



УДК 577.112.5:615.919:595.44-114.52.088

## УЧАСТКИ УЗНАВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ А4 И А24 В МОЛЕКУЛЕ $\alpha$ -ЛАТРОТОКСИНА

© 2000 г. В. Д. Лазарева, Н. Е. Бочарова<sup>#</sup>, К. Е. Волынский, Т. М. Волкова, 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 13.08.99 г. Принята к печати 20.12.99 г.

Участки молекулы  $\alpha$ -латротоксина ( $\alpha$ -LTX), связывающие функционально активные моноклональные антитела (МА) А4 и А24, локализованы с использованием трех подходов: гидролиз молекулы токсина и определение *N*-концевой аминокислотной последовательности иммунореактивных пептидов; изучение взаимодействия МА с несколькими рекомбинантными фрагментами  $\alpha$ -LTX; твердофазный ИФА синтетических перекрывающихся пептидов (6–8 а. о.), соответствующих структуре иммунореактивного фрагмента  $\alpha$ -LTX. Показано, что эпитоп МА А4 находится в области F<sup>234</sup>–M<sup>294</sup> молекулы белка, а МА А24 взаимодействуют с фрагментом <sup>347</sup>FDKDI<sup>352</sup>.

*Ключевые слова:* моноклональные антитела; латротоксин.

Природные нейротоксины – ценные инструменты изучения молекулярных механизмов передачи нервного импульса. Этим объясняется повышенный интерес к ним со стороны биохимиков и нейробиологов. Большое внимание в последнее время уделяется исследованию яда каракурта и его основного токсического компонента –  $\alpha$ -латротоксина ( $\alpha$ -LTX), стимулирующего секрецию нейромедиаторов из нервных окончаний позвоночных [1]. Первичная структура  $\alpha$ -LTX была установлена нами ранее на основании нуклеотидной последовательности структурного гена [2]. В ходе экспериментов на синапсосомах и клетках феохромоцитомы РС12 показано, что  $\alpha$ -LTX вызывает повышение концентрации Ca<sup>2+</sup> внутри клетки за счет увеличения проницаемости клеточной мембраны для Ca<sup>2+</sup> [3, 4]. На пресинаптической мембране мозга млекопитающих локализованы два высокоаффинных рецептора  $\alpha$ -LTX – нейрексин 1 $\alpha$  [5] и латрофилин [6], отвечающих, по-видимому, за кальцийзависимое и кальцийнезависимое действие токсина, соответственно.

Влияние МА, полученных против  $\alpha$ -LTX, на его функциональные эффекты было изучено в экспериментах на клетках РС12 [7] и синапсосомах из мозга крыс [8–10]. Так, в работе [8] была получена панель МА и исследована их биологическая активность. Показано, что изучаемые МА не влияли на связывание токсина с рецепторами. В то же время было обнаружено, что некоторые МА способны полностью или частично блокировать вызванные  $\alpha$ -LTX эффекты по секреции

GABA и переносу Ca<sup>2+</sup> внутрь синапсосом. В частности, МА А24 полностью блокировали активированные токсином вход Ca<sup>2+</sup> и секрецию GABA, а МА А4, блокируя вход Ca<sup>2+</sup>, снижали способность  $\alpha$ -LTX стимулировать секрецию лишь на 45%. Это обстоятельство позволило сделать предположение о существовании в молекуле токсина нескольких функциональных доменов, ответственных за токсин-рецепторное взаимодействие, кальцийзависимый и кальцийнезависимый секретогенные эффекты [8]. Для локализации этих доменов в молекуле токсина в настоящей работе было проведено картирование молекулы  $\alpha$ -LTX с помощью МА А4 и А24.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленной задачи последовательно использовали три подхода: гидролиз молекулы токсина различными методами с последующим хроматографическим или электрофоретическим разделением полученных фрагментов; гетерологическую экспрессию в бактериальной системе  $\kappa$ ДНК, кодирующей фрагменты молекулы  $\alpha$ -LTX; для уточнения положения эпитопов МА синтезировали перекрывающиеся 6–8-членные пептиды, повторяющие аминокислотную последовательность молекулы  $\alpha$ -LTX. На всех этапах работы исследовали взаимодействие полученных фрагментов или синтетических пептидов с МА.

На первом этапе молекулу  $\alpha$ -LTX [2] как в нативном виде, так и модифицированную по остаткам Cys ( $\alpha$ -LTX(CM)), подвергали расщеплению BrCN по остаткам Met и ферментами (трипсином, химотрипсином, термוליзином и протеиназой V8

Сокращения: GABA –  $\gamma$ -аминомасляная кислота.

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

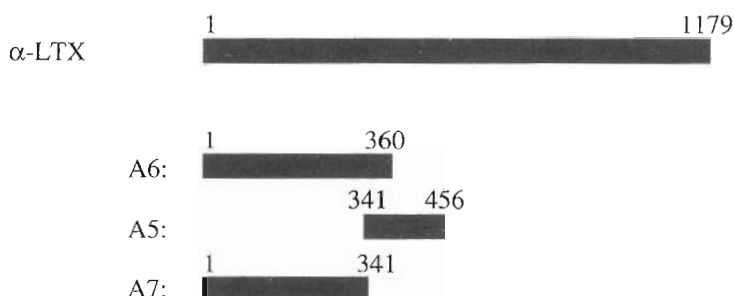


Рис. 1. Схема расположения экспрессированных фрагментов в молекуле  $\alpha$ -LTX.

из *Staphylococcus aureus*) в различных условиях для получения фрагментов минимальной длины, сохраняющих способность взаимодействовать с МА. Полученные гидролизаты фракционировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ или SDS-ПААГ-электрофореза по методу [11], позволяющему анализировать смесь полипептидов с  $M$  2–150 кДа. Анализ взаимодействия полученных фракций с антителами проводили с помощью твердофазного ИФА.

В аналитических экспериментах было установлено, что расщепление молекулы  $\alpha$ -LTX или  $\alpha$ -LTX(CM) трипсином, химотрипсином и термוליзином мало пригодно для получения пептидных фрагментов подходящего размера. В мягких условиях реакций гидролизаты содержали большой набор иммунореактивных фрагментов с молекулярной массой более 30 кДа. В более жестких условиях получали смеси 5–20-членных пептидов, фракционирование и анализ которых представляли собой многостадийный и трудоемкий процесс.

Наилучшие результаты были получены при расщеплении  $\alpha$ -LTX протеиназой V8 из *S. aureus* в присутствии 0.1% SDS в течение 12 ч при 37°C и  $\alpha$ -LTX(CM) с помощью BrCN в 75% TFA. Гидролизаты удалось разделить на индивидуальные фрагменты с  $M$  7–18 кДа, взаимодействующие с обоими МА, в одну стадию с помощью SDS-ПААГ-электрофореза [11]. В обоих случаях после электропе-

реноса на иммобилон ТМ дорожку с иммобилизованным гидролизатом разрезали на две части: одну тестировали с помощью твердофазного ИФА, а другую окрашивали Кумасси R250. Окрашенные Кумасси иммунореактивные фрагменты вырезали и использовали для определения  $N$ -концевой аминокислотной последовательности.

При твердофазном ИФА продуктов обоих расщеплений положительный ответ для каждого антитела давали несколько компонентов с различной молекулярной массой. Для определения  $N$ -концевой аминокислотной последовательности иммунореактивных пептидов выбирали фрагменты с минимальной молекулярной массой. В результате гидролиза нативного  $\alpha$ -LTX протеиназой V8 идентифицировали фрагмент с молекулярной массой около 7.5 кДа, взаимодействующий с МА А24. Определение его структуры показало, что эпитоп МА А24 находится в области  $N^{341}-E^{390}$   $\alpha$ -LTX (табл. 1) [2]. При анализе продуктов бромцианового расщепления  $\alpha$ -LTX(CM) был идентифицирован более длинный пептид  $T^{334}-M^{398}$  из той же области молекулы (табл. 1), что подтверждает эти результаты.

Твердофазный ИФА с МА А4 фрагментов, полученных при расщеплении  $\alpha$ -LTX(CM) с помощью BrCN, выявил два перекрывающихся иммунореактивных пептида  $F^{234}-M^{294}$  и  $K^{131}-M^{294}$  (табл. 1). Таким образом было установлено, что участки узнавания МА А4 и А24 расположены в  $N$ -концевом домене – одном из трех, согласно предложенной схеме доменной организации [12]. Эпитоп МА А4 находится в области  $F^{234}-M^{294}$ , а МА А24 – в области  $N^{341}-E^{390}$ .

Молекула  $\alpha$ -LTX имеет сложную структуру, в частности содержит внутренние повторы, что осложняет однозначную интерпретацию полученных результатов. Для их подтверждения на следующем этапе было осуществлено клонирование и экспрессия в клетках *E. coli* фрагментов гена  $\alpha$ -LTX, выбранных с таким расчетом, чтобы картирование антителами продуцированных участков молекулы  $\alpha$ -LTX позволило подтвердить нахождение искомым эпитопов в  $N$ -концевой части (рис. 1). Для сборки экспрессирующих конструк-

Таблица 1. Иммунореактивные фрагменты молекулы  $\alpha$ -LTX, полученные в результате расщепления белка BrCN\* и протеиназой V8

Тип расщепления	Фрагмент		МА	Возможная область расположения эпитопа**
	$M$ , кДа	$N$ -концевая последовательность		
BrCN	7	FFLLEQY-	A4	$F^{234}-M^{294}$
BrCN	18	KSIQD-	A4	$K^{131}-M^{294}$
Протеиназа V8	7.5	NFAQISFD-	A24	$N^{341}-E^{390}$
BrCN	8	TLSET-	A4	$T^{334}-M^{398}$

\* Бромцианом расщепляли  $\alpha$ -LTX(CM).

\*\* Структура токсина [2].

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при ПЦР\*

AL-1	142	159
	TTG <u>GGA TCC</u> GAA GGA GAA GAT TTA ACT	
	<i>Bam</i> HI	
AL-2R	1509	1492
	GA A <u>CCG TCG ACT</u> TTC GTG AAT TCC TTA AA	
	<i>Sal</i> I	
AL-5	1162	1179
	TTG <u>GGA TCC</u> AAT TTT GCG CAA ATT TCA	
	<i>Bam</i> HI	
AL-6R	1230	1213
	GA A <u>CCG TCG ACT</u> TCC CGA CCA TCT CTC CA	
	<i>Sal</i> I	
AL-7R	1161	1144
	GA A <u>CCG TCG ACT</u> TCT GGT GTC TCA CTC AA	
	<i>Sal</i> I	

\* Подчеркнуты участки узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции.

ций проводили амплификацию выбранных фрагментов гена с помощью ПЦР со специфических праймеров: для фрагмента, соответствующего участку А5, использовали праймеры AL-5 и AL-2R, участку А6 – праймеры AL-1 и AL-6R, участку А7 – праймеры AL-1 и AL-7R (табл. 2). Нарботку рекомбинантных белков, соответствующих участкам молекулы  $\alpha$ -LTX, проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). С помощью аналитических экспериментов отобраны клоны с максимальным уровнем экспрессии и подобрано оптимальное время экспрессии – 3 ч (данные не приведены).

В результате определения места внутриклеточной аккумуляции целевых белков в клетке было обнаружено, что все 3 рекомбинантных фрагмента  $\alpha$ -LTX при синтезе в бактериальной системе образовывали нерастворимые агрегаты (тельца включения). Поскольку с помощью SDS-ПААГ-электрофореза было показано, что гетерологические белки составляли подавляющую часть тотального белка кластеров через 3–4 ч после индукции экспрессии (рис. 2), в дальнейшем для SDS-ПААГ-электрофореза и ИФА использовали без дополнительной очистки лизат клеток, отобранных до и через 3 ч после индукции экспрессии.

Из рис. 3 видно, что МА А4 высокоспецифично взаимодействует с фрагментами А6 и А7, тогда как МА А24 – с фрагментами А5 и А6. На основании анализа взаимодействия исследуемых антител с рекомбинантными фрагментами (рис. 3, табл. 3) можно сделать вывод о том, что эпитоп МА А4 расположен в N-концевой части молекулы  $\alpha$ -LTX (M<sup>1</sup>–N<sup>341</sup>). С учетом данных предыдущего этапа работы (табл. 1) можно подтвердить, что участок  $\alpha$ -LTX, взаимодействующий с МА

А4, находится во фрагменте F<sup>234</sup>–M<sup>294</sup>. Более точная локализация эпитопа для МА А4 оказалась невозможной из-за внутренних структурных повторов в этой части молекулы  $\alpha$ -LTX.

В то же время для МА А24 после двух этапов работы (табл. 1, рис. 3) область расположения эпитопа удалось сузить до двадцати АКО – N<sup>341</sup>–D<sup>360</sup>. Для подтверждения этих результатов синтезировали набор перекрывающихся 6–8-членных пептидов, полностью охватывающих структуру фрагмента N<sup>341</sup>–D<sup>360</sup>  $\alpha$ -LTX (табл. 4, пептиды (1)–(15), (25)–(29)), из которых наибольшей иммунореактивностью обладали пептиды (7) и (8), далее по убывающей: (25), (26), (6), (5).

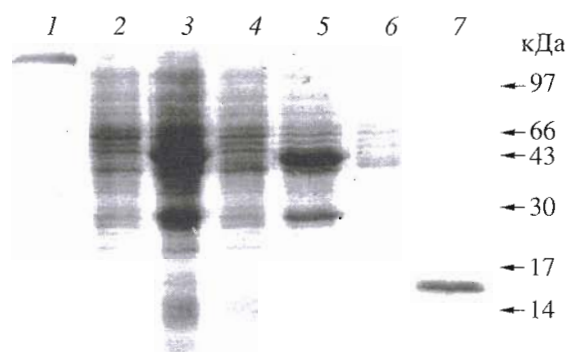
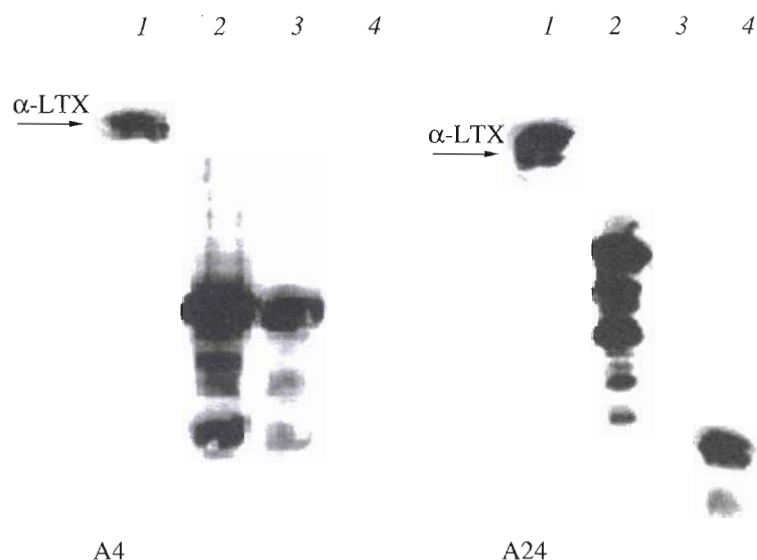


Рис. 2. SDS-ПААГ-электрофорез  $\alpha$ -LTX (1), лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих фрагменты молекулы токсина А5, А6 и А7, до индукции экспрессии (дорожки 2, 4, 6 соответственно) и через 3 ч после индукции экспрессии (3, 5 и 7).



**Рис. 3.** Твердофазный ИФА с антителами А4 и А24: 1 –  $\alpha$ -LTX, 2, 3, 4 – лизаты клеток *E. coli*, содержащих экспрессированные фрагменты А5, А6 и А7 молекулы токсина, соответственно.

С целью проверки специфичности взаимодействия МА А24 также синтезировали пептиды из других областей молекулы  $\alpha$ -LTX, которые, аналогично исследуемой области, имеют в своем со-

ставе мотив FХК (табл. 4, пептиды (16)–(24)). Для этих пептидов взаимодействия с МА А24 не наблюдалось. С той же целью были синтезированы трипептиды FDK, FSK, FTK и FNK. Показано, что

**Таблица 3.** Взаимодействие экспрессированных фрагментов молекулы  $\alpha$ -LTX с исследуемыми антителами (твердофазный ИФА)

МА	Фрагмент			МА	Фрагмент		
	A6	A7	A5		A6	A7	A5
A4	+	+	–	A24	+	–	+

**Таблица 4.** Взаимодействие синтетических перекрывающихся пептидов с МА А24 в твердофазном ИФА

Синтетический пептид		Взаимодействие с МА**	Синтетический пептид		Взаимодействие с МА**
номер	структура*		номер	структура*	
(1)	341NFAQIS <sup>346</sup>	–	(16)	408LVFRKF <sup>413</sup>	–
(2)	342FAQISF <sup>347</sup>	–	(17)	450GFKEFT <sup>455</sup>	–
(3)	343AQISFD <sup>348</sup>	+	(18)	451FKEFTK <sup>456</sup>	–
(4)	344QISFDK <sup>349</sup>	++	(19)	452KEFTKL <sup>457</sup>	–
(5)	345ISFDKD <sup>350</sup>	+	(20)	453EFTKLN <sup>458</sup>	–
(6)	346SFDKDI <sup>351</sup>	–	(21)	454FTKLN <sup>459</sup>	–
(7)	347FDKDIT <sup>352</sup>	–	(22)	374TLFSKI <sup>379</sup>	–
(8)	348DKDIT <sup>353</sup>	–	(23)	375LFSKIS <sup>380</sup>	–
(9)	349KDITTP <sup>354</sup>	–	(24)	376FSKISH <sup>381</sup>	–
(10)	350DITTP <sup>355</sup>	–	(25)	342FAQISFDK <sup>349</sup>	++
(11)	351ITTPIG <sup>356</sup>	–	(26)	344QISFDKDI <sup>351</sup>	++
(12)	352TTPIGD <sup>357</sup>	–	(27)	346SFDKDIT <sup>353</sup>	–
(13)	353TPIGDW <sup>358</sup>	–	(28)	348DKDITTP <sup>355</sup>	–
(14)	354PIGDWR <sup>359</sup>	–	(29)	350DITTPIGD <sup>357</sup>	–
(15)	355IGDWRD <sup>360</sup>	–			

\* Указано положение соответствующего фрагмента в молекуле  $\alpha$ -LTX.

\*\* Показано отсутствие (–) или наличие (+) взаимодействия; “++” – сильное взаимодействие.

только трипептид FDK слабо взаимодействовал с исследуемым МА. Представленные результаты позволили сделать вывод о последовательности эпитопа МА А24: <sup>347</sup>FDKDIТ<sup>352</sup>.

В результате проделанной работы подтверждены предположения о функциональной важности именно *N*-концевой части молекулы токсина, локализованы участки молекулы  $\alpha$ -LTХ, ответственные за взаимодействие с двумя функционально активными моноклональными антителами, модулирующими ионофорный и секретогенный эффекты латротоксина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лиофилизированный цельный яд *Latrodectus mactans tredecimguttatus* получали на Ташкентском зоокомбинате и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .  $\alpha$ -LTХ выделяли из яда по методу [13].

В работе использовали реактивы и дезокси-нуклеозидтрифосфаты (Pharmacia, Швеция), маркерные белки для SDS-ПААГ (Pharmacia, Швеция; Sigma, США), поливинилидендифторидные мембраны (иммобилон ТМ) (Millipore, США), нитроцеллюлозные мембраны ВА 85 (Schleicher and Shuell, Германия), рестрикционные эндонуклеазы (Stratagene, NEB, Promega – США), ДНК-лигазу фара Т4 (Stratagene, США), ДНК-полимеразу фара Т7 (Pharmacia Biotech, Швеция), Taq-ДНК-полимеразу (Ферментас, Литва; Perkin Elmer, США), Твин-20 (Ferak, Германия), конъюгат кроличьих антител против IgG мыши с пероксидазой хрена (Sigma, США), ECL-набор (Amersham, США), трипсин, термолизин, химотрипсин, протеиназу V8 из *S. aureus* (Boehringer Mannheim, Германия), штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) hsdS gal ( $\lambda$ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1), плазмидный вектор pT7-7 (USB, США).

**Гидролиз протеиназой V8** из *S. aureus* 200 пмоль нативного  $\alpha$ -LTХ проводили в 50 мМ Трис-НСl, рН 7.8, содержащем 0.1% SDS при  $37^{\circ}\text{C}$  и соотношении фермент-субстрат 1 : 20 (по весу) в течение 12 ч (фермент добавляли равномерно двумя порциями).

**Карбоксиметилирование  $\alpha$ -LTХ и расщепление бромцианом (BrCN).** Карбоксиметилирование  $\alpha$ -LTХ проводили по методу [14]. К раствору  $\alpha$ -LTХ(СМ) добавляли один объем метанола и одну четверть объема хлороформа, тщательно перемешивали и затем центрифугировали 5 мин при максимальных оборотах в настольной центрифуге (Eppendorf, Германия). Отбрасывали водно-метаноловый слой, а к осадку белка и хлороформному слою добавляли один объем метанола, перемешивали и центрифугировали. Полученный осадок  $\alpha$ -LTХ(СМ) растворяли в 75% ТФА или в 70% муравьиной кислоте. К 200 пмоль  $\alpha$ -LTХ(СМ) добавляли 800 нмоль BrCN (200-крат-

ный избыток BrCN по отношению к остаткам метионина в молекуле белка [2]) и выдерживали при перемешивании в темноте в течение 24 ч при комнатной температуре. Останавливали гидролиз лиофилизацией.

**SDS-ПААГ-электрофорез** белков проводили по методу Лэммли [15] в 10% SDS-ПААГ, а гидролизатов белка – по методу [11] в Трис-трициновом буфере в SDS-ПААГ, состоящем из концентрирующего (4% Т, 3% С), промежуточного (10% Т, 3% С) и разделяющего (16.5% Т, 6% С) гелей.

Для подготовки образцов для SDS-ПААГ-электрофореза клетки *E. coli*, содержащиеся в 1 мл культуры, собирали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 1 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера для нанесения образцов [15], содержащего 3%  $\beta$ -меркаптоэтанол, кипятили 2 мин и центрифугировали 2 мин. На одну дорожку ПААГ наносили 10–20 мкл каждого образца.

Гидролизаты  $\alpha$ -LTХ перед нанесением на SDS-ПААГ либо предварительно высаживали хлороформ-метанолом как описано выше для  $\alpha$ -LTХ(СМ), либо использовали лиофилизированные препараты. Образцы готовили аналогично описанному выше, используя буфер для нанесения образцов [11].

**Твердофазный ИФА.** Исследуемый раствор белка наносили на нитроцеллюлозную мембрану или иммобилон ТМ либо в точку с помощью капилляра, либо электропереносом по методу [16] после SDS-ПААГ-электрофореза. Мембрану с иммобилизованными белками выдерживали 30 мин в 10 мМ Трис-НСl, рН 7.6, содержащем 150 мМ NaCl (TBS) с добавлением 5% обезжиренного сухого молока, затем 2 ч при комнатной температуре инкубировали с МА, добавляя их до конечной концентрации 1 мкг/мл в том же буфере, затем мембрану тщательно отмывали буфером TBS, содержащим 0.1% Твин-20 (TBS-T), и инкубировали в течение 1 ч с конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами против IgG мыши (разведение 1 : 5000) в TBS-T с 5% молоком. Снова промывали мембрану несколькими сменами TBS-T. Идентификацию иммуносвязывания проводили с помощью субстрата пероксидазы хрена – ECL-набора, хемилюминесценцию детектировали на рентгеновской пленке.

**Определение аминокислотной последовательности иммунореактивных гидролитических пептидов,** иммобилизованных на иммобилоне ТМ и окрашенных 0.05% Кумасси R250 в 50% метаноле и 10% уксусной кислоте, производили с помощью автоматической деградации в газофазном секвенаторе 470А (Applied Biosystems, США) с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот.

**Выделение плазмид, обработка рестриктазами, трансформация** и другие генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным протоколам [17].

**Получение плазмид, содержащих целевые участки гена  $\alpha$ -LTX.** Для сборки экспрессирующих конструкций использовали ПЦР на матрице ДНК плазмиды, содержащей вставку, кодирующую 5'-область гена  $\alpha$ -LTX, с праймеров (табл. 2). ПЦР проводили при следующих условиях ( $t$ , °С/время, мин) 94/1, 55/1, 72/2, 15 циклов, потом 10 мин 72°С с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы. Продукты анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

**Клонирование продукта ПЦР в экспрессирующий вектор pT7-7.** Смесь фрагментов после ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Продукт амплификации ожидаемого размера выделяли из геля с помощью набора Gene Clean (BIO 101 Inc, США). Клонирование полученного продукта осуществляли по сайтам *Bam*HI и *Clal* в плазмидный вектор pT7-7 и полученной конструкцией трансформировали клетки штамма BL21(DE3).

**Приготовление компетентных клеток** штамма BL21(DE3) и трансформацию проводили по методу [18].

**ПЦР на колониях, содержащих рекомбинантную плазмиду.** Проверку клеток на наличие плазмиды со вставкой нужного размера проводили с помощью ПЦР на колониях с использованием праймера T7 и специфических праймеров противоположной ориентации: праймера AL-2R для фрагмента A5, праймера AL-6R для фрагмента A6 и праймера AL-7R для фрагмента A7. Реакционную смесь покрывали слоем легкого минерального масла, инкубировали 5 мин при 98°С и охлаждали до 85°С. Под масло добавляли необходимое количество *Taq*-ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили при следующих условиях: ( $t$ , °С/время, мин) 94/1, 55/1, 72/3, 20 циклов.

**Наработка рекомбинантных белков.** Для наработки аналитических количеств ночную культуру, полученную из отдельной колонии, разводили 1 : 100 в 5 мл среды LB (1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7.6), содержащей 200 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали при 37°С с интенсивной аэрацией до оптической плотности 0.3–0.4 (600 нм) (обычно 4 ч). Экспрессию индуцировали добавлением IPTG (изопропил- $\beta$ -D-тиога-лактопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ. После индукции культуру продолжали выращивать в тех же условиях в течение 2–3 ч. Каждый час в культуру добавляли свежую порцию ампициллина (200 мкг/мл). Анализ клеточных лизатов на наличие рекомбинантного белка прово-

дили с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и твердофазного ИФА.

Препаративную наработку белка проводили аналогично, разводя ночную культуру в 200 мл среды. Через 3 ч клетки собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, ресуспендировали в 2 мл 10 мМ Трис-НСl, pH 7.6, содержащего 150 мМ NaCl, и разрушали воздействием ультразвука (8 импульсов по 10 с с перерывами по 5 с). Полученную суспензию центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин, ресуспендировали в том же объеме воды и центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок использовали для электрофоретического и ИФА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-48552).

Авторы выражают благодарность В.Н. Пашкову за предоставленные антитела, Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, Р. Муртазиной за синтез пептидов и Ю.Ф. Ямниковой за определение аминокислотной последовательности гидролитических пептидов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grishin E. // *Toxicon*. 1998. V. 35. P. 1693–1701.
2. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Grishin E.V. // *FEBS Lett*. 1990. V. 270. P. 127–131.
3. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // *Trends Pharmacol. Sci*. 1986. V. 7. P. 151–155.
4. Rosental L., Meldolesi J. // *Pharmacol. Ther*. 1989. V. 42. P. 115–134.
5. Ushkaryov Y.A., Petrenko A.G., Geppert M., Sudhof T.C. // *Science*. 1992. V. 257. P. 50–56.
6. Davletov B.A., Shamotienko O.G., Lelianova V.G., Grishin E.V., Ushkaryov Yu.A. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 23239–23245.
7. Cattaneo A., Grasso A. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 2730–2736.
8. Паиков В.Н., Ковалевская Г.И., Грико Н.Б., Булгаков О.В., Яхнина Е.Б., Николишина Е.В., Сторчак Л.Г., Шатурский О.Я., Гиммельрейх Н.Г., Гришин Е.В. // *Биоорганическая химия*. 1992. Т. 18. С. 383–390.
9. Pashkov V., Grico N., Tsurupa G., Storchak L., Shatursky O., Himmelreich N., Grishin E. // *Neuroscience*. 1993. V. 56. P. 695–701.
10. Storchak L., Pashkov V., Pozdnyakova N., Himmelreich N., Grishin E. // *FEBS Lett*. 1994. V. 351. P. 267–270.
11. Schagger H // *Analyt. Biochem*. 1987. V. 166. P. 368–379.
12. Grishin E. // *Eur. J. Biochem*. 1999. V. 264. P. 276–280.

13. Пашков В.Н., Ковалевская Г.И., Красноперов В.Г., Булгаков О.В. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. С. 1281–1283.
14. Волкова Т.М., Галкина Т.Г., Куделин А.Б., Гришин Е.В. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 437–439.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
18. Inoue H., Nojima H., Okayama H. // Gene. 1990. V. 96. P. 23–28.

## Recognition Sites of Monoclonal Antibodies A4 and A24 in the $\alpha$ -Latrotoxin Molecule

V. D. Lazareva, N. E. Bocharova<sup>#</sup>, K. E. Volynskii, T. M. Volkova, and E. V. Grishin

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

$\alpha$ -Latrotoxin ( $\alpha$ -LTX) binding sites to functionally active monoclonal antibodies (MA) A4 and A24 were localized using three approaches: hydrolysis of the toxin followed by the *N*-terminal sequencing of immunoreactive peptides; the study of antibody interaction with several recombinant  $\alpha$ -LTX fragments; and Western immunoblotting of synthetic overlapping peptides (6–8 aa) whose structures correspond to that of the immunoreactive  $\alpha$ -LTX fragment. It was shown that the MA A4 epitope is located within the F<sup>234</sup>-M<sup>294</sup> protein fragment and that of MA A24 interacts with the fragment <sup>347</sup>FDKDI<sup>352</sup>.

*Key words: latrotoxin, monoclonal antibodies*

---

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

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.