



УДК 547.962+547.993

ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА И АМИНОКИСЛОТНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДВУХ ЦИТОТОКСИНОВ
ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA*

Гришин Е. В., Сухих А. П., Адалович Т. Б.,
Овчинников Ю. А.

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

Из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* выделены два полипептида, обладающие гемолитическим, кардиотоксическим и цитотоксическим действием. Гомогенность цитотоксинов доказана с помощью диск-электрофореза и анализа концевых аминокислотных остатков. Проведено изучение свойств цитотоксинов, определены их аминокислотные составы и аминокислотные последовательности. Показано, что молекулы обоих цитотоксинов состоят из 60 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями.

Нейротоксический эффект яда змей семейства элапидов обусловлен действием содержащихся в этих ядах полипептидов, специфически блокирующих нервно-мышечную передачу в мионевральных синапсах [1]. За биологические эффекты иного рода, наблюдаемые при действии яда элапидов *in vitro* и *in vivo*, а именно гемолиз, деполяризацию скелетных мышц, кардио- и цитотоксическое действие, блок проводимости по нерву, местное раздражающее действие и т. д., ответственны другие компоненты яда, также являющиеся полипептидами. Все они образуют группу близких по структуре соединений, характеризующихся изоэлектрической точкой выше 12, высоким содержанием лизина и гидрофобных аминокислот и низким — глицина и аргинина [2]. По химическому строению они весьма сходны с нейротоксинами, выделенными из тех же ядов [3].

Разнообразные биологические эффекты этой группы полипептидов из ядов проявляются, по-видимому, на уровне плазматических мембран клеток; поэтому их предпочтительнее называть цитотоксинами или мембрано-активными полипептидами [4]. Цитотоксины менее токсичны, чем нейротоксины, но их действие значительно усиливается в присутствии фосфолипазы А. Браганка с сотр. [5] показали, что выделенный ими основной полипептид из яда индийской кобры *Naja naja* действует цитотоксически на разные клетки, проявляя избирательность в отношении малодифференцированных, в том числе опухолевых, клеток. К настоящему времени полипептиды, по структуре гомологичные цитотоксинам, получены из большого числа разных ядов; определена их структура [2, 6—11], но биологически они охарактеризованы недостаточно.

В данной работе описаны выделение, свойства и аминокислотная последовательность двух цитотоксинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.

Аминокислотный состав цитотоксина II, пептидов бромцианового гидролизата (СВ) и химотриптических пептидов (Сh) цитотоксина II

Аминокислота	Цитотоксин II	СВ-1	СВ-2	СВ-3	Сh-1	Сh-2	Сh-3
Cys (Сm)	8	3,0(3)		5,0(5)	2,0(2)		3,0(3)
Asp	5	1,2(1)		3,8(4)	1,4(1)		3,2(3)
Thr	2	1,0(1)		1,0(1)			1,0(1)
Ser	3	1,1(1)		2,0(2)	1,8(2)		
Pro	5	2,2(2)		2,8(3)	2,5(3)		
Gly	2	1,3(1)		1,1(1)	1,3(1)		
Ala	3	1,2(1)		2,1(2)	1,9(2)		
Val	7	1,0(1)		5,6(6)	4,1(4)	1,0(1)	1,0(1)
Met	2	(1)	(1)				
Ile	1			1,0(1)	1,0(1)		
Leu	6	3,7(4)		1,9(2)	2,0(2)		
Tyr	2	0,8(1)		1,0(1)		0,6(1)	
Phe	2	0,7(1)	(1)				
His	1			1,0(1)	1,2(1)		
Lys	10	5,6(6)		4,0(4)	2,1(2)	1,0(1)	1,0(1)
Arg	1			0,9(1)	1,0(1)		
Всего	60	24	2	34	22	3	9
N-Концевая	Leu	Leu	Phe	Val	Val	Val	Val

На сефадексе G-75 цельный яд среднеазиатской кобры был разделен на три фракции (рис. 1, а) [12]. Фракция II оказывала токсическое действие (LD_{50} 0,85 мг/кг веса мышей), вызывала гемолиз эритроцитов в отсутствие экзогенного источника фосфолипидов («прямой» гемолиз) и воспроизводила эффекты цельного яда на изолированном сердце лягушки. Диск-электрофорез при pH 8,8 показал, что во фракции II содержится свыше 10 компонентов, преимущественно мигрирующих к катоду. Для их разделения фракцию II подвергали ионообменной хроматографии на СМ-целлюлозе (рис. 1, б). Фракции VI и V (цитотоксин I) обладали цито-, кардио- и гемолитическим действием (LD_{50} 2,4 и 1,1 мг/кг соответственно). По данным диск-электрофореза, фракция VI состояла из нескольких компонентов, которые были разделены с помощью ионообменной хроматографии на смоле биорекс-70 (рис. 2). «Прямой» гемолитической, цито- и кардиотоксической активностью обладал компонент BR-2 (цитотоксин II, LD_{50} 1,75 мг/кг). Цитотоксин II в концентрации 10 мкг/мл воспроизводил почти все эффекты цельного яда кобры на изолированном сердце лягушки: уменьшение амплитуды сердечных сокращений, урежение ритма и остановку сердца в систоле. Аритмию вызывал другой компонент яда кобры — цитотоксин I, который, хотя и при значительно более высоких концентрациях, также останавливал сердце лягушки.

Гомогенность цитотоксинов I и II доказана диск-электрофорезом, анализом аминокислотного состава и концевых аминокислотных остатков, а также ультрацентрифугированием. Выход цитотоксина I составлял 15%, а цитотоксина II — 18% веса цельного яда. По данным ультрацентрифугирования и гель-фильтрации, молекулярный вес цитотоксина II ~ 7000, что находится в хорошем соответствии с результатами аминокислотного анализа (табл. 1). Аналогичные значения молекулярного веса получены для цитотоксина I.

Перед структурным анализом цитотоксинов проводилось восстановление их дисульфидных связей и карбоксиметилирование. Аминокислотный

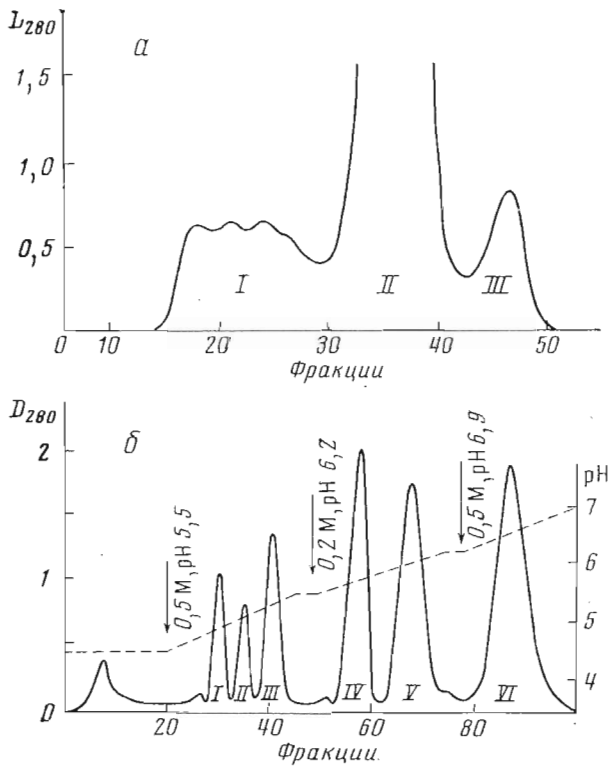


Рис. 1. Разделение яда среднсазиатской кобры *Naja naja oxiana*: а — гель-фильтрация 250 мг цельного яда на сефадексе G-75 в 0,1 М уксусной кислоте; колонка $2,5 \times 100$ см, объем фракций 12 мл; б — хроматография 200 мг фракции II (рис. 1, а) на 0,5М-целлюлозе в градиенте аммоний-ацетатного буфера; колонка $2,5 \times 20$ см, объем фракции 18 мл

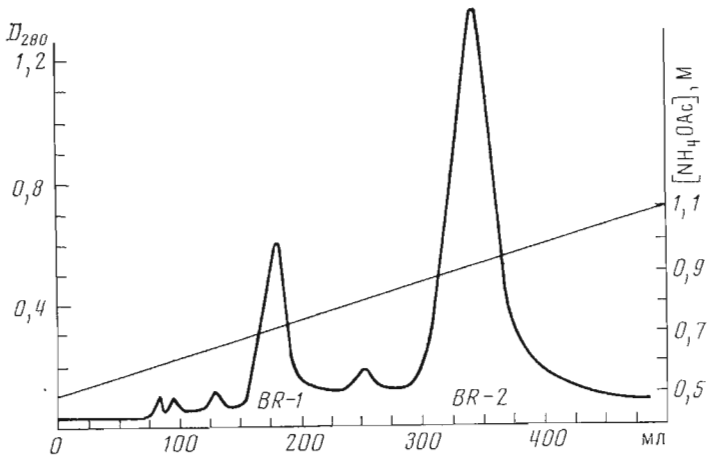


Рис. 2. Хроматография фракции VI (рис. 1, б) на смоле биорекс-70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 6,5; колонка $2,5 \times 28$ см, скорость 45 мл/ч

анализ карбоксиметилированных цитотоксинов показал, что карбоксиметилирование прошло практически количественно, а остатки других аминокислот при этом затронуты не были.

Полная аминокислотная последовательность цитотоксина II

N-Концевая аминокислотная последовательность карбоксиметилированного цитотоксина II* определялась двумя способами. Первоначально деградацией по методу Эдмана с идентификацией дансильных производных была установлена последовательность первых семи аминокислотных остатков: Leu-Lys-Cys(Cm)-Lys-Lys-Leu-Val-. N-Концевая аминокислотная последовательность модифицированного полипептида, определенная при помощи секвенатора с использованием квадрольной программы, оказалась следующей: Leu-Lys-Cys(Cm)-Lys-Lys-Leu-Val-Pro-Leu-Phe-X-X-X-¹⁰
: 20
-Cys(Cm)-Pro-Ala-Gly-X-X-Leu-X-Tyr-X-Met-Phe-Met-.

Применение карбоксипептидазы А позволило установить C-концевую последовательность цитотоксина II: -Lys-Cys(Cm)-Asn-.

Полная аминокислотная последовательность цитотоксина II определялась по общепринятым методам структурной химии белка. Вначале было предпринято его триптическое расщепление. Судя по данным аминокислотного анализа этого полипептида (табл. 1), при его триптическом гидролизе следовало ожидать образования 12 сравнительно коротких фрагментов. Полученные результаты (рис. 3) хорошо согласуются с этим предположением. Как видно из пептидной карты, большинство пептидов имело близкую электрофоретическую подвижность. Вследствие этого для их разделения целесообразнее было использовать ионообменную хроматографию. Так как большинство триптических пептидов носило явно основной характер, для их фракционирования применялся катионит хромобедс $P \times 4$, что привело к получению 13 объединенных фракций (рис. 4). Фракции IV, VII, XI и XII представляли собой индивидуальные пептиды T-2, T-4, T-7 и T-3 соответственно. Из фракции I с помощью препаративной хроматографии на бумаге выделены пептиды T-11 и T-9. Аналогичным образом фракция VI была разделена на два пептида (T-6 и T-10), а из фракции X выделен пептид T-1. Препаративной хроматографией на пластинке с целлюлозой MN-300 из фракций II и V выделены пептиды T-5 и T-8 соответственно. Во фракциях III, VIII, IX и XIII не было обнаружено пептидного материала в количестве, достаточном для анализа.

Таким образом, из триптического гидролизата карбоксиметилированного цитотоксина II выделено в общей сложности 11 различных пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 2. Аминокислотная последовательность триптических пептидов T-1, T-2, T-5, T-6, T-8 — T-11 (табл. 3) определена по методу Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде их дансильных производных. C-Концевая последовательность пептида T-8 подтверждена с помощью карбоксипептидазы С, которая отщепляет за 16 ч 32% лизина и 30% пролина. Смесь карбоксипептидаз А и В отщепляет от пептида T-11 за 2 ч 75% аспарагина, 15% карбоксиметилцистеина, 13% лизина. Аминопептидаза М отщепляет от пептида T-6 за 20 мин 61% аспарагина, 32% лейцина, 6% карбоксиметилцистеина. Следовательно, N-концевым аминокислотным остатком пептида T-6 является аспарагин.

Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-аминокислот была найдена последовательность первых трех аминокислотных остатков пептида T-3 (Lys-Leu-Val-) и T-4 (Leu-Val-Pro-). Смесь карбоксипептидаз А и В отщепляет от пептида T-4 за 65 мин 33% лизина, 30% серина, 23% лейцина и 23% фенилаланина. Из этих данных и аминокислотного состава можно предположить аминокислотную последовательность пептида T-4

* Далее определение «карбоксиметилированный» опускается.

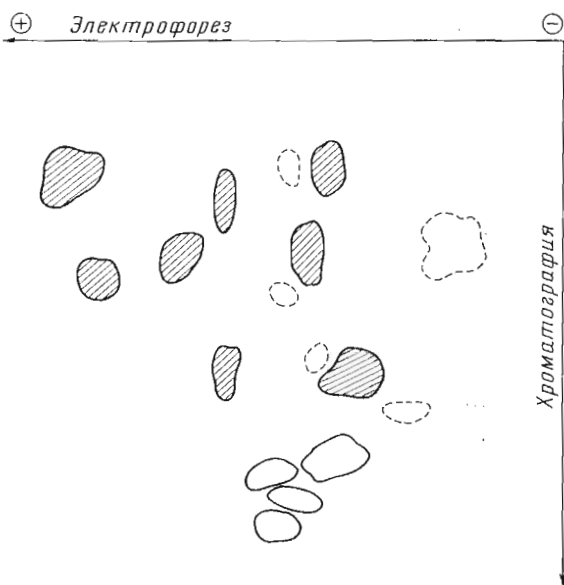


Рис. 3. Пептидная карта продуктов триптического гидролиза цитотоксина II: 1-е направление — электрофорез, pH 5,6; 32 В/см, 2,5 ч; 2-е направление — хроматография в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12

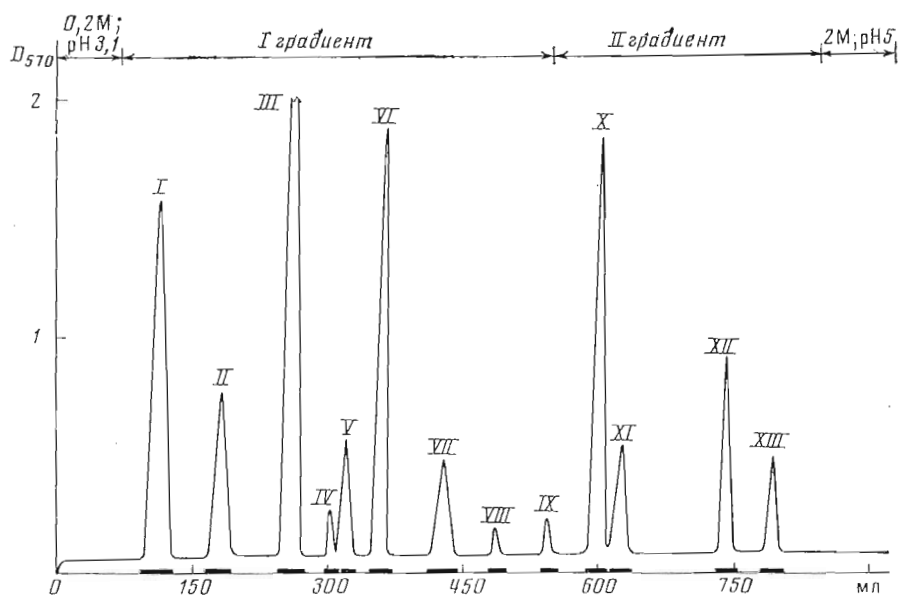


Рис. 4. Разделение продуктов триптического гидролиза цитотоксина II на катионите хромобедс Р × 4 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (условия см. «Экспериментальную часть»)

Аминокислотный состав триптических пептидов карбоксиметилированного цитотоксина II

Аминокислота	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	T-11
Cys(Cm)		0,8(1)			0,8(1)	0,8(1)		1,8(2)	1,8(2)		2,7(3)
Asp						1,0(1)		1,1(1)	1,0(1)		2,9(3)
Thr					0,9(1)						0,9(1)
Ser			1,0(1)	1,0(1)						1,7(2)	
Pro			0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,8(2)	0,8(1)	0,9(1)		
Gly					1,1(1)			0,9(1)	1,1(1)		
Val			1,1(1)	1,1(1)			2,8(3)	1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)	0,7(1)
Ala					1,0(1)		2,0(2)				
Ile								1,0(1)	0,9(1)		
Leu	1,0(1)		1,9(2)	1,8(2)		1,0(1)				2,0(2)	
Met							1,5(2)				
Tyr						0,8(1)					0,8(1)
Phe			1,0(1)	0,9(1)			0,9(1)				
His							0,8(1)				
Lys	1,0(1)	1,8(2)	2,0(2)	1,0(1)	1,2(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Arg								0,9(1)			
Всего	2	3	8	7	6	5	12	9	8	6	10
N-Концевая	Leu	Cys (Cm)	Lys	Leu	Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Ser	Tyr

Таблица 3

Аминокислотная последовательность триптических пептидов цитотоксина II

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Leu-Lys
T-2	Cys(Cm)-Lys-Lys
T-3	Lys-Leu-Val-Pro-Leu-Phe-Ser-Lys
T-4	Leu-Val-Pro-Leu-Phe-Ser-Lys
T-5	Thr-Cys(Cm)-Pro-Ala-Gly-Lys
T-6	Asn-Leu-Cys(Cm)-Tyr-Lys
T-7	Met-Phe-Met-Val-Ala-Ala-Pro-(His, Val, Pro, Val, Lys)
T-8	Arg-Gly-Cys(Cm)-Ile-Asx-Val-Cys(Cm)-Pro-Lys
T-9	Gly-Cys(Cm)-Ile-Asx-(Val, Cys(Cm), Pro, Lys)
T-10	Ser-Ser-Leu-Leu-Val-Lys
T-11	Tyr-Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asx-Thr-Asx-Lys-Cys(Cm)-Asn

(табл. 3). Пептид T-3 отличается по аминокислотному составу от пептида T-4 на один N-концевой остаток лизина. Положение остатка фенилаланина в пептидной цепи этих фрагментов стало известным из N-концевой последовательности всей молекулы цитотоксина, определенной при помощи секвенатора. Полная аминокислотная последовательность пептида T-7 была установлена при изучении других гидролизатов цитотоксина.

Для объединения всех триптических пептидов в единую цепь проводилось расщепление цитотоксина II бромцианом. В результате разделения продуктов бромцианового гидролиза на сефадексе G-25fine получены четыре фракции (рис. 5). Данные аминокислотного состава и анализ N-

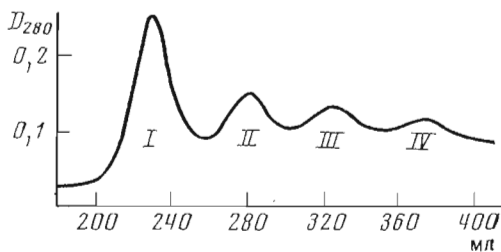


Рис. 5. Разделение бромцианового гидролизата цитотоксина II на сефадексе G-25 fine в 0,1 М NH_4HCO_3 , колонка $2,5 \times 100$ см, скорость 10 мл/ч

ксина II: Leu-Lys-Cys(Cm)-Lys-Lys-Leu-Val-Pro-Leu-Phe-Ser-Lys-Thr-Cys(Cm)-Pro-Ala-Gly-Lys-Asp-Leu-Cys(Cm)-Tyr-Lys-Met. Бромциановый фрагмент СВ-2 представляет собой дипептид Phe-Met.

Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-аминокислот найдена N-концевая последовательность пептида СВ-3: Val-Ala-Ala-Pro. Карбоксипептидаза А за 2 ч отщепляла от этого пептида 76% аспарагина и 39% карбоксиметилцистеина. С помощью автоматического секвенатора была также определена последовательность его первых 17 аминокислотных остатков: Val-Ala-Ala-Pro-His-Val-Pro-Val-Lys-Arg-Gly-Cys(Cm)-X-Asp-Val-Cys(Cm)-Pro-. Для определения полной структуры фрагмента СВ-3 был проведен его химотриптический гидролиз. В результате разделения продуктов химотриптического гидролиза препаративной хроматографией и электрофорезом на бумаге получены в индивидуальном состоянии три пептида (Ch-1, Ch-2 и Ch-3), аминокислотный состав которых приведен в табл. 1. При исследовании частичной структуры пептида Ch-1 было выяснено, что он является N-концевой частью бромцианового фрагмента СВ-3 и имеет аминокислотную последовательность Val-Ala-Ala-Pro-His-Val-Pro-Val-Lys-Arg-Gly-Cys(Cm)-Ile-Asp-Val-Cys(Cm)-Pro-Lys-Ser-Ser-Leu-Leu.

Методом Эдмана для пептида Ch-2 была установлена структура Val-Lys-Tyr, а для пептида Ch-3 (с идентификацией фенилтиогидантоинов) — частичная структура Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asn-Thr-Asp-. Карбоксипептидаза А за 2 ч отщепляет от этого пептида 88% аспарагина и 45% карбоксиметилцистеина. Данные аминокислотного состава и структура триптического пептида Т-11 позволили предположить для пептида Ch-3 аминокислотную последовательность Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asn-Thr-Asp-Lys-Cys(Cm)-Asn. Результаты структурного анализа пептидов химотриптического гидролиза и данные последовательности триптических пептидов помогли осуществить полную «реконструкцию» бромцианового фрагмента СВ-3.

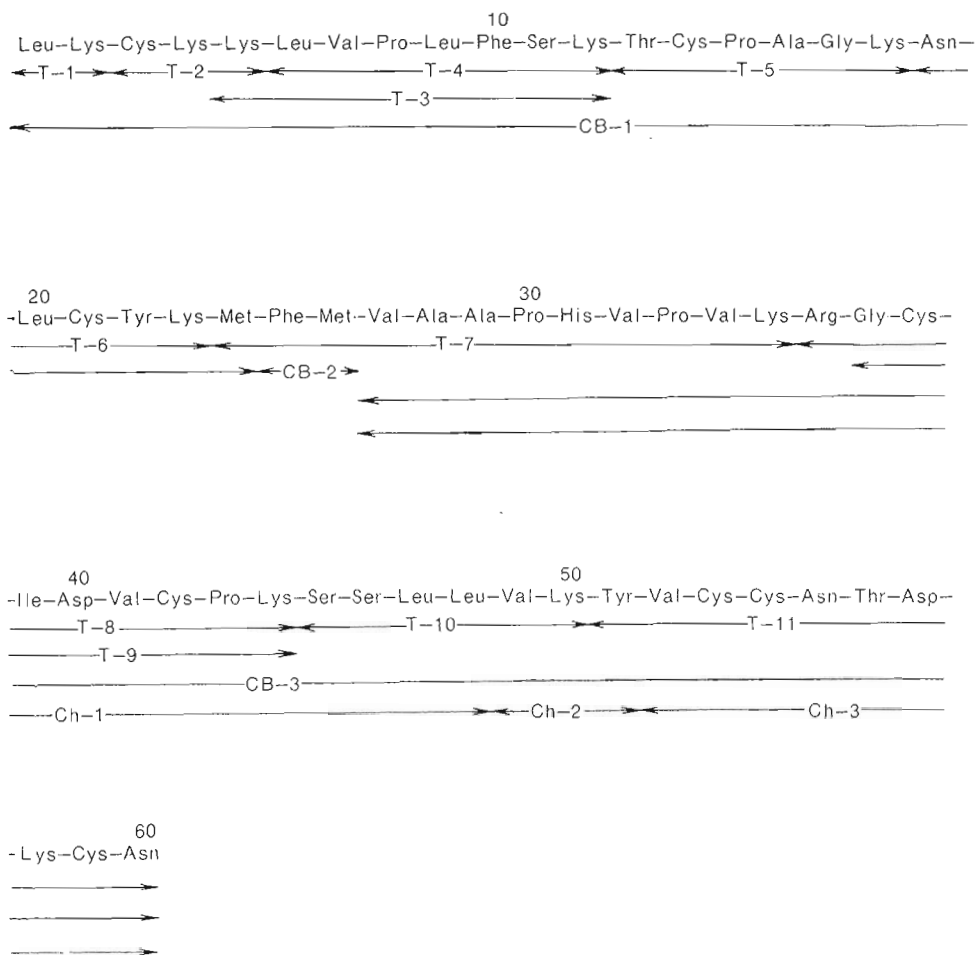
Из вышеизложенного можно сделать вывод, что бромциановый фрагмент СВ-1 состоит из триптических пептидов Т-1 — Т-7, а фрагмент СВ-3 объединяет пептиды Т-7 — Т-11. Триптический пептид Т-7 соединяет между собой все три бромциановых фрагмента. Таким образом, было осуществлено объединение всех фрагментов в единую полипептидную цепь [13]. Аминокислотная последовательность цитотоксина II приведена на схеме 1.

Полная аминокислотная последовательность цитотоксина I

Цитотоксин I подвергался деградации по методу Эдмана на автоматическом секвенаторе. Была получена следующая N-концевая аминокислотная последовательность: Leu-Lys-Cys(Cm)-Asn-Lys-Leu-Val-Pro-Ile-Ala-Tyr-¹⁰

концевых аминокислотных остатков показали, что фракции I, III и IV — это индивидуальные пептиды СВ-3, СВ-1 и СВ-2 соответственно, а фракция II — смесь пептидов СВ-1 и СВ-3. Аминокислотный состав полученных фрагментов приведен в табл. 1.

На основании изучения N-концевой последовательности бромциановых пептидов и данных аминокислотного состава было установлено, что пептид СВ-1 является N-концевым в молекуле цитото-



С х е м а 1. Полная аминокислотная последовательность цитотоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana*: T, CB и Ch — триптические, бромциановые и химотриптические пептиды

20

-X-X-Cys(Cm)-Pro-Glx-Gly-X-Asn-Leu-Cys(Cm)-Tyr-X-Met-Phe-Met-X-X-

30

-Asx-Leu-X-X-X-Val-. С-Концевая аминокислотная последовательность (-Cys(Cm)-Asn) была определена с помощью карбоксипептидазы С, которая отщепляла за 2 ч 31% аспарагина, 15% карбоксиметилцистеина. Триптический гидролиз цитотоксина I проводили аналогично гидролизу цитотоксина II. Полученный гидролизат исследовали методом пептидных карт (рис. 6) и хроматографировали на катионообменной смоле хромобедс Р × 4. Было получено 13 фракций (рис. 7), шесть из которых содержали индивидуальные пептиды. Пептиды Т-4, Т-7 и Т-9 очищались от примесей с помощью хроматографии на бумаге. Аминокислотный состав выделенных триптических пептидов цитотоксина I приведен в табл. 4.

Аминокислотная последовательность пептидов Т-1 — Т-4 (табл. 5) была установлена на основании их аминокислотного состава и данных по N-концевой последовательности цитотоксина I, определенной с помощью секвенатора. Дегградацией по методу Эдмана с использованием аминопептидазы М определена аминокислотная последовательность пептидов Т-5 и Т-7 (табл. 5). Аминопептидаза М отщепляла от пептида Т-5 за 20 мин 28% аспарагина, 24% лейцина, а в случае пептида Т-7 — 31%

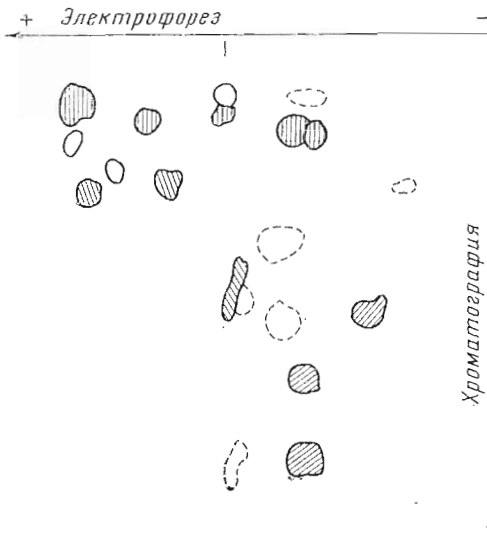
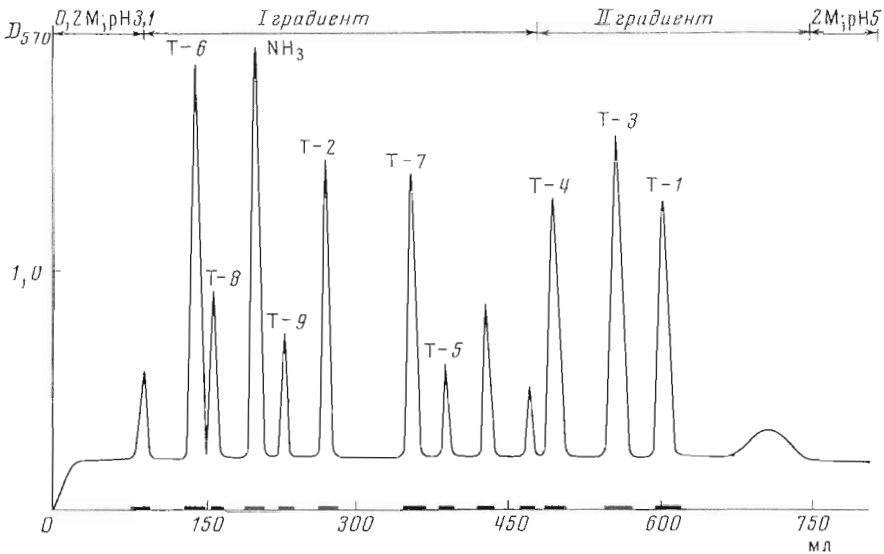


Рис. 6. Пептидная карта продуктов триптического гидролиза цитотоксина I (условия см. рис. 3)

Рис. 7. Разделение продуктов триптического гидролиза цитотоксина I на катионите хромобедс Р × 4 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (условия см. «Экспериментальную часть»)



аспарагина, 20% серина и 13% лейцина. Следовательно, N-концевым аминокислотным остатком в обоих пептидах является аспарагин.

Аминокислотная последовательность пептида T-6 (табл. 5) была установлена методом Эдмана с идентификацией как Dns-, так и Pth-производных.

Последовательность пептида T-8 была найдена с использованием метода Эдмана (с идентификацией фенилтиогидаптоинов аминокислот) и гидролиза карбоксипептидазой А, которая за 2 ч отщепляла от этого пептида 100% аспарагина и 26% карбоксиметилцистеина.

Пептид T-9 имеет структуру, аналогичную пептиду T-8, но короче на остаток карбоксиметилцистеина и аспарагина. К сожалению, при анализе триптических пептидов T-8 и T-9 не удалось однозначно установить в седьмом положении наличие остатка аспарагина или аспарагиновой кислоты, а также местоположение остатков метионина в молекуле цитотоксина I (табл. 4).

С целью объединения триптических фрагментов в единую полипептидную цепь проводилось расщепление цитотоксина I бромцианом. В результате разделения бромцианового гидролизата на сефадексе G-25fine

Аминокислотный состав цитотоксина I и его триптических пептидов

Аминокислота	Цитотоксин I	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9
Cys(Cm)	8		0,9(1)	1,0(1)		0,9(1)	1,7(2)		2,9(3)	1,7(2)
Asp	8		1,1(1)	1,2(1)		1,1(1)	1,2(1)	1,0(1)	3,0(3)	2,3(2)
Thr	3								1,0(1)	1,0(1)
Ser	2							1,1(1)		
Glu	1									
Pro	4				0,9(1)		1,0(1)			
Gly	2						1,1(1)			
Ala	1				1,2(1)					
Val	5				1,0(1)		0,8(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)
Met	3									
Ile	3				0,9(1)		0,7(1)			
Leu	6	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,7(2)		
Tyr	3				1,0(1)	0,8(1)			0,8(1)	0,9(1)
Phe	1									
Lys	8	1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,8(1)		
Arg	2								1,0(1)	1,0(1)
Всего	60	2	3	5	7	5	8	6	10	8
N-Концевая	Leu	Leu	Cys(Cm)	Leu	Leu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Tyr

Таблица 5

Аминокислотная последовательность триптических пептидов цитотоксина I

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Leu-Lys
T-2	Cys(Cm)-Asn-Lys
T-3	Leu-Lys-Cys(Cm)-Asn-Lys
T-4	Leu-Val-Pro-Ile-Ala-Tyr-Lys
T-5	Asn-Leu-Cys(Cm)-Tyr-Lys
T-6	Gly-Cys(Cm)-Ile-Asp-Val-Cys(Cm)-Pro-Lys
T-7	Asn-Ser-Leu-Leu-Val-Lys
T-8	Tyr-Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asn-Thr-Asx-Arg-Cys(Cm)-Asn
T-9	Tyr-Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asn-Thr-Asx-Arg

(рис. 8, а) и последующей рехроматографии фракции I (рис. 8, б) были получены три фракции — II, III, IV. Данные аминокислотного состава и анализа N-концевых аминокислот показали, что фракции II и III представляют собой индивидуальные пептиды ВС-2 и ВС-3. С помощью дополнительной очистки фракции IV на биогеле Р-6 в 6 М мочеvine выделен чистый пептид ВС-1. Аминокислотный состав полученных пептидов приведен в табл. 6.

Для установления полной аминокислотной последовательности пептид ВС-1 был расщеплен трипсином; дальнейший анализ полученной смеси проводился методом Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот без предварительного разделения пептидов (табл. 7). Поскольку структура пептидов триптического гидролиза всей молекулы цитотоксина, входящих в состав данного фрагмента, была известна, оказалось возможным, не разделяя полученную смесь пептидов, установить пол-

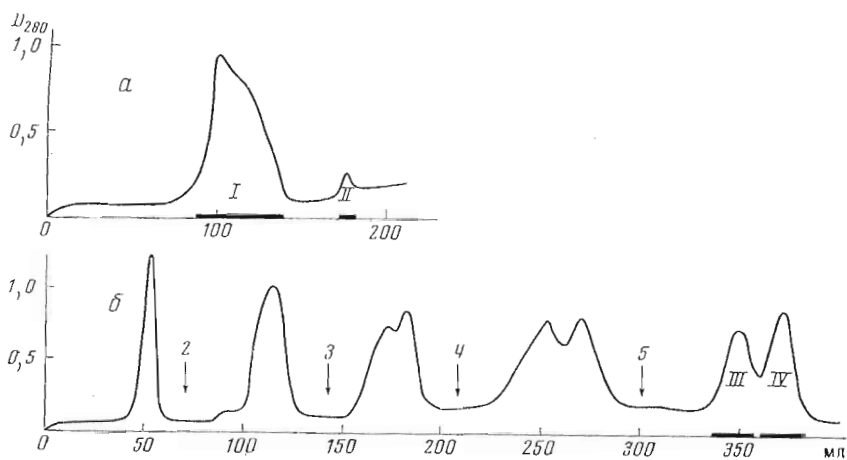


Рис. 8. Разделение бромцианового гидролизата цитотоксина I: *a* — гель-фильтрация всего гидролизата на сефадексе G-25 fine в 30%-ной уксусной кислоте, колонка $2,5 \times 100$ см, скорость 10 мл/ч; *б* — рециклизация фракции I (рис. 8, *a*) на той же колонке в 6 М водном растворе мочевины. Стрелками отмечено число циклов

ную структуру пептида BC-1. Таким образом, бромциановый фрагмент BC-1 состоит из триптических пептидов T-1 — T-5.

Бромциановый фрагмент BC-2 представлял собой дипептид Phe-Met. Методом Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот была найдена последовательность первых четырех аминокислотных остатков пептида BC-3: Ser-Asp-Leu-Thr.- Карбоксипептидаза А отщепляла от этого пептида за 2 ч 80% аспарагина и 67% карбоксиметилцистеина.

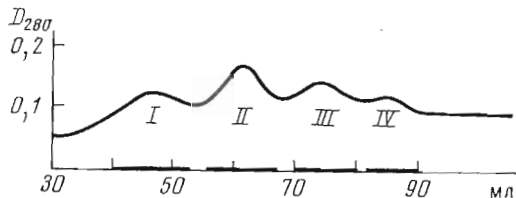


Рис. 9. Разделение триптического гидролизата цитраконилированного цитотоксина I на биогеле P-10 в 30%-ной уксусной кислоте, колонка $1,5 \times 100$ см, скорость 9 мл/ч

На основании данных аминокислотного состава и структуры пептидов T-6 — T-9 (табл. 5) для пептида BC-3 можно было предположить следующую частичную структуру: Ser-Asp-Leu-Thr-(Ile, Pro, Val, Lys, Arg)-Gly-Cys(Cm)-Ile-Asp-Val-Cys(Cm)-Pro-Lys-Asn-Ser-Leu-Leu - Val - Lys - Tyr-Val-Cys(Cm)-Cys(Cm)-Asn-Thr-Asx-Arg-Cys(Cm)-Asn. Для выяснения аминокислотной последовательности центральной части молекулы цитотоксина I и объединения всех фрагментов было проведено цитраконилирование цитотоксина I и его последующий гидролиз трипсином. При разделении триптического гидролизата получены четыре фракции (рис. 9). В первой фракции содержался индивидуальный пептид CT-1. Из второй фракции методом бумажной хроматографии был выделен пептид CT-3, а из третьей при помощи высоковольтного электрофореза на бумаге — пептид CT-2. В четвертой фракции была обнаружена смесь пептидов. В табл. 6 представлен аминокислотный состав триптических пептидов цитраконилированного цитотоксина I.

С целью выяснения структуры пептида CT-1 был проведен его триптический гидролиз; образовавшаяся смесь анализировалась методом Эдмана с идентификацией Dns-аминокислот без разделения фрагментов (табл. 8). Данные анализа позволили установить в структуре цитотоксина I наличие последовательности -Met-Met-. Кроме того, наблюдалось неспецифическое

Таблица 6

Аминокислотный состав бромциановых пептидов (BC) и пептидов триптического гидролизата цитраконилированного цитотоксина I (CT)

Аминокислота	BC-1	BC-2	BC-3	CT-1	CT-2	CT-3
Cys(Cm)	2,6(3)		4,5(5)	2,8(3)		3,6(4)
Asp	2,4(2)		6,5(6)	3,2(3)	1,0(1)	4,2(4)
Thr	1,0(1)		2,2(2)	1,9(2)	0,9(1)	1,2(1)
Ser			2,2(2)	1,2(1)	1,0(1)	1,3(1)
Glu	1,1(1)			1,3(1)		
Pro	1,6(2)		2,0(2)	3,0(3)	1,0(1)	0,8(1)
Gly	1,0(1)		1,4(1)	1,4(1)		1,3(1)
Ala	1,0(1)			1,0(1)		
Val	1,2(1)		3,7(4)	2,0(2)	0,8(1)	2,6(3)
Met	1,0(1)	0,7(1)		2,7(3)	0,6(1)	
Ile	1,0(1)		2,1(2)	1,8(2)	1,0(1)	1,0(1)
Leu	2,7(3)		3,0(3)	3,5(4)	1,1(1)	2,1(2)
Tyr	2,0(2)		1,0(1)	1,8(2)		1,1(1)
Phe		1,0(1)		1,0(1)		
Lys	4,5(5)		3,4(3)	6,4(6)	1,2(1)	2,0(2)
Arg			1,9(2)	0,9(1)	1,3(1)	1,0(1)
Всего	24	2	33	36	10	22
N-Концевая	Leu	Phe	Ser	Leu	Met	Gly

Таблица 7

Результаты определения аминокислотной последовательности пептида BC-1 из бромцианового гидролизата цитотоксина I

Методы анализа	Результаты анализа				
Частичная структура, определенная с помощью секвенатора	Leu-Lys-Cys(Cm)-Asn-Lys-Leu-Val-Pro-Ile-Ala-Tyr-X-X-Cys(Cm)-Pro-Glx-Gly-X-Asn-Leu-Cys(Cm)-Tyr-X-Met				
Постадийная деградация смеси фрагментов триптического гидролизата с идентификацией Pth-аминокислот	1 Leu Cys(Cm) Leu Thr Asn	2 Lys Asn Val Cys(Cm) Leu	3 Lys Pro Pro Cys(Cm)	4 Ile Glu Tyr	5 Ala Gly Lys
Полная структура пептида; стрелками отмечены места действия трипсина	Leu-Lys-Cys(Cm)-Asn-Lys-Leu-Val-Pro-Ile-Ala-Tyr-Lys-Thr-Cys(Cm)-Pro-Glu-Gly-Lys-Asn-Leu-Cys(Cm)-Tyr-Lys-Met				

Таблица 8

Результаты анализа структуры триптических пептидов фрагмента CT-1

Стадии деградации					Стадии деградации				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Leu	Lys				Thr	Cys(Cm)	Pro	Glx	Gly
Cys(Cm)	Asx	Lys			Asx	Leu	Cys(Cm)	Tyr	Lys
Leu	Val	Pro	Ile	Ala	Met	Phe	Met	Met	Ser

расщепления полипептидной цепи трипсином (ср. фрагменты Т-4 и Т-3, а также Т-8 и Т-9 — табл. 3). Неполноту гидролиза, по-видимому, можно объяснить наличием в непосредственной близости от расщепляемой связи остатков дикарбоновых аминокислот или карбоксиметилцистеина. Интересно отметить, что наблюдаемый разрыв связи Met-Met трипсином в цитракоилированном цитотоксине I нехарактерен для действия данного фермента.

Наибольшие трудности в изучении аминокислотной последовательности цитотоксинов встретились при определении остатков амидов и свободных дикарбоновых аминокислот в С-концевой части молекулы. Так, при анализе триптического пептида Т-11 цитотоксина II не удалось однозначно доказать наличие в нем остатка аспарагина и лишь при установлении структуры фрагмента Сh-3 методом Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот оказалось возможным полностью определить С-концевую аминокислотную последовательность цитотоксина II. Аналогично в случае цитотоксина I наличие аспарагиновой кислоты в положении 57 было установлено только в результате гидролиза пептида СТ-3 смесью карбоксипептидаз А и В.

Подобно уже известным цитотоксинам [4, 14], цитотоксины I и II из яда среднеазиатской кобры состоят из 60 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Они характеризуются высоким содержанием лизина и гидрофобных аминокислот и низким содержанием глицина и аргинина. Наряду с инвариантным расположением восьми остатков цистеина и двух остатков метионина последовательности Leu-Lys- (1—2), -Lys-Thr-Cys-Pro- (12—15), -Gly-Lys-Asn-Leu-Cys-Tyr- (17—22), -Lys-Arg-Gly- (35—37), -Pro-Lys- (43—44) также являются одинаковыми для всех известных цитотоксинов.

Основное отличие цитотоксина II от всех известных ранее цитотоксинов — это наличие остатка лизина-4 вместо аспарагина. Кроме того, в положении 31 был обнаружен остаток гистидина, что нехарактерно для известных аминокислотных последовательностей цитотоксинов. В то же время цитотоксин I отличается от цитотоксина II тем, что в нем содержится последовательность -Met-Met- в положении 26—27, которая встречалась только в двух известных структурах цитотоксинов [10, 11]. Несмотря на это, содержание гомодипептидов (пять пар) в цитотоксине II выше, чем в цитотоксине I. Довольно необычно для цитотоксинов и присутствие остатка глутаминовой кислоты в положении 16 молекулы цитотоксина I.

В целом обе структуры цитотоксинов обладают высокой степенью гомологии как между собой, так и по сравнению с известными структурами цитотоксинов.

Экспериментальная часть

Яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, высушенный над хлоридом кальция, получали из Киргизского зонального зоокомбината. Использовали трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы А и В («Worthington», США), карбоксипептидазу С («Roche», ФРГ), аминопептидазу М («Schuchardt», ФРГ); бромциан синтезировали методом, описанным в работе [15], непосредственно перед применением. При хроматографировании использовали хроматографическую бумагу («Wathman 3», Англия), целлюлозу MN-300 («Macherey — Nagel», ФРГ), карбоксиметилцеллюлозу CM-32 («Wathman», Англия), сефадексы («Pharmacia», Швеция), биогели («Bio-Rad», США), ионообменные смолы биорекс-70 («Bio-Rad», США) и хромобедс Р × 4 («Technicon», США).

Хроматографическое разделение цельного яда среднеазиатской кобры на сефадексе G-75 (рис. 1, а) и затем на CM-целлюлозе (рис. 1, б) осуществляли по методике, описанной ранее [12]. Фракцию VI (400 мл) далее разделяли на биорексе-70 (рис. 2). Гомогенность всех полученных фрак-

ций после обессоливания и лиофильного высушивания проверяли при помощи диск-электрофореза. Токсичность фракций, как и чистых препаратов, испытывали внутрибрюшинной инъекцией белым мышам весом 25—30 г. Молекулярный вес устанавливали по Эндриусу [16] на сефадексе G-75 (колонка $2,5 \times 100$ см). Молекулярный вес цитотоксина II определяли также методом седиментационного равновесия в аналитической ультрацентрифуге фирмы «Beckman» (США), модель E, снабженной интерференционной оптической системой Рэля со светофильтром Kodak 77A. Определение начальных концентраций проводили в двухсекторной границеобразующей ячейке капиллярного типа при скорости вращения 5200 об/мин. Для ускорения достижения равновесного состояния использовали метод разгона-торможения [17].

Модификация цитотоксинов. Очищенные цитотоксины восстанавливали β-меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали по известной методике [18].

Цитракоилирование 2,5 мкмоль карбоксиметилированного цитотоксина I в 3,5 мл 8 М мочевины проводили в ячейке титратора при pH 8,1 [19]. Добавляли небольшими порциями 40-кратный избыток цитраконового ангидрина в расчете на каждую свободную аминогруппу и pH смеси поддерживали около 8,1 с помощью 1 н. едкого натра. После цитракоилирования в течение 30 мин раствор сразу же обессоливали на сефадексе G-10 в 0,001 М водном растворе аммиака.

Триптический гидролиз карбоксиметилированных цитотоксинов и разделение продуктов. Триптический гидролиз 2 мкмоль цитотоксинов I и II и 2,5 мкмоль цитракоилированного цитотоксина I проводили в 0,1 М NH_4HCO_3 (pH 8,5) в течение 4 ч при 37° и отношении фермент — субстрат 1 : 100 (по весу). Затем гидролизаты упаривали на роторном испарителе и хранили при -10° .

Продукты триптического гидролиза цитотоксинов разделяли на катионообменной смоле хромобедс Р × 4 с размером зерен 22 мкм при использовании градиентного элюирования летучими пиридин-ацетатными буферами (рис. 4, 7). Регенерация смолы, приготовление колонки, получение градиента pH и концентраций описаны ранее [20]. Условия разделения: колонка 0,9 × 100 см, высота столба смолы 80 см, скорость элюирования 30 мл/ч, объем фракций 3 мл. Продукты триптического гидролиза наносили на колонку под давлением азота. Первоначально через колонку пропускали в течение 2 ч 0,2 М пиридин-ацетатный буфер, pH 3,1 (стартовый буфер). С помощью термостата в рубашке колонки поддерживали температуру 40°. Градиент I создавали, пропуская в течение 16 ч 0,5 М пиридин-ацетатный буфер, pH 5, через заполненный стартовым буфером смеситель объемом 200 мл. Затем температуру в рубашке колонки поднимали до 50° и в смеситель подавали 2 М пиридин-ацетатный буфер, pH 5,0 (градиент II) в течение 10 ч. Элюирование заканчивали, прокачивая через колонку 100 мл 0,5 М NaOH. Анализ элюата осуществляли с помощью нингидрина после щелочного гидролиза на автоматическом пептидном анализаторе «Technicon II» (США).

Разделение триптического гидролизата цитракоилированного цитотоксина I осуществляли на биогеле Р-10 (рис. 9).

Расщепление цитотоксинов I и II бромцианом и разделение пептидов. К раствору 3 мкмоль восстановленных и карбоксиметилированных цитотоксинов I и II в 5—6 мл 70%-ной муравьиной кислоты добавляли 100-кратный избыток бромциана в расчете на один остаток метионина [21]. Расщепление проводили в течение 22 ч при комнатной температуре в темноте. Затем гидролизаты разбавляли 10-кратным количеством воды, упаривали на роторном испарителе и лиофилизовали.

Продукты бромцианового гидролиза цитотоксина I разделяли на колонке с сефадексом G-25 fine в 30%-ной CH_3COOH (рис. 8). Фракцию I рехроматографировали на той же колонке в 6 М мочевины. Продукты гидролиза цитотоксина II разделяли на той же колонке в 0,1 М аммоний-

бикарбонате (рис. 5). Полученные фракции обессоливали на колонке $2,5 \times 40$ см с сефадексом G-10 в 0,001 М растворе аммиака в воде.

Химотриптический гидролиз бромцианового фрагмента цитотоксина II. К раствору 1,5 мкмоль фрагмента СВ-3 в 1,5 мл 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8,5) добавляли химотрипсин в отношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Расщепление продолжали 3,5 ч при 37° . Затем гидролизат тщательно упаривали до полного удаления солей и хранили до использования при -10° . Пептиды выделяли с помощью препаративной БХ, ТСХ или электрофореза (см. ниже).

Для выделения и очистки пептидов кроме колоночной хроматографии использовали препаративную БХ на ватмане 3 или ТСХ на целлюлозе MN-300 (пластинки 20×20 см) в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12. В ряде случаев применяли электрофорез на бумаге при рН 5, 6, напряжении 1500 В (2,5 ч) или на приборе «Savant» (США) при рН 5,6 и 6,4, напряжении 5000 В (30—45 мин). Зоны обнаруживали с помощью нингидрина. Пептиды элюировали с бумаги 20%-ной уксусной кислотой.

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот Bio-Cal BC-201, как описано ранее [20].

Определение аминокислотной последовательности. N-Концевую аминокислотную последовательность цитотоксинов определяли с помощью секвенатора 890 С «Beckman» (США) при использовании квадрольной белковой программы. Частичную последовательность С-концевого бромцианового фрагмента цитотоксина II (СВ-3) также определяли на секвенаторе, но с использованием N,N-диметилаллиламинной программы. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли на газожидкостном хроматографе GC-65 «Beckman» (США) и с помощью ТСХ. Последовательность аминокислот N-концевой части цитотоксина II и структуру пептидов определяли методом Эдмана по описанным ранее методикам [22, 23]. N-Концевую аминокислотную последовательность некоторых пептидов устанавливали с помощью аминопептидазы М [24], С-концевую аминокислотную последовательность цитотоксинов I и II и ряда пептидов — с помощью карбоксипептидаз А, В и С [25, 26] и анализа отщепленных аминокислотных остатков на аминокислотном анализаторе. При определении структуры некоторых длинных пептидов применяли дополнительный гидролиз трипсином. Полученную смесь фрагментов анализировали без разделения, используя данные по частичной аминокислотной последовательности [27].

Авторы выражают благодарность И. В. Назимову за определение аминокислотной последовательности на секвенаторе и Л. А. Ореховой за участие в ряде экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee C. Y. (1972) Annual Rev. Pharmacol., 12, 265—286.
2. Weise K. H. K., Carlsson F. H. H., Joubert F. J., Strydom D. Y. (1973) Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 354, 1317—1326.
3. Tu A. T. (1973) Annual Rev. Biochem., 42, 235—258.
4. Condrea E. (1974) Experientia, 30, 121—129.
5. Braganca B. M., Patel N. T., Badrinath P. G. (1967) Biochim. et biophys. acta, 136, 508—520.
6. Narita K., Lee C. Y. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 41, 339—343.
7. Takechi M., Sasaki T., Hajashi K. (1972) Molec. Pharmac., 8, 446—451.
8. Louw A. I. (1974) Biochim. et biophys. acta, 336, 481—495.
9. Carlsson F. H. H., Joubert F. J. (1974) Biochim. et biophys. acta, 336, 453—469.
10. Fryklund L., Eaker D. (1975) Biochemistry, 14, 2860—2871.
11. Hayashi K., Takechi M., Sasaki T., Lee C. Y. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1, 360—366.
12. Туракулов Я. X., Сорокин В. М., Ншпанходжаева С. А., Юкельсон Л. Я. (1971) Биохимия, 36, 1282—1287.

13. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Adamovich T. B., Ovchinnikov Yu. A., Yukelson L. Ya. (1974) FEBS Lett., 48, 179—183.
14. Takechi M., Hayashi K. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 49, 584—590.
15. Hartman W. W., Dreger E. E. (1973) In Organic Synthesis Coll. (Blatt A., ed.), p. 150, N. Y.
16. Andrews P. (1964) Biochem. J., 91, 222—233.
17. Hexner P. E., Radford L. E., Beams J. W. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 1848—1852.
18. Grestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) J. Biol. Chem., 238, 622—627.
19. Dixon H. B. F., Perham R. N. (1968) Biochem. J., 109, 312—314.
20. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) Биохимия, 37, 451—460.
21. Gross E. (1967) In Methods in Enzymol., XI, p. 238, Acad. Press, N. Y.— London.
22. Gray W. R. (1967) In Methods in Enzymol., XI, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.— London.
23. Sjöquist J. (1960) Biochim. et biophys. acta, 41, 20—25.
24. Light A. (1972) In Methods in Enzymol., XXV, pp. 253—262, Acad. Press, N. Y.— London.
25. Ambler R. P. (1972) In Methods in Enzymol., XXV B, pp. 143—154, 262—272, Acad. Press, N. Y.— London.
26. Tschesche H., Kupfer S. (1972) Eur. J. Biochem., 26, 33—36.
27. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикулина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) Биохимия, 37, 410—413.

Поступила в редакцию
26.II.1976

**ISOLATION, PROPERTIES AND SEQUENCE DETERMINATION OF THE
TWO CYTOTOXINS FROM THE VENOM OF THE MIDDLE-ASIAN
COBRA *NAJA NAJA OXIANA***

GRISHIN E. V., SUKHIKH A. P., ADAMOVICH T. B.,
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Two cytotoxins were isolated from the whole venom of the Middle-Asian cobra *Naja naja oxiana*. These cytotoxins exert a hemolytic, cardiotoxic and cytotoxic effects. Gel-electrophoresis and N-terminal analysis were used for the purity control. Amino acid composition and total amino acid sequence of cytotoxins were determined. The cytotoxins are shown to contain 60 amino acid residues and 4 intramolecular disulfide bonds.
