



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5 : 595.44-114.52.088

© 1992 г. О. В. Булгаков\*, Т. М. Волкова, Т. Г. Галкина,  
В. Н. Пашков\*, К. А. Плужников, Е. В. Гришин

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
ЛАТРОИНСЕКТОТОКСИНА ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва:

\* Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН,  
г. Пушкино Московской обл.

Яд паука каракурта (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*), одного из самых ядовитых пауков, исследуется уже более 15 лет. Еще в первых работах по изучению его биологического действия было показано, что он обладает высокой токсичностью для позвоночных, ракообразных и насекомых. Однако лишь недавно из яда удалось выделить высокоспецифичный для насекомых  $\alpha$ -латроинсектотоксин (ЛИТ) [1], обладающий пресинаптической активностью, принципиально сходной с активностью ранее описанного  $\alpha$ -латротоксина [2, 3]. Структурно-функциональный анализ ЛИТ, сравнение его с  $\alpha$ -латротоксином, токсичным для позвоночных, позволит выявить активные центры молекулы, участки связывания с пресинаптическим рецептором насекомых и использовать полученную информацию для создания направленных биологических методов борьбы с вредными насекомыми.

Данная работа посвящена структурному анализу фрагментов ЛИТ.

Исследуемый токсин выделяли из ядовитых желез паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* по методу [1], его гомогенность подтверждали электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS [4], анализом N-концевых аминокислотных остатков, а также аминокислотным анализом после 24-часового гидролиза 6 н. HCl. Было показано, что ЛИТ представлял собой белок с молекулярной массой около 120 кДа, его N-концевым аминокислотным остатком являлась глутаминовая кислота, а аминокислотный состав соответствовал ранее описанному [1]. Полученный препарат белка обладал парализующим действием на личинок мухи *Musca domestica*.

Попытки определения N-концевой аминокислотной последовательности свежевыделенного препарата ЛИТ непосредственно в аликвоте раствора не привели к получению однозначных результатов, поскольку молекула ЛИТ в условиях автоматического секвенирования подвергалась произвольному расщеплению. Более успешным оказался анализ предварительно иммобилизованного белка. В этом случае для исследования N-концевой последовательности 50 пмоль токсина подвергали электрофорезу в ПААГ в присутствии SDS с последующим электропереносом белковой зоны на поливинилидендифторид (иммобилон, Millipore, США). В результате автоматического секвенирования иммобилизованного белка была получена N-концевая последовательность

Glu-Met-Ser-Xaa-Ala-Asp-Gln-Xaa-Lys-Leu-Leu-Ala-Tyr-

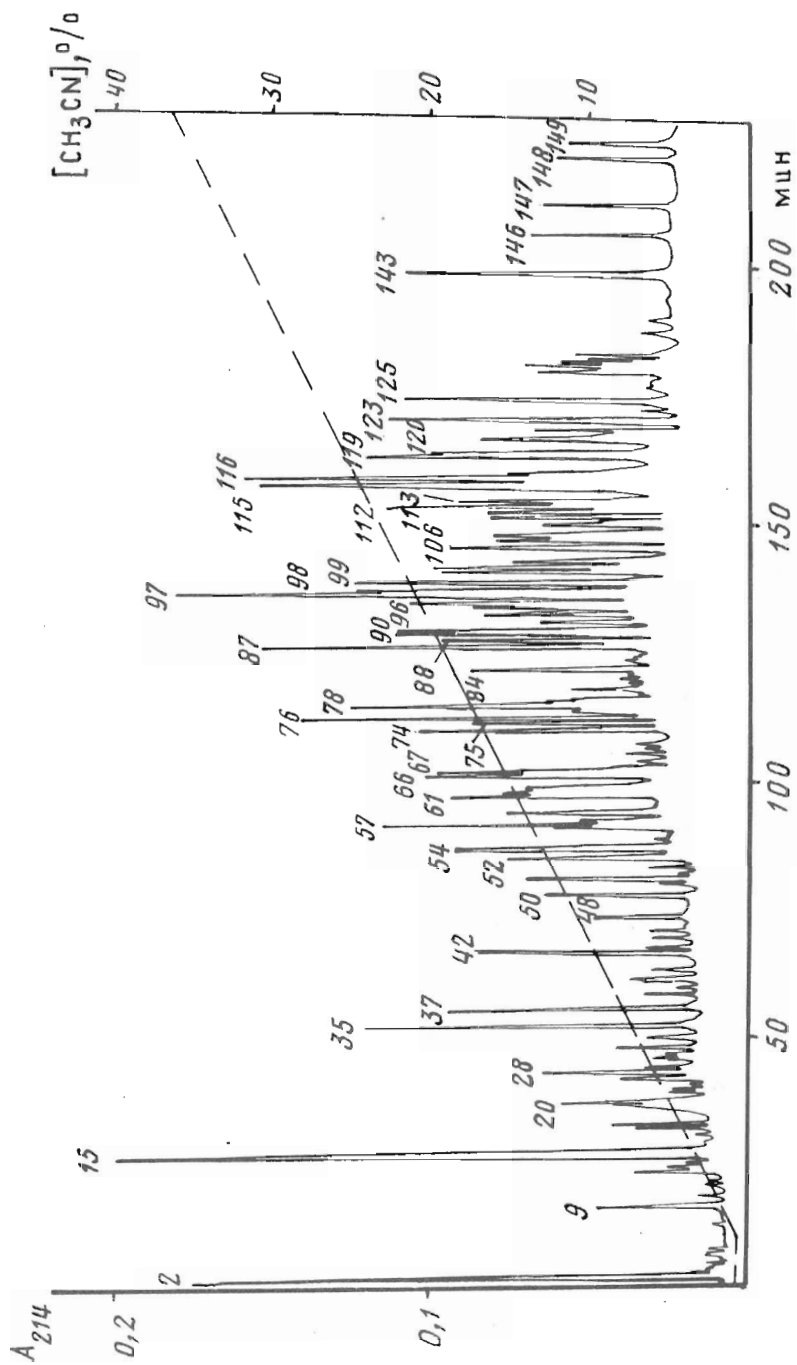


Рис. 1. Фракционирование растворимой части триглицевого гидролизата КМ-ЛИТ методом ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке (4,6×250 мм) Ultrasphere ODS C<sub>18</sub> в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин

54-2	Gly-Ser-Gln-Val-Glu-Phe-Arg
57-3	Tyr-Leu-Val-Arg
57-4	Tyr-Phe-Val-Gln-Glu-Arg
66-4	Phe-Thr-Ala-Leu-His-Ala-Ala-
74-1	Leu-Gln-Glu-Pro-Ala-Pro-Gly-Asn-Phe-
74-4	Trp-Thr-Pro-Leu-
75-1	Tyr-Asp-Lys-Ile-Glu-Ile-Val-Lys
76-3	Tyr-Ala-Ile-Gln-Phe-Glu-
78-3	Ser-Asp-Asp-Lys-Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Leu-
78-4	Gln-Gly-Arg-Phe-Glu-Ile-Val-Arg
84-3	Asp-Ile-Asn-Leu-Leu-Glu-Lys
84-4	Leu-Leu-Ser-Asp-Glu-Asn-Leu-Asn-Ile-
87-2	Leu-Asn-Glu-Ser-Glu-Xaa-Asn-Pro-Leu-His-Glu-Ala-Ala-Ala-Tyr-
87-3	Asp-Leu-Tyr-Asn-Ala-Ala-Gln-
88-4	Thr-Ile-Leu-Tyr-His-Ala-Ile-Xaa-Asp-Xaa-Ala-Lys
90-4	Asn-Asp-Phe-Met-Asp-Val-
96-2	Thr-Leu-Ile-Gln-
97-3	Gly-Ile-Asn-Pro-Ala-Glu-Phe-Asn-Glu-Glu-Asn-Gln-Ala-Ser-Pro-Phe-
99-1	Leu-Gln-Glu-Pro-Ala-Pro-Gly-Asn-Phe-Leu-
99-2	Ala-Glu-Asp-Ile-Asn-Ser-Gln-Met-Pro-Ile-Xaa-Glu-Ala-Val-Ser-
112-2	Ser-Asp-Leu-Phe-Thr-Pro-Leu-
112-7	Leu-Phe-Tyr-Asp-Leu-Met-Lys
115-7	Leu-Val-Ile-Glu-Thr-Ile-Glu-Asn-Ile-Ala-Thr-Lys
116-3	Glu-Ile-Ala-Asn-Met-Glu-Leu-Pro-Ile-Ile-Asp-Glu-Thr-Pro-
119-3	Xaa-Asp-Val-Gln-Glu-Asn-Thr-Pro-Ile-Thr-Val-Ala-Ile-Phe-
119-4	Leu-Gln-Glu-Pro-Ala-Pro-Gly-Asn-Phe-Leu-Leu-Tyr-
119-5	Gln-Phe-Gly-Asp-Gln-Ile-Pro-Glu-Leu-Val-Gly-Thr-Leu-
123-2	Asn-Glu-Glu-Ile-Pro-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-

Рис. 2. Аминокислотные последовательности триптических фрагментов ЛИТ. Первая цифра соответствует номеру фракции, из которой выделен пептид (см. рис. 1), следующие цифры – номера фракций рехроматографических очисток

Дальнейший ход структурного анализа ЛИТ был обусловлен необходимостью получения данных для клонирования его структурного гена. Наиболее оптимальным, с нашей точки зрения, подходом является фрагментация белка протеолитическим ферментом с последующим выделением и секвенированием полученных фрагментов. Поскольку в молекуле ЛИТ содержится достаточно большое число остатков цистеина, перед расщеплением белок в течение 4 ч обрабатывали 1000-кратным избытком дитиотреита в присутствии 6 М мочевины с последующим карбоксиметилированием иодуксусной кислотой. После быстрого обессоливания карбоксиметилированного (КМ) токсина на колонке (1,5×13 см) с трис-акрилом GF-05 проводили гидролиз КМ-ЛИТ (20 ч при 37°С) в 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (рН 8) с помощью трипсина (нагрузка фермента 1:50). Гидролизат дважды лиофилизировали, затем растворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте. Растворимую фракцию пептидов разделяли методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS, при этом было получено более 140 фракций (рис. 1). После рехроматографии ряда фракций на колонке (4,6×150 мм) Ultrasphere ODS в 10 мМ ацетата аммония (рН 5,7) в градиенте ацетонитрила автоматическим секвенированием частично или полностью были определены аминокислотные последовательности 26 триптических фрагментов ЛИТ (рис. 2).

При сравнении структуры этих пептидов с известной последовательностью  $\alpha$ -латротоксина [3] оказалось, что некоторые пептиды (66-4, 75-1, 76-3, 78-3, 84-4, 87-2, 87-3, 99-2) обладают значительным (53–90%) структурным подобием с участками молекулы латротоксина. При этом пептиды 66-4, 87-2 и 99-2 совпадают по структуре с участками латротоксина, содержащими внутренние структурные повторы, которые, вероятно, играют важную роль в проявлении функциональной активности обоих токсинов.

Результаты данной работы являются основой для клонирования структурного гена ЛИТ.

Авторы выражают глубокую благодарность И. В. Назимову, Г. А. Гришиной, Н. Б. Левиной за автоматическое секвенирование пептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалевская Г. И., Пашков В. Н., Булгаков О. В., Федорова И. М., Магазиник Л. Г., Гришин Е. В. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 1013–1017.
2. Grasso A. // Neurotoxins in Neurochemistry/Ed. Dolly J. G. N. Y. – Chichester – Toronto: Ellis Horwood Limited Publ., 1988. P. 67–78.
3. Kiyatkin N. I., Dulubova I. E., Chekhovskaya I. A., Grishin E. V. // FEBS Lett. 1990. V. 270. № 1–2. P. 127–131.
4. Loemmli W. N. // Nature. 1970. V. 227. № 5559. P. 680–685.

Поступило в редакцию  
29.XII.1991

O. V. BULGAKOV\*, T. M. VOLKOVA, T. G. GALKINA, V. N. PASHKOV\*,  
K. A. PLUZHNIKOV, E. V. GRISHIN

#### STUDY OF THE AMINO ACID SEQUENCE OF THE BLACK WIDOW SPIDER VENOM LATROINSECTOTOXIN

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow;*

*\*Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy  
of Sciences, Pushchino, Moscow Region*

The N-terminal amino acid sequence of  $\alpha$ -latroinsectotoxin from the venom of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* was determined. Then the toxin was digested by trypsin and total or partial amino acid sequences of twenty-six tryptic peptides were established. This resulted in the structural information needed for the construction of probes followed by the cloning of the  $\alpha$ -latroinsectotoxin structural gene.