



УДК 595.443.7-114.52: 577.113.5

## ХРОСОМНЫЕ ГЕНЫ НЕЙРОТОКСИНОВ ПАУКА КАРАКУРТА НЕ СОДЕРЖАТ ИНТРОНОВ

© 2000 г. В. Н. Данилевич<sup>#</sup>, Е. В. ГришинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.05.2000 г. Принята к печати 19.06.2000 г.

Посредством техники ПЦР-амплификации получены и клонированы перекрывающиеся фрагменты хромосомной ДНК паука каракурта *Latrodectus mactans*, несущие гены высокомолекулярных нейротоксинов:  $\alpha$ - и  $\delta$ -латроинсектотоксинов ( $\alpha$ -LIT и  $\delta$ -LIT), а также  $\alpha$ -латротоксина ( $\alpha$ -LTX). Проведен рестриктный анализ и изучена структура выделенных ПЦР-фрагментов. При этом установлено, что распределение и размеры ДНК-рестриктов полностью соответствуют теоретически ожидаемым из данных секвенирования кДНК-копий соответствующих генов токсинов. Из полученных результатов следует, что гены  $\alpha$ -LIT и  $\delta$ -LIT не содержат интронов. С учетом наших результатов по определению структуры гена  $\alpha$ -латрокрустотоксина ( $\alpha$ -LCT) сделано заключение о том, что безынтронное строение – общая черта строения генов каракурта, кодирующих высокомолекулярные токсины.

*Ключевые слова:* нейротоксины; *Latrodectus*; геномная ДНК; ПЦР-амплификация; рестриктный анализ; геномная организация.

### ВВЕДЕНИЕ

Ядовитые железы паука *Latrodectus mactans* вырабатывают высокотоксичный и уникальный по составу яд. В нем обнаружено целое семейство высокомолекулярных нейротоксинов белковой природы, обладающих выраженной структурной гомологией и в то же время отличающихся по специфичности действия [1, 2]. Так, некоторые из изученных нейротоксинов, например  $\alpha$ -латротоксин ( $\alpha$ -LTX), токсичны по отношению к позвоночным [1, 2], другие,  $\alpha$ - и  $\delta$ -латроинсектотоксины ( $\alpha$ -LIT и  $\delta$ -LIT) действуют только на насекомых [3, 4], третьи,  $\alpha$ -латрокрустотоксин ( $\alpha$ -LCT), активны по отношению к ракообразным [5, 6]. Поскольку молекулярная масса всех нейротоксинов каракурта превышает 100 кДа, их аминокислотные последовательности были установлены на основании анализа структуры соответствующих кДНК.

Из всего семейства генов паука каракурта, кодирующих высокомолекулярные нейротоксины, к настоящему времени секвенировано только 4. Три из них (гены *alit*, *dlit* и *altx*) секвенированы на уровне кДНК [7–9] и лишь один ген (*alct*) – на уровне геномной ДНК [10, 11]. При этом оказа-

лось, что структурная часть хромосомного гена *alct*, несмотря на свой большой размер (около 4.5 т. п. о.), не содержит интронов. Оставалось неясным, содержатся ли интроны в других генах данного семейства. Этот вопрос представляет не только теоретический, но и практический интерес, так как если гены анализируемого семейства не содержат интронов, то значительно упрощается задача их клонирования и секвенирования.

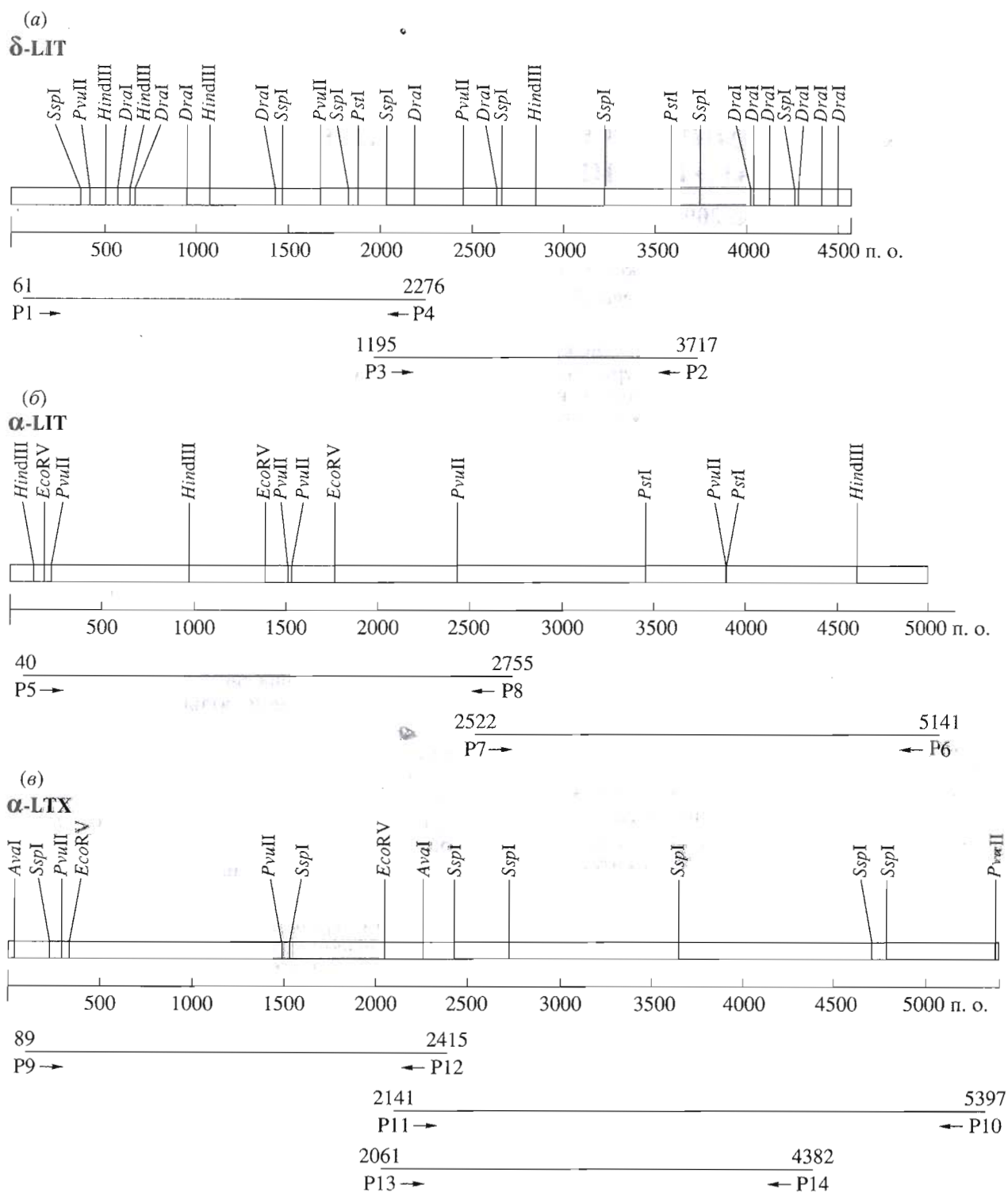
Наиболее простым способом для выяснения вопроса об интронном или безынтронном строении генов высокомолекулярных токсинов каракурта является ПЦР-амплификация и изучение структуры тех генов семейства, нуклеотидная последовательность которых уже определена на уровне кДНК. В соответствии с вышесказанным, в настоящей работе была изучена структурная организация хромосомных генов, кодирующих нейротоксины  $\delta$ -LIT,  $\alpha$ -LIT и  $\alpha$ -LTX.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально была предпринята попытка целиком амплифицировать с помощью ПЦР хромосомные гены, кодирующие  $\delta$ -LIT,  $\alpha$ -LIT и  $\alpha$ -LTX. С этой целью были синтезированы шесть праймерных олигонуклеотидов – по два на каждый ген. Структура праймеров была подобрана таким образом, чтобы они имели одинаковую длину –  $24 \pm 1$  нт и одинаковый GC-состав (~40%). При этом в каждом случае прямой (forward) прай-

Сокращения:  $\alpha$ -LIT и  $\delta$ -LIT –  $\alpha$ - и  $\delta$ -латроинсектотоксины;  $\alpha$ -LTX –  $\alpha$ -латротоксин;  $\alpha$ -LCT –  $\alpha$ -латрокрустотоксин; *alit*, *dlit*, *altx* и *alct* – гены соответствующих нейротоксинов.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: dan@mail.ibch.ru; тел.: (095) 336-65-40; факс: (095) 330-73-01).



**Рис. 1.** Рестриктивные карты кДНК-копий генов паука каракурта, кодирующих  $\delta$ -LIT (а),  $\alpha$ -LIT (б) и  $\alpha$ -LTX (в). Показано положение сайтов (участков расщепления) лишь тех рестриктаз, которые использованы в работе. Показана также локализация (и указаны координаты) амплифицируемых фрагментов.

мер точно соответствовал участку ДНК, расположенному проксимально относительно кодирующей части гена (на небольшом расстоянии от иницирующего кодона), а обращенный (reverse)

праймер был комплементарен участку ДНК, расположенному дистально относительно кодирующей части гена на различном, иногда достаточно большом, расстоянии от терминирующего кодо-

Праймерные олигонуклеотиды, использованные для ПЦР-амплификации перекрывающихся фрагментов ДНК генов нейротоксинов

Олигонуклеотид	Структура олигонуклеотида (5' → 3')*
P1 δ-LIT	TACAAACTATTTTCAGCAGCGGTAG (61–84)
P2 δ-LIT	CAATGGATGACACAGAAGGAATGG (3694–3717)
P3 δ-LIT	CAAGAAGTTGCAGAATCTTTAGTGG (1995–2019)
P4 δ-LIT	AACGGTAAGATTACCATCTGCAAC (2253–2276)
P5 α-LIT	GTTTATGCAGGTAGCTTTGTGAAG (40–63)
P6 α-LIT	TTAGTGCCTTAAGAAATCGATAGG (5118–5141)
P7 α-LIT	ATGAAGCTGTATCGAATGGACATC (2522–2545)
P8 α-LIT	CAACTTCAAGTTCTCCTGTACTGG (2732–2755)
P9 α-LTX	CTGTAGGAGAAATTATGGAACGC (89–111)
P10 α-LTX	TGTGTTTTGGTCTACAGCTGAGAG (5374–5397)
P11 α-LTX	ATGCGAATGTAGTATCTTCTCCTG (2141–2164)
P12 α-LTX	AAGCTCTGGATACTTGCTCATTGC (2392–2415)
P13 α-LTX	CAACATAACAGCTTTGCACTATGC (2061–2084)
P14 α-LTX	TACATTGTGTCTGCCTTCCAAC TG (4359–4382)

\* В скобках указаны координаты участков ДНК генов нейротоксинов (см. рис. 1а, б, в), соответствующих или комплементарных праймерным олигонуклеотидам.

на (см. рис. 1). Структура праймеров приведена в таблице.

В опытах по ПЦР-амплификации полноразмерных генов использовали праймеры P1 + P2 (ген *δlit*), P5 + P6 (ген *αlit*) и P9+P10 (ген *αltx*) (таблица). Расчетные размеры фрагментов кДНК, ограниченных вышеуказанными праймерами, составляли 3656, 5101 и 5308 п. о., соответственно. При ПЦР-амплификации в качестве матрицы использовали нативную хромосомную ДНК, а также ДНК, расщепленную рестриктазой *SmaI*.

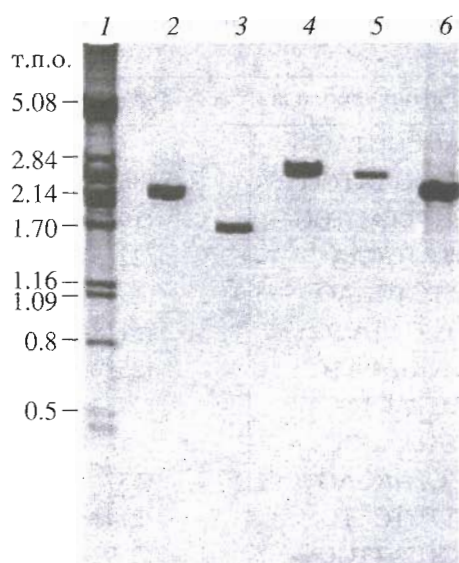
Эксперименты по амплификации полноразмерных генов нейротоксинов, однако, оказались неудачными. Возможными причинами этому могли быть структурные особенности амплифицируемых генов, их относительно большой размер, а также, весьма вероятно, недостаточно высокое качество препаратов ДНК, используемых для ПЦР. В наших экспериментах геномная ДНК была выделена из ядовитых желез паука, хранившихся в течение длительного времени (более 5 лет) при -70°C. Не исключено, что выделенные образцы хромосомной ДНК могли содержать повреждения (апуриновые сайты, одноцепочечные разрывы), что делало их непригодными для ПЦР-амплификации длинных фрагментов. Кроме того, условия проведения ПЦР могли быть не оптимальными (качество фермента, состав буферной смеси и т.д.).

На следующем этапе проводилась амплификация фрагментов генов нейротоксинов. Для этого было синтезировано дополнительно по два праймера к внутренним участкам генов, расположен-

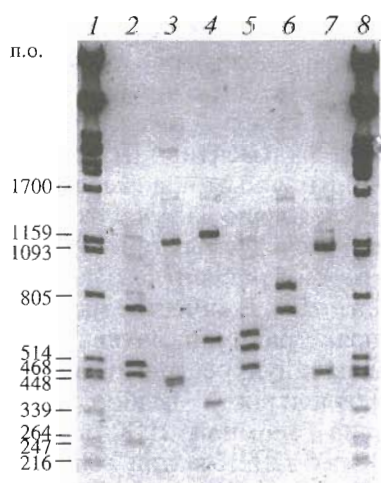
ных примерно в середине секвенированных последовательностей кДНК (см. рис. 1а, б, в). Выбор структуры праймеров осуществлялся с учетом ранее описанных правил – их длина составляла 24 ± 1 нт, а содержание GC-пар – около 40%. Размеры фрагментов кДНК, ограниченных прямым и обращенным праймерами, в этом случае (как это следовало из нуклеотидных последовательностей исследуемых генов) варьировали от 1698 п.о. (второй фрагмент *δlit*) до 3256 п. о. (второй фрагмент *αltx*). В качестве матрицы для ПЦР в этих случаях брали как нативную ДНК, так и ДНК, расщепленную рестриктазами *BamHI*, *XhoI* и *SmaI* по отдельности. Выбор ферментов для фрагментации геномной ДНК определялся тем, что в пределах кДНК-копий генов анализируемых токсинов отсутствуют участки расщепления этих рестриктаз.

В ходе проведенных экспериментов по ПЦР-амплификации нами были получены перекрывающиеся фрагменты ДНК (по два фрагмента) генов *αlit* и *δlit* и один фрагмент гена *αltx* (см. рис. 2). Соответствующие фрагменты были получены с использованием встречных праймеров P1 + P4 (проксимальная часть гена *δlit*), P3 + P2 (дистальная часть гена *δlit*), P5 + P8 (проксимальная часть гена *αlit*), P7 + P6 (дистальная часть гена *αlit*), P9 + P12 (проксимальная часть гена *αltx*) (таблица). Неоднократные попытки получить второй (дистальный) фрагмент гена *αltx* с использованием праймеров P11 + P10 не увенчались успехом, что, по-видимому, связано с особенностями строения





**Рис. 2.** Электрофорез в 1% агарозном геле фрагментов ДНК-продуктов ПЦР-амплификации проксимальной (2) и дистальной (3) частей гена *delta lit*; проксимальной (4) и дистальной (5) частей гена *alpha ltx*; проксимальной (6) части гена *alpha ltx*. Дорожка 1 – *PstI*-фрагменты ДНК фага  $\lambda$ .



**Рис. 3.** Изучение структуры гена *delta lit*. Электрофорез в 1% агарозном геле фрагментов ДНК, образующихся при действии рестриктаз *DraI* (2), *HindIII* (3) и *PvuII* (4) на ДНК-продукт ПЦР-амплификации проксимальной части гена *delta lit*, а также рестриктаз *SspI* (5), (*HindIII* + *PstI*) (6) и (*PstI* + *PvuII*) (7) на ДНК-продукт ПЦР-амплификации дистальной части этого гена. 1, 8 – *PstI*-фрагменты ДНК фага  $\lambda$ .

данного фрагмента и/или с его значительным размером (3256 п. о.).

Возвращаясь к характеристике полученных в ходе ПЦР-амплификации фрагментов ДНК, нужно отметить, что их размеры практически соответствуют (в пределах ошибки эксперимента) таковым, вычисленным из данных секвенирования

кДНК. Как следует из данных электрофоретического анализа соответствующих фрагментов ДНК (см. рис. 2), наибольшие размеры имеют проксимальный и дистальный фрагменты гена *alpha ltx* (их вычисленные размеры равны 2715 и 2619 п.о.), за ним следует единственный фрагмент гена *alpha ltx* (2326 п.о.). Наименьшие размеры у фрагментов гена *delta lit* (2215 и 1722 п.о.).

С целью идентификации ПЦР-фрагментов и более точного определения их размеров была исследована их структура с помощью рестриктового анализа. Предварительно осуществлялась реамплификация этих фрагментов и накопление достаточно большого количества ДНК для препаративного электрофореза и элюции из геля. Очищенные образцы ДНК расщепляли рестриктазами, а полученные при этом фрагменты (рестрикты) фракционировали в 1–1.5% агарозном геле. Подбор рестриктаз для расщепления конкретного ПЦР-фрагмента проводили на основании рестриктной карты соответствующей ему кДНК-копии гена, построенной с помощью компьютерной программы DNASTar. Сайты расщепления для использованных в работе рестриктаз в пределах анализируемых генов нейротоксинов показаны на рис. 1а, б, в. Так, в пределах проксимальной части гена *delta lit*, ограниченной встречными праймерами P1 и P4, имеется 5 сайтов расщепления рестриктазы *DraI*, т.е. при расщеплении соответствующего ей продукта ПЦР этой рестриктазой должно образовываться 6 фрагментов. В опыте на электрофореграмме *DraI*-рестриктов мы наблюдали 4 полосы, соответствующие фрагментам с размерами 750, 490, 460 и 250 п.о. (рис. 3, дорожка 2) (размеры этих фрагментов в пределах ошибки измерения хорошо соответствуют расчетным). Два фрагмента из 6 имеют маленькие размеры (81 и 98 п.о.) и не видны в данных условиях электрофореза.

Внутри проксимальной части гена *delta lit* имеется также три сайта расщепления *HindIII*, т.е. при расщеплении соответствующего продукта ПЦР этой рестриктазой в случае отсутствия интронов должно образовываться 4 фрагмента. На электрофореграмме мы наблюдали три фрагмента с размерами 1160, 450 и 420 п. о.; четвертый маленький фрагмент размером 120 п.о. не виден (см. рис. 3, дорожка 3). Размеры трех *HindIII*-фрагментов в опыте также хорошо соответствуют расчетным. Продукт ПЦР, соответствующий проксимальной части гена *delta lit*, расщепляется, кроме того, на три фрагмента рестриктазой *PvuII*, имеющей два сайта в пределах анализируемой части гена (рис. 3, дорожка 4). И в этом случае размеры образующихся рестриктов также полностью соответствуют расчетным. Аналогичная стратегия была использована также и для анализа структуры других ПЦР-фрагментов.

При анализе структуры ПЦР-фрагментов в некоторых случаях соответствующие ДНК расщепляли одновременно двумя рестриктазами. Так, дистальный фрагмент гена *δlit* расщепляли рестриктазой *SspI* (имеет три сайта в пределах дистальной части гена) (рис. 3, дорожка 5), а также независимо рестриктазами *HindIII* + *PstI* и *PstI* + *PvuII* (рис. 3, дорожки 6, 7). Эти ферменты имеют по одному сайту внутри анализируемой части гена *δlit*. Перекрывающиеся фрагменты ДНК гена *αlit* анализировали с помощью рестриктаз *PvuII* и *EcoRV* (проксимальный фрагмент) (рис. 4, дорожки 1, 2), а также *HindIII* + *PvuII* (дистальный фрагмент гена) (рис. 4, дорожка 4).

Единственный ПЦР-фрагмент гена *αltx* анализировали с помощью рестриктаз *EcoRV* и *PvuII* (одинокое расщепление) (рис. 4, дорожки 5, 6).

Подводя итог этой части работы, нужно отметить следующее. Число сайтов расщепления для используемых рестриктаз и их локализация в пределах анализируемых ДНК-продуктов ПЦР в точности соответствует расчетным данным, основанным на нуклеотидных последовательностях кДНК. Это означает, что исследуемые хромосомные гены, кодирующие нейротоксины, не содержат интронов. Отсутствие интронов в нескольких достаточно больших структурных эукариотных генах является необычным фактом, поскольку, как известно [12–17], даже относительно небольшие гены, кодирующие белковые токсины у пресмыкающихся (змей) и членистоногих (скорпионов), содержат интроны. У змей гены токсинов состоят из трех экзонов и двух интронов. При этом один интрон встроен в область, соответствующую сигнальному пептиду, второй находится в пределах собственно структурной части гена [12–14]. Согласно данным цитируемых авторов, размеры интронов у змей варьируют от ~200 до ~1250 п. о. У скорпионов гены белковых токсинов содержат по одному интрону, встроенному в участки ДНК, кодирующие сигнальные пептиды [15–17]. При этом размер интрона у различных видов колеблется от 87 до 425 п. о. [15–17]. В литературе практически отсутствуют данные о структуре генов, кодирующих белковые токсины у других представителей паукообразных. В то же время известно, что интрон-экзонное строение характерно для генов, кодирующих синтез гемоглобина (белка – переносчика кислорода) у паука тарантула *Eurypelma californicum* [18], а также для генов пауков, кодирующих белок паутины [19]. Причина, по которой гены, кодирующие высокомолекулярные токсины у паука каракурта, не содержат интронов, не вполне ясна.

Таким образом, учитывая результаты нашей предыдущей работы по изучению структуры хромосомного гена, кодирующего α-LCT [11], можно предполагать, что безинтронное строение – ха-

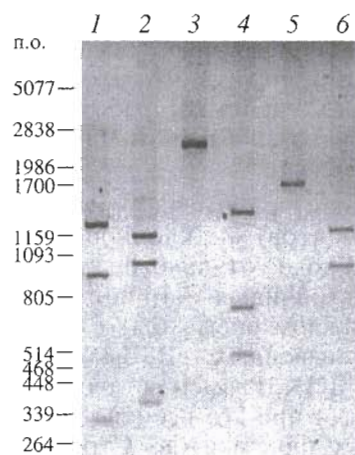


Рис. 4. Изучение структуры генов *αlit* и *αltx*. Электрофорез в 1% агарозном геле фрагментов ДНК, образующихся при действии рестриктаз *PvuII* (1) и *EcoRV* (2) на ДНК-продукт ПЦР-амплификации проксимальной части гена *αlit*; (*HindIII* + *PvuII*) (4) на ДНК-продукт ПЦР-амплификации дистальной части гена *αlit*; *EcoRV* (5) и *PvuII* (6) на ДНК-продукт ПЦР-амплификации проксимальной части гена *αltx*. Дорожка 3 – полноразмерный продукт ПЦР-амплификации дистальной части гена *αlit*, необработанный рестриктазами. Слева показано положение *PstI*-фрагментов ДНК фага λ.

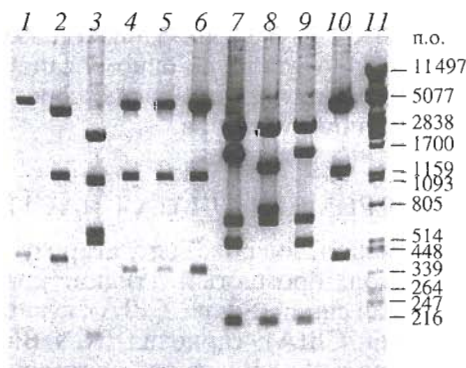


Рис. 5. Анализ структуры рекомбинантных плазмид, полученных при клонировании фрагментов ДНК-продуктов ПЦР-амплификации в векторную плазмиду rBSIIsk(+) по сайту *EcoRV*. Электрофорез в 1% агарозном геле фрагментов ДНК, образующихся при действии рестриктазы *HindIII* (1, 2) на ДНК двух рекомбинантных плазмид со вставками проксимальной части гена *δlit* в двух противоположных ориентациях; рестриктазы *SspI* на ДНК плазмиды со вставкой дистальной части гена *δlit* (3); рестриктазы *EcoRV* (4–6) на ДНК трех независимых плазмид со вставками проксимальной части гена *αlit* в единственной ориентации; рестриктаз *HindIII* + *PvuII* (7–9) на ДНК трех независимых рекомбинантов со вставкой дистальной части гена *αlit* в противоположных ориентациях; *PstI* (10) на ДНК плазмиды со вставкой дистальной части гена *αlit* (ориентация вставки – та же, что и на дорожке 8). Дорожка 11 – *PstI*-фрагменты ДНК фага λ.



рактерная черта организации генов всего семейства высокомолекулярных токсинов паука каракурта. Нужно отметить, что это обстоятельство может сильно упростить работу по изучению структуры генов еще неизученных представителей этого семейства.

Полученный в работе набор ПЦР-фрагментов (все 5 фрагментов) мы клонировали в плазмиду рBSIIsk(+). В ходе тотального скрининга плазмид из клонов, устойчивых к ампициллину трансформантов, в каждом опыте было выявлено по несколько производных рBSIIsk(+), содержащих вставочные ДНК. Размер вставок у выявленных рекомбинантов при этом соответствовал размеру клонируемых фрагментов. Структуру вставочных ДНК у рекомбинантных плазмид дополнительно исследовали с помощью набора рестриктаз. Результаты рестриктазного анализа рекомбинантных плазмид представлены на рис. 5.

Как следует из полученных данных, исследованные нами рекомбинантные плазмиды содержат вставки полноразмерных фрагментов ДНК-продуктов ПЦР, как правило, в двух противоположных ориентациях. В перспективе (при необходимости) перекрывающиеся фрагменты генов *αlit* и *δlit* можно объединить и получить полноразмерные гены. В случае гена *αlit*, такое объединение можно осуществить с помощью рестриктазы *BclI*, сайт расщепления которой расположен в точке с координатой 2696, а в случае гена *δlit* – с помощью рестриктазы *NdeI*, расщепляющей соответствующую ДНК в точке с координатой 2056. Обе рестриктазы имеют лишь по одному сайту в пределах анализируемых генов и расщепляют ДНК с образованием липких концов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: Трис, агарозу, EDTA, меркаптоэтанол, бромистый этидий, краситель бриллиантовый синий (Sigma, США); гуанидинтиоцианат (Fluka, США); саркозил (ICN Biochemicals, США); триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); эндонуклеазы рестрикции *BamHI*, *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *PstI*, *SmaI*, *SspI*, *HindIII* (Fermentas, Литва). Фосфатаза CIAP (Amersham, США). Термостабильные ДНК-полимеразы *KlenTaq* и *Pfu*, а также полинуклеотидкиназа фага T4 и ДНК-лигаза фага T4 были любезно предоставлены В.М. Крамаровым (лаб. биотехнологии ИБХ РАН).

Структура олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров для ПЦР, представлена в таблице.

**Выделение геномной и плазмидных ДНК.** В тех случаях, когда не указано особо, использовали общепринятые методики [20].

Геномную ДНК выделяли из замороженных ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) ядовитых желез паука, используя ранее

описанную методику [11], которая является модификацией гуанидинтиоцианатного метода выделения РНК [21]. Плазмидные ДНК выделяли методом щелочной денатурации [22] и очищали на колонках Wizard (Promega).

**Рестриктный анализ ДНК.** Структуру плазмидных ДНК, а также линейных фрагментов ДНК-продуктов ПЦР, анализировали с помощью рестриктаз *DraI*, *EcoRV*, *PstI*, *PvuII*, *SspI* и *HindIII*. Условия обработки ДНК рестриктазами и электрофорез фрагментов описаны в [20].

**ПЦР-амплификация.** При постановке ПЦР в качестве матрицы использовали как нативную хромосомную ДНК, так и геномную ДНК, фрагментированную с помощью рестриктаз. Для этого геномную ДНК подвергали полному расщеплению рестриктазами *BamHI*, *SmaI* и *PvuII* по отдельности (100 нг ДНК на реакцию). При постановке ПЦР главным образом использовали смесь *KlenTaq*-полимеразы и *Pfu*-полимеразы (соотношение активностей 50 : 1). (В отдельных случаях для ПЦР использовали ДНК-полимеразу CombiPol и соответствующий буфер со стабилизатором фирмы InViTek (Германия).)

Условия ПЦР: 35–40 циклов; денатурация –  $92^{\circ}\text{C}$ , 30 с; отжиг –  $62^{\circ}\text{C}$ , 30 с; синтез –  $72^{\circ}\text{C}$ , 3 мин. Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 10–20 нг двухцепочечной ДНК, по 10 пмоль каждого праймера и буфер (50 мМ Трис-НСI, pH 9.2; 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 250 мкг/мл BSA). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1.0–2.0% агарозном геле с применением стандартного Трис-ацетатного буфера [20].

С целью получения препаративных количеств фрагментов ДНК-продуктов ПЦР для рестриктного анализа, проводили дополнительно ПЦР-амплификацию (реамплификацию) в тех же условиях. Для этого реакционную смесь после завершения первого раунда ПЦР разводили в 20 раз и 1–2 мкл брали для второго раунда ПЦР. Число циклов во втором раунде составляло 20.

Фрагменты ДНК, полученные в результате ПЦР, очищали методом элюции из агарозного геля и использовали для рестриктного анализа, а также для клонирования.

**Клонирование ДНК.** Очищенные фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР-амплификации, фосфорилировали полинуклеотидкиназой фага T4 и клонировали в векторную плазмиду рBSIIsk(+)  
(Stratagene), линейризованную рестриктазой *EcoRV* и дефосфорилированную с помощью щелочной фосфатазы из поджелудочной железы теленка (CIAP).

**Электротрансформация бактерий.** Рекомбинантные ДНК вводили в клетки реципиентного штамма *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene) посредством электротрансформации [23, 24]. Селекцию трансформантов проводили на чашках с

L-агаром [20] в присутствии ампициллина в концентрации 50 мкг/мл.

Авторы выражают благодарность Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, В.М. Крамарову за предоставленные ферменты, Л.Е. Петерсу за препарат ДНК-полимеразы CombiPol и С.А. Лукьянову за полезные замечания, сделанные при обсуждении полученных результатов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grishin E.V. // *Toxicon*. 1998. V. 36. P. 1693–1701.
2. Grishin E.V. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 264. P. 276–280.
3. Knipper M., Madedu L., Breer Y., Meldolesi J. // *Neuroscience*. 1986. V. 19. P. 55–62.
4. Магазаник Л.Г., Федорова И.М., Антонов С.М., Ковалевская Г.И., Булгаков О.В., Пашков В.Н., Гришин Е.В. // *Биол. мембраны*. 1990. Т. 7. С. 660–661.
5. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. // *Биоорганич. химия*. 1990. Т. 16. С. 1567–1569.
6. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. // *Биоорганич. химия*. 1991. Т. 17. С. 716–718.
7. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Grishin E.V. // *FEBS Lett.* 1990. V. 270. P. 127–133.
8. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Grishin E.V. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 213. P. 121–127.
9. 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. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 7535–7543.
10. Вольнский К.Е., Волкова Т.М., Галкина Т.Г., Красноперов В.Г., Плужников К.А., Хвощев М.В., Гришин Е.В. // *Биоорганич. химия*. 1999. Т. 25. С. 25–30.
11. Данилевич В.Н., Лукьянов С.А., Гришин Е.В. // *Биоорганич. химия*. 1999. Т. 25. С. 537–547.
12. Fuse N., Suchiya T., Nonomura Y., Menez A., Tamiya T. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 193. P. 629–633.
13. Chang L.S., Lin J., Chou Y.C., Hong E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 239. P. 756–762.
14. Chang L.S., Chou Y.C., Lin S.R., Wu B.N., Lin J., Hong E., Sun J.Y., Hsiao C.D. // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1997. V. 122. P. 1252–1259.
15. Delabre M.L., Pasero P., Marilley M., Bougis P.E. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 6729–6736.
16. Legros C., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F. // *FEBS Lett.* 1997. V. 402. P. 45–49.
17. Xiong Y.M., Ling M.N., Wang D.C., Chi C.W. // *Toxicon*. 1997. V. 35. P. 1025–1031.
18. Voll W., Voit R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 5312–5316.
19. Hayashi C.Y., Lewis R.V. // *Science*. 2000. V. 287. P. 1477–1479.
20. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
21. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 5294–5299.
22. Birnboim H.C., Doly J. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1531–1533.
23. Hanahan D.J. // *Mol. Biol.* 1983. V. 166. P. 557–580.
24. Dover W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 6127–6145.

## The Genes Encoding Black Widow Spider Neurotoxins are Intronless

V. N. Danilevich<sup>#</sup> and E. V. Grishin

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

The overlapping fragments of the chromosomal DNA from black widow spider *Latrodectus mactans* carrying genes for high-molecular-mass protein neurotoxins,  $\alpha$ - and  $\delta$ -latroinsectotoxins ( $\alpha$ -LIT and  $\delta$ -LIT) and  $\alpha$ -latrotoxin ( $\alpha$ -LTX), were PCR-amplified and cloned. Restriction analysis of the PCR products showed that the distribution and sizes of the restriction fragments coincided with those deduced from the earlier sequencing of cDNAs of the corresponding genes. It thus followed that the  $\alpha$ -LIT and  $\delta$ -LIT genes are intronless. Along with our data on the structure of the  $\alpha$ -latrocrustotoxin ( $\alpha$ -LCT), this implies that the lack of introns is a common feature of the black widow spider genes encoding high molecular mass neurotoxins.

*Key words: neurotoxins, Latrodectus, genomic DNA, PCR-amplification, restriction analysis, gene structure*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-6540; fax: +7 (095) 330-7301; e-mail: dan@mail.ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 12. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.