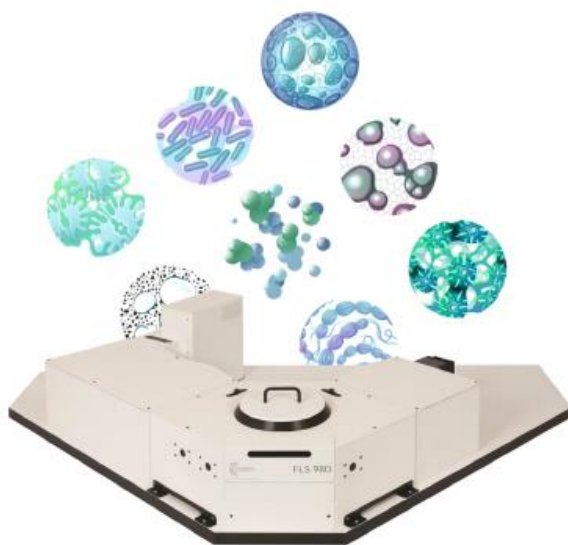


基于荧光各向异性的配体键合研究



荧光各向异性对于研究配体和蛋白质之间的键合作用是一个十分有用的工具，特别是当键合以后其他的荧光性质没有发生改变的时候。当一个小配体和大分子键合的时候，它在溶液中的运动会变慢，反映在荧光性质上就会导致荧光各向异性的变化。如果我们在竞争反应中使用一种荧光标记的配体作为探针，就可以研究没有被标记的化合物的解离常数。这种分析方法能提供十分有用的数据，不管配体的亲和力和是高还是低，如果仪器配置了滴定装置的话能实现自动化分析。

本篇应用文章对在竞争反应中无荧光标记的配体进行了研究，结果显示了一个从 *Shewanella Denitrificans* 中占据主导地位的 Kef 体系。

实验方法及材料

发射侧的偏振光谱使用 FLS980 稳态瞬态荧光光谱仪（激发和发射侧均为双光栅）获取。滨松 R928P 检测器，积分时间 0.2s。

为了进行各向异性的测量，需要用线性偏振光激发样品，线性偏振激发光通过位于激发光和样品仓之间的偏振片得到。在样品和检测器之间放置发射侧的偏振片来收集发射侧的偏振光。

天美(中国)科学仪器有限公司
北京市朝阳区天畅园7号楼(100107)

t 010-64010651
f 010-64060202
e techcomp@techcomp.cn
w www.techcomp.cn

荧光各向异性的计算公式如下：

$$r = \frac{G(\lambda_{em})I_{VV}(\lambda_{em}) - I_{VH}(\lambda_{em})}{G(\lambda_{em})(I_{VV}(\lambda_{em}) + 2I_{VH}(\lambda_{em}))}$$

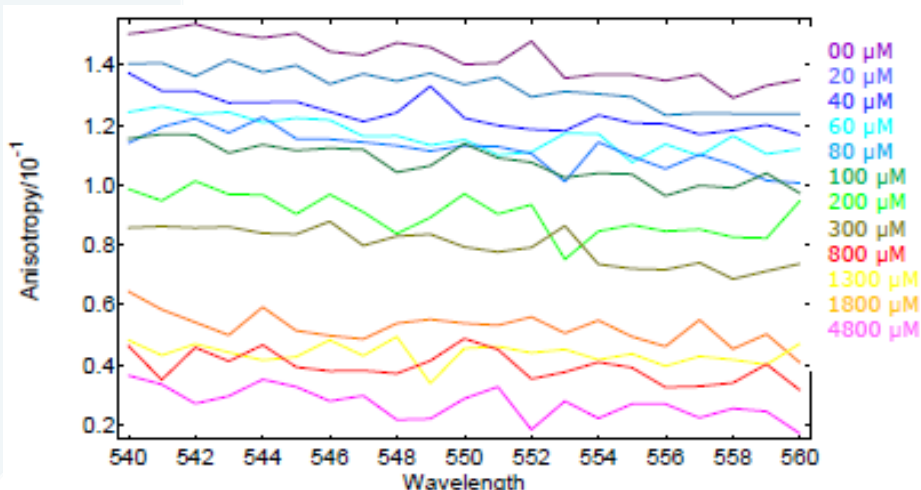
第一个下角标代表激发侧偏振片的位置，第二个下角标代表发射侧偏振片的位置。 $G(\lambda_{em})$ 是一个仪器校正因子， $G(\lambda_{em}) = I_{HH}(\lambda_{em}) / I_{HV}(\lambda_{em})$ 。偏振光的方向有垂直 (V) 和平行 (H) 两个方向。

在这个例子中，分析了一种特别的商业化荧光探针，通过加入谷胱甘肽和亲电试剂来激活 Kef。使用荧光团丹酰连接在谷胱甘肽的骨架上，行成 S-[[5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl] sulfonyl amino propyl] glutathione (DNGSH) 荧光探针。选择荧光丹酰的是因为它是一个很小的荧光团，可以较小空间位阻。文献报道这种探针键合 Kef 的解离常数是 $K_d = 6 \mu\text{M}$ 。在竞争性实验中使用两倍 Kef 浓度 $100 \mu\text{M}$ 的 DNGSH。

配体使用的是 S-Octan-3-on-1-yl glutathione (OctSG; 亲和剂加合物 1-octen-3-one 和谷胱甘肽。实验过程采用荧光微量样品池 (光程 $3\text{mm} \times 3\text{mm}$) 来使需要测量的体积最小化到 $100\mu\text{L}$ 。温度恒定在 20°C 。首先需要对荧光探针 DNGSH 建立 K_d 常数。此外，还需要在竞争实验开始前对 DNGSH 的性质进行粗略估计。因此，可以使用不断增加浓度的 Kef 来对少量的 DNGSH 进行反滴定。已知 DNGSH 键合 Kef 的各向异性 $r = 0.180$ ，荧光强度是自由配体的四倍。 $(Q = 4)$ 。自由 DNGSH 的各向异性 $r = 0.020$ 。DNGSH 加入到 Kef 中的各向异性数据如下，配体 OctSG 逐步进行滴加。滴加以后经过 5min 的平衡时间后记录各向异性光谱。

结果与讨论

下图是 OctSG 的滴定光谱。为了使分析更加简单，每次滴定过程的各向异性值都会记录下来。如下图。



公司

北京市朝阳区大物四 / 号楼(100107)

t 010-64010651

f 010-64060202

e techcomp@techcomp.cn

w www.techcomp.cn

测试得到 OctSG 的解离常数为 $K_d=7.1\mu\text{M}$ ，内插图显示了整个实验过程。

