



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.083

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕЙРОНАЛЬНОГО БЕЛКА С АНТИГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ ЛАТРОТОКСИНА

Цыганкова О. М., Третьяков Л. А., Гришин Е. В.

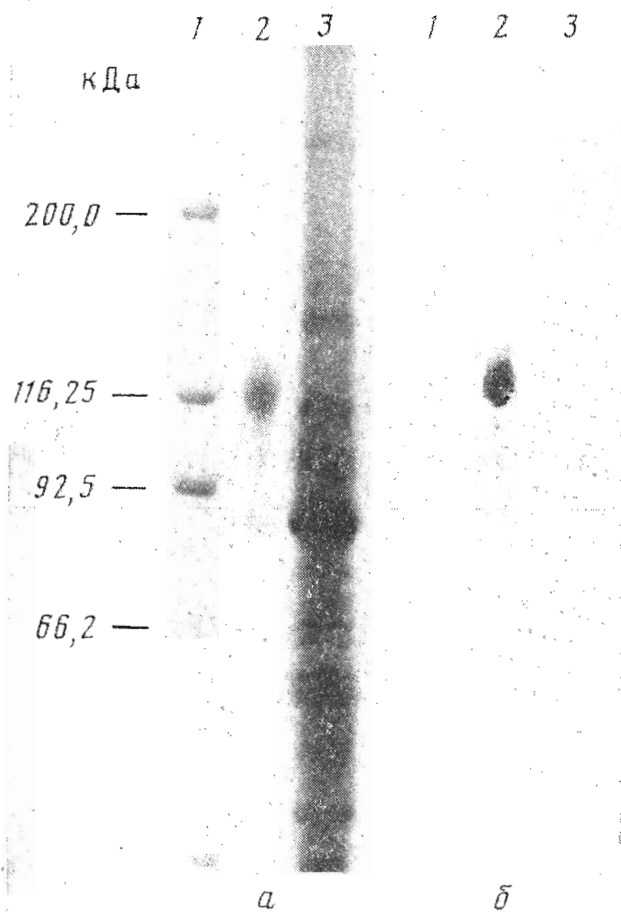
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Идентификация и детальное исследование различных рецепторных систем мембраны нервной клетки неразрывно связаны с использованием природных нейротоксинов, селективно взаимодействующих с изучаемыми нейрональными компонентами. Можно предположить, что наличие высокоспецифичных участков связывания для нейротоксинов на мембранах нервных клеток свидетельствует с достаточно большой вероятностью о существовании в нервной ткани эндогенных аналогов подобных веществ. Действительно, недавно удалось обнаружить эндогенные лиганды для рецепторов апамина и тетродотоксина [1, 2]. Функциональная роль таких эндогенных факторов остается пока неизвестной, но не исключено, что они участвуют в процессе регуляции секреции нейромедиаторов.

Среди природных нейротоксинов, влияющих на секрецию медиатора, особый интерес представляет  $\alpha$ -латротоксин — основной токсический компонент яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, который с большим сродством взаимодействует с пресинаптической мембраной [3, 4]. Данная работа посвящена идентификации и изучению нейронального белка, обладающего антигенными свойствами латротоксина.

Для обнаружения нейронального компонента с подобными антигенными свойствами представлялось целесообразным использовать кроличьи моноспецифические антитела против латротоксина. В качестве объекта исследования была выбрана кора головного мозга быка. Первоначально для поиска компонента, связывающегося с антителами против латротоксина, применяли твердофазный иммуноферментный анализ [5]. При этом максимальный уровень связывающейся активности удалось обнаружить в цитоплазматической фракции коры, полученной по стандартной методике [6]. Специфичность связывания подтверждалась в контрольных опытах с использованием нормальных кроличьих антител.

С целью очистки активного компонента цитоплазматическую фракцию разделяли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Toyo-pearl 650S (Toyo Soda, Япония) в градиенте концентрации KCl. Фракции, элюируемые в диапазоне 0,3–0,4 М KCl, максимально связывались с антителами к латротоксину. В дальнейшем идентификация осуществлялась посредством электрофореза по Лэммли [7] с последующим электрофоретическим переносом белков на нитроцеллюлозный фильтр [8]. Фильтр последовательно инкубировали с моноспецифическими антителами против латротоксина (в качестве контроля — с нормальными иммуноглобулинами), с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (Sigma, США), конъюгированными с пероксидазой хрена, а затем обрабатывали субстратом 4-хлор-1-нафтолом. Моноспецифические антитела к латротоксину взаимодействовали с белковым компонентом с молекулярной массой около 100 кДа (рисунок). Соотнесение белковых зон, проявляющихся при иммуноблоттинге и при окраске кумасси R-250, обеспечивалось с помо-



Электрофоретический анализ фракции цитоплазматических белков, элюируемой 0,3–0,4 М КСl с DEAE-Toyorearl 650 S (3; см. текст); стандартные белки (1), латротоксин (2). Гель окрашен кумасси ярко-синим R-250 (а). Нейрональный белок с антигенными свойствами латротоксина детектирован иммунохимически на нитроцеллюлозном фильтре после электрофоретического переноса с ПААГ (б)

щью обработки нитроцеллюлозного фильтра флуоресцентным красителем [9]. Значение молекулярной массы искомого белка было подтверждено также результатами гель-хроматографии на сефакриле S-300 (не приведено).

Данные электрофоретического анализа позволяют предположить, что зона с молекулярной массой около 100 кДа содержит несколько белковых компонентов с очень близкими значениями электрофоретической подвижности. Однако на основе результатов иммуноблоттинга нельзя сделать вывод о том, какой именно из данных компонентов взаимодействует с антителами против латротоксина. Поэтому задачей дальнейших исследований являлось выделение белковых компонентов в индивидуальном виде для более полного изучения нейронального белка с антигенными свойствами латротоксина. Первоначально в этих целях был использован иммуносорбент на основе моноспецифических антител против латротоксина. Но емкость такого аффинного сорбента оказалась недостаточной для выделения препаративных количеств данного белка. В этой связи весьма перспективным представлялось использование моноклональных антител, поскольку с их помощью можно не только получить иммуносорбент, но и провести идентификацию искомого белка.

Требуемый для получения моноклональных антител материал выделя-

ли электрофоретическим способом. Для этого фракцию, полученную при ионообменной хроматографии (0,3–0,4 М КСl), после концентрирования и обессоливания разделяли с помощью препаративного электрофореза. После окрашивания необходимую зону вырезали и элюировали из нее белковые компоненты по методу [10], которые затем освобождали от красителя в системе метапол — хлороформ (1:2) и использовали в качестве антигена для иммунизации мышей и тестирования гибридных линий. В настоящее время ведутся работы по характеристике клеточных линий, продуцирующих моноклональные антитела против искомого белка.

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о существовании в цитоплазматической фракции коры головного мозга быка белковых компонентов с молекулярной массой около 100 кДа с антигенными свойствами нейротоксина из яда каракурта. Можно надеяться, что дальнейшее изучение данных компонентов приведет к определению их роли в регуляции секреции нейромедиатора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fosset M., Schmid-Antowarchi H., Hugues M., Romey G., Lazdunski M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 7228–7232.
2. Lombet A., Fosset M., Romey G., Jacomet Y., Lazdunski M. // Brain Res. 1987. V. 417. P. 327–334.
3. Ушкарев Ю. А., Грушин Е. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71–80.
4. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. 1985. V. 7. № 4. P. 151–155.
5. Engvall E. // Methods Enzymol. 1980. V. 70. P. 419–439.
6. Kuonen D. R., Roberts P. J. // J. Neurochem. 1987. V. 49. P. 272–280.
7. Laemmli U. K. // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–685.
8. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
9. Szewczyk B., Summers D. F. // Anal. Biochem. 1987. V. 164. P. 303–306.
10. Stearne P. A., van Driel I. R., Grego B., Simpson R. J., Goding J. W. // J. Immunol. 1985. V. 134. P. 443–448.

Поступило в редакцию  
26.V.1988

#### IDENTIFICATION OF A NEURONAL PROTEIN WITH LATROTOXIN-LIKE ANTIGENIC PROPERTIES

TSYGANKOVA O. M., TRETYAKOV L. A., GRISHIN E. V.

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

Monospecific antibodies against neurotoxin from the black widow spider venom ( $\alpha$ -latrotoxin) have been used to identify a neuronal protein (s) with latrotoxin-like epitopes. As determined by ELISA, the protein is localized in cytoplasmic fraction of bovine brain. It was partially purified by anion-exchange chromatography and preparative SDS-electrophoresis. Immunoblotting data indicate that this neuronal acidic protein has molecular mass of ca. 100 kDa.