

# 使用 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计进行时间分辨测量

可实现准确测量的多功能仪器

## 技术概述

### 作者

Fabian Zieschang 博士、  
Katherine MacNamara、  
Jeff Comerford 和  
Kevin Grant  
安捷伦科技公司

### 前言

时间分辨荧光技术是常用于标记和追踪关键生物分子的重要分析技术。荧光标记技术检测随时间变化的荧光信号响应，因此安全性显著高于放射性标记技术，而且荧光测量固有的分子选择性和分析灵敏度都很高，利用此优势，我们可以更深入地理解样品的化学性质和分子环境。

时间分辨荧光测量的一个重要优势是该技术借助可靠的机制解决了背景荧光（来自细胞或介质的自体荧光）这个常见问题，这些背景荧光可使这类分析复杂化、干扰常用探针（例如荧光素和罗丹明）的稳态发射，同时也是高背景信号的主要来源（这会削弱测量效果）。鉴于该技术提升测量能力的巨大潜能，我们不难理解为何（时间分辨荧光技术中所用的）镧系元素络合物被广泛用于各种生命科学应用，例如免疫分析、受体-配体结合分析、蛋白质-蛋白质结合分析、细胞因子分析、粘附细胞分析、酶分析、DNA 杂交分析和细胞毒性分析。



Agilent Technologies

## 长寿命发射测量的概念

时间分辨分析技术测量标记分子与入射光发生相互作用而产生的短时响应（这与仅记录荧光探针瞬时发射的稳态荧光分析相反）。Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计的闪烁式氙灯每秒开关（从完全发光到完全黑暗）80 次，这意味着使用 Cary Eclipse 进行每次测量时，闪烁式氙灯都将以 75 kW 以上的峰值功率发出短光脉冲来激发荧光标签，而且它的弧尺寸较小，因此可提供极亮光束（灯的亮度对于荧光测量而言极为重要，因为来自样品的信号与作用于样品的光量成正比，即照射到样品上的光越多，样品发射的光就越多）。Cary Eclipse 闪烁式氙灯的高脉冲频率和短衰减时间使其能够执行持续时间最短约 0.1 ms、最长可达无限长的时间分辨测量。使用 Cary Eclipse 检测样品的时间响应时，我们使用两种不同的采集模式。

- **荧光模式**：在照射瞬间记录稳态荧光发射信号
- **磷光模式**：在采集样品发射的光之前，软件将命令分光光度计等待用户定义的一段时间，时间长短通常根据灯的衰减时间来定义。该模式用于时间分辨“延迟”荧光测量，此类测量通常使用基于镧系元素的探针

使用 Cary Eclipse，我们能够轻松测量这些各不相同、但几乎同步产生的荧光响应，而且测量过程不需要任何用户干预。如下所示，所有测量仅通过几个简单的步骤即可编程到软件中，然后自动运行。

图 1 显示了荧光激发信号强度随时间衰减的典型曲线，以及荧光和磷光测量之间相对差异的示意图。

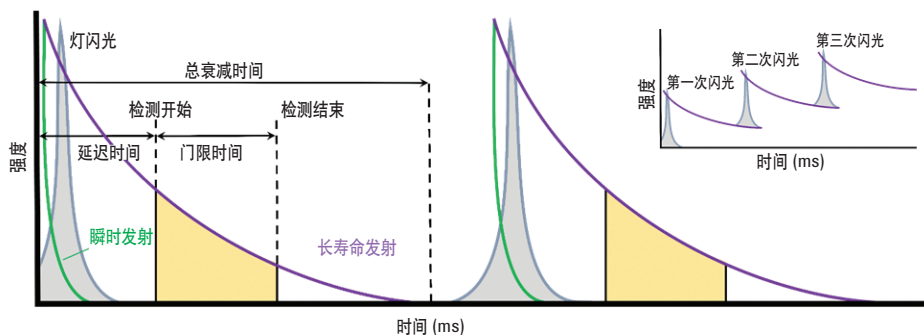


图 1. 荧光（绿线）和磷光（紫线）测量的典型响应曲线。瞬时发射是指稳态荧光。长寿命发射是指磷光（或延迟荧光）响应。延迟时间是指闪烁式氙灯开始发射脉冲与数据采集开始之间间隔的时间长度（您可轻松优化该参数以去除任何来自短寿命背景荧光的信号和任何散射作用产生的信号）。门限时间是指检测器采集来自发射物的光的时间长度（门限时间越长，采集到的光就越多，信号强度也就更大）。总衰减时间是指磷光响应的持续时间。一般而言，实验设置需确保氙灯闪光和新的测量在总衰减时间结束之后开始。时间依赖性分析的主要特性就是该分析允许用户通过连续累加测量来提高灵敏度（插图）

## Agilent Cary Eclipse 适用于时间分辨测量的关键属性

- Agilent Cary Eclipse 避免了光降解，并且对任何生物样品而言都非常安全
- 闪烁式氙灯的高频率 (80 Hz) 优势使其非常适合用于稳态动力学和时间分辨实验
- 通过单次测量即可一并测量同一样品的瞬时发射（纳秒级时间范围内的荧光发射）和磷光发射（毫秒级时间范围）信号
- 用户可直接应用磷光模式，无需价格昂贵的其他附件
- 闪烁式氙灯技术可确保氙灯每次发射强脉冲之后都能恢复完全的黑暗状态。这种极其精准且绝对可重现的定时方案对于实施准确的时间分辨测量而言至关重要

## 镧系元素络合物的长寿命发射

生命科学领域的许多时间分辨荧光测量都采用具有独特化学性质的镧系元素络合物标签。在生命科学应用中尤其受关注的一种镧系元素是铕 ( $\text{Eu}^{3+}$ )。  $\text{Eu}^{3+}$  标签的衰减时间相对更长（平均总衰减时间约为  $10^{-5} - 10^{-3}$  秒，而许多传统荧光分子的衰减时间仅为  $10^{-9}$  秒），而且其吸收光和发射光之间的波数差距也更大。由于铕的激发光谱和发射光谱之间存在巨大差别，我们可以通过完美配置仪器达到极低的检测限，在消除所有背景发射（见下文）干扰的情况下，还能实现惊人的灵敏度提升。

$\text{Eu}^{3+}$  本身的吸光能力非常弱，但与某些有机配体结合之后，可形成具有极强吸光能力和极高发射性的络合物。特别值得关注的是，虽然  $\text{Eu}^{3+}$  络合物的吸光特性主要取决于所连接的有机配体，但发射却是  $\text{Eu}^{3+}$  独有的特征。这确保了吸收谱带和发射谱带之间具有相对较大的差距（约 350 至 600 nm），这一特性能够消除激发光干扰。下一节将简要介绍获得可测信号的步骤。

## 获得镧系元素络合物的可测荧光响应

在大多数时间分辨发射分析中，分析人员会将含有  $\text{Eu}^{3+}$  标记物质的溶液与目标生物分子（通常只有很弱的荧光或完全没有荧光）混合。反应一段时间后，去除未反应的  $\text{Eu}^{3+}$ ，仅保留与生物分子结合的  $\text{Eu}^{3+}$  标签。在该阶段，结合了  $\text{Eu}^{3+}$  的目标分子与其原始状态相比，荧光特性可能并没有增加多少，我们需要从各种不同的可用配体溶液中选择一种，将其转换成高发射性且易于检测的络合物。快速简单的反应步骤之后，络合物即制备完成，接下来便可采用独有高灵敏度和低背景荧光特性的时间分辨荧光分析技术进行测量。

## 应用实例：使用 Agilent Cary Eclipse 采集时间分辨荧光光谱

在图 1 中，我们以图像形式展示了时间分辨实验的一些主要参数，并通过示意图展示了如何优化这些参数以最大程度改善测量效果。在下节中，我们将以一个实例说明如何通过优化参数从样品分析中获得最多的相关数据。

分子系统的组成是非常复杂的，我们测得的样品响应可能来自不同的分子。在按照前文所述的实验方案进行准备的时间分辨实验中，与  $\text{Eu}^{3+}$  结合的目标分子将与配体溶液进行反应，以确保这些分子能够被仪器检测到。这种方法常见的副作用是所得光谱中可能存在多个来源的信号（图 2）。我们可利用这些信号来源的时间分辨特性，按组分对其进行分离。

### 延迟时间

延迟时间是指闪烁式氙灯开始发射脉冲与数据采集开始之间间隔的时间长度（图 1）。前文所述的一个简单实验研究了不同延迟时间对  $\text{Eu}^{3+}$  配体溶液的光谱产生的影响，在该实验中，我们采用固定的门限时间（图 1，将在下文详细说明）以及从  $0 \mu\text{s}$  递增至  $100 \mu\text{s}$  的延迟时间进行了一系列测量（图 3）。延迟时间为  $0 \mu\text{s}$  时，由背景荧光引起的大约位于  $450 \text{ nm}$  处的强峰非常明显（图 3 中的绿色光谱）。由于该背景荧光发射的时间范围非常短（纳秒级范围），因此随着延迟时间变长，其对光谱的贡献越来越低。而  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光发射时间远长于此（毫秒级），因此不受延迟时间变长的影响。通过适当调整延迟时间，仪器进行测量时可以仅采集这种短寿命背景信号消失之后发射的光，测得的信号将只对应于特定目标物质 ( $\text{Eu}^{3+}$ )。

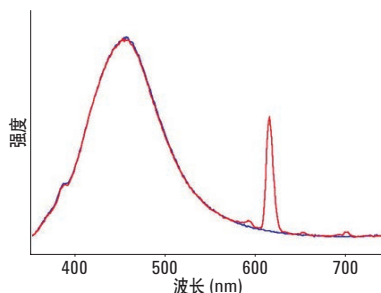


图 2. 溶液中的  $\text{Eu}^{3+}$  (红色) 和空白增强溶液 (蓝色) 的荧光光谱。约  $450 \text{ nm}$  左右的宽峰来自空白增强溶液的强背景发射， $615 \text{ nm}$  左右峰形尖锐的窄发射峰来自  $\text{Eu}^{3+}$  发射

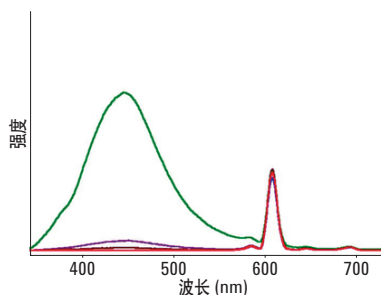


图 3. 延迟时间对  $\text{Eu}^{3+}$  配体溶液中采集到的信号的影响。随着门限时间从  $0 \mu\text{s}$  (绿线) 增加到  $100 \mu\text{s}$  (红线)，背景荧光峰 (约  $450 \text{ nm}$  处的谱带) 的强度显著降低

## 门限时间

门限时间是指探测器采集来自特定目标发射物的光的时间长度(图 1)。从本质上讲,门限时间越长,采集到的光就越多,信号强度也就更大。在研究不同门限时间对所得光谱的影响的简单实验中,我们采集了固定延迟时间(见上文)和不同门限时间条件下的光谱(图 4)。改变门限时间对瞬时(背景)荧光强度没有影响,但有助于最大程度增强长寿命(和目标)  $\text{Eu}^{3+}$  发射的强度(图 4)。

## 目标分子的时间分辨光谱

通过将 Cary Eclipse 设定为磷光模式,延迟时间设为 0 秒,并调整门限时间以最大程度采集  $\text{Eu}^{3+}$  发射的信号,可以准确捕获瞬时(荧光)发射(活跃于纳秒级时间范围内)信号和来自  $\text{Eu}^{3+}$  的目标发射(活跃于整个毫秒级时间范围内)信号。Cary Eclipse 能够通过单次测量一并采集来自同一样品的荧光和磷光光谱。在完全没有用户干预的情况下,仪器可以单独对适当目标分子的信号进行明确的定量、监测和记录。图 5 显示了以去除所有背景贡献为目的实验中采集得到的配体溶液中  $\text{Eu}^{3+}$  的时间分辨光谱。此技术的另一项优势是用户可定义探测器测量目标信号的时间。这能确保时间分辨分析具备必要的、特定于分子的定量和定性测量能力,以及这些关键实验的灵敏度可进行优化,以确保目标样品中的所有信息都能被提取出来。

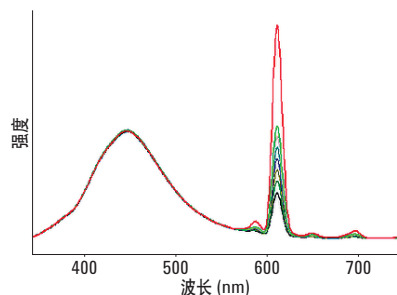


图 4. 门限时间对  $\text{Eu}^{3+}$  配体溶液中采集到的信号的影响。我们采用固定的延迟时间 ( $0 \mu\text{s}$ ) 以及从  $40 \mu\text{s}$  (紫线) 增加到  $200 \mu\text{s}$  (红线) 的不同门限时间条件采集了光谱。如文中所述,门限时间增加并未改变瞬时(背景)荧光的强度,但通过调整门限时间可最大程度增强长寿命  $\text{Eu}^{3+}$  发射

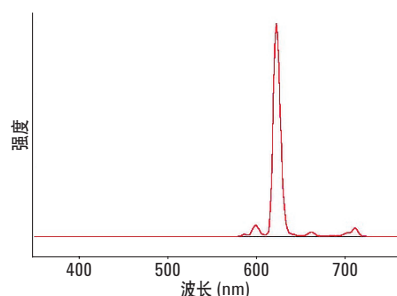


图 5. 配体溶液中  $\text{Eu}^{3+}$  的时间分辨发射光谱。采集光谱时采用了优化的时间分辨采集参数,因此消除了所有非目标来源的信号

## 应用实例：使用 Agilent Cary Eclipse 测量 PMMA 嵌段中铕 (Eu<sup>3+</sup>) 的衰减

铕的荧光响应随时间推移衰减。铕 (Eu<sup>3+</sup>) 和其他镧系金属独有的荧光特性在水性溶液和 PMMA 等固体基质中的衰减时间大约为 0.5–3 ms。Cary Eclipse 荧光分光光度计每 40 μs 即可采集一个数据点。这意味着 Cary Eclipse 在记录持续约 5 ms 的衰减反应时将记录 100 条衰减曲线进行平均，且每条曲线包含 100 个数据点，所有这些曲线在不到 1 秒的时间内即可显示在屏幕上。如果使用低于 40 μs 的门限时间，系统将会阶段性地采集衰减曲线。

图 6 显示了测量 PMMA 嵌段中 Eu<sup>3+</sup> 的荧光衰减曲线的两个实验的结果。我们分别采用 50 μs（左图）和 2 μs 的门限时间（右图）采集数据，在 2 ms 时间范围内采集 1000 个数据点所得的结果表明，Cary Eclipse 可采用极短的门限时间获得出色的信噪比 (S/N)。然后我们使用 50 μs 门限时间实验的数据计算了速率和寿命，结果列于表 2 中。

图 6 所示的数据表明，Cary Eclipse 能够以快于 PMMA 嵌段中 Eu<sup>3+</sup> 的衰减的速度，快速有效地采集数据。右图表明，衰减曲线还未达到与 x 轴平行的点（指示到达平衡状态的点）。这突出了 Cary Eclipse 能够可靠记录寿命极短和寿命长度无限的样品数据的能力。另外，值得注意的是，使用 Cary Eclipse 荧光分光光度计进行这些测量时，无需更换任何硬件组件即可完成所有测量。

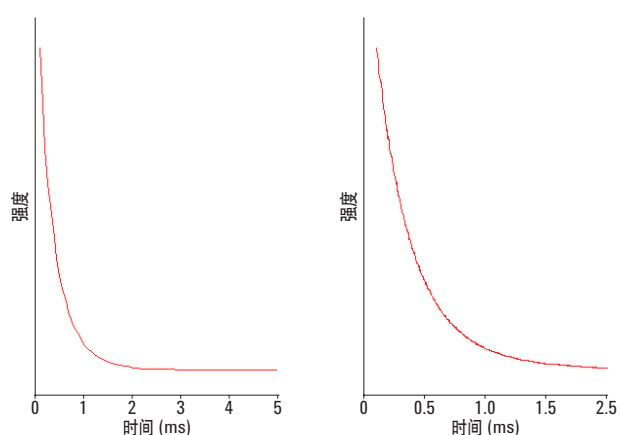


图 6. 分别使用 50 μs 门限时间（左图）和 2 μs 门限时间（右图）采集到的 Eu<sup>3+</sup> 时间分辨荧光衰减曲线。该例表明，Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计可在非常短的门限时间内获得出色的 S/N，它在 2 ms 内可采集 1000 个数据点

表 2. 使用在 50 μs 门限时间条件下采集的 Eu<sup>3+</sup> 时间分辨荧光衰减曲线计算所得的速率和寿命数据

### 速率计算

$$\text{公式: 强度} = A1 \times e^{(-k1 \times \text{时间})} + C$$

实验	开始 (ms)	结束 (ms)	k1 (ms <sup>-1</sup> )	A1	C	S.D.
	0.00	5.00	2.842 ± 0.0	457.0969 ± 4.6	0.9614 ± 0.4	1.6199

### 寿命计算

$$\text{公式: 强度} = A1 \times e^{(-\text{时间} \times \text{TAU1})} + C$$

实验	开始 (ms)	结束 (ms)	TAU1 (ms)	A1	C	S.D.
	0.00	5.00	0.352 ± 0.0	457.0874 ± 4.6	0.9609 ± 0.4	1.6199

使用 WinFLR 中的寿命软件应用执行计算。



## 结论

由于通过磷光寿命测量方法采集的数据完全不受发射物质绝对浓度和发射光强度的影响，因此所得结果中包含关于该发射物质局部化学环境的丰富信息。这使得寿命测量成为了一种极具吸引力的技术，用户可利用该技术：

- 阐释混合物中发射物质的数量（例如检测标记药物所结合的受体数量）
- 进行镧系元素共振能量传递 (LRET) 研究
- 分析发射物质的尺寸和形状
- 研究分子间和分子内的相互作用以及结合效率
- 获得关于局部环境（粘度、极性和蛋白质构象）的信息
- 检测是否存在某些分析物（例如氧气、二氧化碳、农药或抗生素）

在检测时间延迟发射之后，我们可以通过样品的磷光寿命研究获得更深层次的信息。时间分辨延迟发射测量和磷光寿命检测确实是理想的互补技术，使用稳定可靠的 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计（该仪器已被证明不会使样品发生光降解，可确保从每个样品中获得的信息都正确无误）进行这些测量，您可以从珍贵的样品中尽可能多地获取真实的信息。

## 参考文献

1. Lakowicz, J. R. Ch. 3: Fluorescence Anisotropy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edn. Springer Science + Business Media, LLC, New York (2006).
2. Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.* **1988**, 21, 139-150

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cary-eclipse](http://www.agilent.com/chem/cary-eclipse)

查找当地的安捷伦客户中心：

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价：

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

**[www.agilent.com](http://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，2016

2016年3月3日，中国出版

5991-6524CHCN



**Agilent Technologies**