

Información básica

- **Escala de síntesis.** El Focus XC permite realizar síntesis en un rango de escalas variable entre 0.05-5 mmoles. Por razones prácticas en el Servicio se han optimizado los métodos para las siguientes escalas: 100 μmol , 250 μmol y 1 mmol. Por término medio, dependiendo del grado de sustitución de la resina empleada, en una síntesis en la escala 100 μmol se obtienen 30-50 mg de “crudo” para un péptido de 10 residuos, y 70-100 mg para un péptido de 20 residuos.
- **Control de calidad.** Todos los péptidos son sometidos a un estricto control de calidad consistente en un análisis mediante LC-MS. En los casos necesarios, el producto sintético también se analiza mediante MALDI-TOF. Cuando el usuario lo solicite, como control adicional, también se realizará un análisis de aminoácidos.
- **Entrega.** Los péptidos se cortan de la resina de síntesis y se desprotegen con ácido trifluoroacético. Posteriormente, se precipitan con éter y el “crudo” obtenido se entrega seco al usuario. El plazo de entrega varía entre 10 días y 3 semanas.
- **Péptidos modificados.** En el Servicio se sintetizan péptidos acetilados y/o amidados de forma rutinaria. También se realizan síntesis con otras modificaciones químicas como fosforilación, biotilación, conjugación con derivados fluorescentes (rodamina y fluoresceína), etc. En este caso, el usuario deberá asumir el coste del formato mínimo comercialmente disponible de la modificación que desee incorporar.
- **Almacenamiento y manipulación.** El “crudo” liofilizado debe guardarse entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente en un desecador. Tras la liofilización, los péptidos retienen cantidades significativas de agua y de contra iones, como el trifluoroacetato, que se unen a los residuos cargados positivamente, la combinación de ambos puede llegar a representar hasta el 30% del peso total del crudo. La concentración exacta del crudo se puede obtener mediante análisis de aminoácidos de una alícuota del péptido en solución. Los péptidos en solución son mucho menos estables que liofilizados, por lo que una vez reconstituidos deben usarse tan pronto como sea posible para evitar su degradación. El resto del péptido que no haya sido usado debe guardarse en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, si posee residuos de cisteína, metionina o triptófano, bajo atmósfera inerte para evitar la oxidación de los mismos.
- **Métodos para disolver péptidos.** La solubilidad de los péptidos es muy variable. El principal problema asociado con la solubilidad es la formación de estructura secundaria. En general, cuanto mayor es la longitud y el número de residuos hidrofóbicos presentes en el péptido, mayor es la tendencia a formar estructura secundaria. La presencia de sales también favorece la formación de estructura secundaria por lo que el mejor disolvente que podemos emplear en primer lugar es el agua. Si el péptido no es soluble en agua, seguir las siguientes recomendaciones:

- 1- Péptidos de carácter ácido. Resuspender en un volumen reducido de tampón básico como 10% bicarbonato amónico y diluir con agua para obtener la concentración deseada. No utilizar tampones básicos con péptidos que contengan residuos de cisteína.
- 2- Péptidos de carácter básico. Resuspender en un volumen reducido de 30% de ácido acético y diluir con agua para obtener la concentración deseada.
- 3- Péptidos de carácter muy hidrofóbico. Intentar disolver en un volumen reducido de DMSO y diluir con agua.
- 4- Péptidos con tendencia a formar agregados (generalmente con residuos de cisteína). Añadir urea 6 M, urea 6 M y 20% de ácido acético o cloruro de guanidinio 6 M y diluir posteriormente con agua.

La reconstitución de un péptido puede ser un proceso laborioso. En ocasiones, sonicar durante varios minutos en un baño con agua caliente puede resultar de ayuda.

Los péptidos que contienen residuos de Trp, Met o Cys requieren un cuidado especial para evitar su oxidación. Es necesario utilizar agua/tampones libres de oxígeno o agentes reductores como el 1,4-ditio-treitol (DTT).