

Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

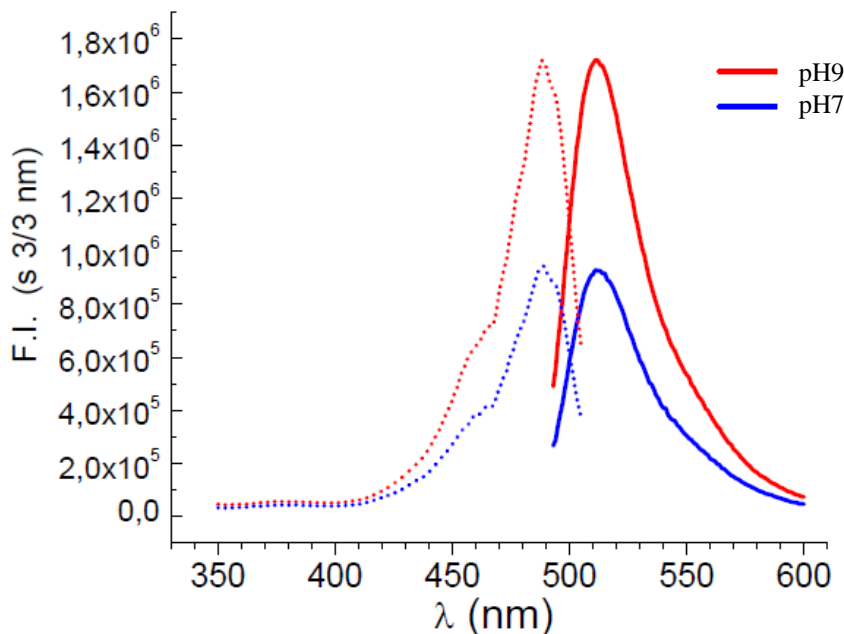
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

Materiál

- Fluorescein - NIST-traceable standard - 50 μM (Molecular Probes, Invitrogen)
- Pufr 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 7 a pufru 9 a následným naředěním (150 μL 1000x zřed. roztoku do 1350 μL příslušného pufru).
2. Změřte excitační spektra vzorků (nejdříve pH 9) při $\lambda(\text{em}) = 515 \text{ nm}$
3. Změřte emisní spektra vzorků (nejdříve pH 9) při $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$
4. Změřte spektra při 25 a 40°C (zahřátím vodní lázní).



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

Výsledky

Při změně pufru z pH 9 na pH 7 a při zvýšení teploty dochází ke snížení intenzity fluorescence fluoresceinu.

Praktické poznámky

- Při měření zcela neznámého zředěného vzorku využíváme toho, že všechny fluorofory můžeme excitovat v UV oblasti. Díky tomu můžeme pozorovat fluorescenci různých fluoroforů na UV transiluminátoru.
U neznámého vzorku nejdříve změříme fluorescenční emisní spektrum s nastavením excitační vlnové délky kolem 300-350 nm.
- Intenzita fluorescence fluoresceinu se mění se změnou pH, protože dochází ke změně náboje fluoresceinu, tím se mění elektronový obal a potažmo absorpční a emisní vlastnosti tohoto fluoroforu. Viz obrázky v dokumentaci [Fluorescein NIST-Traceable Standard](#)
- S rostoucí teplotou dochází ke snížení pravděpodobnosti přechodu elektronu z excitovaného stavu do základního stavu vyzářením elektronu a naopak roste pravděpodobnost uvolnění energie excitovaného stavu elektronu prostřednictvím disipační energie = tepla.