



УДК 595.443.7-114.52:577.112.5

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ФРАГМЕНТА кДНК α-ЛАТРОКРУСТОТОКСИНА ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА

© 1999 г. К. Е. Волынский<sup>#</sup>, Т. М. Волкова, Т. Г. Галкина,  
В. Г. Красноперов<sup>1</sup>, К. А. Плужников, М. В. Хвоцев<sup>2</sup>, Е. В. Гришин  
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Микаухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 23.01.98 г. Принята к печати 14.05.98 г.

Клонирован фрагмент структурного гена нового представителя семейства латротоксинов из яда паука каракурта – α-латрокрустотоксина. Фрагмент длиной 1191 п.о., полученный методом ПЦР на основе информации о строении ряда хмотриптических пептидов токсина, кодирует участок аминокислотной последовательности из 397 а. о. Этот полипептид представляет собой С-концевую часть центрального домена молекулы токсина, в которой предположительно локализован участок, отвечающий за видоспецифичность действия белка. Изучено структурное подобие этого участка с соответствующими участками других латротоксинов.

*Ключевые слова:* нейротоксин; *Latrodectus*; клонирование.

Известно, что яд паука каракурта обладает способностью стимулировать нейросекрецию. Массированный выброс практически любых нейромедиаторов из нервных окончаний вызывают высокомолекулярные белковые токсины этого яда, представляющие собой на сегодняшний день семейство из 7 белков с *M* 110–130 кДа. В состав данного семейства входят: нейротоксин для млекопитающих – α-латротоксин (α-LTX), пять высокоспецифичных латроинсектотоксинов (α-, β-, γ-, δ-, ε-LIT), а также α-латрокрустотоксин (α-LCT), селективно действующий на нервные окончания ракообразных [1].

Механизм действия α-LTX на нервные окончания позвоночных изучен наиболее детально. Показано, что он специфически связывается с пресинаптическим рецептором как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca<sup>2+</sup>; стимулирует вход ионов кальция внутрь нервного окончания и массированный выброс нейромедиатора; способен встраиваться в искусственные и плазматические мембраны и образовывать катионселективные каналы [2–5]. Для других представителей семейства латротоксинов получены данные, свидетельствующие о сходном механизме действия на нервную передачу соответствующих животных [1]. В последние годы

была установлена структура трех представителей семейства латротоксинов: α-LTX, α- и δ-LIT [6–8]. Оказалось, что они попарно гомологичны на 34–38% и имеют сходную доменную организацию: N-концевой домен с наибольшей степенью линейной гомологии; центральный домен, состоящий из тандемно расположенных повторов анкиринового типа; С-концевой домен. Областью наибольших различий в структуре трех белков является С-концевая часть центрального домена, в которой у α-токсинов расположен кластер остатков цистеина, образующих дисульфидные связи, а у более низкомолекулярного δ-LIT такой кластер отсутствует. В этой области между аминокислотными остатками 920–1100 у α-LTX обнаружены 6 из 9 остатков цистеина, а у α-LIT – 7 из 10, причем их локализация в двух токсинах не идентична. Было сделано предположение, что именно эти участки молекул обуславливают специфичность связы-

	1	10	20
α-LCT	EMSKADQGTFLRYQGGVAYGTT	I	GA-
α-LIT	EMSRADQCKLLAYTAVGYETVGNVA-		
α-LTX	EGEDLTLEEKAEI	CSELELQ	KYVD-
δ-LIT	DEEDGEMTLEERQAQCKA	I	EYSNSV-

Рис. 1. N-Концевые аминокислотные последовательности α-LCT, α-LIT [7], α-LTX [6] и δ-LIT [8]. Идентичные в сравнении с α-LCT аминокислотные остатки затемнены.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 336-40-22; факс: (095) 330-73-01; e-mail: volyn@ibch.siobc.ras.ru).

<sup>1</sup> В настоящее время: Департамент фармакологии Медицинского центра Университета Нью-Йорка, Нью-Йорк, США.

<sup>2</sup> В настоящее время: Департамент молекулярной генетики Юго-Западного медицинского центра Университета Техаса, Даллас, США.

$\alpha$ -LIT 740 -HLGIIGKNEEIPFFL- 754  
 110-3 1 XLAIMNPNTETPQFL- 14

$\alpha$ -LIT 1131 -LVROGADVNAKGIDDLRPIDIAAGEKAKA- 1158  
 84-4 1 LVQKGADVNAKGXENLKPIXLAGEKXXA- 28

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей химотриптических пептидов 110-3 и 84-4  $\alpha$ -LCT с близкими по структуре фрагментами  $\alpha$ -LIT. Идентичные аминокислотные остатки затемнены.

вания латротоксинов со своими рецепторами, и, как следствие, их таксоспецифичность. Поскольку  $\alpha$ -LCT специфичен к третьему виду животных, возникают вопросы, существует ли в нем подобный кластер остатков цистеина, какова первичная структура фрагмента его молекулы в С-концевой части центрального домена и какова степень ее гомологии с соответствующими участками других латротоксинов.

1	<u>-Met Asn Pro Asn Thr Glu Thr Pro Gln Phe Leu Ile Ala Lys Gly Ala Asn Ile Asn</u>
1	TATG AAC CCG AAT ACT GAG ACA CCA CAG TTT CTT ATC GCA AAA GGA GCA AAT ATC AAT
20	<u>Ala Lys Thr Asn Asp Gly Ser Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Ala Leu Gly Lys Thr</u>
59	GCA AAA ACA AAT GAT GGA AGT ACG CCT TTA CAT TTT GCT GCT GCA TTA GGC AAA ACC
39	<u>Asn Ile Phe Gln Leu Leu Met Asp Lys Gly Ala Asn Ile Lys Ala Glu Asn Leu Ile</u>
116	AAC ATT TTC CAG TTA CTT ATG GAC AAA GGA GCA AAT ATA AAA GCT GAA AAT TTA ATT
58	<u>Asn Gln Met Pro Ile His Glu Ala Val Val Asn Gly His Leu Ala Ile Val Lys Met</u>
173	AAT CAA ATG CCT ATT CAT GAA GCC GTT GTG AAT GGG CAC CTG GCA ATT GTC AAA ATG
77	<u>Leu Ile Glu Gln Asp Ser Ser Leu Met Asn Ala Lys Asn Met Arg Asp Glu Tyr Pro</u>
230	CTG ATT GAG CAA GAT TCT TCT CTT ATG AAT GCG AAA AAT ATG AGG GAT GAA TAT CCA
96	<u>Phe Tyr Leu Ala Ala Glu Lys Arg Tyr Lys Asp Val Phe Asn Tyr Leu Glu Ser Lys</u>
287	TTT TAC CTC GCT GCA GAA AAA CGT TAT AAA GAT GTA TTT AAT TAC CTT GAA AGC AAA
115	<u>Gly Ala Asp Val Asn Glu Lys Asn Asn Asp Gly Asn Thr Leu Leu His Leu Phe Ser</u>
344	GGA GCT GAT GTA AAT GAG AAA AAT AAC GAC GGA AAT ACG CTT TTA CAT TTG TTC TCT
134	<u>Ile Asn Gly Glu Val Glu Val Val Gln Phe Leu Ile Gln Asn Gly Ala Asp Phe Arg</u>
401	ATC AAC GGG GAG GTT GAG GTT GTT CAG TTT CTA ATT CAA AAT GGT GCT GAC TTC CGG
153	<u>Leu Arg Asn Lys Glu Arg Lys Ser Phe Phe Asp Leu Ala Val Glu Phe Gly His Ala</u>
458	CTA AGG AAC AAG GAA AGA AAG AGT TTT TTC GAT CTT GCC GTC GAG TTC GGA CAC GCC
172	<u>Gly Ile Val Gly Tyr Ala Ile Glu Glu Asn Lys Val Asp Leu Gln Glu Pro Tyr Arg</u>
515	GGT ATT GTG GGA TAT GCC ATT GAA GAA AAC AAG GTG GAT CTC CAG GAA CCT TAT CGA
191	<u>Gly Lys Thr Ile Leu Tyr His Ala Ile Cys Asp Ser Val Lys Tyr Asp Arg Ile Glu</u>
572	GGG AAA ACA ATC CTA TAT CAT GCT ATT TGT GAT TCT GTG AAA TAC GAC AGG ATA GAA
210	<u>Val Val Arg Tyr Phe Val Glu Thr Leu Asn Glu Asp Gln Cys Ser Pro Leu Gln Glu</u>
629	GTA GTG AGG TAT TTT GTC GAA ACT CTT AAC GAG GAC CAG TGT AGT CCA CTG CAG GAA
229	<u>Ala Ala Ala Tyr Ala His Leu Asp Leu Val Lys Tyr Phe Val Gln Glu Arg Gly Ile</u>
686	GCA GCA GCT TAT GCT CAT TTA GAT TTA GTG AAA TAC TTT GTT CAG GAG AGA GGA ATA
248	<u>Asn Pro Thr Ala Phe Asn Asn Asp Asn Gln Val Ser Pro Leu Cys Ile Ala Ile Val</u>
743	AAC CCC ACT GCA TTC AAT AAT GAC AAT CAA GTG TCT CCC CTA TGC ATT GCA ATA GTG
267	<u>Gly Ala Pro Cys Gly Phe Val Lys Ser Cys Asp Thr Pro Glu Arg Leu Asp Val Val</u>
800	GGT GCA CCA TGT GGG TTT GTA AAA TCA TGT GAT ACT CCC GAA CGC TTG GAT GTC GTT
286	<u>Glu Tyr Leu Val Asp Lys Thr Pro Asp Ile Asn Lys Glu Cys Asp Thr Gln Gln Ser</u>
857	GAG TAC CTG GTG GAC AAA ACG CCT GAC ATA AAT AAA GAA TGT GAT ACA CAA CAG AGT
305	<u>Thr Pro Val Ser Ser Ala Val Tyr Gly Asn Lys Val Ser Ile Leu Asn Tyr Leu Ile</u>
914	ACT CCA GTC TCC AGT GCA GTA TAC GGC AAT AAA GTT TCG ATT TTG AAT TAT TTA ATA
324	<u>Arg Asn Gly Ala Asp Pro Asn Lys Lys Val Arg Gly Asp Pro Pro Leu Phe Ile Ala</u>
971	CGA AAT GGA GCT GAT CCC AAT AAA AAA GTT AGG GGA GAT CCA CCA CTT TTC ATT GCT
343	<u>Ala Met Ile Gly Gln Tyr Asp Ile Val Lys Ser Leu Val Glu Gln His Lys Ile Asp</u>
1028	GCT ATG ATT GGA CAA TAC GAT ATC GTA AAG AGT TTA GTA GAG CAG CAT AAG ATT GAC
362	<u>Val Asn Thr Arg Asn Lys Glu Gln Phe Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Ser Asn Asp</u>
1085	GTT AAT ACA AGA AAC AAA GAG CAG TTT ACA CCA TTA CAT GCA GCA GCT AGT AAC GAT
381	<u>His Ile Asp Val Val Lys Tyr Leu Val Gln Lys Gly Ala Asp Val Asn Ala-</u>
1142	CAC ATC GAT GTG GTG AAA TAC TTG GTA CAA AAG GGA GCA GAT GTA AAC GC

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК  $\alpha$ -LCT и выведенная из нее аминокислотная последовательность фрагмента токсина (нумерация аминокислот с N-конца фрагмента). Аминокислотные последовательности, соответствующие структуре химотриптических пептидов  $\alpha$ -LCT (см. таблицу) – подчеркнуты. Стрелками (R11–R21) отмечено начало повторов анкиринового типа [6–8].

Пептиды химотриптического гидролизата  $\alpha$ -LCT\*

Пептид	Аминокислотная последовательность	Положение гомологичных участков в $\alpha$ -LIT [7]
51-3	DLANPS-	195-202
58-3	RDIHRDLY-	426-433
59-8	HLASRQD-	538-544
59-9	XMIGGXG-	нет гомологии
59-10	SFID-	291-294
84-4	LVQKGADVNAKGXENLKPIXLAGEKXXA-	1131-1158
84-7	VSSGNEFRXI-	419-428
89-6	XIASE-	1150-1154
90-7	FVQEXGINPTAF-	984-995
96-3	SIXGEVXVV-	876-884
96-4	NIDISTRADQAITP-	нет гомологии
96-6	HIASERKNNDFFVK-	504-516
98-5	INETPAGINIKSNSGL-	586-601
101-5	AIHNPNTS-	468-475
101-6	TAANATGNSQI-	707-717
106-2	DLPIHXTF-	322-330
110-3	XLAIMNPNTETPQFL-	740-754
112-4	IVRGEXAV-	нет гомологии
112-6	AHLXLVKYF-	976-984
114-7	GNEKPXLI-	326-333
114-8	TLVGP-	413-417
118-3	XIAIVGAPXGFVKS-	1005-1018
120-5	NEVNKKLQKGAEALENVTELAEKTY-	78-102
121-5	XXINQELAI PNNAADNNAIXALF-	190-212
122-4	SLAAATGNSQIVXTILNSGAVVXQETAN-	707-734
123-3	XEESSSVPG-	58-66

\* Пептиды маркированы в соответствии с нумерацией фракций, полученных при хроматографии химотриптического гидролизата  $\alpha$ -LCT (последняя цифра соответствует номеру фракции при рехроматографии); буквой X обозначены неидентифицированные аминокислотные остатки.

Для ответа на вопросы была предпринята данная работа по молекулярному клонированию и определению нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК, кодирующего С-концевую область центрального домена  $\alpha$ -LCT.

$\alpha$ -LCT выделяли из цельного яда каракурта по методу [9] и определяли его N-концевую аминокислотную последовательность. Ее сравнение с N-концевыми аминокислотными последовательностями других латротоксинов показало наибольшую структурную гомологию с  $\alpha$ -LIT (рис. 1), который, как и  $\alpha$ -LTX, имеет равную  $\alpha$ -LCT молекулярную массу (данные SDS-ПААГ). Для получения дальнейшей структурной информации перед протеолизом белок подвергали восстановлению и карбоксиметилированию. Исчерпывающего ферментативного гидролиза  $\alpha$ -LCT(Cm)\* удалось до-

биться только при обработке химотрипсином в присутствии 4 М мочевины в течение 36 ч. Методом ВЭЖХ из гидролизата получено более 130 пептидных фракций, часть из которых была подвергнута дополнительной очистке. Автоматической деградацией по Эдману установлена полная или частичная аминокислотная последовательность 26 химотриптических пептидов (таблица). Компьютерное сравнение структур пептидов  $\alpha$ -LCT с аминокислотными последовательностями других латротоксинов выявило, что большинство пептидов обладают наибольшей линейной гомологией с первичной структурой  $\alpha$ -LIT [7] и распределены равномерно вдоль всей его полипептидной цепи (таблица). Для трех пептидов не найдено заметного структурного сходства ни с одним из латротоксинов.

Для клонирования фрагмента кДНК  $\alpha$ -LCT, предположительно кодирующего часть молеку-

\* Карбоксиметилированный по остаткам Cys белок.

1	M N P N T E T P Q E L I A K G A N I N A K T N D G S T P L H F A A A L G K T N I F Q L L M D K G A N	α-LCT
744	I G K N E E I P F F L V E K G A N V N D K T N S G V T P L H F A A A G L G K A N I F R L L L S R G A D	α-LIT
752	M S K Y P E L I Q I L L D Q G S N F E A K T N S G A T P L H L A T F K G K S Q A A L I L L N N E V N	α-LTX
51	J K A E N L I N Q M P I H E A V V N G H L A I V K M L I E Q D S S L M N A K N M R D E Y P F Y L A A	α-LCT
794	I K A E D I N S Q M P I H E A V S N G H L E L V R I L I E K D P S L M N V K N I R N E Y P F Y L A V	α-LIT
802	W R D T D E N G Q M P I H G A A M T G L L D V A Q A I I S I D A T V V D I E D K N S D T P L N L A A	α-LTX
101	E K R Y K D V F N Y L E S K G A D V N E K N N D G N T L L H L F S I N G E V E V V Q F L I Q N G A D	α-LCT
844	E K R Y K D I F D Y F V S K D A N V N E V D H N G N T L L H L F S S T G E L E V V Q F L M Q N G A N	α-LIT
852	Q N S H I D V I K Y F I D Q G A D I N T R N K K G L A P L L A F S K K G N L D M V K Y L F D K N A N	α-LTX
151	F R L R N K E R K S F F D L A V E F G H A G I V G Y A I E E N K - - - V D L Q E P Y R G K - - -	α-LCT
694	F R L K N N E R K T F F D L A I E N G R L N I V A F A V E K N K - - - V N L Q A A H R G K - - -	α-LIT
902	V Y I A D N D G M N F F Y Y A V Q N G H L N I V K Y A M S E K K D K F E W S N T D N N R D E	α-LTX
193	- - T I L Y H A I C D S V K Y D R I E V V R Y F V E T L N E - D Q C S P P Q E A A A Y A H L D L V K	α-LCT
936	- - T I L Y H A I C D S A K Y D K I E I V K Y F I E K L N E - S E C N P L H E A A A Y A H L D L V K	α-LIT
952	E C A I S H F A V C D A V Q F D R I E I V K Y F V G T L G N F A I C G P L H Q A A R Y G H L D I V K	α-LTX
240	Y F V Q E R G I N P T A F N N D N O V S P L C I A I V G A P C G F V K S C D T P E R L D V V E Y L V	α-LCT
963	Y F V Q E R G I N P A E F N E E N Q A S P P C I T I H G A P C G Y S L D C D T P D R L E V V E Y L S	α-LIT
1002	Y L V E E E F L S V - - D G S K T D T P L C Y A S E N G - - - - - H F T V V Q Y L V	α-LTX
290	D K T P D I N K E C D T Q Q S T P V S S A V Y G N K V S I L N Y L I R N G A D - P N K K V R G D P P	α-LCT
1033	D K I P D I N G K C D V Q E N T P I T V A I F A N K V S I L N Y L V G I G A D - P N Q Q V D G D P P	α-LIT
1037	S N G A K V N H D C G N G M T A - I D K A I T K N H L Q V V Q F L A A N G V D F R R K N S R G T T P	α-LTX
339	L F I A A M I G Q Y D I V K S L V E Q - - H K I D V N T R N K E Q F T P L H A A A S N D H I D V V K	α-LCT
1082	L Y I A A R Q G R F E I V R C L I E V - - H K V D I N T R N K E R F T A L H A A A R N D F M D V V K	α-LIT
1086	F L T A V A E N A L D I A E Y L I R E K R Q D I N I N E Q N V D K D T A L H L A V Y Y K N L Q M I K	α-LTX
387	Y L V Q K S A D V N A	α-LCT
1130	Y L V R Q G A D V N A	α-LIT
1136	L L I K Y G I D V T I	α-LTX

Рис. 4. Сравнение аминокислотной последовательности полученного фрагмента α-LCT с соответствующими фрагментами α-LIT и α-LTX. Идентичные аминокислотные остатки затемнены, остатки цистеина взяты в рамки.

лы, содержащей кластер остатков цистеина, было решено использовать ПЦР на первой цепи кДНК с праймерами, сконструированными на основании информации о структуре химотриптических пептидов 110-3 и 84-4. Эти пептиды гомологичны соответственно областям 740-754 и 1131-1158 в молекуле α-LIT (рис. 2).

Для снижения вырожденности праймеров был проведен анализ частоты использования кодонов в кДНК α-LTX, α-LIT и δ-LIT (данные не представлены). На основе структуры центральной части пептида 110-3 (IMNPNTET) (таблица) синтезирован прямой праймер ПР1: (5')AA(T/A/C)ATGAA(C/T)CC(G/A/T/C)AA(C/T)AC(G/A/C/T)GA(G/A)AC. Для конструирования обратного праймера ПР2 выбрана последовательность пептида 84-4 (QKGADVNA): (5')GC(G/A)TT(G/A/C/T)AC(G/A)TC(T/A)GC(G/A/C/T)CC(C/T)TT(C/T)TG. В результате ПЦР с этими праймерами получили продукт ожидаемой длины – около 1200 п. о., который затем был клонирован в плазмидный вектор pBlueScript II SK+. При его секвенировании установлена нуклеотидная последовательность длиной 1191 п. о., содержащая открытую рамку считывания для последовательности длиной 397 а. о.

Сравнение структур химотриптических пептидов α-LCT с выведенной аминокислотной последовательностью продукта ПЦР показало, что кроме двух пептидов, выбранных нами для построения

олигонуклеотидных праймеров, первичные структуры еще четырех пептидов – 90-7, 96-3, 112-6 и 118-3, соответствуют различным участкам этой последовательности (рис. 3, таблица). Эти данные – прямое доказательство того, что полученный продукт ПЦР, – фрагмент структурного гена, кодирующего α-LCT. В последовательности соответствующего фрагмента α-LCT, как и в C-концевых фрагментах центрального домена других латротоксинов, присутствуют повторы анкиринового типа (рис. 3) [6–8].

Компьютерное сравнение выведенной аминокислотной последовательности фрагмента α-LCT с соответствующими фрагментами α-LTX и α-LIT выявило высокую степень линейной гомологии с фрагментом α-LIT – около 68%, тогда как гомология с α-LTX составила всего 31.2% (рис. 4). В исследуемом фрагменте α-LCT, как и в аналогичном фрагменте α-LTX, обнаружено 6 остатков цистеина. В соответствующем фрагменте α-LIT присутствует дополнительный седьмой остаток этой аминокислоты в положении 1096. Из рис. 4 видно, что во всех токсинах совпадает расположение 4 остатков цистеина, в то время как в α-LCT и α-LIT идентично расположены 6 остатков. Остатки цистеина в положениях 948 и 953 в α-LTX не имеют соответствующих цистеиновых остатков в структуре α-LCT и α-LIT, в то же время в токсине, специфичном для млекопитающих, отсутствуют цистеиновые остатки, гомологичные Cys<sup>270</sup>, Cys<sup>276</sup> α-LCT и

Cys<sup>1013</sup>, Cys<sup>1019</sup>  $\alpha$ -ЛТ. Эти данные позволяют высказать предположение, что рецепторы  $\alpha$ -ЛТ насекомых и  $\alpha$ -LCT ракообразных имеют сходное строение, тогда как рецептор  $\alpha$ -LTX позвоночных сильно отличается от них. Таким образом, остатки цистеина в изучаемых фрагментах  $\alpha$ -ЛТ и  $\alpha$ -LCT расположены аналогично и для обеспечения таксоспецифичности этих токсинов, по-видимому, достаточно наличия точечных аминокислотных замен в участках связывания с рецепторами. Наиболее выраженные структурные различия  $\alpha$ -LCT и  $\alpha$ -ЛТ (рис. 4) наблюдаются между Cys<sup>270</sup> и Cys<sup>276</sup>, а также в области 250-258, и именно эти участки не имеют гомологии с  $\alpha$ -LTX. Структуры всех трех токсинов имеют существенные различия во фрагментах, соответствующих остаткам 186-189 и 220-224  $\alpha$ -LCT.

Таким образом, полученная в данной работе структурная информация позволяет более точно локализовать участки наибольших различий в молекулах латротоксинов, которые, вероятно, отвечают за их видоспецифичность. Нельзя, безусловно, исключить возможность того, что фрагменты С-концевой части центрального домена молекул латротоксинов, содержащие цистеиновые кластеры, не единственные структуры, определяющие специфичность связывания токсинов со своими рецепторами. Дальнейшие работы по функциональной экспрессии химерных конструкций латротоксинов, а также их мутантных форм помогут более детальному анализу участков латротоксинов, отвечающих за высокоспецифичное связывание с рецепторами на пресинаптической мембране.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лиофилизированный цельный яд *Latrodectus mactans tredecimguttatus* получали на Ташкентском зоокомбинате и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

В работе использовали реактивы и маркерные белки для SDS-ПААГ, (dT)<sub>12-18</sub>, (dN)<sub>6</sub>, дезокси-нуклеозидтрифосфаты (Pharmacia, Швеция), поливинилдендифторидные мембраны (иммобилон ТМ) (Millipore, США), химотрипсин (Boehringer Mannheim, Германия), рестрикционные эндонуклеазы, ДНК-лигазу фага Т4, экзонуклеазу III (Stratagene, США), обратную транскриптазу MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (USB, США), ДНК-полимеразу фага Т7 (Pharmacia Biotech, Швеция), Taq-ДНК-полимеразу (Ферментас, Литва), S1-нуклеазу (Amersham, Великобритания), полинуклеотидкиназу фага Т4, фрагмент Кленова (NEB, США), штамм *Escherichia coli* XL1Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZDM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)).

**Карбоксиметилирование  $\alpha$ -LCT и химотриптический гидролиз  $\alpha$ -LCT(См).**  $\alpha$ -LCT выделяли

из цельного яда *L. m. tredecimguttatus* по методу [9]. К 0.44 мг ( $\sim 3.4$  нмоль)  $\alpha$ -LCT в 1 мл 50 мМ Трис-НСl, рН 8.2 добавляли мочевины до концентрации 6 М, EDTA – до 2 мМ и 1.7 мкмоль дитиотреита; выдерживали 3 ч при  $70^{\circ}\text{C}$  и еще 48 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . К реакционной смеси добавляли 3.4 мкмоль иодуксусной кислоты и через 15 мин ( $20^{\circ}\text{C}$ ) диализовали против 0.1 М Трис-НСl, рН 8.2, содержащего 4 М мочевины. Полученный  $\alpha$ -LCT(См) гидролизовали химотрипсином при соотношении фермент–субстрат 1 : 20 (по весу) в течение 36 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , фермент добавляли равномерно тремя порциями. Гидролизат 30 мин центрифугировали при 15000g. Супернатант фракционировали.

**Фракционирование химотриптического гидролизата  $\alpha$ -LCT** осуществляли с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Ultrapore RPMC (4.6  $\times$  250 мм, 5 мкм, Beckman, США) в 0.1% ТФА в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (1  $\rightarrow$  60%, 180 мл), при скорости потока 1 мл/мин. Пептидные фракции отбирали на основании показаний двух проточных спектрофотометров при длинах волн 214 и 280 нм. Рехроматографию отдельных фракций проводили ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Ultrasphere-octyl (4.6  $\times$  250 мм, 5 мкм, Beckman, США) в 0.1% ТФА с разными градиентами концентраций ацетонитрила. Хроматографически индивидуальные пептиды подвергали автоматической деградации в газовой фазе секвенаторе 470А (Applied Biosystems, США).

**N-Концевую аминокислотную последовательность  $\alpha$ -LCT** определяли с помощью автоматической деградации после иммобилизации белка на иммобилоне ТМ. Для этого 25 мкг  $\alpha$ -LCT наносили на мембрану, предварительно вымоченную в метаноле, мембрану высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 30 мин, затем промывали 20% метанолом для удаления солей.

**Клонирование фрагмента кДНК  $\alpha$ -LCT.** Для синтеза кДНК использовали мРНК, выделенную из ядовитых желез каракурта как описано ранее [7]. Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV, в качестве затравки использовали одновременно (dT)<sub>12-18</sub> и полностью вырожденный гексануклеотид (dN)<sub>6</sub>. ПЦР проводили на матрице первой цепи кДНК с праймерами ПР1 и ПР2 при следующих условиях (t,  $^{\circ}\text{C}$ /время, мин): 94/1; 45/1; 72/3; 35 циклов с помощью Taq-ДНК-полимеразы. Продукт ПЦР был экстрагирован смесью фенол:хлороформ (1 : 1), затем хлороформом и осажден этанолом в присутствии 0.3 М ацетата натрия, рН 5.2. К полученному фрагменту (10 мкл водного раствора) добавляли 5 мкл 700 мМ Трис-НСl (рН 7.6), содержащего 100 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ дитиотреит, 5 мкл 1 мМ АТФ; 1 мкл 10 мМ dNTPs; 26 мкл воды, фрагмент Кленова (5 единиц/1 мкл); Т4-полинуклеотидкиназу (20 единиц/2 мкл). Инкубировали 30 мин при

37°C. Экстрагировали смесью фенол-хлороформ, затем хлороформом и высаживали этанолом в присутствии 0.3M ацетата натрия (pH 5.2). Осадок промывали 80% этанолом и растворяли в 15 мкл воды. Полученный раствор ДНК наносили на 1% агарозный гель. Проводили электрофорез при 15 В/см в течение 45 мин. Полосу геля, содержащую фрагмент ДНК длиной около 1200 п. о. вырезали из геля и выделяли ДНК с помощью набора GENE CLEAN (BIO 101 Inc, США). Клонирование полученного продукта ПЦР осуществляли по сайту *EcoRV* в плазмидный вектор pBlueScript II SK+ (Stratagene, США). Для определения первичной структуры рекомбинантной вставки готовили набор матриц для секвенирования методом направленных делеций с помощью экзонуклеаз *EcoIII* и *SI* [10]. Нуклеотидную последовательность полученных клонов определяли по методу [11, 12].

**Компьютерный анализ нуклеотидных и белковых последовательностей** проводили с использованием коммерческого программного пакета DNASTAR, программы MegAlign (DNASTAR Inc, США). Поиск по белковым и нуклеотидным базам данных (SWISSPROT, NBRF-PIR, EMBL, GenBank) проводили с помощью алгоритмов FASTA и BLITZ (по электронной почте EMBL).

**Аналитические процедуры.** Количество белка определяли по методу [13]. Электрофорез цельного яда, фракций и очищенных компонентов проводили в 10% SDS-ПААГ [14].

Авторы выражают благодарность Е.Н. Черговой, И.В. Назимову (ИБХ РАН) и Т.А. Мурановой

(ФИБХ РАН) за секвенирование белка и пептидов; Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grishin E.V. // Pure and Appl. Chem. 1994. V. 66. P. 783–790.
2. Rosental L., Meldolesi J. // Pharmacol. & Ther. 1989. V. 42. P. 115–134.
3. Finkelshtein A., Rubin L.L., Tzeng M.C. // Science. 1976. V. 193. P. 1009–1011.
4. Grasso A., Alema S., Rufini M., Senni M.I. // Nature. 1980. V. 283. P. 774–776.
5. Lelianova V.G., Davletov B.A., Sterling A., Rahman M.A., Grishin E.V., Totty N.F., Ushkaryov Yu.A. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 21504–21508.
6. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Grishin E.V. // FEBS Lett. 1990. V. 270. P. 127–131.
7. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Grishin E.V. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. P. 121–127.
8. Dulubova I.E., Krasnoperov V.G., Khvotchev M.V., Pluzhnikov K.A., Volkova T.M., Grishin E.V., Vais H., Bell D.R., Usherwood P.N.R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7535–7543.
9. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 1567–1569.
10. Henikoff S. // Gene. 1984. V. 28. P. 351–359.
11. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
12. Tabor S., Richardson C.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4767–4771.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## Cloning and Sequencing of a Fragment of the cDNA for $\alpha$ -Latrocrustotoxin from Black Widow Spider Venom

K. E. Volynskii<sup>#</sup>, T. M. Volkova, T. G. Galkina, V. G. Krasnoperov, K. A. Pluzhnikov, M. V. Khvoshchev, and E. V. Grishin

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow GSP-7, 117871 Russia*

A fragment of the structural gene of  $\alpha$ -latrocrustotoxin, a new representative of latrotoxins from black widow spider venom, was cloned. The fragment (1191 bp) was obtained by means of PCR based on the data obtained by sequencing tryptic peptides of the toxin. The fragment codes for a 397-aa sequence. The encoded polypeptide is the C-terminal fragment of the toxin central domain that presumably contains a site responsible for the toxin species specificity. The structural similarity of this fragment to the corresponding fragments of other latrotoxins was studied.

*Key words:* neurotoxin, *Latrodectus*, cloning

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-4022; fax: +7 (095) 330-7301; e-mail: volyn@ibch.siobc.ras.ru.