

荧光检测试剂的几个影响因素 你一定要了解

荧光是一种现在常用于生命科学研究的技术。荧光试剂广泛用于追踪细胞和其他生物系统中生物分子的存在。荧光试剂的巨大进步促进了一系列更复杂的荧光技术，如荧光共振能量转移（FRET），时间分辨荧光（TRF），荧光偏振（FP），光漂白后荧光恢复（FRAP），荧光激活细胞分选（FACS）和荧光光谱（FCS）等。激发和发射波长，荧光量子产率，荧光寿命，大小，光稳定性和生物学功能是您应用选择荧光探针时需要考虑的重要因素，荧光试剂是成功使用荧光技术的最关键因素。在为您的检测选择合适的荧光试剂时，需要考虑几个因素。

•**测量模式**：荧光染料通过响应感兴趣的生物事件的荧光变化来跟踪生物事件。荧光变化以三种基本模式测量：荧光强度，荧光寿命和荧光偏振。尽管近年来荧光偏振和荧光寿命的测量得到了更多的关注，但是**荧光强度测量仍然是主要模式**。

•**激发和发射波长**：在选择合适的激发和发射波长时需要考虑许多因素，例如：所用荧光仪器的光源和滤光片，分析物中不需要的杂质的吸收和发射。通常，较长波长往往会提供更好的灵敏度。

•**光谱的形状和宽度**：激发和发射光谱的形状是多路复用应用中的重要组成部分。对于有机染料，激发和发射光谱通常具有多个峰或肩，以及逐渐减少到最后峰的红色的尾部。无机材料（如镧系元素配合物和量子点）显示极其对称和窄谱，对多路复用应用非常有用。

•**斯托克斯位移**：斯托克斯位移是荧光团的吸收峰和发射峰之间的差异。只要荧光探针的其他性质不受损害，总是优选更大的斯托克斯位移。较大的斯托克斯位移可使用不重叠的宽激发和发射滤波器，这增加了亮度和灵敏度。具有较小斯托克斯位移的荧光探针需要非常靠近的滤光器，并且不包括曲线的整个区域，因此降低了效率和亮度。

•**光稳定性**：许多化学过程导致传统染料的发射降解。光氧化是光漂白的主要原因。有两种方法可以减少光漂白：选择更多光稳定的荧光试剂或添加抗氧化剂（在分析系统中）。例如，出于光稳定性原因，罗丹明优于荧光素。通常，显微镜检测比微孔板或流式细胞术的检测需要更严格的光稳定性。

除了这些因素之外，还有许多测定条件需要仔细控制从而得到最佳的测定结果。通常，应考虑以下关键因素来进行荧光测定。这些因素包括 pH 效应，环境效应，离子效应，酶作

用和受体结合。

•**线性和动态范围**：理论上荧光强度与浓度成比例（线性）。但是，有一些因素会影响这种线性关系。当浓度太高时，光不能通过样品引起激发。因此，非常高的浓度可以具有非常低的荧光强度（浓度猝灭）。样品的线性与许多因素有关，包括样品的化学成分和光必须行进的路径长度。应测试未知样品的线性度。

•**荧光猝灭**：术语“猝灭”是指许多降低或淬灭荧光的因素。淬灭因素是以完全相同的方式处理标准，空白和样品非常重要的一个原因。

•**溶液浊度**：与 UV-VIS 分光光度计等吸收技术相比，荧光测量对浊度的影响更具免疫力。如果干扰物质是反射性的，则浊度会产生光散射并且读数会增加。如果干扰物质吸收光，则荧光会减少。然而，如果干扰物质不吸收光，则荧光读数不会受到影响，除非有太多的浊度使得发射的光不能穿透溶剂。

•**pH 效应**：许多化合物的荧光对 pH 敏感。我们建议在测定中始终使用缓冲液。在某些研究中，pH 因子可能是一个优势。探针分子的 pH 依赖性已被大量用于确定细胞和其他生物系统的 pH。

•**光漂白**：许多荧光分子可被光漂白或破坏。特别是紫外线会导致某些分子分解。随着分子被破坏，荧光读数减少。破坏率取决于环境因素，包括温度。

•**温度**：荧光受温度变化的影响。随着温度的升高，荧光减少。这可能是由于分子运动随温度升高而增加，导致更多的分子碰撞和随后的能量损失。然而，对于大多数荧光化合物，温度的影响远小于上述其他效应。