



УДК 577.112.5:591.145.2-546

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОТОКСИНОВ ИЗ ЯДА  
СРЕДНЕАЗИАТСКОГО СКОРПИОНА *BUTHUS EUPEUS*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

Из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* выделены три главных нейротоксина для млекопитающих —  $M_9$ ,  $M_{10}$  и  $M_{14}$ . Определен аминокислотный состав всех токсинов. В результате исследования структуры пептидов, полученных при гидролизе трипсином, химотрипсином, протениназой из *Staphylococcus aureus* и BNPS-скатолом, установлена полная аминокислотная последовательность токсинов  $M_9$  и  $M_{14}$ .

Полипептидные нейротоксины из ядов членистоногих широко используются как инструменты исследования компонентов биологических мембран. Токсины скорпионов влияют на процесс инактивации или активации натриевых каналов и в основном применяются для изучения этих мембранных транспортных систем [1, 2]. Токсины скорпионов могут селективно действовать на какой-либо один класс животных и подразделяются на токсины для млекопитающих, для ракообразных и инсектотоксины [3, 4]. Ранее из яда скорпиона *Buthus eupeus* были выделены 12 нейротоксинов для млекопитающих и 5 инсектотоксинов [5, 6]. В настоящей работе, как и в работе [7], был исследован яд среднеазиатского подвида этого скорпиона, полученный от особей, собранных в достаточном узком ареале обитания. В результате были выделены главные токсины яда среднеазиатского подвида скорпиона *B. eupeus*:  $M_9$ ,  $M_{10}$  и  $M_{14}$ . Структура токсина  $M_{10}$  была изучена ранее [7]. Настоящая работа посвящена выяснению полной аминокислотной последовательности двух других главных компонентов яда\*.

Для облегчения и ускорения процесса выделения нейротоксинов в отличие от ранее использованного способа [7] цельный яд скорпиона *B. eupeus* после отделения нерастворимых примесей подвергался предварительному фракционированию на СМ-целлюлозе СМ-32 с элюцией буфером возрастающей ионной силы. При этом практически вся токсическая активность обнаруживалась во фракции, элюированной 0,5 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,8) и содержащей ~25% исходного материала. Дальнейшее разделение проводилось гель-фильтрацией на биогеле Р-10 (рис. 1). Токсичные фракции IV и V подвергались фракционированию на биорексе 70 в градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера (рис. 2, 3). С помощью равновесной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50 из фракции IV-5 был выделен с выходом 1,95% токсин  $M_9$  (рис. 4). Хроматографией с рециклизацией на том же сорбенте фракции V-4 достигнуто разделение токсинов  $M_{10}$  и  $M_{14}$  (выход 2,6 и 1,44%) (рис. 5). Таким образом, выход нейротоксинов  $M_9$ ,  $M_{10}$  и  $M_{14}$  в сумме достигал 6%. Следовательно, они являются главными токсическими компонентами яда скорпиона *B. eupeus*. Эти токсины обладали достаточно высокой биологической активностью, значения  $LD_{50}$  составляли 0,708; 0,720 и 0,915 мг/кг веса мыши. Гомогенность токсинов показана с помощью диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле, определения N-концевых аминокислотных остатков, а также анализа аминокислотного состава. Все эти токсины со-

\* Результаты по изучению аминокислотной последовательности токсинов  $M_9$  и  $M_{14}$  были представлены ранее в кратком сообщении [8].

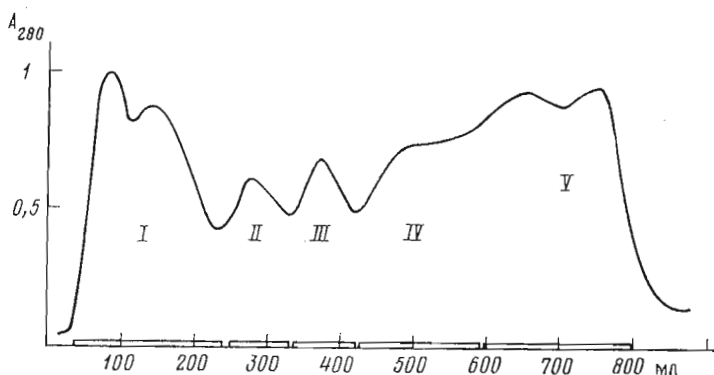


Рис. 1. Гель-хроматография 2 г токсичной фракции яда скорпиона *V. eurus* (полученной после целлюлозы СМ-32) на биогеле Р-10 в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 7,9); две последовательно соединенные колонки размером  $3,4 \times 100$  см, скорость элюции 40 мл/ч, объем фракций 8 мл. Показаны границы объединения фракций

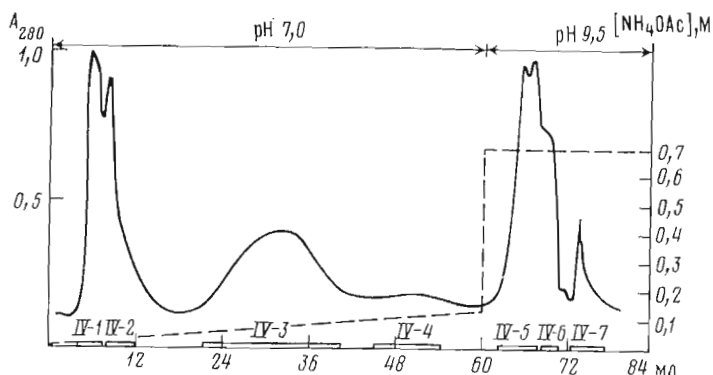


Рис. 2. Хроматография фракции IV (рис. 1) на биорексе 70 в градиенте рН и молярности аммоний-ацетатного буфера; колонка размером  $1,5 \times 40$  см, скорость элюции 2 мл/ч, объем фракций 0,5 мл

стоят из 65–66 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями и обладают очень высокой степенью гомологии со всеми ранее выделенными токсинами для млекопитающих из яда скорпиона *V. eurus* (табл. 1).

Для установления аминокислотной последовательности токсинов  $M_9$  и  $M_{14}$  использовали классические приемы и методы определения структуры белков. Первоначально проводили восстановление дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп. Для облегчения идентификации цистеиновых остатков модификацию осуществляли  $[^3\text{H}]$ иодоуксусной кислотой. Деграцией по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот было показано, что оба токсина имеют одинаковую N-концевую последовательность: Ala-Arg. С помощью карбоксипептидаз А и В удалось установить С-концевые последовательности токсинов:  $M_9$  — Cys(Cm)-His и  $M_{14}$  — Cys(Cm)-Arg.

Расщепление полипептидной цепи СМ-нейротоксина  $M_9$  осуществлялось трипсином. Все триптические фрагменты (за исключением Т-1 и Т-8) были получены в индивидуальном виде ВЭЖХ с обращенной фазой в градиенте ацетонитрила (рис. 6). В табл. 2 приведен аминокислотный состав всех гомогенных пептидов, в сумме составляющих 62 аминокислотных остатка. Фрагменты Т-1 и Т-8 анализировали в смеси, причем последовательность Т-1 совпадала с N-концевой последовательностью токсина. Структуру пептидов устанавливали методом Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде Dns-производных [9, 10]. Одновременно определяли дикарбоновые аминокислоты и их амиды в виде Pth-производ-

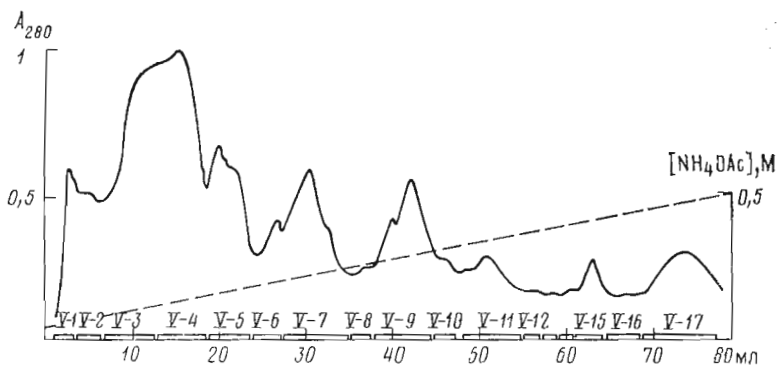


Рис. 3. Разделение фракции V (рис. 1) на биорексе 70 в градиенте молярности аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5); колонка размером  $1,5 \times 40$  см, скорость элюции 1,8 мл/ч, объем фракций 0,5 мл

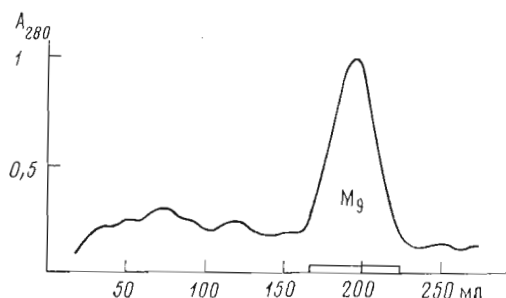


Рис. 4. Хроматография фракции IV-5 (рис. 2) на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (pH 8,5); две последовательно соединенные колонки размером  $1,5 \times 85$  см, скорость элюции 8 мл/ч, объем фракций 5 мл

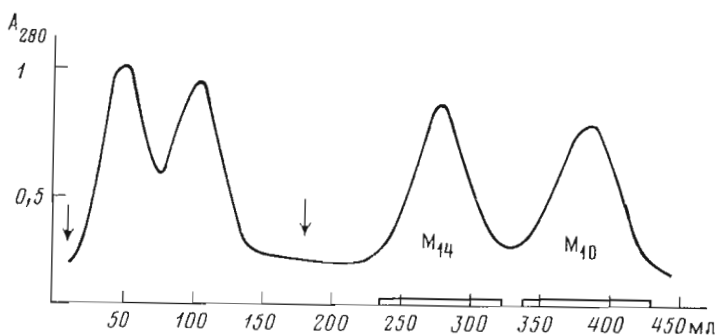


Рис. 5. Хроматография с рециклизацией фракции V-4 (рис. 3) на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (pH 8,5); две последовательно соединенные колонки размером  $1,5 \times 85$  см, скорость элюции 8 мл/ч, объем фракций 5 мл. Вертикальные стрелки указывают начало цикла

ных [11]. В некоторых случаях С-концевые последовательности пептидов устанавливали с помощью карбоксипептидаз А и В [12]. В табл. 3 представлены результаты определения аминокислотной последовательности триптических пептидов СМ-токсина  $M_9$ .

Наличие в молекуле токсина  $M_9$  трех остатков глутаминовой кислоты позволило расщепить исходный полипептид на четыре крупных фрагмента с помощью протеиназы из *Staphylococcus aureus*. Разделение этих фрагментов осуществлялось гель-хроматографией на сефадексе G-25 (рис. 7). Пептиды Sp2-1 и Sp2-2, имеющие практически одинаковую молекуляр-

Аминокислотный состав токсина яда скорпиона *B. eurus*

Аминокислота	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub> *	M <sub>10</sub> *	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>	M <sub>13</sub>	M <sub>14</sub> *
Asp	11	10	9	10	11	9	13	10	9	9	8	9	10	12
Thr	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1
Ser	4	3	3	3	3	3	4	3	2	5	5	5	4	2
Glu	6	4	5	6	4	2	4	3	5	2	5	3	4	4
Pro	6	3	4	5	6	3	4	5	5	2	3	3	3	4
Gly	6	5	6	6	8	6	9	7	6	7	5	9	8	5
Ala	7	4	5	5	6	6	6	6	5	6	8	7	7	6
1/2Cys	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Val	2	2	3	2	2	3	1	1	2	3	2	4	2	2
Ile	4	2	2	3	4	3	2	2	5	2	4	3	2	3
Leu	3	2	1	2	2	3	2	2	3	1	3	1	1	3
Tyr	4	3	6	4	5	4	4	4	6	6	4	4	5	4
Phe	2	3	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
His	5	3	8	4	2	2	2	2	4	8	3	6	7	4
Lys	2	5	2	5	9	5	3	5	2	2	3	3	2	5
Arg	2	3	4	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
Trp	3	3	4	2	4	2	5	3	1	3	2	2	2	2
Всего	75	60	68	70	78	64	73	64	66	65	61	67	65	66
N-Концевая	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Val	Val	Ala
Литература	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	Val	[6]	[6]	[6]	[6]

\* Данные настоящей работы; для токсина M<sub>10</sub> аминокислотный состав полностью совпадает с данными работы [7].

Аминокислотный состав СМ-токсина M<sub>9</sub> и его пептидов, полученных при расщеплении трипсином (Т), прогенназой из *Staphylococcus aureus* (Sp)

АМИНОКИСЛОТА	СМ-М <sub>9</sub>	Т-2	Т-3	Т-4	Т-5	Т-6	Т-7	Sp1	Sp2-1	Sp2-2	Sp3
Cys(Cm)	6,61(8)										
Asp	9,06(9)	1,08(1)	1,69(2)	4,90(2)	2,53(3)	4,65(2)		2,95(4)	0,81(1)	2,48(3)	1,12(1)
Thr	1,07(1)		2,14(2)	3,31(3)	3,30(3)	3,35(3)		3,27(3)	2,12(2)	3,23(3)	
Ser	2,21(2)				4,00(1)				0,96(1)		
Glu	5,17(5)		1,27(1)	1,20(1)	2,06(2)	1,20(1)		1,18(1)	1,22(1)	1,04(1)	
Pro	4,51(5)		1,56(2)	1,90(2)	3,38(3)	1,84(2)	1,08(1)	2,07(2)	1,02(1)	4,13(1)	1,07(1)
Gly	6,00(6)				4,05(4)	1,28(1)	1,36(1)	4,32(4)		0,85(1)	1,29(1)
Ala	4,82(5)	1,21(1)	1,36(1)	2,08(2)	1,13(1)	1,20(1)		1,25(1)	3,23(3)	1,26(1)	0,92(1)
Val	2,30(2)		1,21(1)	1,32(1)	1,12(1)	1,12(1)		0,92(1)	0,94(1)		
Ile	4,63(5)		1,03(1)	0,85(1)	1,03(1)	1,95(2)	1,14(1)	3,65(4)	0,89(1)		
Leu	3,11(3)				2,08(2)	1,10(1)		1,72(2)			
Tyr	5,50(6)	0,80(1)	1,80(2)	2,83(3)	1,90(2)	4,00(1)		1,85(2)	1,73(2)	0,97(1)	
His	2,20(2)		1,28(1)	0,89(1)				0,90(1)	0,79(1)	1,85(2)	
Lys	3,87(4)		1,72(2)	1,96(2)	1,09(1)		1,08(1)	2,01(2)	0,98(1)	0,99(1)	
Arg	2,42(2)					0,99(1)		1,00(1)	1,02(1)		
Trp	1,00(1)					(1)		(1)			
N-Концевая	Ala	Asp	Ile	Asp	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ala	Cys(Cm)	Asn
Всего	66	3	45	18	23	47	4	32	15	15	4
Выход, %		48	52	39	64	45	51	64	43	38	67

Аминокислотная последовательность пептидов СМ-токсина M<sub>9</sub>

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Положение в полипептидной цепи белка
{ T-1 T-8	Ala $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{Arg} \end{array}$ Cys(Cm) $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{His} \end{array}$	1-2 65-66
T-2	Asp-Ala-Tyr	3-5
T-3	Ile-Ala-Lys-Pro-His-Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr-Glu-Cys(Cm)-Tyr-Asn-Pro-Lys	6-20
T-4	Asp-Ala-Tyr-Ile-Ala-Lys-Pro-(His, 2 Asn, 2 Cys(Cm), Val, 2 Tyr, Glu, Pro)-Lys	3-20
T-5	Gly-Ser-Tyr-Cys(Cm)-Asn-Asp-Leu-Cys(Cm)-Thr-Glu-Asn-Gly-Ala-Glu-Ser-Gly-Tyr-Cys(Cm)-Gln-Ile-Leu-Gly-Lys	21-43
T-6	Tyr-Gly-Asn-Ala-Cys(Cm)-Trp-Cys(Cm)-Ile-Gln-Leu-Pro-Asp-Asn-Val-Pro-Ile-Arg	44-60
T-7	Ile-Pro-Gly-Lys	61-64
Sp2-1	Ala-Arg-Asp-Ala-(2 Tyr, Ile, Ala, Lys, Pro, His, Asn, Cys(Cm), Val)-Glu	1-15
Sp2-2	Cys(Cm)-Tyr-Asn-Pro-Lys-Gly-Ser-(Tyr, 2 Cys(Cm), Asn, Asp, Leu, Thr)-Glu	16-30
Sp3	Asn-Gly-Ala-Glu	31-34
Sp1	Ser-Gly-Tyr-Cys(Cm)-Gln-Ile-Leu-Gly-Lys-Tyr-Gly-Asn-Ala-(3 Cys(Cm), Trp, 3 Ile, Gln, Leu, 3 Pro, Asn, Val, Arg, Gly, Lys, His)	35-66
S-1 **	Cys(Cm)-Ile-Gln-Leu-Pro-Asp-Asn-Val-Pro-Ile-Arg-Ile-Pro-Gly-Lys-Cys(Cm)-His	50-66

\*  $\nabla$  — стадии деградации по Эдману,  $\leftarrow$  — отщепление карбоксипептидазами.

\*\* Пептид, полученный при расщеплении сукцинилированного токсина M<sub>9</sub> BNPS-скатолом.

ную массу, удалось разделить лишь с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Определение аминокислотной последовательности фрагментов Sp1, Sp2-1, Sp2-2, Sp3 (табл. 3) не позволило реконструировать С-концевую часть молекулы. Для получения недостающей информации СМ-токсин M<sub>9</sub> был модифицирован янтарным ангидридом и расщеплен BNPS-скатолом по единственному остатку триптофана. Структурный анализ пептида S-1 позволил определить полную аминокислотную последовательность нейротоксина M<sub>9</sub> (см. рис. 9).

Первичная фрагментация СМ-токсина M<sub>14</sub> проводилась трипсином. Среди N-концевых аминокислот смеси пептидов был обнаружен лизин, что указывает на существование в молекуле последовательности Lys-Lys или Arg-Lys. С помощью ВЭЖХ с обращенной фазой в градиенте концен-

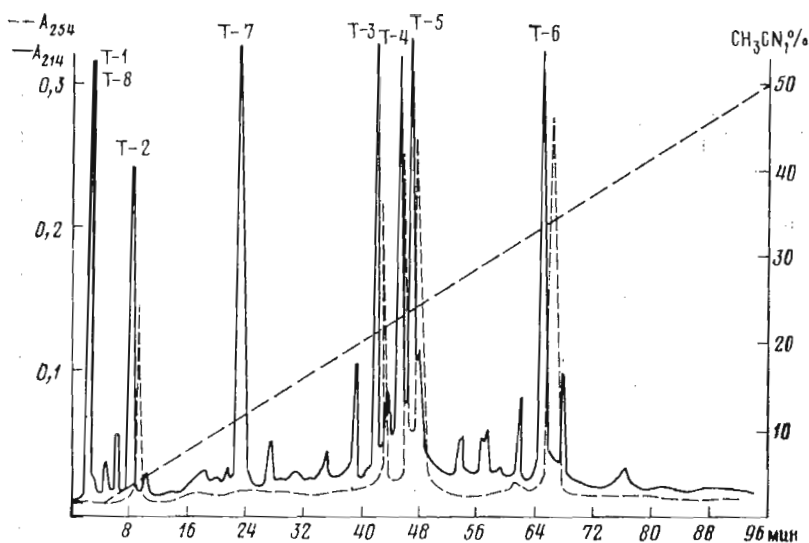


Рис. 6. Разделение триптических пептидов СМ-токсина  $M_9$  ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS  $C_{18}$ , 5 мкм ( $0,46 \times 25$  см) в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7). Скорость элюции 1 мл/мин

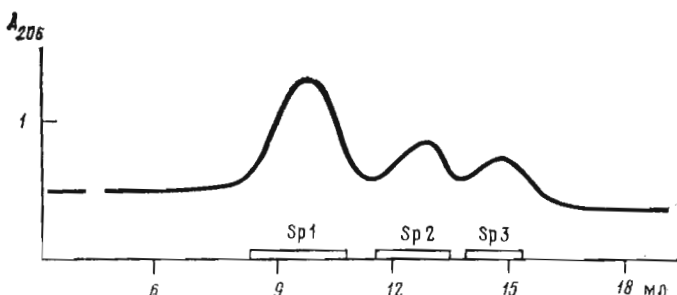


Рис. 7. Хроматография пептидов, полученных при гидролизе СМ-токсина  $M_9$  протеиназой из *S. aureus*, на сефадексе G-25 в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7); колонка размером  $0,4 \times 130$  см, скорость элюции 1,3 мл/ч, объем фракций 0,3 мл

трации ацетонитрила (рис. 8) были получены 7 индивидуальных пептидов, содержащих в общей сложности 64 аминокислотных остатка (табл. 4). Поскольку методом Эдмана не удалось определить полную аминокислотную последовательность пептида Т-3, был проведен исчерпывающий гидролиз этого фрагмента химотрипсином. После разделения ВЭЖХ с обращенной фазой проанализированы три полученных пептида.

Для реконструкции полипептидной цепи СМ-токсина  $M_{14}$  оказалось наиболее удобным расщепление молекулы химотрипсином. Разделение полученных пептидов было проведено в условиях, аналогичных использованным для триптического гидролизата. В табл. 4 и 5 показаны аминокислотный состав и последовательность всех химотриптических фрагментов токсина  $M_{14}$ , причем фрагменты Ch-5 и Ch-7 анализировались в смеси. На основании информации по структуре триптических и химотриптических фрагментов токсина  $M_{14}$  была установлена полная аминокислотная последовательность этого полипептида (рис. 9). Гомология в аминокислотной последовательности  $M_9$  и  $M_{14}$  достигает 70%. Во всех трех токсинах, выделенных из яда *B. eurreus* ( $M_9$ ,  $M_{10}$  и  $M_{14}$ ), обнаруживаются достаточно крупные гомологичные участки. А поскольку механизм действия их одинаков, можно предположить, что именно эти участки определяют связывание токсинов с их мембранным рецептором.

Аминокислотный состав CM-токсина M<sub>14</sub> и его триптических (Т)

Аминокислота	CM-M <sub>14</sub>	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5
Cys (Cm)	6,03 (8)			3,41 (4)	0,73 (1)	1,59 (2)
Asp	11,84 (12)		2,81 (3)	3,12 (3)	2,09 (2)	1,41 (1)
Thr	1,18 (1)			0,79 (1)		
Ser	2,45 (2)			0,81 (1)	1,41 (1)	
Glu	3,48 (4)			1,15 (1)	1,37 (1)	
Pro	3,98 (4)			0,99 (1)		
Gly	5,51 (5)				3,19 (3)	1,36 (1)
Ala	6,48 (6)	1,17 (1)	2,08 (2)	1,21 (1)	1,21 (1)	1,28 (1)
Val	1,80 (2)			0,89 (1)		
Ile	2,83 (3)		0,83 (1)			
Leu	2,78 (3)			0,91 (1)	1,03 (1)	
Tyr	4,09 (4)		0,79 (1)	1,82 (2)	0,76 (1)	
Phe	1,50 (1)					1,02 (1)
Lys	4,08 (4)			1,03 (1)		0,98 (1)
Arg	5,09 (5)	1,00 (1)	1,02 (1)		0,96 (1)	
Trp	(2)				(1)	(1)
N-Концевая	Ala	Ala	Asp	Asn	Asn	Phe
Всего	66	2	8	17	13	8
Выход, %		71	74	62	69	67

Экспериментальная часть

В работе использовали лиофильно высушенный цельный яд скорпиона *B. eupreus* отечественного производства, ТРСК-трипсин, химотрипсин (Worthington, США), карбоксипептидазы А и В (Boehringer, ФРГ), стафилококковую протеиназу (Miles, Англия). Для хроматографии применяли биогель Р-10 и катионит Bio Rex 70 (Bio Rad, США), DEAE-сефадекс А-50 (Pharmacia, Швеция), целлюлозу CM-32 (Whatman, Англия). Разделение токсинов и пептидов ВЭЖХ с обращенной фазой осуществляли на хроматографе Altex с проточным спектрофотометром (модель 332) с объемом ячейки 8 мкл (Altex, США), использовали колонки Silasorb C<sub>8</sub>(А) и Ultrasphere ODS C<sub>18</sub>(В) размером 0,46×25 см. Для контроля разделения пептидов присоединяли проточный спектрофотометр Altex 160 (Beckman, США), который измерял поглощение при 214 нм.

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот D-500 (Durrum, США).

**Выделение нейротоксинов.** Цельный яд *B. eupreus* (8 г) растворяли в 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 5), центрифугировали 60 мин при 18 000 об/мин (ротор JA-20, центрифуга J-21В, Beckman, США). Осадок ресуспендировали в том же буфере и повторно центрифугировали. Супернатант наносили на колонку (5×15 см) с целлюлозой CM-32, уравновешенной тем же буфером. Проводили ступенчатую элюцию 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 5), 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,8), 0,5 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,8), 0,5 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 9,0); собирали активную фракцию, полученную при элюции 0,5 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,8). После обессоливания на сефадексе G-10 и лиофилизации токсическую фракцию хроматографировали на двух последовательно соединенных колонках (3,4×100 см) с биогелем Р-10 (рис. 1). Токсичные фракции IV и V подвергали ионообменной хроматографии на биорексе 70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рис. 2, 3). Фракцию IV-5 рехроматографировали на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М NH<sub>4</sub>OAc, рН 8,5 (рис. 4). Фракцию



## и химотриптических (Ch) пептидов

T-6	T-7	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-6	Ch-8
2,83(3)	0,69(1)	1,14(1)	0,81(1) 3,22(3)	0,71(1) 1,11(1) 1,02(1)	1,78(2) 3,25(3)		1,65(2) 3,27(3)
2,03(2)	1,83(2) 0,89(1) 1,32(1)			0,85(1)	2,18(2) 1,31(1)		2,24(2) 3,19(3)
1,12(1) 0,99(1) 1,21(1)	0,99(1)	2,12(2)	1,29(1) 0,91(1) 0,95(1)	1,11(1)	1,41(1)	1,26(1)	1,31(1)
		0,96(1)	0,92(1)	0,74(1) 0,82(1)		0,74(1)	1,13(1)
1,00(1)	1,01(1)	1,07(1)	1,01(1)		1,98(2)	1,04(1)	2,01(2) 1,85(2)
Asn	Ile	Ala	Ile	Thr	Cys	Leu	Cys
9	7	5	9	7	14	4	19
70	69	72	60	68	67	75	69

V-4 разделяли хроматографией с рециклизацией на DEAE-сефадексе А-50 в том же буфере (рис. 5).

Гомогенность полученных фракций контролировали диск-электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (рН 4,3) по методу Рейсфельда [13].

Токсичность изучаемых фракций и образцов контролировали на белых мышцах путем внутривенных инъекций как описано ранее [14].

Аминокислотный состав токсинов и пептидов определяли по стандартной методике [6].

Восстановление β-меркаптоэтанолом и карбоксиметилирование токсинов M<sub>9</sub> и M<sub>11</sub> проводили по методике [15].

*Триптический гидролиз CM-токсинов M<sub>9</sub> и M<sub>11</sub>*. 200 нмоль CM-токсина растворяли в 600 мкл 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (рН 8,3) и затем обрабатывали трипсином 4 ч при 37° С и отношении фермент — субстрат 1:50 (по весу). Гидролизат подкисляли и упаривали. Разделение триптических пептидов осуществляли ВЭЖХ на колонке В (рис. 6, 8).

*Гидролиз CM-токсина M<sub>9</sub> протеиназой из S. aureus*. 100 нмоль токсина растворяли в 200 мкл 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, рН 7,9, добавляли протеиназу в соотношении 1:30 (по весу) и вели гидролиз 4 ч при 37° С. Гидролизат упаривали и разделяли хроматографией на сефадексе G-25 в 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc, рН 5,7 (рис. 7). Фракцию Sp2 подвергали разделению на колонке А методом ВЭЖХ с обращенной фазой в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте.

*Сукцинирование CM-токсина M<sub>9</sub>* проводили по ранее описанному методу [16]. 80 нмоль токсина в 700 мкл 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 9) обрабатывали 1 ч 100-кратным избытком янтарного ангидрида (в ячейке титратора), рН поддерживали с помощью 2,5 М NaOH, затем немедленно обессоливали на биогеле Р-4 (1×90 см) в 5 мМ NH<sub>4</sub>OH.

*Гидролиз сукцинированного CM-токсина M<sub>9</sub> BNPS-скатолом*. 20 нмоль токсина суспендировали в 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 1,5-кратный избыток BNPS-скатола, перемешивали и добавляли 50 мкл

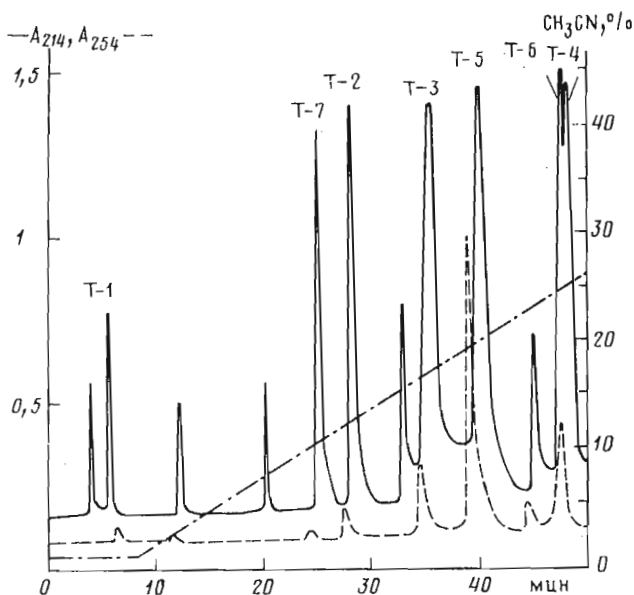


Рис. 8. Разделение триптических пептидов СМ-токсина  $M_{14}$  ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS  $C_{18}$  (условия как на рис. 6)

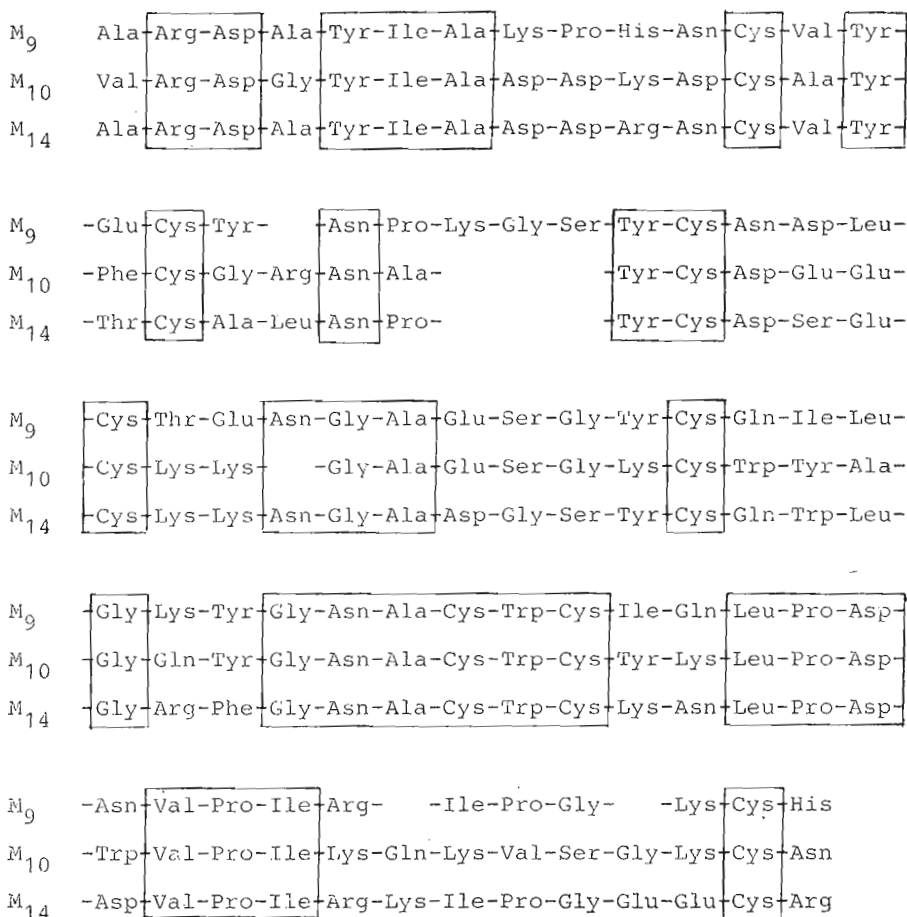


Рис. 9. Полные аминокислотные последовательности токсинов  $M_9$ ,  $M_{10}$  и  $M_{14}$  из яда скорпиона *B. eurus*. В рамки взяты инвариантные остатки. Пропуски означают делецию

Аминокислотная последовательность пептидов СМ-токсина M<sub>14</sub>

Пептид	Аминокислотная последовательность	Положение в полипептидной цепи белка
T-1	Ala-Arg	1-2
T-2	Asp-Ala-Tyr-Ile-Ala-Asp-Asp-Arg	3-10
T-3	Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr-Thr-Cys(Cm)-Ala-Leu-Asn-(Pro, Tyr, 2 Cys(Cm), Asp, Ser, Glu)-Lys	11-27
T-4	Asn-Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Tyr-Cys(Cm)-Gln-Trp-Leu-Gly-Arg	29-41
T-5	Phe-Gly-Asn-Ala-Cys(Cm)-Trp-Cys(Cm)-Lys	42-49
T-6	Asn-Leu-Pro-Asp-Asp-Val-Pro-Ile-Arg	50-58
T-7	Ile-Pro-Gly-Glu-Glu-Cys(Cm)-Arg	60-66
Ch-1	Ala-Arg-Asp-Ala-Tyr	1-5
Ch-2	Ile-Ala-Asp-Asp-Arg-Asn-Cys(Cm)-Val-Tyr	6-14
Ch-3	Thr-Cys(Cm)-Ala-Leu-Asn-Pro-Tyr	15-21
Ch-4	Cys(Cm)-Asp-Ser-Glu-Cys(Cm)-Lys-Lys-Asn-Gly-Ala-Asp-Gly-Ser-Tyr	22-35
Ch-6	Leu-Gly-Arg-Phe	39-42
Ch-8	Cys(Cm)-Lys-Asn-Leu-Pro-Asp-Asp-Val-Pro-Ile-Arg-Lys-Ile-Pro-Gly-Glu-Glu-Cys(Cm)-Arg	48-66
{ Ch-5	Cys(Cm) - - -Gln - - -Trp	36-38
{ Ch-7	Gly- - -Asn - - -Ala - - -Cys(Cm) - - -Trp	43-47

Примечание. → — стадии деградации по Эдману.

воды для растворения белка. Реакцию проводили в темноте при 20° С в течение 1 ч. Затем реакционную смесь разбавили равным объемом воды и трижды экстрагировали BNPS-скатол 1-хлорбутаном. Водную фазу после разведения водой упарили досуха.

*Химотриптический гидролиз СМ-токсина M<sub>14</sub>*. К 200 нмоль токсина, растворенного в 200 мкл 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (рН 8,3), добавляли химотрипсин в соотношении 1 : 50. Реакцию вели 4 ч при 37° С. Гидролизат после упаривания разделяли методом ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке В в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ NH<sub>4</sub>OAc (рН 5,7). В аналогичных условиях проводили гидролиз 20 нмоль пептида Т-3 из токсина M<sub>14</sub>.

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали методом Эдмана по описанным ранее методикам [9, 10]. При этом в дансильном варианте использовали идентификацию амидов дикарбоновых кислот и самих кислот в виде Pth-производных [11].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе, ценные советы и замечания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Catterall W. A., Hartshorn 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. Zlotkin E., Martinez G., Rochat H., Miranda F. *Insect Biochemistry*, 1975, v. 5, № 3, p. 243-250.
4. Zlotkin E., Miranda F., Lissitzky S. *Toxicon*, 1972, v. 10, № 3, p. 207-209.

5. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 450-461.
6. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 155-164.
7. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Шахпаронов М. И., Казаков В. К. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 714-723.
8. Волкова Т. М., Гарсия А. Ф., Тележинская И. Н., Потепенко Н. А., Гришин Е. В. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 979-982.
9. Gray W. R. In: *Methods in Enzymol.* N.Y.—L.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 469-475.
10. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикулина Е. Б., Виноградова Е. И. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410-413.
11. Алахов Ю. Б., Могуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301-1313.
12. Ambler R. P. In: *Methods in Enzymol.* N.Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. XXVB, p. 143-154, 262-272.
13. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. *Nature*, 1962, v. 195, № 4838, p. 281-283.
14. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963, с. 81.
15. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. *Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
16. Жданова Л. Н., Адамович Т. Б., Назимов И. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 4, с. 485-493.

Поступила в редакцию  
7.V.1985

### STUDY OF 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 main polypeptide neurotoxins  $M_9$ ,  $M_{10}$ ,  $M_{14}$ , possessing paralytic activity in mice, have been isolated from the venom of the Central Asian scorpion *Buthus eupeus*. The amino acid composition of these toxins was determined. Toxins  $M_9$  and  $M_{14}$  were digested with trypsin, chymotrypsin, *Staphylococcus aureus* proteinase and cleaved with BNPS-skatole. The complete amino acid sequences of the toxins  $M_9$  and  $M_{14}$  were established.