

Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

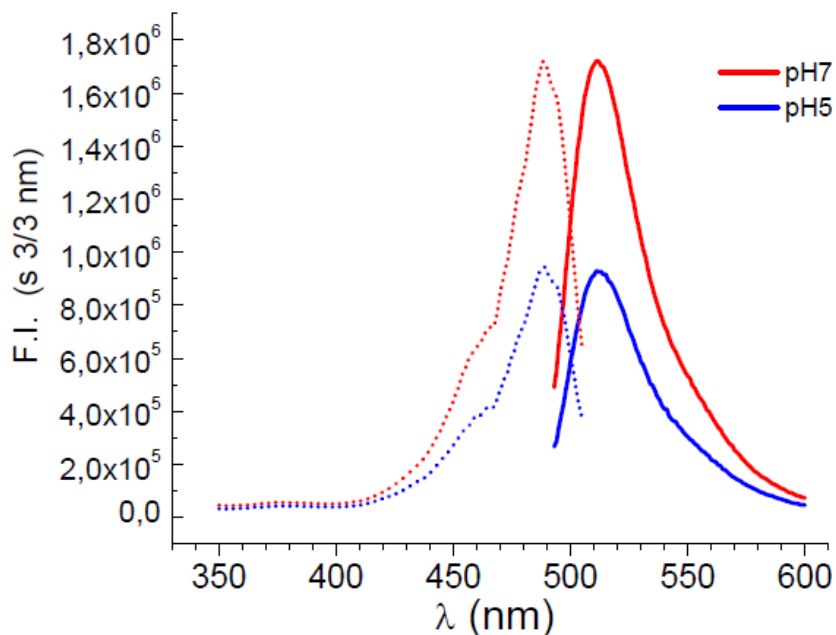
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

Materiál

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

Postup

1. Připravte vzorky fluoresceinu **10 000x** naředěním roztoku NIST standardu jeho přidáním 1,5 μL do 1499 μL roztoku pufř 5, pufř 7 a pufř 9 a následným dalším naředěním (150 μL 1000x zřed. roztoku do 1350 μL příslušného pufř).
2. Změřte excitační spektra vzorků při $\lambda(\text{em}) = 515 \text{ nm}$
Pozn. Začněte měřením fluoresceinu v pufř 9, pak v pufř 7 a nakonec změřte při stejných nastaveních fluorescein v pufř 5.
3. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$
4. Znovu změřte emisní a excitační spektrum fluoresceinu v pufř 9 při 20°C, zahřejte vzorek vodní lázní na 40°C a znovu změřte spektra.



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

Výsledky

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