

Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

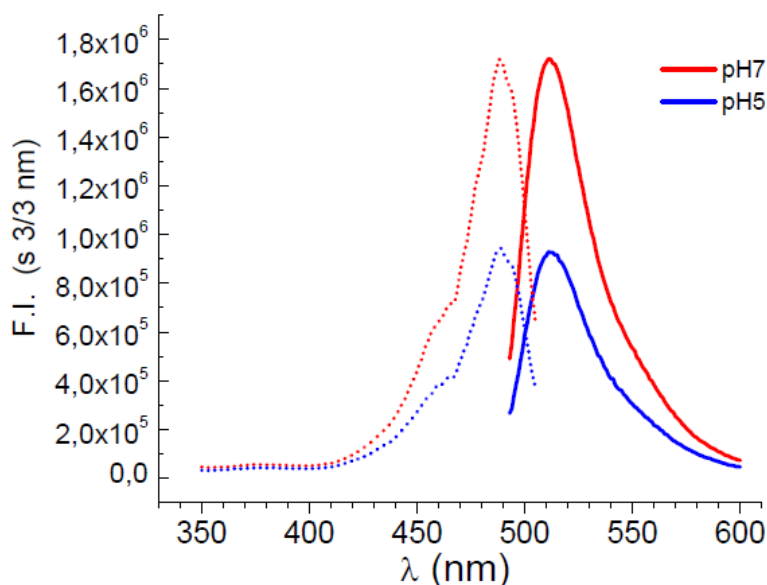
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

Materiál

- Fluorescein - NIST-traceable standard - 50 μM (Molecular Probes, Invitrogen)
- Pufr 5 (20 mM MES, pH 5.0)
- Pufr 7 (50 mM fosfát sodný, pH 7.0)
- Pufr 9 (50 mM glycin, pH 9.0)
- Spektrofluorometr vybavený kryostatem (chlazenou vodní lázní)
- Kyveta

Postup

1. Připravte vzorky fluoresceinu **10000x** naředěním roztoku NIST standardu jeho přidáním 1,5 μL do 1499 μL roztoku pufru 5, pufru 7 a pufru 9 a následným naředěním (150 μL 1000x zřed. roztoku do 1350 μL příslušného pufru).
Pozn. Začnete měřením fluoresceinu v pufru 9, pak v pufru 7 a nakonec v pufru 5
2. Změřte excitační spektra vzorků při $\lambda(\text{em}) = 515 \text{ nm}$
3. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$
4. Změřte spektra fluoresceinu v pufru 9 při 40°C (zahřejte vzorek vodní lázní)



Obr. 1: Vliv pH na excitační a emisní spektrum fluoresceinu.

Výsledky

Při změně pufru z pH 7 na pH 5 a při zvýšení teploty dochází ke snížení intenzity fluorescence fluoresceinu.