



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5:591.145.2-546

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ДВУХ НЕЙРОТОКСИНОВ ИЗ ЯДА СКОРПИОНА *BUTHUS EURPEUS*Волкова Т. М., Гарсия А. Ф., Тележинская И. Н.,
Потапенко Н. А., Гришин Е. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Нейротоксины из яда скорпионов используются в качестве инструментов исследования натриевых каналов электровозбудимых мембран млекопитающих [1–3]. Эти токсины представляют собой полипептиды молекулярной массы 7–8 кДа с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями [4]. Из яда скорпиона *Buthus eurus* был выделен ряд нейротоксинов, вызывающих замедление скорости инактивации быстрых натриевых каналов нервных мембран позвоночных, причем их действие в существенной мере обусловлено уровнем мембранного потенциала [5–7]. Была также установлена структура одного из основных токсических компонентов яда среднеазиатского скорпиона — нейротоксина M_{10} [8]. В настоящем сообщении описано определение аминокислотной последовательности двух других токсинов этого яда — нейротоксинов M_9 и M_{14} .

Для получения в индивидуальном виде главных токсических компонентов яда среднеазиатского скорпиона *B. eurus* (нейротоксинов M_9 , M_{10} и M_{14}) был использован ранее разработанный метод [5, 8]. Цельный яд после отделения с помощью центрифугирования нерастворимых мужопротеидов подвергался фракционированию на биогеле Р-10. Две токсичные для мышей фракции разделялись далее на катионите Bio-Rex 70; для окончательной очистки отдельных компонентов использовалась хроматография на ДЕАЕ-сефадексе А-50. В результате были выделены три основных токсина яда среднеазиатского скорпиона: M_9 , M_{10} и M_{14} , значения LD_{50} которых соответственно составляли 0,708; 0,72 и 0,915 мг/кг. Общий выход этих нейротоксинов достигал 6% (1,95; 2,6 и 1,44) от веса исходного яда.

При установлении аминокислотной последовательности нейротоксинов M_9 и M_{14} использовались классические методы и приемы определения структуры белков. После восстановления дисульфидных связей и карбоксиметилирования образовавшихся сульфгидрильных групп [8] фрагментация модифицированных токсинов проводилась ферментативным или химическим расщеплением пептидных связей. Для структурного анализа выделенных пептидов применялся метод Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде Dns- или Pth-производных [8], для установления С-концевых последовательностей использовались карбоксипептидазы А и В.

Расщепление полипептидной цепи нейротоксина M_9 осуществлялось при помощи трипсина и протеиназы из *Staphylococcus aureus*. Триптические пептиды (Т) были получены в индивидуальном виде высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой (градиент концентрации ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония, рН 5,7). Пептиды, полученные при гидролизе токсина стафилококковой

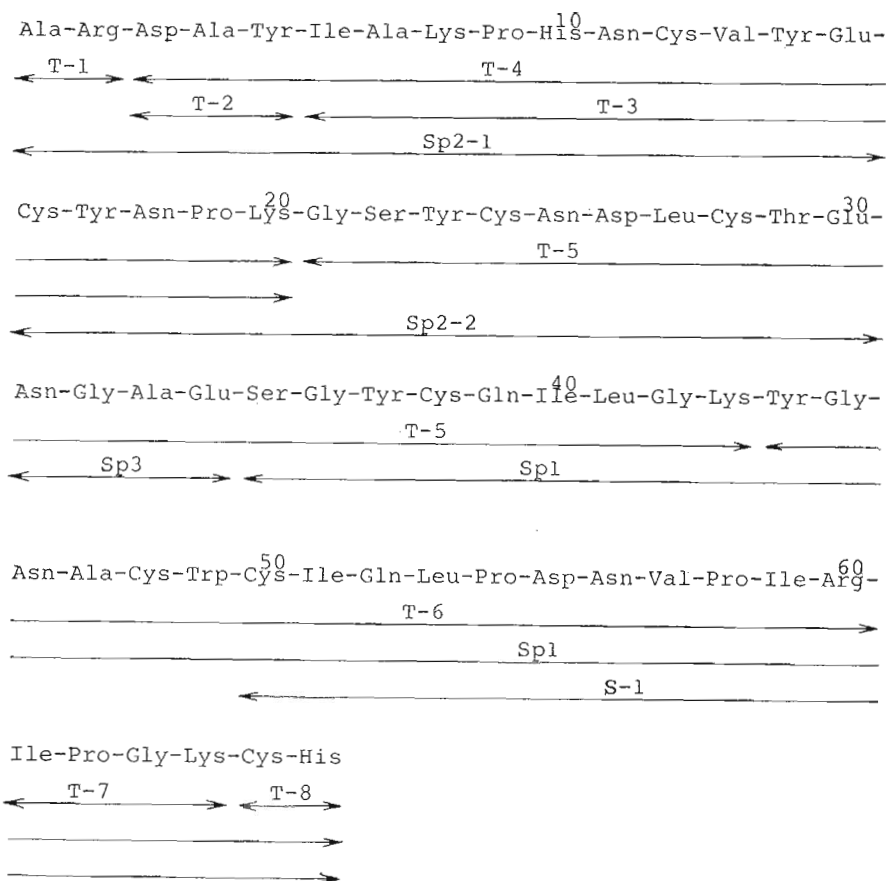


Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность нейротоксина M₉ из яда среднеазиатского скорпиона *B. eupeus*

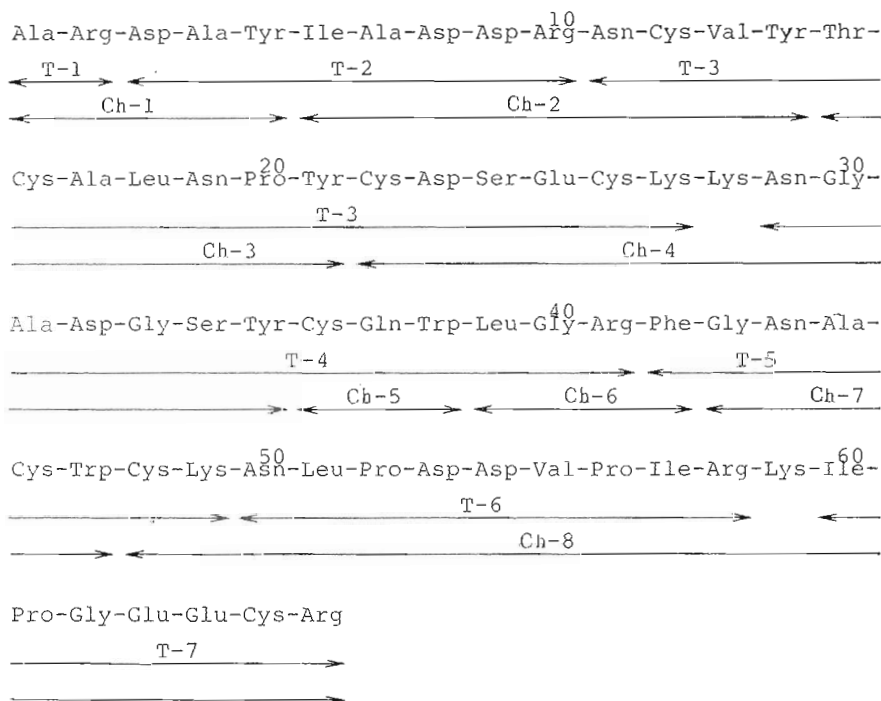


Рис. 2. Полная аминокислотная последовательность нейротоксина M₁₄ из яда среднеазиатского скорпиона *B. eupeus*

протеиназой (Sp), разделяли на сефадексе G-25 в 100 мМ ацетате аммония (рН 5,7), а также ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте). Для определения С-концевой аминокислотной последовательности использовался пептидный фрагмент (S-1), образованный при расщеплении молекулы токсина, модифицированного янтарным ангидридом, BNPS-скатолом по единственному остатку триптофана-49 [9]. Результаты определения структуры всех этих пептидных фрагментов позволили полностью реконструировать аминокислотную последовательность молекулы нейротоксина M_9 (рис. 1).

Фрагментация нейротоксина M_{14} осуществлялась при помощи трипсина и химотрипсина. Индивидуальные триптические и химотриптические пептиды были выделены в одну стадию при использовании ВЭЖХ с обращенной фазой (градиент концентрации ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония, рН 5,7). При этом химотриптические пептиды Ch-5 и Ch-7 были получены в виде смеси; анализ их структуры проводился без разделения с использованием данных по аминокислотной последовательности триптического пептида Т-5. Для определения структуры триптического пептида Т-3 применялось дополнительное расщепление его химотрипсином с выделением С-концевого фрагмента. Информация, полученная при изучении всех выделенных пептидов, оказалась достаточной для установления полной аминокислотной последовательности молекулы нейротоксина M_{14} (рис. 2).

На основании структурного анализа нейротоксинов M_{10} [8], M_9 и M_{14} установлено, что главные токсические компоненты яда среднеазиатского скорпиона *V. eurus* образуют гомологичную группу полипептидов, состоящих из 65–66 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Для этих токсинов характерно наличие ~65% инвариантных аминокислотных остатков. Высокая степень структурной гомологии, по-видимому, обуславливает одинаковый механизм действия нейротоксинов из яда скорпиона *V. eurus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Catterall W. A., Hartshorne R. P., Beneski D. A. *Toxicon*, 1982, v. 20, № 1, p. 27–40.
2. Ovchinnikov Yu. A., Grishin E. V. *Trends. Biochem. Sci.*, 1982, v. 7, № 1, p. 26–28.
3. Darbon H., Jover E., Couraud F., Rochat H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 115, № 2, p. 415–422.
4. Rochat H., Bernard P., Couraud F. In: *Adv. Cytopharmacol.* N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 325–334.
5. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Аракузиев Б. У. *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 450–461.
6. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 155–164.
7. Mozhayeva G. N., Naumov A. P., Nosyreva E. D., Grishin E. V. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 597, № 3, p. 587–602.
8. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Шахпаронов М. И., Казаков В. К. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 714–723.
9. Жданова Л. П., Адамович Т. Б., Назимов П. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 4, с. 485–493.

Поступило в редакцию
24.II.1984

AMINO ACID SEQUENCE OF TWO NEUROTOXINS FROM THE VENOM OF
CENTRAL ASIAN SCORPION *BUTHUS EUPEUS*

VOLKOVA T. M., GARCIA A. F., TELEZHINSKAYA I. N.,
POTAPENKO N. A., GRISHIN E. V.

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

Three polypeptides, M_{10} , M_{14} and M_9 , toxic to mammals were isolated from the venom of the Central Asian scorpion *Buthus eupeus*. All the toxins were shown to be homogeneous according to disc-electrophoresis and N-terminal group analyses. The toxin M_9 was digested with trypsin, *Staphylococcus aureus* proteinase and cleaved with BNPS-skatole. The toxin M_{14} was subjected to tryptic and chymotryptic hydrolyses. The complete amino acid sequences of the toxins M_9 and M_{14} were established and it was shown that each of them consists of 66 amino acid residues with four intramolecular disulfide bonds.