



УДК 547.993.02

**АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНА M<sub>10</sub>  
ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО СКОРПИОНА *Buthus eupeus*****Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Шахпаров М. И.,  
Казаков В. К.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* выделен полипептидный нейротоксин M<sub>10</sub>, обладающий паралитической активностью к теплокровным. Проведен триптический и химотриптический гидролиз нейротоксина; установлена его полная аминокислотная последовательность; показано, что токсин состоит из 65 аминокислотных остатков с 4 внутримолекулярными дисульфидными связями.

Нейротоксины яда скорпионов представляют собой основные полипептиды молекулярного веса от 4 000 до 8 000, содержащие 4 внутримолекулярные дисульфидные связи. Эти компоненты яда в концентрации 10<sup>-7</sup>–10<sup>-9</sup> М вызывают замедление скорости инактивации быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран, и их действие зависит от величины мембранного потенциала [1–3]. Токсины скорпионов обладают свойством видовой специфичности, и из яда скорпиона одного вида могут быть выделены индивидуальные полипептиды, действующие на нервную систему млекопитающих, насекомых или ракообразных [4, 5].

Ранее нами были установлены аминокислотные последовательности двух инсектотоксинов И<sub>1</sub> и И<sub>2</sub> из яда скорпиона *Buthus eupeus* [6, 7]. Настоящая работа посвящена выделению и определению аминокислотной последовательности нейротоксина M<sub>10</sub>, обладающего сильно выраженным действием на нервную систему млекопитающих.

Как было сказано ранее [5], состав яда *Buthus eupeus*, а также выход индивидуальных токсинов существенно менялся в зависимости от ареала обитания скорпионов. В настоящей работе использовался яд, полученный от скорпионов, обитающих в одном районе Узбекистана. Разделение цельного яда проводилось по стандартной схеме, включающей гель-фильтрацию с рециклизацией на биогеле Р-10, фракционирование на СМ-целлюлозе СМ-32 и окончательную очистку на ДЕАЕ-сефадексе А-50 [5]. Единственное существенное отличие от ранее описанной методики заключалось в том, что труднорастворимые нетоксичные компоненты яда были предварительно отделены экстракцией ацетоном [8]. Эта операция в значительной степени облегчила дальнейший процесс выделения индивидуальных токсинов.

При фракционировании яда *Buthus eupeus* были выделены 3 нейротоксина, эффективных по отношению к млекопитающим. Нейротоксин M<sup>\*</sup><sub>10</sub>

\* Элюционные параметры токсина M<sub>10</sub> на всех стадиях хроматографического разделения (см. выше) близки соответствующим параметрам токсина M<sub>3</sub>, выделенного нами ранее из другого образца яда [5].

Аминокислотный состав СМ-токсина M<sub>10</sub> и его триптических пептидов

Аминокислота	M <sub>10</sub>	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-8	T-9
Cys(Cm)	(8)		1,52(2)	1,61(2)		2,45(3)			0,71(1)
Asp	9,27(9)		4,04(4)	2,02(2)		1,28(1)	0,91(1)		1,12(1)
Ser	1,88(2)					1,30(1)		1,06(1)	
Glu	5,25(5)			2,02(2)		2,25(2)			
Pro	2,18(2)						1,92(2)		
Gly	7,03(7)		2,35(2)			4,35(4)		1,32(1)	
Ala	5,90(6)		2,34(2)	1,13(1)		3,28(3)			
Val	2,86(3)	1,00(1)					0,58(1)	0,96(1)	
Ile	1,90(2)		1,12(1)				0,66(1)		
Leu	1,06(1)						0,72(1)		
Tyr	6,00(6)		1,65(2)	0,61(1)		2,56(3)			
Phe	0,92(1)		0,87(1)						
Lys	7,78(8)		0,88(1)	0,78(1)	1,00(1)	1,60(2)	1,09(1)	0,91(1)	
Arg	1,93(2)	0,92(1)	0,93(1)						
Trp*	3					2	1		
N-Концевая	Val	Val	Asp	Asn	Lys	Gly	Leu	Val	Cys(Cm)
Всего	65	2	16	9	1	21	8	4	2
Выход, %		61	40	56	52	10	14	65	30

\* Количество остатков триптофана в белке определено спектрофотометрически.

был получен с выходом 2,2%, в то время как выход остальных токсинов не превышал 0,6%. По-видимому, M<sub>10</sub> — главный токсический компонент данного яда; его LD<sub>50</sub> оказалась равной 0,72 мг/кг веса мышей. По аминокислотному составу M<sub>10</sub> напоминает токсин M<sub>3</sub> [5]. Для обоих токсинов характерно отсутствие остатков гистидина и метионина, наличие одного остатка фенилаланина и одинаковое число остатков лизина (8) и аргинина (2) (табл. 1). В то же время существуют и некоторые различия: в M<sub>10</sub> найдены 3 остатка триптофана (в M<sub>3</sub>—4), отсутствуют остатки треонина и т. д. Аминокислотный анализ нативного и окисленного гомодуравненной кислотой M<sub>10</sub> позволил установить присутствие 8 остатков цистеина, что наряду с данными об отсутствии свободных сульфгидрильных групп свидетельствует о наличии 4 внутримолекулярных дисульфидных связей.

Для установления аминокислотной последовательности нейротоксина M<sub>10</sub> использовали классические приемы и методы определения структуры белков. Первоначально проводили восстановление дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся свободных сульфгидрильных групп. Для облегчения идентификации цистеиновых остатков модификацию осуществляли подкислой кислотой, содержащей тригивную метку.

N-Концевая аминокислотная последовательность карбоксиметилированного M<sub>10</sub> (СМ-токсина), определенная деградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных [9], оказалась следующей: Val-Arg-. Применение карбоксипептидазы С позволило установить С-концевую последовательность СМ-токсина: -Cys(Cm)-Asn.

При триптическом гидролизе СМ-токсина следовало ожидать образования 11 пептидных фрагментов (табл. 1). Однако на пептидной карте гидролизата удалось обнаружить только 9 фрагментов, а среди N-концевых аминокислот были найдены валин, глицин, лейцин, лизин, См-цистеин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Разделение пептидов триптического гидролиза осуществляли ионообменной хроматографией на катионите аминокс А-6 в градиенте рН и молярности летучих пиридин-ацетатных буферов. При этом было получено 8 объединенных фракций (рис. 1). На основании анализа N-концевых аминокислотных остатков и данных хроматографии в тонком слое было показано, что фракция I—IV

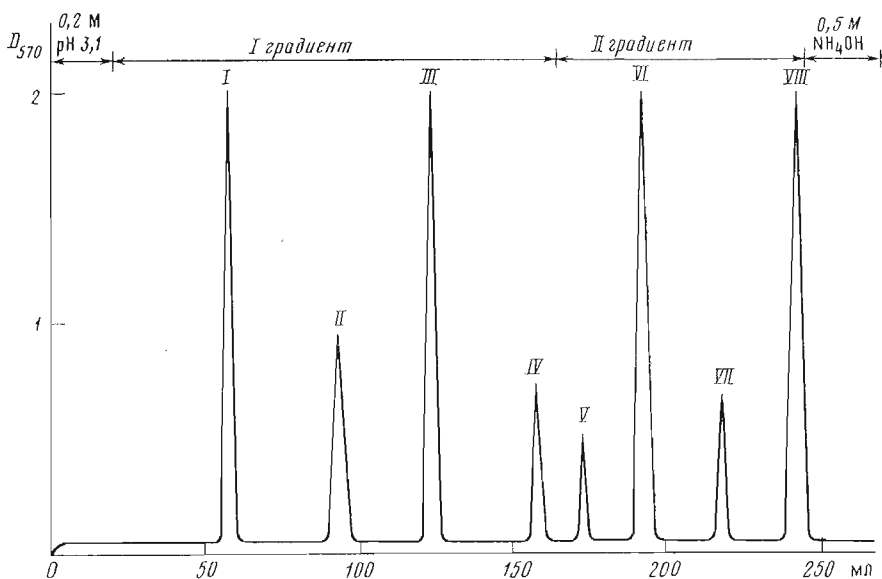


Рис. 1. Разделение триптического гидролизата СМ-токсина  $M_{10}$  на катионите амникс А-6 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (см. «Экспериментальную часть»)

и VII содержали соответственно индивидуальные пептиды\* Т-9, Т-3, Т-2, Т-8 и Т-1 (табл. 1). Во фракциях V, VI и VIII главные пептидные компоненты содержали примеси других пептидов. При разделении этих фракций методом хроматографии в тонком слое целлюлозы были выделены соответственно индивидуальные пептиды Т-5, Т-6 и Т-4 — свободный лизин (табл. 1). При обработке хроматограмм реактивом Эрлиха удалось установить, что пептиды Т-5 и Т-6 содержат в своем составе остатки триптофана.

Итак, из триптического гидролизата СМ-токсина  $M_{10}$  было выделено 8 пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 1. Структура этих пептидов была определена с использованием деградации по методу Эдмана [9—11]. Кроме того, при определении С-концевой последовательности пептидов использовали карбоксипептидазу С.

Таким образом, с помощью дансильной модификации метода Эдмана была установлена структура пептидов Т-1, Т-2, Т-3, Т-8 и Т-9 (табл. 2). Сходство структуры пептида Т-1 с N-концевой последовательностью токсина позволяет заключить, что он является N-концевым. Для установления структуры пептидов Т-2 и Т-3 проводился дополнительный гидролиз с помощью карбоксипептидазы С (4 ч). При этом для пептида Т-2 были определены аргинин и глицин, а для Т-3 — лизин и Cm-цистеин. Фрагмент Т-9, очевидно, является С-концевым, что следует из сравнения его последовательности с данными гидролиза нейротоксина карбоксипептидазой С (см. выше).

Для пептида Т-5 была установлена частичная аминокислотная последовательность: Gly-Ala-Glu-Ser-Gly-Lys-Cys(Cm)-... Для расщепления трипсином трудногидролизуемой пептидной связи Lys-Cys(Cm) в пептиде Т-5 были выбраны экстремальные условия гидролиза [12]. Полученную смесь пептидов подвергали деградации без разделения с идентификацией Dns-производных аминокислот (табл. 3). При этом была установлена частичная аминокислотная последовательность пептида Т-5, представленная в табл. 2. Определение полной структуры пептида Т-5 не представлялось возможным из-за низкого его выхода.

\* Пептиды триптического и химотриптического (см. ниже) гидролизатов обозначены по порядку их расположения в полипептидной цепи токсина.

Аминокислотная последовательность триптических пептидов СМ-токсина M<sub>10</sub>

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Val-Arg
T-2	Asp-Gly-Tyr-Ile-Ala-Asp-Asp-Lys-Asp-Cys(Cm)-Ala-Tyr-Phe-Cys(Cm)-Gly-Arg
T-3	Asn-Ala-Tyr-Cys(Cm)-Asp-Glu-Glu-Cys(Cm)-Lys
T-4	Lys
T-5	Gly-Ala-Glu-Ser-Gly-Lys-Cys(Cm)-X-Tyr-Ala-Gly-Gln-Tyr-...
T-6	Leu-Pro-Asp-Trp-Val-Pro-Ile-Lys
T-8	Val-Ser-Gly-Lys
T-9	Cys(Cm)-Asn

Таблица 3

## Результаты определения аминокислотной последовательности фрагментов триптического гидролизата пептида T-5

Метод анализа	Стадии деградации						
	1	2	3	4	5	6	7
Постадийная деградация смеси триптических фрагментов пептида T-5 с идентификацией Dns-производных аминокислот	Gly Cys(Cm)	Ala X	Glu Tyr	Ser Ala	Gly Gly	Lys Gln	- Tyr

Из результатов, представленных в табл. 2, следует, что пептиды T-2 и T-5 содержат трудногидролизуемые трипсином пептидные связи: соответственно Lys-Asp и Lys-Cys(Cm). Наличие таких пептидных связей частично объясняет факт выделения неполного набора триптических пептидов.

Для реконструкции молекулы токсина нами было предпринято химотриптическое расщепление СМ-токсина. В химотриптическом гидролизате были определены следующие N-концевые аминокислоты: валин, изолейцин, Сm-цистеин, аланин, глицин и лизин. Поскольку для химотриптического расщепления было использовано всего 200 нмоль СМ-токсина, разделение химотриптического гидролизата было проведено методом пептидных карт (рис. 2), при этом было обнаружено 8 главных пептидных зон. На основании данных анализа N-концевых аминокислотных остатков и аминокислотного состава было установлено, что пептидные зоны 1—8 (рис. 2) представляют собой соответственно индивидуальные пептиды ХТ-8, ХТ-3, ХТ-1, ХТ-5, ХТ-7, ХТ-6, ХТ-2 и ХТ-4 (табл. 4). Таким образом, из химотриптического гидролизата СМ-токсина было выделено 8 фрагментов, содержащих в общей сложности 65 аминокислотных остатков.

По методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот и определением амидов дикарбоновых аминокислот в виде фенилтиогидантоинов была установлена структура пептидов ХТ-1, ХТ-2, ХТ-3, ХТ-5, ХТ-6 и ХТ-7 (табл. 5). При этом гидролиз пептида ХТ-6 с помощью карбоксипептидазы А (2 ч) приводил к отщеплению триптофана с выходом 40%. Для пептида ХТ-4 определили частичную аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 5, причем карбоксипептидаза А (2 ч) отщепляла от пептида ХТ-4 тирозин (33,9%) и триптофан (26%).

Структура пептида ХТ-1 позволила соединить между собой триптические фрагменты T-1 и T-2 (см. схему). С помощью пептидов ХТ-3 и ХТ-4 удалось перекрыть соответственно пептиды T-2—T-5 (табл. 2, схема). Одновременно частичная структура триптического пептида T-5 в существенной мере помогла локализовать химотриптический пептид ХТ-5 (схема).

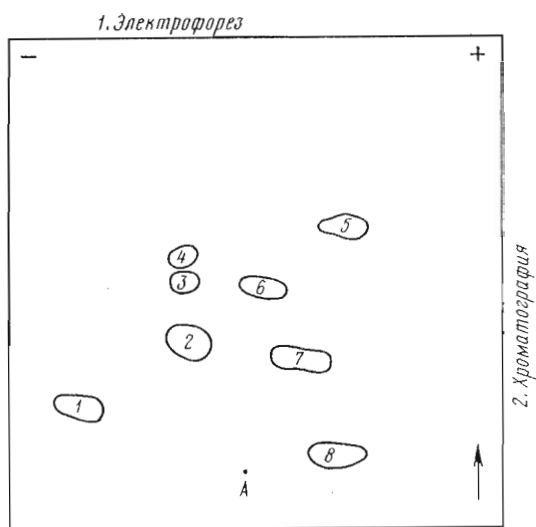


Рис. 2. Пептидная карта химотриптического гидролизата СМ-токсина М<sub>10</sub>. А — точка нанесенная; электрофорез: пиридин-ацетатный буфер (рН 6,4), 1200 В, 30 мин; хроматография в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12

Для определения структуры пептида ХТ-8 использовали данные по аминокислотной последовательности пептидов Т-6, Т-8 и Т-9. Кроме того, были предприняты термолитический и триптический гидролизы ХТ-8. Анализ смесей термолитических и триптических пептидов методом Эдмана наряду с данными по его N-концевой последовательности позволил полностью установить структуру пептида ХТ-8 (табл. 5, 6). При этом было найдено, что в состав ХТ-8 входит пептид Gln-Lys(Т-7), не обнаруженный в триптическом гидролизате СМ-токсина. По-видимому, этот факт можно объяснить циклизацией N-концевого остатка глутамина с образо-

Таблица 4

Аминокислотный состав химотриптических пептидов СМ-токсина М<sub>10</sub>

Аминокислота	ХТ-1	ХТ-2	ХТ-3	ХТ-4	ХТ-5	ХТ-6	ХТ-7	ХТ-8
Cys(Cm)		0,66(1)	0,50(1)	2,55(3)		0,58(1)	0,68(1)	0,53(1)
Asp	1,37(1)	2,82(3)	1,03(1)	1,13(1)		1,14(1)		2,40(2)
Ser				1,04(1)				1,35(1)
Glu				3,00(3)	1,02(1)			0,90(1)
Pro								2,05(2)
Gly	1,40(1)		1,32(1)	2,24(2)	1,40(1)	1,41(1)		1,41(1)
Ala		1,88(2)	0,95(1)	0,93(1)	1,03(1)	1,04(1)		
Val	0,99(1)							2,25(2)
He		0,88(1)						0,88(1)
Leu								0,88(1)
Tyr	1,24(1)	1,06(1)	0,96(1)	0,95(1)	0,82(1)		1,31(1)	
Phe		1,04(1)						
Lys		1,09(1)		2,63(3)				3,58(4)
Arg	0,61(1)		0,80(1)					
Trp				1		1		1
N-Концевая	Val	He	Cys(Cm)	Cys(Cm)	Ala	Gly	Cys(Cm)	Lys
Всего	5	10	6	16	4	5	2	17
Выход, %	40	20	30	40	15	40	40	18

Аминокислотная последовательность химотриптических пептидов СМ-токсина M<sub>10</sub>

Пептид	Аминокислотная последовательность
ХТ-1	Val-Arg-Asp-Gly-Tyr
ХТ-2	Ile-Ala-Asp-Asp-Lys-Asp-Cys (Cm)-Ala-Tyr-Phe
ХТ-3	Cys (Cm)-Gly-Arg-Asn-Ala-Tyr
ХТ-4	Cys (Cm)-Asp-Glu-Glu-Cys (Cm)-Lys-Lys-Gly-Ala-X-X-X-X-Trp-Tyr
ХТ-5	Ala-Gly-Gln-Tyr
ХТ-6	Gly-Asn-Ala-Cys (Cm)-Trp
ХТ-7	Cys (Cm)-Tyr
ХТ-8	Lys-Leu-Pro-Asp-X-Val-Pro-Ile-Lys-Gln-Lys-Val-Ser-Gly-Lys-Cys (Cm)-Asn

Таблица 6

## Результаты определения аминокислотной последовательности химотриптического пептида ХТ-8

Метод анализа	Стадии деградации					
	1	2	3	4	5	6
Постадийная деградация смеси термолитических фрагментов пептида ХТ-8 с идентификацией Dns-производных аминокислот	Lys → Ile → Val →	Leu → Lys → Ser →	Pro → Glx → Gly →	Asp → Lys → Lys →	X → Cys (Cm) →	Val → Asx →
Постадийная деградация смеси триптических фрагментов пептида ХТ-8 с идентификацией Dns-производных аминокислот	Lys → Leu → Gln → Val →	Pro → Lys → Ser →	Asp → Gly →	Trp → Lys →	Val → Cys (Cm) →	Pro Ile Lys → Asn →
Частичная аминокислотная последовательность пептида ХТ-8	Lys →	Leu →	Pro →	Asp →	-X- →	Val →

Примечание: → — стадии деградации.

ванием производного пироглутаминовой кислоты в ходе выделения триптических пептидов. При помощи химотриптического пептида ХТ-8 удалось расположить в единую полипептидную цепь триптические пептиды Т-6 — Т-9.

Таким образом, оставалось выяснить расположение химотриптических пептидов ХТ-6 и ХТ-7, входящих в состав триптического пептида Т-5. Для этой цели был предпринят ограниченный триптический гидролиз по остаткам аргинина с предварительной модификацией СМ-токсина янтарным ангидридом. При разделении триптического гидролизата на колонке с бюгелем Р-10 были получены 4 фракции (фракции II—IV далее не исследовали) (рис. 3). При анализе фракции I было установлено, что в ее состав входят фрагменты с N-концевыми остатками Asx и Cys (Cm). N-Концевая аминокислотная последовательность первых 10 аминокислотных остатков этих фрагментов была определена автоматическим методом с помощью секвенатора. При этом было найдено, что фрагмент с N-концевым аспарагином представляет собой триптический пептид, образовавшийся в результате гидролиза пептидной связи (18--19) Arg-Asn, в то время как второй фрагмент образовался в результате неспецифического расщепления пеп-



ки (Schleicher-Schüll, ФРГ), катионообменную смолу аминекс А-6 и биогель Р-10 (Bio-Rad, США), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция).

Определение триптофана проводили на спектрофотометре Gilford 240 (Франция). Аминокислотный анализ осуществляли на автоматическом анализаторе аминокислот D-500 (Durrum, США).

*Выделение нейротоксина M<sub>10</sub>.* Цельный яд скорпiona *Buthus eupeus* получали из Института биоорганической химии АН УзССР. 1 г яда растворяли в 50 мл 0,25 М NaCl в воде, раствор охлаждали до 0° С и при перемешивании прибавляли по каплям 55 мл ацетона, охлажденного до -20° С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин. К супернатанту добавляли еще 135 мл ацетона, осадок активной фракции после центрифугирования быстро высушивали на воздухе, растворяли в 10 мл воды и лиофилизировали. Выход активной фракции яда составил 31%. Разделение 310 мг активной фракции на колонке (1,6×400 см) с биогелем Р-10 с последующей рециклизацией и очисткой на СМ-целлюлозе СМ-32 проводили как описано ранее [5]. Выход нейротоксина M<sub>10</sub> из цельного яда составляет 2,2%.

*Модификация токсина.* Нейротоксин M<sub>10</sub> восстанавливали β-меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали с использованием радиоактивного препарата иодуксусной кислоты (Amersham, Англия), как описано ранее [6].

Сукцинилирование 400 нмоль СМ-токсина M<sub>10</sub> проводили в 1 М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 9,0) при добавлении хлоргидрата гуанидина в ячейке титратора (Radiometer, Дания) при температуре 20° С. При перемешивании добавляли 200-кратный избыток янтарного ангидрида, рН смеси поддерживали ~8,7 с помощью 2,5 н. NaOH. Реакционную смесь обессоливали на сефадексе G-25 в 0,001 М водном растворе аммиака.

*Триптический гидролиз СМ-токсина.* Триптический гидролиз 0,5 мкмоль СМ-токсина проводили в течение 3 ч в ячейке титратора при рН 8,3 и 37° С. Отношение фермент — субстрат составляло 1:100 (по весу). рН смеси поддерживали ~8,3 с помощью 1 М водного раствора аммиака. Полученный гидролизат упаривали на роторном испарителе. Триптические пептиды разделяли на хроматографической колонке, заполненной катионитом аминекс А-6 в градиенте рН и молярности летучего пиридин-ацетатного буфера (рис. 1). Регенерация смолы, приготовление колонки и градиента рН и концентраций описаны ранее [15].

Условия разделения: размеры колонки 0,6×60 см, высота столба смолы 55 см, скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 1 мл; давление на колонку при 40° С 7 атм. Продукты триптического гидролиза растворяли в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере, рН 3,1 (стартовый буфер), и наносили на колонку под давлением азота. Затем через колонку пропускали 20 мл стартового буфера. Градиент I создавали, пропуская 0,5 М пиридин-ацетатный буфер (рН 5,0) через заполненный стартовым буфером смеситель объемом 60 мл. Градиент II получали при подаче в смеситель 2,0 М пиридин-ацетатного буфера, рН 5,0. Элюирование заканчивали, пропуская через колонку 0,5 М NH<sub>4</sub>OH. Анализ элюата проводили на автоматическом пептидном анализаторе «Техникон II» (Technicon, США), приспособленном для проведения нингидридной реакции; отбор пробы для анализа при этом составлял 25 мкл. Объединенные фракции хроматографировали в тонком слое целлюлозы в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10:15:3:12) в течение 24 ч. Пептидные зоны обнаруживали нингидрином и экстрагировали с целлюлозы 50% пиридином (Pierce, США). Детекцию пептидных зон, содержащих триптофан, проводили с помощью реактива Эрлиха.

Пептидная карта триптического гидролизата была получена в условиях, описанных ниже для химотриптических пептидов.

*Триптический гидролиз сукцинированного СМ-токсина M<sub>10</sub>.* К раствору 0,4 мкмоль сукцинированного СМ-токсина в 0,65 мл 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>



(рН 8,3) добавляли трипсин в отношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Гидролиз продолжался 16 ч при 37° С, затем продукты триптического гидролиза разделяли на колонке (1×89 см) с биогелем Р-10 (200—400 меш) в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , рН 7,85, скорость элюирования 3 мл/ч (рис. 3).

*Триптический гидролиз пептида Т-5.* К раствору 0,02 мкмоль пептида Т-5 в 0,1 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,3) добавляли трипсин в отношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Гидролиз продолжали 18 ч при 37° С [12]. Затем гидролизат упаривали до полного удаления солей.

*Химотриптический гидролиз СМ-токсина.* К раствору 0,2 мкмоль СМ-токсина  $\text{M}_{10}$  в 0,3 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,3) добавляли химотрипсин в отношении фермент — субстрат 1 : 30 (по весу). Расщепление проводили 4 ч при 37° С. Гидролизат упаривали на роторном испарителе до полного удаления солей.

Продукты химотриптического гидролиза разделяли методом пептидных карт (см. рис. 2) на 10 целлюлозных пластинках (20×20 см), при этом на каждую пластинку наносили 0,02 мкмоль гидролизата. Сначала разделение проводили электрофорезом в течение 30 мин при напряжении 1200 В в пиридин-ацетатном буфере, рН 6,4, на приборе «Савант РР-18» (Savant, США). После высушивания электрофореграмму хроматографировали 16,5 ч в перпендикулярном направлении в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12. Пептидные зоны обнаруживали флуорескаминном [16] и экстрагировали с целлюлозы 50% пиридином (Pierce, США).

*Триптический гидролиз химотриптического пептида ХТ-8.* К раствору 0,01 мкмоль пептида ХТ-8 в 0,025 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,3) добавляли трипсин в отношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Гидролиз длился 4 ч при 37° С. Полученный гидролизат упаривали на роторном испарителе до полного удаления солей.

*Термолитический гидролиз химотриптического пептида ХТ-8.* К раствору 0,016 мкмоль пептида ХТ-8 в 0,02 мл 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,3) добавляли термолизин в соотношении фермент — субстрат 1 : 20 (по весу). Гидролиз продолжался 2 ч при 37° С. Полученный гидролизат упаривали до полного удаления солей.

*Определение аминокислотной последовательности.* Структуру пептидов устанавливали методом Эдмана по описанным ранее методам [9, 10]. При этом в дансильном варианте использовали идентификацию амидов дикарбоновых аминокислот и самих кислот в виде Pth-производных по методу [11]. Триптический гидролизат пептида Т-5, триптический и термолитический гидролизаты пептида ХТ-8 анализировали методом Эдмана без разделения, используя данные по частичной аминокислотной последовательности [10].

С-Концевую аминокислотную последовательность токсина и пептидов находили при помощи карбоксипептидазы А [17] и последующего анализа отщепленных аминокислот на аминокислотном анализаторе, а также при помощи карбоксипептидазы С [18] с идентификацией отщепленных Dns-производных аминокислот [9].

Н-Концевую аминокислотную последовательность пептидов фракции I триптического гидролизата сукцинизированного СМ-токсина (рис. 3) определяли с помощью секвенатора Beckman 890 С (США) с использованием стандартной медленной пептидной ДМАА 071472 программы. Идентификацию Pth-производных аминокислот осуществляли на газожидкостном хроматографе Beckman GC-65 (США) и с помощью ТСХ [10].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Romey G., Chicheportiche R., Lazdunski M., Rochat H., Miranda F., Lissitzky S. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **64**, 115-121.
2. Catterall W. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8660-8668.
3. Можяева Г. Н., Наумов А. П., Солдатов Н. М., Гришин Е. В. (1979) *Биофизика*, **24**, 235-241.
4. Zlotkin E. (1973) *Experientia*, **29**, 1453-1466.
5. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 450-461.
6. Жданова Л. Н., Адамович Т. Б., Назимов И. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 485-493.
7. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Солдатов Н. М., Костецкий П. В., Овчинников Ю. А. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1285-1293.
8. Miranda F., Koreyan C., Rochat H., Lissitzky S. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **16**, 514-523.
9. Gray W. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XI, pp. 469-475, Acad. Press, N. Y.—London.
10. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Якичулина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) *Биохимия*, **37**, 410-413.
11. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1301-1313.
12. Довгас И. В. (1978) Канд. дис. «Исследование первичной структуры белка L10 из рибосом *E. coli* MRE-600», Ин-т белка АН СССР, Пушкино.
13. Rochat H., Rochat C., Sampieri F., Miranda F. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **28**, 381-388.
14. Koreyan C., Martinez G., Rochat H. (1978) *FEBS Lett.*, **89**, 54-58.
15. Солдатова Л. Н. (1977) Канд. дис. «Структурная характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона *Buthus eupeus*», Ин-т биоорган. химии АН СССР, М.
16. Mendez E., Lai C. Y. (1975) *Anal. Biochem.*, **65**, 281-292.
17. Ambler R. P. (1972) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XXV B, pp. 143-154, 262-272, Acad. Press, N. Y.—London.
18. Tschesche H., Kupfer S. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 33-36.

Поступила в редакцию  
19.X.1979

AMINO ACID SEQUENCE OF NEUROTOXIN M<sub>10</sub> FROM THE VENOM OF THE  
MIDDLE-ASIAN SCORPION *BUTHUS EUPEUS*

GRISHIN E. V., SOLDATOVA L. N., SHAKHPARONOV M. I., KAZAKOV V. K.

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

Polypeptide neurotoxin M<sub>10</sub> possessing a paralytic activity towards mammals has been isolated from the venom of the Middle Asian scorpion *Buthus eupeus*. This neurotoxin consists of 65 amino acid residues and contains 4 intramolecular disulfide bonds. The neurotoxin M<sub>10</sub> was digested with trypsin and chymotrypsin and its total amino acid sequence was determined.