



УДК 547.993.1.02:595.461

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ЯДА  
КАВКАЗСКОГО ПОДВИДА СКОРПИОНА *BUTHUS EUPEUS*

Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н.

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

Из яда кавказского подвида скорпиона *Buthus eupeus* выделено три нейротоксины для млекопитающих и один инсектотоксин. Гомогенность токсинов доказана диск-электрофорезом и анализом N-концевых аминокислотных остатков. Определен аминокислотный состав токсинов M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub>, M<sub>13</sub>, I<sub>5</sub>. На основании данных по исследованию триптических и термолитических пептидов инсектотоксина I<sub>5</sub> установлена его полная аминокислотная последовательность. Показано, что токсин I<sub>5</sub> состоит из 35 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями и содержит амидированный C-концевой остаток аргинина.

В яде скорпионов содержатся полипептидные нейротоксины с молекулярной массой около 7000, обладающие свойством замедлять скорость инактивации быстрых натриевых каналов электровозбудимой мембраны [1]. Эти нейротоксины удобно использовать в качестве уникальных инструментов исследования молекулярных механизмов передачи первого импульса [2, 3]. Помимо нейротоксинов, селективно поражающих нервные системы позвоночных, в яде скорпионов обнаружены токсические полипептиды, обладающие мощным парализующим действием на насекомых — инсектотоксины. Ранее нами было осуществлено выделение и определение аминокислотной последовательности инсектотоксинов из яда среднеазиатского подвида скорпиона *Buthus eupeus* [4–6]. Настоящая работа посвящена выделению токсических компонентов яда кавказского подвида скорпиона *B. eupeus* и их характеристике, а также определению аминокислотной последовательности инсектотоксина I<sub>5</sub> из этого яда.

Цельный яд кавказского подвида скорпиона *B. eupeus* был получен электрической стимуляцией тельсонов особей, пойманных на небольшом участке берега р. Куры в районе г. Каспи. Кроме того, использовался яд, взятый от скорпионов, содержащихся в условиях скорпионария. Следует отметить, что, как выяснилось в процессе работы, обе партии яда практически не различались по своему белковому составу. Лиофильно высушенный яд хранился при –10° С в течение длительного времени без заметной потери биологической активности.

Разделение компонентов яда проводилось с использованием на первой стадии ионообменной хроматографии цельного яда на SP-сефадексе С-25 (рис. 1), что позволило в значительной степени ускорить и упростить выделение полипептидных токсинов по сравнению с методикой разделения яда среднеазиатского подвида скорпиона *B. eupeus* [4]. Перед нанесением на колонку с SP-сефадексом цельный яд был растворен в стартовом буфере. Труднорастворимые нетоксичные компоненты мукопротеидной природы отделялись с помощью центрифугирования. Кроме этого для разрушения возможных агрегатов в раствор яда добавлялась мочевины. Полученные в результате хроматографии фракции I-5, I-6 и I-8 оказались токсичными для мышей, а фракции I-6 и I-7 вызывали паралич у тараканов.

Дальнейшая очистка токсинов проводилась с помощью гель-фильтрации токсических фракций на биогеле Р-10 (рис. 2, 4–6). В результате были получены токсины для млекопитающих M<sub>12</sub> и M<sub>13</sub> и инсектотоксин I<sub>5</sub>. При дополнительной очистке фракции I-5-2 на катионите биорекс 70

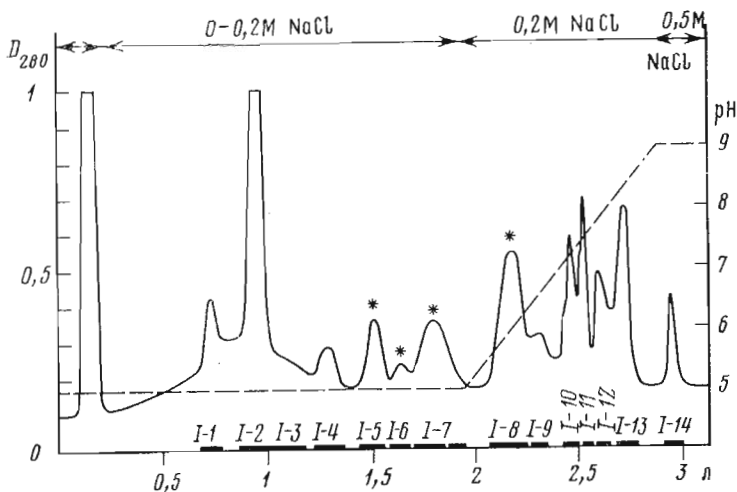


Рис. 1. Разделение цельного яда кавказского подвида скорпиона *B. eurus* (540 мг) на SP-сефадексе С-25 в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере (градиент NaCl, градиент pH); колонка 1,6×25 см, скорость 36 мл/ч, объем фракций 12 мл. Здесь и на рис. 2-6 показаны границы объединения фракций. Звездочкой отмечены фракции, проявляющие токсичность

был выделен нейротоксин  $M_{11}$ . Гомогенность выделенных токсинов доказана с помощью диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле (рН 4,3) и анализа N-концевых аминокислот. Для токсинов  $M_{11}$ ,  $M_{12}$ ,  $M_{13}$  и  $I_5$  были определены летальные дозы (табл. 1). Как видно из табл. 2, все выделенные токсины обладают значительной гомологией с соответствующими токсическими полипептидами из яда среднеазиатского подвида скорпиона *B. eurus* ([4], табл. 2).

С наибольшим выходом из яда кавказского подвида скорпиона *B. eurus* был получен инсектотоксин  $I_5$  (табл. 1). Этот токсин обладает ярко выраженным паралитическим эффектом по отношению к насекомым. С. М. Антоновым и Л. Г. Магазаником в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова в электрофизиологических экспериментах на нервно-мышечном соединении личинки мясной мухи было показано, что инсектотоксин  $I_5$  в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл уменьшает на 50% чувствительность постсинаптических рецепторов к глутамату.

Для установления аминокислотной последовательности инсектотоксина  $I_5$  использовали классические методы определения структуры белков. Первоначально проводили восстановление внутримолекулярных дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся свободных сульфгидрильных групп цистеиновых остатков. Аминокислотный анализ карбоксиметилированного токсина  $I_5$  свидетельствовал о том, что модификация прошла количественно (табл. 3, ср. табл. 2).

При триптическом гидролизе СМ-токсина  $I_5$  следовало ожидать образования 6 пептидных фрагментов. Среди N-концевых аминокислот трипти-

Таблица 1

Выход и летальные дозы токсинов яда кавказского подвида скорпиона *B. eurus*

Образец	LD <sub>50</sub> , мкг/кг веса мышы	D* <sub>100</sub> , мкг/тара- кана	Выход, %	Образец	LD <sub>50</sub> , мкг/кг веса мышы	D* <sub>100</sub> , мкг/тара- кана	Выход, %
Цельный яд	3000	25	100	$M_{13}$	1542		1,04
$M_{11}$	220		0,36	$I_5$		3	2,71
$M_{12}$	4167		0,55				

\* D<sub>100</sub> — доза, вызывающая устойчивый паралич у 100% тараканов.

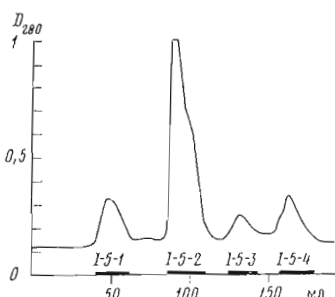


Рис. 2

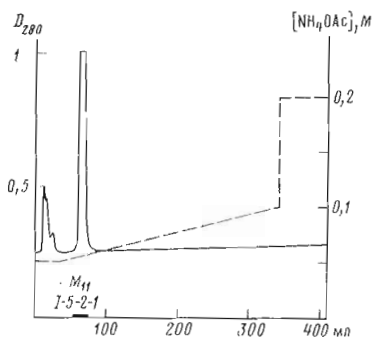


Рис. 3

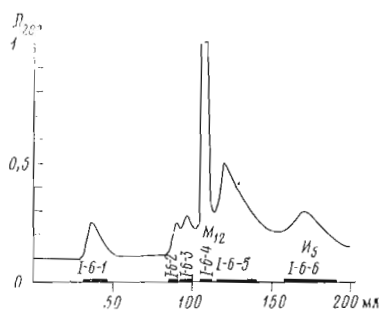


Рис. 4

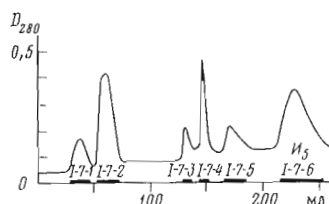


Рис. 5

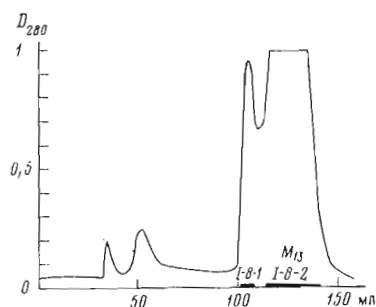


Рис. 6

- Рис. 2. Гель-фильтрация фракции I-5 (см. рис. 1) на биогеле Р-10 в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 7,8); две последовательно соединенные колонки (1×90 см), скорость 3 мл/ч, объем фракций 1,5 мл
- Рис. 3. Разделение фракции I-5-2 (см. рис. 2) на катионите бюрекс 70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 7); колонка 1×8 см, скорость 10,4 мл/ч, объем фракций 3,5 мл
- Рис. 4. Гель-фильтрация фракции I-6 (см. рис. 1) на биогеле Р-10. Условия см. подпись к рис. 2
- Рис. 5. Гель-фильтрация фракции I-7 (см. рис. 1) на биогеле Р-10. Условия см. подпись к рис. 2; скорость 1,7 мл/ч, объем фракций 1,7 мл
- Рис. 6. Гель-фильтрация фракции I-8 на биогеле Р-10. Условия см. подпись к рис. 2; скорость 2,2 мл/ч, объем фракций 1,1 мл

ческого гидролизата были идентифицированы метионин, СМ-цистеин, аспарагиновая кислота, лизин. Выделение триптических пептидов осуществлялось методом пептидных карт (рис. 7). При анализе пептидного материала было обнаружено, что в зонах 1, 2, 4, 6 содержатся соответственно триптические пептиды Т-1, Т-5, Т-2 и Т-2+Т-3. В зоне 5 найден пептид Т-3 в количестве, недостаточном для анализа, а зона 3 не содержала пептидного материала. Таким образом, из триптического гидролизата выделено 4 фрагмента, содержащих в общей сложности 34 аминокислотных остатка (табл. 3). Определение структуры этих пептидов было проведено с использованием деградации по методу Эдмана и идентификацией аминокислотных остатков в виде Dns-производных [7, 8], при этом одновременно идентифицировали амиды дикарбоновых аминокислот или сами аминокислоты в виде Pth-производных [9]. Кроме того, при опреде-

**Аминокислотный состав токсинов яда кавказского  
подвида скорпиона *B. eurus***

Аминокислота	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>	M <sub>13</sub>	H <sub>5</sub>
Asp	8	9	10	5
Thr	1			2
Ser	1	2	1	
Glu	5	5	4	1
Pro	3	3	3	3
Gly	5	9	8	4
Ala	8	7	7	1
1/2Cys	8	8	8	8
Val	2	4	3	
Met				3
Ile	4	3	2	
Leu	3	1	1	1
Tyr	4	4	5	
Phe		1	1	2
His	2			
Lys	3	6	7	3
Arg	2	3	2	2
Trp	2	2	3	
Всего	61	67	65	35
N-Концевая	Ala	Val	Val	Met

Таблица 3

**Аминокислотный состав CM-токсина H<sub>5</sub> и его триптических пептидов**

Аминокислота	H <sub>5</sub>	T-1	T-2	T-2+T-3	T-5
Cys (Cm)	7,10(8)	1,53(2)	0,98(1)	2,43(3)	2,49(3)
Asp	5,20(5)	2,95(3)		0,85(1)	1,19(1)
Thr	2,06(2)	1,70(2)			
Glu	1,15(1)				1,13(1)
Pro	2,62(3)	1,82(2)			1,06(1)
Gly	3,96(4)			2,93(3)	1,23(1)
Ala	1,04(1)	1,15(1)			
Met	2,13(3)	2,30(3)			
Leu	1,05(1)				1,15(1)
Phe	2,02(2)	0,90(1)			1,17(1)
Lys	2,93(3)	1,03(1)		0,70(1)	
Arg	1,63(2)		1,10(1)	0,65(1)	1,12(1)
N-Концевая	Met	Met	Cys(Cm)	Cys(Cm)	Cys(Cm)
Всего	35	15	2	9	10
Выход, %		45	23	30	42

Таблица 4

**Аминокислотная последовательность триптических пептидов CM-токсина H<sub>5</sub>**

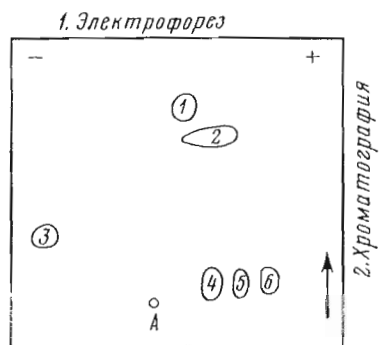
Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	<u>Met-Cys(Cm)-Met-Pro-Cys(Cm)-Phe-Thr-Thr-Asp-Pro-Asn-Met-Ala-Asn-Lys</u>
T-2	<u>Cys(Cm)-Arg</u>
T-2+T-3	<u>Cys(Cm)-Arg-Asp-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Gly-Gly-(Gly, Lys)</u>
T-5	<u>Cys(Cm)-Phe-Gly-Pro-Gln-Cys(Cm)-Leu-Cys(Cm)-(Asx, Arg)</u>

*Примечание:* → — стадии деградации по Эдману, ← — ступенно карбоксипептидазами А и В.

лении С-концевой последовательности пептидов использовали карбоксипептидазы А и В.

Таким образом, методом Эдмана была установлена полная аминокислотная последовательность пептида Т-2 и частичная — пептидов Т-1, Т-2+Т-3 и Т-5 (табл. 4). Для установления полной структуры пептида Т-1 проводился дополнительный анализ с помощью карбоксипептидаз А и В. При этом за 3 ч отщепились лизин (27,3%), аспарагин (26,5%), аланин (21,2%) и метионин (19,2%) (табл. 4). Пептид Т-1, по-видимому, является N-концевым, так как имеет общую с токсином И<sub>5</sub> N-концевую ами-

Рис. 7. Пептидная карта триптического гидролизата СМ-инсектотоксина И<sub>5</sub>. А — точка нанесения; электрофорез: пиридин-ацетатный буфер (рН 6,5), 40 В/см, 1 ч; хроматография в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12



нокислотную последовательность Met-Cys- (установлена на СМ-токсине И<sub>5</sub> методом Эдмана).

Для реконструкции молекулы токсина И<sub>5</sub> было предпринято термолитическое расщепление СМ-токсина. В термолитическом гидролизате найдены следующие N-концевые аминокислоты: метионин, фенилаланин, аланин, лейцин. При анализе гидролизата методом пептидных карт было обнаружено 6 пептидных зон. Выделение термолитических пептидов осуществлялось с помощью электрофореза на целлюлозе при рН 6,5. В результате получены 4 пептидные зоны, в двух из которых содержались индивидуальные пептиды Th-1 и Th-5. Третья зона содержала смесь пептидов Th-2 и Th-4, которая в дальнейшем анализировалась без разделения. При очистке с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе из четвертой зоны были выделены свободный метионин и пептид Th-3. Наличие метионина в гидролизате свидетельствует о том, что при термолитическом расщеплении произошел частичный разрыв N-концевой связи метионина-12.

Таким образом, в термолитическом гидролизате СМ-токсина было идентифицировано 5 пептидов, содержащих в общей сложности 35 аминокислотных остатков (табл. 5). Методом Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот и определением амидов дикарбоновых аминокислот в виде фенилтиогидантоинов была установлена структура пептидов Th-1 и Th-5 (табл. 6).

Следует отметить, что обработка карбоксипептидазами А, В, У СМ-токсина и термолитического фрагмента Th-5 не приводила к отщеплению С-концевого аминокислотного остатка. При определении структуры пептида Th-5 было найдено, что дансильрование без последующего кислотного гидролиза остатка аргинина после трех циклов деградации по Эдману приводит к образованию производного аргинина, идентичного по хроматографической подвижности предварительно синтезированному стандарту дансильрованного амида аргинина [10]. Этот результат указывает на то, что С-концевым аминокислотным остатком пептида Th-5 так же, как и СМ-токсина И<sub>5</sub>, является амид аргинина. В пользу этого предположения свидетельствует также факт непригодности карбоксипептидаз А, В, У для анализа С-концевого аминокислотного остатка.

Смесь пептидов Th-2 и Th-4 анализировалась методом Эдмана без разделения с использованием данных по известной аминокислотной последовательности пептида Th-2, входящего в состав триптического пептида Т-1 (табл. 4, 6); при этом была установлена структура пептида Th-4 (табл. 6).

Таблица 5

Аминокислотный состав термолитических пептидов СМ-токсина И<sub>5</sub>

Аминокислота	Th-1	Th-2+Th-4	Th-3	Th-5
Cys (Cm)	1,48 (2)	0,65 (1)	3,25 (4)	0,72 (1)
Asp		2,21 (2)	2,12 (2)	1,05 (1)
Thr		1,81 (2)		
Glu		1,08 (1)		
Pro	0,93 (1)	2,02 (2)		
Gly		1,30 (1)	3,21 (3)	
Ala			1,08 (1)	
Met	1,61 (2)	0,74 (1)		
Leu				0,95 (1)
Phe		1,92 (2)		
Lys			2,93 (3)	
Arg			1,03 (1)	0,96 (1)
N-Концевая	Met	Phe	Ala	Leu
Всего	5	12	14	4
Выход, %	56	50	35	60

Таблица 6

Аминокислотная последовательность термолитических пептидов СМ-токсина И<sub>5</sub>

Пептид	Аминокислотная последовательность
Th-1	<u>Met-Cys (Cm)-Met-Pro-Cys (Cm)</u>
Th-2	<u>Phe-Thr-Thr-Asp-Pro-Asn-Met</u>
Th-4	<u>Phe-Gly-Pro-Gln-Cys (Cm)</u>
Th-3	<u>Ala-Asn-Lys-Cys (Cm)-Arg-Asp-Cys (Cm)-Cys (Cm)-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-</u> <u>- Cys (Cm)</u>
Th-5	<u>Leu-Cys (Cm)-Asn-Arg-NH<sub>2</sub></u>

Примечание. → — стадии деградации по Эдману; ← — отщеплено карбоксипептидазами А и У.

Таблица 7

## Определение аминокислотной последовательности термолитического пептида Th-3 по результатам метода Эдмана

Данные	Стадии деградации								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Постадийная деградация смеси термолитических фрагментов пептида Th-3	Ala Cys (Cm) Asp Lys Cys (Cm)	Asn Arg Cys (Cm)	Lys Asp Cys (Cm)	Cys (Cm) Gly	Cys (Cm) Gly	Gly Gly	Gly Lys	Gly	Lys
Частичная аминокислотная последовательность пептида T-2+T-3 (см. табл. 4)	Cys (Cm)	Arg	Asp	Cys (Cm)	Cys (Cm)	Gly	Gly		

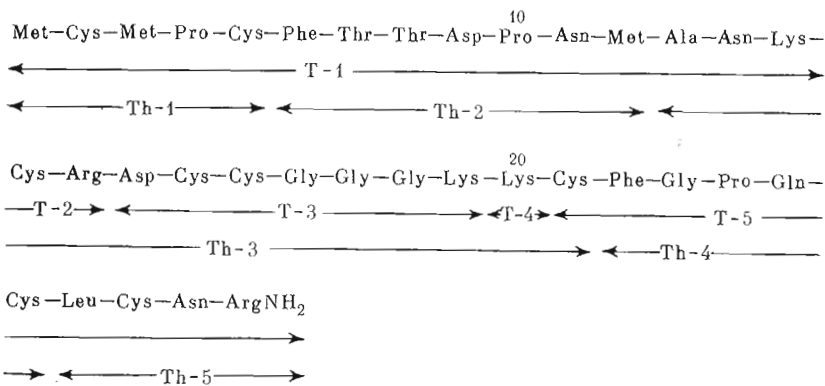


Рис. 8. Полная аминокислотная последовательность инсектотоксина И<sub>5</sub> из яда кавказского подвида скорпиона *B. eupeus*

Данные по структуре триптического пептида Т-5 позволили соединить между собой термолитические фрагменты Th-4 и Th-5. Таким образом была реконструирована С-концевая часть молекулы токсина И<sub>5</sub>.

При определении структуры пептида Th-3 методом Эдмана удалось установить последовательность лишь двух аминокислотных остатков Ala-Asn-, так как при этом, по-видимому, происходила циклизация остатка аспарагина. Карбоксипептидаза Y отщепляла от пептида Th-3 за 16 ч цистеин (25,5%) и лизин (34,5%), а карбоксипептидаза А за 3 ч — цистеин (37%). Исчерпывающий триптический гидролиз пептида Th-3 привел к образованию смеси 3 пептидов, свободных лизина и СМ-цистеина. Анализ смеси триптических пептидов методом Эдмана без разделения с использованием данных по частичной структуре пептида Т-2+Т-3 (табл. 4), а также результатов аминокислотного анализа позволил установить аминокислотную последовательность термолитического пептида Th-3 (табл. 6, 7). В состав этого фрагмента входят триптические пептиды Т-2, Т-3, свободный лизин (Т-4), а также С-концевая часть пептида Т-1 (Ala-Asn-Lys-) и N-концевой остаток цистеина пептида Т-5.

Таблица 8

**Аминокислотные последовательности инсектотоксинов короткого типа из яда скорпионов**

Инсекто-токсин	Последовательность	Лите-ратура
<i>Be</i> И <sub>1</sub>	MCMPCF <sup>1</sup> TTRP DMA Q QCRACCKGRGKCFG <sup>2</sup> PQCLCGID	[5]
<i>Be</i> И <sub>5</sub>	MCMPCF <sup>1</sup> T <sup>2</sup> TDP NMA NKCRDCCGGGK <sup>3</sup> KCFG <sup>2</sup> PQCLCNR*	[1]
<i>Amn</i> P2	CGPCF <sup>1</sup> T <sup>2</sup> TDP YTE SKCATCCGGRGKCVG <sup>2</sup> PQCLCNR <sup>1</sup>	[1]
<i>Be</i> И <sub>4</sub>	MCMPCF <sup>1</sup> T <sup>2</sup> TBB—RA—K	[11]

\* R — остаток аргинина амидирован.

При исследовании триптических фрагментов пептида Th-3 была определена полная структура пептида Т-3, позволившая установить наличие последовательности Lys-Lys. Поскольку карбоксипептидаза А отщепляет от термолитического пептида Th-3 только остаток цистеина (37%), а карбоксипептидаза Y — лизин (34,5%) и цистеин (25,5%), есть все основания предполагать, что С-концевая последовательность этого пептида -Lys-Lys-Cys(Cm). Таким образом, пептид Th-3 является перекрывающим для всех триптических пептидов и данные о его структуре позволили реконструировать полную аминокислотную последовательность токсина И<sub>5</sub> (рис. 8).

Инсектотоксин И<sub>5</sub> состоит из 35 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Для его молекулы ха-

рактерно полное отсутствие остатков серина, валина, изолейцина, тирозина, гистидина и триптофана. Он является структурным гомологом инсектотоксина  $I_1$  из яда среднеазиатского подвида скорпиона *V. eurus* [5] и токсина *Amm P2* из яда африканского скорпиона на *Androctonus mauretanicus mauretanicus* [1] (табл. 8). Действительно, при сравнении структуры инсектотоксинов  $I_1$  и  $I_5$  можно выделить более 70% инвариантных остатков. То же характерно и для пары *Amm P2* и  $I_5$  — более 65% инвариантных остатков. В целом для всех этих токсинов характерно наличие около 50% инвариантных остатков. Важным обстоятельством является одинаковое число аминокислотных остатков между дисульфидными мостиками инсектотоксинов. При сравнении N-концевой аминокислотной последовательности инсектотоксина  $I_5$  [11] со структурами известных инсектотоксинов короткого типа нетрудно заметить, что  $I_5$  также обладает гомологичной структурой. Так, N-концевая аминокислотная последовательность его первых восьми остатков абсолютно совпадает с N-концевой последовательностью инсектотоксинов  $I_1$  и  $I_5$ . Высокая степень структурной гомологии дает основания предполагать принципиально одинаковый механизм действия инсектотоксинов короткого типа.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ТРСК-трипсин, карбоксинептидазы А и В (Worthington, США), термолизин и карбоксинептидазу Y (Boehringer, ФРГ). Для хроматографии применяли ионообменный SP-сефадекс С-25, сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция), биогель Р-10, катионит биорекс 70 (Bio-Rad, США), целлюлозные пластинки (20×20 см) (Schleicher und Schüll, ФРГ).

Буферные растворы готовили с помощью рН-метра РИМ-63 (Radiometer, Дания).

**Выделение нейротоксинов.** Цельный яд кавказского подвида скорпиона *V. eurus* получали из Горьковского университета. 500 мг цельного яда *V. eurus* растворяли в 10 мл 0,01 М аммоний-ацетатного буфера (рН 5), центрифугировали 40 мин при 15 000 об/мин на центрифуге J-21В (Beckman, США). Осадок ресуспендировали в 10 мл того же буфера и повторно центрифугировали. В объединенный супернатант добавляли мочевины до 6 М концентрации, затем наносили его на колонку с SP-сефадексом С-25 (1,6×25 см). Разделение проводили в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере в градиенте NaCl с последующим градиентом рН (рис. 1). Объединенные фракции обессоливали на колонке с сефадексом G-10 (2,5×40 см) в 5% уксусной кислоте и лиофильно высушивали. Токсичные фракции подвергали гель-фильтрации на биогеле Р-10 (две последовательно соединенные колонки 1×90 см) в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8 (рис. 2, 4–6). Фракцию I-5-2 (рис. 2) дополнительно очищали на катионите биорекс 70 (рис. 3). Спектрофотометрический контроль за разделением проводили на приборе «Uvicord II» (ЛКВ, Швеция) при 280 нм.

Гомогенность полученных фракций контролировали с помощью диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле (рН 4,3) по методу Рейсфельда и сотр. [12].

Определение токсичности яда, фракций и индивидуальных токсинов проводили на тараканах [4] и внутривенной инъекцией белым мышам весом 20–25 г, LD<sub>50</sub> рассчитывали по методу Литчфильда и Уилкоксона [13].

**Определение аминокислотного состава токсинов.** 0,01–0,02 мкмоль токсина гидролизovali 24 ч в 0,5 мл 5,7 н. HCl в запаянных вакуумированных ампулах при 110°С. Аминокислотный анализ осуществляли на автоматическом анализаторе аминокислот D-500 (Duglum, США). Триптофан определяли на спектрофотометре «Gilford-240» (Франция) [4].

**Карбоксиметилирование инсектотоксина  $I_5$**  после восстановления β-меркаптоэтанолом осуществляли подуксусной кислотой по известной методике [14].

**Триптический гидролиз карбоксиметилированного инсектотоксина  $I_5$**  (100 нмоль) осуществляли в 200 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного бу-



фера (рН 8,3) в течение 4 ч при 37° С. Отношение фермент — субстрат составляло 1 : 100 (по весу). Полученный гидролизат упаривали на ротаторном испарителе и хранили при -10° С. Триптические пептиды разделяли методом пептидных карт на 10 целлюлозных пластинках. Сначала проводили электрофорез в течение 1 ч при напряжении 800 В в пиридин-ацетатном буфере (рН 6,5), а после высушивания — хроматографию в перпендикулярном направлении в течение 16,5 ч в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12. Пептидные зоны обнаруживали флуорескаминном [15] и экстрагировали 50% пиридином (рис. 7).

*Термолизический гидролиз СМ-токсина И<sub>5</sub>*. К раствору 100 нмоль СМ-инсектотоксина И<sub>5</sub> в 100 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) добавляли термолизин в соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Гидролиз вели 4 ч при 37° С и гидролизат упаривали. Термолизические пептиды разделяли с помощью электрофореза на целлюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 6,5; 50 мин, напряжение 800 В). Весь гидролизат наносили на пластинку зоной в 10 см. Пептиды обнаруживали и экстрагировали так же, как описано для триптических пептидов. Одну из зон, содержащую пептид Th-3, после ее выделения дополнительно разделяли хроматографией на пластинке с целлюлозой 16,5 ч в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10:15:3:12.

*Триптический гидролиз пептида Th-3*. 20 нмоль пептида Th-3 гидролизовали трипсином в 50 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) в течение 16 ч при 37° С и фермент-субстратном соотношении 1:50. Останавливали гидролиз упариванием до полного удаления соли.

*Определение аминокислотной последовательности*. Структуру пептидов устанавливали методом Эдмана по описанным ранее методикам [7, 8]. При этом в дансильном варианте использовали идентификацию амидов дикарбоновых кислот и самих кислот в виде Pth-производных по методу [9]. Смесь термолитических пептидов Th-2 и Th-4, а также триптический гидролизат пептида Th-3 анализировали методом Эдмана без разделения, используя данные по частичной аминокислотной последовательности [8].

С-концевую аминокислотную последовательность токсина и пептида Т-1 определяли при помощи карбоксипептидаз А и В при рН 8,3, а пептида Th-3 при рН 6 [16]. Для пептида Th-3 и токсина использовали также карбоксипептидазу Y [17]. Последующий анализ отщепленных аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе, а также идентификацией Dns-производных аминокислот.

Синтез амида аргинина проводили по известному методу [10].

Авторы выражают благодарность Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, а также В. П. Мальковой за определение биологической активности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rochat H., Bernard P., Couraud F. In: Adv. Cytopharmacol. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 325-334.
2. Beneski D. A., Catterall W. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 639-643.
3. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 6, с. 914-922.
4. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Алакузиев Б. У. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 450-461.
5. Жданова Л. Н., Адамович Т. В., Назимов И. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 4, с. 485-493.
6. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Солдатов Н. М., Костецкий П. В., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1285-1293.
7. Gray W. R. In: Methods in Enzymol. N. Y.—London: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 469-475.
8. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жигулина Е. Б., Виноградова Е. П. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410-413.
9. Алазов Ю. В., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301-1313.

10. Zervas L., Otani T. M., Winitz M., Greenstein J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 11, p. 2878-2884.
11. Grishin E. V. In: Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology. Oxford — N. Y.: Pergamon Press, 1980, p. 93-96.
12. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. Nature, 1962, v. 195, № 4838, p. 281-283.
13. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963, с. 81.
14. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
15. Mendes E., Lai C. Y. Anal. Biochem., 1975, v. 65, № 1-2, p. 281-292.
16. Ambler R. P. In: Methods in Enzymol. N. Y.— London: Acad. Press, 1972, v. XXVB, p. 143-154, 262-272.
17. Sterner R., Heinrikson R. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1975, v. 168, № 2, p. 693-703.

Поступила в редакцию  
18.IX.1984

## STUDY OF TOXIC COMPONENTS FROM THE VENOM OF CAUCASUS SUBSPECIES OF SCORPION *BUTHUS EUPEUS*

GRISHIN E. V., VOLKOVA T. M., SOLDATOVA L. N.

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

Three polypeptides toxic to mammals and one toxic to insects were isolated from the venom of the Caucasus subspecies of scorpion *Buthus eupeus*. All these toxins were shown to be homogeneous according to disc-electrophoresis and N-terminal group analyses. The amino acid composition of toxins M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub>, M<sub>13</sub> and I<sub>5</sub> was determined. Insectotoxin I<sub>5</sub> was digested by trypsin as well as by thermolysin, and its total amino acid sequence was established. Insectotoxin I<sub>5</sub> consists of 35 amino acid residues with four intramolecular disulfide bonds. The C-terminal arginine residue is shown to be amidated.