



УДК 577.112.5:615.919:595.44-114.52.088

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ НЕЙРОТОКСИНОВ СКОРПИОНА *Orthochirus scrobiculosus* РАЗНЫХ АРЕАЛОВ ОБИТАНИЯ

© 1999 г. А. В. Липкин<sup>#</sup>, Е. В. ГришинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 05.11.98 г. Принята к печати 18.01.99 г.

Для изучения варибельности структуры нейротоксина Os3 из яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*, обитающего в Узбекистане и Туркмении, разработан метод клонирования семейств кДНК, кодирующих группу высокомолекулярных Os3-подобных полипептидов. Показано, что в состав "туркменского" яда *O. scrobiculosus* входит семейство близкородственных Os3-подобных полипептидов. С помощью масс-спектрометрического анализа цельных ядов скорпионов *O. scrobiculosus* из двух регионов Средней Азии доказано, что в них в зависимости от ареала обитания скорпиона, присутствуют различающиеся по аминокислотному составу токсические компоненты.

*Ключевые слова:* скорпион; токсин; клонирование.

Природные токсины являются ценными инструментами исследования функций биологических систем на молекулярном уровне. Особую группу составляют нейротоксины, с высокой специфичностью воздействующие на те или иные компоненты нервной системы. Их изучение оказало огромное влияние на прогресс в области нейронаук, позволило идентифицировать и охарактеризовать ионные каналы, нейрорецепторы и другие белки.

Нейротоксины из яда скорпионов известны своей способностью специфически воздействовать на функционирование различных ионных каналов. Особенно хорошо изучены токсины, влияющие на быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран и увеличивающие время их инактивации. Данные нейротоксины представляют собой полипептиды молекулярной массы около 7 кДа, обычно содержащие четыре внутримолекулярные дисульфидные связи [1]. Подобная молекулярная организация обеспечивает высокую устойчивость и стабильность нейротоксинов в растворах денатурирующих веществ. Первичная структура большинства токсинов определена методами белковой химии [1]. Молекулярное клонирование ряда токсинов скорпионов выявило некоторые особенности их структурной организации. Так, большинство из них синтезируется в виде препротоксина. N-Концевой сигнальный пептид, состоящий из 19–21 а.о., необходим для секреции токсина из клетки [2–4]. Иногда наблюдается дополнительный этап процессинга, состоящий в удалении от

одного до трех C-концевых аминокислотных остатков и, сопровождаемый в некоторых случаях амидированием C-концевого остатка [5, 6]. Функциональная роль C-концевого процессинга не ясна, однако можно предположить, что удаляется еще одна сигнальная последовательность, необходимая для правильной транспортировки токсинов в клетке.

Из яда черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*, обитающего на территории Узбекистана, были выделены четыре нейротоксина, вызывающих замедление скорости инактивации натриевого канала [1]. Для двух из них (токсины Os3 и Os1) методами белковой химии определена первичная структура [1, 7].

Аналогичный вид скорпиона обитает на территории Туркмении. Однако в библиотеке кДНК туркменского черного скорпиона в предварительных исследованиях не был обнаружен ген, кодирующий токсин Os3, что позволило предположить варибельность полипептидного состава ядовитого секрета черного скорпиона *O. scrobiculosus* в зависимости от ареала его обитания.

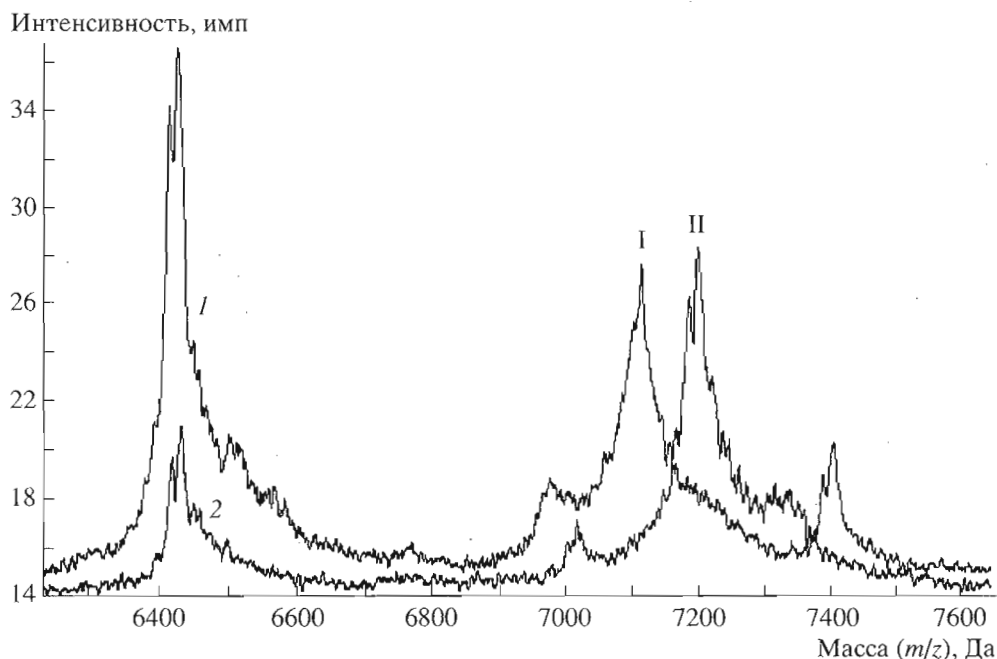
Подтверждению правильности этого предположения посвящена данная работа.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для работы использованы особи среднеазиатского скорпиона *O. scrobiculosus*, собранные в весенний период на территории Узбекистана и Туркмении. Цельный яд скорпионов исследовали методом масс-спектрометрии. Анализ масс-спектрометрических данных показал, что в составе токсических компонентов ядов в области молеку-

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; X-Gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид.

<sup>#</sup>Автор для переписки: (тел.: (095) 336-40-22; факс: (095) 330-73-01; e-mail: lipus@ibch.siobc.ras.ru).



**Рис. 1.** Масс-спектр цельных ядов скорпионов *O. scrobiculosus*, собранных на территории Узбекистана (1) и Туркмении (2). Молекулярная масса нативного токсина Os3, рассчитанная из первичной аминокислотной последовательности [1] – 7096 Да. Молекулярные массы Os3R-1, Os3R-2, Os3R-3 и Os3R-4, рассчитанные из выведенных аминокислотных последовательностей – 7125.8, 7139.7, 7209.7, 7312.9 Да, соответственно.

лярных масс от 6950 до 7550 Да, характерных для токсинов, действующих на  $\text{Na}^+$ -каналы [1, 7] наблюдаются очевидные различия в составе (рис. 1, пики I и II). Токсические компоненты из яда черного туркменского скорпиона имеют больший молекулярный вес, чем из яда узбекского скорпиона. Эта разница примерно в 80–120 Да хорошо видна на рис. 1. Данное обстоятельство, по-видимому, свидетельствует о том, что узбекские и туркменские скорпионы секретируют разные полипептидные токсины. Для подтверждения этого предположения было проведено сравнение структуры токсина Os3 из яда узбекского скорпиона [1] и его ближайших гомологов из яда туркменского скорпиона. С этой целью осуществлено клонирование кДНК туркменского скорпиона *O. scrobiculosus*, кодирующих близкородственные токсину Os3 гомологи.

После отбора цельного яда методом электро-стимуляции скорпионы содержались в отдельных коробках 2 сут. За это время происходил усиленный синтез мРНК, кодирующей полипептидные токсины, содержащиеся в ядовитом секрете. По истечении данного периода тельсоны скорпионов препарировали и замораживали в жидком азоте. Замороженные тельсоны использовали для получения  $\text{poly}(\text{A})^+$ -мРНК методом двухстадийной аффинной хроматографии тотальной РНК на  $\text{oligo}(\text{dT})$ -целлюлозе. Синтез первой цепи кДНК проводили на основе  $\text{poly}(\text{A})^+$ -мРНК с помощью обратной транскриптазы *M-MLV* со

специфическим праймером RoRidT [8], содержащим кроме  $(\text{dT})_{17}$ -последовательности сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, удобных для последующего клонирования (таблица).

кДНК, кодирующую Os3 – близкородственные токсины, получали методом ПЦР. Синтезированную первую цепь кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР. В качестве затравок взяты вырожденный олигонуклеотидный праймер P1, синтезированный на основе N-концевой аминокислотной последовательности токсина Os3 узбекского скорпиона [1], и специфический олигонуклеотидный праймер Ro [8], входящий в состав праймера RoRidT (таблица). При конструировании праймера P1 для снижения вырожденности использовали таблицу частоты встречаемости кодонов, составленную нами на основе известных генов скорпионов (не приведена). Данные этой таблицы учитывались при конструировании 5'-концевой области праймера, а для 3'-концевой области были синтезированы все возможные варианты кодонов, т.к. для безошибочной работы *Taq*-полимеразы важна 100%-ая комплементарность матрицы и праймера именно в 3'-концевой области последнего. Для выбора оптимальных температурных параметров реакции проводили несколько ПЦР с последовательным понижением температуры отжига праймеров от 60 до 40°C. При электрофоретическом анализе продуктов этих реакций обнаружили, что наиболее эффективная амплификация фрагмента ожидаемой длины (около 310 п. о.)

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

Праймер	Структура (5' → 3')
RoRidT [8]	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTC(T) <sub>17</sub>
Ro [8]	<p><i>Cla</i>I      <i>Sal</i>I      <i>Sph</i>I      <i>Bam</i>HI      <i>Hind</i>III      <i>Eco</i>RI      <i>Sac</i>I</p> ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCC 1                    5                    10 GlyValArgAspGlyTyrIleAlaGlnPro-
P1*	GGGGTAAGGGACGGGTATATAGCGCAGCC A    C    T    A    A T            C    T C                    C

\* Приведена N-концевая аминокислотная последовательность токсина Os3 черного узбекского скорпиона [1], на основе которой синтезирован праймер P1.

наблюдается при температуре отжига 45°C, причем неспецифической амплификации при этой температуре практически не происходит.

Известно [9], что *Taq*-ДНК-полимераза обладает свойством нематричного 3'-концевого синтеза. В результате значительное количество продуктов ПЦР содержат на 3'-конце дополнительный остаток аденина. Это и тот факт, что все эти фрагменты кДНК не содержат на 5'-концах фосфатные группы, затрудняет их непосредственное клонирование по тупым концам. Поэтому мы при получении продукта ПЦР обрабатывали его фрагментом Кленова и T4-полинуклеотидкиназой. После завершения реакции реакцию смесь разделяли электрофорезом в агарозном геле, из которого затем выделяли ДНК длиной 310 п. о.

Полученный в результате амплификации фрагмент клонировали по тупым концам в плазмидный вектор pBlueScriptII SK+, обработанный эндонуклеазами рестрикции *Eco*RV и *Hinc*II, и для предотвращения самолигирования вектора, – щелочной фосфатазой из кишечника теленка. Реконбиантные клоны *E. coli* штамма XL1-Blue отбирали при помощи сине-голубой селекции на среде, содержащей X-Gal и IPTG.

Для подтверждения наличия в отобранных клонных реконбиантной вставки определенной длины применяли метод ПЦР “на колониях” с использованием универсальных праймеров. Отобранные этим методом клоны далее секвенировали по методу Сенгера [10, 11]. Определение последовательности реконбиантной вставки выявило клоны, содержащие высокогомологичные кДНК, кодирующие Os3-подобные полипептиды.

Полученные кДНК мы назвали семейством *os3r*, а отдельные кДНК – *os3r-1*, *os3r-2*, *os3r-3*, *os3r-4*, соответственно (рис. 2). Доказательством того, что каждая из структур кДНК реальна, а не продукт ошибки ПЦР является наличие не менее трех независимых клонов для каждой из приве-

денных четырех структур кДНК. Другим доказательством может служить сравнение нуклеотидных последовательностей генов семейства *os3r*, показывающее, что различные точечные замены нуклеотидов равномерно распределены вдоль всей цепи кДНК и полностью отсутствуют в области сигнала полиаденилирования (фрагмент 250-280). Все кДНК из семейства *os3r* состоят из нуклеотидной последовательности, кодирующей в открытой рамке считывания 69 а.о., и 3'-нетранслируемой области, содержащей сигнал полиаденилирования ААТAAA, а также саму poly(A)-область. На рис. 2 также представлена наиболее гомологичная с *os3r* нуклеотидная последовательность кДНК *butXIV*, кодирующая токсин из яда скорпиона *Buthus occitanus* [12]. Сравнение этих последовательностей позволяет выявить несколько основных особенностей, характерных для семейства *os3r*: гены этого семейства – близкородственны; они могли образоваться в результате дупликации родового гена (гена предшественника) и каждая такая дублированная копия могла эволюционировать независимо. Другим важным наблюдением является то, что уровни гомологии структур кДНК *O. scrobiculosus* и *B. occitanus* различны в разных участках последовательностей. Наибольшая гомология наблюдается для структур, кодирующих аминокислотные последовательности зрелых токсинов, тогда как гомология для 3'-некодирующих последовательностей несколько ниже. Однако в районе сигнала полиаденилирования наблюдается удивительный консерватизм. Среди кДНК семейства *os3r* наибольшей степенью гомологии с кДНК *butXIV* обладает структура кДНК *os3r-4*.

Из сравнения аминокислотных последовательностей представителей семейства Os3R, выведенных из кДНК, со структурой токсина Os3 [1], полученной ранее методами белковой химии, а также со структурами наиболее близкородственных

<i>osr3-1</i>	10	G G G G T A A G G G A C G G G T A C A T A G C G C A G C C C A C A A C T G T G T A T A C C C A T T G T T T T C C A G G G	60
<i>osr3-2</i>	20	G G G T A A G G G A C G G G T A C A T T G C C G C A G C C C C A C A A C T G T G T A T T T T C C A G G G	
<i>osr3-3</i>	30	G G G T A A G G G A C G G G T A C A T T G C C G C A G C C C C A C A A C T G T G T A T T C C A G G G	
<i>osr3-4</i>	40	G G G T A A G G G A C G G G T A C A T A G C G C A G C C C C A C A A C T G T G C A T A C C A T T G T C T T C A A T T C	
<i>butXIV</i>	50	G T A C G T G A C G G T A T A T T G C C C A G C C C C A T A C C C A T T G T T A A A A A T C	
<i>osr3-1</i>	70	T C T T C A G G T T G T G A C A C A T T A T G T A A G G A G A A C G G G G C T A C C G A A G G C T C A T G C C G G A T T T	120
<i>osr3-2</i>	80	T C T T C A G G T T G T G A C A C A T T A T G T A A G G A G A A C G G G G C T A C C G A A G G C T C A T G C C G G A T T T	
<i>osr3-3</i>	90	T C T T C A G G T T G T G A C A C A T T A T G T A A G G A G A A C G G G G C T A C C G A A G G C T A T G C C G G A T T T	
<i>osr3-4</i>	100	T C T T C A G G T T G T G A C A C A T T A T G T A A G G A G A A C G G G G C T A C C A G A G G C G A A T G C C G G A C A T	
<i>butXIV</i>	110	T C C T C A G G C T G C G A C A C T T T A T G T A A G G A G A A C G G G T G C T A C G A G T G G C C A C T G C C G G A C A T	
<i>osr3-1</i>	130	A T A C T T G G A C C G G G A A C T G C C T G C T G G T G C A A A G A C T T G C C C G A T A G A G T A G G G A T T A T A	180
<i>osr3-2</i>	140	A T A C T T G G A C C G G G A A C T G C C T G C T G G T G C A A A G A C T T G C C C G A T A G A G T A G G G A T T A T A	
<i>osr3-3</i>	150	A A A C T T G G A C C G G G A A C T G C C T G C T G G T G C A A A G A C T T G C C C G A T A G A G T A G G G A T T A T A	
<i>osr3-4</i>	160	A A A T G G G G A C A T G G A A G T G C C T G C T G G T G C A A A G A C T T G C C C G A T A G A G T A G G A T T A T A	
<i>butXIV</i>	170	A A A T C T G G A C A C C G G A A G T G C C T G C T G G T G C A A A G A C T T G C C A G A T A A A G T A G G G A T T A T A	
<i>osr3-1</i>	190	G T A G A G G G A G A A A T G C C A T A G C G G C T A A A C C T G T A G A G C A A A C S A A G A A G A A T A T A T C	240
<i>osr3-2</i>	200	A T A G A G G G A G A A A T G C C A T A G C G G C T A A A C C T G T A G A G C A A A A C A A A G A A G A A T A T A T C	
<i>osr3-3</i>	210	G T A G A G G G A G A A A T G C C A T A G C G C C T A A A C C T G T A G A G C A A A C S A A G A A T A T A T C	
<i>osr3-4</i>	220	G T A G A G G G A G A A A T G C C A T A G C G C C T A A A C C T G T A G A G C A A A A C S A A G A A T A T A T C	
<i>butXIV</i>	230	G T A C A A G G A G A A A A T G C C A T C G C T G A T A A G S A A A A C C S A A A A G A A T G T A T T	
<i>osr3-1</i>	250	C T A A G A C A A A T T G A T A A A T A A T A A - - T - - T A A A A T T G C S A A A A A A A A A A A A	300
<i>osr3-2</i>	260	C T A A G A C A A A T T G A T A A A T A A A T A T A - - T - - T A A A A T T G C S A A A A A A A A A A A A	
<i>osr3-3</i>	270	C T A A G A C A A A T T G A T A A A T A A A T A T A - - T - - T A A A A T T G C S A A A A A A A A A A A A	
<i>osr3-4</i>	280	C T A A G A C A A A T T G A T A A A T A A A T A T A - - T - - T A A A A T T G C S A A A A A A A A A A A A	
<i>butXIV</i>	290	T T A A G A A C T A T T - - A A A T A A A T A T A A A T T G - A A A A A A A A A A A A A A	

Рис. 2. Нуклеотидные последовательности кДНК семейства *os3r* из яда "туркменского" скорпиона *O. scrobiculosus* (*os3r-1*, *os3r-2*, *os3r-3*, *os3r-4*) в сравнении с нуклеотидной последовательностью кДНК *butXIV* из яда скорпиона *B. ocellatus* [12]. Для достижения большей наглядности в последовательности внесены разрывы (-). Затемнены нуклеотиды, встречающиеся реже, чем в 50% последовательностей, подчеркнута сигнальная последовательность полиададенилирования.

	10	20	30	40	50	60	70
Os3	GVRDGYIAQPHNCVYHCFPGSSGGCDTLCKENGATCGSSC-	FILGRGTACWCKDLPDRVGVIVDGEKCH					
Os3R-1	GVRDGYIAQPHNCVYHCFPGSSGGCDTLCKENGATEGS-	CGFILGRGTACWCKDLPDRVGIIVEGEKCHSG					
Os3R-2	GVRDGYIAQPHNCVYHCFPGSSGGCDTLCKENGATEGS-	CGFILGRGTACWCKDLPDRVGIIVEGEKCHSG					
Os3R-3	GVRDGYIAQPHNCVYHCFPGSSGGCDTLCKENGATEAE-	CGFKLGRGTACWCKDLPDRVGIIVEGEKCHSA					
Os3R-4	GVRDGYIAQPHNCAYHCLQFSSGGCDTLCKENGATRGE-	CGHKWGHGSACWCKDLPDRVGIIVEGEKCHSA					
ButXIV	VRDGYIAQPHNCAYHCLKISSGGCDTLCKENGATSGH-	CGHKSGHGSACWCKDLPDKVGIIVHGEKCHR					
SCX3_Butom	G-RDGYIAQPHNCVYHCFPGSSGGCDTLCKEKGATSGH	CGFLPGSGVACWCDNLPNKVPIVVEGEKCH					

**Рис. 3.** Аминокислотные последовательности полипептидов семейства Os3R из яда "туркменского" скорпиона *O. scrobiculosus* (Os3R-1, Os3R-2, Os3R-3, Os3R-4), выведенные из соответствующих кДНК, в сравнении со структурой токсина Os3 из яда "узбекского" скорпиона, опубликованной ранее [1], а также аминокислотные последовательности наиболее близкородственных токсинов (ButXIV и SCX3\_Butom) из яда скорпиона *B. occitanus* [12, 13]. Для достижения большей наглядности в аминокислотные последовательности внесены разрывы (-). Затемнены аминокислотные остатки, встречающиеся реже, чем в 50% последовательностей; жирным шрифтом выделен дипептид Ser-Gly/Ala, который отщепляется в процессе посттрансляционной модификации.

токсинов из семейства *B. occitanus* [12, 13] видно (рис. 3), что полипептиды семейства Os3R синтезируются в виде белковых предшественников с последующим отщеплением двух аминокислотных остатков в С-концевой области (Ser-Gly/Ala). Впервые процессинг С-концевой части был описан для токсинов скорпионов AaНI-AaНIII [6]. Анализ структуры кДНК и аминокислотных последовательностей зрелых токсинов свидетельствует о существовании новых специфичных карбоксипептидаз, необходимых для процессинга предшественников токсинов скорпионов.

Для токсинов семейства Os3R из яда скорпиона *O. scrobiculosus* и токсинов из яда скорпиона *B. occitanus* наблюдается практически полная идентичность первых 34 N-концевых и последних 5 С-концевых аминокислотных остатков, а также наличие тетрапептида ACWC (а.о. 47–50), характерного для всех известных скорпионовых токсинов. В то же время, фрагменты 35–46 и 51–62 имеют значительные структурные различия.

Среди кДНК семейства *os3r* не найдено ни одной кДНК, кодирующей структуру токсина Os3. Это тем более удивительно, что было проанализировано статистически достаточное число рекомбинантных клонов, а содержание токсина Os3 в яде составляет 1.7% [1]. В наиболее гомологичных аминокислотных последовательностях Os3 и Os3R-1 были обнаружены некоторые точечные замены (рис. 3). Замены в центральной и С-концевой области Os3R-1 не несут функциональной нагрузки и могут быть обусловлены тем, что в зависимости от ареала обитания скорпионы одного вида секретируют несколько различающиеся по аминокислотному составу токсины.

Таким образом, по результатам масс-спектрометрического анализа цельных ядов черного скорпиона из двух различных регионов Средней Азии и данным по клонированию можно утверждать, что в зависимости от ареала обитания в состав яда входят разные по молекулярному весу токсические компоненты, и, поэтому, среди поли-

пептидов семейства Os3R нет ни одного полностью идентичного токсину Os3.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: Триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco, Англия), формальдегид, формамид, β-меркаптоэтанол, глюкозу (Merck, Германия), трисгидроксиметиламинометан (Трис), бычий сывороточный альбумин (BSA), диэтилпиноксикарбонат, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA, динатриевая соль), IPTG, глицерин, мочевины, гуанидинотиоцианат, агарозу (ICN, США), oligo(dT)-целлюлозу, дезоксинуклеозидтрифосфаты и дидезоксинуклеозидтрифосфаты (Pharmacia-PL, Швеция), [α-<sup>32</sup>P]dATP (Обнинск), [α-<sup>33</sup>P]dATP (ИБХ РАН), реактивы отечественного производства квалификации ос. ч, эндонуклеазы рестрикции (Fermentas, Литва; Bio-Labs, США), обратную транскриптазу вируса лейкемии мыши (M-MLV), Т4-ДНК-лигазу, щелочную фосфатазу, Т4-поли-нуклеотидкиназу (USB, США), Taq-ДНК-полимеразу (ИБХ РАН).

**Биологический материал.** Все использованные скорпионы были собраны на территории Туркмении и Узбекистана в период: конец апреля–начало мая.

**Олигонуклеотидные зонды:** RoRidT, Ro и P1 синтезированы Н.С. Быстровым; M13(-20) и Rev. M13 (Stratagene, США).

**Бактериальные штаммы и плазмидные векторы:** *E. coli* XL-1 Blue (*supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1, Δ(lac-proAB), F' proAB+, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(tetr)*) (Stratagene, США), плазмидный вектор pBlueScriptII SK+ (Stratagene, США).

**Обработка растворов и посуды для работы с РНК.** Воду и растворы, используемые для работы с РНК, обрабатывали диэтилпиноксикарбонатом (0.1%), выдерживали в течение ночи при 37°C и автоклавировали. Пластиковую посуду замачива-

ли в этаноле, содержащем 0.01% диэтилпирикарбоната, и автоклавировали. Стеклянную посуду и инструменты прогревали 2 ч при 250°C.

**Выделение мРНК из тельсонов скорпионов *O. scrobiculosus*.** Тотальную РНК выделяли по модифицированному методу [14]. Навеску из 5 г замороженных тельсонов скорпионов (200 штук) помещали в фарфоровую ступку и измельчали до порошкообразного состояния при охлаждении жидким азотом. Полученный порошок переносили в гомогенизатор типа Polytron, добавляли 20 мл нагретого до 60°C лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 100 мМ EDTA, 2% лаурилсаркозин, 1% (по объему) β-меркаптоэтанол) и гомогенизировали 2–3 мин на максимальной скорости. К полученному лизату последовательно добавляли по 20 мл фенола, насыщенного 0.1 М NaOAc (рН 5.2) и смеси хлороформ–изоамиловый спирт (29 : 1), гомогенизировали 2–3 мин. Суспензию нагревали 5 мин при 60°C, перемешивали, охлаждали на льду и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин (0°C). К водной фазе добавляли равный объем смеси фенол–хлороформ, перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. Обработку повторяли 5 раз до исчезновения материала в интерфазе. Водную фазу переносили в центрифужные стаканы, добавляли 1/10 объема 3 М NaOAc, рН 5.2 и 2.5 объема этанола, выдерживали 1.5 ч при –20°C и центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин (0°C, J-21). Осадок промывали 80% этанолом, подсушивали и растворяли в 10 мл воды. К полученному раствору добавляли равный объем 4 М LiCl, инкубировали на льду 12–14 ч и центрифугировали 30 мин при 18000 об/мин (0°C, J-21). Осадок промывали 80% этанолом, подсушивали и растворяли в 4 мл воды. Количество РНК и наличие примесей на различных стадиях выделения определяли спектрофотометрически (поглощение при 260 и 280 нм). Препарат тотальной РНК хранили в виде суспензии в 80% этаноле при –70°C.

**Poly(A)<sup>+</sup>-РНК** выделяли методом аффинной хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе [15].

**Получение кДНК.** Для синтеза первой цепи кДНК брали 6 мкл раствора poly(A<sup>+</sup>)-мРНК (1.5 мкг/мкл), прогревали 5 мин при 70°C, быстро охлаждали на льду. К раствору последовательно добавляли: 5 мкл воды, 2 мкл десятикратного буфера для обратной транскриптазы *M-MLV* (500 мМ Трис-НСl, рН 8.3 при 37°C, 750 мМ KCl, 60 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ дитиотреитол), 2 мкл RoRidT праймера (0.1 мкг/мкл), 1 мкл 10 мМ dNTP, 1 мкл 10 мМ спермидин-НСl, 1 мкл ингибитора РНКаз из плаценты человека (40 ед. акт./мкл), 2 мкл обратной транскриптазы *M-MLV* (32 ед. акт./мкл). Реакцию проводили при 37°C в течение 1 ч. кДНК, кодирующую полипептиды, близкородственные токсину Os3, получали методом ПЦР. Для этого брали

0.5 мкл первой цепи кДНК, 100 пмоль вырожденного олигонуклеотидного праймера Р1 и 20 пмоль специфического олигонуклеотидного праймера Ro. Реакцию проводили в 50 мкл однократного буфера для *Taq*-ДНК-полимеразы (50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 9.0, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Тритон X-100) в присутствии 250 мкМ dNTP и 1 ед. акт. фермента в течение 30 циклов: денатурация – 45 с при 94°C, отжиг – 45 с при 45°C, синтез – 1 мин при 72°C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

**Компьютерный анализ.** Для работы с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями использовали коммерческий пакет программы WinStar (Dnastar Inc., США). Нуклеотидные последовательности вводили в компьютер и объединяли в проект по секвенированию с помощью программы SEQMAN. Анализ аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы PROTEAN, сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей – с помощью программы MEGALIGN. Поиск последовательностей, гомологичных семейству Os3R, по белковым и нуклеотидным базам данных (SWISSPROT, NBRF-PIR, EMBL, GenBank) осуществляли с помощью BLAST WWW-сервера (доступен через Интернет по адресу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Масс-спектрометрический анализ.** Масс-спектрометрический анализ цельного яда проводили на приборе VISION 2000 (Thermo Bioanalysis, США). Для каждого из образцов снимали не менее четырех масс-спектров.

Авторы выражают благодарность Н.С. Быстрову за синтез и очистку олигонуклеотидных праймеров, а также М.Ю. Титову за проведение масс-спектрометрических исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова Т.М., Дулубова И.Е., Тележинская И.Н., Гришин Е.В. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. С. 1100–1108.
2. Gurevitz M., Urbach D., Zlotkin E., Zilberberg H. // *Toxicon*. 1991. V. 29. P. 1270–1272.
3. Martin-Euclaire M.F., Ceard B., Ribeiro A.M., Diniz C.R., Rochat H., Bougis P.E. // *FEBS Lett.* 1992. V. 302. P. 220–222.
4. Zilberberg N., Zlotkin E., Gurevitz M. // *Toxicon*. 1991. V. 29. P. 1155–1158.
5. Bacerril B., Vazquez A., Garcia C., Corona M., Bolivar F., Possani L.D. // *Gene*. 1993. V. 128. P. 165–171.
6. Bougis P.E., Rochat H., Smith L. A. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 19259–19265.
7. Потапенко Н.А., Волкова Т.М., Гарсия А.Ф., Галкина Т.Г., Дулубова И.Е., Гришин Е.В. // *Биоорг. химия*. 1986. Т. 12. С. 581–589.
8. Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 8998–9002.

9. Clark J. M. // Nucl. Acids Research. 1988. V. 20. P. 9677–9686.
10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
11. Tabor S., Richardson C.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4767–4771.
12. Bouhaouala-Zahar B., Ducancel F., Zenouaki I., Ben Khalifa R., Borchani L., Pelhate M., Boulain J.C., El Ayeb M., Menez A., Karoui H. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 238. P. 653–660.
13. Vargas O., Martin M.F., Rochat H. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 162. P. 589–599.
14. Feramisco J., Helfman D., Smart S., Burrige K., Thomas G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 11024–11031.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Structural Variability of Neurotoxins of *Orthochirus scrobiculosus* Scorpions from Different Natural Habitats

A. V. Lipkin<sup>#</sup> and E. V. Grishin

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

To study the structural variability of the Os3 neurotoxin from the venom of scorpion *Orthochirus scrobiculosus* inhabiting Uzbekistan and Turkmenia, a cloning method for the family of cDNAs that encode the highly homologous Os3-like polypeptides was developed. The Turkmenian scorpion venom was shown to contain a family of closely related Os3-like polypeptides. Mass-spectrometry indicated that crude venoms from scorpions inhabiting these two regions of Central Asia differ in the amino acid composition of their toxic components depending on the habitat.

*Key words: scorpion, toxin, cloning*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: (095) 336-4022; fax: (095) 330-7301; e-mail: lipus@ibch.siobc.ras.ru.