



УДК 577.112.088.3 : 591.145.2-544

В. Г. Красноперов, О. Г. Шамотинко, Е. В. Гришин\*

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ИНСЕКТОСПЕЦИФИЧЕСКИХ  
НЕЙРОТОКСИНОВ ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА  
*LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,  
Пушино Московской обл.;

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

Известно, что яд паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* содержит наряду с  $\alpha$ -латротоксином — пресинаптическим нейротоксином, стимулирующим секрецию нейромедиаторов из синаптических окончаний нервных клеток позвоночных, ряд белковых токсических компонентов, стимулирующих пресинаптическую активность нервных клеток беспозвоночных — насекомых, ракообразных [1, 2]. Эти компоненты яда не получены в индивидуальном состоянии, хотя они могут оказаться эффективными «инструментами» для изучения рецепторных систем пресинаптических мембран нервных клеток беспозвоночных. Весьма интересной представляется возможность проведения сравнительного анализа этих рецепторных компонентов нервных клеток беспозвоночных с выделенным ранее из мозга быка пресинаптическим рецептором  $\alpha$ -латротоксина [3]. Данная работа посвящена выделению и характеристике инсектоспецифических нейротоксинов из яда каракурта.

Тестирование токсической активности выделяемых фракций проводили на личинках большой вошинной моли *Galleria mellonella* и лабораторных мышах линии BALB/c.

Первой стадией разделения цельного экстракта яда была выбрана хроматография на колонке Mono Q в трис-НСI-буфере, рН 7,4 (хроматографическая система FPLC, Pharmacia, Швеция). Вся содержащаяся в экстракте токсическая активность сорбировалась на колонке в 50 мМ NaCl. Сорбированные активные компоненты удалось выделить при элюции в линейном градиенте концентрации NaCl (фракции 130—260 и 260—360 мМ). На последующих стадиях выделение индивидуальных токсинов из каждой токсической фракции проводили раздельно.

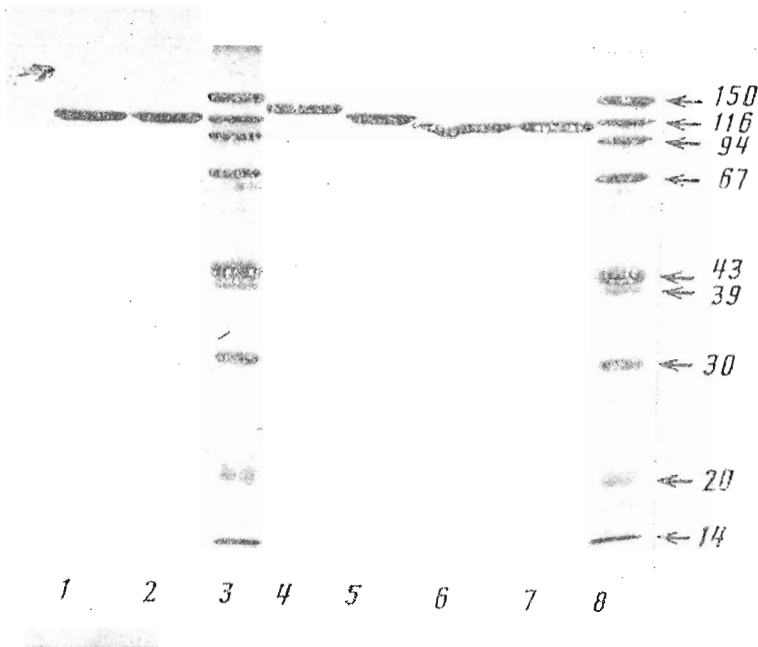
На второй стадии очистки обе токсические фракции были хроматографированы на колонке Mono Q в 20 мМ гистидин-НСI-буфере, рН 5,8. При этом в случае первой фракции токсическая активность была элюирована

Свойства инсектоспецифических токсинов из яда каракурта

Характеристика	Латроинсектотоксины				
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\Delta$	$\xi$
М, кДа	120	140	120	110	110
ЛД <sub>50</sub> *, мкг/кг	15	25	250	60	1000
Выход**	3	0,2	0,2	0,4	2

\* ЛД<sub>50</sub> определены в опытах на личинках большой вошинной моли *Galleria mellonella*.

\*\* Выход каждого инсектоспецифического токсина приведен в процентах от веса белковой фракции экстракта исходного яда.



SDS-электрофоретический анализ в восстанавливающих условиях  $\alpha$ -латротоксина (1) и латроинсектотоксинов  $\alpha$  (2),  $\beta$  (4),  $\gamma$  (5),  $\Delta$  (6),  $\epsilon$  (7) из яда лаука каракурта (по 2 мкг). Электрофорез проведен в пластинках полиакриламидного геля толщиной 0,5 мм с 4% концентрирующим и 10% разделяющим гелем согласно методу Лэммли [5]; 3 и 8 — маркеры молекулярных масс (сверху вниз приведены  $M$ , кДа):  $\beta'$ -,  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы,  $\beta$ -галактозидаза, фосфорилаза  $b$ , бычий сывороточный альбумин, овальбумин,  $\alpha$ -субъединица РНК-полимеразы, карбоксиангидраза, соевый ингибитор трипсина,  $\alpha$ -лактоальбумин

с колонки в диапазоне концентраций 100—220 мМ, а в случае второй — 300—340 мМ NaCl. Снижение значения pH буфера с 7,4 до 5,8 на этой стадии приводило к изменению суммарного заряда белков, влияя тем самым на их сорбцию. В результате этого удалось отделить группу нетоксических белков с молекулярными массами 60—70 кДа, очистка от которых была затруднена с помощью каких-либо других методов.

В качестве третьей стадии разделения для первой токсической фракции использовали хроматографию на колонке Mono S в 50 мМ натрий-сукцинатном буфере, pH 6,2. Сорбированные в данных условиях компоненты были элюированы 200 и 260 мМ NaCl в виде двух хроматографически и электрофоретически чистых белков с молекулярными массами 120 и 110 кДа, обозначенных нами  $\gamma$ - и  $\xi$ -латроинсектотоксинами соответственно. Несорбируемую на колонке Mono S фракцию хроматографировали в дальнейшем на гидроксапатите. В элюате с гидроксапатитной колонки 100 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, были обнаружены с помощью электрофореза два белковых компонента с молекулярными массами 120 и 150 кДа. Разделение их было проведено с помощью хроматографии на колонке Mono Q. Токсический компонент, элюируемый 200 мМ NaCl, был назван  $\beta$ -латроинсектотоксином (140 кДа) а компонент, элюируемый 220 мМ, —  $\alpha$ -латроинсектотоксином (120 кДа).

С помощью электрофореза было показано, что вторая токсическая фракция после хроматографии на колонке Mono Q в гистидин-HCl содержала два близких по молекулярным массам белковых компонента, один из которых с молекулярной массой 120 кДа являлся известным  $\alpha$ -латротоксином [1]. Другой компонент, обозначенный нами  $\Delta$ -латроинсектотоксином, представлял собой инсектоспецифический токсин. Выделение этих двух токсинов в индивидуальном виде было проведено с помощью трех последовательных стадий хроматографии на гидроксапатите.

Свойства выделенных токсинов приведены в таблице. Летальные дозы ЛД<sub>50</sub> инсектоспецифических токсинов определяли на личинках 5-й воз-

растной стадии большой воициной молли *Calleria mettonella* согласно методике, приведенной в работе [4]. Токсическая активность выделенных токсинов была проверена также на тараканах *Periplaneta americana*. Все токсины оказывали летальное действие на тараканов, что свидетельствует об отсутствии у них узкой видоспецифичности. Следует отметить, что инсектоспецифические токсины при инъекции мышам в дозах свыше 5 мг/кг веса тела нейротоксического действия не оказывали. Все выделенные токсины хранились при 4° С в течение 2 нед без заметной потери активности.

Результаты SDS-электрофоретического анализа выделенных токсинов в восстанавливающих условиях приведены на рисунке.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук Т. М. Волковой за помощь в проведении исследований.

#### 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. Петренко А. Г., Суркова И. Н., Шамотиенко О. Г., Коваленко В. А., Красноперов В. Г., Третьяков Л. А., Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 158—165.
4. Frontali N., Grasso A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1964. V. 106. № 1—3. P. 213—218.
5. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступило в редакцию  
16.III.1990

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

#### ISOLATION AND PROPERTIES OF INSECTOSPECIFIC NEUROTOXINS FROM VENOM OF THE *LATRODECTUS MACTANS TREDECIMGUTTATUS* SPIDER

Branch of the 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 has been developed for isolating five insectospecific neurotoxins and  $\alpha$ -latrotoxin from venom of the *Latrodectus mactans tredecimguttatus* spider by means of ion exchange chromatography on Mono Q and Mono S columns and chromatography on hydroxylapatite column. LD 50 of all the toxins are determined.