



УДК 547.466.05

РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

II. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ N-КОНЦЕВОЙ ПРОЛИН*

*Цыряпкин В. А., Шьроков В. А., Недоспасова Л. В.**Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

На примере очистки Pro-Gly, Pro-Gly-Gly, Pro-Gly-Gly-Gly и Pro-Leu-Gly показана принципиальная возможность использования медных комплексов оснований Шиффа аминокислот и пептидов для выделения из смеси пептидов, содержащих N-концевой пролин. Аминокислоты и пептиды, образующие комплексы, сорбировали на анионообменной смоле, при этом в растворе концентрировались пролин и пептиды с N-концевым пролином.

В синтезе пептидов наиболее трудоемкой и часто наиболее дорогостоящей стадией является выделение и очистка конечного продукта. Выделение пептидных смесей, полученных в результате фрагментации белков с целью их последующего анализа, также представляет значительный интерес. Имеется огромное число хорошо разработанных методов выделения индивидуальных пептидов из смесей, использующих различия в растворимости, величине заряда, размере молекулы или других свойствах. Особое место занимают методы, основанные на специфической модификации отдельных аминокислотных остатков, входящих в пептидную цепь, приводящей к изменению свойств всей молекулы. Так, были предложены методы очистки пептидов и белков, содержащих цистеин, «ковалентной» хроматографией, в ходе которой происходит селективное связывание функциональных групп сорбента с SH-группами цистеина [2-4], показана принципиальная возможность связывания и очистки триптофансодержащих пептидов [5], использована возможность алкилирования CH_3S -группы метионина для ковалентного связывания и последующего выделения пептидов и белков, содержащих эту аминокислоту [6].

В этом сообщении мы предлагаем метод препаративного выделения пептидов, содержащих N-концевой пролин. В качестве модельных соединений взяты ди-, три- и тетрапептиды, в том числе Pro-Leu-Gly, который является исходным в синтезе окситоцина.

Предлагаемый нами метод основан на способности аминокислот и пептидов с первичной концевой аминогруппой образовывать комплексы их оснований Шиффа с салициловым альдегидом и его производными и с ионами Cu(II) . Такие комплексы хорошо сорбируются сильной анионообменной смолой. В противоположность этому пролин и пептиды с N-концевым пролином не могут образовывать оснований Шиффа и поэтому сорбируются анионообменной смолой значительно слабее. Исходя из этого,

* Сообщение I см. [1].

Выделение пептидов с N-концевым остатком пролина из смесей, содержащих другие пептиды и аминокислоты, обработкой этих смесей салициловым альдегидом (или 5-бромсалициловым альдегидом), ионами Cu(II) и смолой CG-400 II

Выделяемый пептид	Состав смеси						
	качественный	до обработки		после 1 обработки		после 2 обработок	
		мг	%	мг	%	мг	%
Pro-Gly	Pro-Gly	8,8	64	7,4	67		
	Pro	3,4	25	3,0	27		
	Gly	1,5	11	0,7	6		
Pro-Gly-Gly	Pro-Gly-Gly	60	54	15	70	12	84
	Pro	4	4	1,7	8	1,3	9
	Gly-Gly	48	42	4,7	22	1	7
Pro-Gly-Gly-Gly	Pro-Gly-Gly-Gly	45	76	22,5	88	11,2	89
	Pro	3	5	2,5	10	1,4	11
	Gly-Gly-Gly	11	19	0,5	2	0	0
Pro-Leu-Gly *	Pro-Leu-Gly	53	83	26,5	84	22,2	98,6
	Pro	1	1,5	0,5	1,6	0,3	1,4
	Leu+Gly	10	15,5	4,5	14,4	0	0

* Вторая обработка проведена 5-бромсалициловым альдегидом.

следовало ожидать, что при обработке смеси пептидов и аминокислот щелочным раствором салицилового альдегида и Cu(II) аминокислоты и пептиды со свободной первичной аминогруппой будут образовывать комплекс основания Шиффа с ионами меди и сорбироваться анионообменной смолой. Приведенные в таблице результаты подтверждают это предположение, причем, чем больше аминокислотных остатков в пептиде с первичной аминогруппой, тем сильнее сорбируется его комплекс. Так, после первой обработки концентрация глицина уменьшилась в 2 раза, Gly-Gly — в 10, а Pro-Gly-Gly — в 20 раз.

Обработка смеси, содержащей Pro-Leu-Gly, салициловым альдегидом и Cu(II) практически не дала обогащения. По-видимому, величина сорбции Pro-Leu-Gly смолой сравнима с величиной сорбции салицилиденлейцината меди и салицилиденглицината меди. Если, однако, увеличить гидрофобные свойства комплексов, например введением в бензольное кольцо салицилового альдегида брома, то отношение коэффициентов распределения между смолой и раствором для Pro-Leu-Gly и комплексов оснований Шиффа с Cu(II), полученных из лейцина и глицина, можно резко изменить. Действительно, замена салицилового альдегида на 5-бромсалициловый альдегид приводит к полному связыванию смолой комплексов лейцина и глицина, а Pro-Leu-Gly и пролин остаются в растворе.

Важно отметить, что после сорбции комплексов на смоле в растворе могут остаться кроме пептидов с N-концевым пролином и самого пролина другие пептиды, не содержащие свободных аминогрупп. Однако эти примесные пептиды можно довольно просто отделить от пептидов с N-концевым пролином с помощью хроматографии на сульфокатионите.

Таким образом, нами показано, что комплексы ионов Cu(II) с основаниями Шиффа аминокислот и пептидов можно использовать для выделения из смеси пептидов с N-концевым пролином.

Экспериментальная часть

Пептиды Pro-Gly, Pro-Gly-Gly и Pro-Gly-Gly-Gly получали по методике [7] прикапыванием раствора N-карбоксиянгидрида пролина в диоксане к растворам Gly, (Gly)₂, (Gly)₃ соответственно, в 0,1 М боратном бу-

фере при строгом контроле pH 10,2 и интенсивном перемешивании при 0°. Полученные пептиды содержали примеси аминокислот и более коротких пептидов. Состав полученных смесей см. в таблице. Трипептид Pro-Leu-Gly получен С. М. Андреевым (ИНЭОС АН СССР) методом полимерных реагентов [8].

Выделение пептидов с N-концевым пролином проводили по следующей общей методике: смесь пептидов и аминокислот, содержащую пептид с N-концевым пролином, растворяли в 20 мл воды и добавляли 0,6 ммоль комплекса салицилового альдегида с Cu(II) (состав комплекса 2 : 1 соответственно) и 1,3 г смолы CG-400 II в OH⁻-форме. Затем 10% раствором NaOH доводили pH среды до 9, суспензию встряхивали в течение 5 ч при 20° и выдерживали при этих условиях еще 16 ч.

Затем реакционную смесь фильтровали и из полученного ярко-зеленого раствора отбирали аликвоту (0,3 мл) для проведения анализа на содержание пептидов и аминокислот (первая обработка).

К оставшемуся раствору добавляли новую порцию смолы CG-400 II, салицилового альдегида и Cu(II) и повторяли операцию, как описано выше (вторая обработка).

Смесь пептидов, содержащую Pro-Leu-Gly, обрабатывали аналогично, но во второй обработке салициловый альдегид заменяли 5-бромсалициловым альдегидом: к 10 мл супернатанта после первой обработки прибавляли 0,3 ммоль малахита Cu₂(OH)₂CO₃·2H₂O, 0,3 ммоль 5-бромсалицилового альдегида и 0,6 г промытой 0,01 н. NaOH смолы CG-400 II с доведением pH среды до 10.

Результаты анализа растворов после каждой обработки представлены в таблице.

Количественный состав смесей, содержащих Pro-Gly, Pro-Gly-Gly и Pro-Gly-Gly-Gly, определяли на аминокислотном анализаторе ААА-881 (ЧССР) с колонкой 50 × 0,9 см, наполненной аминоксом А-6. Элюировали Na-цитратным буфером, pH 4,25. Времена удерживания для ди-, три- и тетрапептидов с N-концевым пролином 74, 77 и 70 мин соответственно.

Pro-Leu-Gly анализировали на колонке 15 × 0,9 см со смолой аминокс О-15 с элюцией 0,35 н. Na-цитратным буфером, pH 5,28; время удерживания 12 мин.

Во всех случаях скорость подачи элюента составляла 90 мл/ч, температура колонок 54°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цыряпкина В. А., Недоспасова Л. В. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 9, 2030—2034.
2. Der Terrossian E., Pradel L., Kassel R., Desvages G. (1974) Eur. J. Biochem., 45, 243—251.
3. Krieger D. E., Erickson B. W., Merrifield R. B. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3160—3164.
4. Егоров Ц. А., Шахпаров М. И., Давидович Ю. А., Лозьянский В. И., Заславский Б. Ю., Рогожин С. В. (1977) Биоорг. химия, 3, 1111—1115.
5. Rubinstein M., Shechter J., Patchornik A. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 70, 1257—1263.
6. Shechter J., Rubinstein M., Patchornik A. (1977) Biochemistry, 16, 1424—1430.
7. Denkewalter R. G., Schwam H., Strachan R. G., Beesley T. E., Veber D. F., Schoenewald E. F., Barkemeyer H., Paleveda W. J., Jacob T. A., Hirschmann R. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 3163—3164.
8. Andreev S. M., Tsiryapkin V. A., Samoilova N. A., Mironova N. V., Davidovich Yu. A., Rogozhin S. V. (1977) Synthesis, № 5, 303—304.

Поступила в редакцию
26.VI.1978

SEPARATION OF AMINO ACIDS AND PEPTIDES. II. A METHOD FOR
ISOLATION OF N-TERMINAL PROLINE CONTAINING PEPTIDES

TSIRYAPKIN V. A., SHIROKOV V. A., NEDOSPASOVA L. V.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A possibility for applying the copper complexes of amino acid and peptide Schiff's bases for isolation of peptides comprising N-terminal proline was illustrated on the example of Pro-Gly, Pro-Gly-Gly, Pro-Gly-Gly-Gly, and Pro-Leu-Gly. Amino acids and peptides capable of forming such complexes were adsorbed on anion-exchange resin, whereas proline and peptides having N-terminal prolyl residue remained in solution.
