

Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

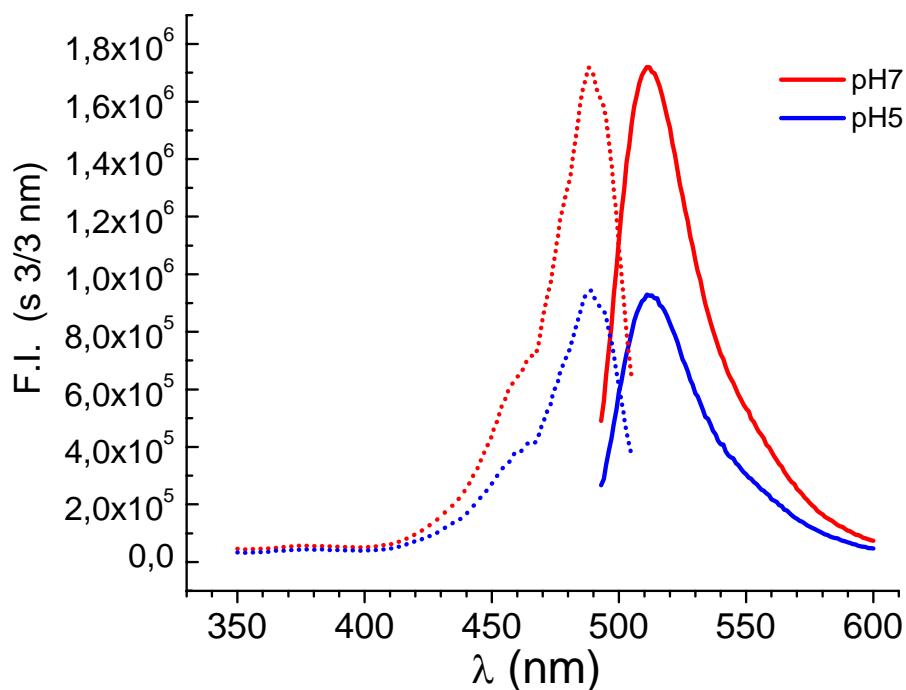
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

Materiál

- fluorescein - NIST-traceable standard - 50 μM (Molecular Probes, Invitrogen)
- mikrokryveta
- pufr 5 (20 mM MES, pH 5.0)
- pufr 7 (50 mM fosfát sodný, pH 7.0)
- pufr 9 (12.5 mM boritan sodný/kys. boritá, pH 9.0)
- spektrofluorometr vybavený kryostatem (chlazenou vodní lázní)

Postup

1. Připravte vzorky fluoresceinu 1000x naředěním roztoku NIST standardu jeho přidáním 1,5 μL do 1499 μL roztoku pufru 5, pufru 7 a pufru 9.
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 při 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.