

$$B = \frac{W}{FD} = I_D W = \frac{d \cos \beta}{Fm} W \quad (4)$$

从(4)式可得出结论:衍射光栅单色器的狭缝谱带宽度不是波长的函数,在任何波长上都是常数值。

三、校正系数与校正曲线

(一) 表观光谱与真实光谱

荧光分光光度计的光谱特性未加校正而测绘的光谱称表观光谱。表观荧光激发光谱的荧光强度与激发光强度 $I(\lambda)$ 、荧光物质的克分子消光系数 $\epsilon(\lambda)$ 、以及量子产率 $\phi(\lambda)$ 成正比。表观荧光发射光谱的荧光强度与探测效率 $K(\lambda)$ 、克分子消光系数 $\epsilon(\lambda)$ 、以及量子产率 $\phi(\lambda)$ 成正比。

荧光分光光度计的光谱特性加以校正后测绘的光谱称真实光谱。真实荧光激发光谱和真实荧光发射光谱的荧光强度都只与荧光物质的克分子消光系数和量子产率有关。

表观光谱与真实光谱的区别在于前者受仪器自身光谱特性的影响,而后者则不受这种影响。

若以 Q 表示单位时间,全部波数范围内荧光发射的总量子数, $\frac{dQ}{d\mu^{-1}}$ 表示某任意波数下的荧光强度,则 $\frac{dQ}{d\mu^{-1}}$ 对波数作图便是真实的荧光发射光谱。

若以同一波数下灵敏度不变的探测器输出 $A(\mu^{-1})$ 表示表观光谱,则可以得到表观发射光谱与真实发射光谱的关系式:

$$S(\mu^{-1}) = \frac{A(\mu^{-1})}{\frac{dQ}{d\mu^{-1}}} \quad (5)$$

式中: $S(\mu^{-1})$ ——用波数表示的校正系数。

(二) 校正系数

影响荧光分析灵敏度的仪器因素是光源,光电倍增管和单色器。因此,荧光发射光谱的校正系数可以表示成:

$$S(\mu^{-1}) = B(\mu^{-1})P(\mu^{-1})L(\mu^{-1})$$

式中:

$B(\mu^{-1})$ ——在波数 μ^{-1} 时,以波数表示的出光谱带宽度,

$P(\mu^{-1})$ ——在波数 μ^{-1} 时,探测器每接收一个光量子的输出。

$L(\mu^{-1})$ ——单色器对波数 μ^{-1} 的光透射比。

由(4)式已知,衍射光栅单色器出光谱带宽度不是波长的函数,在任何波长下都为常值,因此对衍射光栅型单色器的荧光分光光度计, $B(\mu^{-1})$ 是常数,上式可简化为:

$$S(\mu^{-1}) = P(\mu^{-1})L(\mu^{-1}) \quad (6)$$

如果分别以波长 λ , 频率 ν 作自变数,也可得到波长、频率表示的校正系数 $S(\lambda)$ 和 $S(\nu)$ 。

因为 $\nu = \frac{c}{\lambda}$ (c 是光速), $\mu^{-1} = \frac{1}{\lambda}$ 。根据复合函

数微分:

$$S(\nu) = \frac{A(\nu)}{\frac{dQ}{d\nu}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda} \cdot \frac{d\lambda}{d\nu}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda}} \cdot \frac{c}{\lambda^2} \quad (7)$$

$$S(\mu^{-1}) = \frac{A(\mu^{-1})}{\frac{dQ}{d\mu^{-1}}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda} \cdot \frac{d\lambda}{d\mu^{-1}}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda}} \cdot \frac{1}{\lambda^2} \quad (8)$$

所以,以波数、波长和频率表示的校正系数三者间的关系为: $S(\mu^{-1}) = S(\nu) = S(\lambda)/\lambda^2$ (9)

(三) 校正曲线

以 μ^{-1} 作横座标, $S(\mu^{-1})$ 作纵座标描绘出每一个 μ^{-1} 时的 $S(\mu^{-1})$ 曲线,称为 $S(\mu^{-1})$ 对波数 μ^{-1} 的校正曲线。同样,校正曲线也可用 $S(\lambda)$ 对波长 λ , 或用 $S(\nu)$ 对频率 ν 作图表示。仪器的校正曲线反映了仪器的光谱特性,采用不同单色器、不同光电倍增管的不同型号仪器,校正曲线的形状不一样,若需在没有校正装置的荧光分光光度计上测绘出真实光谱,首先必需设法找到该仪器的校正曲线 $S(\mu^{-1})-\mu^{-1}$, 然后,由该仪器绘出样品的表观光谱 $A(\mu^{-1})-\mu^{-1}$, 最后根据(5)式逐点计算出真实光谱。

(待续)

科技消息

一种简单、快速的 DNA 微量测定法

由于 DAPI (4, 6-二脒基- α -苯甲噻唑·2HCl) 可以和 DNA 形成特异复合物,因此可用荧光法对 DNA 进行定量测定。DNA 测定的最低浓度可达 5×10^{-10} 克/毫升,即使含 RNA 杂质高达 20 倍,测量也不受影响。复合物的形成取决于 DNA 与 DAPI 的比例、DNA 的结构、离子强度以及重要二价阴、阳离子的存在。DNA 与 DAPI 的比例不要使荧光达到最大强度。溶液的离子强度太大会减弱复合物的荧光强度,因此最好低于 0.1。DNA 的天然聚合状态愈高,荧光也愈强,解聚的或变性的 DNA,荧光变弱。

摘自 Anal. Biochem., 83, 1, 1978.