

肽的人工合成

多肽A梦 微信号: [allpeptide](#)

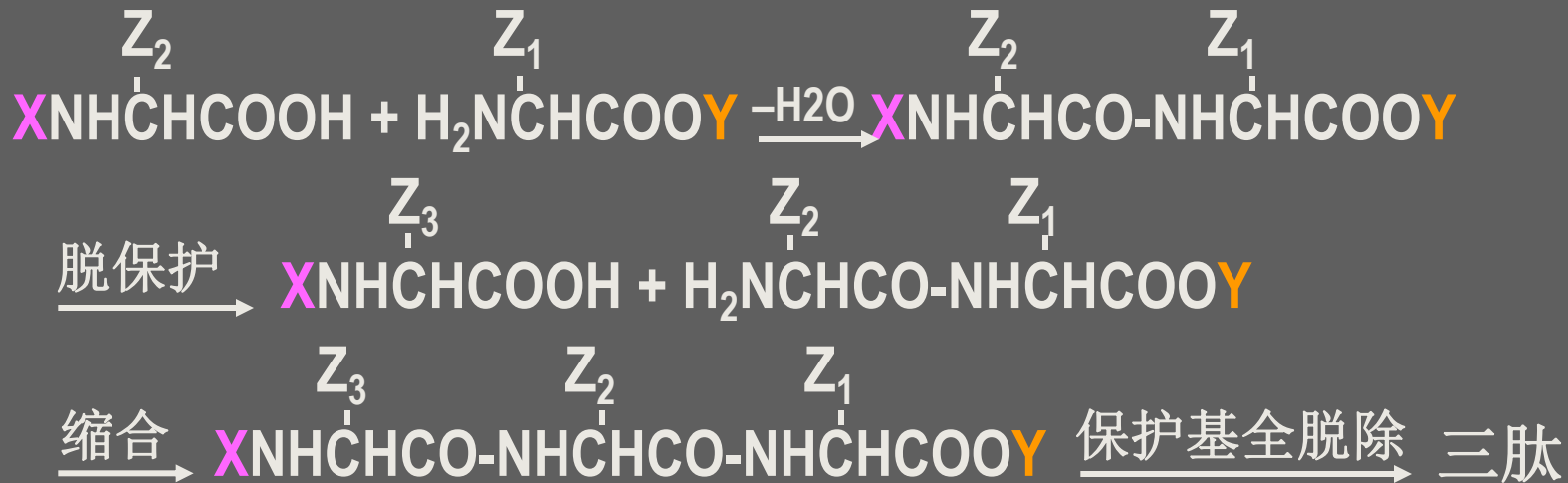
前言

- ⇒ 20世纪初，fischer 创立蛋白质的多肽结构学说
- ⇒ 1932年，Bergmann采用苄氧羰酰基作为氨基保护基
同时期Curtius创立酰氯法，叠氮法活化羧基的肽键生成法
- ⇒ 50年代初，Wieland等发展了活化酯法和混合酸酐法
- ⇒ 1953年，Vigneaud首次化学合成了多肽激素催产素
- ⇒ 1963年，Schwyzer合成24aa的促肾上腺皮质激素(ACTH)
- ⇒ 1965年，我国合成51aa的牛胰岛素
- ⇒ 1979年，矢岛治明液相法合成牛胰RNaseA(124aa)
- ⇒ 80年代，Merrifield提出固相合成法；多肽合成仪不断发展

第一节 肽化学合成原理和液相合成

基本步骤:

1. α -氨基和 α -羧基以及侧链的保护
2. 羧基的活化和肽键的形成
3. 脱除保护基和纯化



一 氨基酸保护基

为了使肽键生成反应能够定向进行，需要对氨基酸的各种官能团进行保护

(一) α -氨基保护基:

⇒ 常用：烷氧羰基、酰基和烷基

基团结构	名称	脱除条件
 <chem>c1ccccc1-CH2O-CO-</chem>	苄氧羰基 (Z)	钯炭催化氢化法(H_2/Pd) Na/液氨, HF法等
$(CH_3)_3CO-CO-$	叔丁氧羰基 (Boc)	弱酸
 <chem>c1ccc2c(c1)ccc(c2)C3=CC=CC=C3-CH2O-CO-</chem>	芴甲氧羰基 (Fmoc)	碱脱除: 20%吡啶/ CH_2Cl_2

(二) α -羧基保护基

⇒ 保护基种类相对较少

⇒ α -羧基保护基种类:

①盐: 钾盐、钠盐、三乙胺盐、三丁胺盐等
盐是对羧基的临时性保护

②酯: 甲酯和乙酯、苄酯、叔丁酯(最常用)

(三) 侧链的保护:

⇒ 20种aa中有13种侧链需要保护

⇒ Lys- ϵ -NH₂ 和侧链羧基:选择与 α -氨基和羧基不同的保护基

⇒ Cys-SH: 甲基苄基、对氧苄基等 (三氟乙酸铯/ TFA脱除)

⇒ 羟基aa(Ser,Thr,Tyr): 苄基、叔丁基

⇒ 酰胺基保护: 2,4,6-三甲氧苄基等 (可用TFA脱除)

二肽键生成法

- 基本思路：使 α -羧基活化为RCOX形式，加强羰基碳原子的正电性，便于 α -氨基进行亲和攻击而成肽

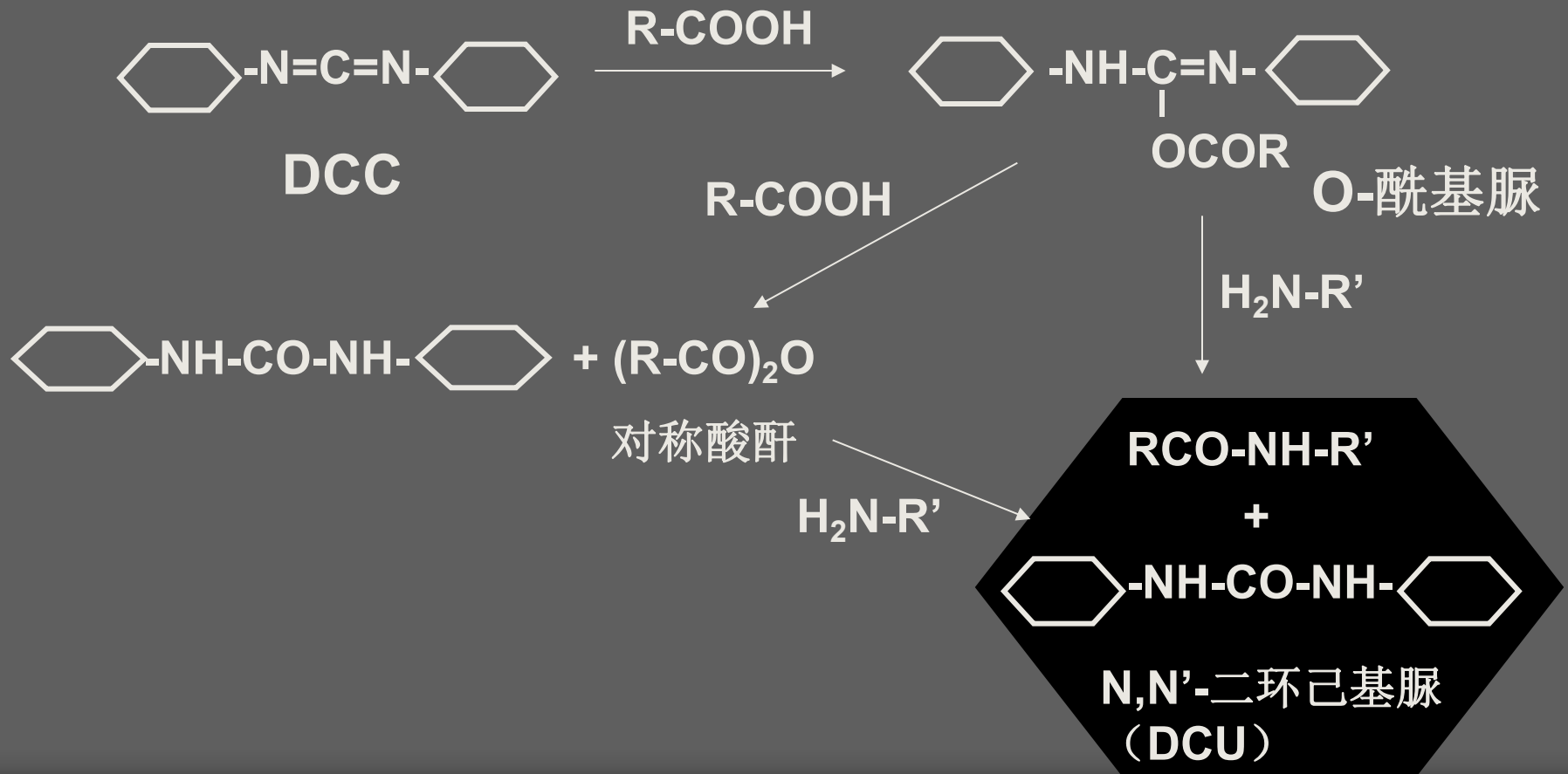
(一) 活化酯法：

- 方法：采用巯基、烷基、酚基和N-羟胺类物质（最常用：N,N'-二环乙基碳二亚胺，DCC)与N-保护aa作用，使 α -羧基活化为酯的形式，然后进行成肽反应。
- 优点：
 - 中间产物可以分离、结晶、保存，便于去除副产物
 - 氨基组分的末端羧基可以不保护
 - 对酰胺基活化特别有效

(二) 缩合剂法:

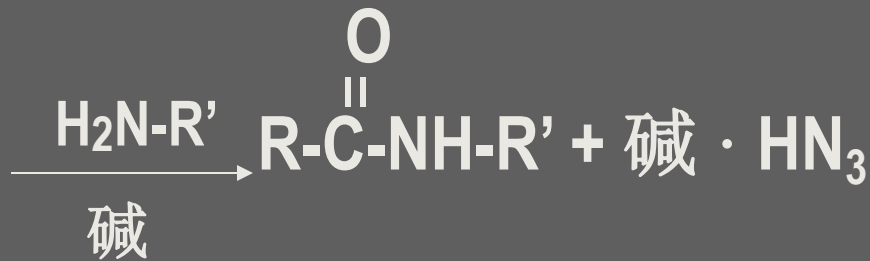
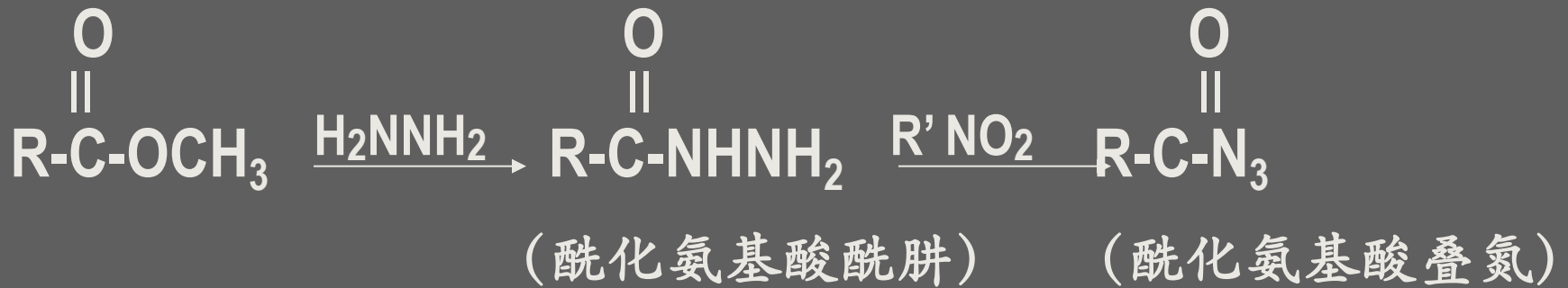
→ 重要的缩合剂: DCC, DIC(二异丙基DCC) 等

→ DCC接肽反应机理:



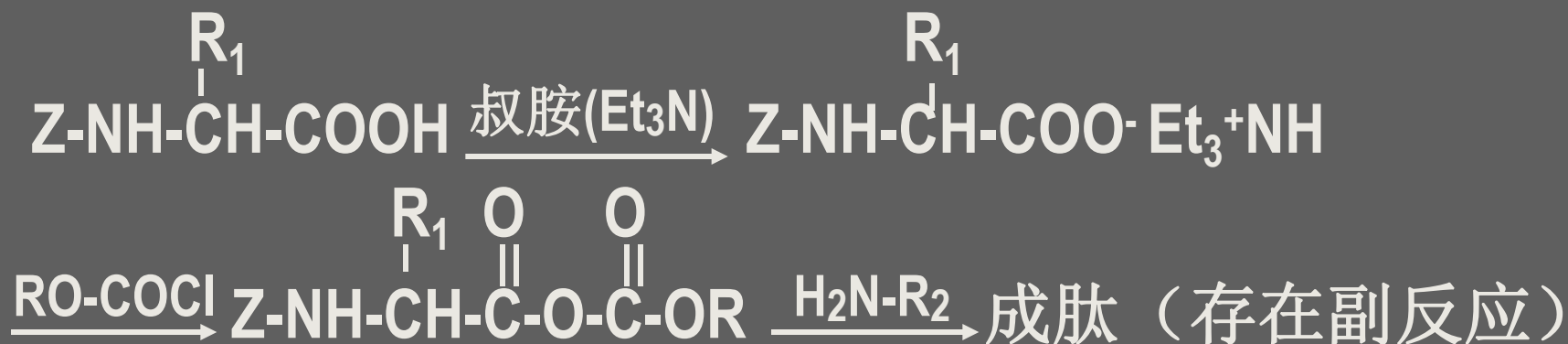
(三) 叠氮法:

→ 是最古老的经典肽键生成法(1902年)，该法最少引起消旋



(四) 混合酸酐法:

- ⇒ 50年代提出, 简单、反应快、纯度好, 尤其适合小肽合成



三 脱保护基及纯化

(一) TFA法:

- 方法: 将产物置于三氟乙酸(TFA)中处理, 以脱除保护基
- 优点: 用于脱除一些不耐酸的保护基, 温和, 副反应少, 尤其适合于固相合成法。曾用于胰高血糖素合成。
- 缺点: TFA用量较大, 需保护的氨基酸种类较多等

(二) HF法:

- 方法: 以无水氟化氢(HF) 在0 ~20°C处理30~60min
- 优点: 可脱除其他方法难以脱除的保护基, 比TFA法有效
- 缺点: HF腐蚀性强, 脱除时副反应较多

(三) 含硅试剂法、有机磺酸法等

四 二硫键的生成

- 是蛋白质合成中最困难的工作
- 经典方法：空气氧化法、碘氧化法，收率低，副反应严重
- 目前：
 - ① 三氟乙酸铊（ $(\text{CF}_3\text{COO})_3\text{TI}$ ）法：

可先裂解Cys的各种保护基，然后金属铊作为弱氧化剂催化二硫键的生成，效率是碘氧化法的2倍
 - ② 亚砷介导法（sulfoxid-directed）：

Cys亚砷和CysR'在酸处理下，生成的SH作用于亚砷的S原子，在亚砷位置处生成二硫键。用不同的Cys亚砷和酸处理，可在需要的位置定点生成二硫键。

五 合成肽的纯化和纯度鉴定

- ⇒ 纯化：凝胶过滤、离子交换层析、反向HPLC等
- ⇒ 鉴定：薄层层析、等电点聚焦、分析HPLC、质谱法等

六肽的液相法合成策略与示例:

- ⇒ 小肽合成: 逐步延长法(stepwise elongation), 从C-端开始逐一合成, 使肽链向N末端延长的方法
- ⇒ 大肽合成: 片段缩合法(fragment condensation), 先分段合成小肽再缩合成大肽段, 缩合时常用不易消旋的叠氮法
- ⇒ 片段缩合法策略:
 - ① 划分肽段: 长度一般不超过10个aa残基
尽可能以不易消旋的Gly、Pro等为肽的C-端aa和保护基性质对肽段纯化难易的影响
构象因素影响
 - ② 选择接肽顺序: 小片段分头缩和→大片段→肽
(有时很难或不能进行)
小片段逐一缩合(反应步骤多但产率高)
较大片段逐一缩合(常用)

• 示例：牛胰RNase A（124aa）的合成

- ⇒ 将RNase A分成长短不一30个片段，分别以逐步延长法合成
- ⇒ 从肽的C-端开始，用叠氮法小片段依次接肽，得到保护的RNase A（N-端为Z(苄氧酰基)；C-端，OBzl(苄氧基)）
- ⇒ Cys(对甲氧苄基，Mbzl)和Met亚砷的还原，得到还原型保护的RNase A
- ⇒ 1mol/L三氟甲磺酸/TFA脱保护；巯基乙醇 + 二硫苏糖醇；过Sephadex G-25层析柱，得到去保护基的RNase A
- ⇒ 在谷胱苷肽存在下空气氧化形成二硫键，
- ⇒ Sephadex G-25，得到合成的RNase A粗品(活力18.9%)
- ⇒ 经过亲和层析，产物活力81.3%
- ⇒ CM-纤维素层析，得到离子交换层析纯产物
- ⇒ 95%乙醇处理，得到牛胰RNase A结晶，酶活力100%

第二节 固相肽合成

一、合成原理：

- ➔ 1963年，Merrifield将aa的C-端固定在不溶性树脂上，然后在其上依次进行氨基酸缩合，延长肽链。克服了液相合成法中每一步产物纯化的困难，奠定了自动化肽合成的基础，为此，Merrifield于1984年获得Nobel化学奖
- 固相法合成较之液相法简单、快速，不需每步纯化中间物
固相法适合10~30aa的小肽，不流失
但固相法合成肽的纯度差，大肽或高纯、大量小肽合成采用液相法

(一) Boc固相法（经典Merrifield法）：

- ➔ 因氨基保护基采用可用TFA脱除的Boc而得名；
侧链用苄醇类保护；
树脂为氯甲基化或羟甲基化聚苯乙烯,对乙酰氨基苄酯树脂

方法:



↓ ① C-末端aa与树脂结合:



↓ ② 用TFA法脱除N^α-Boc



↓ ③ 三乙胺中和、洗涤



↓ ④ 在DCC存在下与Boc-aa耦联, 洗涤



↓ ⑤ 脱保护、重复接肽



↓ ⑥ 全部保护基脱除, HF法等

目的肽

(二) Fmoc固相合成法:

- ⇒ Fmoc固相合成法的步骤与Boc固相合成法类似
- ⇒ 不同之处:
 - 氨基保护基为: 可用碱(20%吡啶)脱除的芴甲氧羰基(Fmoc),
 - 侧链保护基为: 可以用TFA脱除的叔丁基
 - 树脂: 采用90% TFA可切断的烷氧苄醇型
或1% TFA可切断的二烷氧苄醇型
- ⇒ 优点: 避免最终的强酸处理

二、自动肽合成仪:

- ⇒ 1966年, Merrifield等报道了最初的自动肽合成仪
- ⇒ 一般以Boc或Fmoc固相合成法为基础, 将肽合成自动化
- ⇒ 监测: Fmoc有明显的紫外吸收

第三节 酶促肽合成和半合成

一、基本原理：

利用蛋白水解酶催化肽键的形成

- ➔ 优点：反应条件温和；不引起aa消旋；
不要求aa侧链保护；副产物少，后处理较简单

1. 酶促合成多肽的酶类：

- ➔ 主要有四类：Ser蛋白水解酶；HS-蛋白水解酶；
羧肽酶；金属蛋白酶类

2. 对aa成分的选择：为使反应向肽键生成方向进行

二 酶合成反应的几个系统:

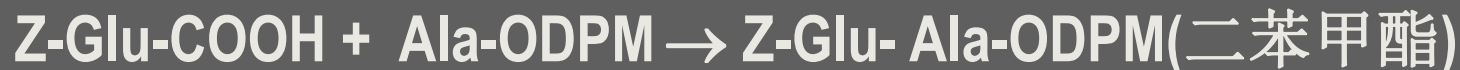
- 为了使反应定向进行, 将参与反应的氨基组分的羧基端和羧基组分的氨基端保护
- 为提高合成反应效率, 防止二次水解, 创建一些特定的反应系统, 如:

1. 沉淀系统: 降低产物溶解度, 使其沉淀, 防止水解



在凝乳酶(200 $\mu\text{mol/L}$)催化下, PH7反应20hr, 收率为70~80%。
随反应进行溶液逐步变褐色, 黏稠化、最终完全固化

2. 二相系统: 将缓冲液与有机溶剂搅拌成乳浊液(二相系统, 水相一般占2~5%), 底物和酶在水的悬滴中反应, 但生成的产物为脂溶性的。随着反应地进行, 产物自动转移至有机相中, 不再与酶接触。如:



三 酶促半合成：

- 对于无保护的大肽段的之间的定向衔接，无法用化学法完成，但用蛋白水解酶的特异性可能取得成功

如：以枯草杆菌蛋白酶为催化剂，把化学合成的RNAase A小片段S-肽与天然水解大片段S-蛋白转化成半合成RNAase A取得成功

- 酶促半合成胰岛素：



→ 酶促半合成人胰岛素（产率90%）

小结

⇒ 肽合成方法：

液相法

固相法（肽合成仪）

酶促合成（半合成）法

⇒ 原理：

基团保护，肽键合成，接肽，脱保护