

使用 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计进行各向异性测量

实现准确测量的通用仪器

技术概述

作者

Fabian Zieschang 博士、
Katherine McNamara 和 Kevin Grant
安捷伦科技有限公司

前言

科学测量仅在能够准确记录样品特征的情况下才能发挥作用。为确保每个测量结果都具有代表性，谨慎的分析人员必须经常检查样品浓度或体积未在分析过程中发生改变，分析物浓度和信号强度之间的预期关系不存在偏差，以及样品未发生物理变化或光降解。而使用 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计进行荧光各向异性测量时，分析人员就无需担心这些复杂因素。这是因为荧光各向异性是一项功能强大的无损分析技术，可实现不受外部变量影响的稳定可靠测量。Cary Eclipse 荧光分光光度计是唯一一款能够可靠测量样品且不引起光降解的仪器。由于荧光各向异性的固有分析稳定性，此项技术现已成为几个重要应用领域中获得准确、精确而可重现数据的常用技术（表 1）。荧光各向异性测量已提高了准确度，显著推进了科学技术和重要应用的发展。使用 Cary Eclipse 进行荧光测量的优势为整个测量中不会破坏珍贵的样品。

技术概述

荧光各向异性测量采用全部对准到一个方向（偏振）的光波。当光击中样品后，将与样品分子发生相互作用并生成可测量的次级信号。如果使用偏振光分析样品且样品中的分子可自由移动或旋转，那么并非所有次级信号均会发生偏振。在各向异性分析中，我们准确测量与样品相互作用后的发射光的偏振度，这是获得样品特征的一种强大探测手段。各向异性测量还可提供关于分子的以下详细信息：体积和形状、是否可轻松移动、在化学过程中如何变化以及随时间或温度的变化情况。



Agilent Technologies

偏振器是一种光学器件，该器件仅允许一个方向的光通过，同时阻挡其他方向的所有光。在 Cary Eclipse 荧光分光光度计中，偏振器可放置于样品前后的光束路线中。然后，用户可使用 Agilent Cary WinFLR 软件记录每次偏振测量的结果，并在不同类型的偏振测量（各向异性、偏振或混合功能）之间切换。Cary WinFLR 软件可自动显示样品光谱和各向异性计算结果（如果适用）。Cary WinFLR 软件还可在实验进行过程中通过提供实时分步讲解自动指导用户进行每次各向异性测量。

表 1. 荧光各向异性的一些主要应用领域

领域	应用
聚合物科学	了解聚合物粘度 鉴定分子方向 表征相变温度和类型 液体和聚合物中的局部微粘度
生物系统	监测完全相同的分子之间的 FRET（同源 FRET） 研究酶反应 测定分子排列 估测膜的内部粘度 研究膜的流动性和渗透性
分子生物学	蛋白质的分子量和变性 实时研究蛋白质-蛋白质相互作用 研究蛋白质聚集和齐聚反应 测量蛋白质动力学 表征 DNA-蛋白质相互作用 研究 DNA/RNA 杂交 研究 DNA/RNA 结构 检测肌球蛋白的再取向 配体亲和性筛查 降解分析
免疫学	抗原-抗体相互作用 免疫筛查研究 受体-配体结合
学术	了解物质的基础物理性质 研究溶剂弛豫效应 分子链动力学 多组分测定 分子聚集
材料	定量分析纳米颗粒（量子点）和大分子的体积 光电材料中的能量传递 研究主-客体体系（胶束、多孔材料、金属有机框架） 金属-配体复合物的各向异性

加粗显示的应用中的样品可能具有光敏性，且在受到多种荧光分光光度计发出光的照射时可能会立即产生不可逆转的变化。Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计中的灯仅在采集数据点时闪烁。这项关键的技术优势避免了光降解并确保了用户可轻松对这些重要样品进行测量 [1]。

解析各向异性数据

样品的荧光各向异性主要由组成分子四处移动和改变方向的容易程度决定。如果与样品首次发生相互作用的所有光均偏振至一个方向，而 Cary Eclipse 荧光分光光度计记录到发射光受到较小偏振，那么我们就可以获得该样品的大量信息。通常样品粘度越大，分子越具有刚性且越倾向于保持原位。我们还知道较大的分子比小分子旋转得更慢。这些一般原理构成了各向异性测量的基础，使各向异性测量成为了各种生命科学应用中的常用工具，用于监测不同关键物质中的分子行为或该行为与温度或时间等因素之间的关系。

应用示例：明确表征溶于三种不同介质中的分子

热塑性聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 块中的分子被牢牢地固定住，基本处于“冻结”状态。这些分子的移动能力有限，因此具有较高的各向异性值（图 1）。在乙二醇等高粘性液体中，分子受到的约束力略有减弱，而在水等高流体介质中，分子具有较大的自由移动限度。

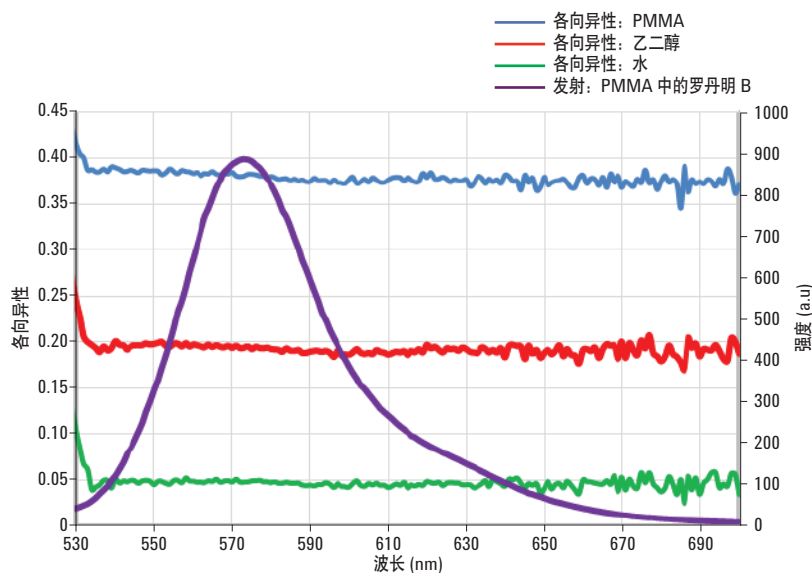


图 1. 溶于水（绿色线）、乙二醇（红色线）和热塑性 PMMA（蓝色线）中的罗丹明 B 的各向异性测量结果，其中各向异性计算结果的较大差异反映了这些介质具有较大的粘度差异。在水中，分子的运动没有受到抑制，因此各向异性值趋近于零，而 PMMA 块能牢牢约束分子，这种约束作用非常强，以至于 PMMA 样品中罗丹明 B 计算所得的较高各向异性值接近理论最大值 [2]。乙二醇中罗丹明 B 的各向异性恰好介于水和 PMMA 的计算值之间。这反映了乙二醇的粘度比水高，但与 PMMA 相比具有更大的流动性。紫色线显示了使用 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计测得的 PMMA 中罗丹明 B 的发射光谱，仪器采用垂直偏振光设置并在发射光束处放置垂直偏振器

应用示例：准确表征分子结构

在具有一定温度变化的实验中对化合物含量进行定量测定是一个困难的任务。因为温度变化可导致样品浓度发生变化，从而影响样品信号。荧光各向异性是一项可靠技术，可消除物理环境的复杂影响，因为它只提供关于目标样品分子的信息。因此可将温度影响与样品化学性质的变化分隔开来（图 2）。

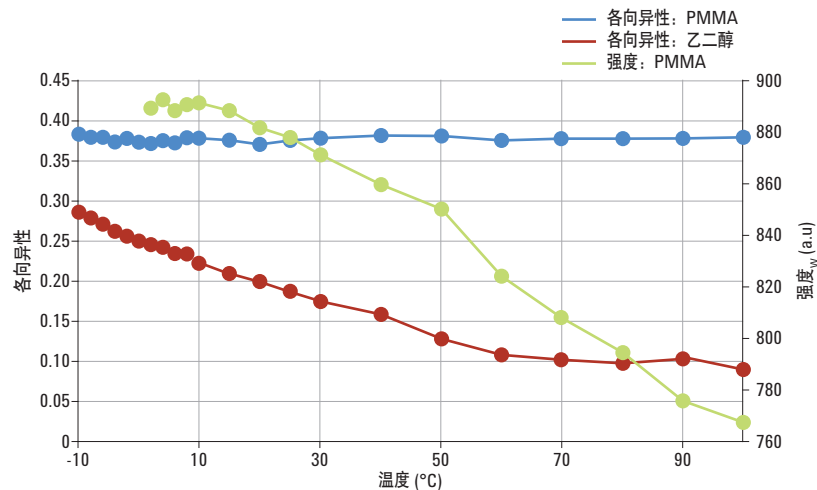


图 2. 溶于乙二醇和热塑性 PMMA 块的罗丹明 B 在不同温度下的各向异性测量结果。绿色线以温度函数的方式显示了温度对罗丹明 B 信号绝对强度的影响。该信号表明与分子行为相关的不同因素之间随温度变化发生了复杂的相互作用，如果不进行正确解析，这一结果可能会被轻率地看作罗丹明 B 的浓度随温度的升高而降低，或也可能看作罗丹明 B 的结构随温度改变而发生显著变化。而蓝色线则展示了在相同温度范围内进行的各向异性测量结果。结果显示荧光强度未对各向异性产生影响，且 PMMA 块的结构也不受温度影响。图中数据表明热塑性聚合物块在 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度范围内可对罗丹明 B 分子进行充分约束，而乙二醇并非如此。各向异性实验结果（红色线）表明乙二醇结构随温度变化，当温度升高时，罗丹明 B 分子将具有更大的运动自由度（各向异性降低）

Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计的优势：光敏样品的准确各向异性测量

您只需观察任意产品在阳光下暴露一段时间的情况，就可发现光能够轻松降解多种有机和无机化合物。这一常见现象也是实验室中非常关注的现象，荧光分光光度计可在每次测量过程中逐渐降解样品。更关键的是，许多通过荧光各向异性测量的高灵敏度得到良好分析的物质（表 1）可能会易于受到光致漂白作用的影响。本质上，样品与光束的相互作用可能导致样品的结构和组成发生改变，从而使分析的准确性受到质疑。这可能会令人懊恼，因为数据的完整性受到表征用仪器带来的威胁，而更令人懊恼的是这个问题本可以轻松避免。Cary Eclipse 荧光分光光度计的独特光学配置为您带来了巨大的分析优势。Eclipse 中的光源仅在采集数据点时打开（该光源每秒闪烁 80 次），且由于该光源在两次闪烁间完全关闭，因此可能造成光化学破坏的光能不会与样品发生相互作用。事实证明这一高速过程可避免光降解 [1] 并确保用户可从多种重要的光敏化学和生物样品中采集到真实而有意义的数​​据，同时不影响准确度和重现性。

结论

本研究中的示例证实了荧光各向异性测量是一款强大的工具，可用于收集各种样品类型的重要分子信息。荧光各向异性能够准确而快速地反映并分析材料的分子环境，且不受干扰影响，这点与许多类似分析技术不同。文中已展示 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计可轻松用于阐述三种常见介质中分子特性的差异。

参考文献

1. Gavin, P.; Prescott, M.; Fyfe, D. J.; Comerford, J. J. Minimizing photobleaching of Blue Fluorescent Protein (BFP) using the Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer（使用 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计最大程度减小蓝色荧光蛋白 (BFP) 的光致漂白），*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5990-7791EN (2011)
2. Lakowicz, J. R. Ch. 10: Fluorescence Anisotropy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edn. Springer Science + Business Media, LLC, New York (2006)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 1 月 7 日，中国出版

5991-6475CHCN



Agilent Technologies