



УДК 577.112.6:542.95

© 1993 Л. Д. Чикин, А. Б. Мошникова,
Ж. О. Гребенникова, А. Т. Кожич, В. Т. Иванов

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ СЕГМЕНТЫ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

С целью изучения конформационных параметров фрагментов бактериоопсина осуществлен синтез пептидов, моделирующих его трансмембранные сегменты С, D, E и G. Синтезированы следующие пептиды последовательности бактериоопсина: ВО-(67—106), ВО-(102—136), ВО-(128—162), ВО-(190—233). Изучены различные варианты проведения твердофазного синтеза, и предложена оптимальная методика для синтеза крупных гидрофобных пептидов.

Важное место в современной физико-химической биологии занимают исследования механизма функционирования интегральных мембранных белков, участвующих в ионном транспорте, регуляции нервной проводимости и других функциях клетки. Для всех интегральных мембранных белков характерно наличие одного или нескольких гидрофобных сегментов, пронизывающих толщу мембраны. Изучение пространственной структуры этих сегментов, а также закономерностей их взаимодействия с липидным окружением является необходимым этапом в выяснении механизмов ионного транспорта. В большинстве случаев нужные фрагменты могут быть получены только путем их химического синтеза. Высокая гидрофобность трансмембранных сегментов обуславливает особую сложность их синтеза и требует разработки новых методических подходов.

Данная работа является частью комплексного исследования бактериородопсина — интегрального белка пурпурных мембран галофильных бактерий *Halobacterium halobium* (рис. 1), осуществляющего фотоиндуцируемый транспорт протонов через мембрану против градиента pH. Изучение конформационных параметров бактериородопсина и его фрагментов является важным этапом выяснения механизма его функционирования.

В рамках упомянутого исследования ранее был осуществлен синтез ряда функционально важных фрагментов молекулы бактериоопсина. При этом использовались различные методы проведения синтеза. Классическими методами пептидной химии в растворе были синтезированы пептиды, моделирующие второй и седьмой (В и G) трансмембранные тяжи бактериоопсина, а именно последовательности ВО-(34—65) и ВО-(205—231) [1, 2]. В процессе синтеза пришлось столкнуться с рядом серьезных трудностей, связанных в первую очередь с ярко выраженной гидрофобностью пептидных фрагментов и, как следствие, низкой их растворимостью. Кроме того, синтез в растворе требует значительных (до нескольких месяцев) затрат времени. В данной работе мы обратились к твердо-

Принятые сокращения: ВО — бактериоопсин, DIEA — диизопропилэтиламин, НОВТ — 1-гидроксibenзотриазол, TFA — трифторуксусная кислота, сНх — циклогексил, Bzl(Cl₂) — 2,6-дихлорбензил, Z(Cl) — 2-хлорбензилоксикарбонил, For — формил, Рапн — гидроксиметилфенилацетамидометил.

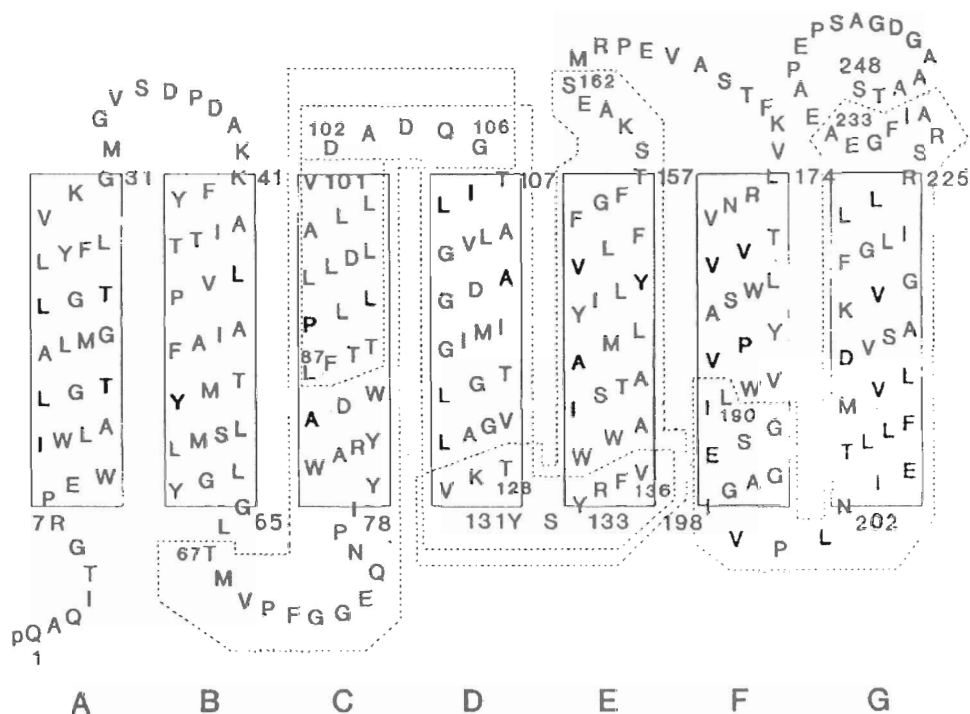


Рис. 1. Предполагаемая структура бактериоопсина [13] с отмеченными на ней штриховой линией синтезированными пептидами; сплошной линией выделены предполагаемые трансмембранные сегменты. Цифрами обозначены границы трансмембранных сегментов и синтезированных пептидов

фазному синтезу как наиболее перспективному методу. Этим методом были синтезированы фрагменты бактериоопсина, соответствующие трансмембранным тлям С, D, E, F, G (ВО-(67—106), ВО-(87—136), ВО-(102—136), ВО-(128—162), ВО-(169—205), ВО-(175—205), ВО-(190—233)). С целью упрощения синтеза имеющиеся в этих фрагментах остатки метионина в положениях 68, 118, 145 и 210 были заменены изостерическими сстатками норлейцина, при этом мы учитывали, что такая замена обычно не приводит к снижению биологической активности [3]. В ходе работы были изучены три различных варианта проведения синтеза.

1. Пептиды ВО-(87—136), ВО-(102—136), ВО-(87—136), ВО-(169—205), ВО-(175—205) были синтезированы с использованием двукратной конденсации для каждой аминокислоты. Первая конденсация проводилась методом симметричных ангидридов для всех аминокислот, кроме Arg, Asn, Gln и Trp. Избыток симметричного ангидрида по отношению к количеству аминогрупп загруженной смолы составлял около 200%. Вторая конденсация для всех аминокислот, за исключением случаев посадки на Asn и Gln, проводилась методом бензотриазоловых (BT) эфиров. Избыток BT-эфира также составлял около 200%. В случае Arg, Asn, Gln и Trp обе конденсации осуществлялись методом BT-эфиров, а для посадки на Asn и Gln вторая конденсация, как и первая, велась с использованием симметричных ангидридов. В этом варианте общий избыток присоединяемой аминокислоты составлял около 750%. Этот вариант проведения синтеза, в основу которого положена методика, предложенная группой Меррифилда [4], был признан неудачным, так как целевой продукт был выделен в небольшом количестве только в случае ВО-(102—136) и ВО-(87—136) (рис. 2). Содержащие по два триптофановых остатка пептиды ВО-(169—205) (рис. 3) и ВО-(175—205) выделить не удалось. Одной из причин этих неудач, вероятно,

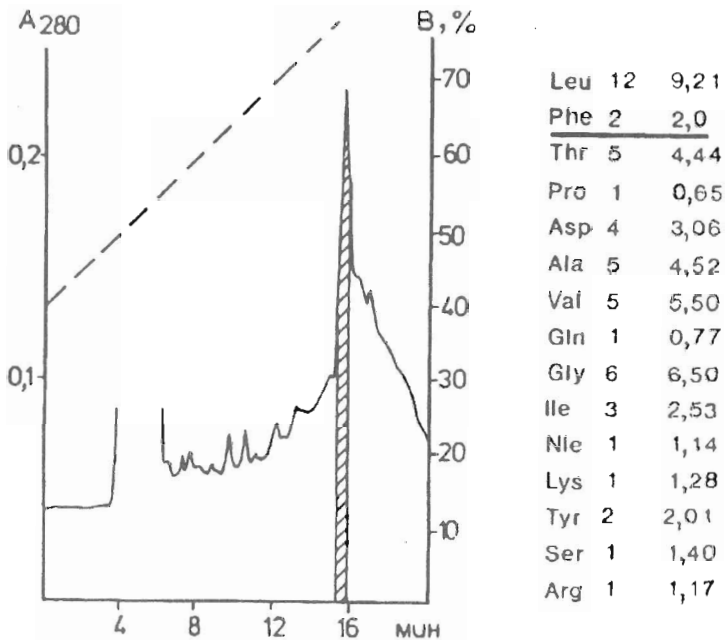


Рис. 2. Хроматограмма пептида ВО-(87—136), синтезированного по первому варианту, после обработки фтористым водородом (колонка Vydac C₄ 10×250 мм, буфер А — 0,4% водная трифторуксусная кислота, буфер В — ацетонитрил). Справа здесь и далее приведен аминокислотный анализ защищенного пептида до снятия со смолы (подчеркнута аминокислота, используемая в качестве внутреннего стандарта). Заштрихованные области соответствуют отбираемым фракциям.

стало использование в синтезе незащищенного триптофана, до этого успешно применявшегося в синтезе пептидов размером более 20 аминокислотных остатков [5, 6].

2. Пептиды ВО-(128—162) и ВО-(190—233) синтезировали с использованием однократной конденсации методом ВТ-эфиров для всех аминокислот. Избыток ВТ-эфира составлял соответственно 1000 и 600%. Но этот вариант, успешно применяемый для синтеза пептидов размером до 30 аминокислотных остатков [5], для синтеза крупных гидрофобных пептидов оказался также непригоден. Пептид ВО-(128—162) (рис. 4а), содержащий два остатка триптофана, выделить не удалось. В этом случае также использовался незащищенный триптофан. По-видимому, длительность синтеза и большое количество операций деблокирования приводят к разрушению незащищенного триптофанового остатка. Наличие пептида ВО-(190—233) (рис. 5а) было подтверждено ЯМР, но выделить его в необходимом для исследований количестве также не удалось из-за присутствия большого количества примесей. Причиной неудачи в этом случае может быть значительная потеря аминогрупп в процессе синтеза, о чем свидетельствовали данные выборочно проводимого нингидринового теста.

3. Третий вариант, использованный при синтезе пептида ВО-(67—106) (рис. 6), а также при повторном синтезе пептидов ВО-(190—233) (рис. 5б) и ВО-(128—162) (рис. 4б), заключался в применении двукратной конденсации методом ВТ-эфиров для всех аминокислот. Избыток ВТ-эфира в каждой конденсации составлял от 300 до 500%. Общий избыток каждой аминокислоты составлял 700—1000%. В этом варианте нами использовался защищенный триптофан.

Пептиды, в том числе и те два, синтез которых ранее окончился неудачей, были успешно синтезированы и выделены в достаточных для исследований

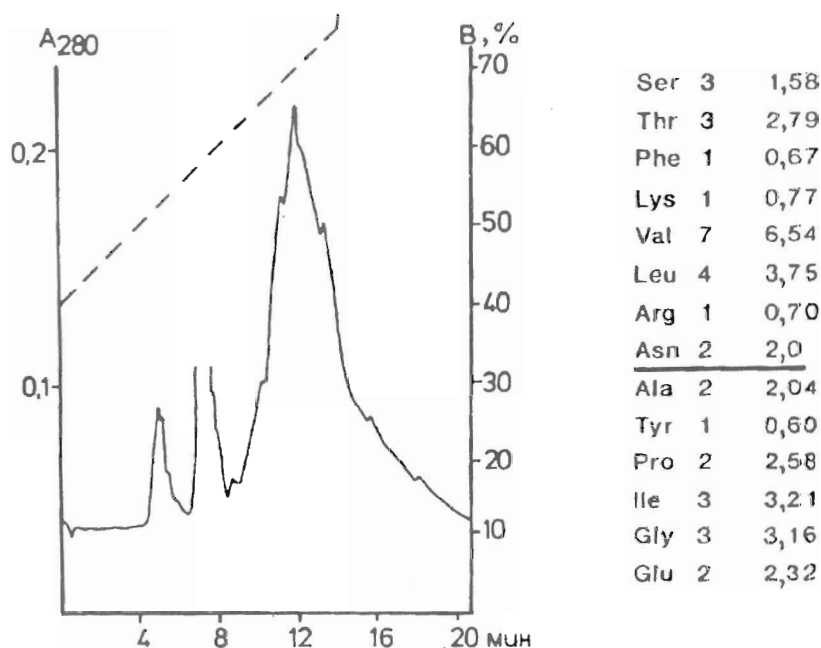


Рис. 3. Хроматограмма реакционной смеси неудачного синтеза пептида ВО-(169—205) по первому варианту после обработки фтористым водородом (колонка Ultrasphere-octyl 10×250 мм, буфер А — 0,4% водная трифторуксусная кислота, буфер В — ацетонитрил)

количествах. Хроматограммы, относящиеся к неудачным синтезам, демонстрируют практическое отсутствие отдельного пика, соответствующего по времени выхода пептиду (синтез пептида ВО-(169—205) по первому варианту (рис. 3) и ВО-(128—162) по второму варианту (рис. 4а)), а также наличие многочисленных близкоидущих примесей (синтез по второму варианту пептида ВО-(190—233) (рис. 5а)). Приведенные там же аминокислотные анализы вещества на смоле говорят о том, что характерный для твердофазного синтеза процесс снижения относительных количеств аминокислот в направлении от С-конца пептида к его N-концу, связанный с потерей аминогрупп или снижением их доступности, наиболее ярко выражен при использовании второго варианта, а наименее — при использовании третьего варианта. В случае второго варианта это может быть объяснено недостаточно полным для пептидов размером более 30 аминокислотных остатков протеканием реакции конденсации, поэтому этот наиболее быстрый и экономичный вариант для синтеза крупных пептидов оказался, к сожалению, непригоден. В случае же первого варианта можно предположить, что причина потери аминогрупп заключается в недостатках метода симметричных ангидридов. Третий вариант оказался наиболее совершенным из рассмотренных.

Структура синтезированных пептидов подтверждена данными аминокислотного анализа (таблица), а также при помощи двумерной спектроскопии ¹H-ЯМР [7, 8]. Таким образом, нами разработан метод, пригодный для синтеза гидрофобных триптофансодержащих пептидов размером более 40 аминокислотных остатков.

Время, необходимое для синтеза пептидов по этой методике, составило 3 ч 40 мин на аминокислоту.

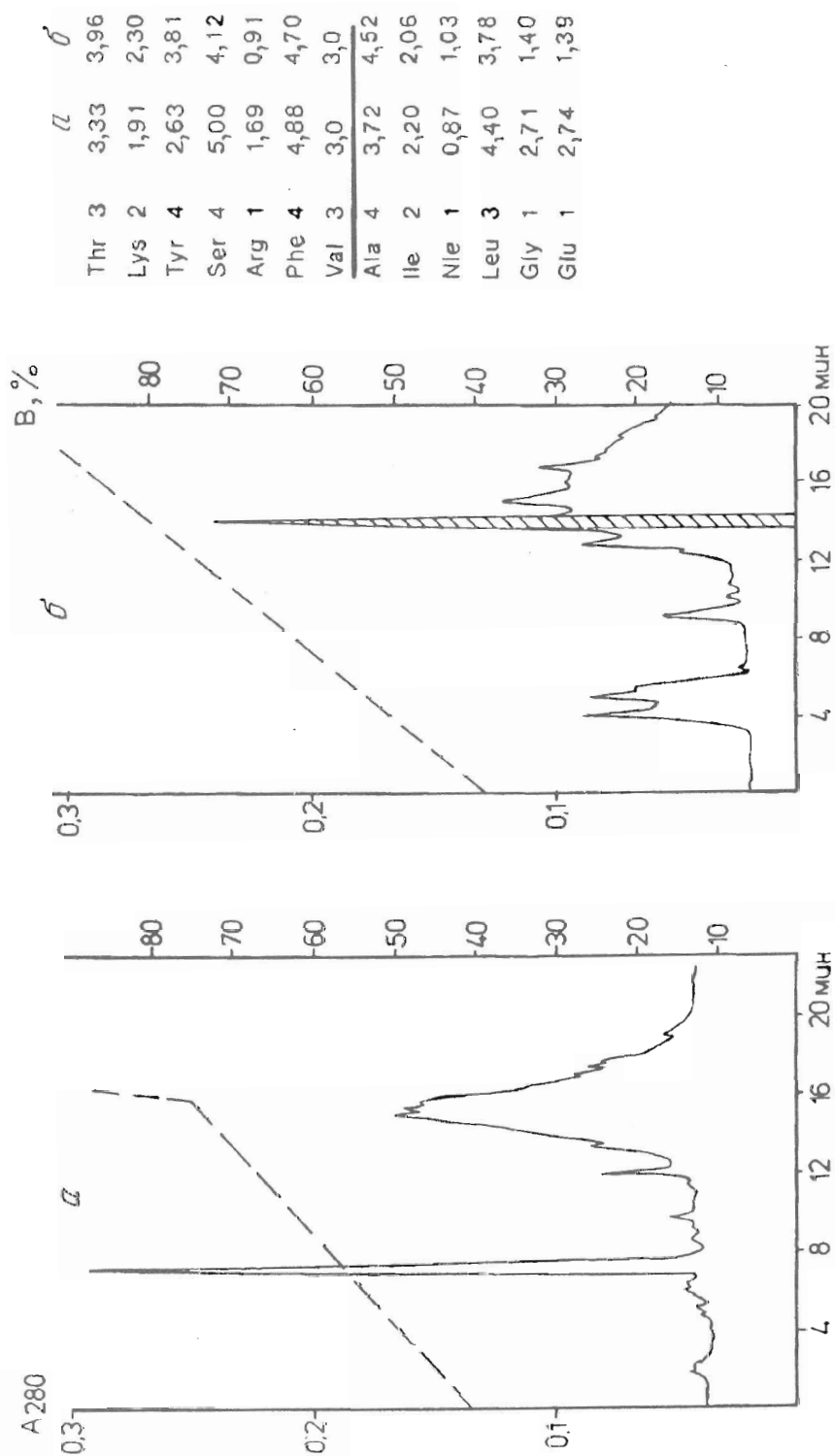
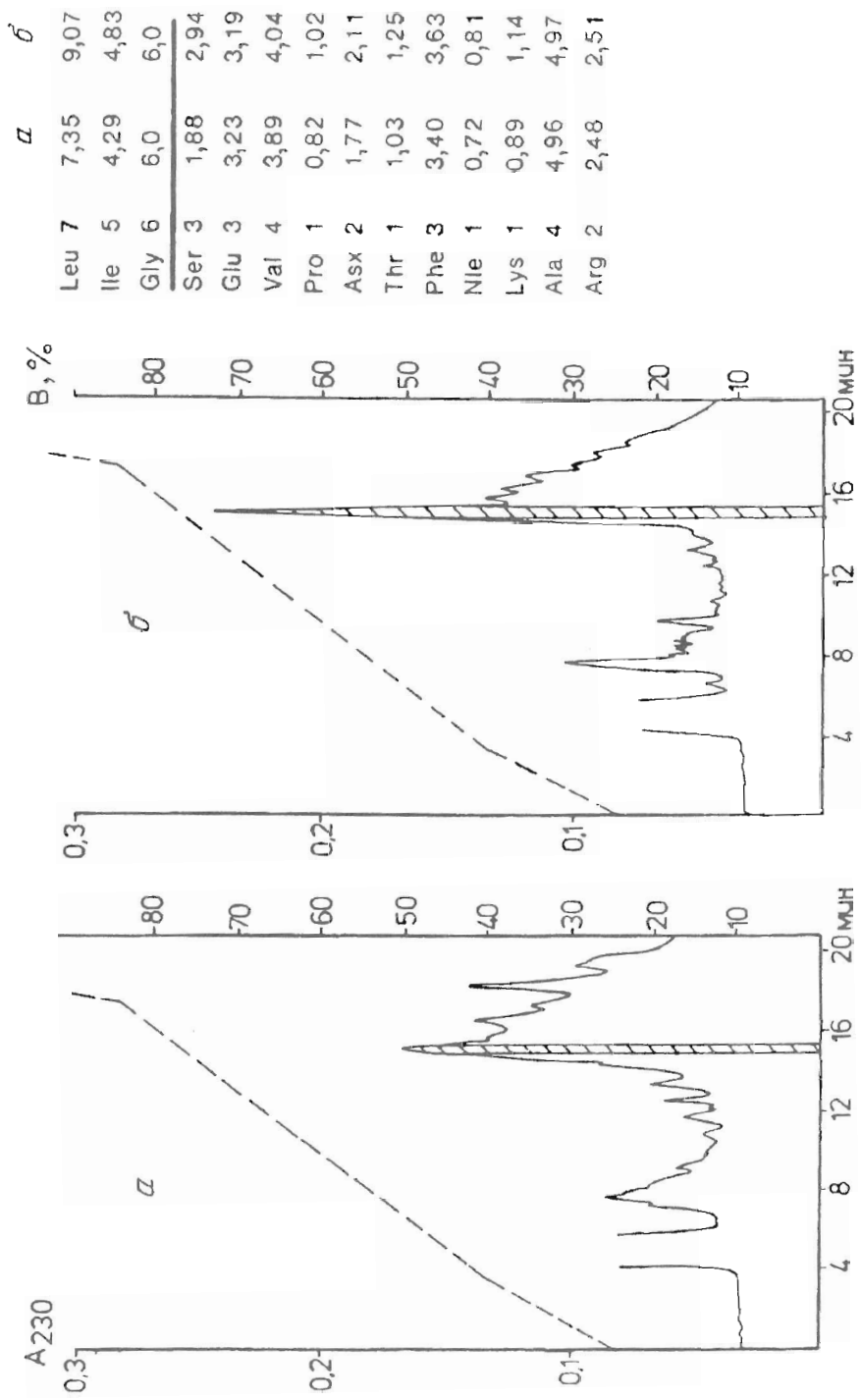


Рис. 4. Хроматограммы вещества неудачного (по второму варианту) (а) и удачного (по третьему варианту) (б) синтеза пептида ВО-(128—162) после обработки фтористым водородом (условия как на рис. 3)



	α	β
Leu 7	7,35	9,07
Ile 5	4,29	4,83
Gly 6	6,0	6,0
<hr/>		
Ser 3	1,88	2,94
Glu 3	3,23	3,19
Val 4	3,89	4,04
Pro 1	0,82	1,02
Asx 2	1,77	2,11
Thr 1	1,03	1,25
Phe 3	3,40	3,63
Nle 1	0,72	0,81
Lys 1	0,89	1,14
Ala 4	4,96	4,97
Arg 2	2,48	2,51

Рис. 5. Хроматограммы вещества неудачно (по второму варианту) (α) и удачно (по третьему варианту) (β) синтеза пептида ВО-(190—233) после обработки фтористым водородом (условия как на рис. 2)

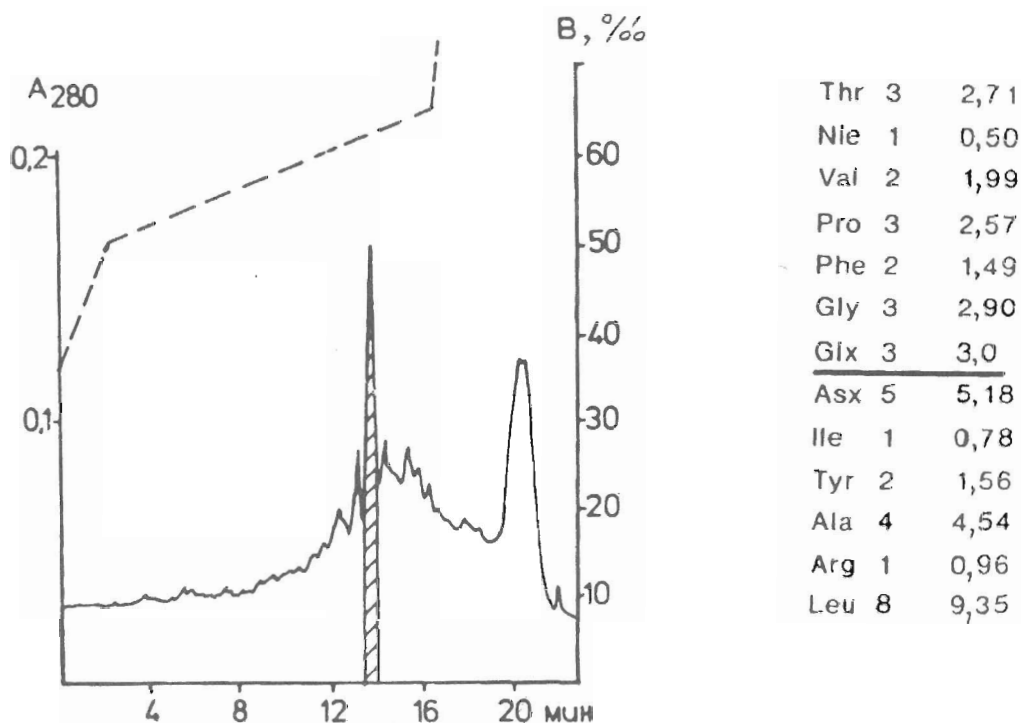


Рис. 6. Хроматограмма пептида ВО-(67—106), синтезированного по третьему варианту, после обработки фтористым водородом (условия как на рис. 3)

Экспериментальная часть

В работе использованы реактивы и производные аминокислот фирм Reanal (ВНР), PRF (Япония), Fluka (Швейцария). В качестве носителя использовали смолу фирмы Bio-Rad (США), аминотетилированную по стандартной методике [9]. Для отщепления со смолы и деблокирования пептидов использовали аппарат фирмы PRF (Япония). Для высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали прибор фирмы Gilson (Франция). Гидролиз пептидов для аминокислотного анализа проводили в течение 24 ч в смеси концентрированной соляной и пропионовой кислот (1 : 1) с добавлением 0,5% фенола.

Растворители абсолютировали обычным образом [10]. Пептиды были синтезированы твердофазным методом на модернизированном нами синтезаторе «Beckman 990» (США). В качестве носителя использовали аминотетилированную смолу с *пара*-гидроксиметилфенилацетамидометильной якорной группировкой. Концентрация аминогрупп составляла 0,25—0,5 ммоль на 1 г смолы. Введение якорной группировки осуществлялось при помощи предварительно синтезированного Рам-производного защищенной С-концевой аминокислоты [9]. Синтез осуществлялся методом последовательного наращивания пептидной цепи [11]. Для временной защиты α -аминогрупп аминокислот использовали Вос-группу. Боковые функциональные группы аминокислот защищали:

Asp, Glu — OcHx; Arg — Tos; Ser, Thr — Bzl; Tyr — Bzl(Cl₂); Lys — Z(Cl); Trp — For. Попытки использования незащищенного триптофана в синтезе крупных пептидов были, как правило, неудачны. Конденсацию аминокислот осуществляли при помощи предварительно приготовленных симметричных ангидридов (кроме Arg, Gln, Asn, Trp) и бензотриазоловых эфиров. Проведенная нами модернизация синтезатора, заключающаяся в переоборудовании мерного сосуда

Аминокислотные анализы пептидов после очистки с помощью ВЭЖХ
Подчеркнуты аминокислоты, используемые в качестве внутреннего стандарта

ВО-(87—136)		ВО-(128—162)		ВО-(190—233)		ВО-(67—106)	
Leu 12	10,71	Thr 3	2,96	Leu 7	7,15	Thr 3	2,89
<u>Phe 2</u>	<u>2,0</u>	Lys 2	2,04	Ile 5	4,88	Nle 1	0,97
Thr 5	4,67	Tyr 4	3,89	<u>Gly 6</u>	<u>6,0</u>	Val 2	2,00
Pro 1	0,97	Ser 4	4,12	Ser 3	3,08	Pro 3	2,93
Asp 4	3,82	Arg 1	0,98	Glu 3	3,05	Phe 2	1,94
Ala 5	4,87	Phe 4	4,14	Val 4	4,00	<u>Gly 3</u>	<u>3,04</u>
Val 5	5,14	<u>Val 3</u>	<u>3,0</u>	Pro 1	0,98	<u>Glx 3</u>	<u>3,0</u>
Gln 1	0,96	Ala 4	4,15	Asx 2	2,01	Asx 5	5,07
Gly 6	6,35	Ile 2	2,05	Thr 1	1,03	Ile 1	0,98
Ile 3	2,86	Nle 1	0,98	Phe 3	3,10	Tyr 2	1,95
Nle 1	1,01	Leu 3	3,14	Nle 1	0,97	Ala 4	3,96
Lys 1	1,03	Gly 1	1,10	Lys 1	0,98	Arg 1	0,98
Tyr 2	1,96	Gly 1	1,02	Ala 4	4,13	Leu 8	8,27
Ser 1	1,08			Arg 2	2,07		
Arg 1	0,99						

А серийного прибора в преактивационный и установке двух термостатов, позволила проводить преактивацию аминокислот в полностью автоматическом режиме, при охлаждении до 0° С, непосредственно перед введением в конденсацию, а также осуществлять конденсацию при нагреве реакционной смеси от 10 до 30° С в течение 1 ч. Полноту протекания реакции контролировали с помощью выборочно проводимого качественного нингидринового теста [12]. Непрореагировавшие аминогруппы блокировали методом ацилирования смесью Ac₂O — DIEA (1 : 2). Вос- группу в процессе синтеза удаляли обработкой смесью TFA — CHCl₃ (1 : 1) с добавлением индола (1 г/л раствора) за 20 мин с последующей нейтрализацией 7% раствором диизопропилэтиламина в DMF в течение 10 мин. После окончания синтеза смолу промывали смесью TFA—CHCl₃ (1 : 1), нейтрализовали 7% DIEA в DMF, промывали CHCl₃ и высушивали в вакууме 5—8 ч. Высушенная смола хранилась в темноте при -20° С.

Протоколы синтеза пептидов. Объемы растворителей приведены в расчете на 2 г исходной смолы.

Протокол 1 (основной вариант): 1) CHCl₃, 30 мл, 1×1 мин; 2) CHCl₃, 30 мл, 1×3 мин; 3) 50% TFA/CHCl₃, 30 мл, 1×1 мин; 4) 50% TFA/CHCl₃, 30 мл, 1×20 мин; 5) CHCl₃, 30 мл, 5×1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1×15 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) защищенная аминокислота, 4 ммоль/5 мл CHCl₃, 1×3 мин, 0° С; 9б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl₃, 1×10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь «9б» добавляется к смоле; 11) DMF, 10 мл, промывка преактивационного сосуда; 12) перемешивание 40 мин, 30° С; 13) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 14) отбор образца для нингидринового теста; 15) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×3 мин; 16) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 17) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 17а) НОВТ, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0° С; 17б) DCC, 2 ммоль/5 мл CHCl₃, 1×3 мин, 0° С; 17в) защищенная аминокислота, 2 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0° С; 18) реакционная смесь «17в» добавляется к смоле; 19) DMF, 5 мл, промывка преактивационного сосуда; 20) перемешивание 80 мин, 30° С; 21) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 22) отбор образца для нингидринового теста.

Для Arg, Asn, Gln, Trp вместо операций 9—12 основного варианта использовали операции 17—20. В случае посадки на Asp и Gln вместо операций 17—20 основного варианта использовались операции 9—12.

Протокол 2: 1) CHCl_3 , 30 мл, 1×1 мин; 2) CHCl_3 , 30 мл, 1×3 мин; 3) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1×1 мин; 4) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1×20 мин; 5) CHCl_3 , 30 мл, 5×1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) НОВТ, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0° С; 9б) DCC, 3 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1×3 мин, 0° С; 9в) защищенная аминокислота, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь «9в» добавляется к смоле; 11) перемешивание 50 мин, 30° С; 12) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 13) отбор образца для нингидринового теста.

Для Arg, Lys, Tug время конденсации (операция 11) было увеличено до 75 мин, так как в случае использования стандартного времени конденсации вышеназванные аминокислоты иногда оказывались, по данным аминокислотного анализа, несколько заниженными относительно других аминокислот.

Протокол 3: 1) CHCl_3 , 30 мл, 1×1 мин; 2) CHCl_3 , 30 мл, 1×3 мин; 3) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1×1 мин; 4) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 1×20 мин; 5) CHCl_3 , 30 мл, 5×1 мин; 6) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 7) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 8) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 9) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 9а) НОВТ, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0° С; 9б) DCC, 3 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1×3 мин, 0° С; 9в) защищенная аминокислота, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0° С; 10) реакционная смесь «9в» добавляется к смоле; 11) перемешивание 30 мин, 30° С; 12) CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; 13) DMF, 30 мл, 2×1 мин; 14) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×3 мин; 15) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 16) DMF, 30 мл, 1×20 мин; параллельно в преактивационном сосуде: 16а) НОВТ, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×3 мин, 0° С; 16б) DCC, 3 ммоль/5 мл CHCl_3 , 1×3 мин, 0° С; 16в) защищенная аминокислота, 3 ммоль/5 мл DMF, 1×10 мин, 0° С; 17) реакционная смесь «16в» добавляется к смоле; 18) перемешивание 60 мин, 30° С; 19) CHCl_3 , 30 мл, 1×1 мин; 20) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 21) отбор образца для нингидринового теста. Для Arg время первой конденсации (операция 11) было увеличено до 60 мин, так как в случае использования стандартной конденсации 30+60 мин нингидриновый тест иногда обнаруживал неполное протекание реакции. Из двух рассмотренных вариантов удлиненной конденсации — 30+90 и 60+60 мин — лучшие результаты дал последний.

Вспомогательные протоколы

Протокол, используемый для посадки на смолу Рам-производного защищенной аминокислоты: 1) CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; 2) 50% TFA/ CHCl_3 , 30 мл, 2×1 мин; 3) CHCl_3 , 30 мл, 5×1 мин; 4) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×1 мин; 5) 7% DIEA/DMF, 30 мл, 1×10 мин; 6) DMF, 30 мл, 3×1 мин; 7) DMF, 30 мл, 1×5 мин; параллельно-ручная активация: 2 ммоль Рам-производного защищенной аминокислоты, 2 ммоль НОВТ, 2 ммоль DCC, DMF/ CHCl_3 , (1 : 1) до 10 мл, 10 мин, 20° С; 8) реакционная смесь вручную добавляется к смоле; 9) перемешивание 40—60 мин, 30° С; 10) DMF, 30 мл, 5×1 мин; 11) отбор образца для нингидринового теста.

Протокол ацилирования: 1) приготовление вручную смеси 2 мл DIEA, 1 мл Ac_2O и до 5 мл CHCl_3 ; 2) добавление смеси вручную к смоле; 3) DMF, 5 мл, 1×20 мин; 4) DMF, 30 мл, 5×1 мин.

Деблокирование и ВЭЖХ. Снятие пептидов со смолы и удаление защитных групп осуществляли действием жидкого фтористого водорода в присутствии *пара*-крезола (10 : 1) (в случае пептидов ВО-(87—136), ВО-(102—136)) или HF в присутствии *пара*-крезола и *пара*-тиокрезола (20 : 1 : 1) (в случае пептидов ВО-(67—106), ВО-(128—162), ВО-(169—205) и ВО-(175—205)). После промывки эфиром пептиды элюировали 20 и 50% растворами уксусной кислоты и лиофилизовали. Пептиды очищали препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ на ко-

лонках. Ultrasphere-octyl и Vydac C4, используя градиент концентрации ацетонитрила или смеси метанол — изопропанол (1 : 1) в 0,3—0,5% водной трифторуксусной кислоте. Аналитические хроматограммы выделенных фракций на тех же сорбентах свидетельствовали о гомогенности препаратов. Пептиды характеризовали аминокислотным анализом. При использовании указанных (см. выше) условий гидролиза остаток триптофана не определяется; данные для серина и треонина, приведенные на рисунках, скорректированы с учетом разрушения этих аминокислот при используемой методике подготовки образцов (для серина степень разрушения принята 50%, для треонина — 25%). Аминокислоты на рисунках расположены в порядке, ориентировочно соответствующем их последовательности в пептиде, в направлении от N- к C-концу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozhich A. T., Vaskovsky B. V. // Peptides. Structure and Function. Proc. 8th Amer. Pept. Symp./Eds Hruby V. J., Rich D. H. Rockford, IL: Pierce Chemical Comp., 1984. P. 191—194.
2. Kozhich A. T., Panin A. V., Tchikin L. D., Ivanov V. T. // Peptides. Proc. 18th European Pept. Symp./Ed. Ragnarsson U. Stockholm, Sweden: Almquist and Wiksell International, 1984. P. 611—614.
3. Ontjes D. A., Anfinsen C. B. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 13. P. 6316—6322.
4. Merrifield R. B., Vizioli L. D., Votan H. G. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 20. P. 5020—5031.
5. Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Иванов В. С., Иванов В. Т., Насташенко Т. А., Кусов Ю. Ю., Балаян М. С. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 7. С. 964—972.
6. Иванов В. С., Чикин Л. Д., Суворова З. К., Кожич А. Т., Иванов В. Т. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. № 6. С. 784—793.
7. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Иванов В. Т. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 5—20.
8. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 2. С. 156—160.
9. Mitchell A. R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. P. 2845—2852.
10. Perrin D. D., Armarego W. I. f., Perrin D. R. Purification of Laboratory Chemicals. Pergamon Press, 1985. P. 167—448.
11. Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. P. 2149—2154.
12. Sarin V. K., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981, V. 117. P. 147—157.
13. Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 16. P. 7439—7442.

Поступила в редакцию
18.VI.1992

L. D. TCHIKIN, A. B. MOSHNIKOVA, Z. O. GREBENNIKOVA,
A. T. KOZHICH, V. T. IVANOV

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF PEPTIDES MODELLING TRANSMEMBRANE SEGMENTS OF BACTERIORHODOPSIN

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Peptides modelling transmembrane segments C, D, E and G of bacteriorhodopsin were obtained by solid phase method using the conventional Boc strategy. Protected peptides were assembled on PAM polystyrene support. Side chain protecting groups were: Tos for Arg, Bzl for Thr and Ser, cHex for Asp and Glu, Bzl(Cl₂) for Tyr, For for Trp, Z(Cl) for Lys. Syntheses were performed on a modernized Beckman 990 synthesizer in the automatic mode. Double couplings by a preformed hydroxybenzotriazole ester were used for all residues. Qualitative and quantitative ninhydrine tests were used to monitor coupling efficiency. Removal of protecting groups and peptide cleavage were achieved by hydrogen fluoride, containing *p*-cresol and *p*-thiocresol as scavengers. Preparative reverse phase HPLC was used for purification. Peptide structure and homogeneity were confirmed by amino acid analysis, ¹H-NMR and analytical HPLC.