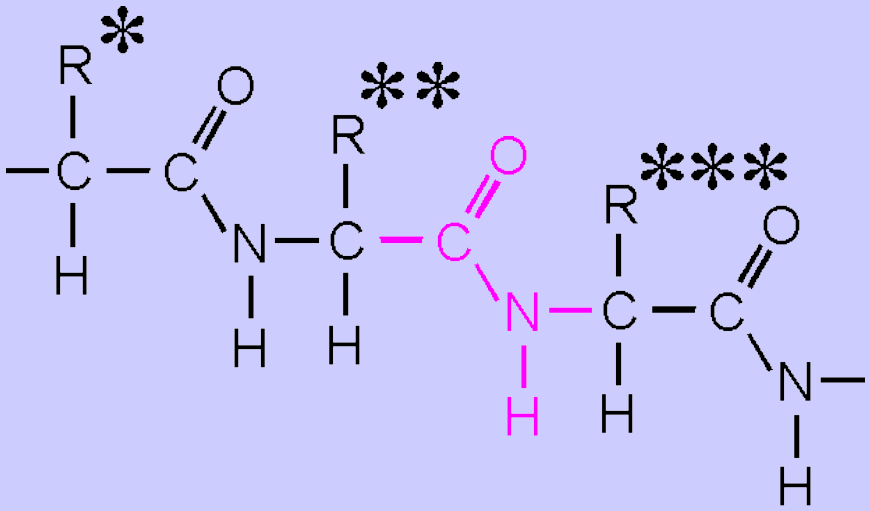
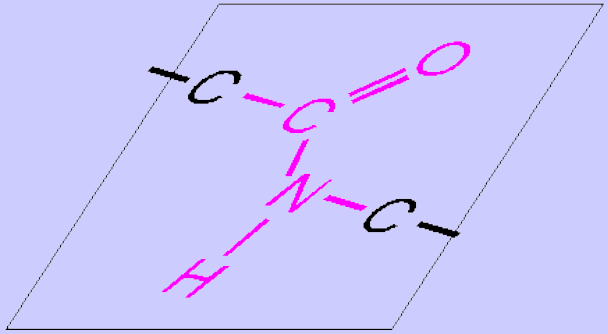
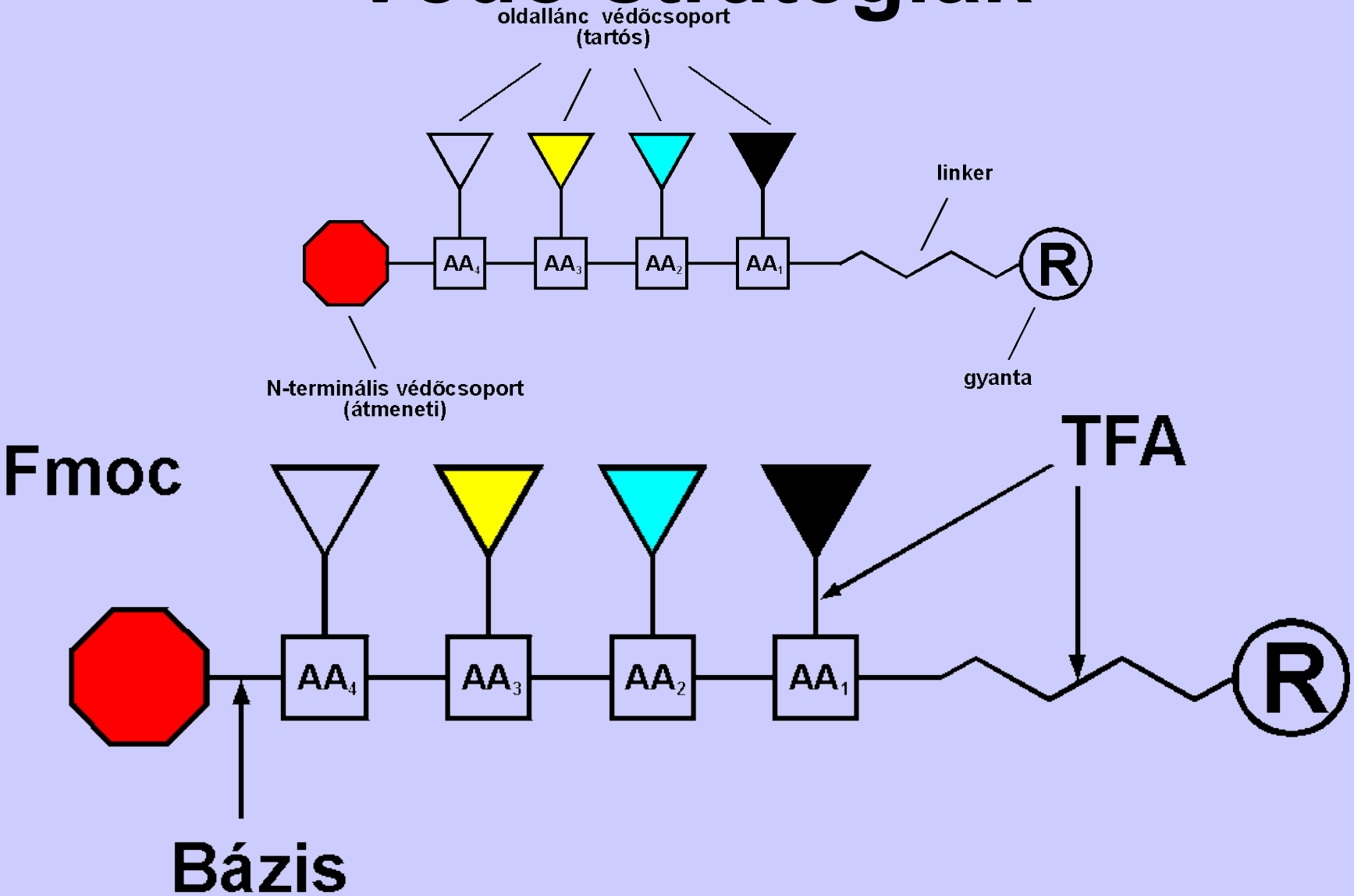
Szilárd fázisú peptidszintézis

A peptidkötés

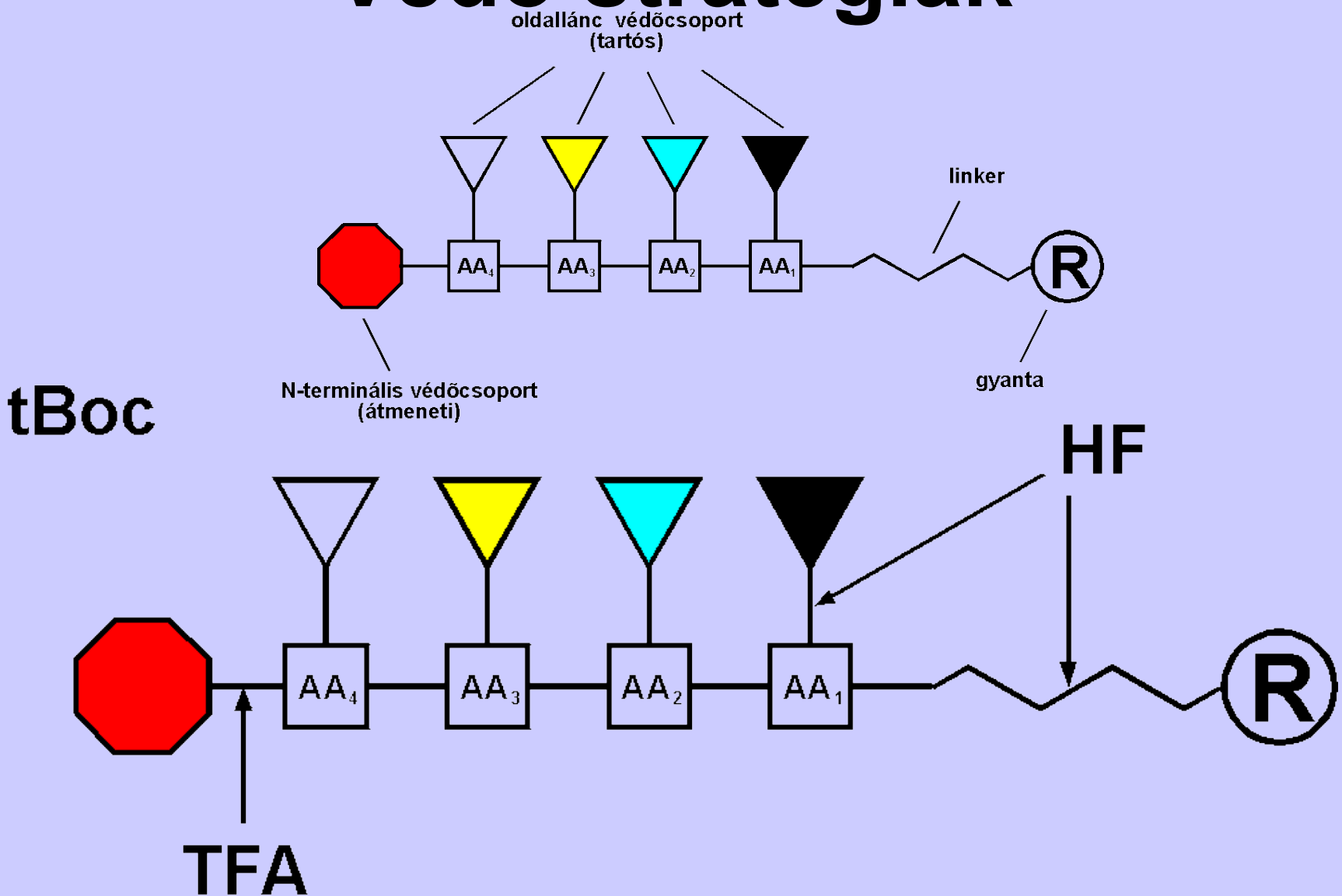




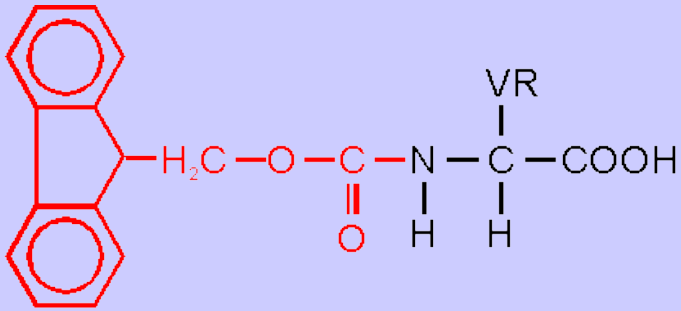
Védő stratégiák



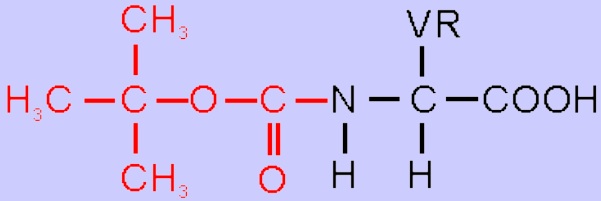
Védő stratégiák



Védett aminosavak

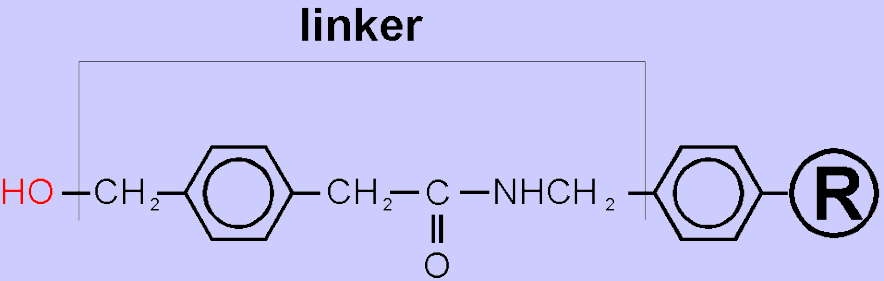


Fmoc-aminosav
9-fluorenil-metoxikarbonil-aminosav

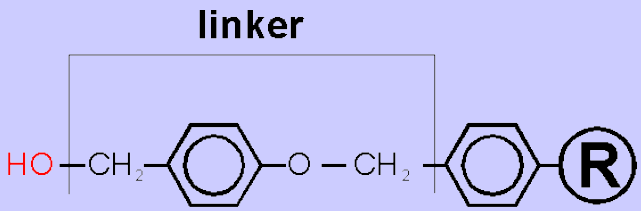


tBoc-aminosav
t-Butiloxikarbonil-aminosav

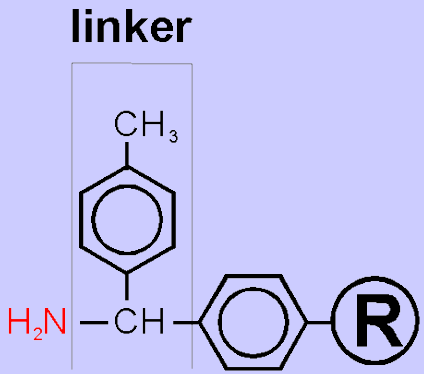
Gyanta típusok



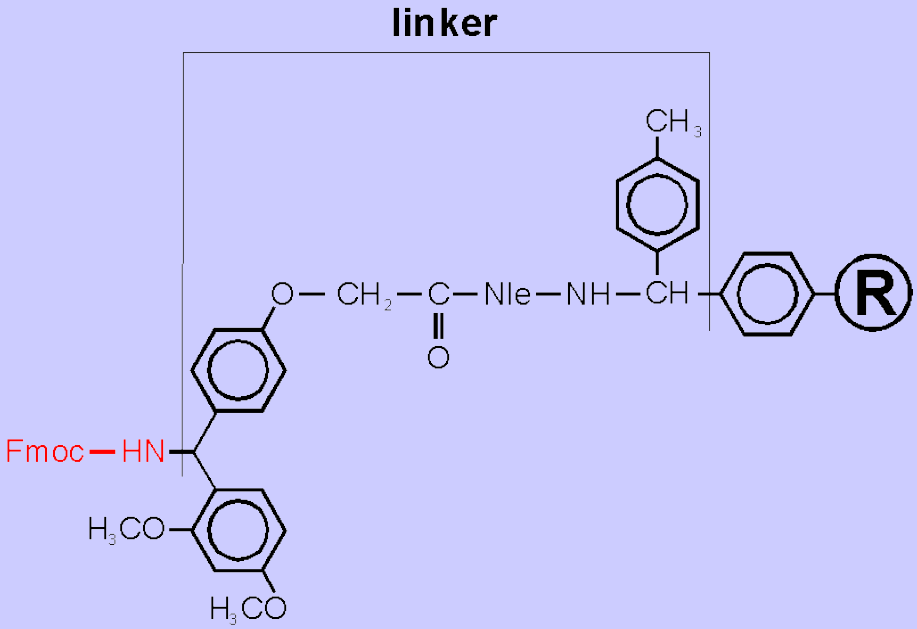
PAM gyanta



Wang gyanta



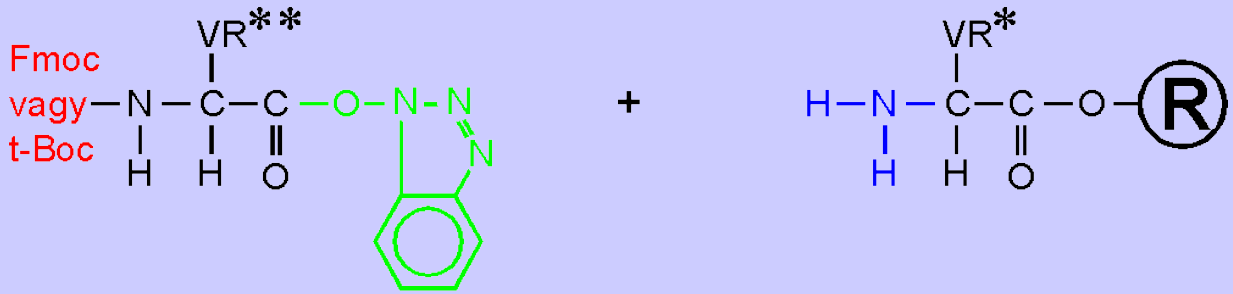
MBHA amid gyanta



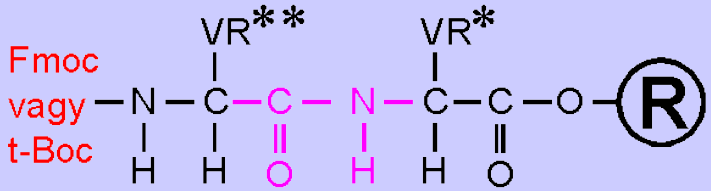
Rink amid MBHA gyanta

Kapcsolás a hordozóra

aktivált C-terminális szabad N-terminális

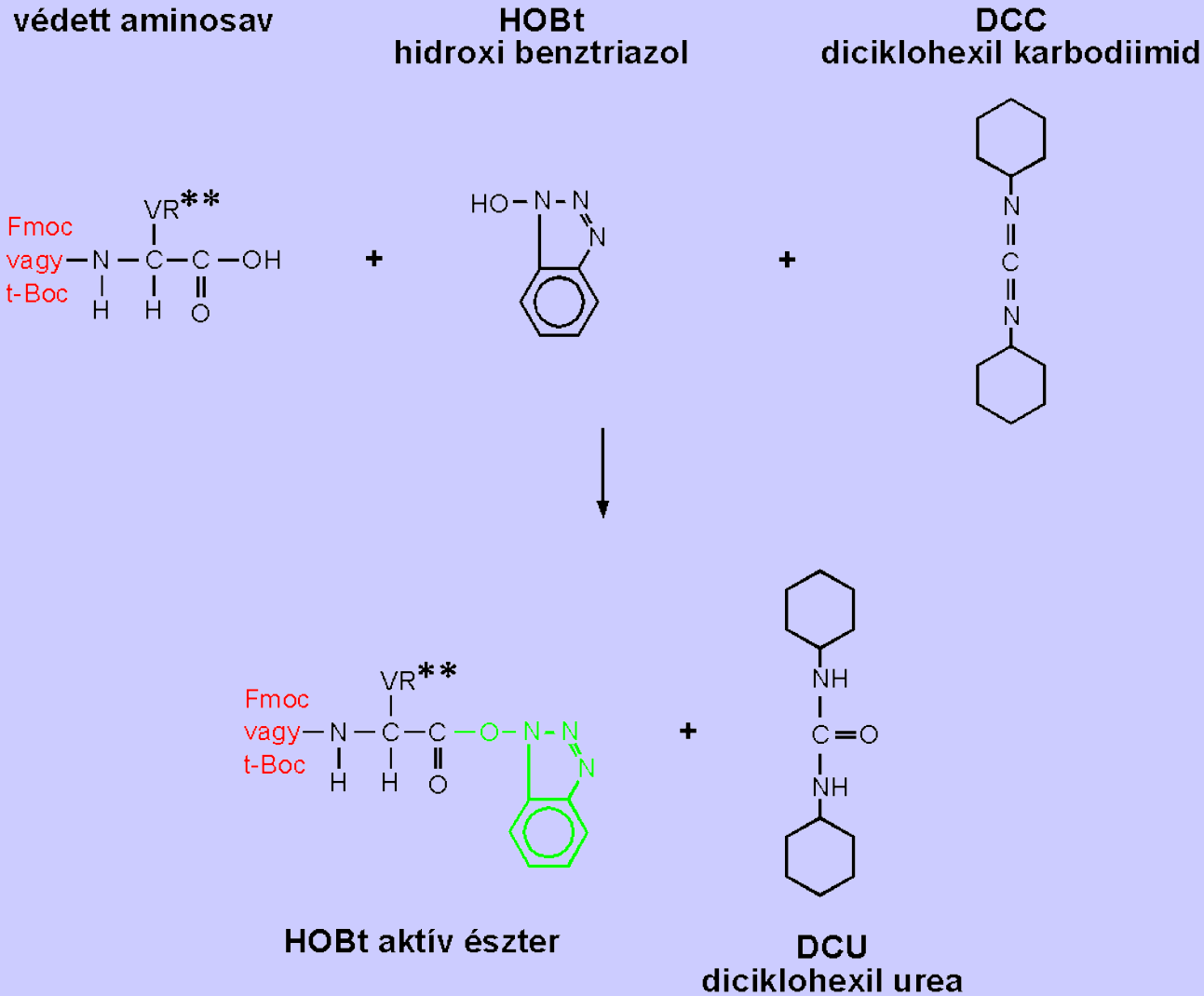


HOBt aktív észter

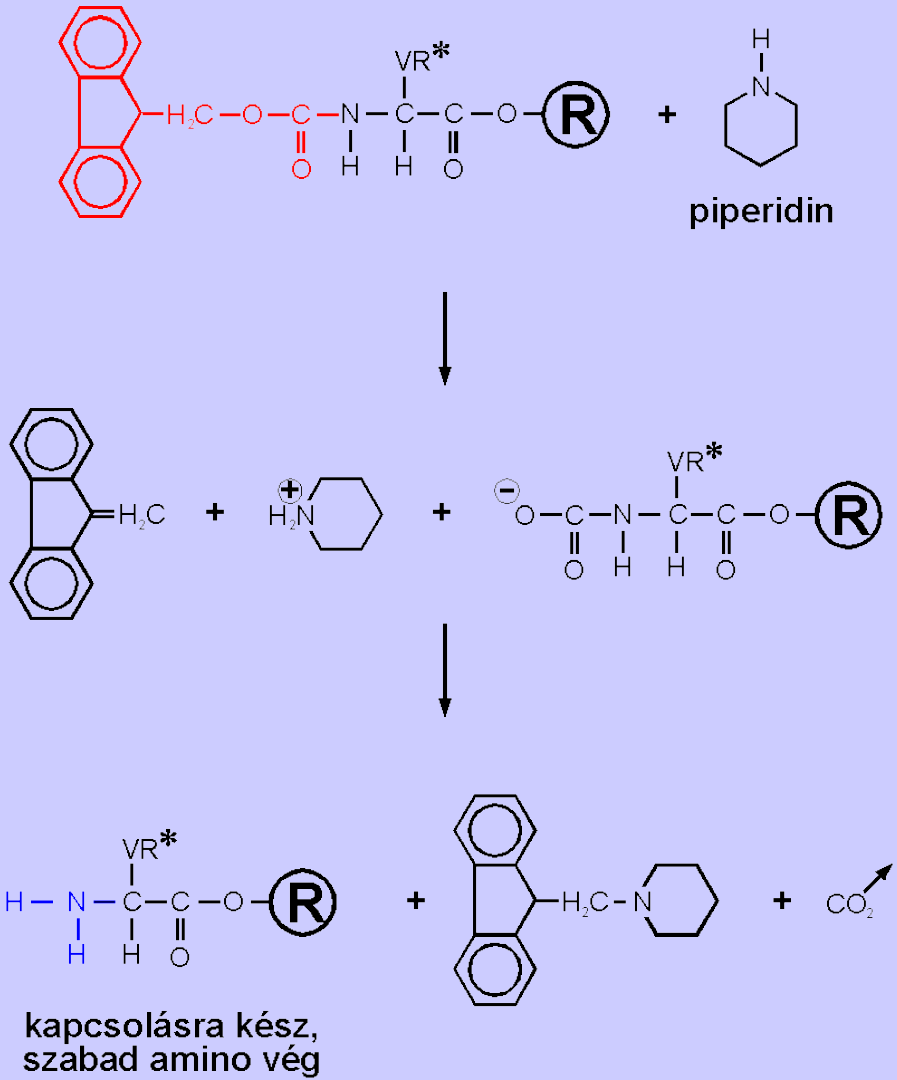


peptid

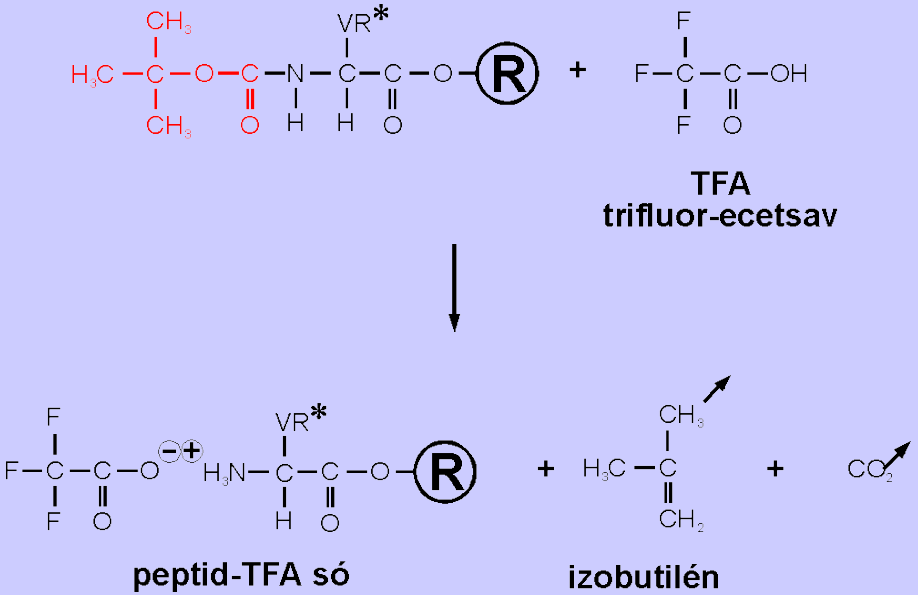
Aktív észter képzése



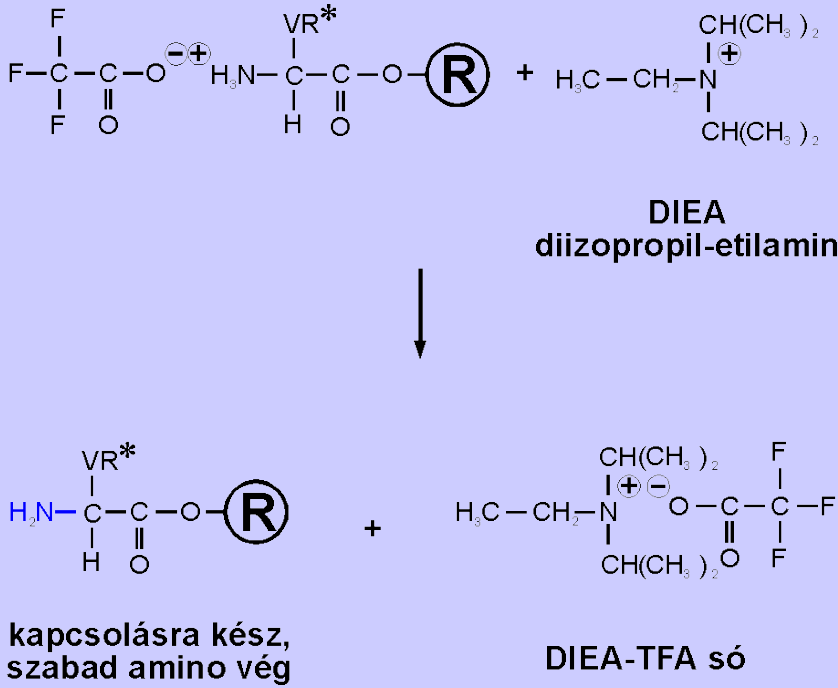
Szabad N terminális képzése, Fmoc kémia



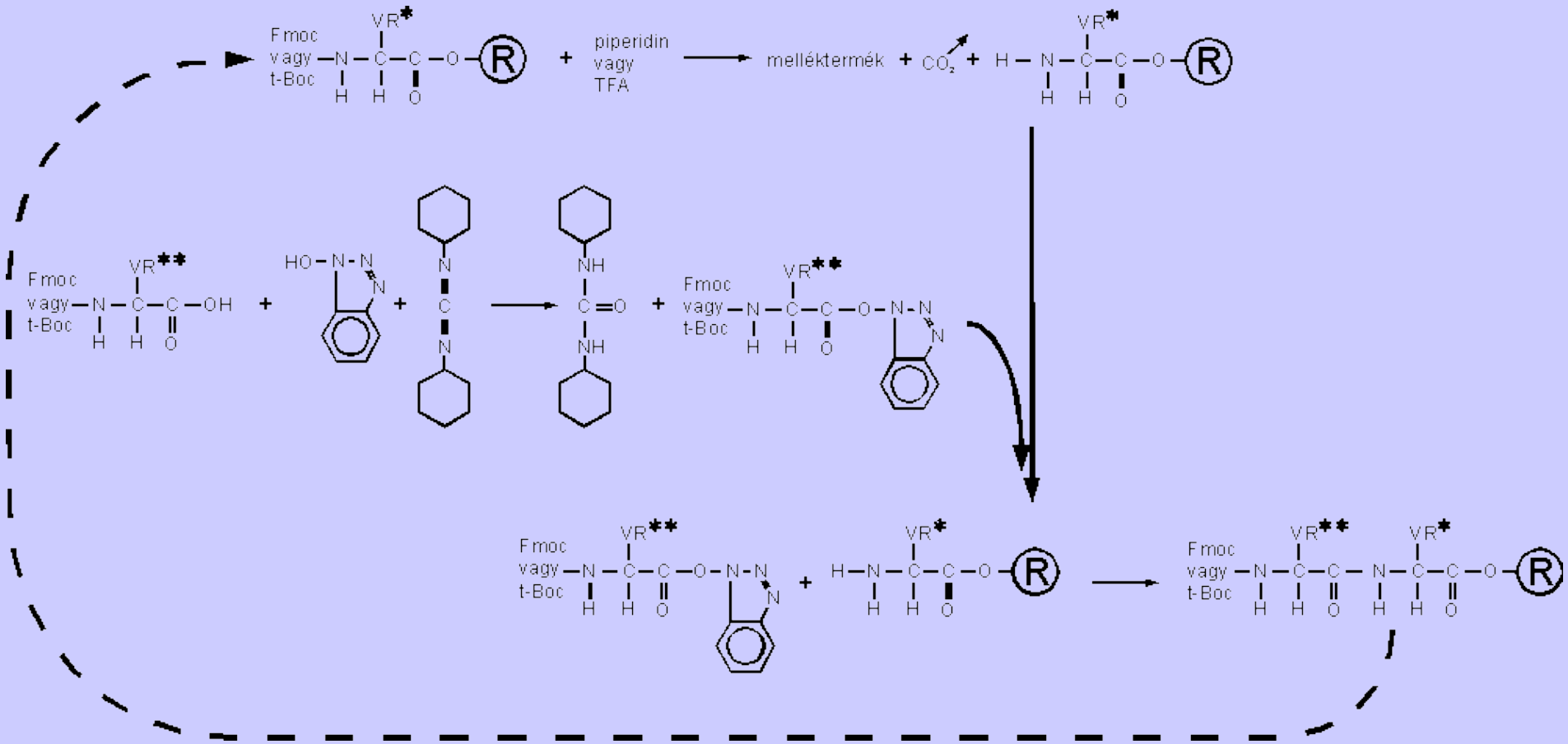
Szabad N terminális képzése, tBoc kémia



semlegesítés



Reakció ciklus



A kész fehérjelánc felszabadítása

- *Lehasítás a hordozóról*
  - *egy időben a védőcsoportok eltávolításával*
    - » *Fmoc -TFA*
    - » *tBoc – hidrogénfluorid*
  - *a védett lánc lehasítása*
    - » *tBoc: hidrazinolízis*
- *Mellékreakciók:*
  - *savérzékeny észterek reagálnak az elektrongazdag oldalláncokkal (Met, Cys, Trp, Tyr)*
  - *kiküszöbölés: carbonium ion scavangerek alkalmazása (anizol, tioanizol, etán-ditiol, krezol, fenol, víz)*

Szintézis problémák

- *Láncterminálódás*
  - *keton és/vagy aldehid szennyeződések a reagensekben:*
    - *imidazolidinon gyűrű képződés az N–terminális dipeptiden*
  - *gyenge savak:*
    - *piroglutaminsav képződés az N–terminális glutaminból*
- *Deléciók:*
  - *nem tökéletes védőcsoport eltávolítás*
    - *kiküszöbölés: cappelés*
  - *diketopiperazin képződés: dipeptid-észterek ciklizálódása és lehasadása a gyantáról. A gyanta hidroximetil formában mard így rövidebb lánc növekedése indulhat. (a legnagyobb kockázat Pro és Gly esetében)*
    - *kiküszöbölés: az átmeneti védöcsoport eltávolítása és a kapcsolás között eltelt idő lerövidítése*

Különböző tisztaságú fehérjék felhasználási területei

Tisztaság	
>70%	• immunizálás
>80%	• ELISA standard antitest titer méréshez antiszérumban • nem kvantitatív enzim-szubsztrát vizsgálatok • foszforilálás • immunocitokémia és in vitro bioesszék • affinitás szorbens előállítás • fehérje elektroforézis
>95%	• kvantitatív ELISA és RIA standard • kvantitatív receptor-ligand kölcsönhatás vizsgálatok • in vitro bioesszék • in vivo vizsgálatok • enzim vizsgálatok • kromatográfiás standardok • NMR vizsgálatok