

Storage & Handling Synthetic Peptides

ガイドライン

SCIENCE @ WORK



Handling and Storage of Synthetic Peptides

合成ペプチドを用いて実験をする際に難しいことは、ペプチドを溶解する最適な溶媒を決定することです。本書では合成ペプチドの一般的な保存方法、取扱、および溶解方法をご紹介します。

Storage Guidelines for Lyophilized Peptides

凍結乾燥されたペプチドが届きましたら、 $-2\sim-8^{\circ}\text{C}$ またはそれ以下の温度で、暗所に保存してください。凍結乾燥されたペプチドは室温で数日から数週間は安定ですが、長期間保存する場合は -20°C かそれ以下で保存することをお勧めします。

湿気は合成ペプチドの安定性を低下させます。冷凍庫に保存されたペプチドを使用する際には、十分に室温に戻してからご使用ください。

A Strategy for Dissolving Single Peptides

すべての凍結乾燥ペプチドを溶解できる万能的な溶媒はありませんが、バイオリジカルアッセイに完全に適合するものでなければなりません。適切な溶媒を見つけるために複数の溶媒を試す必要があります。お客様のペプチドに最も適した溶媒を選ぶには、ある程度の“trial-and-error”が必要とされます。最初に選んだ溶媒がワークするとは限りませんので、最初にトライする溶媒は凍結乾燥により簡単に除去できるものが良いでしょう。そのため、ペプチドをすべて溶かす前に、少量のペプチドで溶解性試験をおこなうことが重要です。以下にペプチドを溶解するための一般的なガイドラインをご説明いたします。

Determining Solubility Characteristics

ペプチド粉末に溶媒を加える前に、ペプチドの溶解特性を理解するために、簡単なツールを用いてペプチドのアミノ酸組成を評価することが重要です。ペプチドの電荷の数と種類は水溶液中での溶解性を左右します。一般的にペプチドに電荷が多いほど水に溶けやすくなります。さらにペプチドは一般的にpH2-6よりも、pH6-8の方よりチャージがあります。このため、ペプチドを中性付近で溶解するのがベターです。ただし、非常に疎水的なペプチドは凝集しやすいのでこの限りではありません。疎水的なシーケンスはアグリゲーションの原因となり、広範

な水素結合によりペプチドは凝集したり、ゲル状になったりします。以下のガイドラインをご参考にペプチドが塩基性、酸性、または中性であるかをご判断ください。

1. 酸性残基 (D, E および C 末端の COOH) に -1 の値を割り当てる。
2. 塩基性残基 (K, R および N 末端の NH_2) に $+1$ の値を割り当てる。
3. H 残基に pH6 以下では $+1$ を、pH6 以上では 0 の値を割り当てる。
4. ペプチドの pH7 でのトータルチャージをカウントします (すべての D, E, K, R, C 末端の COOH および N 末端の NH_2)。
5. ペプチドのすべてのチャージを計算します。

Dissolving Approach for Charged Peptides

上記のガイドラインに基づき、以下の戦略を用いてペプチドの溶解性試験をおこなってください。

1. ペプチドの全体のチャージがネガティブであれば、ペプチドは酸性と思われます。ペプチドが酸性、かつ、または pH7 でのペプチドのすべてのチャージ数が全残基数の 25% よりも多い場合、少量の 0.1M Ammonium bicarbonate でペプチドを溶解し、水で適切な濃度に希釈してください。最終的なペプチド溶液の pH を 7 にするか、または必要に応じて pH を調整してください。
2. ペプチド全体のチャージがポジティブであれば、ペプチドは塩基性と思われます。ペプチドが塩基性であり、pH7 でのペプチドのすべてのチャージ数が、全残基数の 10-25% の間である場合、少量の 25% 酢酸にペプチドを溶解し、水で適切な濃度に希釈してください。
3. ペプチド全体のチャージが 0 であれば、そのペプチドは中性と思われます。すべてのチャージ数が全残基数の 25% よりも多い場合、上記のセクション 1 の戦略を試してみてください。すべてのチャージ数が全残基数の 10-25% の場合、以下で推奨する有機溶媒を試してみてください。
4. ペプチドのすべてのチャージ数が全残基数の 10% よりも少ない場合、有機溶媒を使用することをお勧めします。

どのような溶媒を使うにしても、最初の溶媒の最大濃度は、溶媒の特性がお客様のアッセイに適しているかどうかによります。より強い溶媒を試す前に、超音波等でペプチドが溶けるかどうか確かめた方がよいでしょう。超音



Handling and Storage of Synthetic Peptides



波処理はペプチドの個体をより小さな粒子に分解し、溶解性を促進させます。超音波処理後、ペプチド溶液がゲ状になる、濁っている、または微粒子が見える場合、そのペプチドは懸濁しているだけで、完全には溶けていません。この時点でより強力な溶媒が必要となります。もし、ペプチドが溶けていない場合は、凍結乾燥をおこない、揮発性のバッファーを除去してください。サンプルを乾固させた後、新たな溶媒を試してみてください。

疎水性/電荷のないペプチドの溶解方法について

上記で推奨した方法は、シーケンス中に疎水性残基が50%以上含まれているペプチド、チャージが25%以下の中性ペプチド、および/またはチャージが10%以下のペプチドを溶かすには不十分と思われる。このようなペプチドにはアセトニトリル (ACN)、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、またはジメチルフォルムアミド (DMF) 等の有機溶媒を用いることをお勧めします。また、塩酸グアニジン、または尿素のようなカオトロピック塩を添加することにより、疎水性相互作用を弱めたり、水素結合を壊すことによりペプチドの「ゲル化」を減少させることができます。同様に初期の有機溶媒、またはカオトロピック塩の濃度は、お客様のアッセイシステムに依存します。Cys (C) または Met (M) を含むペプチドのシーケンスは DMSO 中では不安定ですので、ご注意ください。

最初に試した溶媒 (酢酸、アセトニトリル、DMSO、DMF 等) でペプチドを完全に溶かすことが重要です。なぜなら、これらの溶媒にペプチドが溶ける割合は、通常、水/溶媒のミクスチャーよりも高いからです。水/溶媒のミクスチャーをペプチドの溶解に最初に用いた場合、ペプチドサンプルに添加される溶媒の必要量はより多くなると思われる。ペプチドを完全に溶解するのを容易にするために超音波処理も必要です。

初期溶媒、特に有機溶媒でペプチドを溶かした後、ペプチド溶液を静かに攪拌しながらバッファーをゆっくり加え、希釈していきます。これは局所的に水溶液中のペプチド濃度が変わり、ペプチドが沈殿することを防ぎます。さらにこの戦略の良いところは沈殿の可能性を目視で確認できることです。

Preparing a Working Stock Solution (General approach)

実験に必要な濃度よりも高い濃度でストック溶液を作

るために、滅菌水または0.1%酢酸等の適当な溶媒で調整されます。ペプチドのストック溶液はさらにアッセイのバッファーで希釈されます。ペプチドの溶解には、まずアッセイ用のバッファーが用いられます。そしてペプチドが溶けない場合は、一旦ペプチドを回収し、不揮発性の塩または有機溶媒を試します。ペプチドが水や酢酸に溶けなければ、ペプチド溶液を凍結乾燥します。ペプチドを凍結乾燥した後、他のより強い溶媒を試してみます。

Guidelines for Dissolving Several Peptides

ペプチドはシーケンスによって性質が異なりますが、以下にペプチドを再溶解させるためのストラテジーを述べます。この手順はそれぞれのペプチドの最終的なワーキング溶液の容量が結果として異なるかもしれません。

1. ペプチドの濃度が1-5mg/mlとなるように0.1%酢酸を加え、超音波処理をおこないます。
2. 溶けないペプチドには酢酸濃度が10% (v/v) となるように酢酸原液を加え、超音波処理をおこないます。
3. それでも溶けないペプチドには20% (v/v) となるようにアセトニトリルを加え、超音波処理をおこないます。
4. これでも溶けない場合は凍結乾燥により、水、酢酸、アセトニトリルを除去します。サンプルが完全に乾燥した後に、原液のDMFまたはDMSOをペプチドが完全に溶けるまでごく少量ずつ添加します。DMFまたはDMSOの濃度が約10% (v/v) となるように、ゆっくりと水を加え、希釈します。もし、このステップで沈殿が生じたら、水を加えるのをやめて、ペプチドが完全に溶けるまでDMFまたはDMSOを少量ずつ加えます。これらのペプチドは、他のペプチドと同じような濃度では水に溶けないかもしれません。
5. ペプチドを溶かした後、ストック溶液に最も適した溶媒で、それぞれの濃度が同じになるように希釈します。これでペプチドを実験で使うのが容易になります。さらにアッセイするバッファーで希釈します。このステップでバッファーに不溶なペプチドは除いた方が良くもありません。
6. DMFやDMSOを含むペプチド溶液以外は凍結乾燥することが可能です。凍結乾燥することは、ペプチドを長期間保存するのに最も適しています。

Handling and Storage of Synthetic Peptides

Storage Guidelines for Peptide Solutions

一度溶かしたペプチドはあまり長持ちしません。N、Q、C、MおよびWを含むペプチドは溶液中では不安定です。滅菌バッファーを用い、小分けして凍結保存することにより、ペプチドの寿命は長くなります。保存温度は-20℃かそれ以下が適切です。ペプチド溶液の凍結・融解はできるだけお控えください。

Peptide Stability and Potential Degradation Pathways

ペプチドの安定性はアミノ酸組成によって異なります。保存条件が適切でなければ、ペプチドは劣化します。さらにタンパク質分解酵素、化学変化による劣化のリスクが起これば、起これる品質劣化の例を以下に示します。

1.加水分解

一般的にこれはシーケンス中にAsp (D) が含まれている場合におこる問題で、脱水反応により環状のイミド中間体を形成します。シーケンスにAsp-Pro (D-P) が含まれている場合、環状のイミド中間体はペプチド鎖の切断を起こす可能性があります。同様にAsp-Gly (D-G) が含まれているシーケンスは、環状中間体が加水分解により無害なオリジナルAspに戻ったり、不可逆的なiso-aspartate analogになったりします。最終的にはすべてのaspartate体は完全にiso-aspartate analogに変化します。シーケンスにSer (S) を含むシーケンスもまた環状のイミド中間体を形成し、ペプチド鎖の伸長を阻害することがあります。

2.脱アミド化

Asn-Gly (N-G) またはGln-Gly (Q-G) が含まれているシーケンスで、塩基が触媒となって引き起こされる反応で、Asp-Gly (D-G) のメカニズムに類似しています。Asn-Glyの脱アミド化は環状のイミド中間体を形成し、その後加水分解によりAsnのアナログであるaspartateまたはiso-aspartateを形成します。さらに環状のイミド中間体はラセミ化により、AsnのアナログであるD-AspまたはD-iso-Aspへと誘導されます。

3.酸化

Cys (C) およびMet (M) は顕著に可逆的な酸化を受けやすいアミノ酸です。高いpHでCysのチオール基は容易に脱プロトン化し、瞬時に酸化され、分子間または分子内のジスルフィド結合を形成します。ジスルフィド結合はジチオスレイトール (DTT) またはtris (2-carboxyethylphosphine) hydrochloride (TCEP) 等により容易に還元されます。Metは化学および光化学的な触媒反応により、メチオニンスルフォキシドさらにメチオニンスルホンに酸化され、還元することは不可能です。

4.ジケトピペラジン化およびピログルタミン化

ジケトピペラジン化はGly (G) がC末端から3番目の位置にあり、さらにPro (P) またはGly (G) が1番目または2番目の位置にある場合に生じます。反応は2番目と3番目のアミノ酸間のアミド-カルボニル上でのN末端の窒素の求核攻撃を含みます。そしてC末端から2個のアミノ酸がジケトピペラジンを形成し、レジンから離脱されます。

一方、Gln (Q) がシーケンスのN末端にある場合、ピログルタミン化が起こりやすくなります。これは、N末端窒素が脱アミドされたピログルタミルペプチドアナログを形成するためにGln (Q) の側鎖カルボニルの炭素を攻撃するのに類似した反応です。この反応はペプチドのN末端にAsnが含まれているときも起こりえますが、さほど顕著ではありません。

まとめ

ペプチドの劣化を最小限にする最も効果的な方法は凍結乾燥した状態で、-20℃で保存することです。可能であれば-80℃がより好ましいです。ペプチドを溶液で保存する場合は、小分けして凍結保存し、できるだけ凍結・融解を避けます。ペプチド溶液をpH8以上にさらすことはなるべく避けてください。しかし、ペプチドをpH8以上で溶かさなければならない場合は、溶液を冷やしながら出来るだけ短時間に処理してください。最後に凍結乾燥したペプチドおよび溶液 (特にpHが高い場合) は、空気中の酸素にさらす時間をできるだけ最小限にしてください。

SIGMA-ALDRICH®
シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社
ライフサイエンス事業部

カスタム製品に関するお問合せは右記までご連絡ください。

TEL Customer Support (ご注文・納期についてのお問合せ) Scientific Support (技術的なお問合せ)
☎0120-730-830 • 0133-75-7311 ☎0120-730-860 • 0133-71-2471

FAX 受注専用 ☎0120-730-850 • 0133-75-7322 e-mail genosysjp@sial.com