

Application News

No. A490

光吸收分析
Spectrophotometric Analysis

使用快速三维光谱功能对 DNA 检测用荧光探针进行荧光测定

Three-Dimensional Spectra Measurement of Fluorescent Probes used for DNA Detection

在生命科学领域，荧光素标记的 DNA 探针（以下简称“荧光探针”）广泛应用于检测和鉴别特定的 DNA。荧光探针会与特定的 DNA 进行选择结合，因此可以利用荧光标记检测到特定的 DNA。因为荧光素有多种类型，掌握荧光探针的荧光波长在检测 DNA 时十分重要。

本文向您介绍使用荧光分光光度计 RF-6000 的三维光谱测定功能，对两种荧光探针进行荧光测定的示例。

■ 仪器、测定方法和结果

Instrument, Measurement Method and Results

图 1 为 RF-6000 的外观图。RF-6000 具有三维光谱测定功能和自动光谱校正功能，可以在短时间内对较宽的波长范围进行测定。自动光谱校正功能是指不受仪器影响（不使用仪器函数）自动获得校正光谱的功能，在测定时可以自动获得正确的荧光光谱以及激发光谱。

本次分析对使用不同荧光素标记的荧光探针 A、荧光探针 B 分别进行了三维光谱测定。测试三维光谱时，依次改变激发波长，并测定荧光光谱，这样就得到了三维光谱。得到的数据中横轴对应荧光光谱（Em），纵轴对应激发光谱（Ex）。

图 2 为荧光探针 A 的测定结果；图 3 为荧光探针 B 的测定结果。这些是由校正光谱组成的三维光谱。每个样品的测定时间约为 3 分钟。如箭头所示，荧光探针 A 主要在①和②处出现荧光峰，荧光探针 B 主要在①处出现荧光峰。

荧光探针 A（图 2）的峰①于 550 nm 处激发，荧光波长约为 600 nm；峰②于 510 nm 处激发，荧光波长约为 530 nm。荧光探针 B（图 3）的峰①是于 550 nm 处激发，荧光波长约为 600 nm。



图 1 荧光分光光度计 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

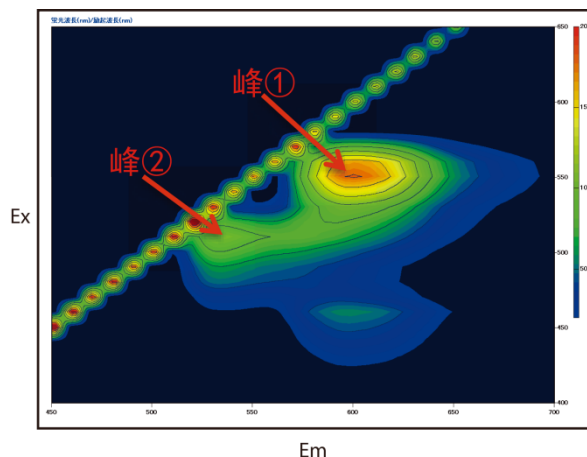


图 2 荧光探针 A 的三维光谱
Three-Dimensional Spectrum Using Fluorescent Probe A

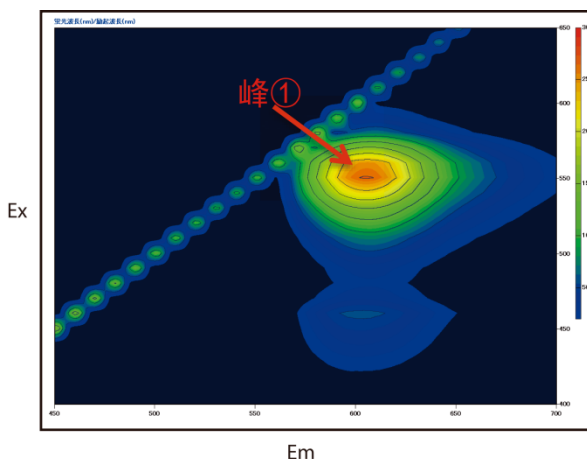


图 3 荧光探针 B 的三维光谱
Three-Dimensional Spectrum Using Fluorescent Probe B

表 1 测定条件
Analytical Conditions

仪器	: 荧光分光光度计 RF-6000
光谱类型	: 3D 光谱
测定波长范围	: Ex 400 nm ~ 650 nm, Em 450 nm ~ 700 nm
扫描速度	: 2000 nm/min
波长间隔	: Ex 10 nm, Em 2 nm
带宽	: Ex 5 nm, Em 5 nm
灵敏度	: 高

■ 光谱测定

Measurement of Spectrum

以三维光谱图的任意坐标自由截取荧光光谱以及激发光谱。此时，横轴方向上截取的光谱将作为荧光光谱；纵轴方向上截取的光谱将作为激发光谱。

在荧光探针 A 三维光谱（图 2）中，获得了峰①和峰②的荧光光谱，分别显示在图 4 和图 5 中。由图可知，峰①的荧光波长为 598 nm；峰②的荧光波长为 532 nm。

在荧光探针 B 三维光谱（图 3）中，获得了峰①的荧光光谱和激发光谱。图 6 和图 7 分别显示荧光光谱和激发光谱。由此可知，荧光波长为 604 nm，最佳激发波长为 550 nm。

另外，通过三维光谱得到不受仪器影响的校正光谱，由此可检测正确的荧光波长位置。

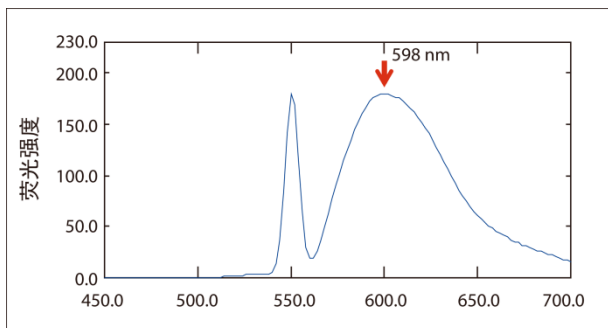


图 4 荧光探针 A 的荧光光谱（550 nm 激发、图 2 峰①）
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe A (Ex 550 nm, Fig. 2 Peak ①)

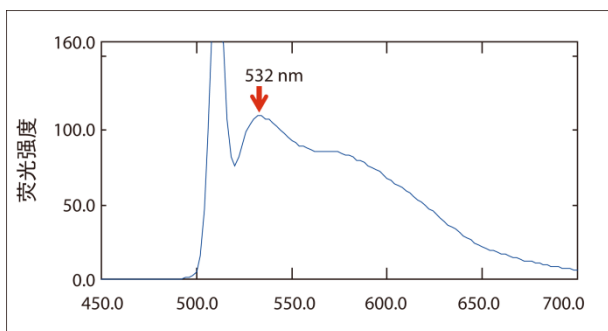


图 5 荧光探针 A 的荧光光谱（510 nm 激发、图 2 峰②）
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe A (Ex 510 nm, Fig. 2 Peak ②)

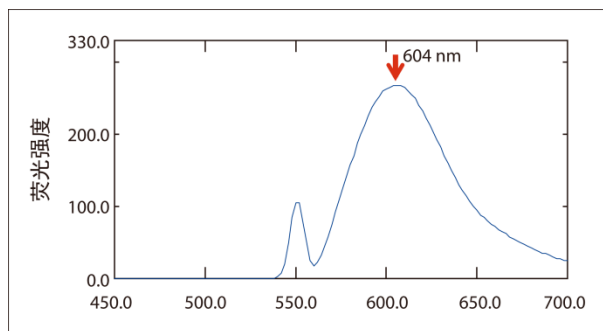


图 6 荧光探针 B 的荧光光谱（550 nm 激发、图 3 峰①）
Fluorescence Spectrum of Fluorescent Probe B (Ex 550 nm, Fig. 3 Peak ①)

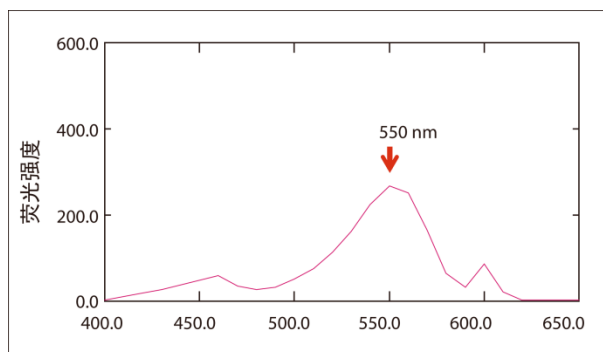


图 7 荧光探针 B 的激发光谱（604 nm 荧光、图 3 峰①）
Excitation Spectrum of Fluorescent Probe B (Em 604 nm, Fig. 3 Peak ①)

■ 总结

Conclusion

使用荧光分光光度计测定了荧光探针的三维光谱，并且能够自动获得校正光谱。使用传统机型获取校正光谱，需要进行手动数据处理，而 RF-6000 则无需该操作。综上所述，使用 RF-6000 可以高精度高效率的进行荧光测定。