



УДК 543.993

ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ
ТОКСИНОВ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО СКОРПИОНА
BUTHUS EUPEUS

Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Таимухамедов Б. А.,*
Атакузиев Б. У.*

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

Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент *

Из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* выделено 12 различных токсинов, гомогенность которых доказана с помощью диск-электрофореза и анализа N-концевых аминокислотных остатков. Проведено изучение свойств токсинов, определены их молекулярные веса и аминокислотные составы. Показано наличие в яде скорпиона четырех инсектотоксинов и восьми токсинов для млекопитающих. Все выделенные токсины представляют собой основные полипептиды молекулярного веса 4000—8000, содержащие четыре внутримолекулярные дисульфидные связи. Установлено существование двух различных структурных типов инсектотоксинов.

В последнее время все большее число природных нейротоксинов успешно применяется в качестве инструментов изучения молекулярных механизмов передачи нервного импульса. При этом нейротоксины яда скорпионов вызывают особый интерес ввиду своей способности замедлять скорость инактивации натриевых каналов электровозбудимых мембран [1]. Вместе с тем токсические компоненты яда скорпионов обладают уникальной видовой специфичностью, проявляющейся в том, что в яде одновременно присутствуют токсины, активные по отношению только к одному из классов животных: токсины для млекопитающих, токсины для насекомых и токсины для ракообразных [2]. Естественно, что в связи с этим изучение таких токсинов может не только способствовать исследованию их нервных и мышечных рецепторов, но и внести существенный вклад в сравнительную молекулярную физиологию разных классов животных.

Несмотря на то что в настоящее время накоплена обширная информация о физиологических аспектах действия яда скорпионов, лишь незначительное число работ было направлено на выделение и исследование индивидуальных нейротоксинов [3—5]. В то же время для физиологических и биохимических целей наиболее целесообразно использовать именно гомогенные токсины, а не цельный яд. Поэтому данная работа посвящена выделению и изучению некоторых свойств нейротоксинов из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus*.

Цельный яд скорпиона *Buthus eupeus* получали в лаборатории биофизики Института биохимии АН УзССР электрической стимуляцией жалящих тельсонов. Полученный таким образом препарат яда экстрагировали дистиллированной водой, экстракт освобождали от нерастворимых компонен-

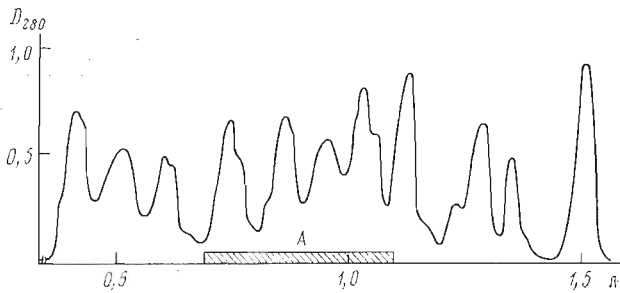


Рис. 1. Гель-фильтрация 200 мг яда скорпиона *Buthus eupeus* на биогеле Р-40 в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,2); три последовательно соединенные колонки (2,5 × 100 см), скорость 30 мл/ч, объем фракций 10 мл. Заштрихованная зона обозначает объединенную токсичную фракцию А!

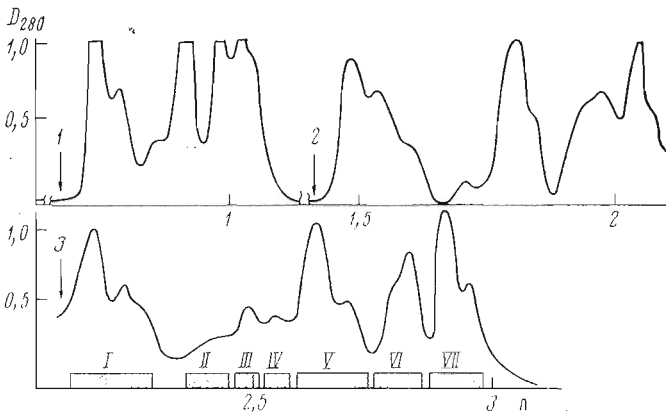


Рис. 2. Гель-фильтрация с рециклизацией 728 мг фракции А на биогеле Р-10 в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,2); три последовательно соединенные колонки (2,5 × 100 см), скорость 25 мл/ч. Вертикальные стрелки обозначают начало нового цикла, а заштрихованные зоны — объединенные фракции. Объем фракций 10 мл

тов центрифугированием и лиофильно высушивали. Сухой яд хранился до использования при -4° в течение нескольких месяцев без заметной потери активности.

Яд скорпиона *Buthus eupeus* представляет собой сложную смесь различных компонентов. Так, электрофорез в 15% полиакриламидном геле позволил обнаружить минимум 15 доминирующих белковых полос, а при электрофорезе в широком интервале рН (от 3,5 до 9,5) было найдено более 22 различных белковых компонентов.

Согласно нашим наблюдениям, состав яда, а также величины летальных доз существенно менялись в зависимости от ареала обитания скорпионов и сезона сбора яда. В яде скорпиона *Buthus eupeus* не удалось обнаружить наличие фосфолипазной, гемолитической и протеолитической активностей, хотя подобные активности были найдены в яде ряда других видов скорпионов [6, 7].

Необходимо отметить, что в состав цельного яда скорпиона входит большая масса труднорастворимых нетоксичных компонентов мукопротеидной природы, которые существенно затрудняли процесс разделения. Поэтому первоначально цельный яд растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды, перастворимую желеобразную массу мукопротеидов отделяли центрифугированием и супернатант лиофильно высушивали. Частично очищенный таким образом яд подвергали хроматографии, причем на всех этапах разделения использовали только летучие солевые буферные

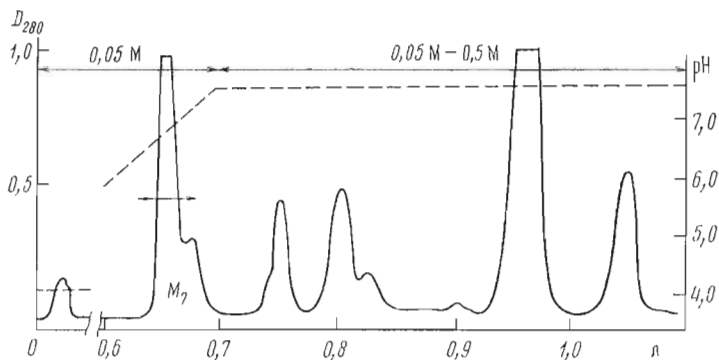


Рис. 3. Хроматография фракции I на CM-целлюлозе SM-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка $1,5 \times 20$ см, скорость 25 мл/ч, объем фракций 8,3 мл. Здесь и далее пунктир означает изменение pH

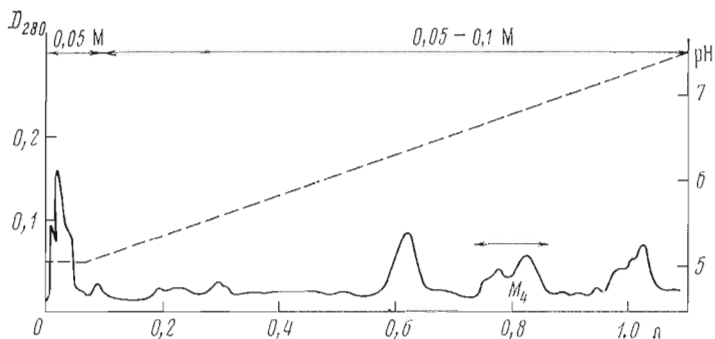


Рис. 4. Хроматография фракции II на CM-целлюлозе SM-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка $1,5 \times 20$ см, скорость 40 мл/ч, объем фракций 10 мл

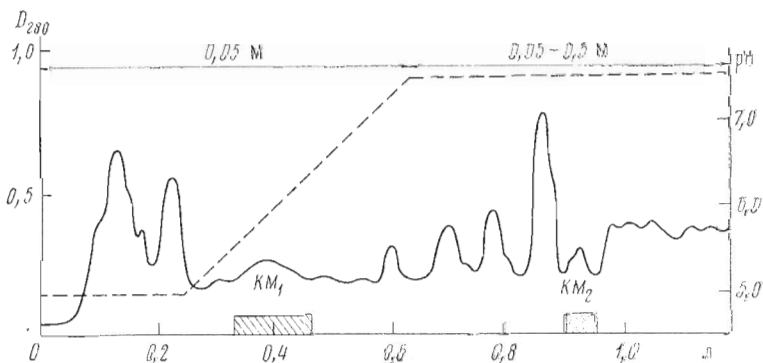


Рис. 5. Хроматография фракции III на CM-целлюлозе SM-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка $1,5 \times 20$ см, скорость 26 мл/ч, объем фракций 13 мл. KM_1 и KM_2 — объединенные токсичные фракции

Рис. 6. Хроматография фракции KM_1 на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5), колонка 1×100 см, скорость 6 мл/ч, объем фракций 12 мл

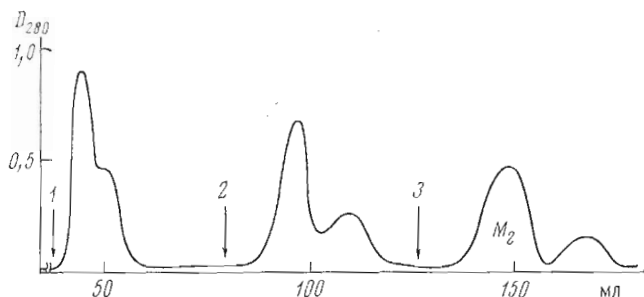
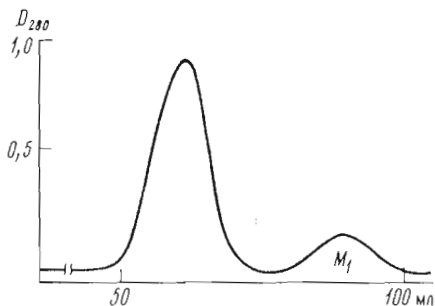


Рис. 7. Хроматография с рециклизацией фракции KM_2 на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5), колонка 1×100 см, скорость 6 мл/ч, объем фракций 10 мл. Вертикальные стрелки указывают начало нового цикла

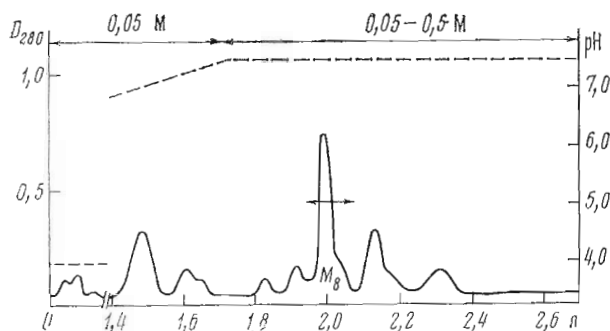


Рис. 8. Хроматография фракции IV на CM-целлюлозе CM-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка $1,5 \times 20$ см, скорость 50 мл/ч, объем фракций 15 мл

растворы, так как в предварительных экспериментах было найдено, что стадия обессоливания значительно снижает выход токсинов.

Токсическое действие цельного яда и полученных фракций определялось при внутривенной инъекции их растворов белым мышам или введением в брюшко под третий сегмент тараканам *Nauphoeta cinerea*. Для мышей результат выражался в единицах LD_{50} ; при тестировании на насекомых обычно проводили оценку D_{100} — дозы, вызывающей устойчивый паралич у 100% особей. Так, исходный яд проявлял паралитическую активность в дозе 25 мкг на таракана; для достижения летального исхода обычно требовались значительно более высокие дозы.

Первичное фракционирование яда проводили на биогеле Р-10 (рис. 1), используя небольшие порции яда (100—200 мг), так как увеличение коли-

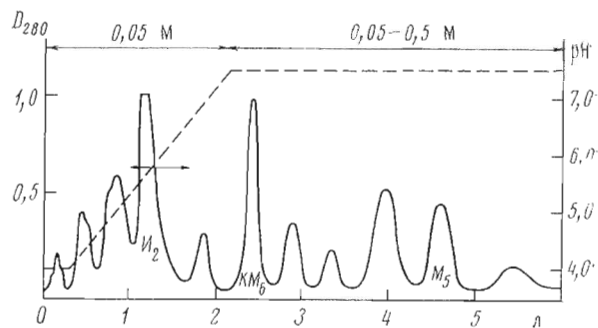


Рис. 9. Хроматография фракции V на CM-целлюлозе SM-32 в градиенте-аммоний-ацетатного буфера; колонка $1,5 \times 20$ см, скорость 80 мл/ч, объем фракций 20 мл. KM_6 — объединенная токсичная фракция

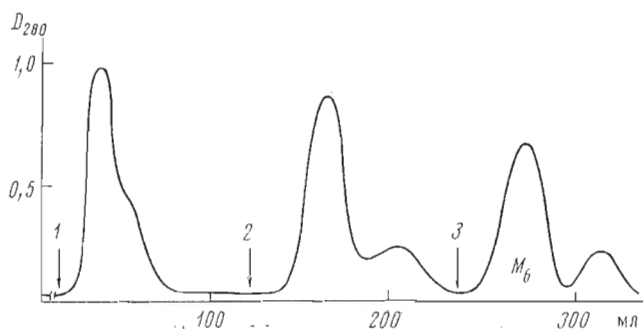


Рис. 10. Хроматография с рециклизацией фракции KM_6 на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (pH 8,5), колонка 1×100 см, скорость 6,7 мл/ч, объем фракций 13,4 мл. Вертикальные стрелки указывают начало нового цикла

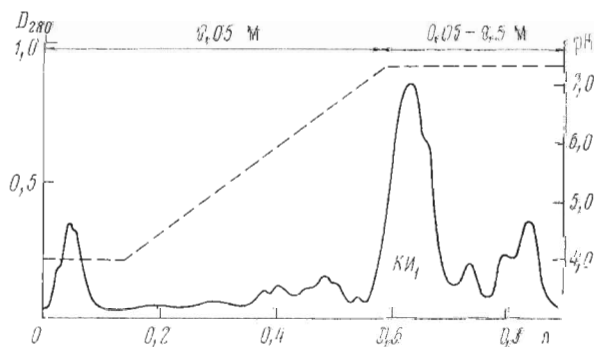


Рис. 11. Хроматография фракции VI на CM-целлюлозе SM-32 в градиенте-аммоний-ацетатного буфера; колонка 1×10 см, скорость 50 мл/ч, объем фракций 25 мл. KI_1 — фракция, токсичная для насекомых

Рис. 12. Хроматография с рециклизацией фракции KI_1 на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5), колонка 1×100 см, скорость 4,6 мл/ч, объем фракции 9,2 мл. Вертикальные стрелки указывают начало нового цикла

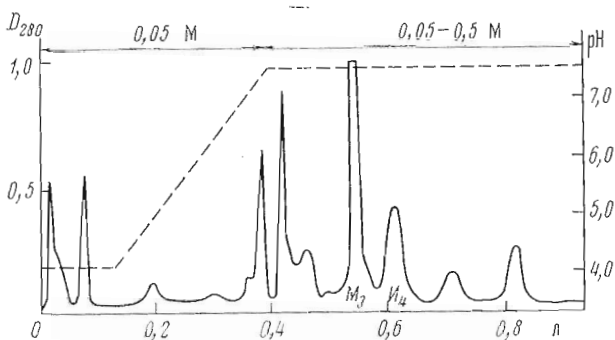
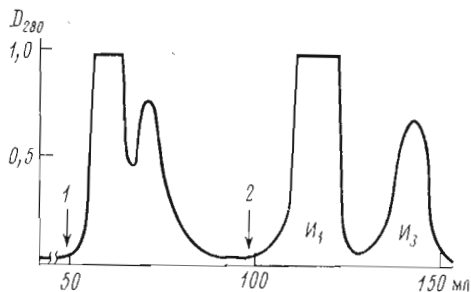


Рис. 13. Хроматография фракции VII на СМ-целлюлозе СМ-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка 1×10 см, скорость 46 мл/ч, объем фракций 13 мл

чества разделяемого материала либо в значительной мере повышало объем наносимого образца, либо настолько увеличивало вязкость раствора яда, что элюирование становилось невозможным.

Согласно результатам тестирования, фракция А (рис. 1) содержала в себе практически всю активность цельного яда как для млекопитающих, так и для насекомых. Объединенная после разделения 1,892 г цельного яда фракция А (выход 38,5%) была далее подвергнута гель-фильтрации с рециклизацией на трех последовательно соединенных колонках ($2,5 \times 100$ см) с биогелем Р-10 (рис. 2). Удовлетворительное разделение имело место уже на третьем цикле. По данным диск-электрофореза и результатам определения токсичности, оказалось целесообразным разделить весь элюат на семь различных фракций, из которых фракции V, VI и VII обладали свойством вызывать паралич у насекомых. Кроме того, все фракции, кроме шестой, были токсичны по отношению к мышам.

Дальнейшее разделение и очистка токсинов осуществлялась по единой схеме с использованием ионообменной хроматографии. Первоначально проводилось фракционирование на СМ-целлюлозе СМ-32 в градиенте рН и молярности аммоний-ацетатного буфера. В ряде случаев этот этап оказался достаточным для выделения индивидуальных токсинов. Так, токсины M_3 , M_4 , M_5 , M_7 , M_8 , I_2 и I_4 были получены в гомогенном состоянии при разделении соответствующих фракций на СМ-целлюлозе (рис. 3, 4, 8, 9, 13) (M — токсины для млекопитающих; I — инсектотоксины). Очистку остальных токсинов проводили хроматографией фракций, полученных на СМ-целлюлозе, на DEAE-сефадексе А-50 (рис. 5—7, 10—12). Таким образом, из яда скорпиона *Buthus eupeus* было выделено в общей сложности 12 различных токсинов.

Все токсины были получены с довольно низкими выходами, и их активность по отношению к млекопитающим и насекомым была ниже общей активности яда скорпиона (табл. 1). Это можно, вероятно, объяснить двумя обстоятельствами. Во-первых, в цельном яде присутствуют другие



Рис. 14. Определение молекулярного веса дансильных производных токсинов скорпиона *Buthus eupeus* методом диск-электрофореза (условия см. «Экспер. часть»)

на насекомых, что подтверждает ранее установленные данные о видовой специфичности действия токсинов яда скорпионов [2]. С другой стороны, выделенные инсектотоксины не обладали паралитической активностью по отношению к мышам в дозах вплоть до 7,5 мг/кг (LD_{50} цельного яда составляет 3 мг/кг веса мышей). Все токсины для млекопитающих, за исключением M_3 , при внутривенном введении вызвали паралич конечностей животных, т. е. являлись нейротоксинами. Однако при инъекции M_3 у испытуемых животных начиналось обильное слюноотделение, рвота и слезотечение, что на фоне отсутствия признаков паралича позволяет предположить принципиально иной механизм действия этого токсина.

Для определения молекулярного веса токсинов применялся метод, основанный на диск-электрофорезе их дансильных производных в присутствии мочевины и додецилсульфата натрия. Для построения калибровочной кривой использовались белки и полипептиды известного молекулярного веса (рис. 14). Было установлено, что молекулярные веса всех токсинов для млекопитающих, а также I_2 , находятся в диапазоне 7000—8000, в то время как I_1 , I_3 и I_4 имеют молекулярный вес ~ 4000 .

Гомогенность всех выделенных токсинов была доказана диск-электрофорезом и анализом N-концевых аминокислотных остатков. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с данными аминокислотного анализа, так как отсутствие одной или нескольких аминокислот в исследуемом белке является убедительным критерием гомогенности.

токсические компоненты, так как в процессе выделения было получено большое число различных токсических фракций в количествах, явно недостаточных для анализа. Во-вторых, выделенные токсины получены, естественно, не со 100% выходом, поскольку они представляют собой склонные к агрегации, сильно заряженные полипептиды. В связи с этим возможна значительная потеря токсических компонентов на каждой стадии разделения. Не исключено также, что существует синергизм действия токсинов или происходит их частичная инактивация в процессе выделения.

Как видно из табл. 1, активность индивидуальных токсинов во много раз превышает токсичность цельного яда скорпиона. Следует отметить, что компоненты, токсичные для млекопитающих, не оказывали никакого действия

Таблица 1

Выход и летальные дозы токсинов яда скорпиона *Buthus eupeus*

Образец	LD_{50} , мг/кг (мышь)	D_{100} , мг/гара-вана	Выход, %	Образец	LD_{50} , мг/кг (мышь)	D_{100} , мг/гара-вана	Выход, %
Цельный яд	3000	25	100	M_3	1000	—	1,21
I_1	—	3	2,06	M_4	750	—	0,10
I_2	—	1	0,58	M_5	100	—	0,54
I_3	—	3	0,57	M_6	200	—	0,20
I_4	—	5	0,35	M_7	250	—	0,77
M_1	150	—	0,11	M_8	300	—	0,51
M_2	600	—	0,14				

Аминокислотный состав токсинов яда скорпиона *Buthus eupeus*

Аминокис- лота	I_1	I_2	I_3	I_4	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6	M_7	M_8
Asp	2	11	3	5	11	10	9	10	11	9	13	10
Thr	2	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	1
Ser		6			4	3	3	3	3	3	4	3
Glu	3	1	2	1	6	4	5	6	4	2	4	3
Pro	3	2	1	2	6	3	4	5	6	3	4	5
Gly	4	7	5	4	6	5	6	6	8	6	9	7
Ala	2	2	1	1	7	4	5	5	6	4	6	6
$\frac{1}{2}$ -Cys	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Val		1			2		3	2	2	3	1	1
Met	3		2	3								
He		3			4	2	2	3	4	4	2	2
Leu	1	3	1	1	3	2	1	2	2	3	2	2
Tyr	1	4	1		4	3	6	4	5	4	4	4
Phe	2	1	2	2			1	1		2	2	
His			1	1	2	3		4	2	2	2	2
Lys	2	8	1	3	5	5	8	5	9	5	3	5
Arg	3		5	2	2	3	2	2	2	2	2	2
Trp		3			3	3	4	2	4	2	5	3
Всего	36	62	36	35	75	60	68	70	78	64	73	64
N-концевая	Met	Ala	Met	Met	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala

Как следует из табл. 2, в яде скорпиона *Buthus eupeus* содержится две группы токсинов. Токсины первой группы, состоящие из 60—75 аминокислотных остатков, включают все нейротоксины для теплокровных, а также инсектотоксин I_2 . Для этих полипептидов характерно наличие большого числа остатков аспарагиновой кислоты и полное отсутствие остатков метионина. По своему аминокислотному составу они сходны с выделенными ранее токсинами из яда скорпиона *Androctonus australis* Hector [5] и *Centruroides sculpturatus* [4, 8]. Вместе с тем в яде среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* присутствует группа инсектотоксинов, состоящих только из 35—36 аминокислотных остатков. Обращает на себя внимание факт наличия в их составе остатков метионина, что нехарактерно для всех изученных токсинов яда скорпионов. Среди прочих существенных отличий можно отметить отсутствие в «коротких» инсектотоксинах остатков триптофана, изолейцина, валина и серина, а также крайне малое содержание остатков тирозина. Уже на основании этих данных можно сделать вывод о присутствии в яде скорпиона *Buthus eupeus* нового, до сих пор неизвестного типа токсинов. Действительно, все ранее изученные токсические компоненты яда скорпионов можно отнести к одному структурному типу. Токсины этого типа состоят из 60—75 аминокислотных остатков, соединенных четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Несмотря на некоторую разницу в аминокислотном составе, все они обязательно содержат остатки триптофана, не имеют в своем составе метионина и обладают заметной структурной аналогией, которая прежде всего заключается в инвариантном расположении остатков цистеина, триптофана и тирозина [9], причем I_2 и инсектотоксин из яда *Androctonus australis* также относятся к этому структурному типу, хотя и обладают существенными особенностями в построении полипептидных цепей [10]. С другой стороны, три «коротких» инсектотоксина явно отличаются по размеру молекулы и по аминокислотному составу как от токсинов для млекопитающих, так и от инсектотоксинов «длинного» типа [11].

Это обстоятельство позволяет сделать вывод о наличии в яде скорпиона двух различных структурных типов инсектотоксинов. Следует отметить, что инсектотоксины «короткого» типа также имеют четыре внутримолеку-

лярные дисульфидные связи [11]. По-видимому, присутствие четырех дисульфидных связей является фундаментальным структурным принципом токсинов скорпионов. Они были найдены во всех изученных к настоящему времени токсических компонентах яда этих животных.

Экспериментальная часть

Яд среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* получали в Институте биохимии АН УзССР электростимуляцией жалящих тельсонов скорпионов (9 В, 30 Вт, 1 с) тремя импульсами; выделяющийся яд собирали, лиофильно сушили и хранили при -4° .

Определение токсичности яда и фракций для млекопитающих проводили внутривенной инъекцией белым мышам весом ~ 20 г, причем для растворения токсичного материала использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (Serva, ФРГ) в физиологическом растворе. Для каждой дозы использовали группы из трех животных и полученный результат выражали в мкг вещества, вызывающего летальный эффект у 50% животных в пересчете на 1 кг веса мышей (LD_{50} , мкг/кг). Определение паралитической активности яда и фракций к насекомым проводили на тараканах *Nauphoeta cinerea* (Oliver) весом ~ 500 мг. Для этого после предварительной анестезии насекомых углекислым газом осуществляли инъекции водных растворов тестируемого материала объемом до 10 мкл под третий сегмент брюшка. Количество вещества, вызывающее длительный устойчивый паралич у 100% тараканов, принимали за D_{100} и выражали в мкг на таракана.

Диск-электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле (рН 4,3), в буферной системе β -аланин — уксусная кислота (рН 4,5) по методу Рейсфилда [12] на приборах «Reanal» (ВНР) и GE-4 (Pharmacia, Швеция). Процесс проводили 130—140 мин, причем первые 10 мин ток составлял 3 мА/гель, а затем 7 мА/гель. Рабочее напряжение равнялось ~ 80 В, а направление фореа — от анода к катоду. Гели окрашивали амидочерным 10В (Reanal, ВНР) с последующим обесцвечиванием в 10% уксусной кислоте в течение 24 ч.

Для электрофокусирования цельного яда использовали стандартные полиакриламидные пластишки с градиентом амфолинов в интервале рН от 3,5 до 9,5 (ЛКВ, Швеция). Электрофокусирование проводили согласно методике Карлссона [13] на приборе «Multifor» ЛКБ 2117 (ЛКВ, Швеция).

Разделение яда. Для отделения мукопротеинов проводили центрифугирование яда порциями по 0,1—0,3 г в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8,2 (5 мл), на центрифуге L5-50 (Beckman, США) при 50 000 г (1 ч, 2°); объединенный супернатант высушивали и хранили при -4° .

Для разделения яда применяли биогель Р-10 (Bio-Rad, США), карбоксиметилцеллюлозу СМ-32 (Whatman, Англия) и DEAE-сефадекс А-50 (Pharmacia, Швеция). Буферные растворы для элюирования готовили на основе бикарбоната аммония и ацетата аммония, причем требуемые значения рН устанавливали с помощью уксусной кислоты или концентрированного водного раствора аммиака (все реактивы марки х.ч.). Измерение рН проводили на РНМ-63 рН-метре (Radiometer, Дания). Для удаления буферных солей полученные при хроматографии фракции подвергали лиофильному высушиванию на приборе для лиофилизации 10-010 (Virtis, США). Элюирование белкового материала с колонок осуществляли с помощью перистальтических насосов 12000 Varioperpex и 2115 Multiperplex (ЛКВ, Швеция). Спектрофотометрический контроль за разделением проводили на приборе Uvicord II (ЛКВ, Швеция) при 280 нм.

Раствор 100—200 мг лиофильно высушенного после отделения мукопротеинов яда в 8 мл 0,05 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,2) пропускали через серию из трех хроматографических колонок ($2,5 \times 100$ см) с биогелем Р-10, уравновешенных в том же буфере при скорости элюирования 30 мл/ч (см. рис. 1).

728 мг лиофильно высушенной токсичной фракции А, соответствующей 1,892 г сухого яда, растворяли в 8 мл 0,05 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,2) и хроматографировали с рециклизацией при скорости 25 мл/ч на трех последовательно соединенных колонках (2,5 × 100 см) с биогеелем Р-10, уравновешенным в том же буферном растворе (см. рис. 2).

Токсичные фракции, полученные после гель-фильтрации с рециклизацией через биогель Р-10, подвергали разделению в градиенте аммоний-ацетатного буфера при скорости 25—80 мл/ч через колонку (1,5 × 20 или 1 × 10 см) с СМ-целлюлозой СМ-32, уравновешенной в 0,05 М NH₄OAc (рН 4,0—5,0). Первый градиент: 0,05 М NH₄OAc, от рН 4 или 5 до рН 7,5. Второй градиент: от 0,05 до 0,4 или 0,5 М NH₄OAc, рН 7,5 (см. рис. 3—5, 8, 9, 11, 13). На заключительном этапе хроматографии колонка промывалась 0,5 М раствором аммиака.

Токсичные фракции, полученные при хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32, подвергались хроматографии с рециклизацией при скорости 4,6—6,7 мл/ч через колонку (1 × 100 см) DEAE-сефадекса А-50, уравновешенного в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5). Обычно на третьем цикле достигалось удовлетворительное разделение компонентов (см. рис. 6, 7, 10 и 12).

Определение молекулярного веса токсинов проводили по методу Като, Сасаки и др. [14]. Для построения калибровочной кривой использовали следующие белки-маркеры: миоглобин, цитохром с (Serva, ФРГ), пейротоксины I и II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и мелиттин (все токсины получены в ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР). Для приготовления растворов и гелей применяли додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), акриламид и N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal, ВНР), дансилхлорид (Merck, ФРГ). Мочевину предварительно деионизовали на колонках с дауэксом 2 × 8 и 50 × 8 (Serva, ФРГ).

Определение аминокислотного состава токсинов. 0,01—0,02 мкмоль токсинов гидролизовали 24 ч в 0,5 мл 5,7 н. HCl в запаянных вакуумированных ампулах при 110°. Гидролизат упаривали и проводили серию параллельных аминокислотных анализов каждой пробы на автоматическом анализаторе аминокислот модели D-500 (Durrum, США).

Количественное определение остатков триптофана осуществляли на спектрофотометре «Gilford-240» (Gilford, Франция), снабженном кюветами QS-100. Величину поглощения (D) определяли в максимуме кривой поглощения (270—290 нм) раствора токсинов известной концентрации (C) в 10% уксусной кислоте. Число остатков триптофана находили по формуле

$$N_{\text{Трп}} = \left(\frac{D}{C} - N_{\text{Тир}} \cdot \epsilon_{\text{Тир}} \right) / \epsilon_{\text{Трп}},$$

где $N_{\text{Тир}}$ — число остатков тирозина, найденное при аминокислотном анализе; $\epsilon_{\text{Тир}}$ 1200 и $\epsilon_{\text{Трп}}$ 5579 — молярные коэффициенты экстинкций тирозина и триптофана соответственно [15].

Определение N-концевых аминокислотных остатков токсинов в виде их Dns-производных проводили по методу Грея [16]. Dns-производные аминокислот идентифицировали с помощью двумерной хроматографии по методике Б. Г. Беленького [17] на пластинках размером 6 × 6 см с закрепленным слоем силикагеля марки КСК (г. Салават).

Определение ферментативных активностей. Фосфолипазную активность определяли по методу Салаха и др. [18]. Реакционная среда содержала 1 мМ Трис(гидроксиэтил)аминометан (Sigma, США), 0,5% Триптона X-100 (Koch-Light, Англия), 0,03 М NaCl, 0,02 М CaCl₂, 0,7 мМ EDTA (все реактивы марки х.ч.). К 2 мл этого раствора (рН 7,8—8,4) добавляли 3 мг димиристоиллецитина (Koch-Light, Англия) в 75 мкл этанола, а затем вносили 0,1—1 мкг яда, растворенного в 5—10 мкл воды. рН измеряли при комнатной температуре в атмосфере азота.

Гемолитическую активность определяли методом Димика [19] с использованием цитратной крови человека (ЦНИИ гематологии и переливания крови Минздрава СССР). Субстрат с ядом инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Величину поглощения при 420 нм определяли на спектрофотометре «Spectord» (ГДР).

Для определения протеолитической активности [20] в серию пробирок помещали по 5 мл раствора бычьего сывороточного альбумина (Serva, ФРГ) (80 мл 2,5% раствора альбумина и 20 мл 0,3 М HCl) и инкубировали 5—10 мин при 35,5°. Затем добавляли по 1 мл водного раствора яда скорпиона (40—100 мкг/мл) с последующей инкубацией в течение 10 мин при той же температуре. В каждую пробирку добавляли по 10 мл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты и дополнительно инкубировали еще 5 мин. Содержимое каждой пробирки центрифугировали или фильтровали для удаления осадка и 5 мл супернатанта добавляли к 10 мл воды. Измерение поглощения при 280 нм против контрольного образца проводили на спектрофотометре «Gilford-240» и результат сравнивали с калибровочной кривой, полученной для пепсина (Worthington, США).

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, а также В. П. Мальковой и Л. А. Ореховой за участие в ряде экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hille B. (1970) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **21**, 1—32.
2. Zlotkin E. (1973) *Experientia*, **29**, 1453—1466.
3. Watt D. D., Babin D. R., Mlejnek R. V. (1974) *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 43—51.
4. Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M., Mlejnek R. V. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **164**, 694—706.
5. Miranda F., Kupeyan C., Rochat H., Rochat C., Lissitzky S. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **16**, 514—523.
6. Diniz C. R., Goncalves J. M. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **41**, 470—477.
7. Mohammed A. H., Kamel A., Ayobe M. H. (1969) *Toxicon*, **6**, 293.
8. McIntosh M. E., Watt D. D. (1973) in *Toxins of Animal and Plant Origin* (de Vries A., Kochva E., eds.), Vol. III, pp. 529—544, Gordon and Breach, N. Y.
9. Rochat H., Rochat C., Kupeyan C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P. (1970) *FEBS Lett.*, **10**, 349—351.
10. Солдатова Л. П. (1977) Канд. дис. «Структурная характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона *Buthus eupeus*». Ин-т биоорганической химии АН СССР, М.
11. Жданова Л. П., Адамович Т. Б., Назимов И. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорганическая химия*, **3**, 485—493.
12. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. (1962) *Nature*, **195**, 281—283.
13. Karlsson C. (1973) *LKB Application Note No 75*.
14. Kato T., Sasaki M., Kimura S. (1975) *Analyt. Biochem.*, **66**, 515—522.
15. Wetlaufer D. B. (1962) *Adv. Prot. Chem.*, **XVII**, 310.
16. Gray W. R. (1967) in *Methods in Enzymol.*, **XI**, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.—London.
17. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Пестеров В. В. (1967) *Докл. АН СССР*, **172**, 91—93.
18. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 331—339.
19. Dimick K. P. (1943) *J. Biol. Chem.*, **149**, 387—393.
20. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. (1950) *Кристаллические ферменты*. с. 296—309, Изд. иностранной литературы, М.

Поступила в редакцию
6.IX.1977

ISOLATION, PROPERTIES AND AMINO ACID COMPOSITION OF TOXINS
FROM THE VENOM OF MIDDLE-ASIAN SCORPION *BUTHUS EUPEUS*

GRISHIN E. V., SOLDATOV N. M., TASHMUKHAMEDOV B. A.,*
ATAKUZIEV B. U.*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent **

Eight polypeptides toxic to mammals and four to insects were isolated from the venom of the Middle-Asian scorpion *Buthus eupeus*. All these toxins were shown to be homogeneous according to disc-electrophoresis, N-terminal group analyses and amino acid composition. The polypeptides toxic to mice and one insectotoxin (I_2) were found to have mol. weight about 8000. Three other insectotoxins have mol. weight of 4000 and, hence, represent a new type of scorpion neurotoxins. All isolated toxins are basic polypeptides having 4 intramolecular disulfide bonds.
