



## ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОСТАВА ЯДА МОНОКЛЕВОЙ КОБРЫ *NAJA KAOUTHIA*

© 2019 г. В. В. Рябинин\*,<sup>1</sup>, Р. Х. Зиганшин\*,<sup>1</sup>, В. Г. Старков\*, В. И. Цетлин\*, Ю. Н. Уткин\*,#

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 28.09.2018 г.

После доработки 10.10.2018 г.

Принята к публикации 19.10.2018 г.

Проведен протеомный анализ яда самцов и самок моноклеовой кобры *Naja kaouthia*, содержащихся в неволе. С использованием в качестве базы данных аминокислотных последовательностей белков представителей таксономической группы Serpentes из базы данных UniProt KB в образцах ядов было идентифицировано 875 белков, а относительное содержание около 190 из них было определено в каждом образце яда методом безметочной количественной протеомики. Показано, что суммарное содержание 35 основных белковых компонентов яда каждой особи составляет около 98% общего количества белков. Анализ относительного содержания токсических компонентов яда у самцов и самок показал достоверное ( $p < 0.05$ ) более высокое содержание фактора роста нервов и натрийуретического пептида в яде самок. Анализ профиля посттрансляционных модификаций токсинов яда *N. kaouthia* выявил у них неизвестные ранее сайты фосфорилирования, ацетилирования и формилирования.

**Ключевые слова:** яды змей, протеомный анализ, хроматомасс-спектрометрия, безметочная количественная протеомика

**DOI:** 10.1134/S0132342319020118

### ВВЕДЕНИЕ

Яды змей представляют собой сложные многокомпонентные смеси, содержащие в основном белковые соединения, с ярко выраженной биологической активностью и в течение многих веков применяются в качестве лекарственных средств. В настоящее время в ряде стран в качестве противовоспалительных и обезболивающих средств применяются мази, содержащие цельные яды змей: випросал В (Россия), кобратоксан и наятокс (Вьетнам), коброксин (США) и др. Однако и отдельные компоненты ядов могут служить основой для создания новых лекарственных средств. Например, нейротоксины из ядов кобр, такие как кобротоксин, короткий  $\alpha$ -нейротоксин из яда тайваньской кобры *Naja naja atra* [1] и длинный  $\alpha$ -нейротоксин из яда тайландской кобры

*N. kaouthia* [2], проявляют выраженный анальгезирующий эффект. Кардиотоксин III из яда кобры *N. naja atra* блокирует миграцию и инвазию опухолевых клеток MDA-MB-231 (рак молочной железы) [3]. Цитотоксин NN-32 из яда *N. kaouthia* перспективен для лечения артрита [4], а цитотоксин НКСТ1 кобры *N. naja atra* способен подавлять рост опухолевых клеток (лимфома) [5]. Выявление и эффективное использование такого рода белков представляет собой одну из актуальных проблем современной медицины и фармакологии.

Вместе с тем, существует проблема значительной вариабельности в составе белковых компонентов яда змей даже одного и того же вида, которая обусловлена различиями в среде обитания, рационе, возрасте змей и рядом других причин. Эту особенность необходимо учитывать при использовании ядов в качестве сырья для получения лекарственных средств и при проведении научных исследований. Одним из методов, позволяющих определить состав яда с высокой точностью, является протеомный анализ с использованием хроматомасс-спектрометрии. Современные методы протеомного анализа позволяют определить не только качественный, но и количественный состав яда.

<sup>1</sup> Авторы, внесшие равный вклад в работу.

Сокращения: ACN – ацетонитрил; САА – 2-хлороацетамид; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; iBAQ – intensity based absolute quantification; LC-MS/MS – тандемная масс-спектрометрия, сопряженная с жидкостной хроматографией; Orbitrap – масс-анализатор орбитальная ловушка; SDC – дезоксихолат натрия; TCEP – Трис(2-карбоксивил)фосфин; TFA – трифторуксусная кислота; PTM – посттрансляционная модификация.

# Автор для связи (тел.: +7 (905) 786-83-15; факс: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru).

Целью настоящей работы являлась оценка методами протеомного анализа варибельности качественного состава и относительного количественного содержания пептидно-белковых компонентов яда змей вида *N. kaouthia* (моноклевая кобра), содержащихся в неволе в одинаковых условиях. Для этих целей был применен метод определения относительного содержания белков в яде без использования изотопных меток, до сих пор для анализа яда кобры *N. kaouthia* не использовавшийся.

Определение количественных различий в содержании белков в сложных биологических системах при, например, изменении физиологического или патофизиологического состояния таких систем является одной из наиболее востребованных задач, решаемых в современных протеомных исследованиях. На сегодняшний день количественную оценку относительного содержания белков в протеомах различных биологических объектов проводят методами хроматомасс-спектрометрии, как с использованием стабильных изотопных меток, так и без них. При сравнении безметочных методов количественного определения белков с методами, основанными на использовании стабильных изотопных меток, было показано, что оба подхода имеют очень близкую эффективность, при значительно более низкой стоимости безметочных подходов [6]. Кроме того, недавно разработанные усовершенствования в методах безметочного анализа белков [7] позволяют значительно расширить диапазон концентраций белков, в котором возможно корректное количественное сравнение содержания одних и тех же белков в различных образцах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки уровня варибельности белкового состава ядов моноклевой кобры *N. kaouthia* нами были проанализированы образцы ядов 6 особей (три самца и три самки) этого вида змей, родившихся и содержащихся в неволе. Для этой цели образцы ядов, после денатурации содержащихся в них белков в присутствии дезоксихолата натрия, восстановления в них дисульфидных связей и карбамидометилирования образовавшихся свободных SH-групп, были подвергнуты триптическому гидролизу, а полученные смеси триптических пептидов анализировали методом хроматомасс-спектрометрии.

В результате инвентаризации белков яда этих 6 особей с использованием LC-MS/MS и поисковой машины Peaks Studio 8.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) было идентифицировано в общей сложности 1114 белков. Белок считали достоверно идентифицированным при условии обнаружения для него не менее одного уникального пептида при  $FDR < 1\%$  (вероятность лож-

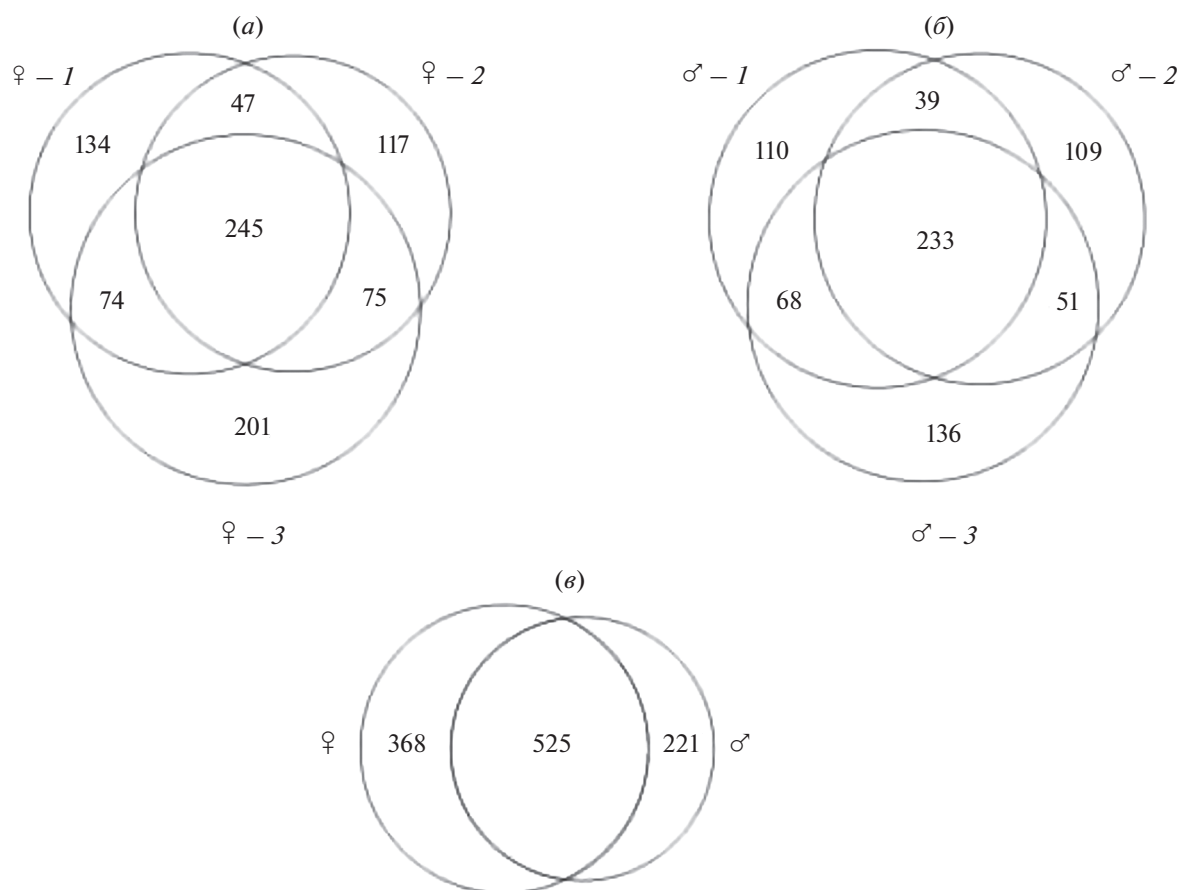
ноположительной идентификации). Сравнение списков идентифицированных белков показало, что, на первый взгляд, яды разных особей значительно различаются по составу между собой (см. рис. 1).

Учитывая тот факт, что около половины списка белков каждого образца яда было идентифицировано только по одному уникальному пептиду, наблюдаемые различия могут быть объяснены сочетанием двух факторов: низким содержанием подобных белков в образце и стохастической природой отбора ионов в сложных смесях для их последующей фрагментации при тандемной масс-спектрометрии. Подтверждение справедливости такой интерпретации наблюдаемых отличий в белковом составе яда разных особей моноклевой кобры было получено в результате оценки относительного содержания белков, которую проводили с использованием метода iBAQ [8, 9], реализованного в программном пакете MaxQuant [10]. В результате такой оценки было установлено, что несмотря на то, что в каждом образце яда было идентифицировано порядка 500 белков, более 98 мольных % (мол. %) от общего количества этих белков в образце составляет суммарное содержание 35 его мажорных компонентов (см. табл. 1).

Токсины, идентифицированные при протеомном анализе яда, составляют 15 различных семейств, которые перечислены в табл. 2. Наиболее представленным и разнообразным с молекулярной точки зрения является семейство трехпетельных токсинов, суммарное содержание которых в яде моноклевой кобры превышает 85 мол. %. Представители этого суперсемейства токсинов, несмотря на общую структурную организацию, взаимодействуют с очень широким спектром рецепторов и ионных каналов, вызывая самые разнообразные биологические эффекты [11].

В литературе имеются данные протеомного анализа яда моноклевой кобры [12, 13], полученные при анализе объединенных ядов от нескольких особей. В работе Тан и сотр. [13] исследованы яды из нескольких географических регионов. Наиболее представленными токсинами, как и в нашем случае, являются трехпетельные токсины, содержание которых изменяется от 63.5 (яд кобры из Малайзии) до 79.5% (яд кобры из Тайланда). Яд кобры из Вьетнама занимает промежуточное положение – 76.4%. Вторым по представленности токсином во всех ядах является фосфолипаза A2, содержание которой выше (более 10%), чем в нашем случае, и достигает в яде кобры из Малайзии 23.5% [13]. Высокое содержание трехпетельных токсинов характерно также для других видов кобр рода *Naja*. Так в яде *N. atra* их содержание составляет 84.3% [14], а в яде *N. naja* – 63.8% [15].

Разнообразие, относительная представленность и разброс в содержании токсинов этого семейства в образцах яда 6 особей моноклевой кобры



**Рис. 1.** Распределение идентифицированных белков в образцах яда самок и самцов моноклевого кобры *N. kaouthia*. (а) Сравнение между индивидуальными образцами яда самок (1–3). (б) Сравнение между индивидуальными образцами яда самцов (1–3). (в) Сравнение между образцами яда самок и самцов.

*N. kaouthia* показаны в табл. 3. Наиболее представленными трехпетельными токсинами являются цитотоксины, содержание которых в среднем составляет около 60%. Далее следуют альфа-кобратоксин (12.4%) и слабые токсины (9.7%). Интересно отметить, что относительное содержание различных типов трехпетельных токсинов сильно зависит от географического региона их обитания

[13]. Так, в ядах *N. kaouthia* из Малайзии и Вьетнама наиболее представлены цитотоксины, а в яде из Тайланда – альфа-кобратоксин, содержание которого достигает 33.3% [13]. В образцах исследованных нами ядов не обнаружены альфа-нейротоксины короткого типа, присутствующие в небольших количествах в ядах, исследованных в работе [13].

**Таблица 1.** Некоторые статистические данные протеомного анализа яда 6 особей моноклевого кобры *N. kaouthia*

Пол и номер животного	Общее число белков/число белков идентифицированных по 1 уникальному пептиду	Число мажорных белков*	Суммарное содержание мажорных белков яда, мол. %
Самка № 1	500/240	33	99.99
Самка № 2	484/252	35	98.05
Самка № 3	595/289	37	98.06
Самец № 1	450/212	34	98.54
Самец № 2	432/209	38	97.96
Самец № 3	488/235	34	98.12

\* С относительным содержанием в яде >0.1 мол. %).

**Таблица 2.** Распределение токсинов яда моноклевого кобры *Naja kaouthia* по семействам и их относительное содержание в образцах яда

Семейства токсинов	Наименование белка в базе данных UNIPROT	Сокращенное название	giBAQ (мол. %)	
			среднее	CO*
Трехпепельные токсины	Three-finger toxin. Cytotoxin	3FTx	85.74	4.03
Металлопротеиназа змеиного яда	Snake venom metalloproteinase	SVMP	3.38	0.57
Фосфолипаза A2	Phospholipase A2	PLA2	2.3	3.5
Весприн	Vespryn	Vesp	2.04	0.37
Фактор яда кобры	Cobra venom factor	CVF	1.90	0.46
Богатый цистеинами белок яда	Cysteine-rich venom protein	CRVP	1.18	0.35
Фактор роста нервов змеиного яда	Snake venom nerve growth factor	SVNGF	0.94	0.54
Оксидаза L-аминокислот	L-Aminoacid oxidase	LAO	0.78	0.31
Экто-5-нуклеотидаза	Ecto-5-nucleotidase	E5N	0.42	0.07
Фосфодиэстераза	Phosphodiesterase	PDE	0.40	0.11
Натрийуретической пептид	Natriuretic peptide	NP	0.13	0.25
Сериновая протеаза змеиного яда	Snake venom serine protease	SVSP	0.10	0.03
Гиалуронидаза	Hyaluronidase	Hyal	0.027	0.006
Лектин C-типа	C-Type lectin	CtL	0.05	0.03
Цистатин	Cystatin	Cyst	0.01	0.006

giBAQ – см. экспер. ч. CO – стандартное отклонение.

Анализ относительного содержания в яде моноклевого кобры токсинов различных семейств показал наличие статистически значимых отличий в содержании “фактора роста нервов змеиного яда” и “натрийуретического пептида” между самцами и самками (см. рис. 2).

Следует отметить, что у большинства видов змей, включая кобр рода *Naja*, отсутствует половой диморфизм по окраске и внешнему строению. Однако имеются ядовитые змеи с ярко выраженным половым диморфизмом, например, куфии и ботропсы. У этих видов самки крупнее самцов, а у куфий самцы и самки различаются окрасом.

Для выявления половых различий в составе яда были проведены сравнительные исследования состава яда самцов и самок храмовой куфии (*Tropidolaemus wagleri*) [16] и двух видов ботропсов (*Bothrops jararaca* и *B. moojeni*) [17, 18]. При этом обнаружено, что яды обоих полов храмовой куфии имели сравнимую токсичность и хроматографический профиль яда [16]. Это свидетельствует о неизменности состава яда у индивидуальных представителей вида, несмотря на ярко выраженный половой диморфизм. С другой стороны, при исследовании ядов *B. jararaca* обнаружено, что самки вырабатывали в пять раз больше яда, чем самцы. Электрофоретический анализ выявил у самцов большее количество белков по сравнению с самками. Яды самок обладали боль-

шими гиалуронидазной, геморрагической и летальной активностями, а яды самцов – большими коагулянтной, фосфолипазной и миотоксической активностями [18].

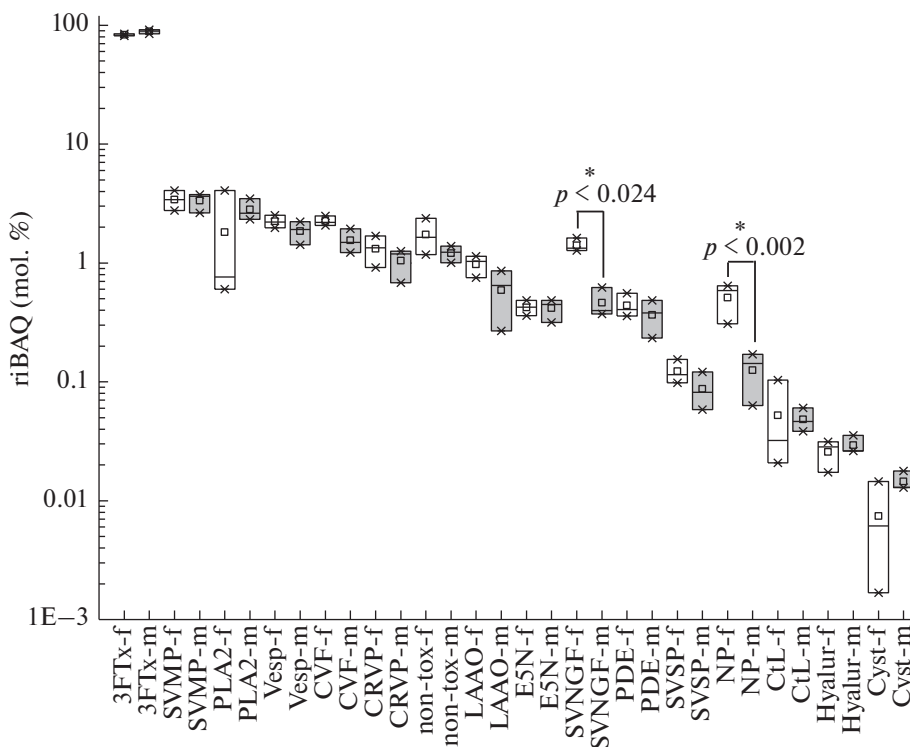
Сходные результаты получены при изучении яда *B. moojeni* с использованием протеомного подхода в комбинации с функциональной, цитотоксической и иммунореактивной характеристикой яда. Установлено, что яд самцов обладал более высокой активностью металлопротеиназы, что подтверждено увеличением экспрессии этого класса ферментов в протеоме. Самки вырабатывали большее количество яда, с более широким спектром компонентов и более сильной цитотоксичностью и антигенным потенциалом. В соответствии с этим яд самок показал более высокие уровни экспрессии ферментов, которые могут способствовать его цитотоксичности и иммунореактивности, таких как LAO<sup>2</sup>. Кроме того, протеомный анализ позволил идентифицировать компоненты яда, которые экспрессированы исключительно в яде самцов или самок. Так, только у самцов обнаружены фосфолипаза B, ингибитор фосфолипазы и гиалуронидаза, тогда как только у самок экспрессируется CRVP. Обнаруженные нами различия в составе яда между самцами и самками кобры *N. kaouthia* не столь существенны,

<sup>2</sup> Полное название фермента здесь и далее см. табл. 2.

Таблица 3. Разнообразие и относительная представленность основных трехпетельных токсинов в яде моноклеевой кобры *Naja kaouthia*

Наименование белка в базе данных UniProt	Идентификатор белка (UniProt)	Содержание белка в образцах яда, мол. %					
		среднее (по всем образцам)	СО (по всем образцам)	среднее (по самцам)	СО (по самцам)	среднее (по самкам)	СО (по самкам)
Cytotoxin 1	P60305	22.66	19.03	22.81	25.34	22.52	16.04
Alpha-cobratoxin	P01391	12.42	39.62	12.67	11.29	12.17	62.74
Cytotoxin 3	P01446	9.18	48.89	10.71	13.76	7.65	83.87
Cytotoxin 3d	Q98962	11.47	17.91	12.32	19.72	10.63	14.91
Tryptophan-containing weak neurotoxin	P82935	7.45	32.09	8.70	26.91	6.19	32.64
Cytotoxin homolog	P14541	4.69	47.42	4.87	59.04	4.50	44.32
Cytotoxin 2	P01445	6.67	23.76	5.83	32.71	7.51	9.59
Cytotoxin 3a	Q98959	4.26	52.29	4.50	10.67	4.02	86.18
Muscarinic toxin-like protein 1	P82462	2.19	58.54	2.45	61.98	1.92	65.31
Weak neurotoxin 6	P29180	2.05	41.29	1.38	30.26	2.73	18.33
Cytotoxin-like basic protein	P62377	0.67	31.43	0.62	13.90	0.73	42.83
Weak neurotoxin 7	P29181	0.18	99.26	0.30	55.50	0.05	93.37
Cytotoxin 10	P86541	0.19	96.82	0.13	98.18	0.26	94.80
Muscarinic toxin-like protein 2	P82463	0.66	90.12	0.58	94.59	0.74	101.42
Cytotoxin sagitoxin	P83345	0.09	84.94	0.08	102.77	0.10	86.74
Muscarinic toxin-like protein 3	P82464	0.34	56.09	0.33	59.54	0.35	65.12
3FTx-Pse-78	R4G319	0.21	74.41	0.12	16.87	0.29	64.51
Cytotoxin 7	P49122	0.13	114.15	0.06	81.00	0.21	96.29
Cytotoxin 8	Q91124	0.04	152.34	0.07	108.33	0.01	38.97

СО – стандартное отклонение.



**Рис. 2.** Относительное содержание токсинов различных семейств в образцах яда самок (1) и самцов (2) моноклоевой кобры *N. kaouthia*. По оси абсцисс указаны сокращенные названия семейств токсинов (расшифровку см. табл. 2); non-tox – все белки, не относящиеся к токсинам; f – самки, m – самцы.

что, по-видимому, отражает отсутствие заметного полового диморфизма у этих змей.

В ходе протеомного анализа ядов мы обнаружили наличие целого ряда посттрансляционных модификаций (ПТМ) токсинов. Список ПТМ, идентифицированных нами в белках всех трех образцов ядов самцов и самок моноклоевой кобры, представлен в табл. 4. Всего было выявлено 1960 пептидов с ПТМ. В данной работе мы провели анализ трех типов ПТМ: ацетилирование, фосфорилирование и формилирование. Выявленные локусы вышеназванных модификаций токсинов, а также указания на наличие или отсутствие этих модификаций у самцов и самок моноклоевой кобры приведены в табл. 5–7. Обращает на себя внимание большое количество выявленных пептидов с ацетилированными и формилированными *N*-концевыми аминокислотными остатками, что может говорить о наличии в яде процессированных и модифицированных молекул этих токсинов.

Следует отметить, что *N*-ацетилирование является достаточно распространенной ПТМ, которая играет важную роль в различных клеточных процессах [19]. В последнее время стало очевидным значение посттрансляционного *N*-концевого ацетилирования в модуляции взаимодействия и фолдинга белков [20]. Несмотря на достаточно широкую распространенность этой ПТМ, имеет-

ся лишь одна работа, в которой идентифицирован в яде и охарактеризован *N*<sup>α</sup>-ацетилированный токсин [21]. Это – десятичленный пептид, содержащий ацетильный остаток на *N*-концевой α-аминогруппе и способный блокировать холинорецептор никотинового типа. Обнаруженные нами ацетилированные пептиды свидетельствуют о достаточно большой представленности этой ПТМ в токсинах яда кобры.

*N*-Формилирование белков является не столь широко распространенной ПТМ, как *N*-ацетилирование. Однако, в литературе имеются данные о присутствии *N*-формилированного мелиттина в яде пчелы *Apis mellifera* [22], но роль такой ПТМ остается не ясной. Фосфорилирование белков представляет собой широко распространенную ПТМ, одной из основных функций которой является изменение биологической активности белка. Ранее фосфорилированные токсины были обнаружены в ядах австралийских элапид [23, 24]. На основании окрашивания электрофоретических гелей флуоресцентным красителем, специфичным для фосфорилированных белков, авторы сделали вывод, что в ядах фосфорилированные белки могут быть представлены изоформами белков, подобных факторам Va и Xa, а также фосфолипазами A2 [23]. Найденные нами фосфорилированные пептиды, соответствующие последова-

**Таблица 4.** Основные ПТМ, выявленные в белках яда моноклевого кобры *N. kaouthia*

Тип посттрансляционной модификации	Число пептидов с модификацией	
	яд самцов	яд самок
Дегидратация	87	77
Ацетилирование ( <i>N</i> -концевое)	41	40
Дезаминирование (Asn)	40	35
Гидроксилирование	34	31
Формилирование	31	30
Фосфорилирование (Ser, Thr, Tyr)	23	10
4-Гидроксиноненал	22	23
Пироглутаминовая кислота из Gln	15	11
Ацетилирование (Lys)	12	6
Ацетилирование ( <i>N</i> -концевое белка)	8	1
Пироглутаминовая кислота из Glu	7	8
<i>N</i> -Глюкуронылирование	6	6
Амидирование	5	4
Формилирование ( <i>N</i> -концевое белка)	5	2
HexNAc (Asn)	5	4
HexNAc (Ser, Thr)	5	4
Карбоксилирование (Asp, Lys, Trp)	4	3
Дезамидирование (Arg)	4	7
Гептоза	4	2
Гексозамин	4	2
Гликозил- <i>L</i> -гидроксипролин	3	1
Фосфопропаргиламин	3	0
Дезаминирование ( <i>C</i> - и <i>N</i> -концевое)	2	1
Липоил	2	3
Восстановленный 4-гидроксиноненал	2	1
Убиквитин	2	0
ADP-рибоза	1	0
Дегидратированный 4-гидроксиноненал	1	0
Глицерофосфат	1	0
Hex1HexNAc1	1	3
HexNAc1dHex1	1	0
HexNAc2dHex1	1	2
HexNAc2dHex2	1	0
Миристоилирование	1	0
Фосфоаденозин	1	1
Фосфогликозил- <i>D</i> -манноза-1-фосфорил	1	0
Фосфогуанозин	1	1
Фосфорилирование пиридилтиола	1	1
Окисление триптофана в кинуренин	1	3
Дезаминирование ( <i>N</i> -концевое белка)	0	1
Карбоксилирование (Glu)	0	1
Фукоза	0	1
Hex1HexNAc1NeuAc1	0	1
Hex1HexNAc1NeuAc2	0	1
Hex1HexNAc2dHex1	0	1
Hex	0	1
Hex (Asn, Ser, Tyr)	0	6
<i>N</i> -Ацетилглюкозамин-1-фосфорил	0	1
<i>N</i> -Связанное гликановое ядро	0	2

Hex – гексоза; HexNAc – *N*-ацетилгексоза; NeuAc – ацетилнейраминавая кислота; dHex – дезоксигексоза.

Таблица 5. Ацетилирование токсинов в 6 образцах яда *N. kaouthia*

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (–) модифицированного пептида в белке	
			самцы (1–3) <sup>#</sup>	самки (1–3) <sup>#</sup>
P00598	Acidic phospholipase A2 1	C(+42.01)WPYFK	+++	+++
P00598	Acidic phospholipase A2 1	ISGC(+57.02)WPY(+15.99)FK(+42.01)TYSYEC(+57.02)SQGTLTC(+57.02)K	+++	+++
P00596	Acidic phospholipase A2 1	C(+42.01)C(+57.02)QVHDNC(+57.02)YNEAEK	–++	+++
P00596	Acidic phospholipase A2 1	C(+42.01)WPYFK	+++	+++
P60044	Acidic phospholipase A2 2	F(+42.01)KNM(+15.99)ISC(+57.02)TVPSR-SWWDFAFDYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+++	––+
Q92086	Acidic phospholipase A2 C	L(+42.01)YQFKNM(+15.99)VQC(+57.02)TVPNR-SWWDFAFDYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+–+	+++
A4FS04	Acidic phospholipase A2 natratoxin	SWWDFAFDYGC(+57.02)YC(+57.02)GK(–0.98)(+42.01)	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	C(+57.02)(+42.01)PNG-HVC(+57.02)YT(+79.97)KTWC(+57.02)DAFC(+57.02)SIR	+++	–––
P01391	Alpha-cobratoxin	V(+42.01)DIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	D(+42.01)C(+57.02)PNGHVC(+57.02)YTK	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	D(+42.01)C(+57.02)PNGHVC(+57.02)YTK-TWC(+57.02)DAFC(+57.02)SIR	+++	–––
P01391	Alpha-cobratoxin	D(+42.01)CPNGHVC(+57.02)YTK	+––	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	R(+42.01)VD(+15.99)LGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK	+++	+––
P01391	Alpha-cobratoxin	T(+42.01)GVD(+14.02)IQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	–––	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	T(+42.01)GVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	T(+42.01)GVDIQC(+57.02)CSTDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	T(+42.01)WCDAFC(+57.02)SIR	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	TWC(+57.02)DAFC(+57.02)S(+162.05)IRGK(+42.01)R	+––	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	TWC(+57.02)DAFC(+57.02)S(+42.01)IR	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	C(+57.02)(+42.01)FITPDITSK	+––	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	C(+57.02)FIT(+42.01)PDITSK	+++	+––
P01391	Alpha-cobratoxin	C(+57.02)FITPDITSK(+42.01)	+++	+––
P01391	Alpha-cobratoxin	V(+42.01)D(+57.02)LGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK(+42.01)TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	–––	+++



Таблица 5. Продолжение

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (–) модифицированного пептида в белке	
			самцы (1–3) <sup>#</sup>	самки (1–3) <sup>#</sup>
P01391	Alpha-cobratoxin	G(+42.01)VD(+14.02)IQC(+57.02)C(+57.02)STD-NC(+57.02)NPFPTTR	–++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	D(+42.01)LGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVKTG-VDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	+--
B6EWW6	Aminopeptidase	I(+42.01)PDGLM(+15.99)NQYNQILAIR	+++	+--
A0A1W7RJE8	Aminopeptidase	I(+42.01)PDGLM(+15.99)NQYNQILAIR	+++	++–
P60043	Basic phospholipase A2 1	K(+42.01)NM(+15.99)IQC(+57.02)TVPKRSWWD-FADYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	–++	+++
Q8UU10	Basic phospholipase A2 PC1	A(+42.01)ALC(+57.02)FAKSPYNNNNYNIDIK	+++	+++
Q91132	Cobra venom factor	Y(+42.01)FKPGM(+15.99)PYELTVYVTNPDG-SPAHVVPVSEAFHSMGTTLSGDGTAK	+–+	+++
Q02454	Cytotoxin	M(+42.01)FMVATPK	++–	+++
P01451	Cytotoxin 1	L(+42.01)VPIAYK	+++	–+–
P01451	Cytotoxin 1	T(+42.01)C(+57.02)PEGK(+42.01)NLC(+57.02)YK(+42.01)MFMMSDLTIPVK	+++	++–
P01451	Cytotoxin 1	T(+42.01)C(+57.02)PEGK(+42.01)	+++	++–
P01451	Cytotoxin 1	T(+42.01)C(+57.02)PEGK(+57.02)NLC(+57.02)YKMFMSDLTIPVK	+++	++–
P01451	Cytotoxin 1	T(+42.01)C(+57.02)PEGKNLC(+57.02)YK(+42.01)	+++	–++
A0A0U5AR60	Cytotoxin 12	LIPLAYK(+42.01)	+++	+--
A0A0U4N5W4	Cytotoxin 13	C(+42.01)PAGKNLC(+57.02)YKMFMVSNKT-VPVK	+–+	+++
A0A0U4W6K7	Cytotoxin 16	LIPLAYKTC(+57.02)AAGK(+42.01)NLC(+57.02)Y	+++	+--
P79810	Cytotoxin 1c	LIPIAS(+42.01)K	+++	–+–
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	M(+42.01)FMMSDLTIPVK	+++	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	M(+42.01)FMMSDLTIPVKR	++–	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	MFMMS(+42.01)DLTIPVK	+++	++–
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	MFMMSDLTIPVK(+42.01)R	–++	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	N(+42.01)SLLVK	+++	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	LIPIAS(+42.01)K	+++	–+–
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	C(+42.01)PAGKNLC(+57.02)YKMFMSDLTIPVK	+++	+++
P60302	Cytotoxin 3	C(+57.02)(+42.01)NKLVLPLFYK	+++	–+–
P60302	Cytotoxin 3	LVPLFYK(+42.01)	+++	+--
P01446	Cytotoxin 3	K(+42.01)(+42.01)C(+57.02)NKLIPLAYK	+++	–+–
P49122	Cytotoxin 7	C(+42.01)HNTQLPFIYNTC(+57.02)PEGK	+++	---
Q91136	Cytotoxin I-like T-15	T(+42.01)C(+57.02)TAGKNLC(+57.02)Y(+79.97)K(+57.02)MFMMSDLTIPVK	+++	++–
P83345	Cytotoxin sagitoxin	L(+42.01)VPLAYK	+++	–+–

Таблица 5. Окончание

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (–) модифицированного пептида в белке	
			самцы (1–3) <sup>#</sup>	самки (1–3) <sup>#</sup>
P60306	Cytotoxin SP13b	L(+42.01)KPLAYK	–++	+++
A0A0F7YZM6	Ecto-5'-nucleotidase 1a	Y(+42.01)DAM(+15.99)ALGNHEFDNGLNGLL-DPLLK	+++	++–
P82942	Hemorrhagic metalloproteinase-disintegrin-like kaouthiagin	C(+42.01)PTLTNQC(+57.02)IALLGPHFTVSPK	+++	----
A0A024BTN9	L-amino acid oxidase Bs29	P(+42.01)LEEC(+57.02)FQETDYEEFLEIAR	+++	+++
A0A024BTN9	L-amino acid oxidase Bs29	N(+42.01)PLEEC(+57.02)FQETDYEEFLEIAR	+++	+++
P01388	Long neurotoxin 2	G(+42.01)VNIKC(+57.02)C(+57.02)S(+79.97)TDNC(+57.02)NPFPTTR	––+	+++
O42257	Long neurotoxin 7	D(+42.01)C(+57.02)PNGHVC(+57.02)YTK	+++	+++
W8E7D1	Phosphodiesterase	S(+42.01)M(+15.99)QAIFLAHGPGFK	+++	+++
F5CPF1	Phospholipase A2	P(+42.01)LLDY(+79.97)ADYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+++	––+
D5J9R6	Phospholipase A2 isoform 3	C(+57.02)(+42.01)QTHDNC(+57.02)YDEAEK	+–+	+++
T1DJT3	Protein disulfide-isomerase A6-like protein	L(+42.01)DLFSESAPAPELLEIINEDVLK	––+	+++
B0FXL8	Siamenotoxin I	L(+42.01)EC(+57.02)HDQSSQTPTTGC(+57.02)SGGETNC(+57.02)YK	+++	+++
E2ITZ3	Three-finger toxin	L(+42.01)EC(+57.02)HNQSSQTPTTGC(+57.02)SGGETNC(+57.02)YK	–+–	+++
E2IU01	Three-finger toxin	V(+42.01)DIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	+++
E2IU01	Three-finger toxin	T(+42.01)GVD(+14.02)IQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	----	+++
E2IU01	Three-finger toxin	R(+42.01)VD(+15.99)LGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK	+++	––+
P82935	Tryptophan-containing weak neurotoxin	GC(+57.02)ADTC(+57.02)PVGK(+42.01)PYEM(+15.99)IEC(+57.02)C(+57.02)STDK	+++	++–
P82935	Tryptophan-containing weak neurotoxin	Y(+42.01)IRGC(+57.02)ADTC(+57.02)PVGK(+42.01)PYEMIEC(+57.02)C(+57.02)STDK	+++	+––
P82935	Tryptophan-containing weak neurotoxin	C(+42.01)LNC(+57.02)PEMFC(+57.02)GK	–++	+++
A0A194ARG1	Venom factor	Q(+42.01)LDISVHDFPR	+++	+++
P25679	Weak toxin CM-9a	L(+42.01)TCLNC(+57.02)PEMFC(+57.02)GK	+++	–+–

\* ПТМ обозначены цифрами, соответствующими величине уменьшения (–) или увеличения (+) молекулярной массы аминокислотного остатка, находящегося слева от цифры: (–0.98) – амидирование; (+14.02) – метилирование; (+15.99) – окисление; (+42.01) – ацетилирование; (+57.02) – карбамидометилирование; (+79.97) – фосфорилирование; (+162.05) – гексозилирование.

Таблица 6. Фосфорилирование токсинов в 6 образцах яда *N. kaouthia*

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (–) модифицированного пептида в белке	
			самцы <sup>#</sup>	самки <sup>#</sup>
P00596	Acidic phospholipase A2 1	T(+438.09)PVD-DLDR(+57.02)C(+57.02)QVHDNC(+57.02)YNEAEK	+++	–++
P00596	Acidic phospholipase A2 1	PNRS(+242.02)WWD-FADYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+++	----
P00596	Acidic phospholipase A2 1	SRC(+57.02)WPYFK(+345.05)TYSYEC(+57.02)SQGTLTC(+57.02)K	----	+++
P00596	Acidic phospholipase A2 1	LAAICFAGAPY(+790.97)NNNNY-NIDLK	+++	----
P15445	Acidic phospholipase A2 2	LAAIC(+57.02)FAGAPY(+790.97)ND(–18.01)NNYNIDLK	+++	–++
P60045	Acidic phospholipase A2 3	LAAIC(+57.02)FAGAPY(+790.97)N(+0.98)DANYNIDLK	+++	+++
P60045	Acidic phospholipase A2 3	LAAIC(+57.02)FAGAPY(+790.97)NDA NYNIDLK	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	TK(+345.05)TWC(+57.02)DAFC(+57.02)SIR	+++	–+–
Q7T1K6	Cysteine-rich venom protein natrin-1	KMEWYPEAAS(+121.04)NAER-WANTC(+57.02)SLNHSPDNL	–+–	+++
Q02454	Cytotoxin	T(+57.02)(+790.97)LKC(+57.02)NKLVP LFYK	+++	–++
A0A0U4N5W4	Cytotoxin 13	T(+57.02)(+790.97)LKC(+57.02)NKLIP-LAYK	+++	+––
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	Y(+930.98)KMFMMSDLTIPVK	+++	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	FMMS(+154.00)DLTIPVK	+++	–++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	LC(+57.02)Y(+122.01)KMFMMSDLTIPVKR	–++	+++
P60306	Cytotoxin SP13b	LC(+57.02)Y(+122.01)KMFMMSNKT-VPVK	+++	–++
P82942	Hemorrhagic metalloproteinase-disintegrin-like kaouthiagin	C(+57.02)DLPELC(+57.02)T(+136.03)G QSAEC(+57.02)PTDSLQR	+++	–++
A0A024BTN9	L-amino acid oxidase	NPLEECFQET(+790.97)DYEEFLEIAR	+++	+++
P25668	Long neurotoxin 1	TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDDC(+57.02)DPFPT(+117.00)RKRP	+++	+–+
F5CPF1	Phospholipase A2	P(+42.01)LLDY(+790.97)ADYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+++	––+
P82935	Tryptophan-containing weak neurotoxin	T(+329.05)C(+57.02)PVGKPY-EMIEC(+57.02)C(+57.02)STDK	+++	+++
A0A194ARG1	Venom factor	Q(+0.98)LDIS(+790.97)VHDFPR	+++	+++
P61898	Venom nerve growth factor	KNPNPEPS(+770.99)GC(+57.02)RGID SSWNSYC(+57.02)TETDTFIK	+++	+––

\* ПТМ обозначены цифрами, соответствующими величине уменьшения (–) или увеличения (+) молекулярной массы аминокислотного остатка, находящегося слева от цифры. (–18.01) – дегидратирование; (+0.98) – дезамидирование; (+42.01) – ацетилирование (*N*-концевое); (+57.02) – карбамидометилирование; (+77.99) – метилфосфонилирование; (+79.97) – фосфорилирование; (+93.98) – метилфосфорилирование; (+117.00) – фосфо-пропаргиламин; (121.04) – фосфорилирование в пиридил тиол; (+122.01) – *O*-изопропил-фосфорилирование; (136.03) – *O*-диэтилфосфорилирование; (+154.00) – глицерофосфорилирование; (+242.02) – фосфогликозил-D-манноза-1-фосфорил; (+329.05) – фосфоаденозин; (+345.05) – фосфогуанозин; (+438.09) – *O*3-(рибофлавинфосфорил).

Таблица 7. Формилирование токсинов в 6 образцах яда *N. kaouthia*

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (-) модифицированного пептида в белке	
			самцы <sup>#</sup>	самки <sup>#</sup>
P00596	Acidic phospholipase A2 1	K(+27.99)TYSYEC(+57.02)SQGTLTC(+57.02)K	+++	+++
P00596	Acidic phospholipase A2 1	S(+27.99)WWD-FADYGC(+57.02)YC(+57.02)GR	+++	++-
Q91133	Acidic phospholipase A2 2	K(+27.99)TYSYEC(+57.02)SQGTLTC(+57.02)K	+++	+++
P60045	Acidic phospholipase A2 3	S(+57.02)WQD-FADYGC(+57.02)YC(+57.02)GK(+27.99)	++-	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	R(+27.99)VDLGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK	++-	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDN(+0.98)C(+57.02)NPFPTRK(+27.99)	-+-	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTRK(+27.99)	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	C(+27.99)FITPDITSK	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	K(+27.99)DC(+57.02)PNG-HVC(+57.02)YTK	+++	+++
P01391	Alpha-cobratoxin	K(+27.99)TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTR	+++	+++
A0A1Z0YU62	AncTx1-W28R/I38S	K(+27.99)SIFGVTTEDC(+57.02)PDGQ-NLC(+57.02)FK	+++	---
Q8UUI0	Basic phospholipase A2 PC1	AALC(+57.02)FAK(+27.99)SPYNNNNY-NIDIK	+++	-++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)YIQEGDAC(+57.02)K	++-	+++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)LC(+57.02)DDFAQF-SYTLTEFGC(+57.02)PT	+++	+++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)LDDRVPDTEIETK	+--	+++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)DLTEEPNSQGISSK	+++	+--
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)IIIQGDPAQIENSI	+++	-++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)IIIQGDPAQIENSIDGS	+++	-++
Q91132	Cobra venom factor	K(+27.99)VYSYNNLDEK	+++	+--
Q7T1K6	Cysteine-rich venom protein natrin-1	K(+27.99)MEWYPEAASNAER	+++	+++
Q7T1K6	Cysteine-rich venom protein natrin-1	K(+27.99)QSSC(+57.02)QDDWIK	+++	-++
P01451	Cytotoxin 1	T(+57.02)C(+57.02)PEGKNLC(+57.02)YK(+27.99)MFMMSDLTIPVK	---	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	M(+27.99)FMMSDLTIPVK	+++	+++
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	MFMMSDLTIPVK(+27.99)	+++	-+-
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	MFMMSDLTIPVK(+27.99)R	+++	+++

Таблица 7. Окончание

Идентификатор белка (UniProtKB)	Наименование белка в базе данных UniProtKB	Сиквенс пептида и локализация ПТМ*	Наличие (+) или отсутствие (-) модифицированного пептида в белке	
			самцы <sup>#</sup>	самки <sup>#</sup>
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	K(+27.99)YVC(+57.02)C(+57.02)NTDR	+++	++-
Q98958-2	Cytotoxin 1d/1e	K(+27.99)MFMMSDLTIPVK	+++	+++
A8QL58	L-amino-acid oxidase	K(+27.99)TC(+57.02)ADIVINDLSLIH-DLPK	+++	+++
P25672	Long neurotoxin 4	R(+27.99)VDLGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK	++-	+++
P82462	Muscarinic toxin-like protein 1	K(+27.99)FLFSETTETC(+57.02)PDGQ-NVC(+57.02)FNQAHLIYPGK	+++	+-
P82463	Muscarinic toxin-like protein 2	K(+27.99)SIFGVTTEDC(+57.02)PDGQ-NLC(+57.02)FK	+++	+-
F8J2F1	Putative long chain neurotoxin 178R	S(+27.99)WC(+57.02)DAFC(+57.02)SIR	+++	+-+
A0A0B8RXZ9	Snake venom 5'-nucleotidase	VQLQNYSSQEIGK(+27.99)	+++	+-+
P82885	Thaicobrin	ADVTFDSNTAFESLVSPDK(+27.99)K	+++	+++
P82885	Thaicobrin	K(+27.99)TVENVGVSQVAPDNPER	+++	+++
E2ITZ3	Three-finger toxin	GC(+57.02)GC(+57.02)PSVK(+27.99)N(+0.98)GIEINC(+57.02)C(+57.02)TTDR	+++	+++
E2ITZ3	Three-finger toxin	LEC(+57.02)HNQSSQTPTTTC(+57.02)SGGETNC(+57.02)YKK(+27.99)	+++	+++
E2IU01	Three-finger toxin	R(+27.99)VDLGC(+57.02)AATC(+57.02)PTVK	++-	+++
E2IU01	Three-finger toxin	K(+27.99)TGVDIQC(+57.02)C(+57.02)STDNC(+57.02)NPFPTTR	+++	-++

\* ПТМ обозначены цифрами, соответствующими увеличению (+) молекулярной массы аминокислотного остатка, находящегося слева от цифры: (+0.98) – дезамидирование; (+27.99) – формилирование; (+57.02) – карбамидометилирование.

тельностям фосфолипаз A2, подтверждают факт фосфорилирования этих токсинов.

Следует отметить, что большинство найденных пептидов, содержащих ПТМ, являются фрагментами трехпелетельных токсинов или фосфолипаз A2. Возможно, целью ПТМ этих токсинов является изменение их биологической активности. Интересно, что в ядах самцов присутствует большее число токсинов с ПТМ. Однако, вследствие того, что содержание токсинов с ПТМ существенно ниже, чем немодифицированных, это различие вряд ли имеет существенное значение для функциональной активности яда.

Оценка масштабов и биологической значимости явления посттрансляционной модификации токсинов потребует дополнительных исследова-

ний и будет предметом наших последующих исследований.

Таким образом, в ходе исследования были проанализированы образцы яда, полученные от 6 особей моноклевого кобры *N. kaouthia*, содержащихся в неволе в одинаковых условиях. Протеомный анализ позволил выявить в каждом из образцов несколько сотен белков. Обнаружена высокая вариабельность состава яда у различных особей. Вместе с тем найдены достоверные различия в количественном содержании фактора роста нервов и натрийуретического пептида в ядах самцов и самок. Этих токсинов содержится больше в яде самок. Кроме того, нами обнаружено большое число токсинов с посттрансляционными модификациями. При этом наибольшее число токсинов с такими модификациями выявлено в

трехпетельных токсинах и фосфолипазах A2. В ядах самцов обнаружено большее число токсинов с ПТМ, чем в ядах самок.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Образцы яда*

В работе использовали образцы яда, полученные от 6 особей моноклевых кобр *N. kaouthia* (три самца и три самки). Змей доили ручным массажем желез, полученный яд высушивали над хлористым кальцием и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### *Восстановление, алкилирование и гидролиз белков трипсином*

Навеску высушенного яда растворяли в восстанавливающем и алкилирующем буфере (pH 8.5) так, чтобы финальные концентрации яда, Трис, дезоксихолата натрия (SDC), Трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕФ) и 2-хлорацетамида (САА) составляли 1 мг/мл, 100 мМ, 1%, 10 мМ и 40 мМ соответственно. Полученный раствор прогревали при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин, охлаждали до комнатной температуры и добавляли равный объем трипсина (Promega, США) в 100 мМ Трис pH 8.5 в весовом соотношении 1 : 100. После инкубации в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  раствор триптических пептидов подкисляли TFA до конечной концентрации 1%, экстрагировали образовавшийся осадок дезоксихолево́й кислоты в равный объем этилацетата при интенсивном перемешивании, разделяли этилацетат и водную фазу центрифугированием (15000 g, 2 мин), этилацетат отбрасывали. Процедуру экстракции повторяли трижды.

Пептиды обессоливали на микроколонках StageTips, как было описано ранее [25, 26], с небольшими модификациями. Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из накопечников для автоматических пипеток (200 мкл) и мембраны Empore SDB-RPS (3M). Для обессоливания 20 мкг триптического гидролизата использовали 1 микроколонку с двумя кусочками мембраны, вырезанными иглой диаметром 14 G. Пептиды наносили на микроколонку центрифугированием при 200 g в течение ~6 мин, промывали последовательно: 100 мкл 1% TFA, 100 мкл этилацетата, 100 мкл 1% TFA, 100 мкл 0.2% TFA, и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 40% ацетонитрила. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испарителе досуха и хранили до хроматомасс-спектрометрического анализа при  $-85^{\circ}\text{C}$ .

### *Хроматомасс-спектрометрический анализ пептидов*

Высушенный элюат растворяли в 20 мкл водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0.1% TFA, и 3 мкл наносили на колонку (75 мкм  $\times$  25 см) с сорбентом Aeris Peptide XB-C18 2.6 мкм (Phenomenex). Разделение пептидов проводили в хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Пептиды загружали на термостатируемую при  $40^{\circ}\text{C}$  колонку в буфере А (0.2% муравьиная кислота (FA) в воде) и элюировали с нее линейным (120 мин) градиентом 4  $\rightarrow$  55% буфера Б (0.1% FA, 19.9% вода, 80% ацетонитрила) при скорости потока 350 нл/мин. После каждого хроматографического разделения колонку промывали 95% буфера Б в течение 5 мин и уравнивали буфером А в течение 5 мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1-сканированием и вплоть до 15 MS/MS-сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1-сканирования было выставлено  $3 \times 10^6$  в диапазоне 300–1200  $m/z$  с максимальным временем инжектирования ионов 60 мс и разрешением 60000 при  $m/z$  200. Изолирование ионов-прекурсоров осуществляли при ширине окна 1.4  $m/z$  и фиксированной первой массе 100.0  $m/z$ . Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокоэнергетической диссоциации в ловушке C-trap с нормализованной энергией столкновения 28 эВ. MS/MS-сканы сохраняли с разрешением 15000 при  $m/z$  200 и при значении  $1 \times 10^5$  для целевых ионов в диапазоне 200–2000  $m/z$  с максимальным временем инжекции ионов 30 мс.

### *Анализ хроматомасс-спектрометрических данных*

Каталогизацию белков яда и анализ их ПТМ проводили с использованием компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [27]. Первичные структуры пептидов, генерируемые программой PEAKS Studio, анализировали против белковых последовательностей таксономической группы Serpentes (70112 структур), экстрагированных из базы данных UniProtKB (10.2017), со следующими настройками: карбамидометилирование Cys – фиксированная модификация; N-концевое ацетилирование белков, окисление Met и дезамидирование Asn/Gln – вариабельные модификации; специфичность протеазы – трипсин. Максимальное количество пропущенных сайтов гидролиза трипсином – 3, а также допущение неспецифического расщепления трипсином по N- и C-концам пептида. Допустимый уровень ложно-

положительных идентификаций (FDR) пептидов был установлен на 0.01 и определялся путем корреляции массива MS/MS-данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 м.д. и допустимом отклонении массы фрагментов 0.05 Да. При составлении списков структур пептидов, имеющих следующие ПТМ: ацетилирование, фосфорилирование и формилирование, нами учитывались только ПТМ с величиной ASCORE, характеризующей точность локализации ПТМ, большей или равной 25.

Для безметочного MS1-количественного определения белков использовали программное обеспечение MaxQuant (версия 1.5.6.5) [10]. Идентификацию пептидов проводили с использованием поисковой машины Andromeda [28] и базы данных UniProtKB (70112 белков, 10.2017 г.) для таксономической группы *Serpentes*. Для идентификации пептидов использовали следующие параметры настройки поисковой машины Андромеда: карбамидометилирование Cys – фиксированная модификация; N-концевое ацетилирование белков, окисление Met и дезамидирование Asn/Gln – переменные модификации. Уровень ложноположительных результатов (FDR) допускался не более 0.01 как для пептидов, так и для белков, при минимальной длине пептида в 7 а.о., и определяли его с использованием реверсной базы данных. Белки, соответствовавшие реверсной базе данных, отфильтровывали. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном уровне отклонения массы иона-прекурсора 20 м.д. и массы фрагментов – 20 м.д. При идентификации белков в каждом образце использовали библиотеку сопоставления MS- и MS/MS-спектров (match library), в качестве которой использовали хроматомасс-спектрометрические данные анализа триптических гидролизатов всех проанализированных образцов яда.

Для оценки количественного содержания белков использовали встроенный в программу MaxQuant алгоритм iBAQ (intensity based absolute quantification) [8], который складывает интенсивности пиков всех идентифицированных для конкретного белка триптических пептидов и делит полученную сумму на количество теоретически возможных триптических фрагментов этого белка. Для определения относительного содержания белка в образце в мольных процентах, использовалась величина iBAQ [9], представляющая собой величину iBAQ каждого белка, нормализованную на сумму величин iBAQ всех идентифицированных белков.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-54-54006.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen R.Z., Robinson S.E. // *Life Sciences*. 1990. V. 47. P. 1949–1954.
2. Chen Z.X., Zhang H.L., Gu Z.L., Chen B.W., Han R., Reid P.F., Raymond L.N., Qin Z.H. // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006. V. 27. P. 402–408.
3. Tsai P.C., Chu C.L., Chiu C.C., Chang L.S., Lin S.R. // *Toxicol.* 2013. V. 74. P. 56–67.
4. Gomes A., Bhattacharya S., Chakraborty M., Bhattacharjee P., Mishra R., Gomes A. // *Toxicol.* 2010. V. 55. P. 670–673.
5. Bhowmik T., Saha P.P., Dasgupta A., Gomes A. // *Cancer Nanotechnology*. 2013. V. 4. P. 39–55.
6. Neilson K.A., Ali N.A., Muralidharan S., Mirzaei M., Mariani M., Assadourian G., Lee A., van Sluyter S.C., Haynes P.A. // *Proteomics*. 2011. V. 11. P. 535–553.
7. Cox J., Hein M.Y., Luber C.A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. // *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*. 2014. V. 13. P. 2513–2526.
8. Schwanhauser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. // *Nature*. 2011. V. 473. P. 337–342.
9. Shin J.B., Krey J.F., Hassan A., Metlagel Z., Tauscher A.N., Pagana J.M., Sherman N.E., Jeffery E.D., Spinelli K.J., Zhao H., Wilmarth P.A., Choi D., David L.L., Auer M., Barr-Gillespie P.G. // *Nature Neuroscience*. 2013. V. 16. P. 365–374.
10. Cox J., Mann M. // *Nature Biotechnology*. 2008. V. 26. P. 1367–1372.
11. Kini R.M., Doley R. // *Toxicol: Official Journal of the International Society on Toxinology*. 2010. V. 56. P. 855–867.
12. Laustsen A.H., Gutierrez J.M., Lohse B., Rasmussen A.R., Fernandez J., Milbo C., Lomonte B. // *Toxicol: Official Journal of the International Society on Toxinology*. 2015. V. 99. P. 23–35.
13. Tan K.Y., Tan C.H., Fung S.Y., Tan N.H. // *Journal of Proteomics*. 2015. V. 120. P. 105–125.
14. Shan L.L., Gao J.F., Zhang Y.X., Shen S.S., He Y., Wang J., Ma X.M., Ji X. // *J. Proteomics*. 2016. V. 138. P. 83–94.
15. Dutta S., Chanda A., Kalita B., Islam T., Patra A., Mukherjee A.K. // *J. Proteomics*. 2017. V. 156. P. 29–39.
16. Tan C.H., Tan K.Y., Yap M.K., Tan N.H. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 43237.
17. Amorim F.G., Costa T.R., Baiwir D., De Pauw E., Quinton L., Sampaio S.V. // *Toxins*. 2018. V. 10. pii: E177. doi: 10.3390/toxins10050177
18. Furtado M.F., Travaglia-Cardoso S.R., Rocha M.M. // *Toxicol: Official Journal of the International Society on Toxinology*. 2006. V. 48. P. 401–410.
19. Drazic A., Myklebust L.M., Ree R., Arnesen T. // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2016. V. 1864. P. 1372–1401.

20. Aksnes H., Drazic A., Marie M., Arnesen T. // Trends in Biochemical Sciences. 2016. V. 41. P. 746–760.
21. Vulfius C.A., Spirova E.N., Serebryakova M.V., Shelukhina I.V., Kudryavtsev D.S., Kryukova E.V., Starkov V.G., Kopylova N.V., Zhmak M.N., Ivanov I.A., Kudryashova K.S., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxicology. 2016. V. 121. P. 70–76.
22. Kreil G., Bachmayer H. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 20. P. 344–350.
23. Birrell G.W., Earl S., Masci P.P., de Jersey J., Wallis T.P., Gorman J.J., Lavin M.F. // Molecular & Cellular Proteomics: MCP. 2006. V. 5. P. 379–389.
24. Earl S.T., Birrell G.W., Wallis T.P., St Pierre L.D., Masci P.P., de Jersey J., Gorman J.J., Lavin M.F. // Proteomics. 2006. V. 6. P. 6554–6565.
25. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. // Nature Protocols. 2007. V. 2. P. 1896–1906.
26. Geyer P.E., Kulak N.A., Pichler G., Holdt L.M., Teupser D., Mann M. // Cell Systems. 2016. V. 2. P. 185–195.
27. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. // Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM. 2003. V. 17. P. 2337–2342.
28. Cox J., Mann M. // Annual Review of Biochemistry. 2011. V. 80. P. 273–299.

### Intraspecific Variability in the Composition of the Venom from Monocle Cobra *Naja kaouthia*

V. V. Ryabinin\*, R. H. Ziganshin\*, V. G. Starkov\*, V. I. Tsetlin\*, and Y. N. Utkin\*,#

#Phone: +7 (905) 786-83-15; fax: +7 (495) 336-65-22; e-mail: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru

\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A proteomic analysis of the venom of males and females of the monocled cobra *Naja kaouthia* that were kept in captivity was carried out. Using the amino acid sequences of proteins of the taxonomic group *Serpentes* from the UniProt KB database as a database, 875 proteins were identified in the venom samples, and the relative content of about 190 of them were determined in each venom sample by the method of label-free quantitative proteomics. It is shown that the total content of 35 main protein components of the venom of each individual is about 98% of the total quantity of venom proteins. An analysis of the relative content of the venom proteins in males and females showed a significant ( $p < 0.05$ ) higher content of nerve growth factor and natriuretic peptide in the venom of females. Analysis of the profile of post-translational modifications of *N. kaouthia* toxins revealed previously unknown sites for phosphorylation, acetylation and formylation.

*Keywords:* snake venoms, proteome analyses, LC-MS/MS, label-free quantitative proteomics