



УДК 547.962.04

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ТОКСИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ЯДА ЮЖНОРУССКОГО
ТАРАНТУЛА
Lycosa singoriensis

Гришин Е. В., Волкова Т. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Галкин А. А., Пеганова Л. Ф.

Институт хирургии им. А. В. Вишневского Академии медицинских наук СССР, Москва

Из яда южнорусского тарантула *Lycosa singoriensis* выделен полипептидный токсин; показано, что он, как и цельный яд, не имеет протеолитической, фосфолипазной и гемолитической активностей. Установлено, что токсин состоит из 104 аминокислотных остатков с 5 внутримолекулярными дисульфидными связями и имеет молекулярный вес 11780; установлен С-концевой аминокислотный остаток Ala и определено наличие блокированного N-концевого аминокислотного остатка выделенного токсина. Показано, что как цельный яд, так и индивидуальный токсин увеличивают проводимость хемовозбудимых кальциевых каналов гладких мышц*.

В яде некоторых видов пауков содержатся токсины белковой природы, обладающие различным физиологическим действием. Так; из яда *Latrodectus mactans* выделен токсический белковый компонент M 130 000 [2, 3], вызывающий массивный выброс медиатора из нервных окончаний [4–10]. В яде *Loxosceles reclusa* найдены два белковых нейротоксина с M 34 000 [11, 12]. Полипептидный нейротоксин с M 7300 был выделен из яда Арканзасского тарантула *Dugesia hentzi* [13, 14]. Этот токсин обладал летальным действием одновременно на млекопитающих и насекомых.

В настоящее время накоплена довольно обширная информация о физиологических и биохимических свойствах цельного яда пауков, в то время как индивидуальные токсины изучены незначительно. Данная работа посвящена выделению и характеристике токсического компонента яда тарантула *Lycosa singoriensis*, а также исследованию некоторых свойств цельного яда.

Цельный яд тарантула *L. singoriensis* получали в лаборатории биофизики Института биохимии АН УзССР водной экстракцией ядовитых желез. Экстракт освобождали от нерастворимых компонентов центрифугированием и лиофильно высушивали. Сухой яд хранился до использования при -4°C в течение нескольких месяцев без заметной потери активности.

* Предварительные результаты были доложены на IV Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов [1].

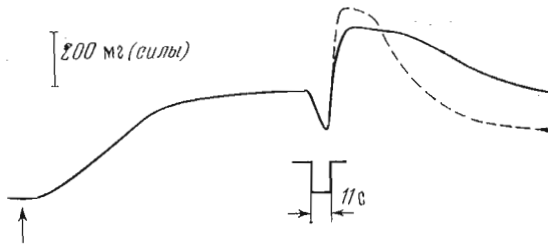


Рис. 1. Влияние яда тарантула *L. singoriensis* на тонус и размыкательный ответ деполяризованной гладкой мышцы *taenia coli* морской свинки. Момент начала подачи яда ($5 \cdot 10^{-5}$ г/мл) отмечен стрелкой. Стимуляция мышцы импульсами гиперполяризующего тока производилась после установления повышенного тонуса в ответ на подачу яда. Импульс тока условно изображен снизу. Для сравнения на рисунке пунктиром показан размыкательный ответ той же мышцы до подачи яда

Препарат яда представляет собой сложную смесь многих компонентов. Согласно данным диск-электрофореза, в его состав входит как минимум 12 различных белков, в основном высокого молекулярного веса. Токсическое действие цельного яда и его фракций определялось внутривенной инъекцией их растворов белым мышам или введенном в брюшко под третий сегмент тараканам *Nauphoeta cinerea*. При этом было установлено, что яд обладал летальным действием только по отношению к млекопитающим (мышам) и его ЛД₅₀ составляла 15 мг/кг. Инъекции тараканам вплоть до 1 мг на особь не оказывали заметного действия на испытуемых насекомых.

Исследуемый яд не проявлял фосфолипазной, протеолитической и гемолитической активностей. Более того, в отличие от яда тарантула *Dugesia hentzi* [14] яд *L. singoriensis* при внутривенном введении белым мышам не вызывал изменения креатинфосфокиназной активности сыворотки крови. Вместе с тем оба эти яда проявляли высокую гиалуронидазную активность.

На нервно-мышечных препаратах *musculus cutaneus pectoris* лягушки и диафрагмы мышцы было показано, что яд тарантула *L. singoriensis* не влияет на частоту и амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки. Эти данные позволили предположить отсутствие в нем компонентов, обладающих нейротоксической активностью. Было также установлено, что цельный яд тарантула не оказывает заметного действия на активность Na^+ , K^+ -активируемой АТФ-азы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -активируемой АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы, K^+ -нитрофенилфосфатазы и цитохром-с-оксидазы. При подкожном введении кроликам яд тарантула не вызывает пекровоз, но резко повышает проницаемость капиллярных кровеносных сосудов.

Цельный яд тарантула вызывает усиление спонтанной импульсной активности и соответствующее сокращение изолированной полоски гладкой мышцы *taenia coli* морской свинки в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ г/мл. Через 10–20 мин препарат гладкой мышцы самопроизвольно расслабляется, несмотря на продолжающуюся подачу яда. Яд вызывает сокращение и тогда, когда мышца полностью деполяризована и изменение мембранного потенциала под влиянием этого яда исключено (рис. 1). Размыкательные сократительные ответы (см. «Экспериментальную часть») деполяризованной мышцы на фоне действия яда заметно уширены по сравнению с нормой (рис. 1) за счет замедления фазы расслабления. На основании представленных данных можно высказать предположение о том, что яд тарантула вызывает усиление входящего потока ионов Ca^{2+} в миоплазму клеток гладких мышц, как это происходит при действии гистамина и брадикинина [15].

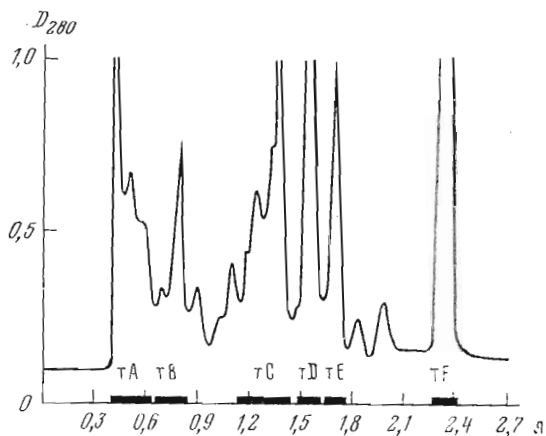


Рис. 2. Разделение цельного яда тарантула *L. singoriensis* (500 мг) на биогеле Р-10 в 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,2; 4° С): колонка 3,4×100 см; объем фракций 15 мл; скорость элюции 30 мл/ч. Отмечены границы объединения фракций

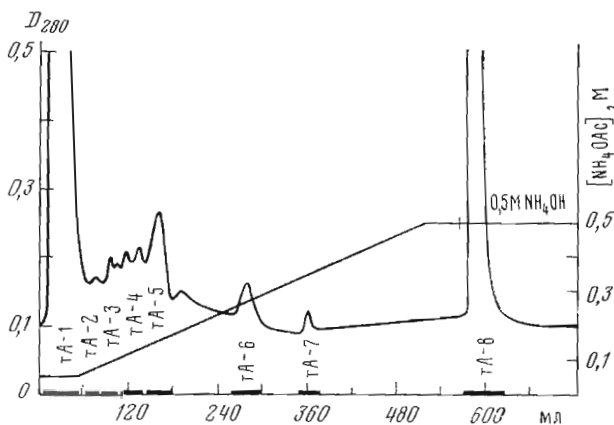


Рис. 3. Разделение фракции тА (75 мг) на целлюлозе СМ-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 6,5; 4° С): колонка 1,5×6 см; объем фракций 5 мл; скорость элюции 30 мл/ч. Отмечены границы объединения фракций

Первичное фракционирование яда тарантула проводили на биогеле Р-10 (рис. 2). В результате гель-фильтрации было получено семь фракций тА — тГ. Фракции тА и тВ были токсичны для мышей. Кроме того, основная доля гиалуронидазной активности содержалась во фракции тВ (60 мкг N-ацетилглюкозамин/мг белка·ч) и практически отсутствовала в других фракциях. По данным диск-электрофореза, в составе наиболее токсичной фракции тА присутствовало около пяти различных белковых компонентов. Для их разделения использовали ионообменную хроматографию на СМ-целлюлозе СМ-32 (рис. 3). При этом были получены восемь фракций, из которых только тА-6 была токсична для мышей (LD_{50} 7 мг/кг веса мыши). Диск-электрофорез тА-6 при рН 4,3 показал наличие в этой фракции только одного белкового компонента, причем количество белка, определенное по методу Лоури, соответствует весу сухой фракции, что позволяет предположить в тА-6 отсутствие небелкового материала. Выход токсического компонента составляет ~0,4% от веса цельного яда, но при этом его токсичность только в 2 раза превышает токсичность исходного яда. Это можно объяснить тем, что либо токсин инактивируется в процессе выделения, либо в цельном яде содержатся компоненты, обладающие синергическим действием по отношению к токсину.

С помощью диск-электрофореза в 10% геле с додецилсульфатом натрия было определено, что молекулярный вес токсина тА-6 составляет 10 000—11 000. Эти данные были подтверждены диск-электрофорезом в 12,5% геле с додецилсульфатом натрия и 8 М мочевиной по методу Като [16] и определением молекулярного веса с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-200 (M 10 600).

При определении N-концевого аминокислотного остатка токсина тарантула по дансильной методике было показано, что N-концевая аминокислота блокирована. При гидролизе токсина карбоксипептидазой А удалось установить наличие в С-концевой области аминокислотных остатков (Phe, Val)-Ala.

Аминокислотный состав токсина тарантула был определен после 24-часового гидролиза 5,7 н. HCl: Asp — 10, Thr — 5, Ser — 3, Glu — 14, Pro — 2, Gly — 6, Ala — 8, Cys — 10, Val — 5, Ile — 5, Leu — 6, Tyr — 2, Phe — 4, His — 5, Lys — 14, Arg — 5.

Оказалось, что токсин состоит из 104 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 11 780. Аминокислотный анализ токсина после гидролиза 4 н. метансульфоновой кислотой показал полное отсутствие остатков триптофана.

При титровании токсина 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) было показано, что он не содержит свободных сульфгидрильных групп. Это обстоятельство позволяет предположить существование в тА-6 пяти внутримолекулярных дисульфидных связей.

Токсин тА-6, как и цельный яд, вызывает сокращение гладких мышц, причем его действующие концентрации: на *taenia coli* $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл, на рог матки крысы $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл. По-видимому, он является высшим аналогом брадикинина, а также других кининов, содержащихся в ядах перепончатокрылых.

Экспериментальная часть

Липофильно высушенный яд южнорусского тарантула *Lycosa singoriensis* получали из Института биохимии АН УзССР. Использовали карбоксипептидазу А (Worthington, США), дансилхлорид (Pierce, США), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (Sigma, США). При хроматографировании использовали биогели (Bio-Rad, США), сефадексы (Pharmacia, Швеция), СМ-целлюлозу СМ-32 (Whatman, Англия). рН буферных растворов определяли с помощью рН-метра РНМ-63 (Radiometer, Дания).

Хроматографическое разделение цельного яда тарантула проводили при 4° С на колонке с биогелем Р-10 в 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,2 (рис. 1). Белок во фракциях определяли спектрофотометрически при 280 нм на приборе Uvicord II (ЛКВ, Швеция).

Фракцию тА (75 мг), полученную после гель-фильтрации на биогеле Р-10, разделяли на СМ-целлюлозе СМ-32 (рис. 3). Гомогенность полученных фракций доказывали с помощью диск-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле при рН 4,3 по методу Рейсфельда и сотр. [17].

Определение токсичности яда, фракций и чистых препаратов проводили на тараканах [18] и внутривенной инъекцией белым мышам весом 20—25 г, ЛД₅₀ рассчитывали по методу Литчфильда и Уилкоксона [19].

Количество белка во фракциях определяли по методу Лоури [20].

Определение ферментативных активностей. Фосфолипазную активность определяли по лецитину, используя метод Салаха и сотр. [21].

При определении гемолитической активности использовали методику приготовления крови и расчеты, описанные ранее [22], степень гемоллиза контролировали спектрофотометрически с помощью спектрофотометра Specord (ГДР) при 420 нм; за 100% принимали гемоллиз в дистиллированной воде. В опытах использовали кровь человека.

Протеолитическую активность определяли по известной методике [23], гиалуронидазную активность цельного яда и фракций — по методу, описанному ранее [24], с некоторыми модификациями. В качестве субстрата использовали гиалуроновую кислоту пупочных канатиков человека, выделенную в ИБХ им. М. М. Шемякина. Для контрольных опытов применяли *N*-ацетилглюкозамин и тестикулярную гиалуронидазу (Reanal, Венгрия). Испытуемые растворы содержали 1 мг белка в 0,2 мл воды; ферментативную реакцию проводили при pH 6 в течение 1 ч при комнатной температуре и останавливали кипячением в водяной бане (3 мин). В реакционную смесь добавляли до pH 8,9 тетраборат калия (0,8 М, pH 13,2). Аминосахара обнаруживали реактивом Эрлиха по методу Райсига [25], но готовили 1% реактив Эрлиха, содержащий 12,5% HCl. Фотометрировали при 586 нм на спектрофотометре Gifford, модель M-240 (США). Активность гиалуронидазы рассчитывали по количеству образовавшегося *N*-ацетилглюкозамина.

Определение влияния цельного яда тарантула на креатинфосфокиназную активность сыворотки крови белых мышей проводили по известной методике [26]. В каждом опыте использовали шесть мышей, четырем из них вводили по 250 мкг цельного яда в 0,25 мл физиологического раствора, двум — 0,25 мл физиологического раствора. Об активности креатинфосфокиназы судили по количеству образовавшегося креатина.

Определение влияния яда тарантула (0,1 мг/мл) на мембранные ферменты проводили на фракциях плазматических мембран сердца собаки (10 мкг белка/мл). Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность контролировали в среде, содержащей 100 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 50 мМ трис, 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ EDTA (pH 7,6). Долю Na^+ , K^+ -АТФ-азной активности определяли в присутствии оубаина.

Среда для определения Mg^{2+} -АТФ-азной активности содержала 50 мМ трис, 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ EDTA (pH 7,5); для Ca^{2+} -АТФ-азной активности: 50 мМ трис, 3 мМ CaCl_2 , 1 мМ EDTA (pH 7,6); для 5'-нуклеотидазной активности 100 мМ KCl, 50 мМ трис, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaK-тарtrat. В реакционную смесь добавляли субстрат (АТФ до 2 мМ, а в последнем случае АМР до 1 мМ) и проводили ферментативные реакции 10 мин при 37° С, реакции останавливали добавлением 0,5 мл 1% HClO_4 . Отщепленный неорганический фосфат обнаруживали по методу Стьюарта [27].

Активность K^+ -нитрофенилфосфатазы определяли в 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), содержащем 5 мМ MgCl_2 , мембранные фракции добавляли в этом случае до концентрации 0,1 мг белка/мл, в качестве субстрата использовали 4,75 мМ *n*-нитрофенилфосфат, реакцию вели 10 мин при 37° С, останавливали 1 н. NaOH. Образовавшийся *n*-нитрофенол определяли спектрофотометрически при 410 нм. Цитохром-*c*-оксидазную активность проверяли по методу [28], изменение окраски регистрировали при 550 нм.

Исследование действия яда на изолированную полоску гладкой мышцы *taenia coli* морской свинки проводили в условиях одновременной регистрации электрической и механической активностей полоски. Для регистрации мембранного потенциала и одновременной стимуляции использовали метод двойного сахарозного моста. Напряжение мышцы измеряли в изометрическом режиме с помощью механотрона 6МХИС. При исследовании действия яда на деполяризованную мышцу был применен метод размыкательных ответов [29], сущность которого состоит в следующем. При деполяризации мембраны, вызванной избытком ионов K^+ во внешнем растворе (120 мМ KCl), электровозбудимые кальциевые каналы, обеспечивающие в норме генерацию потенциалов действия, оказываются инактивированными. При пропускании длительных импульсов тока (от 10 до 20 с), сдвигающих мембранный потенциал в сторону гиперполяризации, инактивация кальциевых каналов устраняется. По окончании импульса кальциевые каналы кратковременно активируются, и в клетку поступают

пона Ca^{2+} . Повышение концентрации Ca^{2+} в мюплазме приводит к сокращению мышцы.

Таким образом, мы получаем возможность отдельно изучать сократительные ответы на химические и электрические возбудители.

Нейротоксическое действие яда тарантула проверяли на нервно-мышечном препарате лягушки (*musculus cutaneus pectoris*) и диафрагме мышцы (с диафрагменным препаратом мышцы работали с циркуляцией при 37°C и насыщении карбогеном) [30]. Частоты и амплитуду миниатюрных потенциалов мышечного волокна регистрировали с помощью микроэлектрода с сопротивлением 5–10 МОм, заполненного KCl, усилителя УТП-2, осциллографа С-1-18, фоторегистратора ФОР-2.

Определение молекулярного веса токсина проводили по Эндриусу [31] на колонке (1×40 см) с сефадексом G-200 в 0,05 М NH_4HCO_3 , pH 8,0. Молекулярный вес токсина определяли также с помощью диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по методу Шапиро [32], а также с помощью диск-электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле с 0,1% додецилсульфатом натрия с применением дансилхлорида [16]. В качестве стандартов использовали альбумин (M 45 000), пепсин (M 35 000), химотрипсиноген А (M 25 000), цитохром с (M 12 400).

Определение аминокислотного состава токсина. 0,01–0,02 мкмоль токсина гидролизовали 24 ч в 0,5 мл 5,7 н. HCl в запаянных вакуумированных ампулах при 110°C . При определении содержания триптофана гидролиз проводили 4 н. метансульфоной кислотой (Pierce, США) в течение 24 ч при 110°C по методу [33]. Серию параллельных аминокислотных анализов каждого гидролизата выполняли на аминокислотном анализаторе модели D-500 (Durrum, США). Количество свободных сульфогидрильных групп определяли с помощью 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) [34].

N-Концевую аминокислоту токсина определяли по ранее описанному методу [35], C-концевые аминокислоты — с помощью карбоксипептидазы А [22] и анализа отщепленных аминокислот на аминокислотном анализаторе.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, а также В. П. Мальковой за определение биологической активности, Н. О. Блиннову за испытание веществ на нервно-мышечных препаратах, В. А. Коваленко за предоставление мембранных фракций сердца собаки, Б. А. Ташмухамедову (Институт биохимии АН УзССР) за любезно предоставленный цельный яд тарантула.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Т. М., Гришин Е. В. (1977) Тез. докл. на IV Всес. симпозиуме по химии белков и пептидов, с. 111.
2. Grasso A. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **439**, 406–412.
3. Ornberg R. L., Smyth T., Jr., Benton A. N. (1976) *Toxicon*, **14**, 329–334.
4. Okamoto M., Longenecker H. E., Riker W. F., Song S. K. (1971) *Science*, **172**, 733–735.
5. Clark A. W., Halbut W. P., Mauro A. (1972) *J. Cell Biol.*, **52**, 1–14.
6. Frontali N., Cecarely B., Gorio A., Mauro A., Sieckevitz P., Treng M.-C. (1976) *J. Cell Biol.*, **68**, 462–479.
7. Griffiths D. J., Smyth T. (1973) *Toxicon*, **11**, 369–374.
8. Paggi P., Toschi G. (1972) *Life Sci.*, **11**, 413–417.
9. Frontali N. (1972) *Brain Res.*, **37**, 146–148.
10. Kawai N., Mauro A., Grundfest H. (1972) *J. Gen. Physiol.*, **60**, 650–664.
11. Geren C. R., Chan T. K., Howell D. E., Odell G. V. (1975) *Toxicon*, **13**, 233–238.
12. Geren C. R., Chan T. K., Howell D. E., Odell G. V. (1976) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **174**, 90–99.
13. Schanbacher F. L., Lee C. K., Hall J. E., Wilson J. B., Howell D. E., Odell G. V. (1973) *Toxicon*, **11**, 21–29.
14. Lee C. K., Chan T. K., Ward B. C., Howell D. E., Odell G. V. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **164**, 341–350.

15. Погадаев В. И., Тимин Е. Н., Ходоров Б. И. (1978) Биофизика, **23**, 290—295.
16. Kato T., Sasaki M., Kimura S. (1975) Anal. Biochem., **66**, 515—522.
17. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. (1962) Nature (London), **195**, 281—283.
18. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. (1978) Биоорг. химия, **4**, 450—461.
19. Белевский М. Л. (1963) Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, с. 81, Гос. изд-во мед. лит-ры, Л.
20. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265—275.
21. Salach J. I., Turini P., Seng K., Hauber J., Singer T. P. (1971) J. Biol. Chem., **246**, 331—339.
22. Ambler R. P. (1972) in: Methods in Enzymology, XXVB, pp. 143—154, 262—272, Acad. Press., N. Y.—London.
23. Нортроп Д., Кунитц М., Херриот Р. (1950) Кристаллические ферменты, с. 296—309, Изд-во иностр. лит., М.
24. Виха И. В., Хорлин А. Я. (1973) Биохимия, **38**, 1237—1242.
25. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. F. (1955) J. Biol. Chem., **217**, 959—966.
26. Асатиани В. С. (1969) Ферментные методы анализа, с. 571—573, «Наука», М.
27. Stewart D. J. (1974) Anal. Biochem., **62**, 349—364.
28. Smith L. (1955) in: Methods in Enzymol., **2**, pp. 732—740, Acad. Press, N. Y.—London.
29. Погадаев В. И., Тимин Е. Н., Ходоров Б. И. (1976) Биофизика, **21**, 848—855.
30. Эндрю Б. Л. (1974) Экспериментальная физиология, с. 52—56, «Мир», М.
31. Andrews P. (1964) Biochem. J., **91**, 222—233.
32. Shapiro A. L., Vinuella E., Maizel J. V. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **28**, 815—820.
33. Moore S. (1972) in: Chemistry and Biology of peptides, pp. 629—653, Johannes Meienhofer, Ed. Ann. Arbor Publishers, Michigan.
34. Ellmann G. L. (1959) Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 70—77.
35. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алдамова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапченко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Кирюшкин А. А., Овчинников Ю. А. (1973) Биохимия, **38**, 3—21.

Поступила в редакцию
6.IV.1979

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A TOXIC COMPONENTS FROM THE VENOM OF TARANTULA *Lycosa singoriensis*

GRISHIN E. V., VOLKOVA T. M., GALKIN A. A., PEGANOVA L. P.
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; A. V. Vishnevsky Institute of Surgery,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A polypeptide toxin has been isolated from the crude venom of tarantula *Lycosa singoriensis*. Neither the isolated toxin, nor the crude venom possess proteolytic, phospholipase or hemolytic activities. The tarantula toxin consists of 104 amino acid residues and contains five intramolecular disulfide bonds. The toxin has a molecular weight of 11 780, C-terminal amino acid residue is Ala and the N-terminus is shown to be blocked. In electrophysiological experiments the crude venom and isolated toxin are found to increase the conductivity of the chemostimulated Ca-channels of smooth muscles.