



УДК 577.412.5:591.145.2-546

ТОКСИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО
СКОРПИОНА *ORTHOCHIRUS SCROBICULOSUS*Волкова Т. М., Дулубова И. Е., Тележинская И. Н.,
Гришин Е. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемкина
Академии наук СССР, Москва

Из ряда среднеазиатского черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* выделены четыре нейротоксина *Os-1* – *Os-4*, гомогенность которых доказана диск-электрофорезом и анализом N-концевых аминокислотных остатков. Определен аминокислотный состав токсинов и установлено, что токсин *Os-1* содержит остатки метионина. Исследование триптических и химотриптических пептидов токсина *Os-3* позволило установить его полную аминокислотную последовательность. Нейротоксин *Os-3* состоит из 67 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями.

Природные нейротоксины используются исследователями в качестве специфичных инструментов изучения молекулярных механизмов передачи первого импульса. Среди этих уникальных биорегуляторов большой интерес вызывают полипептидные токсины из яда скорпионов, способные селективно воздействовать на функционирование быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран [1–3]. Ранее были опубликованы результаты исследования токсических компонентов из ядов кавказского и среднеазиатского подвидов скорпиона *Buthus eupeus* [4–6]. Настоящая работа посвящена выделению и изучению полипептидных нейротоксинов из яда среднеазиатского скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*.

Цельный яд черного скорпиона *O. scrobiculosus*, полученный электрической стимуляцией, обладает значительно большей токсичностью (табл. 1), чем яд скорпиона *B. eupeus* (LD_{50} 3000 мг/кг [4, 5]). По данным диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле, исследуемый яд представляет собой многокомпонентную смесь, содержащую не менее 10–12 различных белков. Труднорастворимые нетоксичные мукопротеиды, составляющие ~10% веса цельного яда, могут быть легко отделены центрифугированием.

Для получения индивидуальных нейротоксинов использовался метод фракционирования яда скорпиона *B. eupeus* [4] с некоторыми модификациями. Первоначально небольшие порции (по 200–300 мг) лиофильно высушенного яда черного скорпиона подвергались разделению на биогеле Р-10 (рис. 1). Токсичность проявляли практически только фракции А и В, выход которых (по белку) составляет 13 и 8% соответственно. При ионообменной хроматографии фракции А на целлюлозе СМ-32 в градиенте рН и молярности аммоний-ацетатного буфера (рис. 2) было получено 13 фракций, из которых только А-5, А-6, А-7, А-9 обладали токсической активностью. С помощью диск-электрофореза в присутствии 6 М мочевины в 15% полиакриламидном геле, определения N-концевых аминокислотных остатков, а также анализа аминокислотного состава было показано, что материал фракций А-7 и А-9 представляет собой индивидуальные нейротоксины *Os-3* и *Os-4*. Для выделения токсина *Os-2* из фракции А-5 была использована ВЭЖХ с обращенной фазой в аммоний-ацетатном буфере и градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 3). Этим же способом из фракции А-6 был получен в индивидуальном виде токсин *Os-3*.

Для разделения фракции В (рис. 1) применялась хроматография на DEAE-сефадексе А-50 (рис. 4). При этом был выделен нейротоксин *Os-1*.

Таблица 1

Токсичность нейротоксинов Os-1 – Os-4, выделенных из яда среднеазиатского скорпиона *O. scrobiculosus*

Образец	Выход, %	LD ₅₀ , мг/кг веса мыши
Цельный яд	100	1000
Os-1	1,60	107,5
Os-2	0,37	540
Os-3	1,70	239
Os-4	0,50	900

Таблица 2

Аминокислотный состав токсинов яда скорпиона *O. scrobiculosus*

Аминокислота	Os-1	Os-2	Os-3	Os-4
Asp	8	8	7	7
Thr	3	3	3	2
Ser	3	3	3	4
Glu	3	4	4	4
Pro	5	3	3	4
Gly	6	10	11	11
Ala	3	3	3	4
1/2Cys	8	8	8	8
Val	3	4	5	3
Met	1	—	—	—
Pe	2	3	3	3
Leu	3	3	3	3
Tyr	7	2	2	3
Phe	—	2	2	—
His	2	3	3	4
Lys	5	3	3	4
Arg	1	3	3	1
Trp	3	2	1	1
Всего	66	67	67	66
N-Концевая	Glx	Asx	Gly	Gly

Таким образом, из яда *O. scrobiculosus* получены четыре нейротоксина для млекопитающих, активность каждого из которых значительно превышала токсичность цельного яда (табл. 1). Все токсины выделены с достаточно хорошим выходом (от 0,37 до 1,7% веса цельного яда). Кроме того, в процессе фракционирования не было обнаружено минорных токсичных фракций, характерных для яда скорпиона *V. eurus* [4]. Однако общий выход по активности не превышает 20%, что свидетельствует о довольно сильной инактивации токсинов *O. scrobiculosus* в процессе выделения.

Результаты аминокислотного анализа (табл. 2) показывают, что все полученные токсины близки к полипептидным токсинам яда *V. eurus* (ср. [4, 5]); в их состав входят 66–67 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Однако в нейротоксине Os-1 содержится остаток метионина, присутствие которого не характерно для токсинов скорпиона, действующих на млекопитающих [1]. До сих пор остатки метионина [7] были обнаружены только в токсине из яда скорпиона *Tylius serrulatus*, способного активировать натриевые каналы. Обращает на себя внимание особое сходство аминокислотных составов токсинов Os-2 и Os-3, различающихся по содержанию только четырех аминокислотных остатков и являющихся, вероятно, изотоксинами.

Для установления аминокислотной последовательности токсина Os-3 проводилось восстановление его внутримолекулярных дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп остатков цистеина.

При триптическом расщеплении молекулы карбоксиметилированного токсина Os-3 для полученной смеси пептидов были идентифицированы

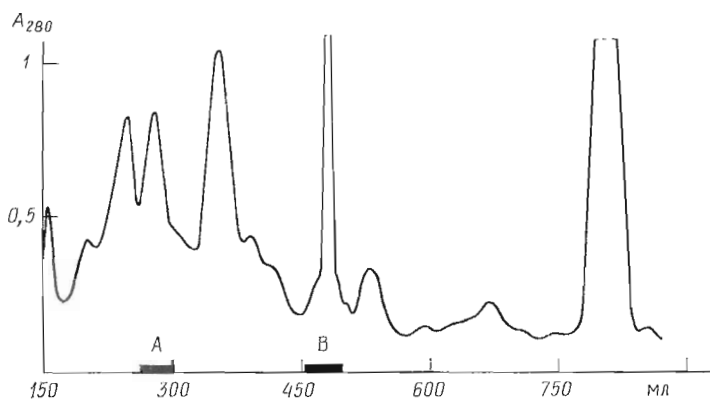


Рис. 1. Гель-фильтрация 300 мг цельного яда скорпиона *O. scrobiculosus* на последовательно соединенных колонках с сефадексом G-50 (1,5×90 см) и биогеом P-10 (две колонки 1,5×90 см) в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 7,8). Скорость элюции 10 мл/ч, объем фракций 5 мл. Здесь и на рис. 2–6 показаны границы объединения фракций

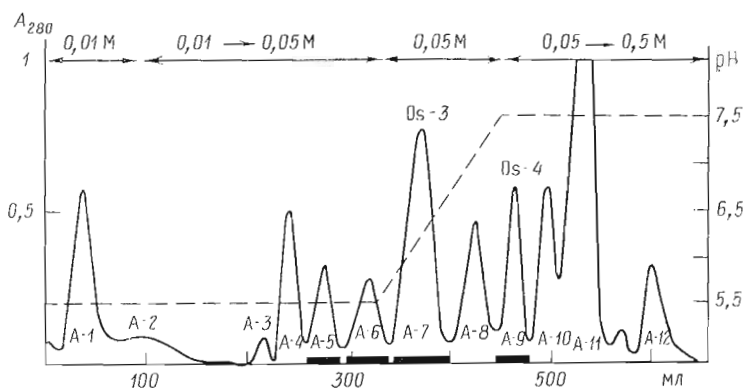


Рис. 2. Хроматография фракции А (рис. 1) на СМ-целлюлозе СМ-32 в градиенте рН и молярности аммоний-ацетатного буфера. Колонка 1,5×12 см, скорость элюции 15 мл/ч, объем фракций 5 мл

следующие N-концевые аминокислотные остатки: Gly, Val, Asp, Glu, Cys(Cm). Разделение пептидов триптического гидролизата осуществлялось ВЭЖХ с обращенной фазой в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 5). При этом было получено восемь фракций, содержащих индивидуальные пептиды Т-1 – Т-8 (табл. 3). Структура этих пептидов устанавливалась методом Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде Dns-производных [8, 9]. Одновременно определялись дикарбоновые аминокислоты и их амиды в виде Pth-производных [10]. В результате была установлена частичная последовательность пептида Т-2 и полные аминокислотные последовательности остальных триптических пептидов (табл. 4). Пептид Т-1 является N-концевым, так как имеет последовательность, идентичную последовательности СМ-токсина Os-3. В связи с тем что пептидная связь Lys-Cys(Cm) не полностью расщепляется трипсином, в гидролизате был обнаружен пептид Т-8, перекрывающий фрагменты Т-6 и Т-7. Причем пептид Т-7 (соответственно Т-8) расположен в С-концевой части токсина, поскольку он не содержит остатков лизина или аргинина.

Для реконструкции молекулы токсина Os-3 было предпринято расщепление его полипептидной цепи химотрипсином; среди N-концевых аминокислот смеси пептидов были найдены Gly, Ile, Asp, His, Cys(Cm). При фракционировании химотриптического гидролизата ВЭЖХ с обращенной фазой были получены индивидуальные пептиды Ch-1 – Ch-8

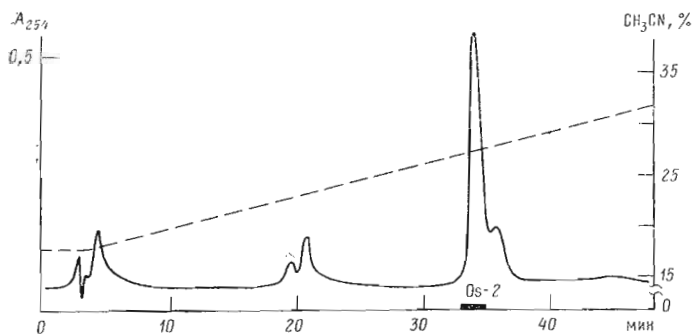


Рис. 3. Разделение фракции А-5 (рис. 2) ВЭЖХ на колонке Silasorb C₈ (0,46×25 см) в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7) в градиенте ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин, объем фракций 0,5 мл

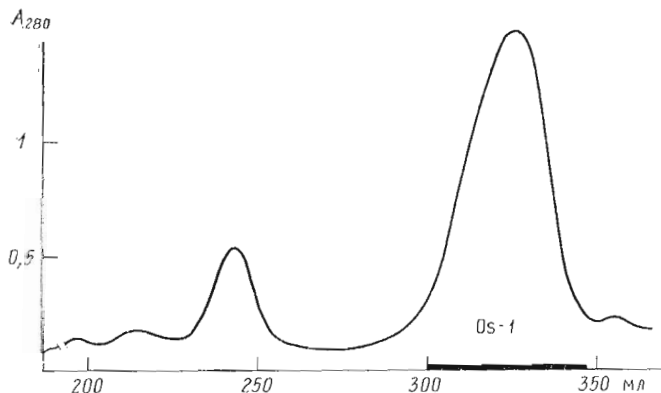


Рис. 4. Хроматография фракции В (рис. 1) на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 8,5). Две последовательно соединенные колонки 1,5×90 см, скорость элюции 6,7 мл/ч, объем фракций 3,35 мл

(рис. 6), аминокислотные составы которых приведены в табл. 5. Методом Эдмана была установлена структура пептидов Ch-1, Ch-2, Ch-3, Ch-7, а также частичная последовательность Ch-5, Ch-6, Ch-8 (табл. 6). Обнаружено, что фрагмент Ch-7 — продукт неспецифического расщепления химотрипсином связи Arg-Gly. По данным аминокислотного анализа и определения N-концевой последовательности пептида Ch-4, он включает в свой состав уже исследованные пептиды Ch-2 и Ch-3.

На основании информации, полученной при определении структуры триптических и химотриптических пептидов, оказалось возможным полностью установить аминокислотную последовательность нейротоксина Os-3 (рис. 7). Этот полипептид состоит из 67 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. По своим структурным особенностям он обладает заметным сходством с нейротоксинами из яда скорпиона *B. eurus*. Действительно, при сравнении с токсинами M₁₀, M₉ и M₁₄ можно выделить по крайней мере 31 инвариантный аминокислотный остаток, а попарное сходство всех этих нейротоксинов достигает 52% (рис. 8). Участки полипептидной цепи нейротоксина Os-3 3-8 (Arg-Asp-Gly-Tyr-Ile-Ala), 47-50 (Ala-Cys-Trp-Cys) и 53-55 (Leu-Pro-Asp) идентичны во всех изученных нейротоксинах скорпионов, активных по отношению к млекопитающим.

Аминокислотный состав СМ-токсина Os-3 и его триптических пептидов

Аминокислота	Os-3	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8
Asp	7,22 (7)		2,78 (3)	1,32 (1)		2,05 (2)	1,16 (1)		1,21 (1)
Thr	2,89 (3)		1,01 (1)	1,22 (1)	1,00 (1)				
Ser	2,83 (3)		1,61 (1)	2,04 (2)					
Glu	4,31 (4)		1,42 (1)	2,37 (2)			1,26 (1)		1,38 (1)
Pro	2,91 (3)		1,86 (2)			1,00 (1)			
Gly	11,52 (11)	1,29 (1)	3,92 (4)	3,51 (3)	1,54 (1)		2,26 (2)		2,51 (2)
Ala	3,25 (3)		1,28 (1)	1,42 (1)	1,31 (1)				
Val	4,28 (5)	1,04 (1)	0,92 (1)				2,31 (3)		2,37 (3)
Cys (Cm)	7,31 (8)		2,62 (4)	0,78 (1)	1,39 (2)			1,06 (1)	0,52 (1)
Ile	3,01 (3)		0,93 (1)	0,83 (1)			0,83 (1)		0,85 (1)
Leu	3,01 (3)		1,12 (1)	1,21 (1)		1,00 (1)			
Tyr	1,90 (2)		1,81 (2)						
Phe	2,11 (2)		1,10 (1)	0,98 (1)					
His	2,90 (3)		1,65 (2)					0,90 (1)	1,02 (1)
Lys	3,06 (3)		1,00 (1)		1,00 (1)		1,00 (1)		1,00 (1)
Arg	3,06 (3)	1,00 (1)		1,00 (1)		1,00 (1)			
Trp	(1)				(1)				
N-Концевая	Gly	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Val	Cys (Cm)	Val
Всего	67	3	26	15	7	5	9	2	11

Таблица 4

Аминокислотная последовательность триптических пептидов СМ-токсина Os-3

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

Примечание: → - стадии деградации по Эдману.

Экспериментальная часть

В работе использовали лиофильно высушенный цельный яд скорпиона *O. scrobiculosus* отечественного производства, ТРСК-трипсин и химотрипсин (Worthington, США). Для хроматографии применяли сефадекс G-50 fine и DEAE-сефадекс А-50 (Pharmacia, Швеция), биогель P-10 (Bio-Rad, США), СМ-целлюлозу СМ-32 (Whatman, Англия). Разделение токсинов и пептидов ВЭЖХ с обращенной фазой осуществляли на хроматографе Altex с проточным спектрофотометром (модель 332) с объемом ячейки 8 мкл (Altex, США), использовали колонки Silasorb C₈(A) и Ultrasphere ODS C₁₈(B) размером 0,46×25 см. Для контроля разделения пептидов последовательно присоединяли проточный спектрофотометр Du Pont (Du Pont Instruments, США), который измерял поглощение при 210 нм.

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

Выделение нейротоксинов. Цельный яд *O. scrobiculosus* растворяли

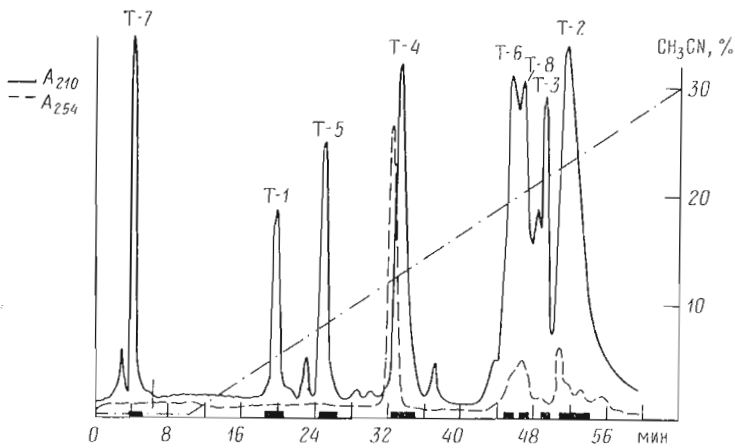


Рис. 5. Разделение триптических пептидов СМ-токсина Os-3 ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS C_{18} , 5 мкм (0,46×25 см) в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5,7) в градиенте ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин

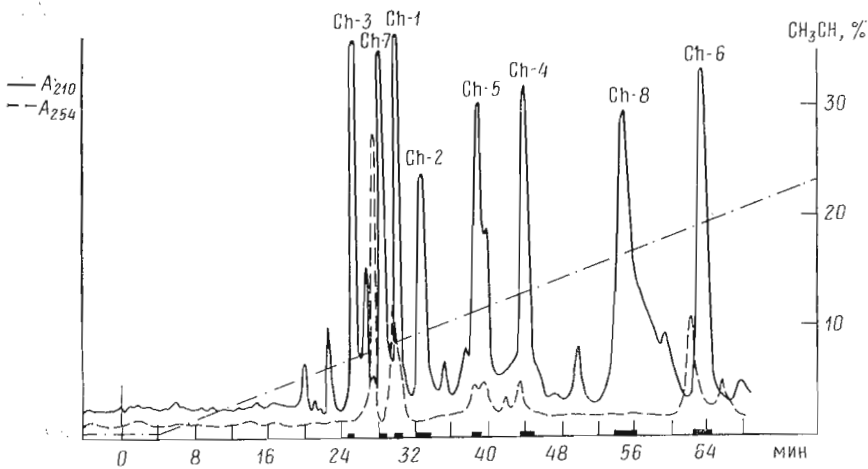


Рис. 6. Разделение химотриптических пептидов СМ-токсина Os-3 ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS C_{18} (условия как на рис. 5)

в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 7,8), центрифугировали 1 ч при 50 000 g на центрифуге L5-50 (Beckman, США). Осадок ресуспендировали в том же буфере и повторно центрифугировали. Объединенный супернатант лиофильно высушивали, растворяли в небольшом объеме того же буфера и подвергали гель-фильтрации на трех последовательно соединенных колонках с сефадексом G-50 и биогеом P-10 (рис. 1). Токсичную фракцию А хроматографировали на колонке с целлюлозой CM-32 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рис. 2), фракцию А-5 разделяли далее ВЭЖХ на колонке А в аммоний-ацетатном буфере в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 3). Фракцию В (рис. 1) фракционировали на DEAE-сефадексе А-50 в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рис. 4).

Гомогенность полученных фракций контролировали диск-электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (рН 4,3) по методу Рейсфельда [11].

Токсичность изучаемых образцов и фракций контролировали на белых мышах весом 18–20 г путем внутривенных инъекций. LD_{50} рассчитывали по методу Литчфильда и Уилкоксона [12].

Аминокислотный состав токсинов определяли по стандартной методике [5].

Триптический гидролиз токсина Os-3. Токсин восстанавливали β -меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали по методике [13]. Полученный

Аминокислотный состав химо триптических пептидов СМ-токсина Os-3

Аминокислота	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5	Ch-6	Ch-7	Ch-8
Asp	1,32(1)		1,19(1)	1,33(1)	2,41(2)			3,22(3)
Thr					2,03(2)			
Ser					3,24(3)	1,06(1)	0,91(1)	
Glu		1,41(1)		1,21(1)	2,29(2)			1,21(1)
Pro		0,99(1)		0,84(1)	1,11(1)			1,03(1)
Gly	2,56(2)				5,42(5)	2,28(2)	1,49(1)	2,16(2)
Ala		1,32(1)		1,12(1)	1,51(1)	1,18(1)	1,02(1)	
Cys (Cm)			0,63(1)	0,57(1)	2,98(4)	0,71(1)	0,82(1)	1,42(2)
Val	0,95(1)		0,96(1)	0,91(1)				2,97(3)
Ile		0,84(1)		0,87(1)		0,92(1)		0,84(1)
Leu					1,08(1)	0,96(1)		0,97(1)
Hyr	0,99(1)		0,85(1)	0,82(1)				
Phe					1,97(2)			
Tis		0,87(1)		0,93(1)	1,10(1)			0,97(1)
Lys					1,04(1)			1,98(2)
Arg	1,04(1)					1,01(1)		1,02(1)
Trp						(1)	(1)	
N-Концевая	Gly	Ile	Asn	Ile	His	Ile	Gly	Cys (Cm)
Всего	6	5	4	9	25	9	5	18

Таблица 6

Аминокислотная последовательность химо триптических пептидов СМ-токсина Os-3

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

Примечание: \rightarrow — стадии деградации по Эдману.

карбоксиметилированный Os-3 (100 нмоль) в 700 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) обрабатывали трипсином в течение 4 ч при 37° С и отношении фермент — субстрат 1:50 (по весу). Гидролизат подкисляли и упаривали. Разделение триптических пептидов осуществляли ВЭЖХ на колонке В (рис. 5).

Химо триптический гидролиз карбоксиметилированного токсина Os-3 (100 нмоль), проводили 4 ч в 700 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,3) при соотношении фермент — субстрат 1:50 и температуре 37° С. Полученный гидролизат подкисляли и упаривали. Химо триптические пептиды подвергали фракционированию методом ВЭЖХ на колонке В (рис. 6).

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали методом Эдмана по описанным ранее методикам [8, 9]. При этом в дансильном варианте использовали идентификацию амидов дикарбоновых кислот и самих кислот в виде Pth-производных по методу [10].

8. Gray W. R. In: Methods in Enzymol. N. Y.—L.: Acad. Press. 1967, v. XI, p. 469–475.
9. Липкин В. М., Алданова П. А., Фейгина М. Ю., Жигулина Е. Б., Виноградова Е. И. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410–413.
10. Алахов Ю. В., Могуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301–1313.
11. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. Nature, 1962, v. 195, № 4838, p. 281–283.
12. Белецкий М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963, с. 81.
13. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.

Поступила в редакцию
3.IV.1984

TOXIC COMPONENTS OF THE CENTRAL ASIAN SCORPION *ORTHOCHIRUS* *SCROBICULOSUS* VENOM

VOLKOVA T. M., DULUBOVA I. E., TELEZHINSKAYA I. N.,
GRISHIN E. V.

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

Four polypeptide neurotoxins, possessing paralytic activity for mice, were isolated from the venom of the Central Asian black scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. All these toxins, Os-1 – Os-4, were shown to be homogeneous by disc-electrophoresis and N-terminal group analyses. The amino acid composition of the toxins was determined, methionine residues being found in toxin Os-1. The neurotoxin Os-3 was subjected to tryptic and chymotryptic hydrolyses and its total amino acid sequence was established. It was shown that neurotoxin Os-3 consists of 67 amino acid residues with four intramolecular disulfide bonds.