

利用 SpectraMax iD3 微孔板读板机检测内源性氨基酸荧光

Hoang Ha | Applications Scientist | Molecular Devices

介绍

蛋白质的内源荧光主要来源于芳香族氨基酸如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。在水中，色氨酸的最大激发光波长在270-280nm左右而其发射光波长峰值接近350nm。蛋白的发射光谱对溶剂的极性和外界环境十分敏感。当蛋白质变性时，色氨酸残基会暴露在水中而其发射波长会变长。这种发射波长峰值的改变可以用来检测蛋白质的变性。

在这里，我们将展示如何运用SpectraMax® iD3多功能微孔板读板机检测内源性色氨酸荧光。色氨酸标准曲线用来显示检测方法的高灵敏度，而色氨酸发射峰值的偏移则用溶菌酶变性实验来检测。溶菌酶包含有两个色氨酸残基，因此受到紫外光照射时会发射荧光。当溶菌酶降解时，色氨酸的发射光峰值会偏移6-10nm。我们可以对降解前后的溶菌酶进行荧光光谱扫描来捕获和检测发生的峰值偏移。

SpectraMax® iD3多功能微孔板读板机兼具内源性色氨酸荧光检测所需的高灵敏度和波长扫描能力。另外，SoftMax® Pro 软件可以通过Spectral Optimization Wizard自动识别最佳的激发和发射波长，同时自动计算发射峰值的偏移，并用于后续分析。

材料

- SpectraMax iD3 多功能微孔板读板机 (Molecular Devices cat. #ID3-STD)
- L-色氨酸 (Sigma cat. #T-0254)
- 溶菌酶 (Sigma cat. #L6876)
- 盐酸胍 (Sigma cat. #G7294)
- UV高透的96孔板 (Greiner cat. #655801)
- 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4)

方法

我们预先准备了起始浓度为100 μM的色氨酸样本并进行了倍比稀释。将原浓度和稀释后的样本按照每个样本三复孔（每孔200微升）的方式加入至UV高透的96孔板中。在六个空白孔中加入PBS作为对照来计算检测的最低限值 (LLD)。SoftMax Pro 软件的Spectral Optimization Wizard用来优化获得最佳激发和发射光波长。通过波长优化后的结果，我们可以准确检测到色氨酸的倍比稀释关系。

我们用终浓度为5 M的盐酸胍处理10mg/mL的溶菌酶溶液使之变性，然后我们用SpectraMax iD3 读板机对变性前后的溶菌酶样本进行光谱扫描，其激发光为270nm而发射光在300nm到450nm之间。运用SoftMax Pro Software中预先设定的程序可以自动识别发射光峰值。

优势

- 借助于色氨酸荧光高灵敏特性进行蛋白质分析
- 通过光谱扫描功能可自动识别峰值位移
- Spectral Optimization Wizard 功能快速优化激发光和发射光波长

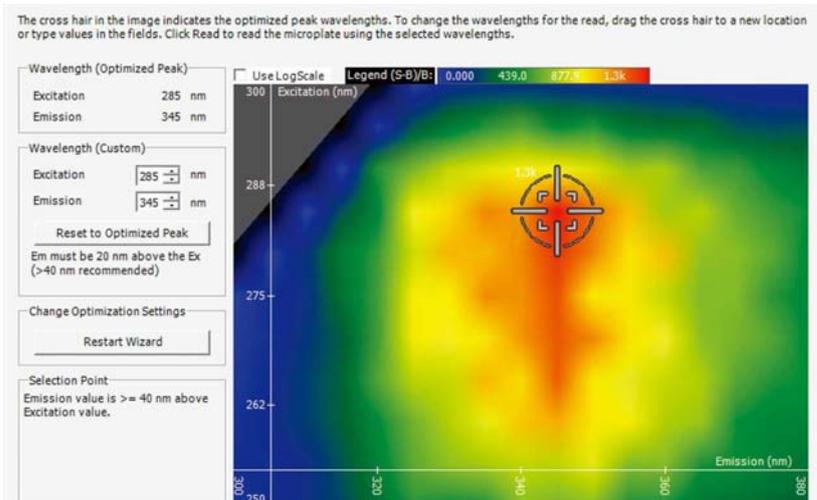


图1 Spectral Optimization Wizard。 SoftMax Pro软件的Spectral Optimization Wizard功能可以快速优化激发光和发射光波长，通过热图的计算降低信噪比。

结果

利用SoftMax Pro软件的Spectral Optimization Wizard可以将激发光和发射光波长做优化(图1)。这一特征可以使这些波长的测量有最优的信噪比(激发光波长285nm, 发射光波长345nm)。

通过波长的最优化方式, SpectraMax iD3 读板机可以准确的测量色氨酸的标准曲线, 其检测最低限值可以达到9.5nM并且有很好的线性($r^2>0.99$) (图2)。

光谱扫描结果显示在溶菌酶降解后其发射光波长峰值从350nm迁移到355.5nm并伴随荧光强度的略微增强(图3)。这一发射光波长峰值的迁移程度也十分接近预期值。

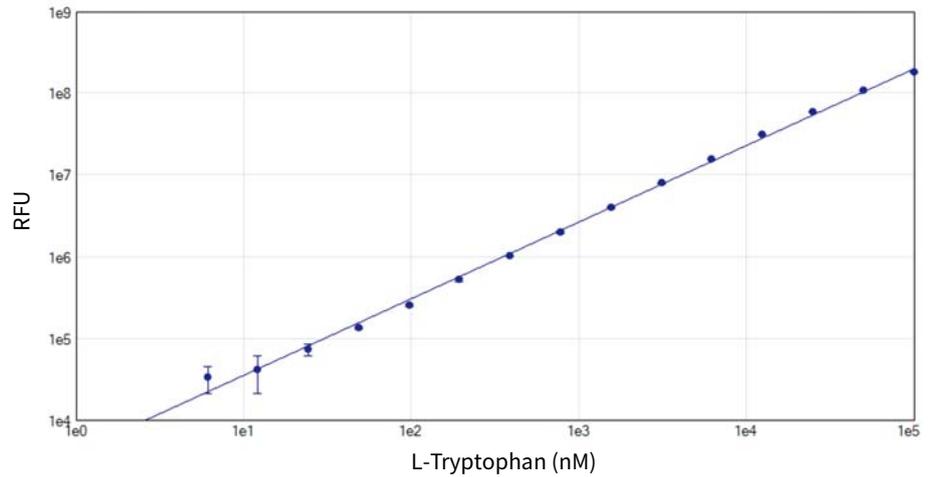


图2 色氨酸标准曲线。色氨酸梯度稀释后得到标准曲线, 其检测最低限值可以达到9.5nM并且有很好的线性($r^2>0.99$)。

结论

SpectraMax iD3 读板机可以通过测量色氨酸内源荧光对蛋白定性。利用15nm激发光和25nm发射光的带宽, 读板机可以在低波长光谱范围内检测低浓度的色氨酸。另外, Spectral Optimization Wizard可以自动识别最优化的激发光和发射光波长。

利用SoftMax Pro 软件预先设定的程序, 研究人员可以自动检测溶菌酶降解前后的波长峰值及其迁移, 从而节省了大量用于数据分析的时间。

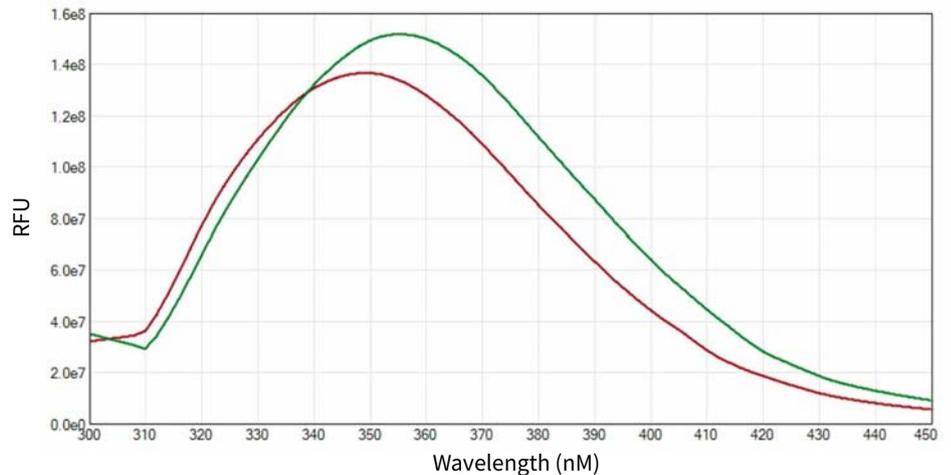


图3 溶解酶素变性后的波谱移位。溶菌酶素变性前(红)后(绿)发射波谱扫描结果如图所示。通过SoftMax Pro 软件预先设定的程序计算得到波峰位移为5.5nm。



扫一扫关注我们
的官方微信