

ペプ子道 外伝

塩基脱保護流極意



九州大学大学院工学研究院
片山研究室

平成貳拾漆年如月吉日

☆ 注意が必要なアミノ酸、試薬

【Arg(Pbf), Asn(Trt), Gln(Trt), Asp(Odmab), Ser(PO(Obzl)OH), Thr(PO(Obzl)OH), Tyr(PO(Obzl)OH)】 不十分な縮合反応

◆ カップリング反応が十分に進まない。

☞ 立体障害による原因が一つ。樹脂密度の見直しやカップリング反応前にDCMIによる十分な樹脂の膨潤を行う。反応条件を改善する。

【Cys, Met】 副反応(空気酸化)

◆ 空気酸化によって、MSのピークが16(?)ズれる。

☞ 抗酸化剤(還元剤)を用いた脱保護をする。過剰な吸引は避ける。

【Arg, Trp】 脱保護での副反応

◆ “N”への保護基の再結合反応(求電子反応)により、脱保護が不完全になってしまう。

☞ 反応時間を1.5時間から2~4時間に延ばす。

【Asp, Glu】 HPLCでの精製

◆ カルボキシル基のプロトン化が不十分だと、ピークが分裂してしまう。

☞ 再沈殿後に溶かすバッファのpHを酸性にする。

【Fluorescein-COOH, Rhodamine-COOH】 HPLCでの精製

◆ リンカー部位のカルボキシル基の修飾部位が、5位と6位の混合物の場合、HPLCピークが2つ分かれる。

☞ ほとんどの実験で問題ないので、2つとも回収する。

【Lys(ivDde)】 副反応

◆ ivDde基の脱保護条件(ヒドラジン)では、脱Fmocも副反応として起きてしまう。

☞ ①ヒドラジン処理の前に脱Fmoc&アセチル化する。

②Bocアミノ酸を用いる。

③ hydroxylamine hydrochloride/imidazole (1.3:1) in NMPを用いる(aapptexプロトコル1182参照)。

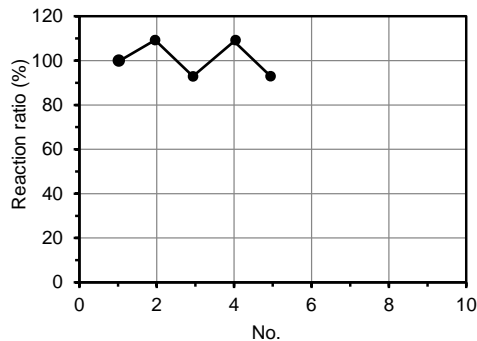
【Mmt, Mtt】 不十分な脱保護反応

◆ Mmt基やMtt基は、ペプチド配列や樹脂密度によっては、1%TFA条件では外れにくい場合が多い。

☞ 2%TFAによる脱保護、反応時間を5分から10分に延ばす。(KaiserテストやUV-visスペクトルで確認)

【増減を繰り返す場合】

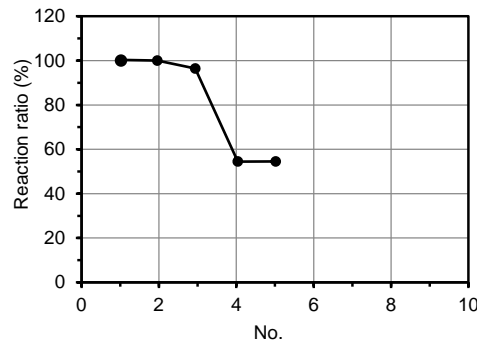
- ・測定溶液の秤量がきちんとできていない。



- ☞ ピペットマン、溶液の調製の正確に

【急に値が下がったとき】

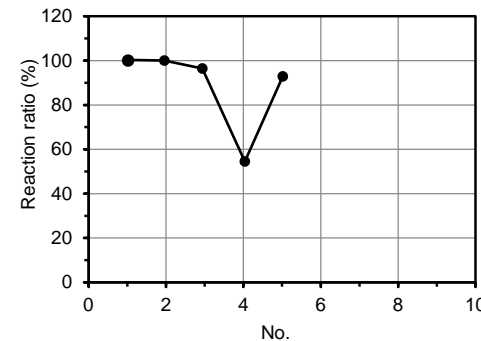
- ・日数が経って、縮合剤や試薬が劣化した。
- ・立体障害が大きく、反応効率の悪いアミノ酸を使った。



- ☞ 試薬の調製
- ☞ 反応条件の検討(濃度、温度、攪拌)
- ☞ 樹脂(低い樹脂密度)や縮合剤(COMU)の変更

【急に値が下がって、また戻ったとき】

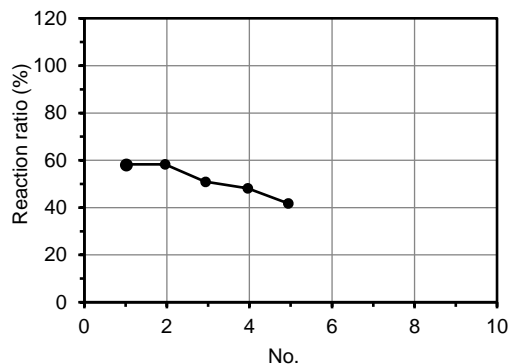
- ・DMFに長期保存しており、脱Fmocが進んでいる。(そのまま反応を続けて問題ない)
- ・劣化した試薬を新しく入れ替えた。



- ☞ 長期保存はNMP中に保存する
- ☞ 試薬の保存に気を付ける(窒素置換)

【反応効率が最初から低い】

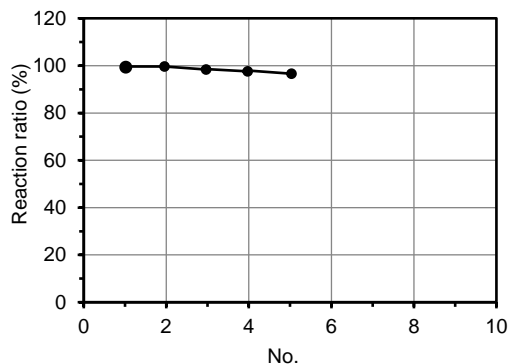
- ・最初のアミノ酸の導入効率が低い。

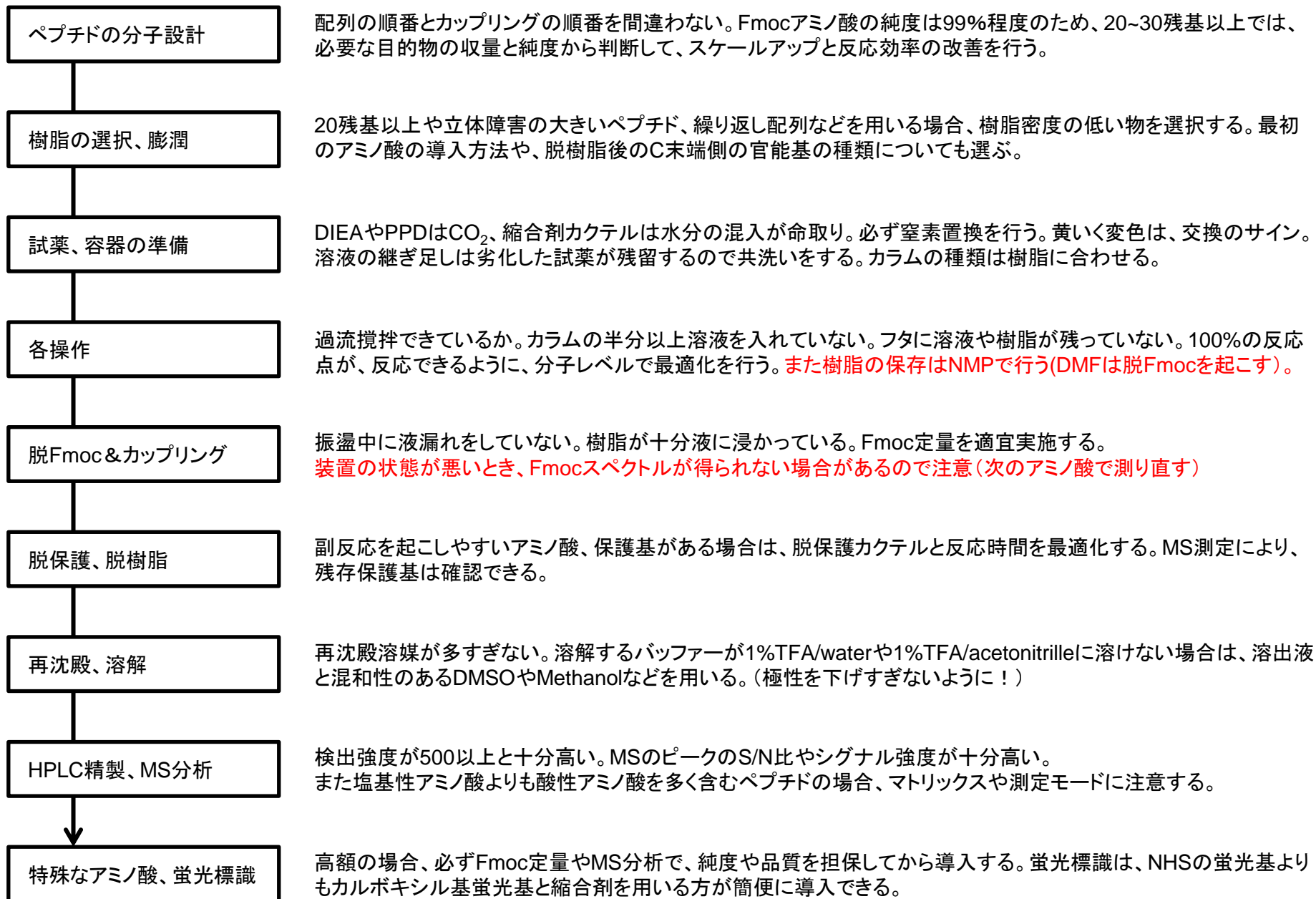


- ☞ 反応条件の検討
- ☞ 樹脂や試薬の劣化

【理想的なFmoc定量】

- ・試薬、反応条件、操作、定量が完璧。





☆合成カラム

- ① PD-10 Empty Columns (GEヘルスケア、17-0435-01) 19,800円/50本 スケール: (13.5 ml) ~0.1 mmol、1-2 ml
- ② エコノパックカラム(BIO RAD、732-1010) 27,000円/50本 スケール: (20 ml) ~0.3 mmol
- ③ ミニカラム(SARSTEDT社、CC.07) 13,000円/100本 スケール: (3~5 ml) ~0.03 mmol
- ④ ポリプロピレン製LibraTube(ハイペップ、RT-5M) 16,500円/100本 スケール: (5 ml) ~0.05 mmol

※③の上フタはスピッツ管(栄研)、下フタは①のフタを使用可能。(純正品は、上フタ:CC.03、下フタ:CC.04)



ペプチ道之掟

【実験を始める前に】

- 試薬のMSDSを確認
(DCM:発がん性、DMF:催奇形性)

【実験が終わったら】

- ヒーターの電源OFF、コンセントを抜く
- 振盪器の電源OFF
- 溶媒の補充(DCM、DMF etc...)
- Kaiserテスト試薬、スピッツ管の補充
- ゴミ箱が溜まる前に、中身を捨てる
- 廃液の処理(1 M塩酸で中和)
- ※ シアン廃液はpH10以上に調製！酸性にしたら死にます！
- ピペットマン、チップの整理、汚したら洗浄
- 汚れは、メタノールとペーパータオルで落とす！
- ☞ カラムの上下のふたは、壊れていなければ再利用する！