

# 荧光相关光谱仪使用流程

## 一、 样品要求

- 1、样品自发荧光或带有荧光标签，若样品标记荧光分子，标记效率在 0.8~1.2。
- 2、使用荧光光谱查看器查看样品的激发波长和发射波长。

激光器组合	DetetorA 探测范围 (nm)	DetetorB 探测范围 (nm)
488/561	500~550	592~624
561/638	575~618	> 650
488/638	500~550	> 650

3、实验前需计算样品的摩尔浓度，实验过程中带荧光标签样品浓度在 1~10nM 最佳，若实验所需样品浓度较高，可结合实际情况配制“低浓度荧光标记样品+高浓度未标记荧光样品”。

## 二、 仪器使用流程

### 1、清洗镜头

在镜头上滴加 30 $\mu$ l 无水乙醇，用擦镜纸沿同一方向轻轻擦拭镜头，勿来回擦拭。

### 2、使用标准品对光路进行校准、采集校准文件数据

- (1) 在镜头上滴加 30~50 $\mu$ l 水 (0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌的双蒸水、灭菌水)
- (2) 将盖玻片置于物镜上，盖玻片下的水完全覆盖镜头
- (3) 在盖玻片上滴加 30~50 $\mu$ l 标准品 (不同激光对应不同标准品)，对仪器进行针孔校准。

启动仪器→打开数据采集软件→建立项目文件夹→选择“Alignment”，打开激光器及探测器，设置激光功率，点击“Start”开始校准针孔。

激光器	校准品
488nm	Atto488
561nm	Alexa555
638nm	Atto655

### (4) 针孔校准结束后，采集校准文件数据

选择“Calibration”，在 Data Save Seetings 中选择对应通道的校准品 (若使用探测器 A，则在左侧选择所用校准品；若使用探测器 B，则在右侧选择所用校准品)，步骤 (3)、(4) 所用校准品相同。建议单次采集 10s 数据，重复 10 次。

校准品	Fluorophore
Atto488	Atto488-carboxylic acid
Alexa555	Alexa 555
Atto655	Atto655-carboxylic acid

### 3、采集样品数据

更换盖玻片，并在盖玻片上滴加 20~50 $\mu$ l 样品，采集数据，单次采集时间和采集次数视实际情况设定。

### 4、实验结束、清洗镜头

实验完成后，移除盖玻片，并用擦镜纸沿同一方向轻轻擦拭镜头，吸走物镜上多余的水，并用无水乙醇再次清洗。

### 5、关机

### 注意：

1、校准文件 (Calibration) 和样品数据 (Experiment) 的采集过程中，需要保证激光功率一致。若样品数据采集过程中更改功率，则需补采相同功率下的校准文件。

2、实验过程中需要密切关注实时光强 (Intensity)，若总荧光强度超过  $5 \times 10^6$ ，立即停止数据采集并关闭探测器，避免烧坏探测器。一般实验中荧光总光强在  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  最佳

3、若需要长时间采集样品数据 ( $> 10\text{min}$ )，样品可以适当多加一下，减少样品蒸发带来的影响。

4、滴加标准品/样品时，需将溶液垂直缓慢滴加在盖玻片上形成球形，不能出现气泡，样品应在镜头正上方。

5、实验过程中需保证物镜上有水，若水不够请及时补加，实验结束后需要将残留的水擦干；且物镜上只能滴加水。

6、建议每次实验前进行针孔校准；但实际上一周或更长时间做一次针孔校准也不影响实验结果。但一次实验未结束前，勿再次进行针孔校准。

### 三、 数据分析

#### 1、校准文件拟合

打开数据分析软件，载入文件夹，双击选择校准文件，选择拟合模型及拟合起点后，对数据进行拟合，得到聚焦体积形状参数  $S$ 、聚焦体积大小  $V_d$ 。(一般  $3 < S < 10$ ,  $V_d < 2fL$ )，拟合结束后保存校准文件数据。

#### 2、样品数据拟合

载入分析后的校准文件数据，选择需要分析的样品文件，选择拟合模型和拟合起点后，对数据进行拟合，得到一系列结果： $N$  (聚焦体积内平均分子个数)、 $T_{uaD}$  (分子通过聚焦体积的平均扩散时间)、 $\Lambda$  (平均分子亮度)、 $R_{hd}$  (流体动力学半径)、 $D$  (扩散系数)、 $C$  (浓度) 等参数。

(以上为荧光自相关数据分析，分子相互作用、荧光交相关分析等请参照说明书步骤)