



УДК 547.964.4.02

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ИНСЕКТОТОКСИНА И₂
ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО СКОРПИОНА *BUTHUS EUPEUS*

Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Солдатов Н. М.,
Костецкий П. В., Овчинников Ю. А.

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

Из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* выделен инсектотоксин И₂, оказывающий паралитическое действие на насекомых. Показано, что инсектотоксин состоит из 62 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. При помощи метода автоматической деградации определена последовательность первых 33 аминокислотных остатков. Из триптического гидролизата инсектотоксина И₂ выделено 9 пептидов и установлена их структура. Локализация трех триптических пептидов осуществлена на основании сходства с гомологичной структурой нейротоксина vI из яда скорпиона *Centruroides sculpturatus*.

Из яда скорпионов выделены полипептидные нейротоксины, замедляющие процесс натриевой инактивации нервных волокон. Эти компоненты яда служат ценным инструментом исследования молекулярных механизмов прохождения нервного импульса [1, 2].

Интересным свойством нейротоксинов яда скорпионов является специфичность действия к разным классам животных. В настоящее время установлено существование нейротоксинов, селективно поражающих нервные системы теплокровных, насекомых и ракообразных [3].

Рядом авторов из яда трех различных видов скорпионов осуществлено выделение 8 инсектотоксинов, причем 4 токсина получены из яда скорпиона *Buthus eupeus* [4]. Из яда североамериканского скорпиона *Centruroides sculpturatus* Ewing были выделены 3 изотоксина, обладающих паралитической активностью для насекомых [5]. Кроме того, еще один инсектотоксин был найден в яде североафриканского скорпиона *Androctonus australis* Nestor [6]. Сопоставление структуры инсектотоксинов с токсинами для млекопитающих представляет несомненный интерес, так как позволяет найти структурные особенности, обуславливающие свойство видовой специфичности действия.

Ранее нами была определена аминокислотная последовательность инсектотоксина И₁ из яда скорпиона *Buthus eupeus*, принадлежащего к новому структурному типу токсинов яда скорпионов [7]. Настоящая работа посвящена установлению аминокислотной последовательности инсектотоксина И₂, состоящего из 62 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями [8] и оказывающего паралитическое действие в дозе 1 мкг на таракана *Nauphoeta cinerea* (Oliver). Кроме того, представлялось интересным провести сравнитель-

Аминокислотный состав карбоксиметилированного инсектотоксина И₂ и его триптических пептидов *

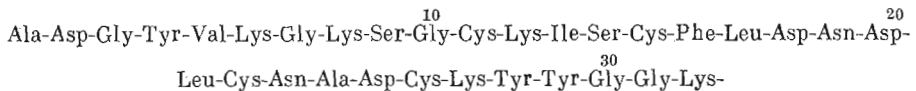
Аминокислота	И ₂	T-1 (IX)	T-2 (XIII)	T-3 (VII)	T-4 (I)	T-5 (XVII)	T-6 (VIII)	T-7 (X)	T-8 (XVIII)	T-9 (I)
Cys (См)	7,11 (8)	—	—	—	2,55 (3)	—	0,62 (1)	1,45 (2)	—	0,86 (1)
Asp	11,2 (11)	1,27 (1)	—	—	5,24 (5)	—	1,98 (2)	1,14 (1)	0,99 (1)	1,16 (1)
Thr	2,05 (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	1,82 (2)
Ser	5,80 (6)	—	—	—	1,01 (1)	—	0,83 (1)	1,03 (1)	1,03 (1)	0,98 (1)
Glu	1,21 (1)	—	—	1,00 (1)	—	—	—	—	—	1,14 (1)
Pro	2,32 (2)	—	—	—	—	—	0,79 (1)	1,12 (1)	—	—
Gly	7,11 (7)	1,20 (1)	1,34 (1)	4	—	2,30 (2)	—	1,30 (1)	1,12 (1)	—
Ala	2,09 (2)	1,15 (1)	—	Ser	1,12 (1)	—	—	—	—	—
Val	0,97 (1)	1,00 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	2,81 (3)	—	—	21,0	0,71 (1)	—	1,08 (1)	—	0,85 (1)	—
Leu	2,95 (3)	—	—	0,81 (1)	1,65 (2)	—	1,15 (1)	—	—	—
Tyr	3,82 (4)	0,80 (1)	—	—	—	1,91 (2)	—	0,76 (1)	—	—
Phe	0,95 (1)	—	—	—	0,93 (1)	—	—	—	—	—
Lys	8,12 (8)	0,92 (1)	1,00 (1)	1,01 (1)	1,00 (1)	1,01 (1)	0,89 (1)	0,88 (1)	1,20 (1)	—
Trp	3	—	—	—	—	—	1	1	1	—
Всего	62	6	2	—	15	5	9	9	6	6
N-Концевая	Ala	Ala	Gly	1,21 (1)	Ile	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ser
Выход, %		16,2	24,8	—	—	24,8	21,0	28,6	14,3	—

* В скобках указан номер фракции (рис. 1), из которой выделен пептид.

ный анализ структуры токсина И₂ и известных ранее токсинов яда скорпионов.

Для установления аминокислотной последовательности инсектотоксина И₂ предварительно проводилось восстановление его дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп моноиодуксусной кислотой. Следует отметить, что установление структуры И₂ осложнялось ограниченностью белкового материала. Так, для всего структурного анализа было затрачено менее 1 мкмоль карбоксиметилированного токсина (СМ-токсина). Аминокислотный анализ СМ-токсина свидетельствовал о том, что модификация прошла количественно (табл. 1).

N-Концевую аминокислотную последовательность СМ-инсектотоксина И₂ определяли методом автоматической деградации. В результате была установлена последовательность первых 32 аминокислотных остатков:



Одновременно было проведено триптическое расщепление СМ-белка. Среди N-концевых аминокислот триптического гидролизата токсина И₂ были определены серин, глицин, аланин, тирозин, изолейцин и лейцин. Из результатов аминокислотного анализа токсина (табл. 1) следовало, что при данном типе гидролиза должно образоваться 9 пептидных фрагментов. Пептидная карта триптического гидролизата инсектотоксина И₂ подтвердила наличие 9 главных пептидных фрагментов.

Для разделения триптических пептидов использовали ионообменную хроматографию на катионите РА-35. При этом была получена 21 объединенная фракция (рис. 1). Для обнаружения пептидов был выбран метод Самеима [9], увеличивающий чувствительность обычной нингидриной реакции за счет образования сильно флуоресцирующего продукта конденсации нингидрина с фенилацетальдегидом и свободными аминогруппами.

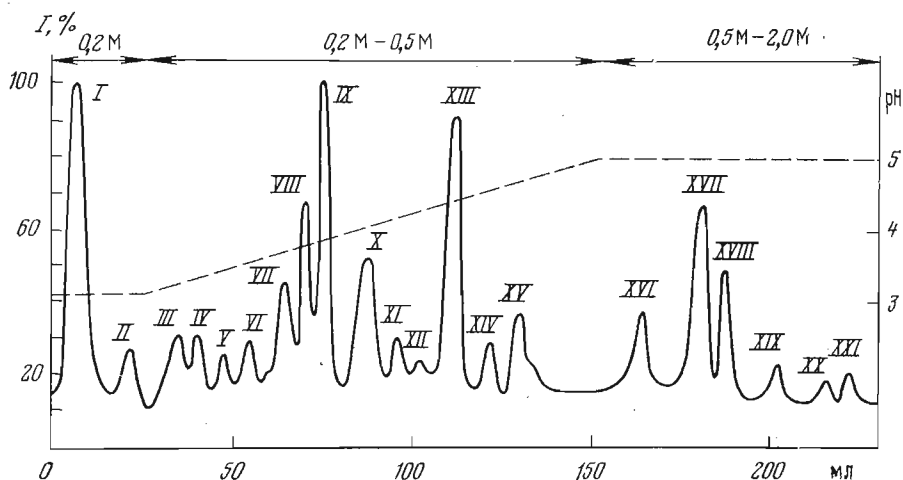


Рис. 1. Разделение триптического гидролизата инсектотоксина I_2 на катионите РА-35 (колонка $0,6 \times 25$ см) в градиенте рН и молярности пиридин-ацетатного буфера. Измерение интенсивности флуоресценции (I) проводили с возбуждением при 390 нм и эмиссией при 490 нм

На основании анализа N-концевых аминокислотных остатков и данных тонкослойной хроматографии было показано, что фракции VII, VIII, X, XIII, XVII и XVIII содержали соответственно индивидуальные пептиды Т-3, Т-6, Т-7, Т-2, Т-5 и Т-8 (табл. 1). При помощи реактива Эрлиха было установлено, что пептиды Т-6, Т-7 и Т-8 содержат в своем составе остатки триптофана. Фракции I и IX представляли собой смеси пептидов и были подвергнуты разделению хроматографией на бумаге. Из фракции IX при этом был выделен индивидуальный пептид Т-4 (табл. 1). Фракция I оказалась малорастворимой, поэтому для характеристики аминокислотного состава содержащихся в ней пептидов была проведена хроматография на бумаге только в аналитическом варианте. В результате из этой фракции были выделены пептиды Т-4 и Т-9. Остальные фракции не содержали достаточного для изучения количества пептидного материала.

Итак, из триптического гидролизата СМ-инсектотоксина I_2 было выделено 9 пептидов (табл. 1). N-Концевым, очевидно, являлся пептид Т-4, так как только он имел общий с токсином I_2 N-концевой аминокислотный остаток — аланин. Ввиду отсутствия в структуре пептида Т-9 остатка лизина был сделан вывод, что этот пептид является С-концевым. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что карбоксипептидаза С отщепляла от инсектотоксина I_2 и пептида Т-9 общую аминокислоту — карбоксиметилцистеин.

Изучение структуры триптических пептидов было проведено по методу Эдмана с идентификацией аминокислотных остатков в виде их дансильных (Dns) [10] или фенилтиогидантоиновых (Pth) [11] производных. Кроме того, использовали модифицированный метод Найала [12] с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот на полиамидных пластинках [13]. При определении С-концевой части пептидов и белка использовали карбоксипептидазу С. Таким образом, с помощью прямого метода Эдмана и некоторых его модификаций была установлена структура пептидов Т-1, Т-2, Т-3, Т-5, Т-6 и Т-8 (табл. 2). Для nonapeптида Т-7 вначале определили N-концевую последовательность первых 7 аминокислотных остатков, карбоксипептидаза С за 4 ч отщепляла: Lys (90%), Asn (78%) и Pro (43%); эти данные позволили установить для пептида Т-7 однозначную структуру (табл. 2).

Структура пептида Т-4 была определена по данным анализа его аминокислотного состава и N-концевого аминокислотного остатка в со-

**Аминокислотная последовательность триптических пептидов
СМ-инсектотоксина И₂**

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

* Структура определена автоматическим методом.

Таблица 3

Результаты определения аминокислотной последовательности триптических пептидов T-4 и T-9 инсектотоксина И₂

Методы анализа	Стадии деградации					
	1	2	3	4	5	6
Постадийная деградация смеси пептидов T-4 и T-9 с идентификацией Dns- и Pth-производных аминокислот	Ser Ile	Glu Ser	Thr Cys (Cm)	Asn Phe	Thr —	Cys (Cm) —
Структура пептида T-4, определенная автоматической деградацией	Ile-Ser-Cys (Cm)-Phe-Leu-Asp-Asn-Asp- Leu-Cys (Cm)-Asn-Ala-Asp-Cys (Cm)-Lys					

поставлении с N-концевой последовательностью токсина, определенной на секвенаторе (см. выше). Исходя из этого, было установлено, что фрагмент T-4 занимает в молекуле токсина область с 13-го по 27-й аминокислотный остаток. Используя данные аминокислотной последовательности пептида T-4, установили структуру пептида T-9 без его отделения от T-4 во фракции I (табл. 2). При этом использовали деградацию по методу Эдмана на смеси триптических пептидов T-4 и T-9 с идентификацией Dns- и Pth-производных аминокислот (табл. 3).

На основании установленной автоматическим методом N-концевой последовательности инсектотоксина И₂ оказалось возможным расположить в полипептидной цепи пять (T-1, T-2, T-3, T-4 и T-5) из 9 выделенных и изученных триптических пептидов. С-Концевым фрагментом токсина, как отмечалось, был определен пептид T-9.

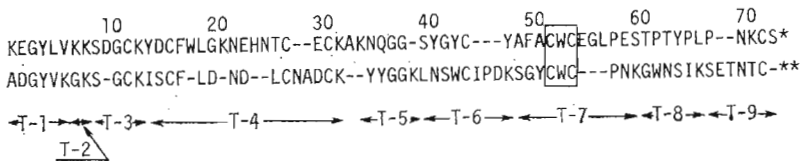
При сравнении N-концевой последовательности инсектотоксина И₂ с изотоксинами яда скорпиона *C. sculpturatus* [5] можно выделить инвариантные аминокислотные остатки в позициях 2—6, 10, 12, 17—20, 27, 30 и 31. Это обстоятельство позволяет использовать структуры изотоксинов яда *C. sculpturatus* как матрицу для расстановки всех триптических фрагментов токсина И₂.

Для доказательства местоположения пептидов T-6, T-7 и T-8 в полипептидной цепи мы использовали гомологию структуры этих пептидов с соответствующими участками аминокислотной последовательности нейротоксина VI из яда скорпиона *C. sculpturatus* [5]. Сходство каждой пары аминокислот (X и Y) в i-й позиции последовательностей сравниваемых

Матрица оценок попарного сходства аминокислот [14] *

	Phe	Met	Tyr	His	Cys	Trp	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Ser	Pro	Thr	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp	Glu		
F Phe	20																					
M Met	12	16																				
Y Tyr	20	16	23																			
H His	10	10	11	20																		
C Cys	6	13	2	7	24																	
W Trp	18	8	19	14	0	28																
R Arg	8	12	7	15	6	6	21															
G Gly	5	9	2	10	10	1	8	17														
L Leu	13	15	9	10	10	7	8	8	18													
I Ile	12	14	10	10	12	8	9	9	15	16												
V Val	10	14	7	10	12	5	11	11	14	15	15											
S Ser	8	11	6	12	12	5	10	13	10	11	12	13										
P Pro	6	10	3	9	8	1	8	13	8	10	11	12	18									
T Thr	9	12	6	11	12	4	10	12	11	12	12	13	12	15								
A Ala	8	11	5	11	11	4	9	13	10	11	12	13	13	13	13							
Q Gln	7	11	5	13	9	4	13	12	10	11	11	12	13	12	15							
N Asn	7	10	5	13	10	5	10	12	9	11	11	13	12	13	13	13	14					
K Lys	7	11	7	12	8	4	15	11	10	11	11	13	11	12	12	12	13	16				
D Asp	6	10	2	12	9	3	10	12	9	10	11	13	12	12	13	13	13	12	16	15		
E Glu	6	10	4	11	9	3	10	13	10	10	11	13	13	12	13	13	13	12	15	15	15	
-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Символом «—» обозначена делеция; кроме трехбуквенного символа для аминокислот приведен однобуквенный код (см. Eur. J. Biochem. (1968) 5, 151—153).



* *C. sculpturatus*, vI

** *B. eupeus*, И₂

Рис. 2. Сопоставление в однобуквенном коде аминокислотных последовательностей токсинов скорпионов vI (*C. sculpturatus*) [5] и И₂ (*B. eupeus*). Символ «←» означает делецию

токсинов оценивалось положительным числом $d(X_i, Y_i) \leq 28$, являющимся элементом матрицы (табл. 4), полученной при анализе заменяемости аминокислотных остатков в структурах гомологичных белков у разных видов организмов [14]. Количественной мерой сходства участков определенной длины служила сумма $\sum d(X_i, Y_i)$ соответствующих чисел попарного сходства аминокислот.

В сравниваемых токсинах vI и И₂ присутствует трипептид Cys-Trp-Cys (CWC, рис. 2), имеющий максимальную суммарную меру сходства — 76. Для доказательства высокой значимости этого сходства использовался численный эксперимент на ЭВМ, а именно: многократно (200 раз) генерировались пары случайных последовательностей того же аминокислотного состава, что и 40–66 токсинов *B. eupeus* и *C. sculpturatus*. В полученных парах сравнивались между собой все возможные трипептиды; при этом оказалось, что вероятность получения меры сходства 76 или выше случайным образом не превышает 0,005, что доказывает правильность предполагаемого местоположения пептида T-7 токсина И₂.

Аналогичным образом была доказана значимость меры сходства 56 для трипептидов 42–44. Примененные для этого случайные последовательности имели аминокислотный состав суммы пептидов T-6 и T-8 для одной последовательности и соответствующих им участков токсина vI *C. sculpturatus* для второй последовательности. Вероятность получения меры сходства 56 случайным образом не превышает 0,02, что доказывает правильность предлагаемого местоположения для пептида T-6. Таким образом, порядок расположения рассматриваемых трипептических пептидов оказался следующим: T-6--T-7—T-8.

На основании этих данных оказалось возможным полностью реконструировать полипептидную цепь инсектотоксина И₂ (рис. 3). Инсектотоксин И₂ состоит из 62 аминокислотных остатков. В его молекуле полностью отсутствует аргинин, находятся 3 остатка триптофана и 8 остатков цистеина, что при отсутствии свободных сульфгидрильных групп свидетельствует о наличии 4 дисульфидных связей. Интересно, что при сравнении N-концевой аминокислотной последовательности инсектотоксина AL из яда скорпиона *A. australis* Hector [3] со структурой И₂ можно пайти лишь некоторое подобие. По-видимому, они должны относиться к разным структурным группам.

На рис. 4 приведены в однобуквенном коде все известные в настоящее время полные аминокислотные последовательности нейротоксинов скорпионов. Указанные последовательности принадлежат к трем семействам, объединенным по признаку максимального структурного подобия [15]. При этом выделены все инвариантные аминокислотные остатки различных токсинов. Токсины AaHI и AaHI' из яда североафриканского скорпиона *Androctonus australis* Hector [16] принадлежат к 1-му семейству, токсин AaHII из яда того же вида скорпиона [17] и LqgV из яда североафриканского скорпиона *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* [18] относятся ко 2-му семейству, а токсин CsEI [19] и группа инвариантных

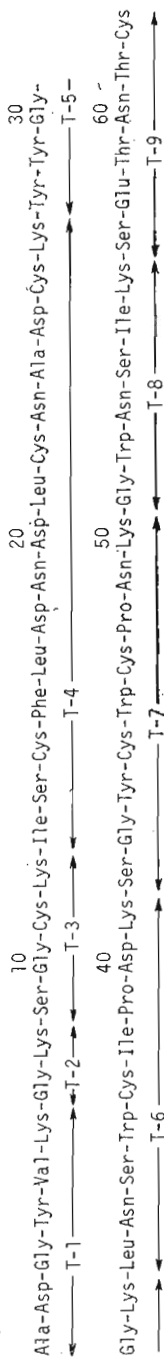


Рис. 3. Полная аминокислотная последовательность инсектотоксина II_2 из яда скорпиона *Uroctonus eurus*: Т — триптрические пептиды

AaH I'	KRDGYI V Y P NN CV Y HC I PP	C DG LC K KN GG SS G SSCFLV PSG LACW C KD LPDN VPI K DTS RK CT
AaH I	KRDGYI V Y P NN CV Y HC V PP	C DG LC K KN GG SS G SSCFLV PSG LACW C KD LPDN VPI K DTS RK CT
AaH II	V K DGYI VD D V N C TY FC GR N AY CNE E STKLK G E S GY CQWASPYG NAC YCYK LPDH V RT K GPGR C H	
L99 V	L K DGYI VD D K N C TF FC GR N AY CND E C KKK GGE S GY CQWASPYG NACW CYK LPDR VSI K E K GR C N	
CsE I	K DGY LVE K T GC KK T CY KLG ENDF CN RE C KMK HIGG S YGY C YG FGC YC EGLPD ST NTW PLPN K CT	
CsS III	K EGY LV SK S T GC K YE C L KLG DND Y C RE C K QQYG KSSG GY C Y AFACW C EALPDH T NWV VPN K CT	
CsE VI	K EGY LV KK S D GC X YD CF W LGK NEH NTC E C KAKNQ GG S YGY C Y AFACW C EGLPE ST P TY PLPN K CS	
CsE VII	K EGY LVN K S T GC K Y GC L KLG ENEG NKC E C KAKNQ GG S YGY C Y AFACW C EGLPE ST P TY PLPN K CSS	
CsE VIII	K EGY LV KK S D GC K Y GC L KLG ENEG NTC E C KAKNQ GG S YGY C Y AFACW C EGLPE ST P TY PLPN K CS	
И ₂	A DGY V K GKS GC KI S CFL DNDL CN A D C KY YGG K LNS W C IPDKSG YCWPSPKGMW NS I KSE T N TC	

Рис. 4. Полные аминокислотные последовательности в однобуквенном коде инсектотоксина II_2 и нейротоксинов из ядов скорпионов [15]

токсина *CsEvI-vIII* [5] из яда североамериканского скорпиона *C. sculpturatus* Ewing и токсин *CssIII* из яда скорпиона *C. suffusus suffusus* [20] — к 3-му семейству. В рассмотрение не включались N-концевые аминокислотные последовательности, определенные для ряда токсинов, так как эти части молекулы наиболее консервативны, в то время как основные различия наблюдаются в С-концевой области. Как уже отмечалось, инсектотоксин I_2 имеет максимальное структурное сходство с токсинами яда североамериканского скорпиона *C. sculpturatus* Ewing *CsEvI-vIII*. В первую очередь необходимо отметить практически сходные размеры полипептидных звеньев между остатками цистеинов.

В то же время различия в аминокислотной последовательности становятся более выраженными ближе к С-концевой части молекулы токсинов. Можно предположить, что различия именно в этой части структуры инсектотоксина I_2 и обуславливают его эффективное действие на насекомых, так как остальные токсины 3-го семейства одновременно токсичны по отношению к млекопитающим и насекомым.

Экспериментальная часть

Инсектотоксин I_2 выделяли как описано ранее [4].

Для ферментативного расщепления применяли трипсин (Worthington, США), карбоксипептидазу С (Ross, ФРГ). При хроматографировании использовали хроматографическую бумагу (Wathman 1, Англия), целлюлозные пластинки (Schleicher-Schüll, ФРГ), катионообменную смолу PA-35 (Beckman, США).

Спектрофотометрические измерения при определении триптофана проводили на спектрофотометре Gilford 240 (Франция).

Инсектотоксин восстанавливали β -меркаптоэтанолом и карбоксиметилировали по известной методике [21]. Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот D-500 (Durrum, США).

Триптический гидролиз 0,5 мкмоль СМ-инсектотоксина I_2 [8] проводили в ячейке титратора в течение 3 ч при 37°С при отношении фермент — субстрат 1:50 (по весу); рН смеси поддерживали около 8,3 с помощью 1 М водного раствора аммиака. Полученный гидролизат концентрировали на роторном испарителе и хранили при -10°С.

Пептиды триптического расщепления разделяли на хроматографической колонке, заполненной катионитом PA-35, уравновешенным 0,2 М пиридин-ацетатным буфером, рН 3,1 (стартовый) в градиенте рН и молярности пиридин-ацетатных буферов (рис. 1). Регенерация смолы, приготовление колонки, получение градиента рН и концентраций описаны ранее [8]. Условия разделения: колонка 0,6×25 см, высота столба смолы 25 см, скорость элюирования 16 мл/ч, объем фракций 1 мл; давление на колонке при 40°С составило около 14 атм. Продукты триптического гидролиза растворяли в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере, рН 2,8, и наносили на колонку под давлением азота (1,5—2 атм). Сначала через колонку пропускали 24 мл стартового буфера. Градиент I создавали, пропуская 0,5 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0, через заполненный стартовым буфером смеситель объемом 30 мл; затем в смеситель подавали 2,0 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0 (градиент II). Элюирование заканчивали, пропуская через колонку 0,5 М NH_4OH в течение 2 ч. Анализ элюата осуществляли по методу Самеима [9]. Интенсивность флуоресценции измеряли на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi MPF-3 (Япония).

Определение аминокислотной последовательности. N-Концевую аминокислотную последовательность СМ-инсектотоксина I_2 определяли на секвенторе Beckman 890С (США) с использованием стандартной медленной пептидной DMAA 071472 программы. Идентификацию Pth-производных аминокислот осуществляли на газожидкостном хроматографе Beckman GC-65 (США) и с помощью ТСХ.

Структуру пептидов устанавливали методом Эдмана по описанным ранее методикам [10, 11], а также по модифицированному методу Найала [12] с идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот на полиамидных пластинках [13]. Смесь триптических пептидов Т-4 и Т-9 анализировали методом Эдмана без разделения, используя данные по аминокислотной последовательности пептида Т-4 [11].

С-Концевую аминокислотную последовательность токсина и пептидов находили при помощи карбоксипептидазы С [22] и последующего анализа отщепленных аминокислот на аминокислотном анализаторе.

Для проведения соответствующих расчетов по доказательству местоположения пептидов Т-6, Т-7 и Т-8 была составлена программа на языке БЭЙСИК применительно к ЭВМ Hewlett-Packard—9830 А (США).

Авторы выражают благодарность сотруднику Института белка (г. Пуццано) Л. М. Винокурову за помощь при определении N-концевой аминокислотной последовательности автоматическим методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Catterall W. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **23**, 8660—8668.
2. Можяева Г. Н., Наумов А. П., Солдатов Н. М., Гришин Е. В. (1979) *Биофизика*, **24**, 235—241.
3. Zlotkin E. (1973) *Experientia*, **29**, 1453—1466.
4. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 450—461.
5. Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M., Mlejnek R. V. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **164**, 694—706.
6. Zlotkin E., Rochat H., Kupeyan C., Miranda F., Lissitzky S. (1971) *Biochimie*, **53**, 1073—1078.
7. Жданова Л. Н., Адамович Т. Б., Назимов И. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 485—493.
8. Солдатова Л. Н. (1977) Канд. дис. «Структурная характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона *Buthus eupeus*», Ин-т биоорган. химии АН СССР, М.
9. Samejima K., Dairman W., Udenfriend S. (1971) *Analyt. Biochem.*, **42**, 237—247.
10. Gray W. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.*, v. XI, pp. 469—475, Acad. Press, N. Y.—London.
11. Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жякулина Е. Б., Виноградова Е. И. (1972) *Биохимия*, **37**, 410—413.
12. Niall H. D., Keutmann H. D., Coop D. H., Potts J. T. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 771—778.
13. Kulbe K. D. (1974) *Analyt. Biochem.*, **59**, 564—573.
14. Barker W. C., Dayhoff M. O. (1972) in: *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Dayhoff M. O., ed.), **5**, 101—110.
15. Habersetzer-Rochat C., Sampieri F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2254—2261.
16. Rochat H., Rochat C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **17**, 262—266.
17. Rochat H., Rochat C., Sampieri F., Miranda F. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **28**, 381—388.
18. Kopeyan C., Martinez G., Rochat H. (1978) *FEBS Lett.*, **89**, 54—58.
19. Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M., Mlejnek R. V. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **166**, 125—134.
20. Rochat H., Kopeyan C., Garcia L. G., Martinez G., Rosso J. P., Pakaris A., Martin M. F., Garcia A., Martin-Moutot N., Gregoire J., Miranda F. (1974) *Commun. at the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*, pp. 113—114, Tokyo.
21. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622—627.
22. Tschesche H., Kupfer S. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 33—36.

Поступила в редакцию
6.IV.1979

AMINO ACID SEQUENCE OF INSECTOTOXIN I₂ FROM THE VENOM OF THE
MIDDLE-ASIAN SCORPION *Buthus eupeus*

GRISHIN E. V., SOLDATOVA L. N., SOLDATOV N. M.,
KOSTETSKY P. V., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

A toxin possessing a paralytic activity towards insects has been isolated from the venom of the Middle-Asian scorpion *Buthus eupeus*. This compound, insectotoxin I₂, consists of 62 amino acid residues and contains 4 disulfide bonds. Automated Edman degradation provided a 33-residue N-terminal sequence. Nine peptides were isolated from the tryptic digest of insectotoxin I₂ and their structure was determined. The position of 3 tryptic peptides in the polypeptide chain was determined basing on the structure of a homologous neurotoxin, neurotoxin vI from the venom of the North-American scorpion *Centruroides sculpturatus*.
