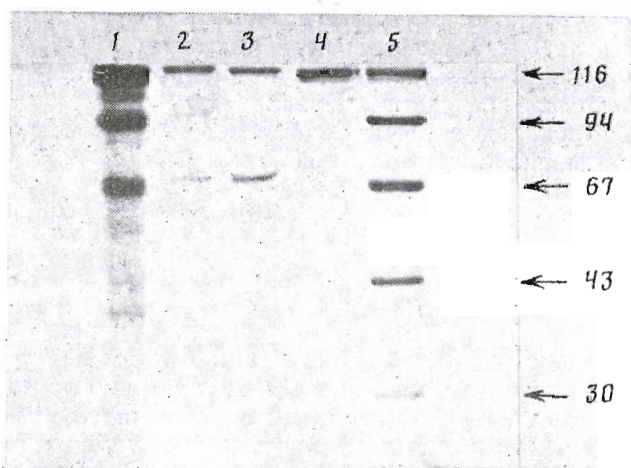


Рис. 2. SDS-электрофоретический анализ в восстанавливающих условиях цельного экстракта яда паука каракурта (1), объединенных фракций, содержащих токсины для ракообразных (латрокрустотоксин), после хроматографии на колонках Моно Q (2), Моно S (3) и Phenyl-Superose (4). Электрофорез проведен в пластинках полиакриламидного геля толщиной 0,5 мм с 4% концентрирующим и 10% разделяющим гелем согласно методу Лэммли [4]; 5 — маркеры молекулярных масс (сверху вниз приведены  $M$ , кДа):  $\beta$ -галактозидаза, фосфоорилаза b, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, карбоксангидраза

Наши эксперименты не подтвердили предположение, высказанное в работе [1], что токсическое действие яда паука на ракообразных связано с наличием двух белковых компонентов с молекулярными массами  $\sim 70$  кДа. Тот факт, что молекулярные массы всех выделенных из яда каракурта индивидуальных токсинов близки к 120 кДа, по-видимому, свидетельствует в пользу общности эволюционного происхождения всех известных и пока еще не идентифицированных токсинов от одного общего предшественника.

Специфичный для ракообразных токсин был назван нами  $\alpha$ -латрокрустотоксином. Значение  $LD_{50}$   $\alpha$ -латрокрустотоксина составляет

~ 100 мкг/кг веса как для раков *Procambarus cubensis*, так и для другого вида раков — *Astacus astacus* (отряд *Decapoda*). Однако для бокоплавов *Gammarus locusta*, представителей отряда *Amphipoda*, LD<sub>50</sub> была приблизительно на порядок больше. В то же время данный нейротоксин не обладал видимой активностью по отношению к личинкам вошчинной моли и мышам в дозах ~ 5 мг/кг веса. Выход очищенного α-латрокрустотоксина составляет ~ 0,5% от веса белковой фракции экстракта исходного яда. В настоящее время проводится изучение механизма действия выделенного нейротоксина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frontali N., Ceccarelli B., Gorio A., Mauro A., Siekevitz P., Tzeng M.-C., Hurlbut P. // J. Cell Biol. 1976. V. 68. № 3. P. 462—479.
2. Knipper M., Madeddu L., Breer H., Meldolesi J. // Neuroscience. 1986. V. 19. № 1. P. 55—62.
3. Красноперов В. Г., Шамотиенко О. Г., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1138—1140.
4. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступило в редакцию  
29.VI.1990

V. G. KRASNOPEROV \*, O. G. SHAMOTIENKO, E. V. GRISHIN \*

#### A CRUSTACEA-SPECIFIC NEUROTOXIN FROM THE VENOM OF THE *LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS* SPIDER

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

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

A method of the isolation of a crustacea-specific neurotoxin from the venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider by means of ion exchange chromatography on Mono Q and Mono S columns and hydrophobic chromatography on Phenyl-Superose column has been developed. LD<sub>50</sub> of the toxin has been elucidated.