

含多个磷酸化位点的多肽的合成

Synthesis of Peptides with Multiple Phosphorylation Sites

生命活动与蛋白质的动态变化密切相关，很多情况下某些蛋白质是通过各种翻译后修饰来完成或改变其功能。在数量众多的蛋白质翻译后修饰中，蛋白质磷酸化修饰无疑是最重要的一类，它是指通过蛋白激酶（Protein kinase, PK）介导的酶促反应把磷酸基团从一个化合物转移到另一个化合物上的过程^[1]（Figure 1 所示），是生物体内存在的一种普遍的调节方式。现今发现的所有人类蛋白质中超过 30% 可被磷酸化修饰，这一修饰在细胞信号的传递过程中占有极其重要的地位，与生命活动的许多过程都密切相关，对此的研究已经成为蛋白质科学的热点之一。

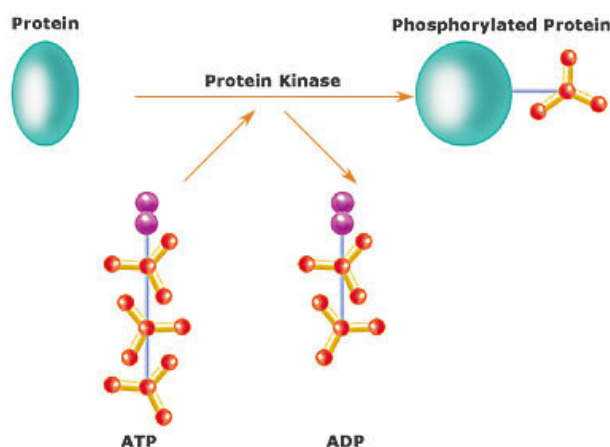


Figure 1. Protein phosphorylation.^[2]

磷酸化多肽（主要指肽链中的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基的侧链羟基被磷酸化生成酸式磷酸酯的修饰多肽）是研究蛋白质磷酸化过程的必不可少的工具，它可作为磷酸酶模型底物，或作为可产生抗磷酸化蛋白抗体的抗原，也可以在确定磷酸化蛋白的物理参数时作为参考化合物等^[3]。因此磷酸化多肽的合成在过去的几年中吸引了相当大的兴趣，目前已确定了较为成熟的合成路线，使磷酸化多肽的合成趋于常规。目前磷酸化多肽的合成主要有两个策略：后磷酸化法（Global phosphorylation）和单体法（Building block approach），如 Figure 2 所示。前者是在多肽序列合成结束后再在固相载体上对丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的侧链羟基进行磷酸化，可以在同一次合成中同时得到带有和不带有磷酸化位点的多肽；而后者则将适当保护的磷酸化氨基酸直接引入到多肽序列中，操作较

前者更为简单，现已成为磷酸化多肽合成的首选策略。

在采用单体法构建磷酸化多肽时，目前广泛采用的原料为侧链单苄基保护的氨基酸： $\text{Fmoc-AA}(\text{PO}(\text{OBzl})\text{OH})\text{-OH}$ ($\text{AA} = \text{Ser, Thr or Tyr}$)。这类保护的磷酸化位点由于侧链磷酸化基团的离子化而产生较大的位阻效应，并且磷酸化位点的引入往往能促进肽链二级结构的形成^[4]，故而磷酸化位点及其后的氨基酸的引入会比较困难。这些问题在合成含有多个磷酸化位点的多肽时将会变得尤为严重，往往会使最终产物的组成非常复杂，难以进行纯化，甚至直接导致合成的失败。

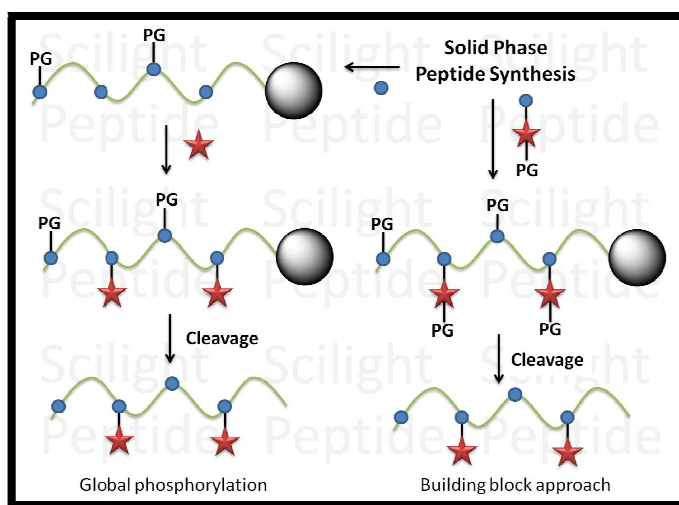


Figure 2. Two strategies for phosphopeptide synthesis: global phosphorylation and building block approach

一般来讲，增加投料量和延长反应时间都能促使连接反应趋于完全，但增加投料量无疑会提高合成成本，对于较昂贵的带有保护的磷酸化氨基酸更是这样，而延长反应时间则可能增加其它副反应发生的风险，故而在合成磷酸化多肽时，需要对氨基酸投料量、反应方法以及反应时长等进行优化调整以期达到更理想、更经济的合成效果。我们有针对性地对磷酸化多肽合成条件进行了探索和调整，采用最终的优化条件成功合成了含有多达六个磷酸化丝氨酸残基的多肽： $\text{FAM-Ahx-X(pS)XX(pS)X(pS)X(pS)XX(pS)X(pS)-NH}_2$ （客户肽，详细序列未给出；其氨基端标记 FAM 以进行荧光检测），经过 RP-HPLC 纯化后最终纯品的纯度高达 95%（见 Figure 3）。

北京中科亚光生物科技有限公司 (<http://www.scilight-peptide.com>) 秉持一贯的遵旨，紧跟科学前沿，通过多年的实验积累，优化合成条件和纯化工艺，已成功掌握含有单个或多个磷酸化位点的多肽的合成工艺，可以满足客户的各种研发需求。如您

有磷酸化多肽或其他多肽定制服务方面的需求，欢迎来电来函咨询，我们将以最大的热忱为您服务！

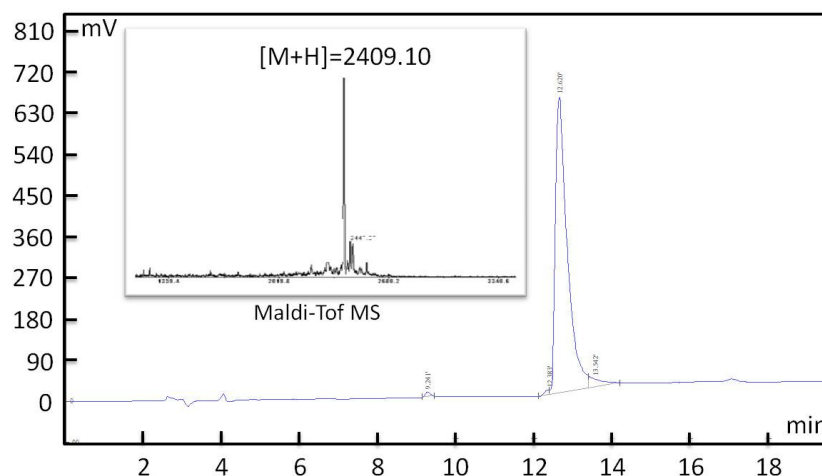


Figure 3. RP-HPLC and Maldi-Tof MS profiles for peptide with 6 phosphorylated Ser residues, indicating high purity of final product. Theoretical Mw = 2408.87, measured M+H = 2409.10; Purity = 95.33 (peak area percent, Agela 250×4.6 mm I.D. C18, detected at 220 nm, 20-40%B in 20 min).

参考文献：

1. P. Cohen, "The Role of Protein Phosphorylation in Neural and Hormonal Control of Cellular Activity", *Nature*, 1982, **296** (5858): 613-620.
2. From: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_kinase.
3. L. A. Pinna, A. Donella-Deana, "Phosphorylated Synthetic Peptides as Tools for Studying Protein Phosphatases", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1222** (3): 415-431.
4. W. C. Chan, P. D. White, "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach" (2000), Oxford University Press.

地址：北京市丰台区总部基地海鹰路7号大恒科技大厦4层 邮编：100070
电话：010-62810185 传真：010-62818544 E-mail: marketing@scilight-peptide.com
Web: www.scilight-peptide.com