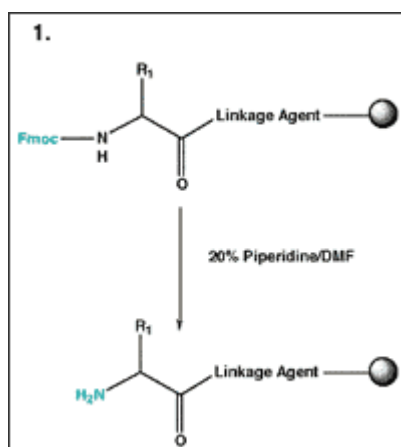


多肽合成

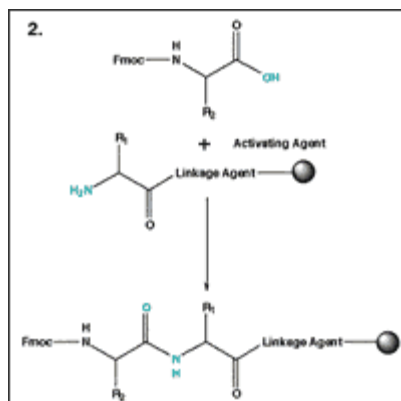
合成原理

当前化学合成多肽的方法主要有两种，即 Fmoc 和 t Boc ；由于 Fmoc 比 tBoc 存在更多优势，所以现在较流行的是 Fmoc 法。多肽合成是一个重复添加氨基酸的过程，合成方向是从 C 端（羧基端）向 N 端（氨基端）进行；过去多肽合成大多是在液相中进行，现在大多采用固相合成，从而大大的降低了每步产品提纯的难度；为了防止副反应的发生，合成柱和添加的氨基酸的侧链都是预先被保护的，只有羧基端是游离的，并且在反应之前必须先用化学试剂活化它。



具体合成步骤如下：

- 1、去保护： Fmoc 保护的柱子和单体必须用一种碱性溶剂（ piperidine ）去除氨基的保护基团。（如图 1 ）
- 2、激活和交联：下一个氨基酸的羧基被一种激活剂所激活溶解，激活的单体与游离的氨基在交联剂的作用下交联，形成肽键。（如图 2 ）
- 3、循环：这两步反应反复循环直到整条肽链合成完毕。



4、洗脱和脱保护：根据肽链所含的残基不同，用不同的脱树脂溶剂从柱上洗脱下来，其保护基团被一种脱保护剂（TFA）洗脱和脱保护。

肽链的设计

简介

多肽是复杂的大分子，因此每条序列在物理和化学特性上都是独特的，有些多肽合成很困难，另有些多肽虽然合成相对容易，但纯化困难；最常见的问题是许多肽不溶于水溶液，因此在纯化中，这些疏水肽必须溶于非水溶剂中或特殊的缓冲液，而这些溶剂或缓冲液很可能不适合应用于生物实验系统，因此研究人员不能使用该多肽达到自己的目的，因此下面是对于研究人员设计多肽的一些建议。

如何降低肽链合成的难度？

1. 减少序列长度

由于肽的长度增加会导致粗产物纯度降低，小于 15 个残基的肽比较容易得到较高纯度的初产物，当肽链长度增加到 20 个残基以上时，正确产物的量就是一个主要考虑的问题。在许多实验中，降低残基数低于 20 往往能得到更好的实验结果。

2. 减少疏水性残基数

疏水性残基占明显优势的肽，尤其在距 C 端 7-12 个残基的区域，常常引起合成困难。这通常被认为是由于合成中形成 β 折叠片，这样会产生不完全配对。用 1 个或几个极性残基置换或加入 Gly 或 Pro 以打开肽结构可能会有帮助。

3. 减少“困难”残基

有多个 Cys、Met、Arg、Try 残基通常难于合成。Ser 通常可作为 Cys 的非氧化替换。

如何增强肽链的可溶性？

• 改变 N 端或 C 端

对于酸性肽（即 pH 值为 7 时带负电荷），我们推荐乙酰化（N 端乙酰化，C 端保持自由羧基），以增加负电荷。而对于碱性肽（即 pH 值为 7 时带正电荷），我们推荐氨基化（N 端自由氨基，C 端氨基化），以增加正电荷。

• 缩短或加长序列

某些序列含有大量疏水氨基酸，如 Trp、Phe、Val、Ile、Leu、Met、Tyr 和 Ala 等，当这些疏水残基大于 50% 通常难于溶解。为了增加肽的极性，加长序列可能会有帮助。另外一种选择是通过减少疏水残基的方法降低肽链的长度以增加极性。肽链极性越高，就越有可能溶于水。

- 加入可溶性残基

对于某些肽链而言，加上一些极性氨基酸能改善可溶性。我们推荐给酸性肽的 N 端或 C 端加上 Glu-Glu。给碱性肽的 N 端或 C 端加上 Lys-Lys。如果不能加入带电荷基团，可以将 Ser-Gly-Ser 加到 N 端或 C 端。但是，肽链的两端不能改变时，该方法则不可行。

- 通过置换一个或多个残基改变序列

肽链的可溶性可通过改变序列内某些残基来改善。通常单个残基的替换就能显著改善其疏水性，而这种改变通常是较为保守的，如用 Gly 代替 Ala。

- 通过选用不同“框架”来改变序列

如果能用某个序列来制备许多长度一定的相互串连或重叠的多肽，则可以用改变各个多肽起始点的方法来实现改变序列的目的。其原理是：在同一多肽的亲水和疏水残基间创造新的更好的平衡，或将同一多肽内的“困难”残基（比如 2 个 Cys）放进两个不同的多肽而不是集于同一分子内。

特殊氨基酸残基对肽链特性影响的一些要点

对于由遗传密码编码的二十种氨基酸及蛋白质中常见的其他氨基酸，按其特性可以用几种方法进行分类。下面列出了最常见的氨基酸的三字母代码和单字母代码，以及不同的分类方法。

氨基酸的代码

丙氨酸	Ala A	甲硫氨酸	Met M	半胱氨酸	Cys C	天门冬酰胺	Asn N
天门冬氨酸	Asp D	脯氨酸	Pro P	谷氨酸	Glu E	谷氨酰胺	Gln Q
苯丙氨酸	Phe F	精氨酸	Arg R	甘氨酸	Gly G	丝氨酸	Ser S
组氨酸	His H	苏氨酸	Thr T	异亮氨酸	Ile I	缬氨酸	Val V
赖氨酸	Lys K	色氨酸	Trp W	亮氨酸	Leu L	酪氨酸	Tyr Y

蛋白质中常见的其他氨基酸

羟脯氨酸

胱氨酸

焦谷氨酸

肽链设计中常见的其它氨基酸

α -氨基丁酸 (Cys 的置换物)

β - 氨基丙氨酸 (Ala 的直链异构物)
正亮氨酸 (亮氨酸的线性侧链异构物)

氨基酸按其亲水性、疏水性分类

亲水性氨基酸 : D, E, H, K, Q, R, S, T, 羟脯氨酸 , 焦谷氨酸

疏水性氨基酸 : A, F, I, L, M, P, V, W, Y, α - 氨基丁酸 , β - 氨基丙氨酸 , 正亮氨酸
C 和 G 属于未定类

其它分类方法

在温和条件下氧化的氨基酸 -->C, M

脱氨或脱羧基的氨基酸 -->N, Q

蛋白制备中易降解的氨基酸 -->M, W

带正电荷的氨基酸 -->K, R, H

带负电荷的氨基酸 -->D, E

当下列疏水氨基酸 , 即 Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp 存在于 C 端时 , 通常引起合成及纯化的困难 , 这主要是因为它们难溶于水。如果您看见这些氨基酸 , 即 Cys 、 His 、 Pro 普遍存在于序列中或在 C 端时 , 则在常规的固相合成中需要特殊的固相支持物。在用普通的固相支持物时 , 在二肽阶段 , 由于环化引起的损失非常高。在许多例子中 , 甚至导致所有链从固相支持物上损失 , 但是若 C 端为氨基化 Pro 时 , 或者用特殊的 PEG- 聚苯乙烯固相支持物时 , 能使产量大为提高 , 则不会发生这种现象。

多肽保存

冻干多肽可 -20°C 保存或室温保存;溶液肽远比冻干形式不稳定,溶液应为中性 pH(pH5-7), -20°C 保存的; 为避免样品的反复冻融, 最好分成小样存放。一份样品如果冻融后未用完, 应扔掉不再使用, 因为细菌的降解有时会成为溶液肽的麻烦, 所以多肽应溶于无菌水或多肽溶液用 $0.2\mu\text{M}$ 滤膜过滤后保存。

对于含 Cys, Met or Trp 的多肽, 脱氧缓冲剂对其溶解必不可少, 因为这种多肽极易被空气氧化, 最好用惰性气体填充保存。另外含 Gln 或 Asn 的多肽也容易降解。

多肽溶解

大多数多肽的首选溶剂是超纯抽气水;稀乙酸或氨水分别对碱性或酸性多肽的溶解也很有帮助。如果这些方法度过后还不溶的多肽, 建议用 DMF、脲、guanidinium chloride 或 acetonitrile 来溶解, 但这些溶剂可能对某些实验有副作用, 所以我们建议设计多肽时要多加留意, 如残基 Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe 和 Val 都会增加多肽的溶解难度。

多肽 HPLC 分析和纯化

HPLC 分析柱有两类：离子交换柱和反相柱。离子交换 HPLC 依靠多肽和固相间的直接电荷相互作用，柱子在一定 PH 范围带有特定电荷衍变成一种离子体，而多肽或多肽混合物，由其氨基酸组成表现出相反电荷，分离是一种电荷相互作用，通过改变 PH 值、离子强度，达到分离纯化的效果。通常，先用低离子强度的溶液，以后逐渐加强或一步一步加强，直到多肽从柱中洗脱出。

反相 HPLC 条件与正常层析正相反，多肽通过疏水作用连到柱上，用降低离子强度洗脱，如增加洗脱剂的疏水性。通常柱子由共价吸附到硅上的碳氢烷链构成，这种链长度为 G4-G8 碳原子。由于洗脱是一种疏水作用。长链柱比短链对小的，高带电肽好；另一方面大的疏水肽用短链柱洗脱好。

典型的操作常由两缓冲剂组成，0.1%TFA-H₂O 和 80% acetonitrile 0.1%TFA-H₂O 稀 acetonitrile。用线型梯变以每分钟 0.5% 到 1.0% 改变的速度混合。常见分析和纯化用柱为 4.6×250mm (3-10 μm) 和 22×250mm (10 μm)。如果用径向填柱，那么大小是 8×100 (3-10 μm) 和 25×250mm (10 μm)

大量各种缓冲剂含许多不同试剂，比如 heptafluorobutyric 酸，0.1% 磷酸，稀 Heformic 酸 (5-6%, pH2-4)，10 -100mM NH₄HCO₃，醋酸钠 / 氨，TFA/TEA，磷酸钠或钾，异戊酚。这样许多不同组合可形成缓冲剂，但要注意一点：硅反相柱料不能长时间暴露于高 pH，甚至微碱 pH，因为这样会破坏柱子。

多肽合成服务价格 (大宗用户价格面议, 电话:021-54460831)

重量/纯度	粗品	脱盐	75%	85%	90%	95%	98%
10-20mg	¥50	¥60	¥90	¥120	¥160	¥180	¥260
21-30mg	¥60	¥70	¥105	¥140	¥175	¥210	¥320
31-40mg	¥70	¥80	¥120	¥160	¥200	¥260	¥380
41-50mg	¥80	¥90	¥135	¥180	¥225	¥270	¥400
51-60mg	¥90	¥100	¥150	¥200	¥250	¥300	¥550
61-70mg	¥100	¥110	¥165	¥220	¥275	¥330	¥600
71-80mg	¥110	¥120	¥180	¥240	¥300	¥360	¥660
81-90mg	¥120	¥130	¥195	¥260	¥325	¥390	¥720
91-100mg	¥130	¥140	¥210	¥280	¥380	¥420	¥800

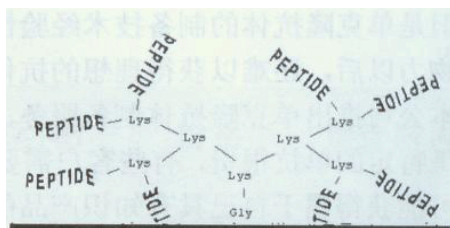
用途

主要用于抗体的制备、多肽疫苗、多肽微注射及对基因结构与功能关系的研究。

说明

- 多肽合成价格原则上以每个氨基酸残基数计，“aa”代表“氨基酸残基”；含有特殊结构的肽链或 aa，如 $-(S-S)-$ 、非天然 aa、修饰 aa 等，价格需要协商。
- 上述价格为参考价，确定的价格视多肽序列将作上、下变动，其中少于 6 个 aa 的按 6 个 aa 计算。
- 闪晶 可为客户免费进行 C18 脱盐纯化，但大多数用于抗体制备的多肽都可以不必特殊纯化（HPLC）。
- 发货时间一般为 4 周，具体情况应视序列长短、合成的难易及纯化的难易，再与客户协商。
- 请在订单中写明多肽序列、数量、纯度及特殊要求。
- 闪晶生产的多肽产品都提供相应的纯度分析图（HPLC）如果需要做分子量鉴定，可进一步做质谱图。

注：制备多肽的一个很大用途是制备多肽抗体，但因多肽的分子量相对较小，所以免疫原性较差，人们通常用 BSA 或者 KLH 与之偶联，但这种方法比较传统也不方便，闪晶生物推出 MAP 多肽，即在合成多肽时，C 端偶联上 MAP，而 MAP 是没有免疫原性的 Lys 结构，即在 MAP 上可以形成 4 个或 8 个抗原性多肽。multiple antigenic peptide 结构如下图：闪晶生物同时免费提供抗原设计服务



MAP 相关文献

MAPS is a method for producing high-titer anti-peptide antibodies (1,2) and synthetic peptide vaccines (3). This system utilizes the α - and ϵ -amino functional groups of lysine to form a backbone to which multiple peptide chains are attached. Depending on the number of lysine tiers (2, 4, 8, etc.), different numbers of peptide branches can be synthesized. Using this new technology, our customers have successfully produced high-titer antibodies.

1. Wang, C. Y., Looney, D. J., Li, M. L., Walfield, A. M., Ye, J., Hosein, B., Tam, J. P. and Wong-Staal, F. "Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV antigen" *Science* 254, 285-288 (1991).

2. Posnett, D., McGrath, H., and Tam, J. P. "A novel method for producing anti-peptide antibodies" *J. Biol. Chem.* 263, 1719-1725 (1988).

3. Tam, J. P. "Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system" *PNAS USA* 85, 5409-5413 (1988).



Shanghai ShineGene Molecular Bio-tech Co.,Ltd.

Add: Floor 2, Building A, 328#, Wuhe Road, Shanghai, 201109, China

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

E-mail: master@shinegene.org.cn

WebSite: www.synthesisgene.com