



УДК 547.963.04

РЕОКСИЛЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ТОКСИНОВ ЯДА
СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA*

Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т.

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

Проведено исследование окисления сульфгидрильных групп восстановленного нейротоксина I (73 аминокислотных остатка, 5 дисульфидных связей) из яда кобры *Naja naja oxiana* в следующих условиях: а) кислородом воздуха при различных значениях рН, температуры и концентраций белка, б) в присутствии дитиотрепта, в) в присутствии пары окислитель-восстановленный глутатион в аэробных или анаэробных условиях. Впервые осуществлено реокисление нейротоксина «длинного типа» и получен продукт, не отличающийся от нативного нейротоксина I по хроматографическому поведению, токсичности и данным КД. В условиях максимального выхода нейротоксина I (0,05 М натрийфосфатный буфер, рН 7,5; 6°) проведено сравнительное исследование реокисления на воздухе других токсинов яда кобры *Naja naja oxiana*. Показано, что по скорости окисления и выходу токсичного продукта токсины можно расположить в ряд: нейротоксин II (выход 40%) > цитотоксин I (15%) > цитотоксин II (10%) < нейротоксин I (10%). В свете полученных результатов обсуждается стабильность пространственных структур исследованных токсинов.

Большинство токсинов яда змей семейства Elapidae являются небольшими белками (60–75 аминокислот) с высоким содержанием дисульфидных связей (4–5 на 1 моль), вносящих значительный вклад в стабилизацию пространственной структуры и сохранение биологической активности. Так, полное восстановление дисульфидных связей в кобротоксине *Naja naja atra* или кардиотоксине *Naja naja* Linn. приводит к характеризующимся неупорядоченной пространственной структурой нетоксичным препаратам, неактивным также по данным электрофизиологических и иммунологических тестов [1–5]. При реокислении восстановленных токсинов обоих типов удается получить продукты, идентичные природным образцам по физико-химическим и биологическим свойствам [1, 2, 6]. Недавно удалось также выделить токсичный продукт с хорошим выходом после стадии реокисления при синтезе кардиотоксина *Naja naja atra* [7].

Цитированные работы по восстановлению и реокислению касались цитотоксинов (которые иногда называют кардиотоксинами) и нейротоксинов «короткого типа» — в обоих случаях полипептидная цепь состоит из 60–62 аминокислотных остатков и содержит 4 дисульфидные связи. До сих пор отсутствуют данные о возможности реокисления постсинаптических нейротоксинов «длинного типа», содержащих 70–75 остатков и 5 дисульфидных мостиков.

В задачу настоящей работы входило изучение возможности реокисления токсина такого типа — нейротоксина I из яда кобры *Naja naja oxiana* (что представляло интерес и в связи с проводившимся в нашей лаборатории синтезом α -бунгаротоксина [8]). Нами было проведено также реокис-

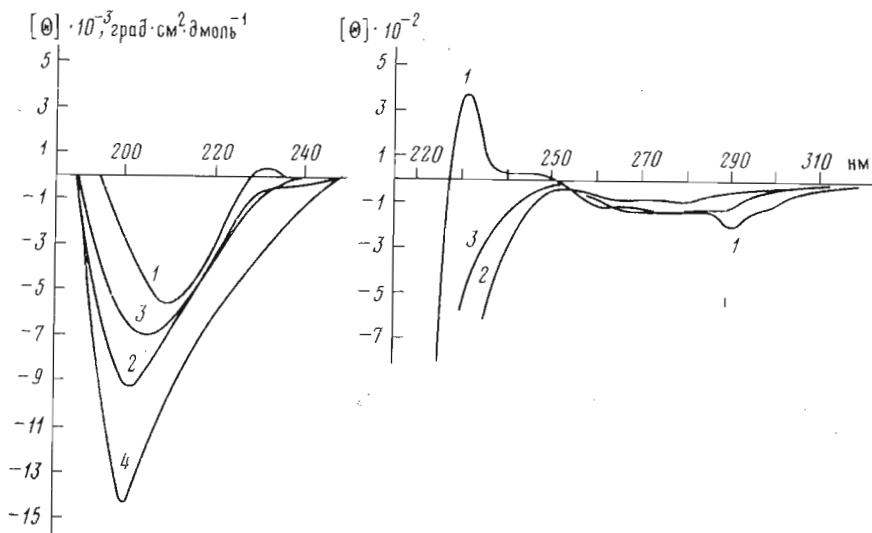


Рис. 1. Спектры КД восстановленного нейротоксина I (после удаления дитиотрепта гель-фильтрацией в 0,1 М уксусной кислоте, кривая 4) и продуктов его реокисления на воздухе (1-3). Номера кривых 1-3 соответствуют номерам фракций на рис. 2. Здесь и далее приведены значения $[\theta]$ в расчете на один аминокислотный остаток

ление нейротоксина II (короткий нейротоксин) и цитотоксинов I и II, присутствующих в том же яде.

Восстановление нейротоксина I проводили дитиотрентом при pH 8,5 в 8 М мочевице. Восстановленный продукт не обладал токсичностью в дозах до 6000 мкг/кг (LD_{50} исходного токсина 600 мкг/кг), а наличие интенсивной отрицательной полосы с λ_{max} 200 нм в спектре КД свидетельствовало о его неуниорядоченной структуре (рис. 1).

Для реокисления нейротоксина I была испытана описанная в литературе методика окисления кислородом воздуха [1], а также окисление в присутствии тиольных [9] и дисульфидных реагентов [10] или их смесей [11, 12], способствующих ускорению тиол-дисульфидного обмена. Кроме того, мы варьировали температуру и pH раствора и концентрацию белка (табл. 1).

Для реокисления на воздухе был опробован ряд условий, не указанных в табл. 1. Так, при кислых значениях pH реокисление практически не идет: например, в 0,1 М уксусной кислоте (pH 2,96) за 18 сут (22°) содержание свободных сульфгидрильных групп упало лишь на 20%. При повышении pH до 7,0 (20°) скорость окисления увеличивается, однако при этом образуется нерастворимый осадок, по-видимому, полимерной природы. Понижением температуры до 6° (pH 7,0) выпадение осадка удается предотвратить, но при этом падает скорость реокисления.

Оптимальными условиями, при которых окисление сульфгидрильных групп протекает с достаточной скоростью и не сопровождается образованием значительных количеств нерастворимого полимера, оказались значения pH 7,4-7,5 и температура 6° (опыты 1, 2, табл. 1). Как видно из табл. 1, увеличение концентрации белка в этих условиях с 0,3 до 1,4 мг/мл снижает выход в 6,7 раза, тогда как при уменьшении концентрации до 0,02 мг/мл выделить токсичный продукт вообще не удалось (опыты 3, 4).

Из табл. 1 видно, что токсичный продукт образуется при окислении в присутствии дитиотрепта при 6° и концентрации восстановленного токсина 0,5 мг/мл (опыт 5). Проведение реакции при 22° сопровождается образованием значительного количества нерастворимого полимера, и токсичный продукт выделить не удается.

Результаты реокисления восстановленного нейротоксина I в зависимости от условий реакции

Опыт (№)	Концентрация белка, мг/мл	Буфер	Реагенты (конц., мМ)	t, °C	Продолжительность	Выход нейротоксина I, % к исходному
1	0,3	0,05 М Na-фосфатный (рН 7,5), 0,1 М NaCl		6	12 сут	16
2	0,3	То же		6	26 »	10
3	1,4	»		6	12 »	1,5
4	0,02	»		6	12 »	0
5	0,5	»	Дитиотреит (0,8)	6	18 »	10
6	0,5	»	»	22	20 ч	0
7	0,13	0,1 М трис-HCl (рН 8,7), 0,2 М NaCl, 1 мМ EDTA	Глутатион окисленный (5)	22	24 »	0
8	0,01	0,08 М трис-HCl (рН 7,85), 0,1 М NaCl	Глутатион восстановленный (5) — глутатион окисленный (0,5)	37	2 »	9
9	0,4	0,1 М трис-HCl, рН-8,0 (анаэробные условия)	То же	27	3,5 »	0

Кроме описанных выше условий, биологически активный продукт образуется при реокислении в присутствии пары восстановленный — окисленный глутатион в условиях работы [12] (опыт 8). Эта система, ускоряющая тиол-дисульфидный обмен, позволяет провести реокисление при концентрации белка 0,01 мг/мл и, несмотря на относительно высокую температуру реакции (37°), избежать образования нерастворимого полимера. При использовании этой же пары в анаэробных условиях (опыт 9) по методике [11] выделить токсичный продукт не удалось, так же как и при реокислении в присутствии окисленного глутатиона в условиях работы [10], что может быть связано с относительно высокой концентрацией токсина в последних двух случаях (0,13 и 0,4 мг/мл соответственно). В результате анализа полученных данных мы пришли к выводу, что наиболее удобным, воспроизводимым и дающим лучшие результаты является реокисление на воздухе, однако оказалось, что даже в этих условиях выход нейротоксина I после реокисления не превышает 10%, т. е. большая часть продукта окисления приходится на неактивные соединения. Поэтому существенным для получения определенных выводов о ходе реокисления был подбор условий разделения образующихся продуктов.

Из рис. 2 и 3 видно, что наряду с продуктом, идентичным по поведению при гель-хроматографии нативному токсину (фракция 1), ди- и олигомерами (фракция 3), образуется продукт (фракция 2), выходящий в объеме между полностью восстановленным и нативным нейротоксином I (рис. 3). Вероятно, в этой фракции содержится продукт с неправильно замкнутыми дисульфидными связями, имеющий менее компактную структуру, чем нативный токсин. (В этой связи интересно отметить, что полученное при реокислении лизоцима соединение с неверно спаренными остатками цистеина элюируется при гель-хроматографии в том же объеме, что и восстановленный фермент [13]). Таким образом, даже если удастся предотвратить образование значительных количеств нерастворимого полимера, образуются растворимые димеры и продукты того же молекулярного веса, что и нативный нейротоксин I, но с неправильно замкнутыми

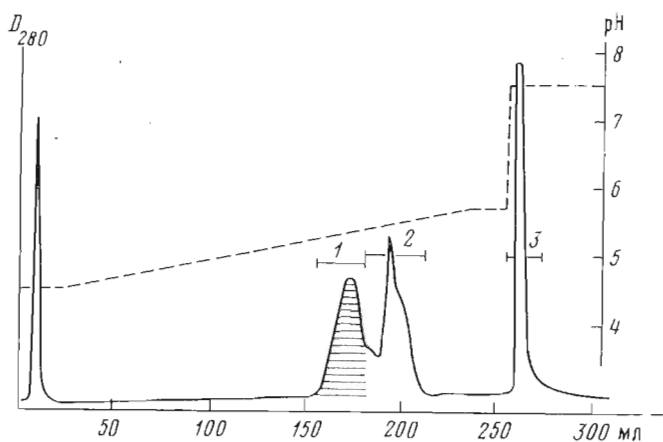


Рис. 2. Разделение продуктов реокисления 27 мг восстановленного нейротоксина I на воздухе (опыт 1, табл. 1) хроматографией на СМ-целлюлозе СМ-32 (колонка 1×6 см) в градиенте рН 0,05 М аммоний-ацетатного буфера. Скорость элюирования 20 мл/ч. Выход фракций 1—10, 2—14, 3—12%. Здесь и на рис. 5, 7, 8 заштрихованы токсичные фракции

дисульфидными связями, в сумме составляющие более $\frac{2}{3}$ (по весу) ренатурированного белка.

Фракция 1 (рис. 2 и 3) совпадает по токсичности и спектру КД (рис. 1) с нативным токсином, тогда как фракции 2 и 3 нетоксичны, а их кривые КД несколько отличаются от спектра нативного нейротоксина I. Так, от-

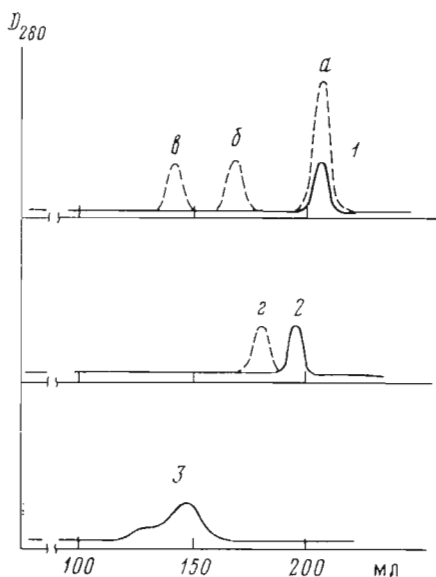


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 (две последовательно соединенные колонки размером 1,5×95 см) фракций 1—3 рис. 2. Пунктиром обозначены пики, соответствующие нативному нейротоксину I, M 8020 (а), цитохрому с, M 12 500 (б), химотрипсину А, M 25 000 (в) и восстановленному нейротоксину 1 (з)

рицательная полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ 210 нм сдвигается в коротковолновую область, а ее интенсивность увеличивается, что может интерпретироваться как переход к менее упорядоченной структуре. Кроме того, в спектрах КД фракций 2 и 3 исчезает положительная полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ 231 нм. Поскольку спектры КД фракций 2 и 3 в области 250—300 нм, отвечающей ароматическим остаткам, мало отличаются от кривой КД нейротоксина I, исчезновение положительной полосы с $\lambda_{\text{макс}}$ 231 нм, в которую могут давать вклад аро-

матические [14] и дисульфидные хромофоры [15, 16], следует отнести главным образом за счет изменения окружения дисульфидных связей.

Таким образом, были найдены условия реокисления восстановленного нейротоксина I, обеспечивающие получение образца, совпадающего по токсичности и спектру КД с нативным токсином. Возникает вопрос: в чем причина низкого выхода активного продукта? Согласно существующим представлениям, нативная пространственная структура белка и положение его дисульфидных связей однозначно определяются аминокислотной последовательностью (см., например, обзоры [17—19]). Однако после первых успешных опытов по реокислению *in vitro* полностью восстановленной рибонуклеазы [20—23] появились данные о неоднозначности этого процесса и образовании при реокислении на воздухе смеси продуктов [24].

Сворачивание различных белков может протекать через различные промежуточные состояния: так, для рибонуклеазы было обнаружено первоначальное «неправильное» замыкание дисульфидных связей и последующее образование нативного белка в результате тиол-дисульфидного обмена [11, 25]. Для основного панкреатического ингибитора трипсина удалось показать, что сначала образуется дисульфидная связь 30—51, существующая в природном белке, а затем через ряд промежуточных состояний в определенном порядке идет замыкание остальных двух дисульфидных мостиков [26]. Подобная упорядоченность предполагается и для лизоцима [27], хотя другие авторы [28] считают, что в лизоциме все дисульфидные связи замыкаются одновременно с близкими скоростями.

В целом реокисление на воздухе *in vitro* протекает значительно медленнее, чем образование дисульфидных связей в живых клетках [29]. Использование тиольных и дисульфидных реагентов [9, 10, 12] позволяет ускорить тиол-дисульфидный обмен и добиться приближения к физиологическим условиям, однако разрыв между эффективностью образования дисульфидных связей *in vivo* и *in vitro* остается очень большим, если в клетке белок образуется из предшественника. Например, реокисление на воздухе проинсулина и инсулина (образующегося путем ферментативного расщепления проинсулина [30]) удается провести с выходом соответственно 80 и 3% [31]. Поскольку и для одноцепочечных белков известны случаи их образования из неактивных предшественников (например, панкреатическая фосфолипаза [32], имеющая высокое содержание дисульфидных связей), можно предположить, что и нейротоксин I образуется в результате расщепления какой-то более сложной молекулы.

Другим объяснением низкого выхода активного продукта при реокислении нейротоксина I может служить неравноценность дисульфидных связей в «длинных» токсинах. Если в «коротких» нейротоксинах не удалось добиться селективного восстановления ни одной из четырех S—S-связей [33], то, как оказалось, в «длинных» нейротоксинах дополнительная, пятая дисульфидная связь может быть избирательно восстановлена в мягких условиях [33, 34]. После ее восстановления и алкилирования сохраняются антигенные свойства и частично токсичность, а соответствующее карбоксамидометильное производное достаточно эффективно взаимодействует с ацетилхолиновым рецептором [33]. Поскольку осуществленные модификации слабо отражаются на конформационных свойствах токсинов, дополнительная дисульфидная связь, очевидно, вносит лишь небольшой вклад в стабилизацию нативной структуры. Однако она может существенно затруднять получение нативного токсина в процессе реокисления.

Рентгеноструктурный анализ показал, что в «коротких» нейротоксинах дисульфидные связи пространственно сближены [35, 36]; предполагается, что сходную укладку полипептидной цепи имеют и другие постсинаптические нейротоксины [36]. Если это так, то в «длинных» токсинах дополнительная дисульфидная связь должна быть удалена от остальных четырех. Неправильное замыкание S—S-мостиков с участием этой связи будет существенно нарушать пространственную структуру молекулы «длинных»

Сравнение процессов реокисления восстановленных токсинов *Na₁ na₁ oxiana* в различных условиях

Соединение	рН 7,5 (0,05 М Na-фосфатный буфер, 0,1 М NaCl), 6°		рН 2,96 (0,1 М уксусная кислота), 22°		
	Время реокисления, сут	Выход токсина, %	Время реокисления, сут	Содержание SH-групп после реокисления	
				SH/моль	%
Нейротоксин I	12	10	18	8,2	82
» II	12	40	18	5,1	64
Цитотоксин I	12	15	15	1,1	14
» II	12	10	17	7,2	90

токсинов. В случае же «коротких» токсинов неправильное спаривание остатков цистеина не должно приводить к существенным изменениям структуры. Так как нативная структура токсинов образуется в результате тиол-дисульфидного обмена из первоначальных продуктов окисления, в которых дисульфидные связи не соответствуют природным, то такой переход в «длинных» токсинах будет более затруднен, чем в «коротких». Кроме того, следует учесть, что переход от четырех дисульфидных связей в «коротких» нейротоксинах к пяти в «длинных» увеличивает число возможных изомеров по S—S-связям от 104 до 945 [18]. Это также может быть одним из объяснений низкого выхода реокисленного нейротоксина I.

Нам представлялось интересным сравнить поведение токсинов разных типов («короткие» и «длинные» нейротоксины, цитотоксины) в процессе реокисления.

Некоторые трудности возникли у нас при выделении восстановленного цитотоксина I. Попытки использовать обычную гель-фильтрацию на сефадексе G-10, уравновешенном 0,05 М натрий-фосфатным буфером, к успеху не привели: практически весь белок сорбировался на носителе. По-видимому, в процессе хроматографии происходит спонтанное «неверное» замыкание дисульфидных связей и полимеризация токсина вследствие его высокой концентрации. При выделении же восстановленного цитотоксина I в 0,1 М уксусной кислоте и последующем доведении рН до 7,5 получается продукт с сильно заниженным содержанием свободных сульфгидрильных групп (3 SH/моль); вероятнее всего, в этих условиях идет быстрое реокисление, так как непосредственно после отделения реагентов в 0,1 М уксусной кислоте содержание сульфгидрильных групп близко к 8 SH/моль. Кроме того, восстановленный цитотоксин I заметно быстрее других токсинов окисляется в 0,1 М уксусной кислоте при комнатной температуре (табл. 2). Тем не менее в условиях, оптимальных для реокисления нейротоксина I, цитотоксин I ведет себя подобно нейротоксину I и цитотоксину II, а наибольшей скоростью и выходом токсичного продукта обладает нейротоксин II (табл. 2 и рис. 4).

На рис. 5 и 6 представлен профиль разделения и кривые КД продуктов реокисления нейротоксина II. Полученные фракции имеют спектры КД, совпадающие (фракция 2) или близкие (фракция 1 и 3) спектру нативного токсина. При этом все продукты реокисления имеют, по данным гель-фильтрации, такой же молекулярный вес, как и исходный нейротоксин, в отличие от результатов для нейротоксина I (см. выше). Более того, в процессе окисления нейротоксина II образуются две токсичные фракции (общий выход 60%), одна из которых имеет такую же токсичность, что и нативный токсин (фракция 2), а другая — 83% токсичности (фракция 3). Приведенные данные говорят о том, что нейротоксин II легко приобретает нативную конформацию в процессе реокисления, вероятно, вследствие ее относительной стабильности по сравнению с другими возможны-

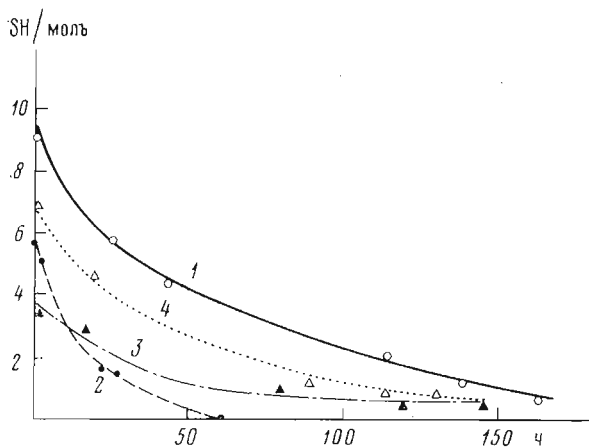


Рис. 4. Зависимость содержания свободных сульфгидрильных групп от продолжительности реокисления на воздухе (условия опыта I, табл. 1) нейротоксинов I (1), II (2), цитотоксинов I (3), II (4)

ми структурами с неправильным спариванием остатков цистеина. При этом, по-видимому, даже неверное замыкание дисульфидных связей может приводить к образованию продуктов, по структуре (фракция 1) и токсичности (фракция 3) напоминающих нативный токсин. Отсюда следует, что дисульфидные связи нейротоксина II сближены в пространстве и неправильное их замыкание не ведет к существенному нарушению пространственной структуры молекулы, что согласуется с рентгеноструктурными данными, рассмотренными выше.

Как уже отмечалось, в литературе описано восстановление — реокисление токсина короткого типа — кобротоксина [1]. При этом с выходом от 40 до 95%, в зависимости от используемой концентрации, был получен токсичный продукт, близкий нативному токсину по удельному вращению, ИК-спектру и иммунохимическим свойствам. Однако продукт реокисления не подвергался разделению.

На основании изложенных выше результатов для нейротоксина II можно предположить, что полученный в работе [1] продукт представляет собой смесь веществ, нуждающихся в дополнительной очистке. Подобное образование близких по свойствам продуктов было ранее обнаружено нами при реокислении апамина — нейротоксина из яда пчел [37].

В случае нейротоксина I и цитотоксинов скорости реокисления и выходы токсичных продуктов значительно ниже, чем для нейротоксина II (рис. 4, 7, 8, табл. 2). Спектры КД токсичных фракций 2 (рис. 7 и 8) оказались близкими кривым соответствующих нативных цитотоксинов, что проиллюстрировано на рис. 9 для цитотоксина II. Низкие выходы активных цитотоксинов I и II (15 и 10% соответственно) объясняются, по-видимому, тем, что для них условия реокисления не были оптимальными, поскольку для аналогичных токсинов известны случаи достижения более высоких выходов [6].

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что процесс сборки нативной структуры нейротоксина II в наименьшей степени сопряжен с побочными реакциями и наиболее «неприхотлив», что свидетельствует о большей стабильности этой структуры по сравнению со структурами других токсинов из яда кобры *Naja naja oxiana*. Аналогичный вывод был сделан ранее на основании данных КД [38]. К заключению об относительно большей стабильности короткого нейротоксина из яда *Naja mossaibica mossaibica* по сравнению с кардиотоксином из того же источ-

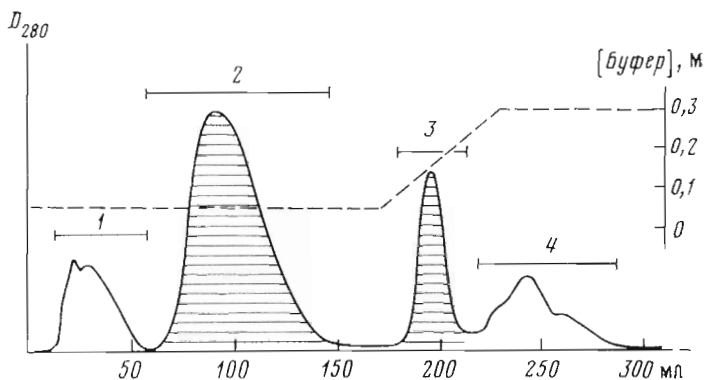


Рис. 5. Разделение продуктов реокисления 9,7 мг нейротоксина II на воздухе с помощью ионообменной хроматографии на биорексе 70 (колонка 1×3 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5. Скорость элюирования 25 мл/ч. Выход фракции 1 – 7, 2 – 40, 3 – 8, 4 – 7%

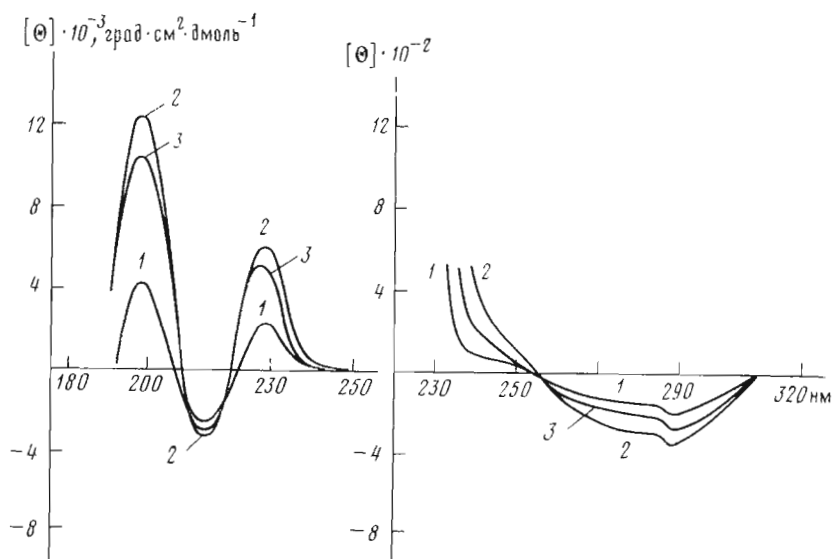


Рис. 6. Спектры КД продуктов реокисления нейротоксина II на воздухе. Цифры на кривых соответствуют номерам фракций на рис. 5

ника пришли Лаутервейн и др. [39] при исследовании спектров ЯМР. С другой стороны, представители одной и той же группы токсинов могут несколько различаться между собой по легкости сборки нативной структуры и ее устойчивости, на что указывают полученные недавно данные о различиях в скоростях реокисления коротких нейротоксинов [40].

Экспериментальная часть

Нейротоксин I из яда кобры *Naja naja oxiana* выделяли по методике [41] с дополнительной очисткой на сефадексе G-50, нейротоксин II и цитотоксины — по методикам, описанным в работах [41–43]. Цитотоксин I дополнительно очищали на катионообменнике биорексе 70 при pH 7,5 в градиенте концентрации ацетата аммония от 0,2 до 0,5 М.

Токсичность определяли на белых мышах (вес около 20 г) путем внутрибрюшинного введения исследуемых препаратов в физиологическом растворе.

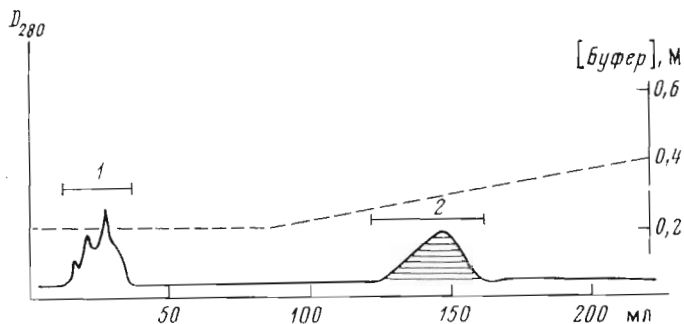


Рис. 7. Разделение продуктов реокисления цитотоксина I (условия опыта 1, табл. 1) на биорексе 70 (колонка 1×4 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5. Скорость элюирования 30 мл/ч

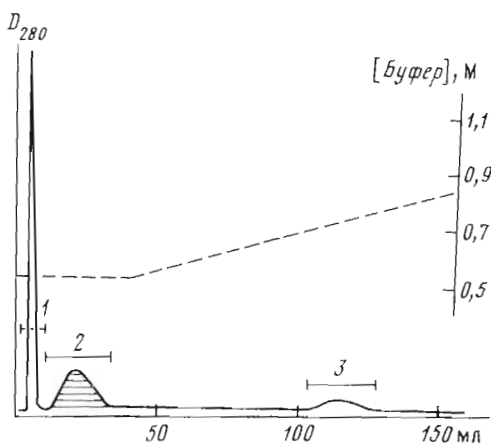


Рис. 8. Разделение продуктов реокисления цитотоксина II (условия опыта 1, табл. 1) на биорексе 70 (колонка 1×4 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 6,5. Скорость элюирования 30 мл/ч

Кривые КД получены на дихрографе Jobin Yvon III при $22-26^\circ$ в натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 ($7,4 \cdot 10^{-5} - 1,45 \cdot 10^{-4}$ М).

Восстановление токсинов проводили дитиотреитом (40–50 моль/моль белка) в 8 М мочеvine, 0,01% EDTA, 0,2 М трис-HCl-буфере, pH 8,5. Содержание сульфгидрильных групп определяли по методу Элмана [44].

Реокисление на воздухе (опыты 1–4). Восстановленный токсин отделяли от избытка реагентов на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,5 и 0,1 М NaCl. Концентрацию белка в элюате доводили до 0,02–0,3 мг/мл и раствор оставляли при 6° . В случае цитотоксина I методика была изменена: продукт восстановления отделяли от реагентов на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 М уксусной кислоте, доводили молярность фосфата натрия до 0,05 М, хлористого натрия до 0,1 М, pH до 7,5, концентрацию белка до 0,2 мг/мл и смесь оставляли на воздухе при 6° . После реокисления раствор лиофилизовали, обессоливали на G-10 в 0,1 М уксусной кислоте, упаривали и проводили очистку на CM-целлюлозе CM-32 (нейротоксин I) или биорексе 70 (остальные токсины) в градиенте pH аммоний-ацетатного буфера. При этом в случае нейротоксина II и цитотоксина II фракции, отвечающие нативным токсинам, выходят соответственно в 0,05 и 0,5 М буфере, а не в градиенте, как было описано ранее [42, 43]. По-видимому, это связано с меньшими

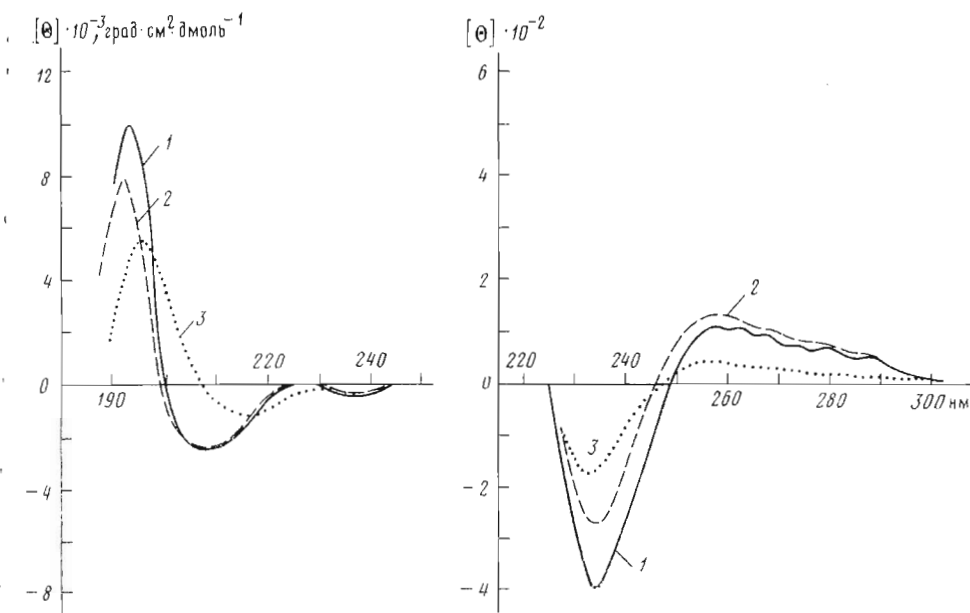


Рис. 9. Спектры КД нативного цитотоксина II (1) и продуктов его реокисления. Номера кривых 2 и 3 соответствуют номерам фракций на рис. 8

размерами колонки в нашем случае, поскольку в контрольных опытах оба нативных токсина также выходили до начала градиента.

Для реокисления в присутствии дитиотрепта (опыты 5, 6, табл. 1) восстановленный нейротоксин I пропускали через колонку, уравновешенную 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,5), 0,1 М NaCl и $8 \cdot 10^{-4}$ М дитиотрептом. После реокисления отделяли дитиотрепт на G-10 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М NaCl, лиофилизовали, обес-соливали на G-10 в 0,1 М уксусной кислоте и разделяли на CM-32.

Реокисление в присутствии окисленного глутатиона (опыт 7, табл. 1) проводили в условиях работы [10]. Раствор диализовали против воды, лиофилизовали и фракционировали на CM-32.

Реокисление в присутствии пары восстановленный — окисленный глутатион в аэробных условиях (опыт 8, табл. 1) проводили по методу, описанному в работе [12]. После реокисления раствор концентрировали (фильтр UM-2, фирма Amicon), доводили рН до 4,0, разбавляли до концентрации солей $\sim 0,05$ М и наносили на колонку с CM-32.

Реокисление с присутствием пары восстановленный — окисленный глутатион в анаэробных условиях (опыт 9, табл. 1) проводили по методике [11].

Авторы выражают благодарность Л. Б. Сенявской за съемку спектров кругового дихроизма и В. П. Мальковой за определение токсичности полученных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang C. C. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 346–355.
2. Bartels E., Rosenberry T. L. (1971) *Science*, **174**, 1236–1237.
3. Yang C. C., Chang C. C., Hayashi K., Suzuki T., Ikeda K., Hamaguchi K. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **168**, 373–376.
4. Chang C. C. (1970) *J. Biochemistry*, **67**, 343–352.
5. Keung W. M., Leung W. W., Kong Y. C. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 383–392.
6. Wong C. H., Chen Y. H., Hung M. C., Wang K. T., Ho C. L., Lo T. B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **533**, 105–111.

7. Wong C. H., Chen S. T., Ho C. L., Wang R. T. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **536**, 376-389.
8. Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Volpina O. M., Myagkova M. A., Deigin V. I. (1976) In: *Peptides 1976* (Loffet A., ed.), pp. 219-231, Brussels.
9. Goldberger R. F., Epstein C. J. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 1380-1383.
10. Greighton T. E. (1974) *J. Mol. Biol.*, **87**, 563-577.
11. Hantgan R. R., Hammes G. G., Scheraga H. A. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3421-3431.
12. Saxena V. P., Wetlaufer D. B. (1970) *Biochemistry*, **9**, 5015-5023.
13. Acharya A. S., Taniuchi H. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 6934-6946.
14. Menez A., Bouet F., Tamiya N., Fromageot P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **453**, 121-132.
15. Coleman D. L., Blout E. R. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2405-2416.
16. Ludescher U., Schwyzer R. (1971) *Helv. chim. acta*, **54**, 1637-1644.
17. Boldwin R. L. (1975) *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 453-475.
18. Anfinsen C. B., Scheraga H. A. (1975) *Adv. Protein Chem.*, **29**, 205-300.
19. Némethy G., Scheraga H. A. (1977) *Quart. Rev. Biophys.*, **10**, 239-252.
20. Anfinsen C. B., Haber E. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1361-1363.
21. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 1309-1314.
22. White F. H. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1353-1358.
23. Bell J., Harker D., De Jarnette E. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 1358-1360.
24. Ahmed A. K., Schaffer S. W., Wetlaufer D. B. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 8477-8482.
25. Creighton T. E. (1977) *J. Mol. Biol.*, **113**, 329-341.
26. Creighton T. E. (1977) *J. Mol. Biol.*, **113**, 275-293.
27. Anderson W. L., Wetlaufer D. B. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 3147-3153.
28. Acharya A. S., Taniuchi H. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2362-2366.
29. Торчинский Ю. М. (1977) *Сера в белках*, с. 231-237, «Наука», М.
30. Steiner D. F., Oyer P. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 473-480.
31. Steiner D. F., Clarck J. L. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 622-629.
32. De Haas G. H., Postema N. M., Nieuwenhuizen W., Van Deenen L. L. M. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **159**, 118-129.
33. Chicheportiche R., Vincent J. P., Kopeyan C., Schweitz H., Lazdunski M. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2081-2091.
34. Botes D. P. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **359**, 242-247.
35. Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Searl J. E., Rudko A. D., Richardson J. S. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2991-2994.
36. Tsernoglou D., Petsko G. A. (1976) *FEBS Lett.*, **68**, 1-4.
37. Нуриллинов А. Р., Елякова Е. Г., Малькова В. П., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1314-1321.
38. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1975) in: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Walter R., Meinhofer J., eds), pp. 935-941, Ann Arbor Science.
39. Lauterwein J., Wüthrich K., Schweitz H., Vincent J. P., Lazdunski M. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1071-1078.
40. Bouet F., Menez A., Fromageot P. (1977) *C. r. Acad. sci., Ser. D*, **285**, 1527-1530.
41. Туракулов Я. X., Сахибов Д. Н., Сорокин В. М., Юкельсон Л. Я. (1969) *Биохимия*, **34**, 1119-1122.
42. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **71**, 595-606.
43. Гришин Е. В., Сухих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 1018-1034.
44. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **82**, 70-77.

Поступила в редакцию
22.XII.1978

REOXIDATION OF THE TOXINS FROM THE MIDDLE ASIAN COBRA

NAJA NAJA OXIANA VENOM

UTKIN Yu. N., TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

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

The oxidation of the sulfhydryl groups of the reduced neurotoxin I (73 amino acid residues, 5 disulfide bonds) from the cobra *Naja naja oxiana* venom was studied under the following conditions: a) by air oxygen at various temperatures, pH and protein concentrations; b) in the presence of dithiothreitol; c) in the presence of a mixture of

the reduced and oxidized glutathion under either aerobic or anaerobic conditions. For the first time the «long type» neurotoxin was reoxidized and the product obtained was shown to be identical to native neurotoxin I in toxicity, CD spectra and chromatographic properties. Under the conditions of maximal yield of neurotoxin I (0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, t 6°), a comparative study was made on the air oxidation of the other toxins from the *Naja naja oxiana* venom. According to the oxidation rates and the toxic product yields, the toxins form the following series: neurotoxin II (yield 40%) > cytotoxin I (15%) > cytotoxin II (10%) \cong neurotoxin I (10%). The stability of spatial structures of the investigated toxins is discussed in the light of the results obtained.