



УДК 595.796-114.52.088:577.112

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ЯДОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ТРОПИЧЕСКИХ МУРАВЬЕВ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА H^+ -АТФ-азу МИТОХОНДРИЙ

© 1995 г. Л. Г. Зайцева, В. Г. Зайцев*, Б. А. Фенюк, П. Ф. Павлов, Н. Д. Виленская, Т. В. Овчинникова*, К. А. Плужников*, Е. В. Гришин*, В. А. Гринкевич[#]

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Международный биологический центр;

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 15.09.94 г.

Проведен анализ белкового состава ядов двух видов южноамериканских жалящих муравьев подсемейства Ponerinae: *Paraponera clavata* и *Ectatomma tuberculatum*, а также муравья "tangarana". Показано, что наиболее сложным составом (не менее 15 полипептидов) обладает яд муравья *E. tuberculatum*. Установлено, что в состав водорастворимых белков ядов муравьев *P. clavata* и "tangarana" входят в основном кислые белки с pI от <3.5 до 5.2, в то время как в яде *E. tuberculatum* преобладают щелочные белки (pI от 8 до >9.5). Для ряда полипептидов проведен N-концевой анализ, и для некоторых из них определена частичная N-концевая аминокислотная последовательность. Показано, что высокомолекулярные полипептиды яда муравья *P. clavata* незначительно активируют АТФ-азную активность F_1 -АТФ-азы митохондрий, в то время как присутствующие в этом яде низкомолекулярные компоненты небелковой природы довольно сильно ингибируют АТФ-азную активность субмитохондриальных частиц и F_1 -АТФ-азы, выделенных из сердечной мышцы быка. Яды муравьев *E. tuberculatum* и "tangarana" не обладают подобным действием.

Ключевые слова: яды жалящих муравьев, белковые компоненты ядов, низкомолекулярные ингибиторы H^+ -АТФ-азы.

Использование ядов перепончатокрылых сдерживается недостаточной изученностью их химического состава. Более того, интенсивным исследованиям подвергаются в основном яды пчел и ос [1, 2], в то время как у муравьев на данный момент яды исследованы лишь для ограниченного числа видов [3].

Следует отметить, что позвоночные в несколько раз более чувствительны к действию яда многих видов жалящих муравьев, чем насекомые [4]. Так, укус жалящих муравьев из примитивного подсемейства Ponerinae (понерины) чрезвычайно болезнен для человека и может вызывать аллергические реакции, вплоть до анафилактического шока [3].

Сокращения: EtV, PcV и TV – яды муравьев *Ectatomma tuberculatum*, *Paraponera clavata* и "tangarana"; BSA – бычий сывороточный альбумин; MF_1 – каталитический сектор H^+ -АТФ-азного комплекса митохондрий сердца быка; TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин; СМЧ – субмитохондриальные частицы; трис – трис(гидроксиметил)аминометан.

[#] Автор для переписки.

Яды этих муравьев обычно представляют собой сложные гетерогенные системы, содержащие низкомолекулярные компоненты различной природы, а также пептиды и белки [3, 5], среди которых обнаружены ферменты [2] и нейротоксины [6 - 8].

Токсичность ядов некоторых муравьев понерин по отношению к мышам достаточно высока. Так, LD_{50} ядов *Paraponera clavata* (PcV) и *Ectatomma tuberculatum* (EtV) при внутрибрюшинном введении составляют 6.5 и 1.7 мкг/кг соответственно. EtV наиболее токсичен не только среди ядов различных видов муравьев, но и превосходит по токсичности яды одиночных ос и пчел [2, 3].

В настоящей работе, первой из цикла наших исследований ядов жалящих муравьев подсемейства Ponerinae (*P. clavata*, *E. tuberculatum*) и муравья "tangarana" (таксономия неизвестна, муравей назван по местному индейскому названию дерева, на котором он обитает), описан белковый состав ядов этих муравьев и их влияние на ключевой фермент системы окислительного фосфорилирования – H^+ -АТФ-азу, выделенную из митохондрий сердечной мышцы крупного рогатого скота.

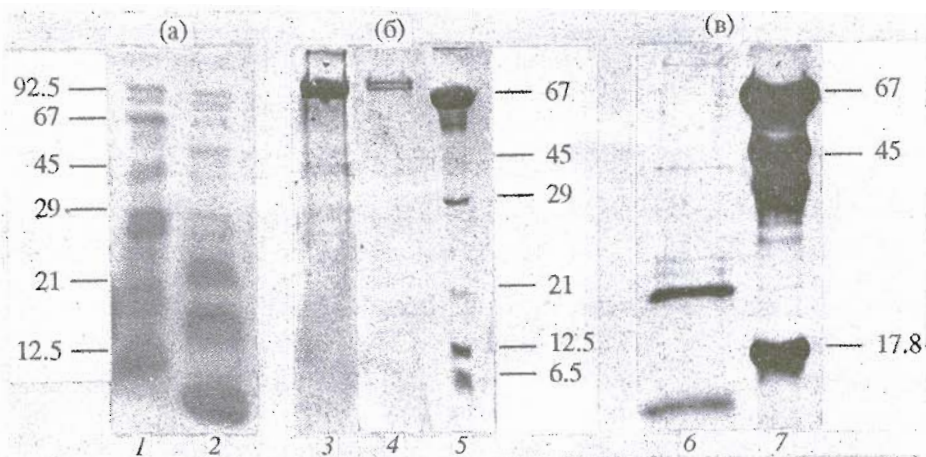


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 13.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS цельных ядов тропических муравьев: EtV (а), TV (б), PсV (в). На дорожки нанесено (мкг белка): EtV – 70 (2), TV – 20 (3) и 4 (4), PсV – 16 (6). 1, 5, 7 – белковые стандарты. В качестве стандартов использовали (*M*, кДа): фосфоорилазу В (92.5), BSA (67), овальбумин (45), карбоангидразу (29), соевый ингибитор трипсина (21), миоглобин (17.8), цитохром *c* (12.5) и ингибитор трипсина из легких быка (6.5).

Среди исследованных нами ядов наибольшее содержание белка обнаружено в EtV – около 18% массы сухого яда. PсV и TV содержат меньшее количество белка – 8 и 5% соответственно.

На первой стадии исследования для выяснения белкового состава ядов был использован аналитический SDS-электрофорез (см. “Экспер. часть”) в 13.5% ПААГ. При этом в составе EtV было обнаружено не менее 10 полипептидов с молекулярными массами от ~8 до 80 кДа (рис. 1а). Наличие такого большого количества различных полипептидов не характерно для муравьиных ядов, а свойственно скорее ядам некоторых ос [5].

Гель-хроматография EtV на колонке с сефадексом G-50 в неденатурирующих условиях показала, что полипептиды с *M* 31, 26, 25, 23.5 и 18 кДа являются индивидуальными моносубъединичными белками (рис. 2а, 2б). Кроме того, электрофоретический анализ полученных фракций позволил более точно определить полипептидный состав EtV. Так, из электрофореграмм следует (рис. 2б), что в состав фракций EtV-1 и EtV-2 входят 9 различных полипептидов (с *M* 31 – 80 кДа). Более всего (по массе) представлен полипептид с *M* 48 кДа, в меньших количествах – полипептиды с *M* 31, 45, 80, 70 и 65 кДа и в незначительных – полипептиды с *M* 42, 40 и 38 кДа. Фракция EtV-3 содержала 4 индивидуальных полипептида с *M* 26, 25, 23.5 и 18 кДа (наиболее представлены полипептиды с *M* 23.5 и 18 кДа). Во фракции EtV-4 присутствовал в основном белок эктатомин (электрофореграмма не приведена), состоящий из двух полипептидов, содержащих 37 и 34 аминокислотных остатка соответственно (структура эктатомина была установлена ранее [9]), и в незначитель-

ных количествах полипептид с *M* 18 кДа. Фракции EtV-5 – EtV-7 не содержали пептидного материала.

Таким образом, в составе EtV нами было обнаружено 15 полипептидов, различающихся по молекулярным массам. Однако большинство из них являются минорными компонентами, а более 75% белковой массы EtV (здесь и далее процентное содержание полипептидов в ядах определялось после денситометрирования соответствующих электрофореграмм – см. “Экспер. часть”) представлено полипептидами с *M* не выше 23.5 кДа.

Методом изоэлектрофокусирования в ПААГ было показано, что главные белковые компоненты фракции EtV-3 (23.5 и 18 кДа) имели изоэлектрические точки выше 9.5. Основным белком является и эктатомин – главный компонент фракции EtV-4 [9]. Как показано ранее [9], эктатомин в концентрациях 0.05 – 0.1 мкМ формирует катион-специфические каналы в клеточных и искусственных мембранах с участием двух молекул белка. Можно предположить, что белки с *M* 23.5 и 18 кДа могут также обладать высокой канало- и/или поробразующей активностью.

Основные белковые компоненты яда PсV имеют молекулярную массу 19 и 13 кДа (рис. 1в); их содержание в сумме составляет более 70% суммарного белка PсV. PсV содержит также 4 минорных компонента с *M* 90, 44, 25 и 22 кДа. Следует отметить, что в препаратах, полученных экстракцией белков фосфатно-сахарозным буфером из препарированных ядовитых желез *P. clavata*, основным компонентом был гликопротеин с *M* ~ 75 кДа, содержание которого было в 2 – 3 раза выше, чем любого другого полипептида [5]. В наших препаратах PсV белок с *M* 75 кДа отсутствовал (см. рис. 1в).

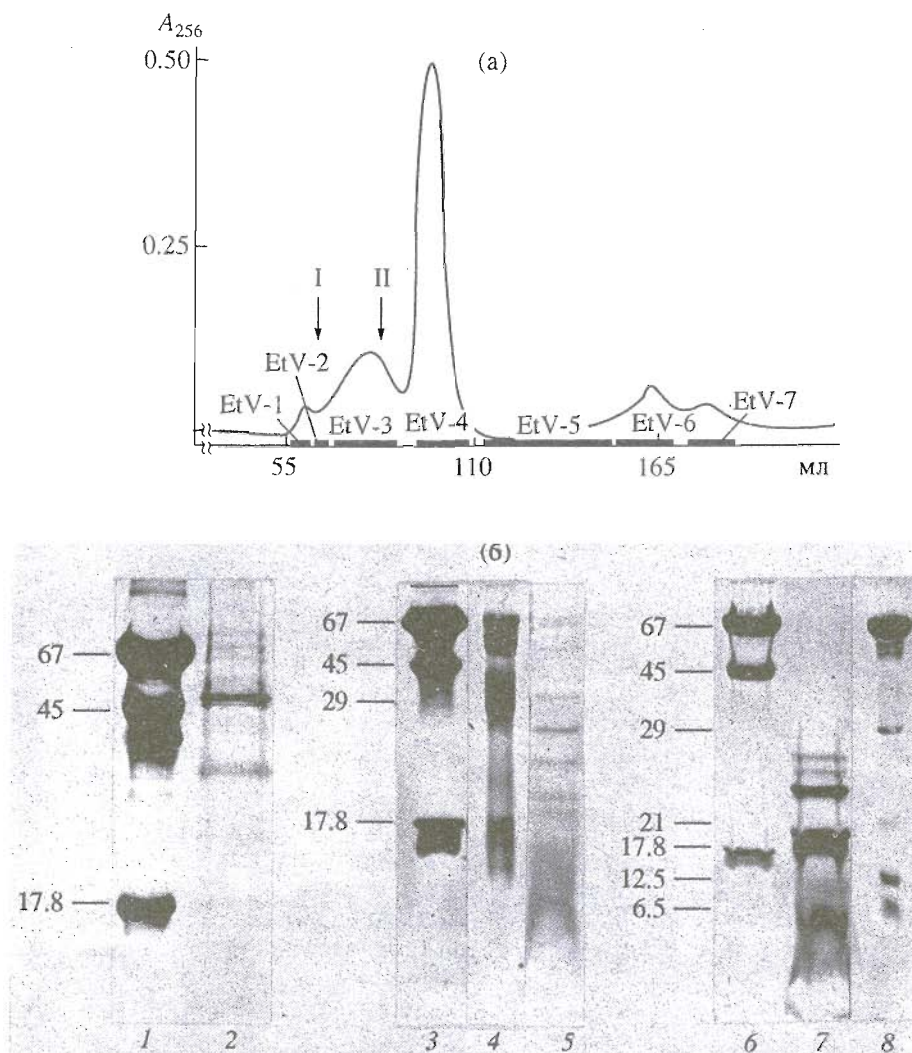


Рис. 2. Хроматография EtV на колонке (1.5 × 90 см) с сефадексом G-50 (тонкий; LKB, Швеция), уравновешенным 50 мМ бикарбонатом аммония, pH 8.0, при скорости элюции 0.42 мл/мин (а) и электрофоретический анализ полученных фракций EtV-1 (2), EtV-2 (5), EtV-3 (7) в 13.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS (б). 1, 3, 4, 6, 8 – белковые стандарты. Здесь и далее на оси абсцисс отмечены границы объединенных фракций. Стрелками указаны положения максимумов пиков белков-стандартов овальбумина (45 кДа – I) и соевого ингибитора трипсина (21 кДа – II), элюированных с данной колонки в аналогичных условиях.

Мы полагаем, что указанный гликопротеин является компонентом ядовитых желез *P. clavata*, но не входит в состав яда этого муравья.

При гель-хроматографии PcV на биогеле P-30 (область фракционирования 2.5 - 40 кДа) в неденатурирующих условиях (рис. 3) около 74% всего белка PcV элюировалось в составе фракции PcV-1. Согласно аналитическому SDS-электрофорезу, это полипептиды с M 90, 44, 25, 22 и 19 кДа. Таким образом, с большой долей вероятности можно предположить, что в состав PcV полипептид с M 18 кДа, а также полипептиды с M 22 и 25 кДа входят в виде полисубъединичных белков, состоящих из двух или более субъединиц. Причем один из самых представленных в PcV белков (M 19 кДа) является наиболее кислым и может быть легко

получен в гомогенном состоянии методом анионообменной ВЭЖХ (рис. 4, фракция PcV-1-3).

Фракция PcV-2 (рис. 3), согласно данным аналитического SDS-электрофореза (не приводятся), содержала полипептиды с $M \sim 13$ и 3 - 4 кДа. Эти полипептиды (см. рис. 3), похоже, не имеют в своем составе ароматических аминокислот Туг и Тгр. Полипептиды с M 3 - 4 кДа присутствуют в PcV в незначительных количествах и на электрофореграмме цельного яда *P. clavata* (рис. 1в) практически незаметны.

Фракции PcV-3 - PcV-5 содержали низкомолекулярные вещества непептидной природы, которые, по данным Плужникова и соавт. [8], являются ацилированными и фосфорилированными производными димера N-ацетилглюкозамина,

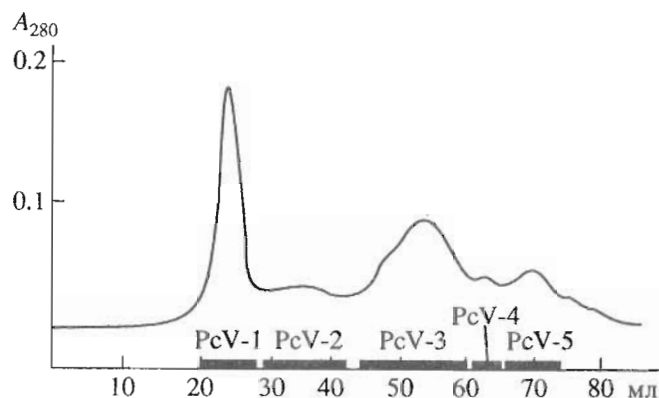


Рис. 3. Хроматография PcV на колонке (1 × 90 см) с биогелем P-30 (тонкий) (BRL, США), уравновешенным 20 мМ бикарбонатом аммония, pH 8.0. Скорость элюции 10 мл/ч, $V_0 \approx 24$ мл.

содержащими ковалентно связанный остаток урацила.

Недавно была опубликована первичная структура понеротоксина, который состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 25 аминокислотных остатков ($M \sim 2.6$ кДа) [6]. Таким образом, можно заключить, что в состав белков PcV входят не менее 7 различных полипептидов.

Изоэлектрическое фокусирование цельного яда PcV показало наличие в нем преимущественно кислых (pI 4.4 - 5.2) и одного слабоосновного (pI 7.3) водорастворимых белков.

Яд муравья "tangarana" по своему белковому составу стоит особняком от всех остальных изученных к настоящему времени муравьиных ядов [5]. Его характерная особенность - наличие двух высокомолекулярных полипептидов с M 83 и 75 кДа, на долю которых приходится около 80% белковой массы яда. Кроме того, в яде в очень незначительных количествах присутствует ряд полипептидов с $M \sim 45, 20$ кДа и ниже (рис. 1б).

Методом гель-хроматографии на Superose 12 в неденатурирующих условиях (высокомолекулярные полипептиды с M 83 и 75 кДа в этих условиях практически нерастворимы) было показано, что низкомолекулярная белковая фракция TV наиболее представлена белком с M 7 кДа (фр. TV-4, рис. 5). Фракции TV-5 - TV-7, согласно данным SDS-электрофореза, не содержали пептидного материала.

Изоэлектрическое фокусирование водорастворимых белковых компонентов TV показало наличие среди них очень кислого белка с $pI < 3.5$ и следовые количества слабоосновного белка с pI 7.4. Белки, содержащие доминирующие полипептиды с M 83 и 75 кДа, были нерастворимы в условиях изоэлектрического фокусирования.

Нами были определены N-концевые аминокислотные последовательности ряда полипептидов, входящих в состав ядов жалоносных муравьев *E. tuberculatum*, *P. clavata* и "tangarana". К сожалению, мы не располагали достаточными количествами ядов, для того чтобы выделять индивидуальные

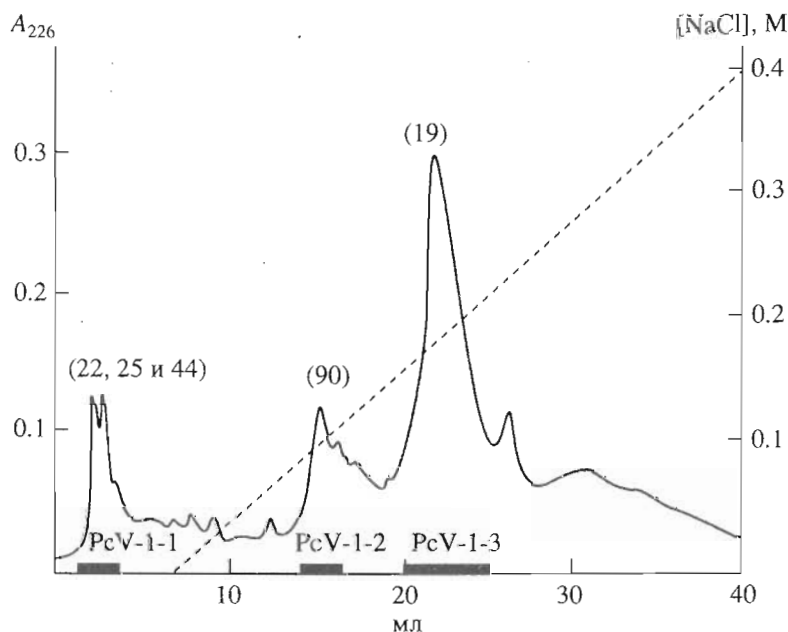


Рис. 4. Фракционирование PcV-1 (см. рис. 3) при помощи ионообменной ВЭЖХ на колонке (7.5 × 25 мм) DEAE-Sphergel TSK в градиенте концентрации NaCl в буфере, содержащем 15 мМ трис-HCl, pH 8.0. Скорость элюции 0.5 мл/мин. Штриховая линия обозначает изменение концентрации NaCl. Цифрами в скобках указана мол. масса (кДа) основного полипептида/ов соответствующей фракции (с. разделено аналитическим SDS-электрофорезом).

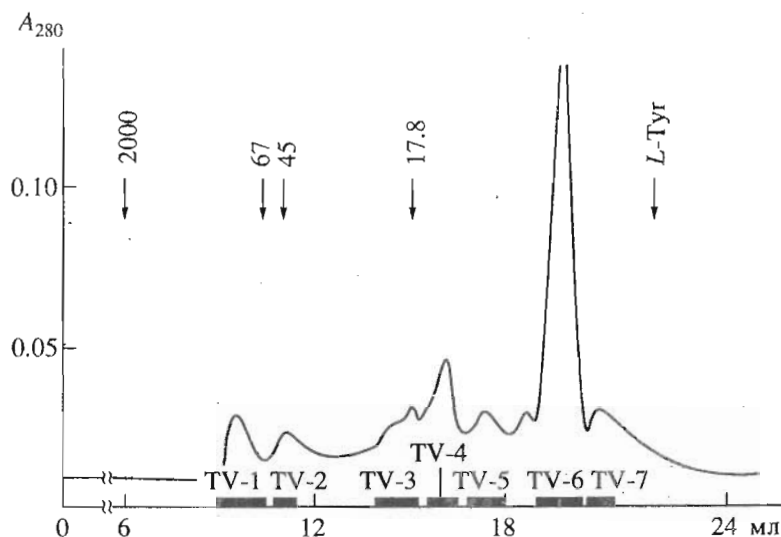


Рис. 5. Хроматография TV на колонке (1 × 30 см) с Superose 12 (Pharmacia, Швеция), уравновешенной буфером, содержащим 20 мМ трис-НСl, pH 7.5. Скорость элюции 18 мл/ч. Стрелками указаны положения стандартов, цифрами – их мол. массы (кДа).

белковые компоненты общепринятыми хроматографическими методами. Поэтому разделение цельных ядов проводили с помощью препаративного электрофореза в ПААГ в присутствии 0.1% SDS (см. “Экспер. часть”). В этом случае фракция полипептидов с $M \sim 13$ кДа (рис. 1в) была разделена на две фракции – с M 12.4 и 10 кДа (электрофореграмма не приводится).

Затем с помощью электроблоттинга белки переносили на PVDF-мембрану. Следует отметить, что в выбранных нами условиях в случае PcV белок с M 90 кДа практически не переносился, а белок с M 10 кДа, как и высокомолекулярные белки яда муравья “tangarana”, переносился только частично (~30 - 40%).

Полосы, визуально соответствующие индивидуальным полипептидам, вырезали и для этих полипептидов определяли N-концевую аминокислотный остаток и частичную N-концевую аминокислотную последовательность.

Как видно из табл. 1, N-концевые аминокислотные остатки белков с M 26, 25, 23.5 и 18 кДа фракции EtV-3 (рис. 2а, 2б), вероятно, модифицированы. Природа химической модификации α -NH₂-групп этих аминокислотных остатков нами пока не установлена. N-Концевые остатки белков фракций EtV-1 и EtV-2 не удалось определить из-за низкого содержания соответствующих полипептидов в этих фракциях.

Защищенные α -аминогруппы N-концевых остатков, вероятно, имеют также основные компоненты яда муравья “tangarana” (с M 83 и 75 кДа), а также полипептиды с M 44 и 19 кДа из яда *P. clavata*.

Секвенирование белка, соответствующего полюсе 12.4 кДа яда *P. clavata*, показало наличие двух полипептидов с N-концевыми последовательностями: Lys-Leu-Gly-Ile-Ser-Pro (полипептид 1) и Arg-Lys-Leu-Leu-Gly-Met- (полипептид 2) в соотношении (2 - 3) : 1. Полоса, соответствующая 10 кДа,

Таблица 1. N-Концевой анализ некоторых полипептидов EtV, PcV и TV

Яд	Полипептид, М, кДа	N-Концевая последовательность*	Яд	Полипептид, М, кДа	N-Концевая последовательность*
EtV	80	н	PcV	90	н
	70	н		44	б
	65	н		25	н
	48	н		22	н
	45	н		19	б
	42	н		12.4	K-L-G-I-S-P-
	40	н		12.4	R-K-L-L-G-M-
	38	н		10	M-R-T-
	31	н		2.7 ^{3*}	F-L-P-L-
	26	б			
	25	б		TV	83
23.5	б	75	б		
18	б	45	н		
8 ^{2*}	G-V-I-P-	20	н		
	W-S-T-I-	7 ^{4*}	н		

* н – не определяли; б – N-концевой остаток блокирован.

^{2*} Эктатомин [9].

^{3*} Понеротоксин [6].

^{4*} Полипептидный состав неизвестен.

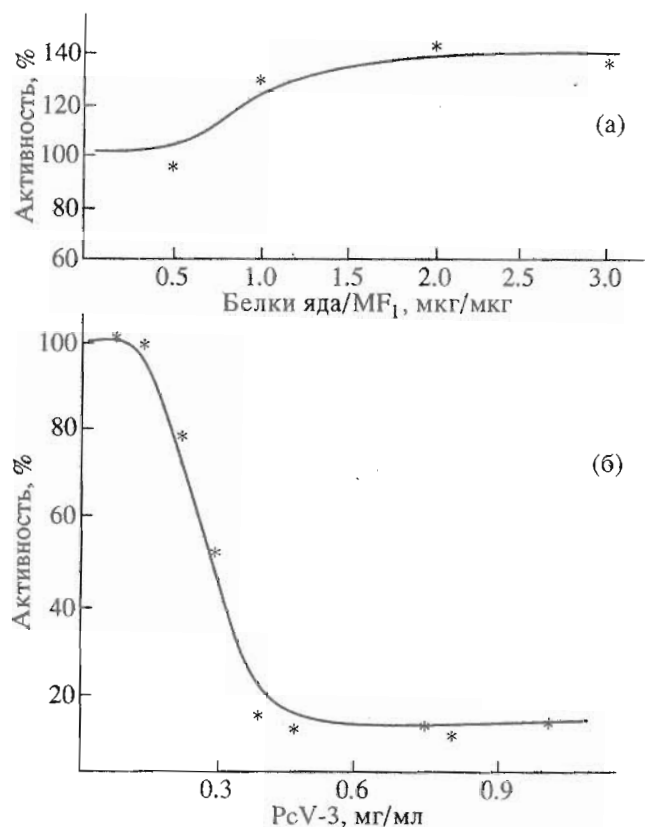


Рис. 6. Влияние на каталитическую активность MF_1 различных компонентов PcV: белков фракции PcV-1 (а) и низкомолекулярных веществ небелковой природы (фракция PcV-3) (б). Концентрация АТФ (мМ): а – 1; б – 4. Время предварительной инкубации MF_1 с компонентами яда (мин): а – 5; б – 25.

содержала индивидуальный полипептид с N-концевой последовательностью Met-Arg-Thr- (табл. 1). Таким образом, в состав белковой фракции PcV входят не менее 9 полипептидов: 90, 44, 25, 22, 19, два по 12,4, 10 кДа и понеротоксин (2,7 кДа).

Следует отметить, что одной из возможных мишеней биологического действия ядов перепончатокрылых являются митохондрии и, в частности, система окислительного фосфорилирования. Так, например, показано [10], что яд *Vespa orientalis* подавляет окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс.

Таблица 2. Влияние ядов тропических муравьев на H^+ -АТФ-азную активность СМЧ

Добавленный яд*	Относительная АТФ-азная активность, %
–	100
TV	99.8
EtV	97.6
PcV	65

* Яд был добавлен в концентрации 0,3 мг сухого веса/мл.

Нами было исследовано влияние рассматриваемых ядов муравьев на каталитическую активность ключевого фермента системы окислительного фосфорилирования – H^+ -АТФ-азы митохондрий сердца быка (табл. 2). EtV и TV, как можно видеть, не оказывают какого-либо влияния на АТФ-азную активность СМЧ, в то время как PcV заметно ее ингибирует. Для предварительного решения вопроса о том, какие компоненты PcV определяют ингибирующую активность этого яда в отношении митохондриальной H^+ -АТФ-азы, нами было исследовано влияние различных фракций PcV, полученных после гель-хроматографии (рис. 3), на АТФ-азную активность каталитического сектора H^+ -АТФ-азного комплекса митохондрий сердца быка (MF_1). Полученные нами данные (рис. 6б) убедительно показывают, что сильной ингибирующей активностью обладают низкомолекулярные вещества непептидной природы (PcV-3, рис. 3). Интересно, что белки фракции PcV-1 заметно стимулируют АТФ-азную активность MF_1 (рис. 6а).

В настоящее время мы проводим дальнейшие, более подробные исследования биологической активности отдельных компонентов ядов вышеуказанных тропических муравьев (результаты будут опубликованы в последующих статьях).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы: акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, метанол (Merck, ФРГ); бикарбонат аммония, SDS, кумасси G-250 и R-250, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, L-тирозин, белковые стандарты № 4, 5, 9 и Kit MS II, BSA (фракция V) (Serva, ФРГ); АТФ (динатриевая соль), β -меркаптоэтанол, TEMED, глицин (Reanal, Венгрия); NaOH (Lachema, Чехословакия); H_3PO_4 (85%) (VEB Labochemie Apola, ГДР); NADH (натриевая соль), реагент Фиске-Суббароу (Sigma, США). Все остальные реагенты – отечественного производства квалификации не ниже х. ч.

Муравьи были собраны в амазонской сельве (департамент Укаяли, Перу). Цельный яд получали с помощью тактильной стимуляции муравьев и собирали в губку. После экстракции 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером (рН 8,1) яд дважды лиофилизировали.

Митохондрии из сердца быка выделяли так, как описано в работе [11]. СМЧ получали согласно [12]. MF_1 выделяли по методу [13].

Яды EtV, PcV и TV фракционировали с помощью гельпроникающей хроматографии, используя седафекс G-50 (тонкий; LKB, Швеция) (см. рис. 2а), биогель Р-30 (тонкий; BRL, США) (см. рис. 3) и кросс-сшитую агарозу Superose 12 (Pharmacia, Швеция) (см. рис. 5).

Ионообменную ВЭЖХ проводили на колонке (7.5 × 25 мм) DEAE-Spherogel TSK (Beckman, США) (см. рис. 4). Отобранные фракции перед дальнейшим использованием подвергали обессоливанию на колонке HR 10/10 (Pharmacia, Швеция).

Изоэлектрическое фокусирование в ПААГ осуществляли на пластинках Ampholine PAGplate 1804-101 (245 × 110 × 1 мм; pH 3.5 - 9.5; LKB, Швеция) в системе Multiphor (LKB, Швеция). В качестве катодного буфера использовали 1 М NaOH, а в качестве анодного – 1 М H₃PO₄. Образцы растворяли в деионизованной воде и наносили из расчета 20 - 40 мкг белка на полосу. Изоэлектрическое фокусирование проводили 90 мин при температуре охлаждающей плиты 10°C. В течение первых 30 мин поддерживался постоянный ток (50 мА), затем ему давали падать до 15 мА. После окончания процесса пластинку помещали на 1 ч в фиксирующий раствор, содержащий 10.5% трихлоруксусной и 3.5% сульфосалициловой кислоты. Пластинку окрашивали 10 мин при 60°C в 0.115% растворе кумасси R-250 в смеси этанол-уксусная кислота-вода, 25 : 8 : 67. Затем пластинку обесцвечивали 12 - 24 ч при 20°C в смеси этанол-уксусная кислота-вода, 25 : 8 : 67. В качестве стандартов для определения изоэлектрических точек использовали белковые стандарты фирмы Pharmacia (Швеция).

Аналитический SDS-электрофорез в ПААГ белковых компонентов ядов и фракций ядов осуществляли по методу Лэммли [14] на приборе Midget Sistem (LKB, Швеция). Необходимые буферные растворы готовили согласно прилагаемым фирмой прописям.

Препаративный SDS-электрофорез белковых компонентов ядов. Цельный яд *P. clavata* и "tanganana" в количествах 30 и 50 мкг (по белку) соответственно и 8 мкг фракции EtV-3 (см. рис. 2а) яда *E. tuberculatum* наносили на дорожку шириной 5 мм приготовленного за сутки 13.5% ПААГ (120 × 150 × 0.75 мм). Форез вели по методу Лэммли [14] в течение 3 ч при силе тока 20 мА.

Денситометрию электрофореграмм проводили на лазерном денситометре модели 2202 Multiscan (LKB, Швеция) с интегратором модели 2220 (LKB, Швеция).

Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд [15], используя в качестве стандарта BSA.

Перенос полипептидов с ПААГ на поливинилдендифторидные мембраны (PVDF-мембраны) (Immobilon Transfer, Millipore, США) для последующего определения N-концевой аминокислотной последовательности проводили на приборе Midget Multiblott (LKB, Швеция) при силе тока 200 мА в течение 1.5 ч в буфере, содержащем 20 мМ Na₂V₄O₇, pH 9.5. После переноса мембрану промывали деионизованной водой, окрашивали 0.1% раствором кумасси G-250 в 50% метаноле и обес-

цвечивали раствором, содержащим 50% метанола и 10% уксусной кислоты. Полосы, соответствующие белку, вырезали и хранили при -20°C.

N-Концевые аминокислотные остатки полипептидов в виде их дансильных производных определяли так же, как в работе [16].

Для анализа N-концевой аминокислотной последовательности белка фрагменты PVDF-мембраны, содержащие примерно 300 пмоль белка, помещали в ячейку секвенатора (модель 477A, Applied Biosystems, США). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот разделяли ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Microsil C-18 (Macherey-Nagel, ФРГ).

H⁺-АТФ-азную активность СМЧ измеряли по количеству высвобождающегося неорганического фосфата. Для этого 5 мкл суспензии СМЧ (150 мкг белка) смешивали с 85 мкл среды инкубации, содержащей 10 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-НСl (pH 7.5) и 10 мкл воды или раствора анализируемых веществ, и инкубировали 30 мин при 20°C. Затем к смеси добавляли 10 мкл 0.1 М АТФ (pH 7.5) и инкубировали 8 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50% трихлоруксусной кислоты, после чего неорганический фосфат определяли по методу, описанному в работе [17].

H⁺-АТФ-азную активность MF₁ измеряли спектрофотометрически при 340 нм в сопряженной ферментативной реакции по скорости убывания поглощения NADH при 20°C [18].

Авторы выражают благодарность Н.И. Хорошиловой и Ю.Ф. Леоновой (ИБХ РАН, Москва) за определение N-концевых аминокислотных последовательностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt J.O., Blum M.S., Overall V.L. // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 1984. V. 1. P. 155 - 166.
2. Schmidt J.O., Blum M.S., Overall V.L. // Toxicon. 1986. V. 24. P. 907 - 911.
3. Blum M.S. // J. Toxicol. - Toxin Reviews. 1992. V. 11. P. 115 - 164.
4. Schmidt J.O. // Toxicon. 1990. V. 28. P. 622.
5. Leluk J., Schmidt J., Jones D. // Toxicon. 1989. V. 27. P. 105 - 114.
6. Piek T., Hue B., Mantel P., Nakajima T., Schmidt J.O. // Comp. Biochem. Physiol. C. 1991. V. 99. P. 481 - 486.
7. Piek T., Duval A., Hue B., Karst H., Lapied B., Mantel P., Nakajima T., Pelhate M., Schmidt J.O. // Comp. Biochem. Physiol. C. 1991. V. 99. P. 487 - 495.
8. Pluzhnikov K.A., Arseniev A.S., Grishin E.V. // Toxicon. 1991. V. 29. P. 294.
9. Плужников К.А., Нольде Д.Е., Тертышников С.М., Суханов С.В., Соболев А.Г., Торгов М.Ю., Филиппов А.К., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. // Биоорганическая химия. 1994, Т. 20. С. 857 - 871.

10. Barr-Nea L., Shahar D., Ishay J. // *Toxicon*. 1988. V. 26. P. 16.
11. Crane G., Green D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1959. V. 22. P. 475 - 481.
12. Racker E., Fessenden R. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 2482 - 2487.
13. Horstman L.L., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 1336 - 1344.
14. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
15. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248 - 254.
16. Гринкевич В.А., Арзамазова Н.М., Потапенко Н.А., Гринкевич Х.А., Кравченко З.Б., Фейгина М.Ю., Алданова Н.А. // *Биооргани. химия*. 1979. Т. 5. С. 1757 - 1774.
17. Fiske C.H., Subbarow Y. // *J. Biol. Chem.* 1925. V. 66. P. 375 - 400.
18. Laikind P.K., Allison W.S. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 11700 - 11704.

Protein Components of Tropical Ant Venoms and Their Effect on Mitochondrial H⁺-ATPase

L. G. Zaitseva*, V. G. Zaitsev**, B. A. Fenyuk*, P. F. Pavlov*, N. D. Vilenskaya*,
T. V. Ovchinnikova**, K. A. Pluzhnikov**, E. V. Grishin**, and V. A. Grinkevich*¹

* *International Biological Center, Biological Faculty, Moscow State University, 119899 Russia*

** *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Abstract – Protein compositions of venoms of South-American stinging ants, *Ectatomma tuberculatum*, *Paraponera clavata* (subfamily Ponerinae), and “tangarana” were analyzed. The venom of *E. tuberculatum* displayed the most complex protein composition (more than 15 polypeptides). The water-soluble fraction of the venoms of *P. clavata* and “tangarana” contained acidic proteins ($pI < 3.5$ to 5.2), whereas the venom of *E. tuberculatum* contained predominantly basic proteins ($pI 8$ to >9.5). N-Terminal residues and N-terminal sequences of a number of polypeptides were determined. High-molecular-mass polypeptides of the *P. clavata* venom slightly stimulated the ATPase activity of mitochondrial F₁-ATPase. Low-molecular-mass nonprotein components of this venom significantly inhibited the ATPase activity of submitochondrial particles and F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. The venoms of *E. tuberculatum* and “tangarana” produced no effect on the ATPase activity.

Key words: venoms of stinging ants, protein components of venoms, low-molecular-mass H⁺-ATPase inhibitors.

¹ To whom correspondence should be addressed.