



УДК 577.112.6: 542.95: 543.426

© 1994 В. Н. Медведкин, Е. А. Пермяков *,
В. Н. Уверский, А. Ф. Грипась, Ю. В. Митин

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ КОНТРОЛЬ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ КВАРЦЕВОГО РЕАКТОРА-КЮВЕТЫ

Институт белка РАН, Пущино Московской обл.;

* *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской обл.*

Ключевые слова: пептидный синтез, флуоресценция, мониторинг.

Использование проточного кварцевого реактора позволяет измерять спектры флуоресценции непосредственно на полимерном носителе. Это дает возможность получить дополнительную информацию в процессе твердофазного синтеза пептидов. Приведено краткое описание реактора. На примере флуоресценции Fmoc-группы в растворе и на полимерном носителе продемонстрированы возможности устройства.

Метод флуоресцентной спектроскопии находит широкое применение при изучении свойств биополимеров [1]. Высокая чувствительность метода и возможность работать в сильно рассеивающих средах делают его привлекательным для решения различных задач, связанных с конформационными изменениями биополимеров, в том числе иммобилизованных на полимерном носителе [2].

Одним из возможных примеров применения флуоресценции в биоорганической химии является, на наш взгляд, твердофазный синтез пептидов, предложенный Меррифилдом [3]. Это обусловлено тем, что в настоящее время в твердофазном синтезе пептидов активно используется в качестве временной защитной группы производное флуорена — Fmoc-группа, легко и количественно отщепляемая в мягких щелочных условиях (см., например, [4] и ссылки на литературу в этой книге). Наше внимание привлекла прекрасная способность этой защитной группы флуоресцировать в ультрафиолетовом диапазоне длин волн, что может быть использовано для получения информации о процессах, происходящих непосредственно на полимерном носителе в ходе пептидного синтеза.

Осуществление пептидного синтеза на полимерном носителе наряду с явными преимуществами перед классическим синтезом пептидов в растворе ставит целый ряд проблем. Контроль полноты протекания реакции, выбор эффективных методов образования пептидной связи, поиск условий, позволяющих избежать образования вторичной структуры полипептидной цепи, и совместимость пептида с полимерным матриксом — далеко не полный их перечень. Вместе с тем количество аналити-

Сокращения: Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил, Dhbt — 3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксобензотриазинил, Pfp — пентафторфенил, Mit — 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил, TFA — трифторуксусная кислота.

ческих методов в твердофазном синтезе пептидов весьма ограничено. Несмотря на большое число публикаций, практическое применение нашла лишь малая часть предложенных аналитических процедур. Подробное описание проверенных практикой методов можно найти, например, в книге [4], где им посвящена отдельная глава. В основном аналитические методы в твердофазном синтезе касаются качественного или количественного определения аминогрупп на полимерном носителе самыми различными способами — с использованием фотометрии [5—10], потенциометрии [11—13], флуориметрии отщепленных от полимера продуктов [14—16].

Имеются также примеры использования радиоизотопных методов [17, 18], ИК-спектроскопии, ЯМР, масс-спектрометрии (см., например, [19] и цитируемые ссылки), позволяющих получить в совокупности ценную информацию. Однако эти методы трудно приспособить для непрерывного мониторинга в условиях рутинного твердофазного синтеза пептидов.

Большую популярность получают в последнее время методы мониторинга твердофазного синтеза, основанные на принципе неразрушающего и неинвазивного контроля реакционной среды. К таким методам относятся различные варианты спектрофотометрического контроля [20—32], электрохимическое детектирование [33, 34], термометрический контроль [35] (не получивший, впрочем, дальнейшего развития) и довольно оригинальный светлографический метод [36—38], позволяющий контролировать процессы промывки полимера и даже в определенной степени процесс образования пептидной связи по изменению степени набухания полимерного носителя.

Первые предварительные данные о применении флуоресцентной спектроскопии для мониторинга твердофазного синтеза непосредственно на полимерном носителе приведены Моравец [39]. Однако продолжения исследований в этом направлении не последовало. Во всяком случае, в своих интересных обзорах о применении флуоресценции для изучения полимеров [40, 41] Моравец не упоминает об этом направлении. По-видимому, попытки получить однозначную зависимость между квантовым выходом флуоресценции и количеством функциональных групп в растворе или на полимере оказались неудачными по ряду причин, вызывающих тушение флуоресценции.

Для получения информации о свойствах Fmoc-группы с точки зрения ее пригодности для флуоресцентного мониторинга твердофазного синтеза пептидов нами изучены спектральные характеристики Fmoc-защищенных аминокислот в чистом растворителе, в присутствии полимера (как инертного наполнителя) и в условиях реального твердофазного синтеза пептидов. Для решения последней задачи разработан специальный кварцевый полумикрореактор, который можно устанавливать как кювету практически в любой флуориметр. Чтобы максимально стандартизовать условия эксперимента, все измерения, независимо от наличия в системе полимерного носителя, проводили в этом реакторе.

На примере флуоресценции Fmoc-группы в растворе DMF (рис. 1) видно, что линейная зависимость квантового выхода флуоресценции Fmoc-Ala-OH от концентрации имеет место лишь в области концентраций до 1 мМ. Затем наступает резкое уменьшение квантового выхода, связанное с концентрационным тушением, и при концентрациях выше 3 мМ квантовый выход флуоресценции изменяется в значительно меньшей степени. Аналогичная зависимость наблюдается и с Fmoc-группой, ковалентно присоединенной к полимеру (данные не приведены). Простой расчет показывает, что при рабочей емкости 0,1—0,5 ммоль пептида на 1 г полимера и его набухаемости в DMF 5 мл/г мы имеем концентрацию Fmoc-группы на полимере 20—100 мМ, что находится в диапазоне концентрационного тушения. Тем не менее даже в этом случае чувствительности флуоресцентного метода контроля более чем достаточно для получения полезной информации. Преимуществом флуоресцентного мониторинга является возможность наблюдать процесс непосредственно на полимерном носителе (или в его присутствии). При этом стандартный стирол-дивинилбензолный сополимер почти

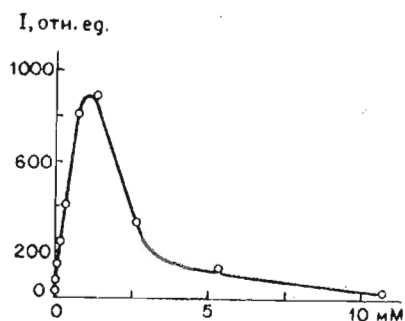


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость квантового выхода флуоресценции Fmoc-Ala-OH от концентрации его раствора в DMF (λ 316 нм)

Рис. 2. Спектры флуоресценции 1 мМ Fmoc-Ala-OH в DMF (1), стирол-дивинилбензольного сополимера, модифицированного этим производным (2), и немодифицированного полимера (3). Спектры 1 и 2 нормализованы по их максимуму

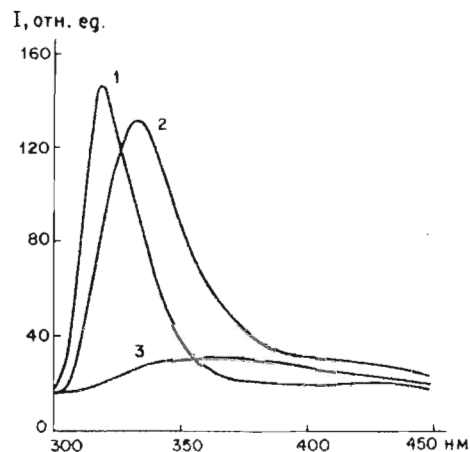


Рис. 2

Рис. 3. Зависимость квантового выхода флуоресценции (λ 316 нм) Fmoc-Glu(OBu^t)GlySer(Bu^t)Asp(OBu^t)-полимера (I) и его же после деблокирования Fmoc-группы (II) от степени сжатия полимера: 1—2 — сжатие полимера; 2—3 — возвращение адаптера к исходному положению; 3—1 — возвращение полимера к исходному состоянию через 30 мин

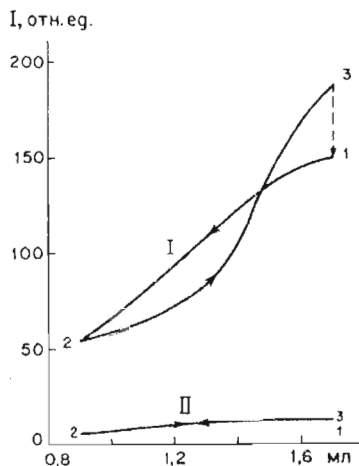


Рис. 3

не имеет собственной флуоресценции (рис. 2, спектр 3). Это дает возможность сравнительно легко контролировать, например, полноту деблокирования Fmoc-группы. Необходимость такого контроля при синтезе пептидов продемонстрирована в работах [31, 32]. Типичные спектры флуоресценции Fmoc-содержащих производных аминокислот (за исключением Trp) и пептидов представлены на рис. 2, 1, 2. Можно наблюдать значительный сдвиг максимума флуоресценции в присутствии стирол-дивинилбензольного сополимера (рис. 2, 2). Причем это смещение характерно не только для случая, когда Fmoc-производное ковалентно связано со смолой. В контрольном эксперименте, когда раствор Fmoc-Ala-OH в DMF пропустили через реактор с немодифицированной смолой до полного уравновешивания, результирующий спектр совпадал со спектром, полученным для Fmoc-Ala-полимера (рис. 2, 2), а также для Fmoc-Asp(OBu^t)-смолы и для других Fmoc-содержащих пептидилполимеров. Важно, что интенсивность флуоресценции Fmoc-Ala-OH в чистом растворителе приблизительно в 50 раз выше, чем в присутствии смолы.

Спектры флуоресценции полимерного носителя или окружающего его раствора можно получить, пользуясь обычной кварцевой флуориметрической кюветой (или упрощенным вариантом проточной прямоугольной кюветы, как это описано в работе [2]). Однако для твердофазного синтеза требуется специальный проточный кварцевый реактор, особенно если принять во внимание сильное изменение квантового выхода флуоресценции при различной степени сжатия полимера (рис. 3). Эти данные являются дополнительным напоминанием о том, что поведение функциональных групп на полимерном матрикс отличается от их поведения в

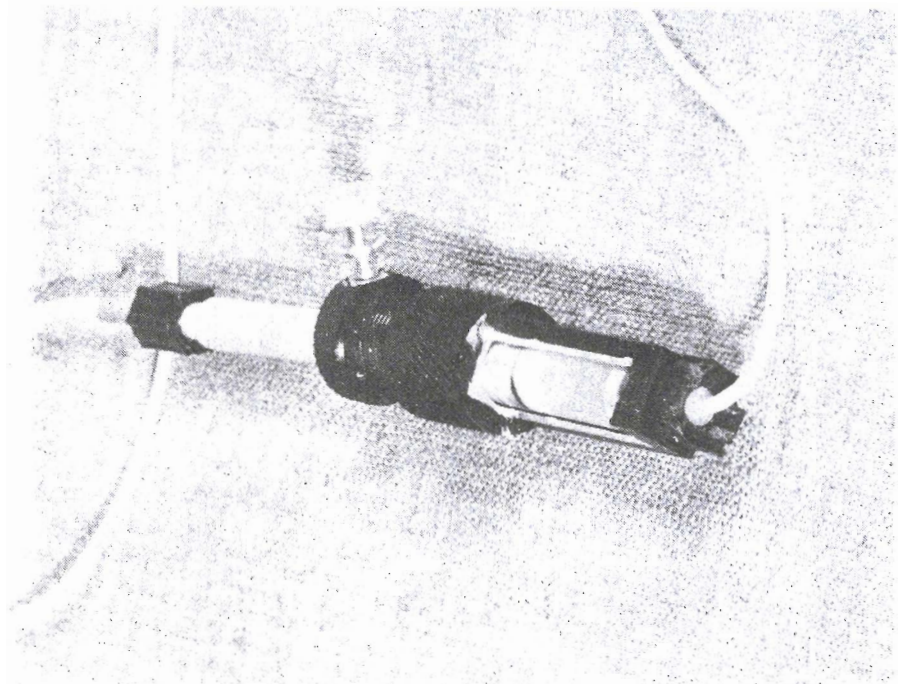


Рис. 4. Общий вид кварцевого реактора-кюветы

растворе — простое сжатие приводит к изменению объемной концентрации присоединенного к полимеру реагента. В этой связи хотелось бы отметить полезность стандартизации условий проведения реакции на твердой фазе. Возможным решением является осуществление реакции на полимерном носителе под фиксированной статической нагрузкой, как это реализовано в светллографе Бару и Родионова [36—38].

Разработанная нами конструкция проточного кварцевого реактора-кюветы с подвижным химически инертным адаптером (рис. 4, 5) дает возможность при необходимости работать со статически нагруженным полимером. Устройство представляет собой компромиссный вариант, позволяющий проводить измерения практически на любом флуориметре (для некоторых конструкций флуориметров может потребоваться незначительная доработка кюветного отделения). Это избавляет от необходимости разрабатывать специальное дорогостоящее флуориметрическое оборудование. Реактор состоит из тонкостенной кварцевой трубки длиной 40 мм и внутренним диаметром 10 мм, закрепленной в прямоугольном (с сечением 14×14 мм) держателе из анодированного алюминия с широким вырезом по двум соприкасающимся граням, позволяющим измерять флуоресценцию под углом от 90 до 0° к источнику УФ-излучения. Кварцевая трубка оснащена нижним неподвижным адаптером, жестко прикрепленным к держателю, и подвижным верхним адаптером. Трубка плотно прижимается к нижнему адаптеру и одновременно фиксируется внутри держателя с помощью винтовой крышки, сквозь которую свободно проходит верхний подвижный адаптер. При необходимости подвижный адаптер может быть жестко зафиксирован с помощью фиксирующего винта, расположенного в верхней части винтовой крышки. В конструкции реактора предусмотрен желоб сечением 2×2 мм, прорезанный в противоположном к окну углу прямоугольного держателя для вывода нижней тефлоновой трубки из кюветодержателя флуориметра (на рисунках не показан). На рис. 5 реактор изображен в полусобранном виде для иллюстрации порядка сборки. Для приведения реактора в рабочее состояние

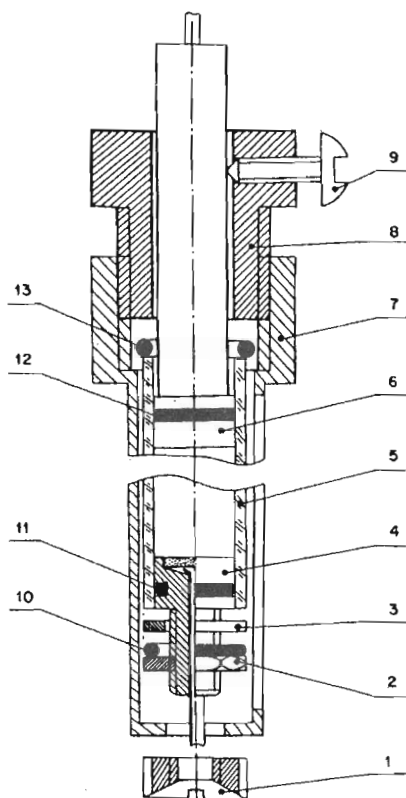


Рис. 5

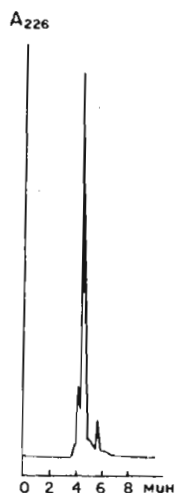


Рис. 6

Рис. 5. Кварцевый реактор-кювета в разрезе. Порядок сборки реактора указан в тексте

Рис. 6. ВЭЖХ реакционной смеси синтезированного пентапептида Glp-Glu-Gly-Ser-Asp после предварительной очистки на сефадексе G-25

необходимо соблюдать следующий порядок сборки. Нижний адаптер 4 закрепляют в кварцевой трубке 5 и фиксируют его положение с помощью прокладки 3 и гайки 2. В реактор загружают 1,5—2 мл полимера и закрывают верхним подвижным адаптером 6. С помощью нижней гайки 1 реактор прикрепляют к держателю 7 и окончательно фиксируют внутри держателя с помощью винтовой крышки 8. При необходимости верхний адаптер фиксируют с помощью винта 9. (10—13 — резиновые прокладки.)

С целью проверки устройства как реактора для пептидного синтеза синтезирован пентапептид Glp-Glu-Gly-Ser-Asp-OH. В ходе синтеза измеряли спектры флуоресценции полимера после конденсации, а также после удаления Fmoc-группы перед очередной конденсацией (стадии 1 и 3 протокола синтеза, см. «Экспериментальную часть»). Спектры флуоресценции Fmoc-группы на каждой стадии синтеза практически совпадают по форме с спектром 2, представленным на рис. 2 (данные не приведены). Из-за сильного тушения флуоресценции пиперидином контролировать удаление Fmoc-группы с полимера непосредственно в ходе деблокирования не удастся. Динамику изменения спектров в ходе синтеза не изучали. Профиль элюции реакционной смеси после снятия пептида с полимера и удаления низкомолекулярных продуктов деблокирования с помощью гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25 приведен на рис. 6.

При планировании экспериментов по применению флуоресценции для ре-

шения задач в химии пептидов важно знать, как влияют на спектр флуоресценции Fmoc-группы различные факторы. С этой целью измерены спектры флуоресценции 1 мкМ растворов различных производных аминокислот в DMF. Спектры Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OPfp, Fmoc-Ser(Bu')-ODhbt, Fmoc-Asp(OBu')-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Tyr(Bu')-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH и Fmoc-His(Trt)-OH практически неотличимы, т. е. влияние ароматических групп боковых остатков, защитных и активирующих групп на спектр флуоресценции Fmoc-группы незначительно или отсутствует совсем. Иначе обстоит дело в случае Fmoc-Trp-OH, для которого наблюдается сильное тушение флуоресценции (возбуждение при 296 нм). Если цель эксперимента — регистрация квантового выхода флуоресценции Fmoc-группы при наименьшем воздействии каких-либо побочных эффектов, необходимо смещать длину возбуждения в длинноволновую область. Опытным путем установлено, что оптимальным режимом для работы с Fmoc-группой является возбуждение флуоресценции при 302,2 нм (линия ртути) и регистрация флуоресценции при фиксированной длине волны (например, при 316 нм).

Как следует из полученных данных, предложенный кварцевый реактор-кювета позволяет измерять спектры флуоресценции в ходе пептидного синтеза. Важное преимущество флуоресцентного мониторинга твердофазного синтеза пептидов перед существующими методами — его нечувствительность к сильному рассеиванию полимерного матрикса, что дает возможность получать информацию о процессах, происходящих непосредственно на полимере. Специфические особенности метода позволяют получать наиболее ценную информацию при низкой концентрации флуоресцирующих групп. С помощью этого метода легко контролировать полноту деблокирования Fmoc-группы в ходе твердофазного синтеза пептидов. Флуоресцентный мониторинг в области рабочих концентраций твердофазного синтеза пептидов требует учитывать концентрационное тушение, в том числе связанное с изменением степени сжатия полимера.

Экспериментальная часть

В работе использованы производные аминокислот, *n*-гидроксibenзилгидроксиметильное производное сополимера стирола с 1% дивинилбензола, с емкостью функциональных групп 0,7 ммоль/г, кат. № 01-64-0001 (Nova-Biochem, Швейцария). Все растворители были свежеперегнанными. Химически инертные адаптеры (полипропилен, тефлон) применяли от хроматографических колонок производства НПФ «Гамма» (Пущино, Россия). В конструкции использованы фторопластовые соединительные трубки диаметром 2 мм. Реагенты через реактор прокачивали в зависимости от эксперимента — с помощью шприцевых дозаторов или под давлением сжатого газа. Пептиды для аминокислотного анализа гидролизovali 12 ч в запаянной вакуумированной ампуле в 6 М HCl при 110° С. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Biotronik (Германия). Спектры флуоресценции измеряли на флуориметре собственной конструкции [42], на котором регистрация флуоресценции осуществляется под углом 90° к направлению луча возбуждающего света. Источником излучения служила ртутная лампа ДРШ 250-2 (мощность 250 Вт). На приборе установлен монохроматор МДР-72. Спектры флуоресценции записывали при длине волны возбуждения 296 нм (за исключением оговоренных в тексте случаев).

Glp-Glu-Glu-Gly-Ser-Asp-OH. Присоединение Fmoc-Asp(OBu')-OH к полимерному носителю и определение степени присоединения аминокислоты к полимеру осуществляли по методике [43] исходя из 1 г полимера. Степень присоединения аминокислоты к полимеру составила 0,36 ммоль/г. Пептиды синтезировали с 0,25 г полимера (1,6 мл набухшего в DMF геля), помещенного в кварцевый реактор-кювету, по стандартному протоколу:

1) промывка DMF до отрицательной реакции раствора на Fmoc-группу по

УФ-спектру (отсутствие поглощения при λ 301 нм). Измерение спектра флуоресценции полимера;

2) деблокирование 20% пиперидином в DMF прокачиванием 10 мл деблокирующего раствора через реактор в течение 15 мин с помощью шприцевого дозатора;

3) промывка DMF до отрицательной реакции раствора на поглощение продуктов деблокирования (λ 301 нм). Измерение спектра флуоресценции полимера;

4) конденсация. 0,35 ммоль активированного эфира Fmoc-аминокислоты (4-кратный избыток к аминогруппам пептидил-полимера), 0,35 ммоль N-метилморфолина и 0,1 ммоль гидроксibenзотриазола в 5 мл DMF прокачивали через реактор в течение 45 мин с помощью возвратно-поступательного шприцевого дозатора со скоростью 1 мл/мин. Для конденсации использовали Pfr-эфиры Fmoc-аминокислот, кроме производного серина, который использовали в виде Dhbt-эфира;

5) совпадает с п. 1, кроме последней стадии, на которой после промывки пептидил-полимера 20 мл DMF реактор последовательно промыли 20 мл метанола, 40 мл диэтилового эфира и сушили в токе азота.

Деблокирование и предварительную очистку пептида проводили как описано в работе [4]. Окончательную очистку пептида осуществляли на колонке (4,6×250 мм) Ultrasphere ODS (part No 25329, Altex, Ирландия) с использованием комплекта хроматографического оборудования (ЛКВ, Швеция). Детектирование осуществляли на длине волны 226 нм. Хроматографию проводили в изократическом режиме в смеси ацетонитрил — 0,1% TFA в воде (5 : 95). Скорость элюирования 0,8 мл/мин. В режиме полупрепаративной очистки около 40 мг неочищенного деблокированного пептида растворяли в 2 мл воды и наносили на колонку порциями по 50 мкл. Фракция основного пика по аминокислотному составу соответствует ожидаемой последовательности: Glu 2,0 (2), Gly 1,2 (1), Ser 0,9 (1), Asp 1,2 (1). Выход 24 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тумерман Л. // Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот. /Ред. Ю. Лазуркин. М.: Наука, 1967. С. 166—221.
2. Gabel D., Steinberg I., Katchalski E. // Biochemistry. 1971. V. 10. № 25. P. 4661—4669.
3. Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 14. P. 2149—2154.
4. Atherton E., Sheppard R. C. // Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. /Eds D. Rickwood, B. D. Hames. Oxford: IRL Press, 1989.
5. Esko K., Karlsson S., Porath J. // Acta chem. scand. 1968. V. 22. № 10. P. 3342—3344.
6. Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. // Anal. Biochem. 1970. V. 34. № 2. P. 595—598.
7. Gisin B. F. // Anal. chim. acta. 1972. V. 58. № 1. P. 248—249.
8. Hodges R. S., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1975. V. 65. № 1/2. P. 241—272.
9. Hancock W. S., Battersbury J. E., Harding D. R. K. // Anal. Biochem. 1975. V. 69. № 2. P. 497—503.
10. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147—157.
11. Dorman L. C. // Tetrahedron Lett. 1969. № 28. P. 2319—2321.
12. Brunfeldt K., Roepstorf P., Thompsen J. // Acta chem. scand. 1969. V. 23. № 8. P. 2906—2907.
13. Brunfeldt K., Christensen T., Villemoes P. // FEBS Lett. 1972. V. 22. № 2. P. 238—244.
14. Жукова Г. Ф., Равдель Г. А., Щукина Л. А. // Журн. общ. химии. 1970. Т. 40. № 12. С. 2753—2757.
15. Garden I. J., Tometsko A. M. // Anal. Biochem. 1972. V. 46. № 17. P. 216—223.
16. Felix A. M., Jimenez M. H. // Anal. Biochem. 1973. V. 52. № 1. P. 377—381.
17. Hancock W. S., Prescott D. J., Vagelos P. R., Marshall G. R. // J. Org. Chem. 1973. V. 38. № 2. P. 774—781.
18. Merrifield R. B., Littau V. // Proc. of the 9th European Peptide Symp., Orsay./Ed. E. Bricas. Amsterdam: North-Holland, 1968. P. 179.

19. Milton R. C. de L., Milton S. C. F., Adams P. A.//J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. № 16. P. 6039—6046.
20. Atherton E., Logan C. J., Sheppard R. C.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1981. № 2. P. 538—546.
21. Dryland A., Sheppard R. C.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1986. № 1. P. 125—137.
22. Cameron L. R., Meldal M., Sheppard R. C.//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. № 4. P. 270—272.
23. Cameron L. R., Holder J. L., Meldal M., Sheppard R. C.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1988. № 10. P. 2895—2901.
24. König W., Geiger R.//Chem. Ber. 1970. B. 103. № 7. S. 2024—2025.
25. Atherton E., Holder J., Meldal M., Sheppard R. C., Valerio R. M.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1988. № 10. P. 2887—2894.
26. Gut V.//Collect. Czech. Chem. Commun. 1975. V. 40. № 1. P. 129—136.
27. Krchnak V., Vagner J., Safar P., Lebl M.//Collect. Czech. Chem. Commun. 1988. V. 53. № 11. P. 2542—2548.
28. Krchnak V., Vagner J., Flegel M., Mach O.//Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 38. P. 4469—4472.
29. Krchnak V., Vagner J., Mach O.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1989. V. 33. № 3. P. 209—213.
30. Vagner J., Krchnak V., Picha J., Pichova D., Fusek M.//Collect. Czech. Chem. Commun. 1993. V. 58. № 2. P. 435—444.
31. Nalis D., Jacob R.//Peptides, 1992. Proc. of the 22th European Peptide Symp./Eds C. H. Schneider, A. N. Eberle. Leiden: ESCOM, 1993. P. 298—299.
32. Larsen B. D., Larsen C., Holm A.//Peptides, 1990. Proc. of the 21st European Peptide Symp./Eds E. Giralt, D. Andreu. Leiden: ESCOM, 1991. P. 183—185.
33. Fox J. E., Newton R., Stroud C. H.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1991. V. 38. № 1. P. 62—65.
34. Schafer-Nielse C., Hansen P. H., Lihme A., Heegart P. H. M.//J. Biochem. and Biophys. Meth. 1989. V. 20. № 1. P. 69—80.
35. Bayer E., Jung G., Halasz J., Sebastian I.//Tetrahedron Lett. 1970. № 51. P. 4503—4505.
36. Rodionov I. L., Baru M. B., Ivanov V. T.//Peptide Res. 1992. V. 5. № 2. P. 119—125.
37. Rodionov I. L., Baru M. B., Ivanov V. T.//Reactive Polymers. 1992. V. 16. № 3. P. 311—319.
38. Baru M. B., Ivanov V. T., Rodionov I. L.//Peptides, 1990. Proc. of the 21st European Peptide Symp./Eds E. Giralt, D. Andreu. Leiden: ESCOM, 1991. P. 198—199.
39. Morawetz H.//Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proc. of the 4th American Peptide Symp./Eds R. Walter, J. Meienhofer. Ann. Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, 1975. P. 385—394.
40. Morawetz H.//Science. 1979. V. 203. № 4379. P. 405—410.
41. Morawetz H.//Science. 1988. V. 240. № 4849. P. 172—176.
42. Semisotnov G. V., Zikherman K. Kh., Kasatkin S. B., Ptitsyn O. B., Anufrieva E. V.//Biopolymers. 1981. V. 20. № 11. P. 2287—2309.
43. Grandas A., Jorba X., Giralt E., Pedroso E.//Int. J. Peptide and Protein Res. 1989. V. 33. № 5. P. 386—390.

Поступила в редакцию
12.X.1993

V. N. Medvedkin, E. A. Permyakov*, V. N. Uversky,
A. F. Gripas', Yu. V. Mitin

A QUARTZ REACTOR-QUVETTE FOR FLUORESCENT MONITORING
OF THE SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow
Region;*

** Institute of Theoretical and Applied Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region*

Key words: peptide synthesis, fluorescence monitoring.

The quartz reactor-quivette for fluorescent monitoring of the solid phase peptide synthesis consists of a 10 mm diameter quartz tube jacketed in a 14×14 mm orthogonal holder and equipped with chemically inert adapters. This allows to use the reactor with almost any standard fluorimeter. Details of the construction are presented. Fluorescence spectra of Fmoc-group, both in solution and on the solid support, are given; effects of concentration quenching of the fluorescence are studied.