

使用停留附件研究荧光猝灭动力学

反应动力学研究是生物和化学研究中的一个重要课题。通过反应动力学研究，可以表征反应速率、反应级数和潜在的分子机制。对于表征反应动力学，使用吸收或者荧光光谱仪监控反应剂或产物的浓度随时间变化是一种有力的方法。对于缓慢的反应，反应剂可以简单地通过手动或者使用磁力搅拌子进行混合。然而，对于快速的反应，反应的时间和混合时间在尺度上可比时，需要使用更专业的技术如停留技术。



图 1 FLS1000 耦合停留附件

在停留附件中，反应剂可以被快速地压进样品池中快速混合，同时被监测到吸光度或者荧光强度随时间的变化。爱丁堡仪器提供可以用于 FLS1000 和 FS5 荧光光谱仪的停留附件，扩展了此系统测试快速反应动力学的能力。研究反应动力学典型的模型系统是 N-乙酰基-L-色氨酸胺（NATA）被 N-溴代琥珀酰亚胺（NBS）的荧光猝灭现象。NATA 被 NBS 氧化形成了不发荧光的溴醇，如图 2，反应动力学因此可以通过监控 NATA 荧光强度随时间的改变进行研究。通过进行 NBS 过量的反应，反应展现出与 NATA 浓度正相关的速率常数虚拟的一级动力学。在使用浓度下，使用人工混合监测时反应太快，因此使用停留附件进行验证性测试。

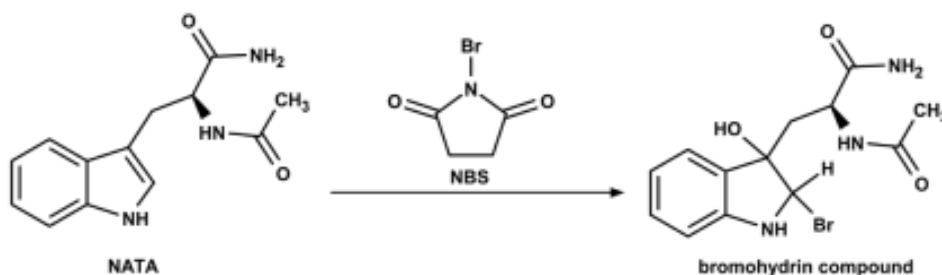


图 2 NATA 被 NBS 氧化

测试方法及试剂

N-乙酰基-L-色氨酸胺 (NATA) 和 N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 溶于 pH7.3 的 PBS 缓冲液中。准备 5 μ M、10 μ M 和 20 μ M 的 3 组 NATA 溶液。NBS 猝灭剂保持过量，浓度分别为 50 μ M、100 μ M 和 200 μ M。NATA 的吸收光谱使用 FS5 荧光光谱仪的透过检测器以 3 nm 激发带宽进行测试。荧光测试使用配备 PMT-980 光电倍增管检测器和 450 W 的双激发发射单色器的 FLS1000 光致发光光谱仪和 N-M04MM 停留附件进行。

NATA 的发射光谱使用激发波长 280nm、激发带宽 3 nm 和发射带宽 1.5 nm 进行测试。对于荧光动力学测试，NATA 和 NBS 溶液置于停留附件 A 和 B 注射器中。注射器 C 装满 PBS 缓冲液提供一个参考。使用 FLS1000 的 TTL 输出触发驱动停留附件注射，总的停留体积设置为 400 μ L。动力学光谱使用 5 nm 带宽的 280 nm 激发波长，5 nm 带宽的 360 nm 发射波长以及 0.2 ms 的时间分辨率进行测试。

结果讨论

NATA 溶液的吸收和发射光谱如图 3。NATA 在 280nm 处吸收最大，发射最大处接近 360nm，因此选择两者为激发发射波长作为后续荧光动力学测试。

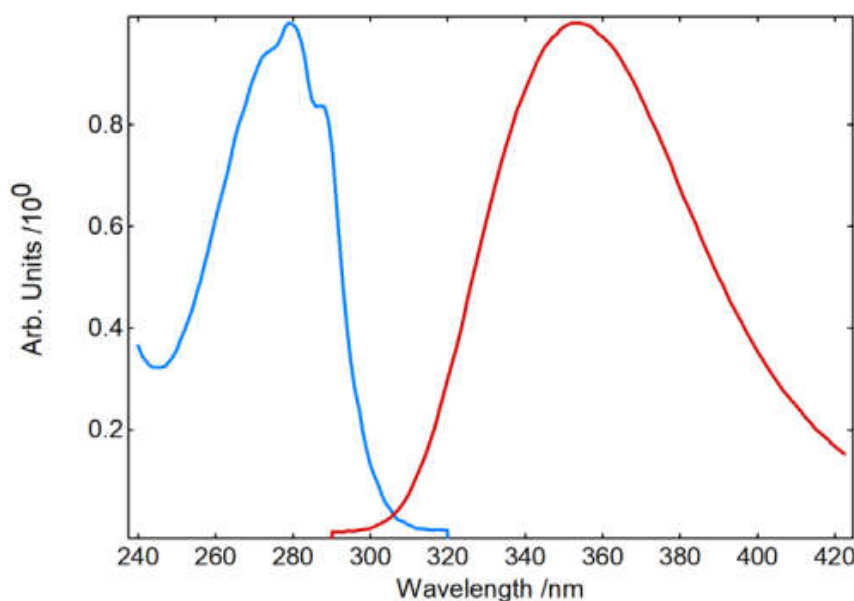


图 3 PBS 中 NATA 的吸收 (蓝色) 和发射 (红色) 光谱

10 μ M 的 NATA 被 100 μ M NBS 的荧光猝灭动力学如图 4 (红色)。荧光猝灭动力学使用 FLS1000 的 Fluoracle 操作软件进行分析。数据使用单指数衰减可以较好拟合，时间常数为 28 ms。

荧光动力学使用 0.2 ms 的高时间分辨进行测试，显著改善了记录动力学数据的质量，确保衰减拟合的准确性和速率常数的可靠性。FLS1000 提供了灵活的时间范围和分辨率用

于监测动力学；同时可以胜任分辨率小于 0.1 ms 快速衰减的测试以及持续几个小时的慢速动力学过程的监测。在 10 μ M NATA 和 PBS 缓冲液注入候后到的荧光动力学作为参比，如图蓝色。可以看到在 NBS 不存在时，荧光信号保持不变，表明 NATA 和 NBS 注入时的衰减是荧光猝灭，不是由溶液吸光度的改变或者系统的人为因素引起。红色衰减和蓝色基线在开始时荧光强度的不同是由于停留附件的死时间引起；溶剂混合和开始测试之间的时间。死时间可以使用指数拟合和基线相交进行计算，大约是 12 ms。

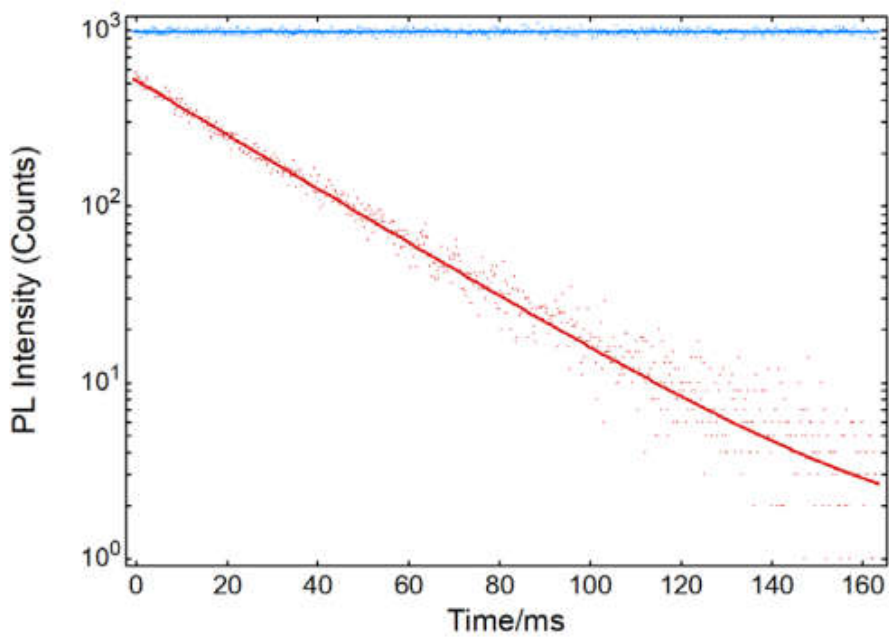


图 4 10 μ M NATA 和 100 μ M NBS 注射后荧光动力学（红色）和 10 μ M NATA 和 PBS 缓冲液注射后荧光动力学（蓝色）。每个动力学迹线（点）是五次连续注射和采集后的叠加。迹线是使用 Fluoracle 拟合进行单指数拟合（红色）和线性拟合（蓝色）

NATA 浓度对荧光猝灭速率的影响也进行了研究。测试 NATA 的 5 μ M、10 μ M 和 20 μ M 浓度依赖荧光猝灭动力学，使用 Fluoracle 进行单指数衰减拟合如图 5。随着 NATA 浓度的上升，衰减的时间常数下降，表明反应过程更快，正是预期的一级反应常数。一级反应速率的衰减时间常数可以被计算，如表 1。

Concentration of NATA (μ M)	Rate Constant (s^{-1})
5	14
10	36
20	67

表 1 不同 NATA 浓度下的一级速率常数

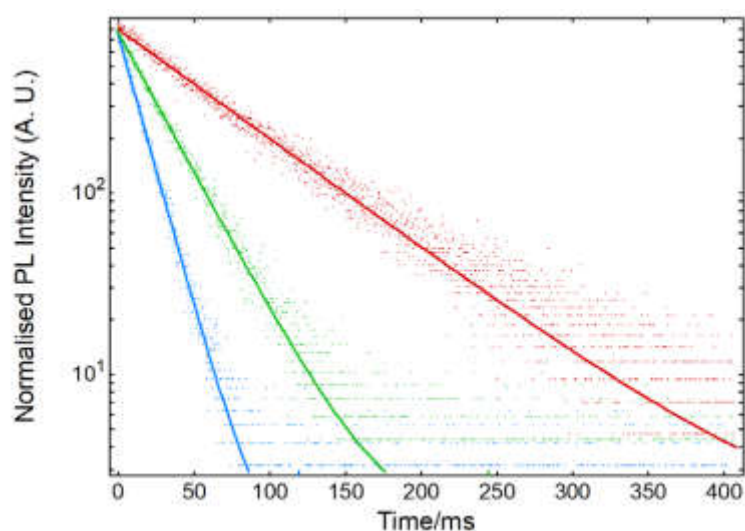


图 5 不同浓度下 NATA 被 NBS 淬灭的归一化荧光动力学。实心线是使用 Fluoracle 软件进行单指数拟合

总结

使用 FLS1000 搭载停留附件进行 NATA 和 NBS 的荧光猝灭动力学测试。荧光猝灭动力学使用 FLS1000 的全功能 Fluoracle 软件进行拟合，测得反应的一级速率常数。此应用文章论证了 FLS1000 耦合停留附件是一个用于测试快速反应动力学的有力工具。FLS1000 提供了灵活的时间尺度和分辨率测试动力学使它完美地满足分辨率小于 0.1 ms 快速衰减的测试以及持续几个小时的慢速动力学过程的监测。