



УДК 591.145.2:543.424

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИНОВ ЯДА КОБРЫ
NAJA NAJA OXIANA И ТОКСИНА β *NAJA NAJA*
SIAMENSIS МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Набиев И. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д.,
Ефремов Е. С., Цетлин В. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Проведено сравнительное изучение цитотоксинов I и II, нейротоксинов I и II из яда кобры *Naja naja oxiana* и токсина β *Naja naja siamensis* методом лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) с целью сопоставления вторичной структуры нейротоксинов короткого и длинного типа и цито-(кардио-)токсинов из яда разных змей. Анализ спектров КР токсинов из яда кобры *N.n.oxiana* позволяет сделать вывод о сходстве вторичной структуры этих токсинов, которая характеризуется высоким содержанием антипараллельной β -формы (~30–35%) и отсутствием α -спиральных участков. Отмечены различия, связанные с состоянием гидроксильных групп остатков Туг и конфигурацией дисульфидных связей. Вторичная структура токсина β *N.n.siamensis* характеризуется наряду с наличием антипараллельной β -формы (~25%) значительным содержанием β -изгибов. Проведено сравнение конформационных состояний нейротоксина I *N.n.oxiana* в кристалле и водном растворе. Показано, что кристаллизация приводит к изменению конфигурации одной из дисульфидных связей.

Нейротоксины ядов змей, блокирующие ацетилхолиновый рецептор постсинаптической мембраны [1], подразделяют на два типа: короткие (60–62 остатка) и длинные (66–74 остатка). Значительное структурное сходство с короткими нейротоксинами имеют содержащиеся в яде токсины менее специфического действия, которые называют цитотоксинами, кардиотоксинами или мембраноактивными полипептидами [1, 2]. При дальнейшем изложении под термином «короткие токсины» будут подразумеваться как эти соединения, так и короткие нейротоксины.

К настоящему времени с помощью ряда физико-химических методов, таких, как ЯМР, КД и флуоресценция, получена важная информация о пространственном строении токсинов. Особую ценность имеют данные рентгеноструктурного анализа эрабутоксина «в» [3–5], относящегося к токсинам короткого типа, и токсина β *N.n.siamensis* — нейротоксина длинного типа [6]. Высокая степень гомологии первичной структуры токсинов и имеющиеся данные об их пространственном строении позволяют предполагать сходство их вторичной структуры. В то же время функциональная дифференцированность токсинов в сочетании со сравнительно небольшими различиями в их первичной структуре ставят на первый план их сравнительное изучение и выявление тех участков молекулы, которые обуславливают их функциональные особенности.

Данные спектров КР токсинов змеиных ядов

Токсин	Амид I, см ⁻¹	Амид II, см ⁻¹	Туг I ₄₅₀ /I ₃₃₀	Тгр (1361 см ⁻¹)	S—S, см ⁻¹	S—S, см ⁻¹	Число остатков	Число S—S-связей	Число Туг	Число Тгр	Лите- ратура
Цитотоксин I <i>N. n. oxiana</i>	1672	1236 1258	0,49	—	515	662 726	60	4	3	0	*
Цитотоксин II <i>N. n. oxiana</i>	1671	1240 1258	0,30	—	515	662 726	60	4	2	0	*
Кардиотоксин <i>N. n. atra</i>	1669	1236 1252	0,30	—	508	654	60	4	3	0	[7]
Кардиотоксин <i>N. n. atra</i>	1672	1231 1254	0,90	—	510	657 727	60	4	3	0	[12]
Цитотоксин I <i>N. n. atra</i>	1672	1231 1254	0,65	—	510	658 726	60	4	2	0	[12]
Кобротоксин <i>N. n. atra</i>	1671	1242	0,95	«Открыт»	510	657	62	4	2	1	[12]
Кобротоксин <i>N. n. atra</i>	1669	1229 1264	0,30	»	509	653	62	4	2	1	[11]
Нейротоксин II <i>N. n. oxiana</i>	1669	1240 1262	Сложный спектр	«Открыты»	3 : 1**	658	61	4	1	2	*
Эрабутоксин «а» <i>L. semijashiata</i>	1673	1236 1255	Н-связан	«Открыт»	3 : 1	658	62	4	1	1	[9]
Эрабутоксин «в» <i>L. semijashiata</i>	1674	1236 1252	Н-связан	»	3 : 1	657	62	4	1	1	[9]
Нейротоксин I <i>N. n. oxiana</i>	1673	1250	0,50	«Открыты»	3 : 2	663	73	5	3	2	*
Токсин 3 <i>N. n. siamensis</i>	1672 1682	1255	1,10	«Открыт»	2 : 3	663 727	71	5	1	1	*
Токсин В <i>Naja naja</i>	1670	1241	1,25	»	3 : 2	662 705	71	5	1	1	[8]

* Настоящая работа.

** Дано отношение I₅₁₀/I₃₃₀.

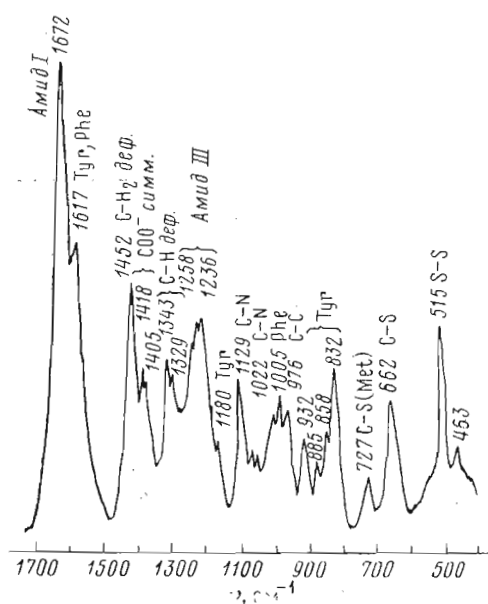


Рис. 1. Спектр КР водного раствора цитотоксина I
N. n. oxiana

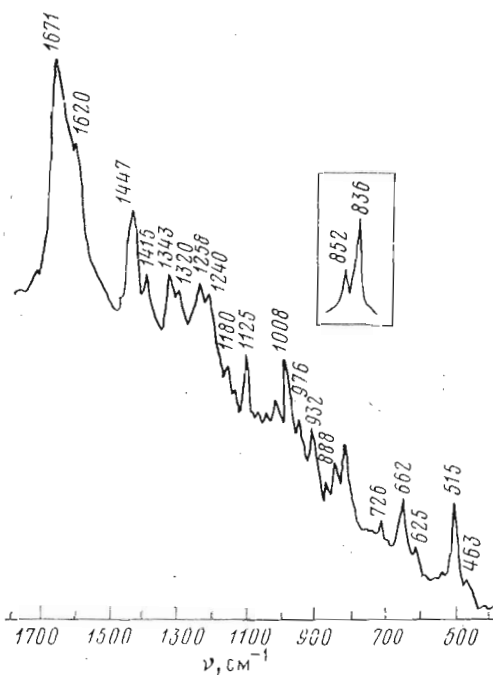


Рис. 2. Спектр КР водного раствора цитотоксина II
N. n. oxiana

Методом спектроскопии КР особенно подробно исследовались нейротоксины короткого типа [7–12], тогда как длинные нейротоксины и цито(кардио-)токсины изучены пока недостаточно. В настоящей работе методом лазерной спектроскопии КР проведено сравнительное исследование вторичной структуры и состояния отдельных аминокислотных остатков (Cys, Tyr, Tug) четырех токсинов из яда кобры *N. n. oxiana*: цитотокси-

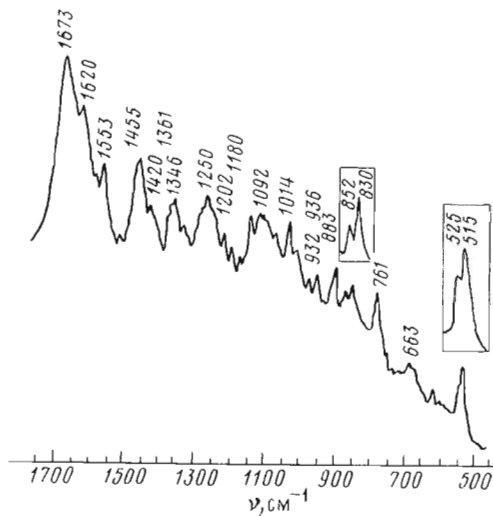


Рис. 3. Спектр КР водного раствора нейротоксина I
N. n. oxiana

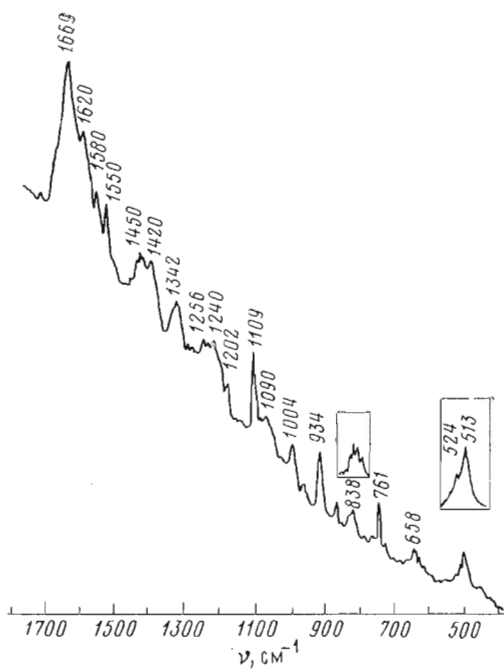


Рис. 4. Спектр КР водного раствора нейротоксина II
N. n. oxiana

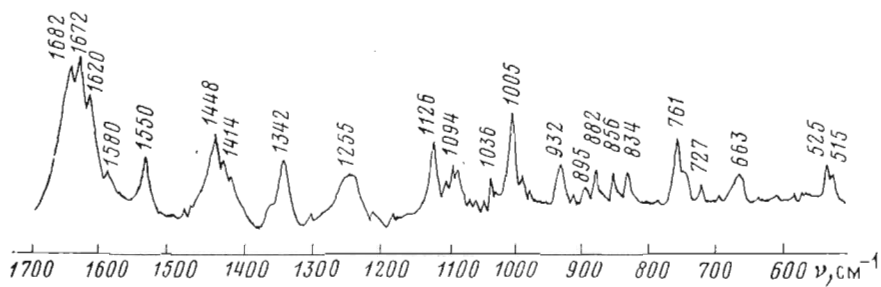


Рис. 5. Спектр КР водного раствора токсина 3 *N. n. siamensis*

Отнесения полос колебаний Амид I и Амид III в спектрах комбинационного рассеяния

Тип структуры	Амид I, см ⁻¹	Амид III, см ⁻¹	Литература
α -Спираль	1665 \pm 5	>1275	[13–16]
Антипараллельная β -структура	1670 \pm 3	1235 \pm 5	[13, 14, 16–18]
Неупорядоченная структура	1665 \pm 3	1245 \pm 4	[13, 14, 19, 20]
Водородно-несвязанная неупорядоченная структура	1685	1235	[13, 19]

нов I и II, нейротоксинов I и II, а также токсина *3 N. n. siamensis*. Нейротоксин I и токсин 3 относятся к длинным токсинам, а остальные токсины — к коротким. Уникальная возможность с помощью метода КР исследовать структуру белка в растворе и в твердом состоянии позволила также провести прямое сопоставление конформационных состояний нейротоксина I в водном растворе и в кристалле.

На рис. 1–5 приведены обзорные спектры КР водных растворов токсинов в области 400–1750 см⁻¹. Данные сравнительного анализа отдельных полос в спектрах изученных нами токсинов, а также некоторых гомологичных им токсинов, изученных ранее, суммированы в табл. 1.

Характерное проявление различных типов регулярной структуры в белках — частота и контур полос колебаний Амид I и Амид III (табл. 2). Как следует из рис. 1–5 и спектров КР токсинов, изученных ранее [7–12], спектры коротких и длинных токсинов имеют несомненное сходство как в областях колебаний Амид I и Амид III (~1670 и ~1240 см⁻¹ соответственно), так и в области валентных C—C (500–1000 см⁻¹) и C—N (1000–1200 см⁻¹) колебаний — чувствительных маркеров конформационных различий. Это позволяет говорить о сходстве вторичной структуры рассматриваемых токсинов. Из приведенных спектров можно сделать качественный вывод о том, что во вторичной структуре токсинов должна преобладать антипараллельная β -форма и неупорядоченная структура, а наличие α -спиральных участков практически исключается. Кроме того, из теоретических расчетов [21, 22] и исследований циклических дипептидов [23] вытекает, что в этот же диапазон наблюдаемых частот Амид I и Амид III могут попадать и частоты β -изгибов.

Количественную оценку содержания участков регулярной структуры в белках обычно проводят методами Липпета [17] и Пезолета [24], анализируя полосы амидных колебаний в спектрах КР растворов белка в легкой и тяжелой воде. Оба метода дают приемлемую точность оценки вторичной структуры (~10% [25]), хотя и имеют свои ограничения. Так, по методу Пезолета можно оценить лишь долю β -структурных участков и только при их значительном содержании, а в методе Липпета участки β -изгибов относятся к категории неупорядоченной структуры.

Для изученных нами цитотоксинов I и II и нейротоксина II *N. n. oxiana* расчеты по методу Липпета дают ~35% β -структуры, для нейротоксина I ~30% и для токсина *3 N. n. siamensis* ~25%. При этом подтверждается обнаруженная ранее [12] закономерность, что короткие нейро- и цито-(кардио-)токсины характеризуются более высоким содержанием антипараллельной β -структуры, чем длинные.

Отличительной особенностью токсина *3 N. n. siamensis* наряду с меньшим содержанием антипараллельной β -формы является также наличие в спектре высокочастотной полосы 1682 см⁻¹ в области колебаний Амид I (рис. 5), не отмечавшейся ранее при исследованиях токсинов различных

типов. Ранее подобные высокочастотные полосы в области полос колебаний Амид I формально относили к «водородно-несвязанной неупорядоченной форме» [13]. Однако при исследовании инсулина методом спектроскопии КР было показано, что подобные полосы должны отвечать упорядоченной регулярной структуре, поскольку они проявляются в виде достаточно узкого пика и при денатурации белка пропадают [19]. Из выполненных недавно теоретических расчетов и исследований модельного соединения [21–23] можно заключить, что подобный диапазон частот полос колебаний Амид I характерен для β -изгибов.

Остатки тирозина дают ряд полос в спектрах КР, среди которых наиболее информативен дублет 850 и 830 см^{-1} . В работе [26] было показано, что отношение интенсивностей полос этого дублета (I_{850}/I_{830}) характеризует состояние гидроксильной группы тирозина: свободное (10:10–10:7), водородно-связанное, где тирозин выступает как донор протона (3:10), водородно-связанное, где тирозин выступает как акцептор протона (10:4), или ионизованное (7:10). В нашей работе для проверки некоторых из этих соотношений проведено титрование модельного соединения — метиламида N-ацетил-L-тирозина. Для водородно-несвязанного состояния тирозиновых остатков получено отношение интенсивностей полос тирозинового дублета 1:1 (рис. 6), которое и было использовано в дальнейших расчетах. Авторы работы [26] отмечали, что применение полученных ими корреляций неоднозначно при наличии более двух тирозиновых остатков в различных состояниях в молекуле белка. Однако именно такая ситуация встречается наиболее часто. Мы использовали эти корреляции для случая двух возможных состояний остатков тирозина — водородно-несвязанного и водородно-связанного, когда тирозины выступают донорами протонов, введя два допущения: постоянство значений приведенных выше отношений и аддитивность вкладов отдельных остатков тирозина в наблюдаемое отношение интенсивностей полос дублета. В приложении дается методика оценки распределения тирозиновых остатков по состояниям при указанных допущениях.

В цитотоксине I, изученном в настоящей работе, два из трех тирозиновых остатков связаны водородной связью. В цитотоксине II, содержащем два тирозиновых остатка, оба тирозина связаны водородной связью, причем оба они выступают как доноры протона. Сопоставление с результатами исследования гомологичных токсинов (табл. 1) позволяет утверждать, что в цито-(кардио-)токсинах, как, вероятно, и в коротких нейротоксинах, по крайней мере инвариантный Tyr^{25} во всех случаях связан водородной связью, выступая как донор протона.

Ранее [1] отмечалось, что остатки тирозина в длинных нейротоксинах, как правило, более доступны растворителю, нежели в коротких. По данным КР-спектров, отношение интенсивностей полос тирозинового дублета для нейротоксина I составляет 0,49, что соответствует двум свободным и одному водородно-связанному тирозинам. Остаток тирозина в токсине *3 N. n. siamensis* не связан водородной связью, так же как и в исследованном ранее токсине *B N. naja* [8].

Интересная ситуация наблюдается для нейротоксина II *N. n. oxiana*.

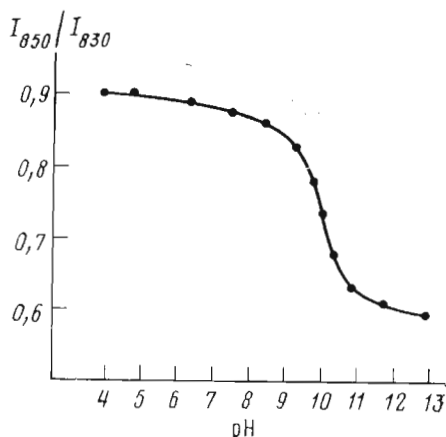


Рис. 6. Зависимость отношения интенсивностей полос тирозинового дублета (I_{850}/I_{830}) от pH в спектрах КР метиламида N-ацетил-L-тирозина

Спектр КР этого токсина в области 800–900 см^{-1} слишком сложен, чтобы идентифицировать тирозиновый дублет. В работе [26] отмечалось, что модельные соединения тирозина, находящиеся в конформации, в которой связи $\text{C}^\alpha\text{—N}$ и $\text{C}^\beta\text{—C}^\gamma$ составляют угол χ^1 300° относительно связи $\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta$, в твердом состоянии дают усложненный спектр в области 800–900 см^{-1} , переходящий в дублет при растворении образца. Вероятно, подобная конформация остатка тирозина реализуется в нейротоксине II из-за того, что подвижность фенильного кольца тирозина ограничена соседними группами. Это предположение подтверждается данными ЯМР [28]. Подобный эффект ранее в спектрах КР белков и полипептидов не наблюдался, хотя его возможность и была предсказана [26].

Полярность окружения остатков триптофана в белке может быть оценена по проявлению узкой полосы 1364 см^{-1} в случае их гидрофобного окружения и ее отсутствию при их полярном окружении [29]. Иными словами, состояние остатков триптофана по спектрам КР можно характеризовать как «закрытое» или «открытое». В гомологичных токсинах, изученных ранее методом КР [7–12], остатки триптофана «открытые». В спектрах КР исследованных в настоящей работе токсинов полоса 1364 см^{-1} либо отсутствует, либо проявляется очень слабо, т. е. остатки триптофана также являются «открытыми».

Дисульфидные мостики в токсинах (4 в коротких и 5 в длинных) играют важную структурную роль. Прямое определение их конфигурации в растворе недоступно для других физико-химических методов, тогда как в спектрах КР она устанавливается достаточно надежно по частотам валентных колебаний связей S—S (480–540 см^{-1}) и C—S (570–720 см^{-1}) [30]. В спектрах КР цитотоксина I (рис. 1) и II (рис. 2) наблюдается острая полоса S—S -валентных колебаний с максимумом 515 см^{-1} и полоса C—S -колебаний при 662 см^{-1} . Согласно предложенным в работе [30] корреляциям, это говорит об идентичности в цитотоксинах I и II всех четырех дисульфидных связей и их принадлежности к *гош-гош-гош*-типу конфигурации. Спектр КР короткого токсина — нейротоксина II *N. n. oxiata* — (рис. 4) в этой области напоминает спектры КР эрабутоксина «а» и «в» из *Laticauda semitashiata* [9] (табл. 1). Из отношения интенсивностей полос 510 и 522 см^{-1} (3 : 4) можно сделать вывод, что три дисульфидных мостика находятся в *гош-гош-гош*- и один — в *гош-гош-транс*-конфигурации. Этот вывод был подтвержден рентгеноструктурными исследованиями эрабутоксина «в» [5]. Таким образом, в коротких нейро- и цитотоксинах доминирующей для дисульфидных связей является *гош-гош-гош*-конфигурация (табл. 1). В нейротоксине I, содержащем пять дисульфидных связей, отношение интенсивностей полос S—S -валентных колебаний (I_{515}/I_{525}) составляет 3 : 2. Это означает, что три дисульфидные связи имеют *гош-гош-гош*- и две — *гош-гош-транс*-конфигурацию. Аналогичный результат был получен для длинного токсина В *Naja naja* [8]. Для токсина З *N. n. siamensis* характерно anomalно высокое содержание *гош-гош-транс*-конфигурации дисульфидных связей. Отношение интенсивностей I_{515}/I_{525} составляет 2 : 3. Таким образом, в длинных нейротоксинах число дисульфидных связей в *гош-гош-транс*-конфигурации выше по сравнению с короткими токсинами (табл. 1).

В связи с появлением данных рентгеноструктурного анализа нейротоксинов возникает вопрос о возможности перенесения информации о структуре в кристаллическом состоянии на структуру токсинов в растворе. Наиболее эффективно сопоставление структуры белка в кристалле и растворе может быть сделано по спектрам КР. На рис. 7 приведен спектр КР нейротоксина I в кристаллическом состоянии. Из анализа областей Амид I и Амид III, C—C - и C—N -валентных колебаний можно сделать вывод о сходстве вторичной структуры нейротоксина I в кристалле и растворе. Тем не менее из сравнения спектров, приведенных на рис. 3 и рис. 7, следует, что при переходе к кристаллу по крайней мере одна из дисульфидных

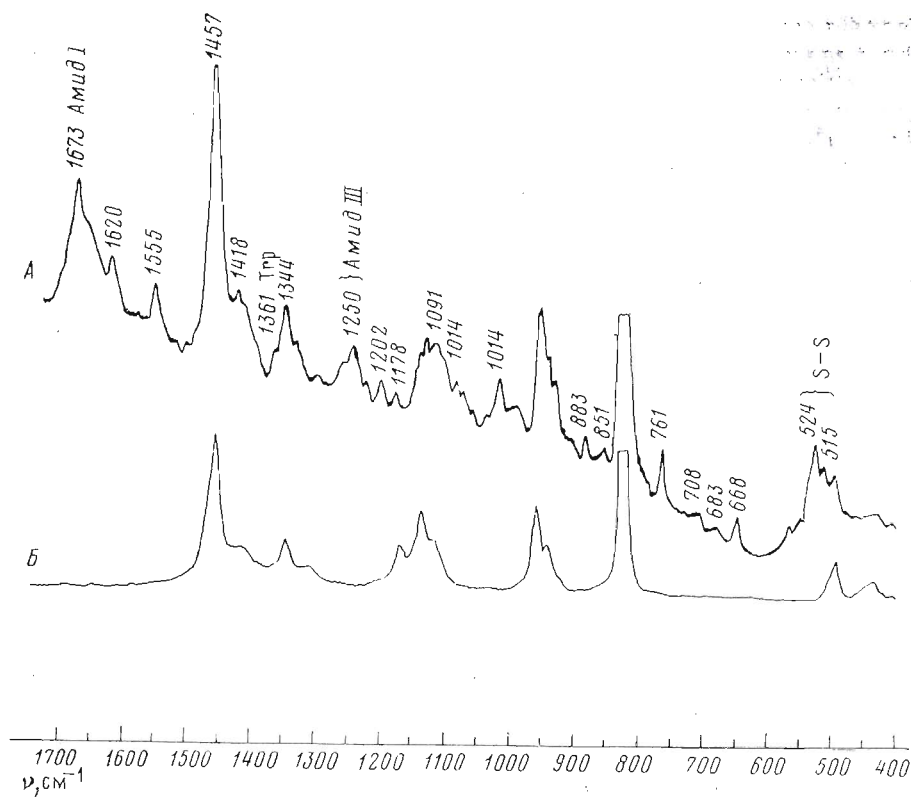


Рис. 7. Спектр КР кристаллического нейротоксина I, помещенного в противораствор — изопропиловый спирт (А), и противораствора (В)

связей меняет свою конфигурацию, так как наблюдается изменение отношения интенсивностей полос 510 к 525 см^{-1} от $3:2$ для водного раствора до $2:3$ для кристалла, что может быть объяснено переходом одной из дисульфидных связей из *gosh-gosh-gosh*- в *gosh-gosh-транс*-конфигурацию. Поскольку кристаллизация нейротоксина I проводилась из 40% водного изопропанола, мы сопоставили спектр КР водного раствора нейротоксина I со спектром раствора нейротоксина I в 40% изопропаноле. Они оказались идентичными. Отсюда следует, что изменение конфигурации одной из дисульфидных связей нейротоксина I связано с переходом в кристаллическую форму, а не с изменением полярности среды.

Экспериментальная часть

Спектры КР получены на раман-спектрометре «Ramanog HG-2S» (Jobin Yvon) с двойным монохроматором на вогнутых голографических решетках и фотоумножителем типа RCA-c31034. Для возбуждения использовалась линия $514,5$ нм Ar^+ -лазера «Spectra-Physics 164-03». Спектры КР водных растворов токсинов записывались при мощности лазера 200 – 250 мВт, напряжении на ФЭУ 1150 В, ширине щели 600 – 700 мкм, скорости скачивания 30 $\text{см}^{-1}/\text{мин}$ и постоянной времени $1,5$ с. Концентрация растворов составляла 90 – 110 мг/мл. В случае кристаллического образца спектр записывался при мощности лазера 50 мВт и напряжении на ФЭУ 1180 В. Спектр КР противораствора — изопропилового спирта — регистрировался при мощности лазера 300 мВт, напряжении на ФЭУ 950 В и скорости сканирования 50 $\text{см}^{-1}/\text{мин}$. Образцы токсинов помещали в капилляры из пирекса с внутренним диаметром 1 мм. Для ослабления плазменных линий, лежащих вблизи от возбуждающей линии, на пути лазерного луча

ставился соответствующий интерференционный фильтр. Накопление спектров в аналоговом режиме и их обработка проводились с помощью компьютера «Nicolet-1180». Съемку спектра кристаллического нейротоксина I проводили во вращающемся капилляре, заполненном противораствором для предохранения образца от локального теплового разрушения под лазерным лучом.

Нейротоксины I и II, а также цитотоксины I и II выделяли из яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana*, как описано в работе [31], и подвергали дополнительной очистке на катионообменнике «Биорекс 70» [32] или сефадексе G-50f (нейротоксин I). Токсин 3 *N. n. siamensis*, очищенный хроматографией на «Биорексе 70», предоставлен Е. Карлссоном.

Для получения кристаллов нейротоксин I растворяли в 0,05 М CH_3COOH до концентрации 10—15 мг/мл и добавляли изопропанол до концентрации 20—25% (по объему), после чего раствор центрифугировали для удаления возможных механических примесей. Кристаллизацию проводили диализом в микрокапелях против 40% водного изопропанола в течение недели при 2° С. Кристаллы перед снятием спектров КР промывали несколько раз свежим 40% водным изопропанолом. Кристаллы, выращенные подобным образом, имели сильную склонность к образованию друз и розеток, так же как и при использовании в качестве высаживающего агента других органических соединений — этанола, 2-метил-2,4-пентандиола, полиэтиленгликоля и т. д.

Авторы выражают благодарность Е. Карлссону (Упсала) за предоставление токсина 3 *N. n. siamensis*.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Величина относительной интенсивности оберточной и основной полос тирозинового дублета (A) может быть выражена для случая двух состояний тирозиновых остатков — водородно-несвязанного и водородно-связанного, где тирозин выступает как донор протона, — следующим образом:

$$A = \frac{nX + 0,3(N - n)Y}{nX + (N - n)Y},$$

где N — число тирозиновых остатков в молекуле, n — число водородно-связанных тирозиновых остатков, выступающих как донор протонов, X — абсолютная интенсивность основной полосы водородно-несвязанного тирозина, Y — абсолютная интенсивность основной полосы водородно-связанного тирозина. (Меньшая по интенсивности полоса тирозинового дублета всегда оберточная [27].)

Учитывая, что сумма интенсивностей невозмущенных полос (при отсутствии ферми-резонанса) равна сумме интенсивностей возмущенных полос (полос резонансного дублета) [27], получаем

$$2X = (1 + 0,3)Y, \quad X/Y = 0,65$$

и тогда

$$A = \frac{0,35n + 0,3N}{N - 0,35n}.$$

Таким образом, для случая только двух возможных состояний тирозиновых остатков распределение тирозинов по состояниям может быть получено точно. Аналогичная процедура для случая трех возможных состояний тирозиновых остатков приводит к неоднозначности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson E. Chemistry of protein toxins in snake venoms.— In: Handbook of experimental pharmacology (Lee E. Y., ed.). Berlin: 1979, p. 152—242.
2. Condrea E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins.— Experientia, 1974, v. 30, № 3, p. 121—129.
3. Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Seare J. E., Rudke A. D., Richardson J. S. Three-dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 2991—2994.
4. Tsernoglou D., Petsko G. The crystal structure of a post-synaptic neurotoxin from sea snake at 2.2 Å resolution.— FEBS Lett., 1976, v. 68, № 1, p. 1—4.

5. *Kimball M. R., Sate A., Richardson J. S., Rosen L. S., Low B. W.* Molecular conformation of erabutoxin b; atomic coordinates at 2.5 Å resolution.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 88, № 3, p. 950—959.
6. *Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A.* Three-dimensional structure of the «long» neurotoxin from cobra venom.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 5, p. 2400—2404.
7. *Hseu T. H., Liu Y. C., Wang C., Hwang D. M., Yang C. C.* Conformational prediction for snake venom and laser Raman scattering of a cardiotoxin from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 13, p. 2999—3005.
8. *Takamatsu T., Harada I., Shimanouchi T., Ohta M., Hayashi K.* Raman spectrum of toxin B in relation to structure and toxicity.— *FEBS Lett.*, 1976, v. 72, № 2, p. 291—294.
9. *Harada I., Takamatsu T., Shimanouchi T.* Raman spectra of some neurotoxins in relation to structures and toxicities.— *J. Phys. Chem.*, 1976, v. 80, № 11, p. 1153—1156.
10. *Yu N. T., Lin T. S., Tu A. T.* Laser Raman scattering of neurotoxins isolated from the venoms of sea snakes *Lapemis hardwickii* and *Enhydryna schistosa*.— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 5, p. 1782—1785.
11. *Hseu T. H., Chang H., Hwang D. M., Yang C. C.* Laser Raman studies of cobrotoxin.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 537, № 2, p. 284—292.
12. *Takamatsu T., Harada I., Hayashi K.* Raman spectra of some snake venom components.— *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 622, № 2, p. 189—200.
13. *Yu N. T., Yast E. J.* Laser Raman spectroscopic studies of ocular lens and its isolated protein fractions.— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 6, p. 2196—2202.
14. *Yu T. G., Lippert J. L., Peticolas W. L.* Laser Raman studies of conformational variations of poly-L-lysine.— *Biopolymers*, 1973, v. 12, № 9, p. 2161—2176.
15. *Frushour B. G., Koenig J. L.* Raman spectroscopic study of tropomyosin denaturation.— *Biopolymers*, 1974, v. 13, № 9, p. 1809—1819.
16. *Small E. W., Franconi B., Peticolas W. L.* Raman spectra and the phonon dispersion of polyglycine.— *J. Chem. Phys.*, 1970, v. 52, № 9, p. 4369—4379.
17. *Lippert J. L., Tyminski D., Desmeules P. J.* Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1976, v. 98, № 22, p. 7075—7080.
18. *Yu N. T., Jo B. H., O'Shea D. C.* Laser Raman Scattering of cobramine B, a basic protein from cobra venom.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1973, v. 156, № 1, p. 71—76.
19. *Yu N. T., Liu C. S., O'Shea D. C.* Laser Raman spectroscopy and the conformation of insulin and proinsulin.— *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 70, № 1, p. 117—132.
20. *Lord R. C., Yu N. T.* Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. II. Native ribonuclease and α -chymotrypsin.— *J. Mol. Biol.*, 1970, v. 51, № 2, p. 203—213.
21. *Krimm S., Bandekar J.* Vibrational analysis of peptides, polypeptides and proteins. V. Normal vibrations of β -turns.— *Biopolymers*, 1980, v. 19, № 1, p. 1—29.
22. *Bandekar J., Krimm S.* Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: characteristic Amide bands of β -turns.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 2, p. 774—777.
23. *Deslauriers R., Leach S. J., Maxfield F. R., Minasian E., McQuie J. R., Meinwald Y. C., Nemethy G., Pottle M. S., Rae I. D., Sheraga H. A., Stimson E. R., Van Nispen J. W.* Cyclized dipeptide model for β band.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 6, p. 2512—2514.
24. *Pezolet M., Pigeon-Gosselin M., Coulombe L.* Laser Raman investigations of the conformation of human immunoglobulin G.— *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 453, № 3, p. 502—512.
25. *Fox J., Tu A. T.* Conformational analysis of a snake venom neurotoxin by prediction from sequence, circular dichroism, and Raman spectroscopy.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1979, v. 193, № 2, p. 407—414.
26. *Stamwiza M. N., Lord R. C., Chen M. C., Takamatsu T., Harada I., Matsuura H., Shimanouchi T.* Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds.— *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 22, p. 4664—4668.
27. *Сущинский М. М.* Ферми-резонанс.— В кн.: *Спектры комбинационного рассеяния молекул и кристаллов*. М.: Наука, 1966, с. 299—307.
28. *Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Y. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Y. A.* Proton-Nuclear-magnetic-resonance study of the conformation of neurotoxin II from Middle-Asian cobra (*Naja naja oxiana*) venom.— *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 71, № 2, p. 595—606.
29. *Yu N. T.* Comparison of protein structure in crystals, in lyophilized state, and in solution by laser Raman spectroscopy. II. Ribonuclease A and carboxypeptidase.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 16, p. 5033—5037.
30. *Sugeta H., Go A., Miyazawa T.* Rotational isomerism around disulfide bonds in alkyl disulfides.— *Chem. Lett.*, 1972, № 16, p. 83—86.
31. *Туракулов Я. Х., Сорокин В. М., Нихангоджиева С. А., Юкельсон Л. Я.* Токсичность среднеазиатской кобры.— *Биохимия*, 1971, т. 36, № 6, с. 1282—1287.

32. Гришин Е. В., Сухих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. Выделение, свойства и аминокислотная последовательность двух цитотоксинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. — Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1018–1034.

Поступила в редакцию
29.IX.1980

A COMPARATIVE RAMAN LASER STUDY OF TOXINS FROM THE VENOM
OF *NAJA NAJA OXIANA* COBRA AND TOXIN 3 FROM
NAJA NAJA SIAMENSIS

NABIEV I. R., PLUZHNIKOV K. A., TRAKHANOV S. D.,
EFREMOV E. S., TSETLIN V. I.

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

Cytotoxins I and II, and neurotoxins I and II from the venom of cobra *Naja naja oxiana*, as well as toxin 3 from the *Naja naja siamensis* cobra venom, were examined by Raman laser spectroscopy with the purpose of comparing the secondary structure in short- and long-type neurotoxins and cyto(cardio)toxins isolated from the venom of different snakes. For the *Naja naja oxiana* toxins, the analysis of the spectra demonstrated a considerably structure similarity characterized by a high content of antiparallel β -structure (~ 30 – 35%) and absence of α -helical segments. The differences in the state of hydroxyl groups of tyrosine residues and in configuration of disulfide bridges were observed among the toxins. *Naja naja siamensis* toxin 3 possesses a considerable amount of β -turns along with antiparallel β -structure ($\sim 25\%$). Conformational states of *N. n. oxiana* toxin I were compared in the crystal and solution. Crystallization was found to result in a change of the configuration of one disulfide bond.