

一、固相合成多肽的聚合物载体及连接分子

1. 聚合物载体 固相合成多肽需要有固相载体及连接固相与反应物的连接分子,正确选择载体和连接分子决定着固相合成法的成功。固相合成多肽用的载体多数采用聚苯乙烯及二乙烯基苯和苯乙烯共聚物等高聚物的衍生物,如氯树脂、Pam树脂、王氏树脂和氨基树脂等。载体树脂的溶胀状况对缩合试剂及羧基组分的自由扩散,对肽链之间的聚集等与缩合反应有关的因素有明显影响。为了使载体有较好的溶胀性,且有较大的网络空间足以容纳不断增长的较长的肽链,而且便于反应物进入载体的内部,一般均采用1%~2%交联度的聚苯乙烯珠状树脂或微孔树脂。

2. 连接分子 固相合成多肽曾经使用过键合不同连接分子的聚合物,这些连接分子为含有氯甲基、巯甲基、酰氯基、对苯甲酰基、芳磺酰氯基、烯丙醇基、丁二酰基、邻硝基苄醇基及二苯氯硅烷等的双官能团化合物。一个理想的连接分子必须在整个合成过程中十分稳定,并在合成后可以定量的切割下来而又不破坏合成的目标分子。选择适合的连接分子还应根据与树脂相连的肽的C末端的结构类型,裂解后生成相应的羧酸、酰胺或氨基醇等衍生物。

二、固相合成多肽的检测

即使是高效的偶联技术,也不能保证酰化反应100%地进行。而且,当遇到立体障碍或B2片层等序列时,偶联反应的效率更大大下降。聚合物载体上总是有缺序或截序的多肽链,在解脱时,它们也进入到产物中,给分离带来很大困难。因此,固相合成肽时,尤其是较长的肽时,每一个氨基酸的缩合率应该达到99.9%,否则得到的产物将非常不纯。因此,监测每一步反应的进行过程显得格外重要。

(杭州专肽生物有着20余年的固相合成经验,通过固相合成技术可以满足绝大多数客户的需求)

1 定性颜色反应 茚三酮显色法(Kaiser法),是用茚三酮颜色反应快速测定树脂上的氨基,从而判定酰化反应是否完全。用茚三酮法检测聚苯乙烯树脂氨基的灵敏度可达到 $5\mu\text{mol/g}$ 。这样的灵敏度已可检测出缩合反应是否进行了99%以上。茚三酮检测时,由于末端氨基酸残基及序列不同,出现的颜色强弱不同。天门冬氨酸(Asp)、天门冬酰胺(Asn)会产生很弱的蓝色或淡棕色。生色试剂2,4,6-三硝基苯磺酸与树脂上氨基反应显示橙红色,灵敏度为 $5\mu\text{mol/g}$ 树脂。

Kaiser试剂包括:

A, 6%茚三酮的乙醇溶液

B, 80%苯酚的乙醇溶液

C, 2%0.001MKCN的吡啶溶液

配制中的吡啶需要经过茚三酮处理后，重蒸后再使用。检测过程，取少量树脂，加入 A, B, C 各 2-3 滴，100℃下加热 1-2min，如果溶液有兰色，或树脂出现兰色，红褐色，表明还有游离氨基，否则说明连接完全。还有其它检测游离氨基的方法：三硝基苯磺酸法，苦味酸法，溴芬兰法等。

2 定量自由氨基检测 水杨醛法, 用于接肽后树脂上残余氨基的量以及去除保护基后总氨基量的测定, 可以定量地检测缩合反应以及脱除保护基的反应是否完全。如不完全即可及时反复处理。用 2%水杨醛+6%吡啶的乙醇溶液同树脂上的氨基反应(60℃, 30~35 分钟), 洗净后, 再用 5%苄胺乙醇溶液将水杨醛置换下来(60℃, 30 分钟), 加苄胺的乙醇溶液稀释后, 读 315nm 的光吸收值, 计算氨基的量 ($E=4.36 \times 10^3$)。此法对于—NH₂ 在 0.15 μmol/mg 树脂以上的样品的相对偏差在 5%以内。

3 HPLC 检测部分保护的中间肽 在多肽合成中间, 取少量的肽树脂(3~10mg) 进行裂解, 乙醚沉淀, 溶于适当溶剂中直接进行 HPLC 分析。裂解时肽的 N-端保护基根据需要保留或脱除。当合成的肽是较短的极性肽时, 可以保留保护基团, 否则, 在 HPLC 中保留时间太短, 不利于分析。这个方法虽然比较麻烦, 但所需时间较短, 精确度较高。

三、反应溶剂

二甲基甲酰胺(DMF)和二氯甲烷(DCM)是肽固相合成中常用的溶剂, 尤其是 DMF 对作用物和产物均具有溶解度高的优点而被广泛应用于多种反应系统中。虽然, DMF 有更好的溶解度, 但沸点较高, 需要减压才能蒸去。而且, 副产物 N-酰基脲在高介电常数的溶剂(DMF, 甲氰(CH₃CN), 二甲亚砜(DMSO), H₂O 等)中容易生成, 而在低介电常数的溶剂(CH₂Cl₂, CCl₄, C₆H₆ 等)中比较不容易生成。在非极性溶剂中, N-保护氨基酸能与 DCC 很快地反应生成对称酸酐。因此, 只要反应物能够溶解, 应尽可能选用低介电常数的溶剂。在固相合成中, 绝大多数都是采用 DCM 为溶剂, 它比选用 DMF 为反应溶剂有消旋率小和 N-酰基脲形成较慢两点好处。在遇到羧基组分不易溶解时, 可加数滴重蒸 DMF 助溶。

四、缩合试剂主要有：碳二亚胺型，鎓盐型(Uronium)

碳二亚胺型

主要包括：DCC, DIC, EDC.HCl 等。采用 DCC 进行反应, 由于反应中生成的 DCU, 在 DMF 中溶解度很小, 产生白色沉淀, 所以一般不用在固相合成中, 但是由于其价格便宜, 在液相合成中, 可以通过过滤除去, 应用仍然相当广泛。EDC.HCl 因为其水溶解性的特点, 在多肽与蛋白的连接中使用比较多, 而且也相当成功。但是该类型的缩合试剂的一个最大的缺点, 就是如果单独使用, 会有比较多的副反应, 但是研究表明如果在活化过程中添加 HOBt, HOAt 等试剂, 可以将其副反应控制在很低的范围。

鎊盐型

鎊盐型缩合试剂反应活性高，速度快，现在使用非常广泛，主要包括：HBTU，TBTU，HATU，PyBOP 等。该试剂使用过程中需要添加有机碱，如，二异丙基乙胺（DIEA），N-甲基吗啉（NMM），该试剂加入后，才能活化氨基酸。

五、固相合成过程

1、羟基树脂为载体的合成方法（Wang 树脂为例：图 1）

Wang 树脂、PAM 树脂、HMPA 树脂、Sasrin 树脂等均在 Linker 结构中含有苄醇基。多数情况下把预制的 N-保护氨基酸的对称酸酐及催化剂 DMAP(对二甲氨基吡啶)与羟基树脂一起反应。在这种成键反应中。DMAP 是必需的，但也由此带来一些麻烦。例如，当某些位阻较大、反应活性较低的 Fmoc-氨基酸需要较长的反应时间，而且 DMAP 的纯度又不理想时。会发生部分 Fmoc 基被脱除，生成部分二肽的麻烦。更常见的危险是当 Cys 及 His 作为 C 端第一个氨基酸与羟基树脂反应时，DMAP 往往使这两种氨基酸发生消旋化。对此，解决办法是改用 Cl-Trt 树脂与这两种氨基酸键合，同样可以生成酯型 Linker。另一种解决办法是用 MSNT 试剂[Fra 1388, Ren 1998]，可以有效地免除 Cys, His 与多种羟基树脂键合时的消旋化危险。

2. 以三苯甲基树脂树脂为载体的合成方法（图 2）

三苯甲基(trt)树脂含有三重苄基结构，因此反应活性极高。一般用等摩尔量的保护氨基酸及 4 倍量的 DIEA 与 Trt 树脂混在二氯甲烷中，室温反应 30-120min 即达完全。对于未反应完全的位点，可用甲醇封住位点。基于 Trt Linker 的温和键合及温和裂解特点，在此种树脂上进行肽片段缩合及全保护基肽片段制备是较理想的方式。

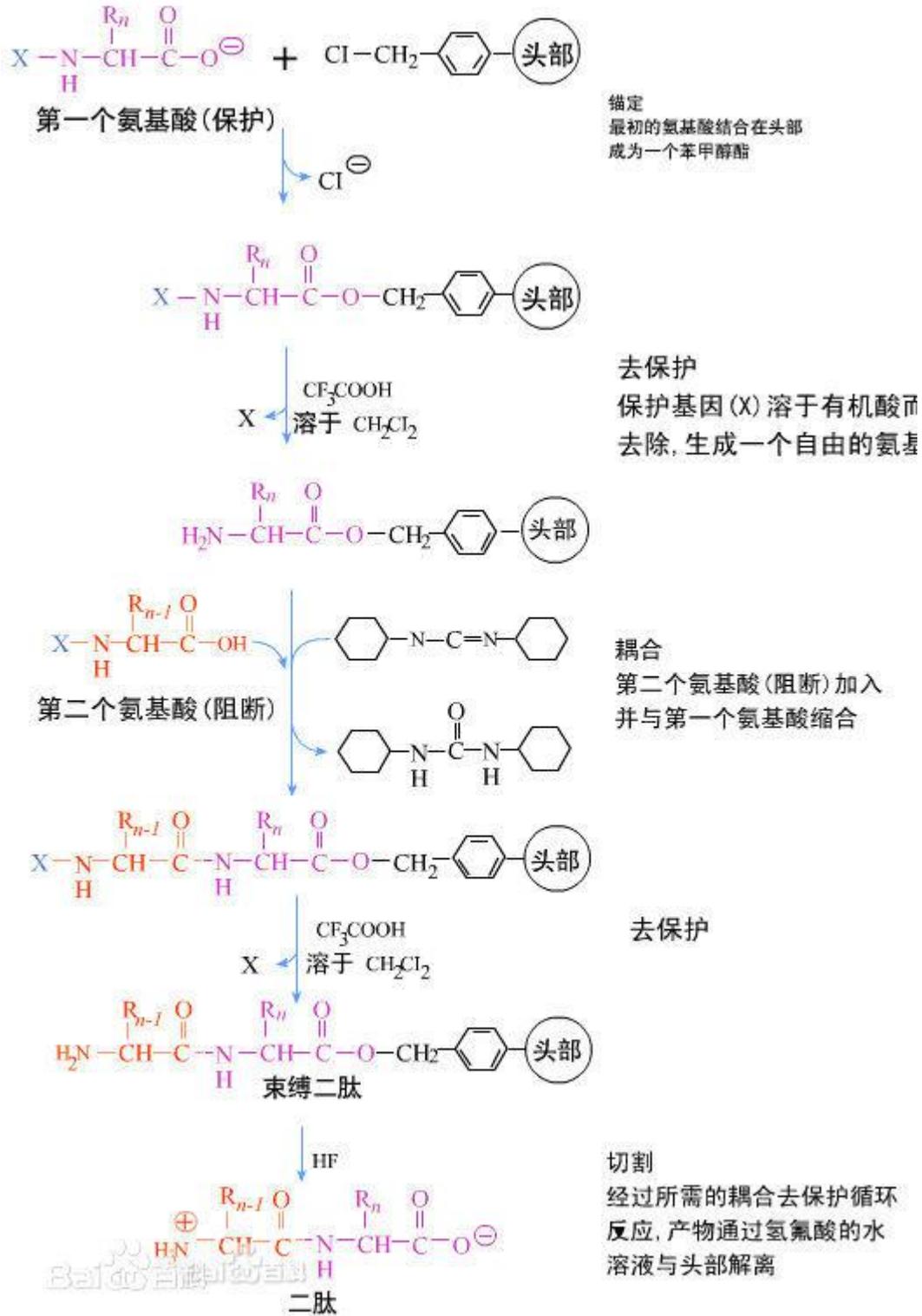
3 以氨基树脂为载体的合成方法

MBHA 树脂、PAL 树脂、Knorr 树脂、Rink-NH₂ 树脂等均在 Linker 中含有可与羧酸反应的氨基。C 端第一个氨基酸与之键合的反应条件与接肽循环中的操作完全相同。如果以 DCC 为缩合剂，一般先将 N-保护氨基酸与 DCC、HOBT 混于溶剂(DMF、THF、DCM 等)中，生成氨基酸的 HOBT 活泼酯，放置 3-5h，待活化反应基本完全后滤除副产物 DCU 沉淀，把羧基活化组分溶液与氨基树脂混合进行键合反应。此步反应有两点事项值得注意：①多数氨基树脂的氨基并非以游离状态出售。有的氨基是以盐酸盐的形式，有的则带有临时保护基(如 Fmoc, Boc 等)，因此在与 C 端第一个氨基酸键合之前必须进行相应的中和或脱除临时保护基的处理；②氨基酸活化组分的用量应大大高于氨基树脂组分，一般的摩尔比为(2-5)：

AP 专肽生物 杭州专肽生物技术有限公司

1, 目的是使键合反应接近 100%, 因为未被酰化的氨基树脂无法从产物中清除出去。使用大大过量的构件是所有固相有机合成的共同之处。

除了 DCC 之外, 其他常见的缩合剂还有 DIC、EDC、EEDQ、HBTU 等。



多肽固相合成法