

СОЗДАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ЗОНДОВ ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ МАСШТАБЕ ВРЕМЕНИ

В.П. Гудов*, соискатель, В.Г. Лунин**, заведующий лабораторией,

В.И. Швец*, заведующий кафедрой

* кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

** НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи

РАМН

e-mail: goodofferman@gmail.com

Осуществлен синтез библиотеки сорбентов с различными якорными группами на основе флуоресцентных красителей ксантенового ряда. Полученные модифицированные сорбенты могут быть использованы для синтеза зондов для полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном масштабе времени (ПЦР-РВ), флуоресцентные красители, зонды для ПЦР-РВ.

Введение

Сорбенты с привитой фазой широко используются для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и зондов для полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени (ПЦР-РВ) [1, 2]. Метод ПЦР-РВ стал в настоящее время признанным стандартом при исследовании ДНК и РНК. Он позволяет определять кинетические параметры реакции и на основе полученной информации судить о наличии и исходном количестве ДНК-мишени в образце. Кроме того, метод ПЦР-РВ дает возможность определять известные мутации в последовательности ДНК и их процентное содержание [3, 4]. Важными достоинствами метода являются отсутствие необходимости в постреакционных манипуляциях с образцами и, как следствие, снижение риска контаминации, сокращение времени анализа и упрощение организации ПЦР-лаборатории.

Зонд для ПЦР-РВ является важным компонентом реакционной смеси. Он представляет собой олигонуклеотид, к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Последовательность зонда подбирается таким образом, чтобы он отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами. Для создания зондов, необходимых для решения широкого круга задач современной биотехнологии, необходимо создание библиотеки сорбентов с различными иммобилизованными якорными группами на основе флуоресцентных красителей. В этой работе была создана такая библиотека с использованием сукцинимидных эфиров флуоресцентных

красителей ксантенового ряда.

Результаты и обсуждение

Целью настоящей работы явилось решение задач, связанных с созданием отечественной методической и материальной базы, необходимой для синтеза флуоресцентных зондов для ПЦР в реальном масштабе времени. Особое внимание в данной работе было уделено поиску воспроизводимой схемы синтеза для организации поточного производства необходимых предшественников для синтеза зондов ПЦР-РВ.

Мы предлагаем удобные схемы создания сорбентов для твердофазного синтеза с иммобилизованными в качестве якорных групп флуоресцентными красителями. Это позволит синтезировать флуоресцентные зонды ПЦР-РВ, используя автоматические синтезаторы нуклеиновых кислот отечественного и импортного производства. Для введения флуоресцентной метки Модифицированные сорбенты на основе стеклянных микросфер с контролируемым размером пор (CPG) позволяют вводить по 3'-концу растущей цепи зонда или праймера различные флуорофоры (рис. 1, схема 1). Особое внимание в работе было уделено совершенствованию технологии очистки активных промежуточных соединений, необходимых для модификации твердой фазы, методом проточной эффективной жидкостной хроматографии среднего давления (FPLC, диапазон давления 2-5 МПа). Полученные сорбенты были охарактеризованы по параметру загрузки функциональных якорных групп, выражавшейся в количестве иммобилизованного компонента на единицу веса сорбента (мкмоль/г).

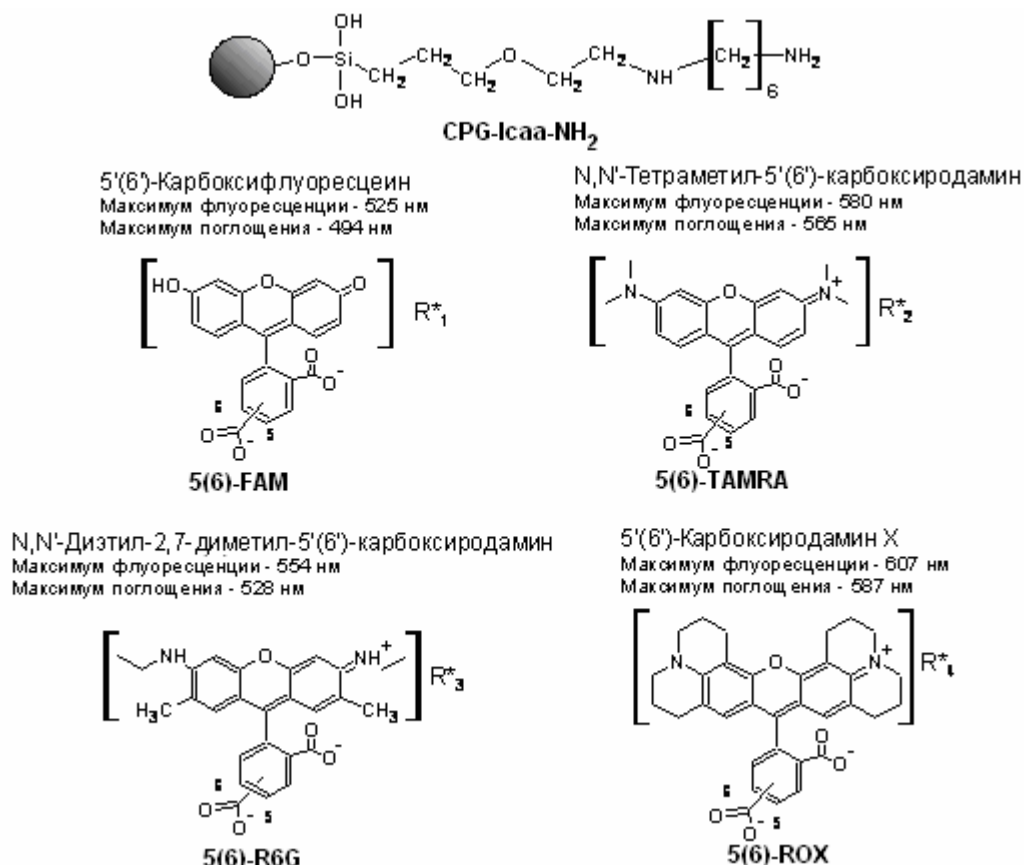


Рис. 1. Сорбент (стеклянные микросферы с контролируемым размером пор (CPG) с привитой фазой – длинноцепочечным амином (Icaa)) и флуоресцентные красители, использовавшиеся в работе.

На первом этапе работы нами были синтезированы сукцинимидные эфиры флуоресцентных красителей **IIa–г** и **IIIa–г** (схема 1). Активированные производные красителей были получены в одну стадию с промежуточной карбодиимидной активацией карбоксильной группы в 5-м и 6-м положении в изомерной смеси. В качестве карбодиимидной компоненты нами был выбран водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (EDAC). Реакцию проводили при комнатной температуре. Полученные сукцинимидные эфиры были очищены и разделены на отдельные изомеры методом FPLC. С целью предотвращения гидролиза сукцинимидных эфиров на силикагеле в ходе хроматографии силикагель предварительно был прогрет до 160°C для удаления остаточной влаги. В качестве элюентов были использованы абсолютизированные апротонные растворители (ацетон, толуол, ацетонитрил). Использование в составе элюента спирта недопустимо из-за переэтерификации, которая может происходить на хроматографической колонке.

Проблема изомерной чистоты ксантеновых флуорофоров, применяемых для мечен

яется как отдельный вопрос в рамках биохимических исследований [6, 7]. Для работы с флуоресцентно-мечеными зондами, олигонуклеотидами, амплифицированной ДНК применяют электрофоретические методы анализа. Однако в нашем случае в геле исследуемые молекулы, полученные с использованием смеси 5- и 6-карбоксиизомеров флуорофоров, имеют различную электрофоретическую подвижность, что приводит к недостоверности и невоспроизводимости результатов исследования, поэтому для работы необходим один изомер [8, 9]. В дальнейшей работе нами были использованы 5-карбоксиизомеры флуоресцентных красителей **IIIa–г**.

Затем нами были получены производные флуоресцентных красителей с линкером – 1-(3-аминопропил)-солкеталем, который очень быстро реагирует с сукцинимидными эфирами флуорофоров с образованием соответствующих амидов **IVa–г**. Очистку продуктов реакции вели методом колоночной хроматографии при атмосферном давлении.

Полученные амиды подвергали гидролизу в 80% уксусной кислоте с целью снятия изопропилиденовой защиты и получения двух гидроксильных функциональных групп (соединения **Va–г**).

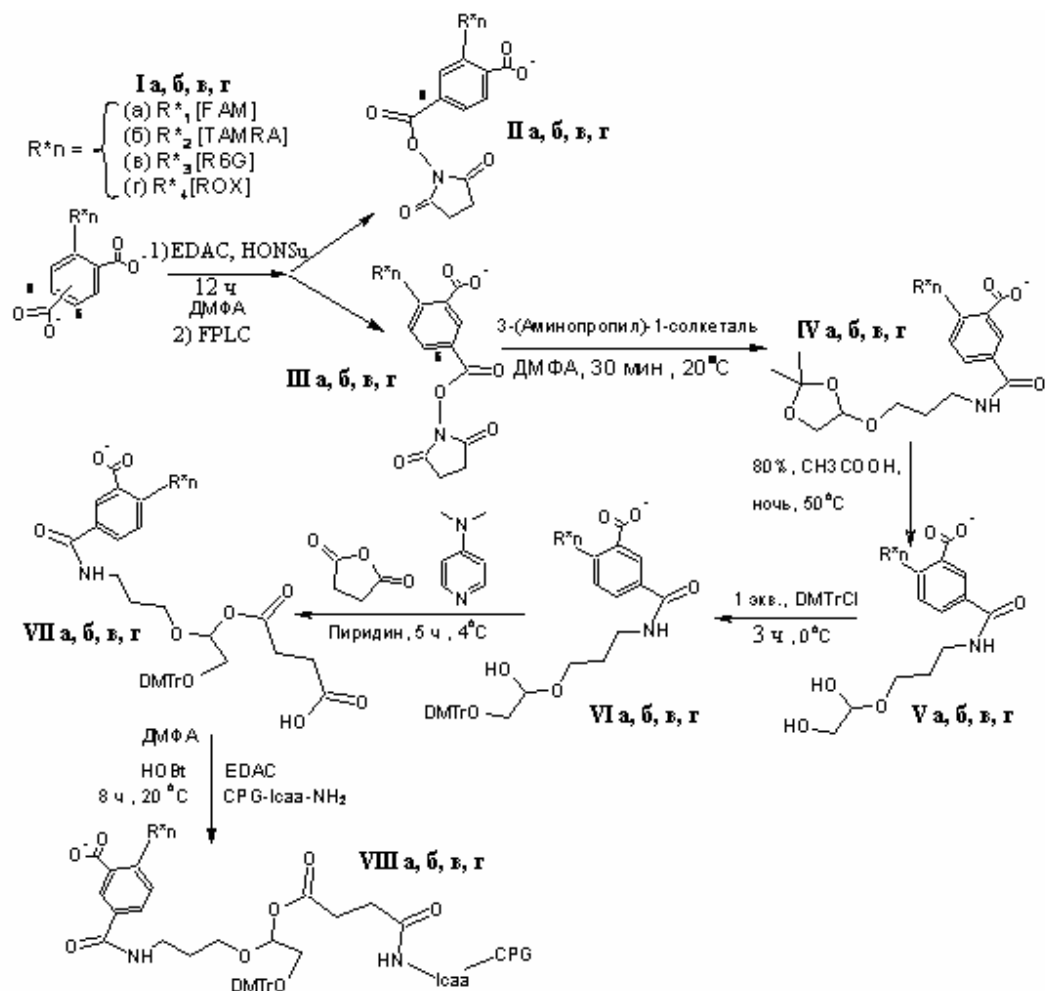


Схема 1. Схема создания модифицированных сорбентов для синтеза зондов ПЦР-РВ.

Первичную спиртовую группу блокировали тритильной защитой с помощью 4,4'-диметокситритилхлорида в пиридине (соединения **VIa–г**). Тритилированные амиды флуорофоров были очищены хроматографией на колонке под атмосферным давлением. Для функционализации оставшейся вторичной гидроксильной группы мы использовали янтарный ангидрид в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP). Полученные карбоксилированные соединения **VIIa–г** были иммобилизованы на аминомодифицированном CPG за счет образования амидной связи карбодиимидным методом с добавками. В качестве активатора карбоксильной группы нами был использован EDAC, а в качестве добавки – N-гидроксисбензотриазол (HOBT) для уменьшения O → N-ацильной миграции [10], что способствовало увеличению плотности загрузки (табл. 1).

Для иммобилизации на аминомодифицированном CPG, карбоксилированные флуорофоры инкубируют при помешивании в абсолютном диметилформамиде [11]. На данной стадии необходимо избегать контактного перемешивания для предупреждения физичес-

кого истирания твердой стеклянной фазы, с этой целью мы использовали возможность перемешивания колбы с суспензией на роторном испарителе.

Таблица 1. Плотность иммобилизации якорных групп, имеющих в составе флуорофор, на CPG-сорбент.

Модифицированный CPG	Величина загрузки (мкмоль/г)
VIIIa	135
VIIIб	141
VIIIв	120
VIIIг	131

Следует отметить возможность использования фосфорамидитов флуоресцентных красителей для иммобилизации на CPG, но в этом случае сорбент будет модифицирован свободной гидроксильной группой, таким образом, открывается химический алгоритм, позволяющий получать модифицированные сорбенты с другой основой, такие как сефадекс, сефароза, целлюлоза, модифицированный полистирол [12].

Индивидуальность и структура соединений были подтверждены данными ТСХ,

ВЭЖХ, а также ^1H -ЯМР-спектроскопии. Метод двумерного ^1H -ЯМР позволил различить между собой 5- и 6-карбокси-изомеры сукцинимидных эфиров ксантеновых флуорофоров [13]. Для определения чистоты полученных соединений был применен метод ВЭЖХ. Выход сукцинимидных эфиров каждого изомера флуорофоров оценивался согласно предварительному ВЭЖХ-анализу исходной смеси флуоресцентных красителей, который давал в распоряжение сведения о количественном соотношении изомеров.

Экспериментальная часть

В работе использовали $\text{N,N}'$ -диметилформамид (ДМФА), гидрид кальция, оксид фосфора (V), ацетонитрил, пиридин, толуол, хлороформ, ацетон, диэтиловый эфир, этилацетат и др. органические растворители отечественного производства; 4-диметиламинопиридин (DMAP), триэтиламин (Fluka), метанол (Panreac), янтарный ангидрид (Aldrich), EDAC, N -гидроксисукцинимид (HONSu), N -гидроксibenзотриазол (Lancaster), 1-(3-аминопропил)-солкеталь («Baggy», Англия), флуоресцентные красители 5(6)-FAM, 5(6)-TAMRA, 5(6)-ROX, 5(6)-R6G (ЗАО «Синтол», Россия). Хлороформ и хлористый метилен перед использованием перегоняли над пятиокисью фосфора; триэтиламин и диметилформамид – над гидридом кальция [14].

Спектры ^1H -ЯМР получали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц, измерения проводили по шкале δ , внутренний стандарт Me_4Si , растворитель $\text{DMSO}-d_6$. Для упаривания водных и органических растворов использовали ротаторные испарители Heidolph Laborotta 4000 (Германия) и Bushi Rotavapor R-200 (Швейцария). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F_{254} , DC-Alufolien (Merck, Германия). ВЭЖХ-анализ соединений осуществляли на приборе Gilson 250 (Франция), используя колонку 1X30, RP18 (Elsico, Россия). Хроматографическую очистку соединений проводили на открытых колонках с силикагелем G60 (Sigma) и в специальной системе проточной эффективной жидкостной хроматографии среднего давления FPLC «Pharmacia» (Швеция) с силикагелем Silica gel 40 (диапазон размера частиц 25–40 мкм, Merck). Системы элюирования: градиент метанола в хлороформе 0–5%, триэтиламин 2% (А), градиент ацетона в толуоле 0–60% (В), градиент ацетонитрила в ацетоне 0–50% (С), хлороформ–метанол, 4 : 1 (D).

Иммобилизацию карбоксифункционированных производных флуоресцентных красителей проводили, используя стандарт-

ную методику [15]. Степень загрузки сорбента якорными группами оценивали по выходу синтезированных на их основе флуоресцентно-меченых праймеров [16].

Сукцинимидный эфир 5'-карбокси-флуоресцеина (Ша). К раствору 0.5 г (1.32 ммоль) 5(6)-FAM и 212 мг (1.85 ммоль) HONSu в 10 мл абс. ДМФА в три приема добавляли 870 мг (1.58 ммоль) EDAC, перемешивали при комнатной температуре в течение 12–14 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе D. Реакционную смесь отфильтровали, фильтрат упаривали в вакууме масляного насоса (0.4 мм рт.ст.), остаток переносили на силикагель и очищали с помощью хроматографии среднего давления (FPLC) в системе В. Выход **Ша** 212 мг (46%), чистота 99%, изомерная чистота 99% (5-изомер). R_f 0.45 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 2.93 (s, 4H), 6.50–6.60 (m, 2H), 6.66–6.75 (m, 4H), 7.56 (d, 1H, $J = 8.14$ Гц), 8.43 (d, 1H, $J = 8.07$ Гц), 8.54 (s, 1H), 10.18 (s, 2H).

Сукцинимидный эфир $\text{N,N}'$ -тетраметил-5'-карбоксиродамина (Шб) получали аналогично **Ша** исходя из 326 мг (0.758 ммоль) 5(6)-TAMRA, 104.3 мг (0.909 ммоль) HONSu и 104.6 мг (0.909 ммоль) EDAC. Остаток, полученный после очистки с помощью FPLC, растворили в минимальном количестве ацетона и продукт осаждали 10-кратным количеством гексана. Выход **Шб** 136 мг (53%), чистота 98%, изомерная чистота 99% (5-изомер) R_f 0.56 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 2.99 (m, 4H), 3.0 (s, 6H), 3.54 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 6.15–6.28 (m, 4H), 6.85–6.96 (m, 4H), 7.41 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.35 (d, 1H, $J = 1.9$ Гц), 8.66 (d, 1H, $J = 8.15$ Гц), 12.30 (s, 1H).

Сукцинимидный эфир $\text{N,N}'$ -диэтил-2,7-диметил-5'-карбоксиродамина (Шв) получали аналогично **Ша** исходя из 0.2 г (0.912 ммоль) 5(6)-R6G, 150 мг (1.3 ммоль) HONSu и 200 мг (1.07 ммоль) EDAC. Остаток, полученный после очистки с помощью FPLC, растворили в минимальном количестве ацетона и продукт осаждали 10-кратным количеством гексана. Выход **Шв** 149 мг (49%), чистота 97%, изомерная чистота 99% (5-изомер). R_f 0.50 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.23 (m, 3H), 1.37 (m, 3H), 2.15 (d, 2H), 2.41 (d, 2H), 2.88 (s, 4H), 3.21–3.42 (d, 4H), 6.03 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.287 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 8.23 (s, 1H, $J = 8.25$ Гц), 8.59 (s, 1H, $J = 8.55$ Гц), 8.82 (m, 3H).

Сукцинимидный эфир 5'-карбоксиродамина X (Шг) получали аналогично **Ша** исходя из 200 мг (0.320 ммоль) 5(6)-ROX, 62 мг (0.524 ммоль) HONSu и 80 мг (0.412

ммоль) EDAC. Выход **IIIг** 112 мг, (61%), чистота 97%, изомерная чистота 99% (5-изомер). R_f 0.56 (C). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.66–1.97 (m, 8H), 2.86–3.00 (m, 4H), 3.86–3.09 (m, 4H), 5.99 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.32 (d, 1H, J = 8.25 Гц), 8.66 (d, 1H, J = 8.6 Гц), 12.30 (s, 1H).

3-(3'-О-Диметокситритил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид 5'-карбоксифлуоресцеина (VIa). К раствору 0.165 г (0.511 ммоль) сукцинимидного эфира 5-FAM **IIIa** в 20 мл абс. ДМФА добавили 0.12 мл (d 1.03 г/мл, 0.58 ммоль) 1-(3-аминопропил)-солкетала, перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровали, фильтрат упарили в вакууме масляного насоса и без очистки использовали на следующей стадии.

Остаток **IVa** с предыдущей стадии растворили в 40 мл 80% уксусной кислоты и оставили на ночь при температуре 55°C, далее реакционную смесь упарили на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса и без очистки использовали на следующей стадии.

Остаток **Va** с предыдущей стадии растворили в 50 мл пиридина, добавили 420 мг (0.52 ммоль) 4,4'-диметокситритилхлорида, перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Очистку продукта вели с помощью колоночной хроматографии в системе А. Выход **VIa** 0.264 г (55% на три стадии). R_f = 0.65 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.84–1.89 (m, 2H), 3.22–3.25 (t, 2H), 3.41–3.72 (m, 4H), 3.79 (s, 6H), 4.43 (s, 6H), 5.19–5.27 (m, 2H), 6.01–6.04 (t, 1H), 6.33–6.89 (m, 6H), 7.7–7.85 (m, 4H), 7.83–7.89 (m, 6H).

3-(3'-О-Диметокситритил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид N,N'-тетраметил-5'-карбоксиродамина (VIб) получали аналогично **VIa** в три стадии исходя из 0.14 г (0.464 ммоль) сукцинимидного эфира 5-TAMRA **IIIб** и 0.1 мл (0.56 ммоль) 1-(3-аминопропил)-солкетала. Выход **VIб** 0.21 г (55% на три стадии). R_f 0.67 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.85 (s, 2H), 2.29 (s, 6H), 3.00 (s, 6H), 3.22–3.25 (m, 2H), 3.36–3.46 (m, 2H), 3.62–3.72 (m, 2H), 3.78 (s, 6H), 5.03 (d, 1H), 5.28–5.31 (m, 1H), 6.32–6.35 (m, 1H), 6.84–7.36 (m, 19H), 7.62–8.28 (m, 3H).

3-(3'-О-Диметокситритил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид N,N'-диэтил-2,7-диметил-5'-карбоксиродамина (VIв) получали аналогично **VIa** в три стадии исходя из 100 мг (0.2 ммоль) сукцинимидного эфира 5-R6G **IIIв** и 0.046 мл (0.21 ммоль) 1-(3-аминопропил)-солкетала. Выход **VIв** 0.23 г (64% на три стадии). R_f 0.63 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.21–1.25 (t, 6H), 1.82–1.89 (q, 2H), 2.23 (s, 6H), 3.18–3.24 (q, 4H),

3.26 (s, 2H) 3.25–3.46 (m, 4H), 3.61–3.72 (m, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.79 (t, 6H), 3.8–3.83 (m, 1H), 5.02 (s, 4H), 6.37–6.38 (m, 2H), 6.88–6.92 (m, 4H), 7.02–7.06 (m, 4H), 7.23–7.30 (m, 7H), 7.55–7.58 (q, 1H), 7.84–7.86 (q, 1H, J = 8.06 Гц), 8.17–8.18 (q, 1H, J = 8.25 Гц)

3-(3'-О-Диметокситритил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид 5'-карбоксиродамина X (VIг) получали аналогично **VIa** в три стадии исходя из 0.14 г (0.464 ммоль) сукцинимидного эфира 5-ROX **IIIг** и 0.1 мл (0.56 ммоль) 1-(3-аминопропил)-солкетала. Выход **VIг** 0.28 г (62% на три стадии). R_f 0.57 (D). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.45–1.75 (m, 6H), 1.85 (s, 1H), 2.25–2.29 (m, 6H), 3.16–3.3 (m, 2H), 3.36–3.46 (m, 2H), 3.62–3.72 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 5.03 (d, 1H), 5.28–5.31 (m, 1H), 6.32–6.35 (m, 1H), 6.84–7.36 (m, 19H), 7.62–8.28 (m, 3H).

3-(3'-О-Диметокситритил-2'-О-сукцинил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид 5'-карбоксифлуоресцеина (VIIa). К раствору 120 мг (160 мкмоль) соединения **VIa** в 20 мл пиридина добавили 0.5 мл DMAP, охладили до –4°C (охлаждающая смесь льда с солью) и добавили 240 мкл (200 мкмоль) янтарного ангидрида. Через 5 ч к реакционной смеси добавили 200 мл насыщенного раствора карбоната натрия, продукт экстрагировали хлороформом (3 × 150 мл). Объединенный органический экстракт упаривали на роторном испарителе, остаток очищали адсорбционной колоночной хроматографии в системе А. Выход **VIIa** 125 мг (76%). R_f 0.35 (A). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.84–1.87 (t, 2H), 2.65–2.68 (q, 2H), 2.72–2.76 (q, 2H), 3.22–3.25 (t, 2H), 3.37–3.39 (m, 2H), 3.79 (s, 4H), 5.04 (m, 1H), 5.19 (d, 1H), 5.27 (d, 1H), 5.69 (s, 4H), 6.0–6.41 (m, 4H), 6.88–8.39 (m, 9H).

3-(3'-О-Диметокситритил-2'-О-сукцинил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид N,N'-тетраметил-5'-карбоксиродамина (VIIб) получали аналогично **VIIa** исходя из 120 мг (139 мкмоль) соединения **VIa** и 200 мкл (180 мкмоль) янтарного ангидрида. Выход **VIIб** 145 мг (75%). R_f 0.41 (A). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.82 (t, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.67–2.76 (m, 4H), 3.00 (s, 6H), 3.22–3.25 (q, 2H), 3.37–3.57 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 5.03 (t, 1H), 5.28–5.31 (m, 1H), 6.18–8.39 (m, 12H).

3-(3'-О-Диметокситритил-2'-О-сукцинил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид N,N'-диэтил-2,7-диметил-5'-карбоксиродамина (VIIв) получали аналогично **VIIa** исходя из 120 мг (134 мкмоль) соединения **VIв** и 180 мкл (150 мкмоль) янтарного ангидрида. Выход **VIIв** 139 мг (83%). R_f 0.49 (A). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.12 (t, 3H), 1.23 (t, 3H), 1.76 (t, 3H), 1.85 (m,

2H), 2.15 (s, 3H), 2.67–2.79 (m, 4H), 3.20 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.58 (m, 2H), 3.74 (s, 1H), 3.79 (s, 6H), 4.79 (d, 1H), 5.74 (m, 1H), 5.31 (s, 4H), 6.11 (d, 1H), 6.20 (s, 1H), 6.89–8.39 (m, 13H).

3-(3'-О-Диметокситритил-2'-О-сукцинил-(пропан-2',3'-диол))-пропиламид 5'-карбокси-родамина X (VIIг) получали аналогично **VIIa**

исходя из 120 мг (123 мкмоль) соединения **VIг** и 180 мкл (150 мкмоль) янтарного ангидрида. Выход **VIIг** 100 мг (70%). R_f 0.55 (А). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.48–1.71 (m, 4H), 1.84 (m, 2H), 2.10–2.59 (m, 10H), 2.66–2.76 (m, 4H), 3.22–3.25 (q, 2H), 3.39 (t, 2H), 3.72–3.75 (q, 2H), 3.79 (s, 6H), 4.22 (s, 1H), 5.04 (m, 1H), 6.07 (s, 1H), 6.88–8.39 (m, 9H).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Tyagi, S. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization / S. Tyagi, F.R. Kramer // *Nature Biotechnology*. – 1996. – Vol. 14. – P. 303–308.
2. Marras, A. E. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes / A.E. Marras, F.R. Kramer, S. Tyagi // *Nucl. Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 122.
3. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR / A.T. Yeung, B.P. Holloway, P.S. Adams, G.L. Shipley // *Biotechniques*. – 2004. – Vol. 36. – P. 266–275.
4. Lukhtanov, E. A. Fluorogenic DNA probes for multicolor hybridization assays / E.A. Lukhtanov, M. Metcalf, M.W. Reed // *Amer. Biotechnol. Lab.* – 2001. – September. – P. 68–69.
5. Эльдерфильд, Р. Гетероциклические соединения. Т. 2 / Р. Эльдерфильд. – М. : Изд-во иностр. лит., 1954. – 437 с.
6. Нурмухаметов, Р. И. Поглощение и люминесценция ароматических соединений / Р. И. Нурмухаметов. – М. : Химия, 1971. – 216 с.
7. Forster, T. Fluorescent energy transfer / T. Forster // *Ann Phys. (Leipzig)*. – 1948. – Vol. 2. – P. 55–75.
8. Berlman, B. Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules / B. Berlman. – N. Y. – London, Academic Press, 1965. – 258 p.
9. Chen, C. T. Fluorescent, sequence-selective peptide detection by synthetic small molecules / C. T. Chen, H. Wagner, W. C. Still // *Science*. – 1998. – Vol. 279. – P. 851–853.
10. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М. : Мир 1985. – 339 с.
11. Steven, A. K. Solid-phase synthesis: a practical guide / A. K. Steven, F. Albericio. – N.Y. : Marcel Dekker Inc. USA, 2000. – P. 475–529.
12. Bodanszky, M. Principles of peptide synthesis / M. Bodanszky. – N.Y. : Academic Press, 1979. – Vol. 1, 175 p.
13. Adamczyk, M. Preparation of succinimidyl and pentafluorophenyl active esters of 5- and 6-carboxyfluorescein / M. Adamczyk, R.J. Fishpugh, J.H. Kevin // *Bioconjugate Chem.* – 1997. – Vol. 8. – P. 253–255.
14. Титце, Л. Препаративная органическая химия. Пер. с нем. / Л. Титце, Т. Айхер. – М. : Мир, 1999. – 704 с.
15. Haughland, R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals / R. P. Haughland. – O.R. : Molecular Probes, Eugene, 1992. – 218 p.
16. Intramolecular dimers: a new strategy to fluorescence quenching in dual-labeled oligonucleotide probes / M.K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R.M. Cook // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124. – P. 6950–6956.