



УДК 577.112.088.3:615.919:595.44-414.52.088

© 1990 г.

Г. И. Ковалевская, В. Н. Пашиков, О. В. Булгаков,
И. М. Федорова*, Л. Г. Магазаник*, Е. В. Гринин**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО ИНСЕКТОТОКСИНА
(α -ЛАТРОИНСЕКТОТОКСИНА) ИЗ ЯДА ПАУКА
LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS

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

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград;

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

Из яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* комбинацией методов высокоэффективной жидкостной анионообменной и гидрофобной хроматографий выделен гомогенный полипептидный токсин с молекулярной массой ~ 120 кДа, названный α -латроинсектотоксином (ЛИТ). Определен аминокислотный состав ЛИТ, в качестве N-концевого аминокислотного остатка идентифицирована глутаминовая кислота. При изоэлектрофокусировании токсина представлен несколькими близкорасположенными полипептидами с pI 5,2—5,4. Выделенный токсин вызывает паралич личинок мухи *Musca domestica* при инъекции ~ 20 нг/особь, а также в концентрации $4,2 \cdot 10^{-10}$ М вызывает повышение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов в глутаматэргическом синапсе нервно-мышечного препарата личинки мухи *Calliphora vicina*. ЛИТ в концентрациях до $1,2 \cdot 10^{-7}$ М не оказывает никакого воздействия в синапсе нервно-мышечного препарата лягушки.

Яд паука каракурта обладает токсичностью для позвоночных, насекомых и ракообразных. Хорошо известна способность этого яда вызывать значительное увеличение частоты освобождения квантов медиатора из пресинаптических окончаний, что приводит к нарушению синаптической передачи. Единственный выделенный из яда в индивидуальном виде нейротоксин (α -латротоксин) с молекулярной массой ~ 130 кДа [1—3] способен инициировать массиванный выброс различных типов нейромедиаторов из синаптических окончаний центральной и периферической нервной системы позвоночных (для обзора см. [4, 5]). С другой стороны, фракция яда, полностью лишенная α -латротоксина (ЛТ), потеряв способность воздействовать на препараты позвоночных, оказывали сильный и качественно сходный эффект в экспериментах на разных тканях насекомых или ракообразных [4, 6—8]. Эти данные свидетельствуют в пользу существования в яде каракурта различных токсинов, действующих избирательно на позвоночных и насекомых.

В настоящей работе представлены результаты идентификации, выделения и характеристики белкового инсектотоксина яда каракурта, вызывающего увеличение частоты возбуждающих постсинаптических потенциалов в глутаматэргических синапсах мухи *Calliphora vicina*.

Исходным источником токсина служил цельный яд паука *Latrodectus*

Сокращения: ЛТ — α -латротоксин, ЛИТ — α -латроинсектотоксин, мВПСИ — миниатюрный возбуждающий постсинаптический потенциал.

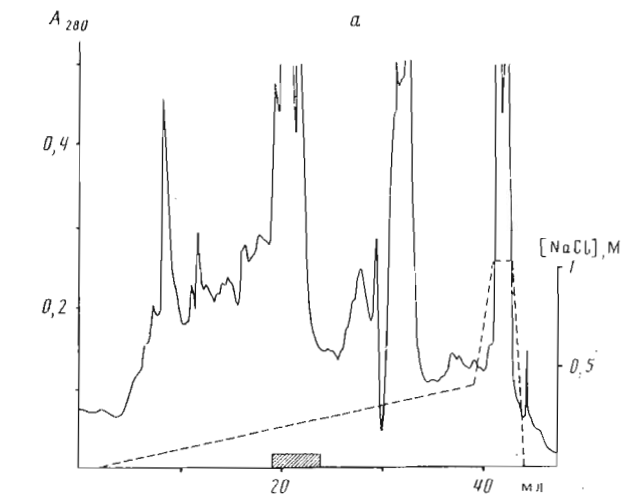
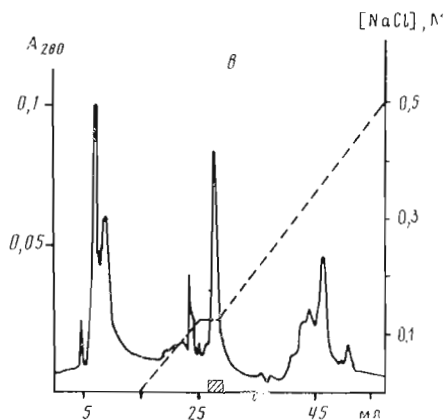
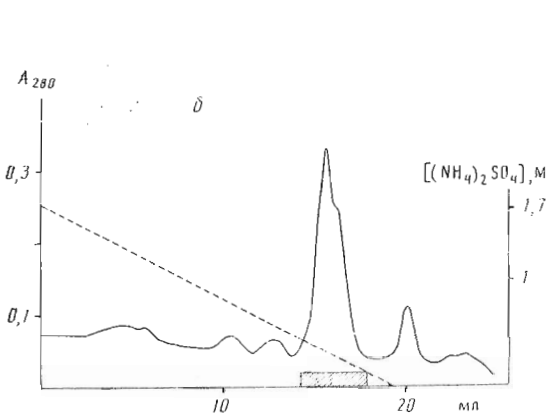


Рис. 1. Получение ЛИТ из экстракта яда паука каракурта. Последовательная хроматография на Mono Q (а), на Phenyl Superose (б), рехроматография на Mono Q (в). Заштрихованными столбиками обозначены фракции, используемые для дальнейшего разделения



mactans tredecimguttatus либо его ядовитые железы. Экстракт яда хроматографировали на анионообменнике Mono Q при pH 8,0 в градиенте концентрации хлористого натрия (рис. 1а). Получающиеся фракции подвергали биологическому тестированию: 1) оценивали токсичность при введении личинкам домашней мухи; 2) оценивали способность увеличивать частоту миниатюрных потенциалов (мВПСП), регистрируемых в нервномышечном препарате личинки мясной мухи.

Фракция, обладающая максимальной активностью в этих тестах, элюировалась 0,21 М хлористым натрием и далее подвергалась гидрофобной хроматографии на Phenyl Superose в обратном градиенте концентрации сульфата аммония (рис. 1б). При концентрации сульфата аммония 0,32 М была выделена фракция, обладавшая высокой биологической активностью, которую вновь хроматографировали на анионообменнике Mono Q при pH 6,5 в градиенте концентрации хлористого натрия. При элюции 0,13 М хлористым натрием (рис. 1в) удалось получить в гомогенном виде белок (далее называемый α -латроинсектотоксином, ЛИТ), выход которого в серии экспериментов составил 0,6—1,0% к весу белковой фракции яда.

В качестве альтернативного источника ЛИТ также использовали фракцию яда, остающуюся после извлечения ЛИТ из экстракта яда на колонке с моноклональными антителами против ЛИТ [9]. Эту фракцию далее разделяли описанными выше методами.

По данным аналитического электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 2), ЛИТ имеет молекулярную массу ~ 120 кДа. N-Концевым аминокислотным остатком является глутаминовая кислота. При изоэлектрофокусировании ЛИТ представлен несколь-

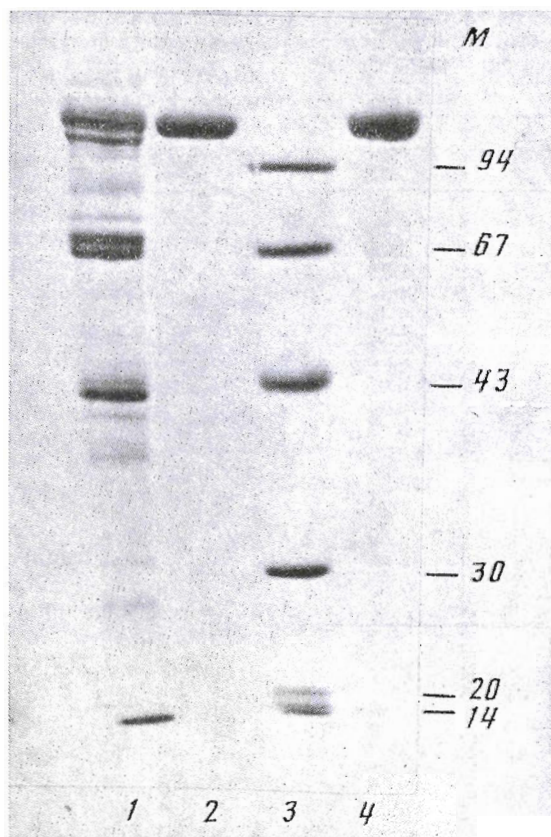


Рис. 2. Электрофоретический анализ 15 мкг экстракта яда (1), 5 мкг ЛИТ (2), 5 мкг ЛТ (4); 3 — низкомолекулярные стандарты фирмы Pharmacia, цифры справа — молекулярная масса в килодальтонах

кими близкорасположенными полипептидами с изоэлектрическими точками 5,2—5,4. Аминокислотный состав ЛТ и ЛИТ приведен в таблице.

Доза ЛИТ, вызывающая устойчивый паралич у 100% личинок, зависела от партии полученного от поставщиков яда и составила в среднем 20 нг/особь. Способ выделения не оказывал заметного влияния на токсичность ЛИТ.

ЛИТ при добавлении в раствор, перфузирующий нервно-мышечный препарат личинки, в концентрации $4,2 \cdot 10^{-10}$ М ($n = 5$) * вызывал повышение частоты мВПСП через 20—30 мин (рис. 3). Увеличение концентрации ЛИТ ускоряло этот эффект. Повышение частоты мВПСП сопровождалось падением амплитуды ответов, вызываемых раздражением двигательного нерва, т. е. нарушением синаптической передачи. В контрольных экспериментах ($n = 3$) было показано, что даже при 300-кратном повышении концентрации ЛИТ не влияет на нервно-мышечные синапсы лягушки. С другой стороны, ЛТ в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ М (в 20 раз более высокой, чем на лягушке) был неэффективен в опытах на препаратах насекомого, что согласуется с известными данными [1, 10].

Эффект ЛИТ ($4,2 \cdot 10^{-10}$ М) в опытах на препаратах личинки мухи был очень похож на эффект ЛТ ($2,5 \cdot 10^{-9}$ М) [8] в опытах на препаратах лягушки: в обоих случаях происходило увеличение частоты квантового выброса медиатора в десятки раз, а затем полный паралич передачи. Такое феноменологическое сходство может быть следствием подобия молекулярного механизма действия, т. е. можно предполагать, что мишени обоих токсинов (очевидно, различающиеся по своему строению, поскольку они из-

* n — число экспериментов.

**Аминокислотный состав
 α -латроинсектотоксина
и α -латротоксина из яда каракурта
(мольные %)**

Аминокислота	ЛИТ	ЛТ
Asp	13,10	14,29
Thr	3,93	4,79
Ser	4,35	5,21
Glu	11,57	12,38
Pro	4,81	3,03
Gly	5,90	6,01
Ala	8,63	8,07
Val	6,72	6,40
Ile	7,65	6,98
Leu	9,32	8,82
Tyr	2,18	3,06
Phe	4,70	4,60
His	2,49	2,32
Lys	7,63	7,42
Arg	4,75	3,98
Cys	0,81	0,60
Met	1,51	2,05
N-концевая	Glu	Glu

туры белков и пептидов ФИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР Т. А. Мурашовой, А. В. Данилову, Л. Ф. Марковой за проведение аминокислотных анализов и определение N-концевого аминокислотного остатка.

Экспериментальная часть

Были использованы реактивы для электрофореза (Bio-Rad, США), маркерные белки для электрофореза и изоэлектрофокусирования (Pharmacia, Швеция), трис (Serva, ФРГ), бычий сывороточный альбумин, фракция 5 (Sigma, США), остальные реактивы марки ос. ч. — отечественного производства. Лиофильно высушенный яд паука каракурта либо его ядовитые железы получали из Ташкентского зоокомбината. ЛТ выделяли по ранее описанному методу [9].

Получение экстракта яда. Яд (или железы) гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, в гомогенизаторе Поттера при 500 об/мин. Гомогенат центрифугировали при 100 000 *g* 30 мин. Супернатант (экстракт яда) использовали в дальнейшей работе.

Хроматографические процедуры проводили на жидкостном хроматографе FPLC (Pharmacia, Швеция).

Хроматография на Mono Q. Первичное разделение экстракта яда проводили на Mono Q HR 5/5 (FPLC, Pharmacia) в 50 мМ трис-НСl при рН 8,0 в градиенте концентрации хлористого натрия (рис. 1а).

Хроматография на Phenyl-Superose. Фракцию, полученную после хроматографии на Mono Q при рН 8,0, разделяли на Phenyl-Superose HR 5/5 в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,3. Образец наносили в 1,7 М сульфате аммония. Элюцию осуществляли в обратном градиенте концентрации сульфата аммония (рис. 1б).

Рехроматография на Mono Q. Выбранную после гидрофобной хроматографии фракцию подвергали дальнейшему разделению на Mono Q HR 5/5 в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 6,5, в градиенте концентрации хлористого натрия (рис. 1в).

Аналитические процедуры. Количество белка во фракциях определяли по модифицированному методу Лоури [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Электрофорез в градиенте концентрации полиакриламидного геля 8—14% в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методике [12]. Изоэлектрофокусирование проводили на

бирательно поражаются разными токсинами) вовлечены в функционально одинаковые звенья процесса нейросекреции. В связи с этим важно сопоставить молекулярное строение самих токсинов. Пока установлено, что они представляют собой кислые белки ($pI \sim 5,3$) с близкой молекулярной массой (~ 120 кДа) и сходным аминокислотным составом.

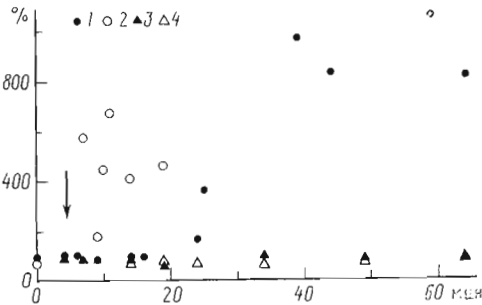
Поскольку отсутствуют данные по молекулярной характеристике описанных в работах [6, 10] инсектотоксинов, предполагать их идентичность с выделением в настоящей работе ЛИТ не представляется возможным.

Дальнейшее изучение молекулярной структуры и механизма действия ЛИТ должно привести к появлению нового эффективного инструмента для исследования процессов нейросекреции.

Авторы выражают благодарность

сотрудникам группы анализа структуры белков и пептидов ФИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР Т. А. Мурашовой, А. В. Данилову, Л. Ф. Марковой за проведение аминокислотных анализов и определение N-концевого аминокислотного остатка.

Рис. 3. Влияние ЛИТ на частоту мВПСП, регистрируемых внутриклеточно в мышечных волокнах личинки мясной мухи (1, 2) и лягушки (3, 4). Концентрация ЛИТ: $4,2 \cdot 10^{-10}$ (1), $4,2 \cdot 10^{-9}$ (2), $4,2 \cdot 10^{-8}$ (3), $1,2 \cdot 10^{-7}$ М (4). Момент добавления ЛИТ отмечен стрелкой. По оси ординат: изменение частоты мВПСП в процентах к исходному уровню, принятому за 100



приборе Multifor 2117 (LKB, Швеция) с использованием стандартных пластин с градиентом pH 3,5—9,5 согласно рекомендациям фирмы. Аминокислотный состав белка определяли на аминокислотном анализаторе Pico-Tag (Waters, США), аминокислоты идентифицировали в виде фенилтиокарбамильных производных после предварительной модификации. N-Концевой аминокислотный остаток определяли в виде Dns-производного после модификации белка по методу Грэя [13]. Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили методом двумерной ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля [14].

Биологическое тестирование. Определение инсектотоксичности фракций белка на различных этапах выделения и чистого препарата проводили на личинках мухи *Musca domestica*, вводя им по 0,5 мкл образца с известной концентрацией белка в физиологическом растворе и фиксируя время обездвиживания. Способность фракций и ЛИТ повышать частоту миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов исследовали на нервно-мышечных препаратах личинки мухи *Calliphora vicina* и лягушки методом, описанным в работе [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Grasso A. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 439. № 2. P. 406—412.
3. Tzeng M.-C., Siekevitz P. // Brain Res. 1978. V. 139. № 1. P. 190—196.
4. Hurlbut W. P., Ceccarelli B. // Adv. Cytopharmacol. 1979. V. 3. P. 87—115.
5. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. 1986. V. 7. № 4. P. 151—155.
6. Knipper M., Madeddu L., Breer H., Meldolesi J. // Neuroscience. 1986. V. 19. № 1. P. 55—62.
7. Fritz L. C., Tzeng M.-C., Mauro A. // Nature. 1980. V. 283. № 5746. P. 486—487.
8. Магазаник Л. Г., Федорова И. М., Антонов С. М., Ковалевская Г. И., Булгаков О. В., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 6. С. 660—661.
9. Пашков В. Н., Ковалевская Г. И., Красноперов В. Г., Булгаков О. В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1281—1283.
10. Ornberg R. L., Smyth T., Benton A. W. // Toxicon. 1976. V. 14. № 2. P. 329—333.
11. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1828—1837.
12. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
13. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 121—138.
14. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Прыщеникова С. Р., Эрстов Д. П. // Молекулярн. биология. 1967. Т. 1. № 1. С. 184—189.
15. Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Гмиро В. Е. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 2. С. 130—140.

Поступила в редакцию
13.II.1990

G. I. KOVALEVSKAYA, V. N. PASHKOV, O. V. BULGAKOV, I. M. FEDOROVA*,
L. G. MAGAZANIC*, E. V. GRISHIN**

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF PROTEIN α -LATROINSECTOTOXIN
FROM THE VENOM OF SPIDER *LATRODECTUS MACTANS*
TREDECIMGUTTATUS

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

**I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Leningrad;*

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

The crude venom of spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus* was fractionated by the combination of anion exchange and hydrophobic chromatography. The biological activity of fraction was tested by means of: 1) estimation of toxicity for housefly larva; 2) intracellular recording of miniature excitatory potentials (MEPSPs) in blowfly larvae muscle fibres. As a result of sequential procedures of chromatography separation a homogeneous protein of 120 kilodalton molecular weight was obtained. This protein referred to α -latroinsectotoxin produced: 1) a great increase of the frequency of MEPSPs in the dose of $4,2 \cdot 10^{-10}$ M and its paralytic dose for fly larva was approximately 20 ng/species; 2) no influence of the MEPSPs after application in the dose of $1,2 \cdot 10^{-7}$ M to the neuromuscular junction of the frog.