

## Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

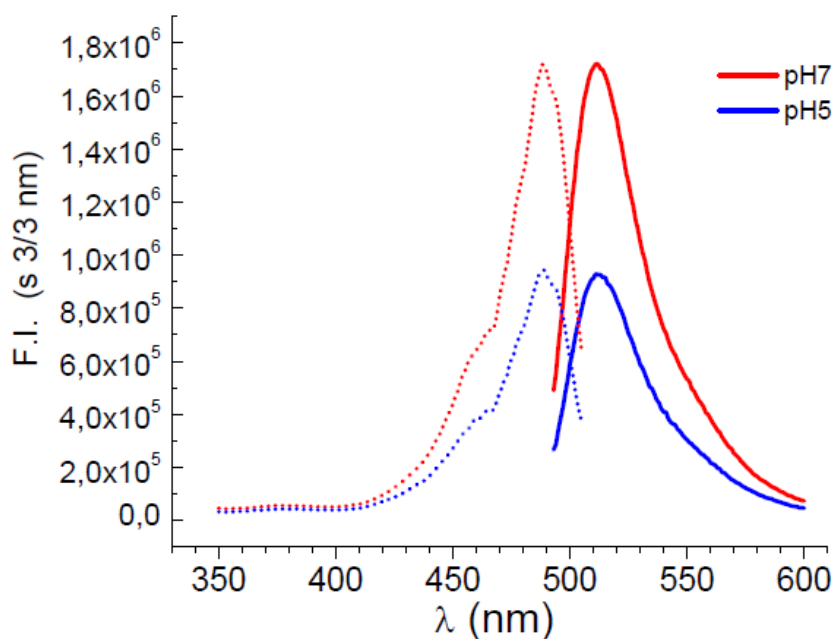
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

### Materiál

- Fluorescein - NIST-traceable standard - 50  $\mu\text{M}$  (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 **10 000x** naředěním roztoku NIST standardu jeho přidáním 1,5  $\mu\text{L}$  do 1499  $\mu\text{L}$  roztoku pufru 5, pufru 7 a pufru 9 a následným dalším naředěním (150  $\mu\text{L}$  1000x zřed. roztoku do 1350  $\mu\text{L}$  příslušného pufru).
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 při 20, 25 a 37°C.



**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.