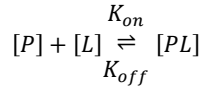


对于普通的配体和蛋白结合，有



$$K_{off}[PL] = K_{on}[P][L]$$

其中  $K_{on}$  为结合速率常数 (association rate constant)，代表分子间结合时的快慢，单位为  $M^{-1} \cdot S^{-1}$ 。 $K_{off}$  为解离速率常数 (dissociation rate constant)，代表分子间解离时的快慢，单位为  $S^{-1}$ 。

在任意时刻，反应达平衡时，结合反应和解离反应的速率  $v_{正向}$  和  $v_{反向}$  是相等的。

即

$$v_{正/反} = K_{off}[PL] = K_{on}[P][L]$$

此时，对于解离常数  $K_d$ ，定义有

$$K_d = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

$$K_d = \frac{([P_{total}] - [PL])([L_{total}] - [PL])}{[PL]}$$

$$[P_{total}] = [P_t]$$

$$[L_{total}] = [L_t]$$

$$[PL]^2 - ([P_t] + [L_t] + K_d)[PL] + [P_t][L_t] = 0$$

$$[PL] = \frac{([P_t] + [L_t] + K_d) - \sqrt{([P_t] + [L_t] + K_d)^2 - 4[P_t][L_t]}}{2}$$

式中  $[P_t]$  为任意时刻蛋白质的总浓度， $[L_t]$  为任意时刻配体的总浓度。

实际上由于蛋白质  $P$  的浓度未必准确能够准确获取，蛋白活性未必为百分百，故可此引入一个系数  $n$  修正  $[P_t]$  以使得化学平衡更与实际情况相符。

$$[PL] = \frac{(n[P_t] + [L_t] + K_d) - \sqrt{(n[P_t] + [L_t] + K_d)^2 - 4n[P_t][L_t]}}{2}$$

在滴定的整个过程中，有

$$[P_t] = [P_0] \frac{V}{V + i \cdot \Delta V}$$

$$[L_t] = [L_0] \frac{i \cdot \Delta V}{V + i \cdot \Delta V}$$

式中  $i$  为滴定的次数， $\Delta V$  为每次滴定中加入的溶液体积， $V$  为荧光比色皿的初始体积。 $[P_0]$  为初始蛋白浓度， $[L_0]$  为初始配体浓度。

联立上式，化简，得

$[PL]$

$$= \frac{\left( n[P_0] \frac{V}{V + i \cdot \Delta V} + [L_0] \frac{i \cdot \Delta V}{V + i \cdot \Delta V} + K_d \right) - \sqrt{\left( n[P_0] \frac{V}{V + i \cdot \Delta V} + [L_0] \frac{i \cdot \Delta V}{V + i \cdot \Delta V} + K_d \right)^2 - 4n[P_0] \frac{V}{V + i \cdot \Delta V} [L_0] \frac{i \cdot \Delta V}{V + i \cdot \Delta V}}}{2}$$

$[PL]$

$$= \frac{(n[P_0]V + [L_0](i \cdot \Delta V) + K_d(V + i \cdot \Delta V)) - \sqrt{(n[P_0]V + [L_0](i \cdot \Delta V) + K_d(V + i \cdot \Delta V))^2 - 4n[P_0][L_0](V \cdot i \cdot \Delta V)}}{2(V + i \cdot \Delta V)}$$

$[PL]$

$$= \frac{\left( n[P_0] + [L_0] \left( \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right) + K_d \left( 1 + \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right) \right) - \sqrt{\left( n[P_0] + [L_0] \left( \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right) + K_d \left( 1 + \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right) \right)^2 - 4n[P_0][L_0] \left( \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right)}}{2 \left( 1 + \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right)}$$

此时 $[PL]$ 为关于 $i$ 的函数。

可以定义配体总浓度 $[L_t]$ 和蛋白总浓度 $[P_t]$ 的比值 $R$ 为新的自变量。

$$R = \frac{[L_t]}{[P_t]} = \frac{[L_0]}{[P_0]} \left( \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right)$$

$$\left( \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right) = \frac{[P_0]R}{[L_0]}$$

$R$ 是关于 $i$ 的函数。代入，化简，得

$[PL]$

$$= \frac{\left( n[P_0] + [L_0] \frac{[P_0]R}{[L_0]} + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n[P_0] + [L_0] \frac{[P_0]R}{[L_0]} + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4n[P_0][L_0] \frac{[P_0]R}{[L_0]}}}{2 \left( 1 + \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right)}$$

$$[PL] = \frac{\left( n[P_0] + [P_0]R + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n[P_0] + [P_0]R + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4n[P_0]^2 R}}{2 \left( 1 + \frac{i \cdot \Delta V}{V} \right)}$$

$$[PL] = \frac{\left( n[P_0] + [P_0]R + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n[P_0] + [P_0]R + K_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4n[P_0]^2 R}}{2 \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right)}$$

$[P_0]$ 是常数。在此处重新定义一个相对解离速率常数 $K'_d$ 。

$$K'_d = \frac{K_d}{[P_0]}$$

代入，得

$$[PL] = \frac{\left( n[P_0] + [P_0]R + [P_0]K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n[P_0] + [P_0]R + [P_0]K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4n[P_0]^2 R}}{2 \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right)}$$

两边同除以 $[P_0]$ ，得

$$\frac{[PL]}{[P_0]} = \frac{\left( n + R + K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n + R + K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4nR}}{2 \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right)}$$

由蛋白质 $P$ 结合配体 $L$ 而引发的荧光淬灭为 $\Delta F$ ， $P$ 被 $L$ 饱和时，引发的最大荧光淬灭为 $\Delta F_{max}$

$$x = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}}$$

近似与修正：

已知滴定全程中根据

$$[P_t] = [P_0] \frac{V}{V + i \cdot \Delta V}$$

$$[P_0] \geq [P_t] = [P] + [PL]$$

$[P_0]$ 恒大于 $[P_t]$ ， $x$ 用 $\frac{[PL]}{[P_0]}$ 是为了近似代替 $\frac{[PL]}{[P_t]}$ 。 $\Delta F_{max}$ 可以表示 $[P_0]$ 时刻的所有能够  $P$  和  $L$  结合相关位置产生的荧光， $\Delta F$  表示该配体结合反应任意一次滴定中平衡后猝灭的荧光。

$$\Delta F = \Delta F_{max} \frac{\left( n + R + K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right) - \sqrt{\left( n + R + K'_d \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right) \right)^2 - 4nR}}{2 \left( 1 + \frac{[P_0]R}{[L_0]} \right)}$$

在实际滴定中，第一次滴定时可能会因为蛋白溶液因温度未平衡至室温或其他原因而导致首次滴定的 $\Delta F$ 过大，此时公式中的常数项  $B$  可以对这种情况加以修正。如不需此项修正，可设置  $B=0$ 。当  $k > 1$  时，曲线的拐点变得不明显。拟合结果会有很多很宽泛的解，参数之间的独立性会变差，此时可以对  $n$  值进行适当的固定，以防止参数过拟合。（比如尝试设定  $n=1$ ）

$$Y=B+F*(x+(1+P0*x/L0)^k+n-sqrt((x+(1+P0*x/L0)^k+n)^2-4*n*x))/(2*(1+P0*x/L0))$$