

**Flavinok fotofizikájának vizsgálata spektroszkópiai
módszerekkel**

TDK dolgozat

Készítette: Karádi Kristóf

PTE TTK Fizika szak

Témavezető: Dr. Lukács András

PTE ÁOK Biofizika Intézet

Pécs

2014

Tartalomjegyzék:

I. Függelék (3)

II. Függelék (4)

I.: Összefoglalás (absztrakt) (5)

II.: Bevezetés, és problémafelvetés (5)

III.: Mérési körülmények (7)

1. A mérés során használt anyagok listája (7)

2. A mérési beállításokról (7)

IV.: Mérési eredmények bemutatása (8)

1. Emissziós és élettartam mérések PBS pufferben (8)

a) Mérések FMN-el (8)

b) Mérések FAD-al (18)

c) Mérések összevetése (27)

2. Mérések Tris pufferben (31)

3. Anizotrópiás mérések (36)

V.: Összegzés, megállapítások (37)

Forrásjegyzék (37)

I. függelék

A TDK munka során feladatomban a következő volt: a konzulensem útmutatása alapján elvégezni a kijelölt kísérleteket, ezeket kiértékelni a megfelelő programok segítségével, majd a kapott eredményeket rendszerbe foglalni, és ezekben szabályosságokat megfigyelni. A kutatás során megtanultam használni a számomra bemutatott mérő-gépeket: Horiba Jobin Yvon FluoroLog készülék, valamint Horiba Jobin Yvon NanoLog készülék. A FluoroLog készülékkel emissziós méréseket végeztem, míg a NanoLog készülékkel élettartam, valamint anizotrópiás méréseket folytattam. A kísérletezés során FMN, és FAD koncentráció sorokat készítettem, és ezek fotofizikai tulajdonságait vizsgáltam, úgy, hogy ezeket megfigyeltem l-triptofán jelenlétében is. Utóbbi esetben fixen tartott FMN/FAD koncentráció mellett a triptofánból használtam hígítással nyert koncentráció sort. A mérések egy részét megismételtem más puffert alkalmazásával is, hogy a puffertől való befolyást kizárjam. A kapott emissziós adatokat Origin és Excel segítségével értékeltem ki: megfigyeltem a grafikonok helyzetének, elsősorban csúcsának koncentráció függését, és a kapott értékeket táblázatokba rendeztem. Az élettartam adatok kiértékelésére pedig a FluoFit nevű programot használtam a lecsengési görbék illesztéséhez, valamint ezek paramétereinek meghatározásához, majd az így nyert adatokat szintén táblázatokba rendeztem, és vizsgáltam változásuk koncentrációtól való függését. Az így nyert összefüggések lettek felhasználva a leírt végkövetkeztetések megállapításában.

II. függelék

Az OTDK központi felhívásának 2. számú mellékletében a 4.3-as B pont alapján: „A benyújtott dolgozat a szakdolgozattal/diplomamunkával azonos tárgyú/tartalmú, és azt az intézményi TDK-konferencia eredményeként fogadták el szakdolgozatként.”

A TDK-munka leadását követő szakaszt (mely nem kerül bele a TDK előadásba a szabályok értelmében) a tématerv következő része tartalmazza (az első szakaszt mely a dolgozatba is bekerült, az absztraktban és az első függelékben már összefoglaltam, így itt nem térek ki rájuk újra):

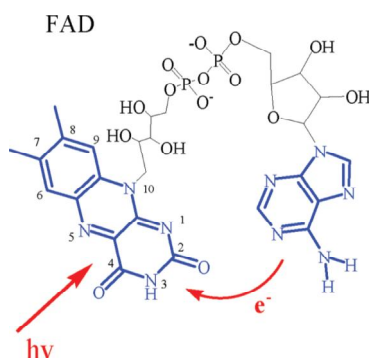
I. Összefoglalás (absztrakt)

A bemutatott dolgozat a flavin adenin dinukleotid (FAD) és a flavin adenin mononukleotid (FMN) fotofizikájával foglalkozik. A természetben mintegy 150 enzimben fordul elő FAD vagy FMN, ezek funkciója pedig rendkívül változatos. A funkció szempontjából jelentős szerepe van az FAD/FMN redox állapotainak illetve elektron donor és akceptor képességének. A flavoenzimek fontos kategóriáját képezik azok a fehérjék, amelyekben a fehérje funkciója egy UV/kék foton elnyelését követően valósul meg. Ilyen enzim például a DNS javításában fontos szerepet betöltő fotoliáz, amelyben az UV/kék foton elnyelését követően az FAD-ról egy elektron lép ki, melynek következtében – a hibás – ciklobután pirimidin dimer kötés felbomlik. Az elektron transzfernek más fotoaktív flavoproteinek esetében is fontos szerepe van, a cirkadián ritmus szabályozásáért felelős kriptokrómokban például a gerjesztést követően egy elektron transzfer kaszkádra kerül sor, amelynek során az elektron három közeli triptofán molekulán „ugrálva” redukálja az FAD-t. Ebben az esetben a triptofán molekulák egyfajta „nanodrótként” viselkednek.

Jelen dolgozatban az FMN és a FAD triptofán általi redukálásának fotofizikáját vizsgáltam oldatban. Ennek érdekében fluoreszcencia emissziós és élettartam méréseket végeztem.

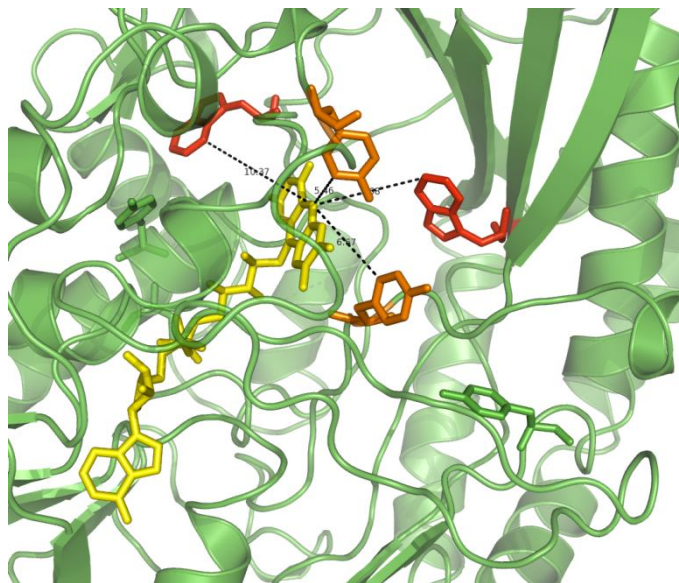
II. Bevezetés és problémafelvetés

A fotoindukált elektron transzfer a fluoreszcencia kioltás gyakori oka. A folyamat során a fluorofór gerjesztését követően egy elektront vonz a környezetéből, amely a gerjesztett állapot gyors relaxációjához vezet. Ez a folyamat figyelhető meg a flavin adenin dinukleotid esetében, ahol az UV/kék foton elnyelését követően a kromofór gerjesztett állapota az adenin gyűrűtől jövő elektron transzferen keresztül relaxálódik. Ennek következtében az FAD esetében két populáció figyelhető meg – egy rövid, 9 ps és egy hosszabb 3.5 ns körüli fluoreszcencia élettartammal rendelkező.



1. ábra: Fotoindukált elektron transzfer az FAD esetében

Tekintettel a flavinok redox tulajdonságaira a fotoindukált elektron transzfer számos flavoprotein esetében megfigyelhető, jóllehet az esetek többségében a fehérje funkciójában nem játszik szerepet.



2. ábra

Az ábrán látható glükóz oxidáz esetében az FAD gerjesztett állapota 10 ps alatt relaxálódik, ami elsősorban a flavinhoz közel elhelyezkedő triptofánnak köszönhető. A fényabszorpciót követően az FAD gerjesztett állapotba kerül, ezt követően egy elektron transzferálódik a közeli triptofánról, így redukálva a flavint. Az elektron transzfer következtében egy flavin anion és egy triptofán kation gyök keletkezik, amely közvetlenül is megfigyelhető és látható infravörös tranziens abszorpció segítségével ([1] Lukacs et al., *J. Phys. Chem. B.*, 2013).

Bár a legtöbb flavoprotein esetében a fotoindukált elektron transzfernek nincs fiziológiai funkciója, néhány flavoprotein család esetében ez a folyamat kulcsfontosságú a fehérje funkciójának szempontjából. Ilyen fehérjék például a DNS-javításban részt vevő fotoliázok, vagy a rovarok/növények cirkádián a ritmusának szabályozásában részt vevő kriptokrómok, amelyek esetében az FAD redukálása egy három tagú triptofán láncon keresztül valósul meg.

Tekintettel arra, hogy a fotoaktív flavoproteinek működésének megértése szempontjából fontos a flavin redox folyamatainak a nyomon követése oldatban kívántunk olyan spektrális markereket keresni, amelyek az FAD és a triptofán anion és semleges gyök állapotára jellemző. Ennek érdekében FMN és FAD mellé adagoltunk triptofánt, arra számítva, hogy megfigyelhető a fotoindukált elektron transzfer. Annak érdekében, hogy az elektron transzfer megvalósuljon mind az FAD mind a triptofán koncentrációja meglehetősen magas értékre állítottuk be. A kísérlet nem az előzetes várakozásainknak megfelelően történt meg. Magas koncentráció esetében azt figyeltük meg, hogy az FAD/FMN fluoreszcencia emissziós csúcsa mintegy 25-30 nm-t elmozdul. Ha triptofánt teszünk a magas koncentrációban jelen levő FMN/FAD mellé, akkor egy színreakció játszódik le.



3. ábra

Jelen munkában ennek a két jelenségnek a feltérképezését és megértését tűztük ki célul fluoreszcencia spektroszkópai mérések segítségével.

III. Mérési körülmények

1. A mérés során használt anyagok listája:

(a használt anyagok a Sigma-Aldrich-tól voltak rendelve)

FMN flavin mononukleotid

FAD flavin dinukleotid

Trp l-triptofán

Pufferek listája:

PBS pH 7.0

Tris pH 7.33

2. A mérési beállításokról:

Emissziós mérések:

Horiba Jobin Yvon FluoroLog készülékkel, a gerjesztési hullámhossz 360 nm volt, a felvett hullámhossz-tartomány pedig 480-700 nm-ig terjedt, a mért értékek a műszert jellemző értékkel korrigálva lettek, használt integrációs idő: 0,2 ns.

Élettartam mérések:

Horiba Jobin Yvon NanoLog készülékkel, a gerjesztés 450 nm-en történt, impulzus üzemű LED-et használva (impulzus szélesség 1,2 ns), a detektor 900 V-on üzemelt. A megfigyelt hullámhossz 540

nm volt (kivéve prompt ahol a szórás mértem 450 nm-en), a mérések addig történtek, amíg a 10000-es csúcs-beütésszámot el nem értem, a csatornaszélesség 0,055 ns/ch volt.

Anizotrópiás mérések:

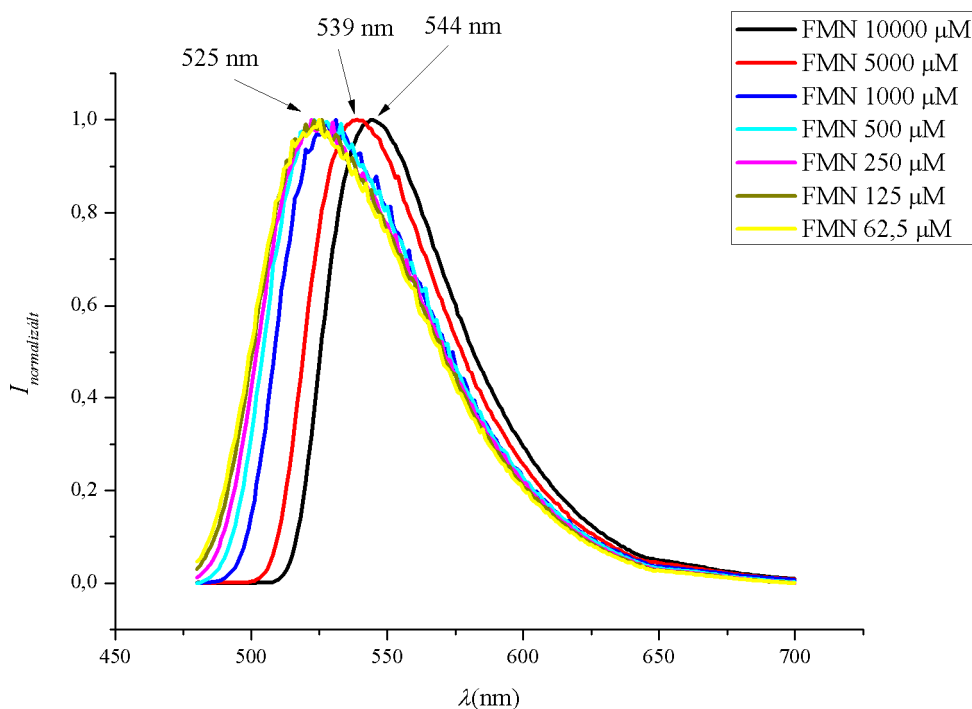
Horiba Jobin Yvon NanoLog készülékkel, a gerjesztés 450 nm-en történt, impulzus üzemi LED-et használva (impulzus szélesség 1,2 ns), a detektor 900 V-on üzemelt. A megfigyelt hullámhossz 540 nm volt (kivéve prompt, ahol a szórás mértem 450 nm-en), a mérések addig zajlottak, amíg a két polarizációs irány közti csúcsbeütésszám eltérés el nem érte az 1000-es beütésszámot. Egy egy polarizációs irányban a gép 30 s-ot időzött, és utána váltott, G-faktor mérése esetén 5 teljes ciklus lefutását mérte a gép. A csatornaszélesség 0,055 ns/ch volt. A következő adatok lettek felvéve: prompt VV, lecsengés VH, lecsengés VV, G-faktor HV, G-faktor HH.

IV. Mérési eredmények bemutatása:

1. Emissziós és élettartam mérések PBS pufferben:

a) FMN-el végzett mérések (PBS puffer):

Emissziós mérés:

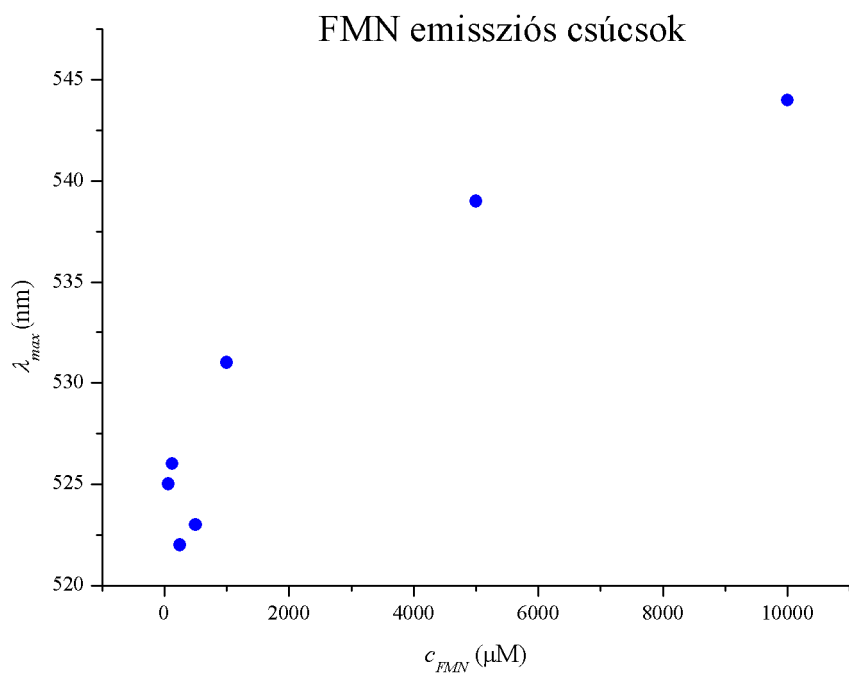


4. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

c_{FMN} (μM)	λ_{max} (nm)	$elt.$ (nm)
10000	544	0
5000	539	-5
1000	531	-13
500	523	-21
250	522	-22
125	526	-18
62,5	525	-19

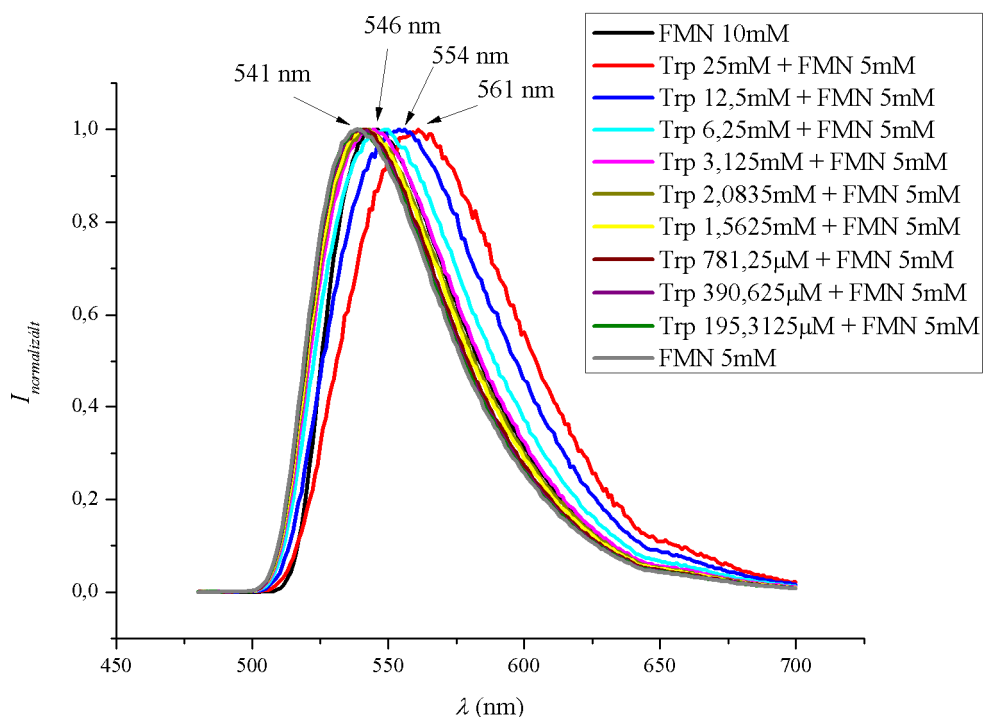
A táblázat grafikonos szemléltetése:



5. ábra

Megfigyelés: ahogy csökken a koncentráció, úgy tolódik az emissziós görbe az ultra-tartomány irányába.

FMN+Trp emissziós mérés:



6. ábra

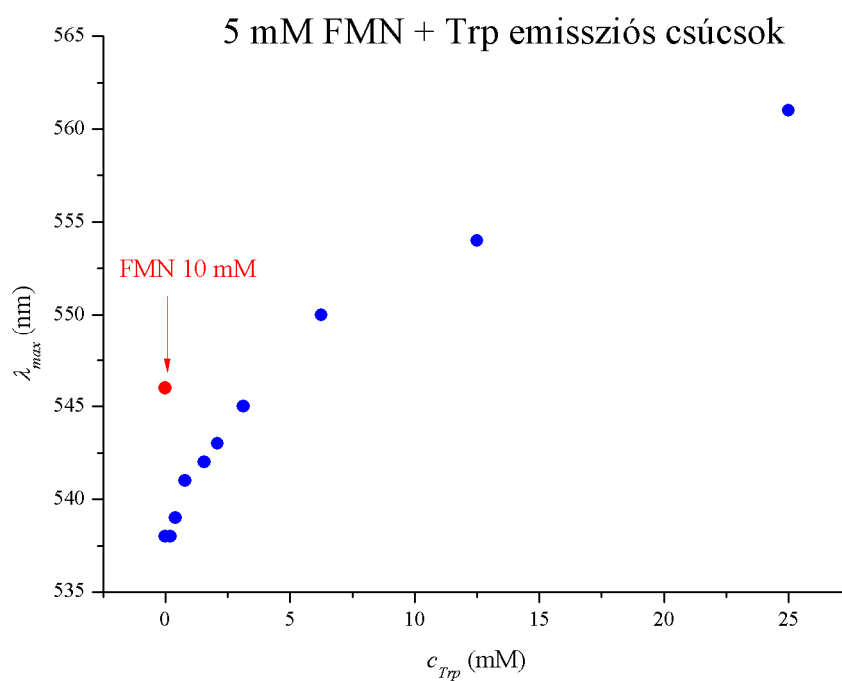
Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

Magyarázat a táblázathoz:

Az „elt.” azt jelöli, hogy a töményebb, Trp-t nem tartalmazó oldatnál (amely Trp-vel lett hígítva később) mért adattól mekkora az eltérés az adott már Trp-t is tartalmazó oldatnál. A „szumma eltérés” pedig azt mutatja meg, hogy mekkora a csak a Trp okozta eltérés, azaz az „elt.”-hez hozzáadjuk a töményebb triptofán mentes oldat adatát, és levonjuk a hígabb triptofán mentes oldat adatát (azaz összességében levonjuk a hígulás okozta eltérést az „elt.”-ből, mivel az nem a Trp hatása). Ezt a jelölés módot a későbbiekben is alkalmazom a dolgozatom során.

c_{FMN} (mM)	c_{Trp} (mM)	λ_{max} (nm)	elt. (nm)	Σ elt. (nm)
10	-	546		
5	25	561	15	23
5	12,5	554	8	16
5	6,25	550	4	12
5	3,125	545	-1	7
5	2,0835	543	-3	5
5	1,5625	542	-4	4
5	0,78125	541	-5	3
5	0,390625	539	-7	1
5	0,1953125	538	-8	0
5	-	538		

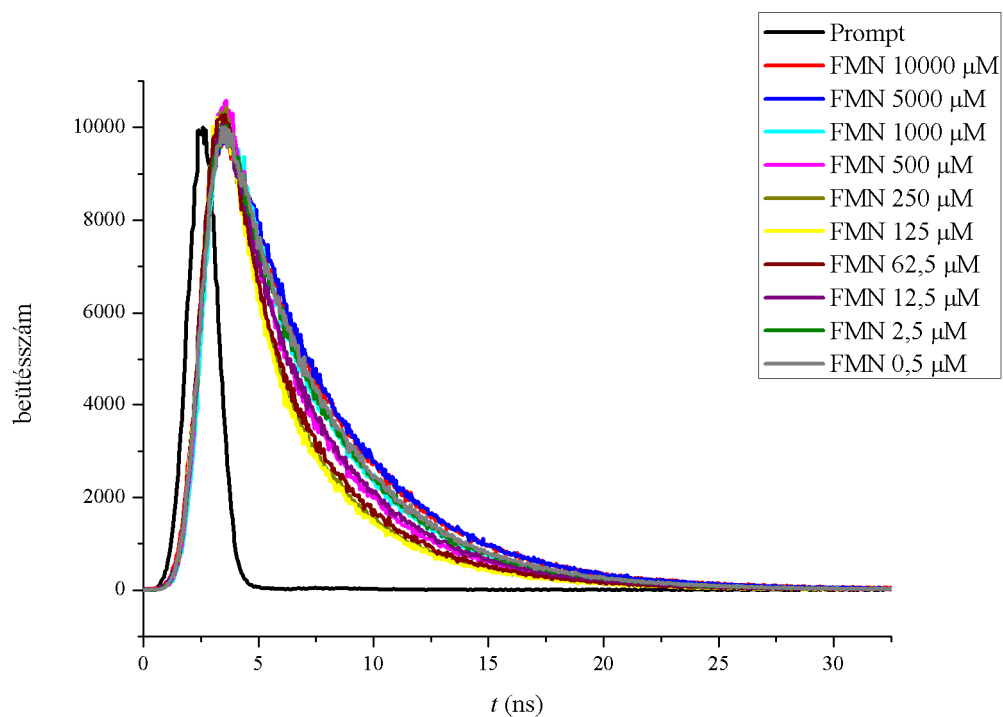
A táblázat grafikonos szemléltetése:



7. ábra

Megfigyelés: az oldathoz adott triptofán az emissziós görbét az infra-tartomány irányába tolja, minél többet adunk hozzá, annál erősebb ez a hatás.

FMN élettartam mérés:

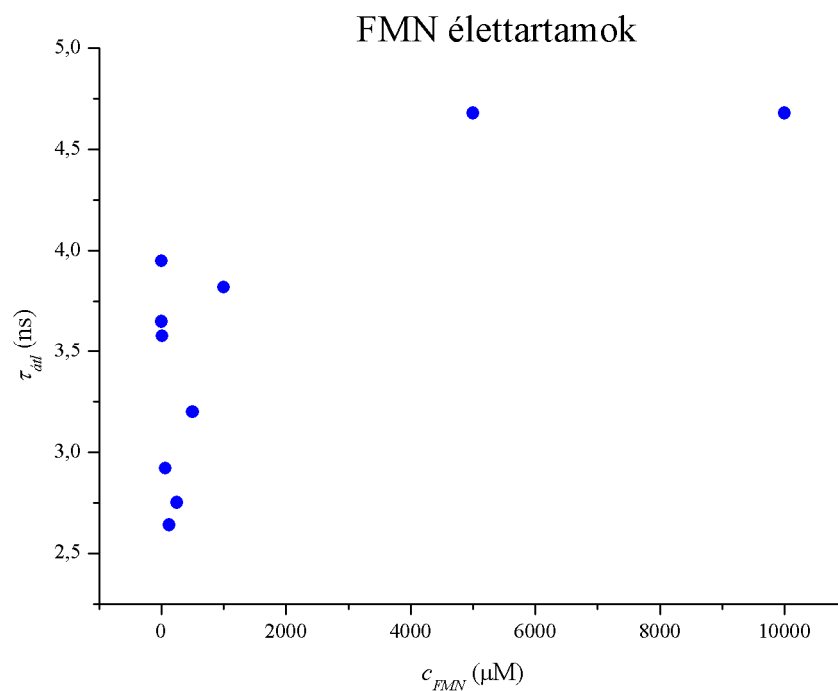


8. ábra

Kiértékelt adatok táblázata (dolgozatom során az élettartam kiértékeléseket a FluoFit nevű programmal végeztem):

c_{FMN} (μM)	$\tau_{\text{átl}}$ (ns)	χ^2	e/t .(ns)
10000	4,68	1,10	0,00
5000	4,68	0,98	0,00
1000	3,82	0,50	-0,86
500	3,20	0,46	-1,48
250	2,75	0,43	-1,93
125	2,64	0,43	-2,03
62,5	2,92	0,46	-1,76
12,5	3,58	0,43	-1,10
2,5	3,95	0,54	-0,72
0,5	3,65	0,72	-1,03

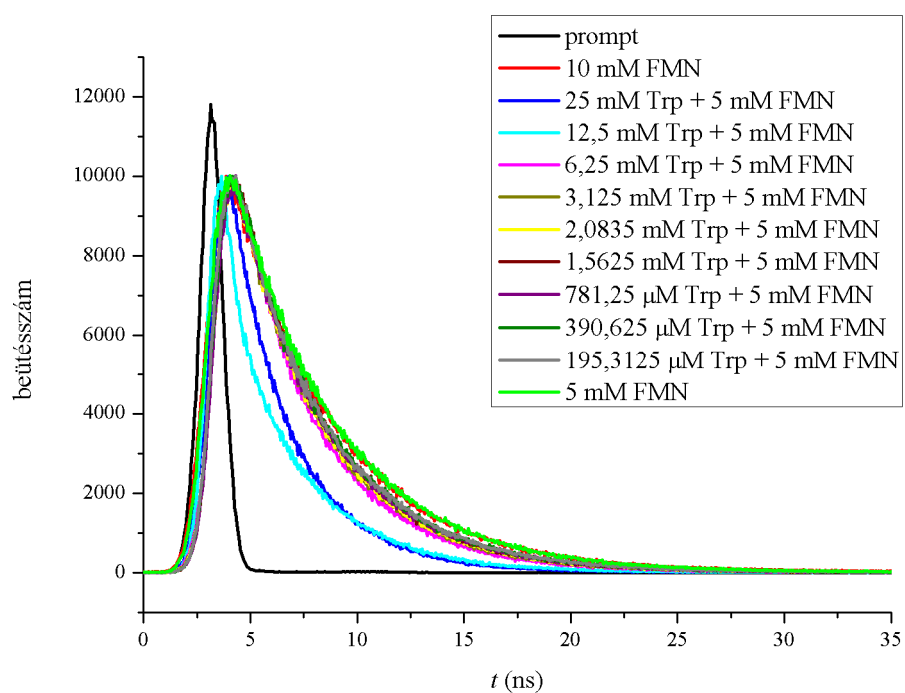
A táblázat grafikonos szemléltetése:



9. ábra

Megfigyelés: az FMN élettartama kezdetben, a koncentráció csökkenésével együtt csökken, majd később növekedni kezd.

FMN+Trp élettartam mérés:

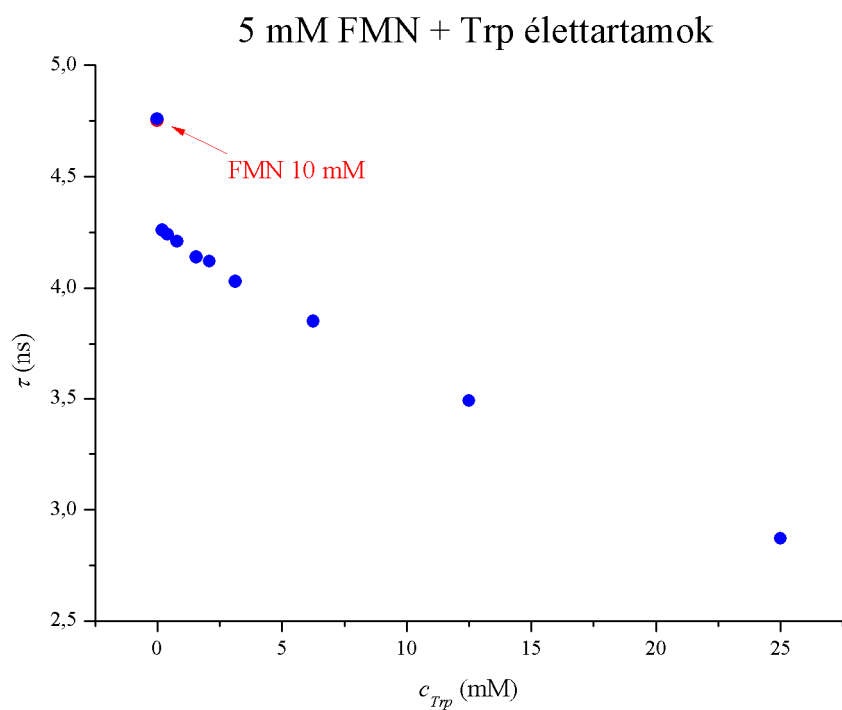


10. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

c_{FMN} (mM)	c_{Trp} (mM)	τ (ns)	χ^2	$elt.$ (ns)	$\Sigma elt.$ (ns)
10	-	4,75	1,60		
5	25	2,87	1,21	-1,89	-1,89
5	12,5	3,49	0,84	-1,27	-1,27
5	6,25	3,85	1,17	-0,90	-0,90
5	3,125	4,03	0,96	-0,72	-0,72
5	2,0835	4,12	0,87	-0,63	-0,64
5	1,5625	4,14	0,86	-0,61	-0,61
5	0,78125	4,21	0,84	-0,55	-0,55
5	0,390625	4,24	0,83	-0,52	-0,52
5	0,1953125	4,26	0,80	-0,50	-0,50
5	-	4,76	1,54		

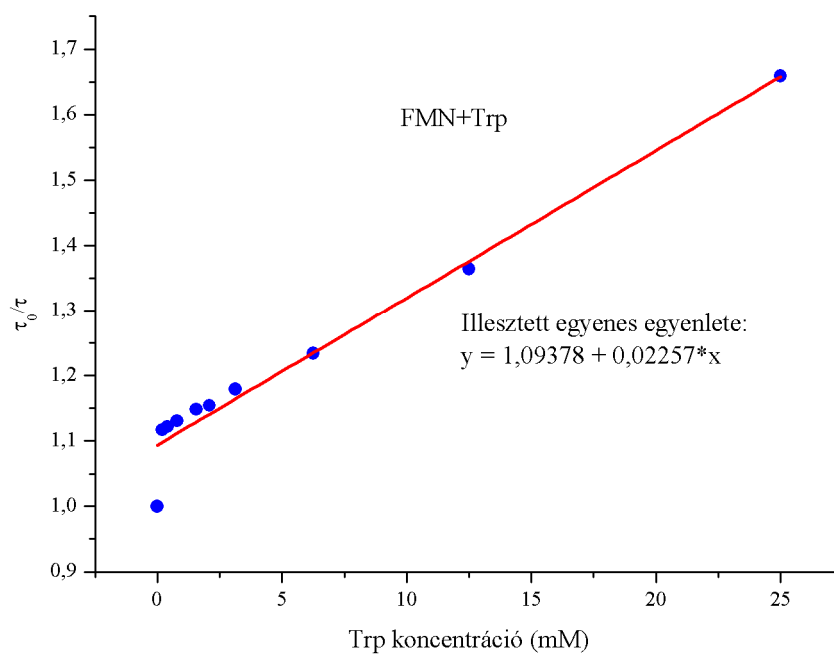
A táblázat grafikonos szemléltetése:



11. ábra

Megfigyelés: minél több Triptofánt adunk az oldathoz, annál jobban lecsökken az fluoreszcencia élettartama.

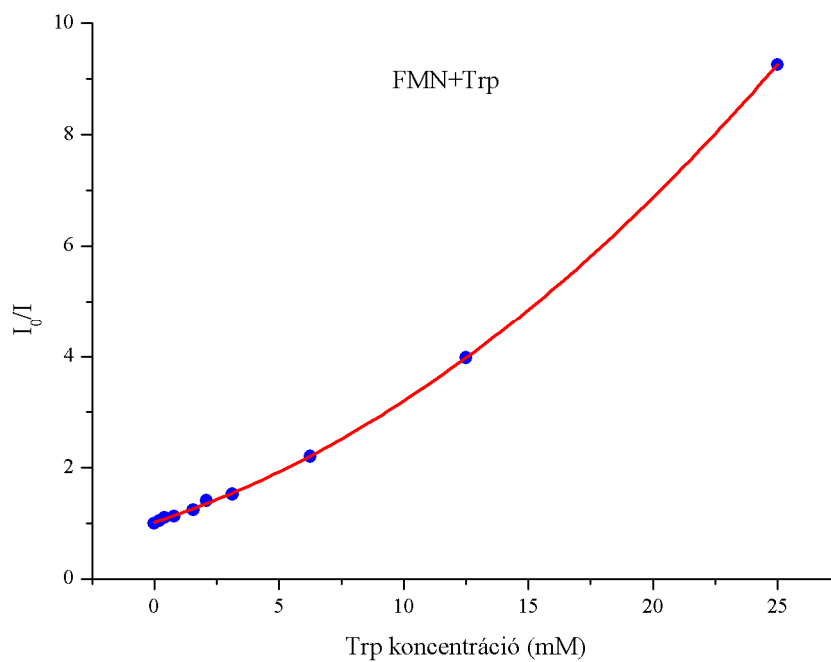
Fluoreszcencia élettartam kioltás FMN+Trp esetén:



12. ábra

Amint látható az élettartamot quencheli a hozzáadott triptofán (ez dinamikus quenchelést jelent, az ütközésekből fakadóan, azaz már gerjesztett molekulákat sugárzás nélkül alapállapotba juttat). A kapott dinamikus Stern-Volmer konstans értéke, az egyenes meredeksége: 0,02257 1/mM.

Fluoreszcencia intenzitás kioltás FMN+Trp esetén:

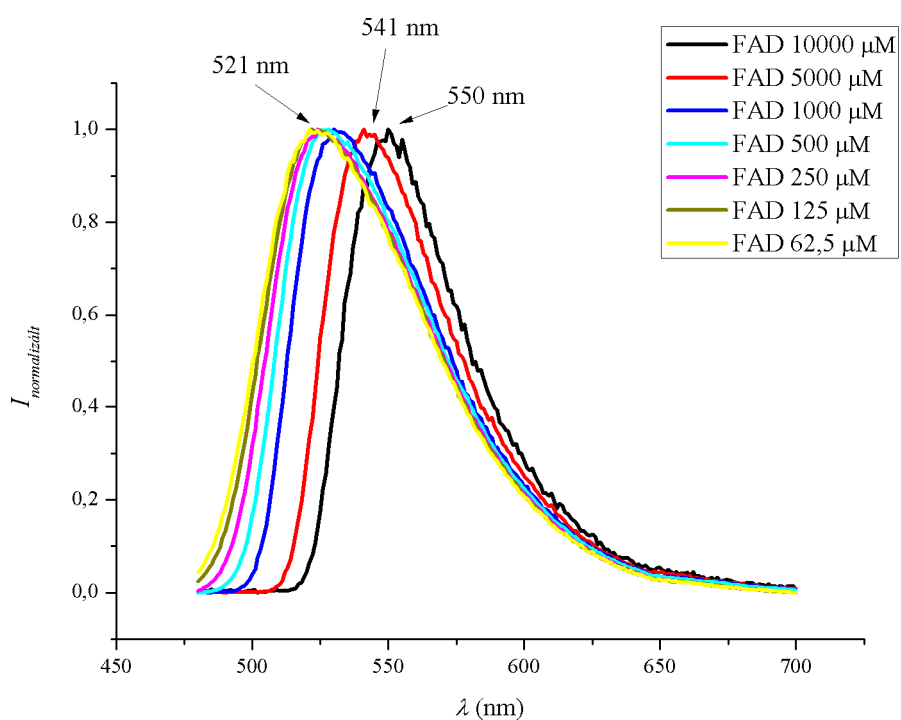


13. ábra

Látható, hogy a kapott grafikon nem egyenes, felfelé ível (ellentétben az élettartam kioltásnál kapottal), ez azért van, mivel bizonyos quenchelő molekulák már a gerjesztéskor olyan közel vannak a quenched molekulákhoz, hogy azok egyből quenchelik őket a gerjesztés után, így azok fluoreszcenciáját már eleve nem észleljük (ezért intenzitás tekintetében erősebb quenchelést kapunk).

b) FAD-al végzett mérések (PBS puffer):

Emissziós mérés:

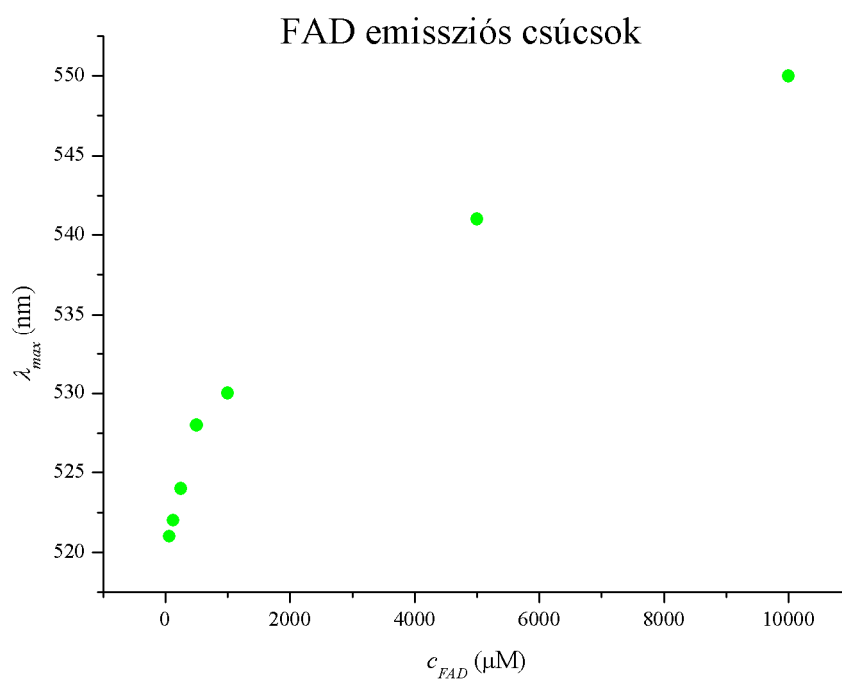


14. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

c_{FAD} (μM)	λ_{max} (nm)	elt. (nm)
10000	550	0
5000	541	-9
1000	530	-20
500	528	-22
250	524	-26
125	522	-28
62,5	521	-29

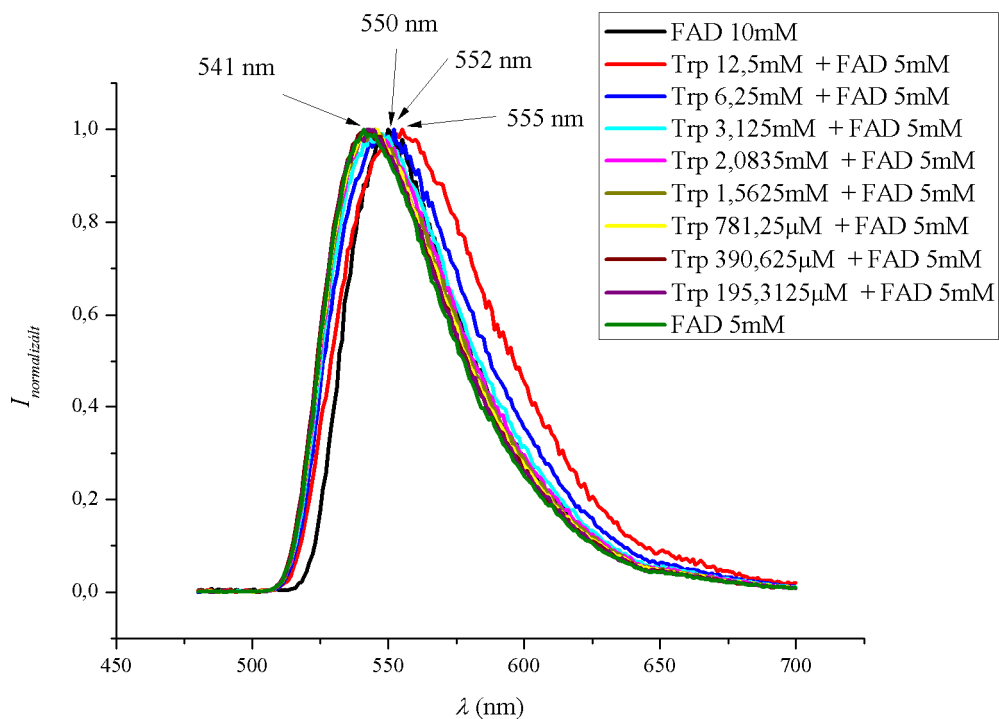
A táblázat grafikonos szemléltetése:



15. ábra

Megfigyelés: ahogy csökken a FAD koncentráció, úgy tolódik az emissziós görbe az ultra-tartomány irányába.

FAD+Trp emissziós mérés:

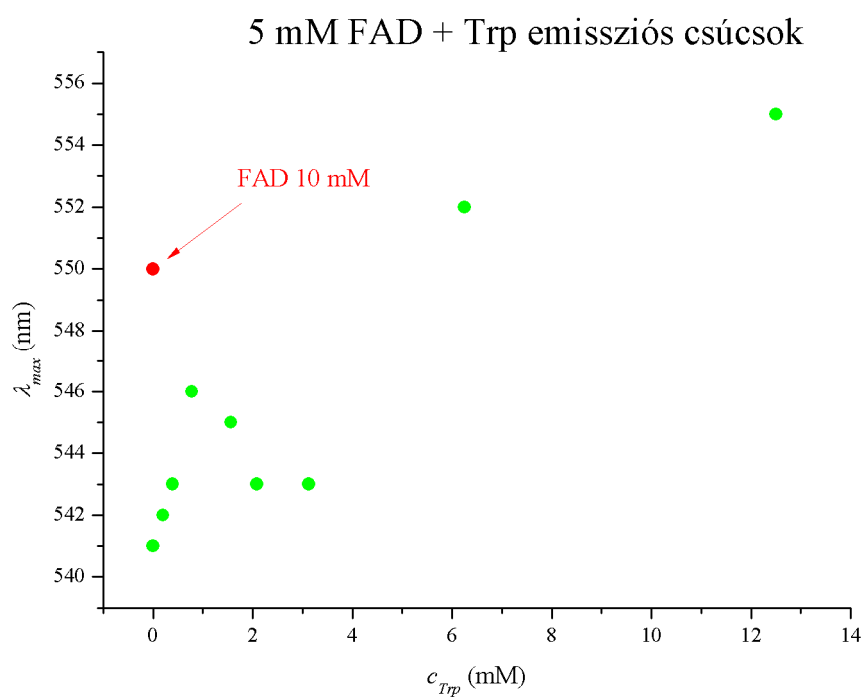


16. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

c_{FAD} (mM)	c_{Trp} (mM)	λ_{max} (nm)	$elt.$ (nm)	$\Sigma elt.$ (nm)
10	-	550		
5	12,5	555	5	14
5	6,25	552	2	11
5	3,125	543	-7	2
5	2,0835	543	-7	2
5	1,5625	545	-5	4
5	0,78125	546	-4	5
5	0,390625	543	-7	2
5	0,1953125	542	-8	1
5	-	541		

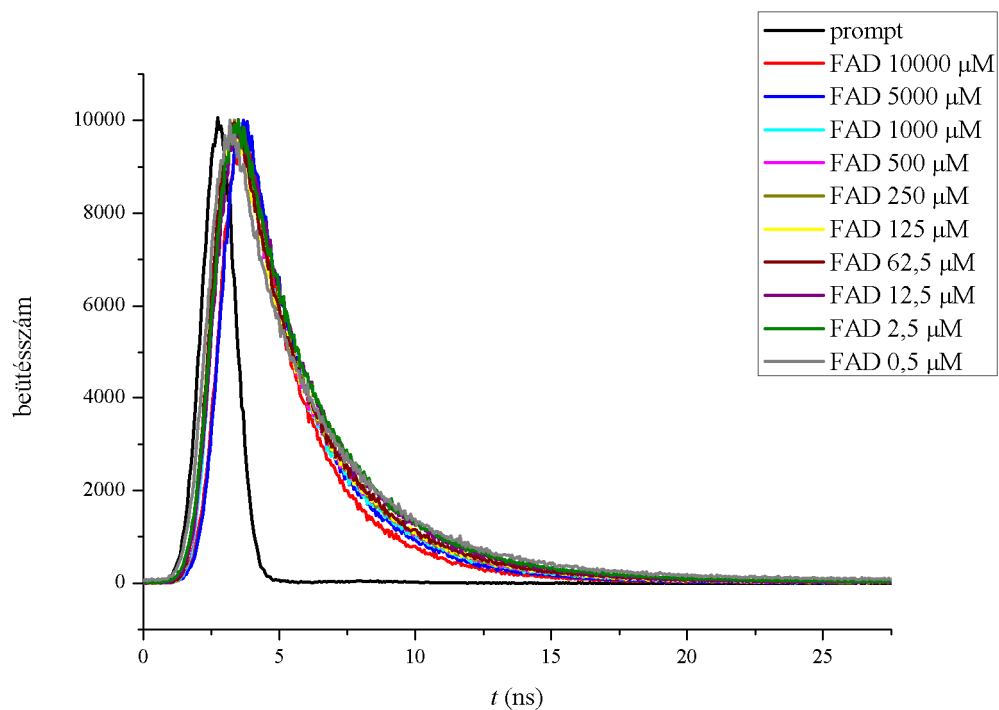
A táblázat grafikonos szemléltetése:



17. ábra

Megfigyelés: a hozzáadott triptofán az emissziós görbét az infra-tartomány irányába tolja. Minél több triptofánt adtunk az oldathoz, annál erősebb az eltolás mértéke.

FAD élettartam mérés:

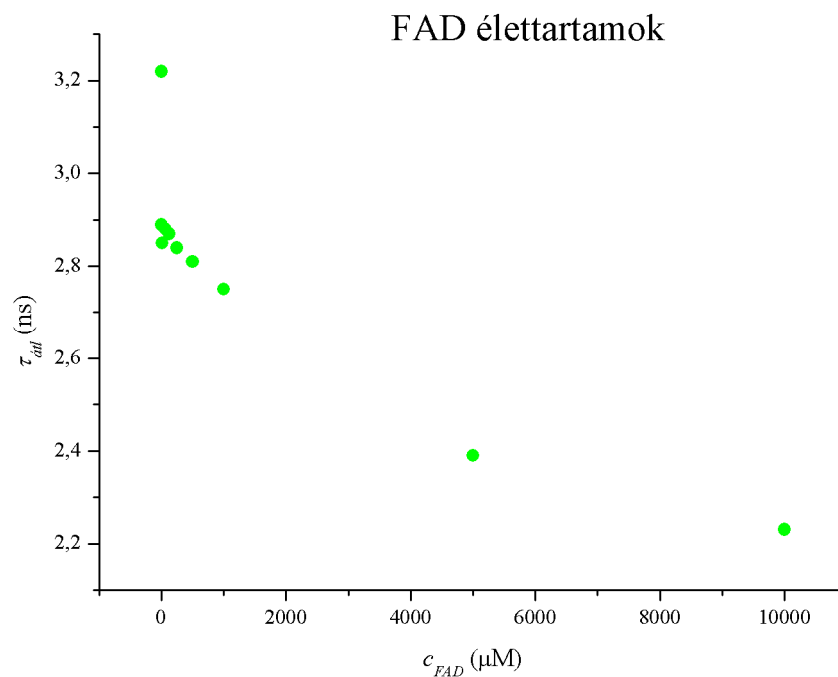


18. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

$c_{FAD} (\mu\text{M})$	$\tau_{\text{átl}} (\text{ns})$	χ^2	$elt. (\text{ns})$
10000	2,23	1,02	0,00
5000	2,39	0,70	0,16
1000	2,75	0,86	0,52
500	2,81	0,78	0,58
250	2,84	0,87	0,61
125	2,87	0,99	0,64
62,5	2,88	1,08	0,65
12,5	2,85	0,69	0,62
2,5	2,89	1,00	0,66
0,5	3,22	1,06	0,99

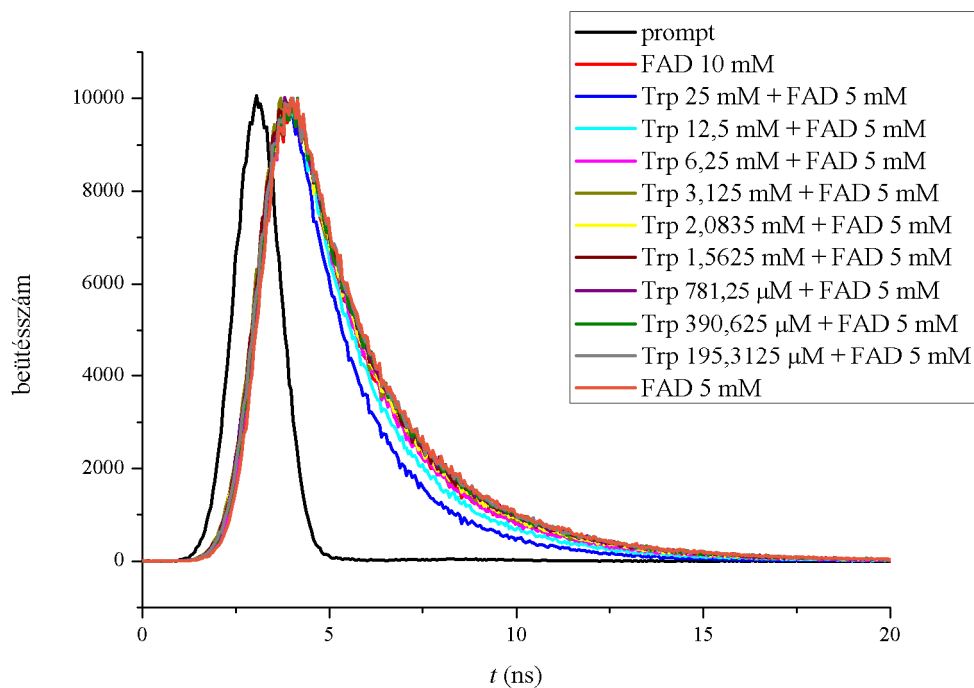
A táblázat grafikonos szemléltetése:



19. ábra

Megfigyelés: a FAD koncentráció csökkenésével az élettartam nő.

FAD+Trp élettartam mérés:

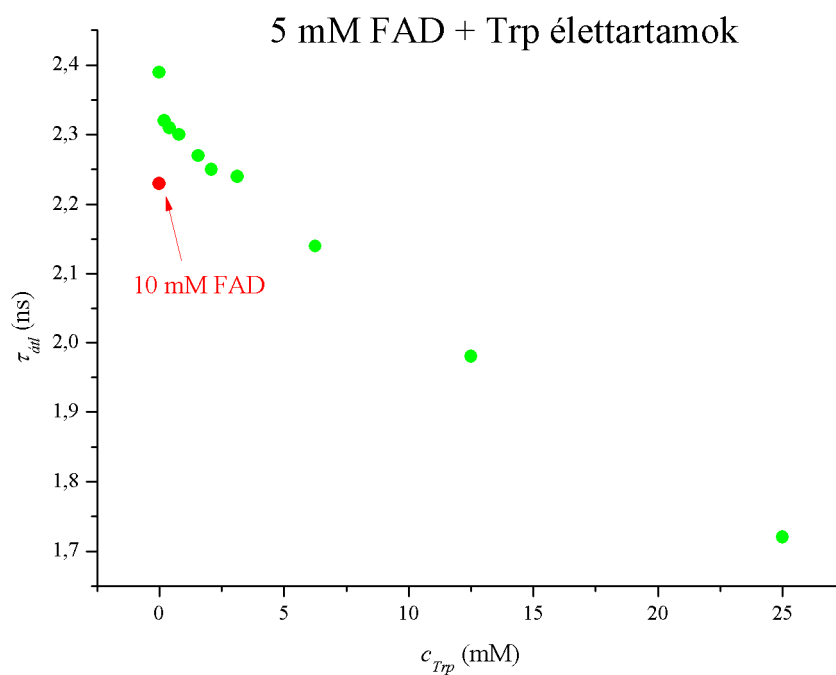


20. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

c_{FAD} (mM)	c_{Trp} (mM)	$\tau_{\text{átl}}$ (ns)	χ^2	elt. (ns)	$\Sigma \text{elt. (ns)}$
10	-	2,23	1,02		
5	25	1,72	0,91	-0,51	-0,67
5	12,5	1,98	0,89	-0,25	-0,41
5	6,25	2,14	0,80	-0,09	-0,24
5	3,125	2,24	0,74	0,00	-0,15
5	2,0835	2,25	0,69	0,02	-0,14
5	1,5625	2,27	0,67	0,04	-0,12
5	0,78125	2,30	0,72	0,07	-0,09
5	0,390625	2,31	0,66	0,08	-0,07
5	0,195312	2,32	0,71	0,09	-0,06
5	-	2,39	0,71		

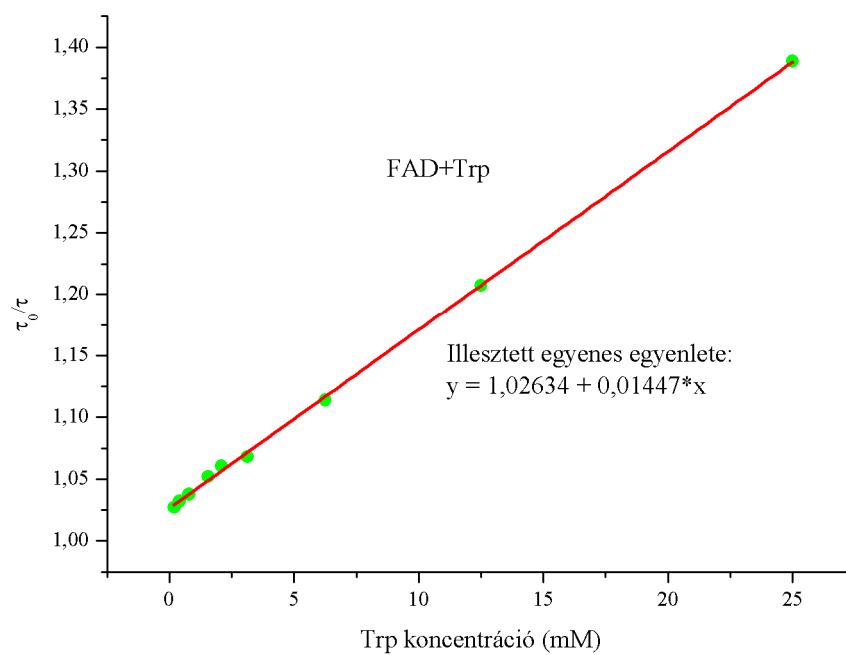
A táblázat grafikonos szemléltetése:



21. ábra

Megfigyelés: minél több Triptofánt adunk az oldathoz, az élettartam annál jobban lecsökken.

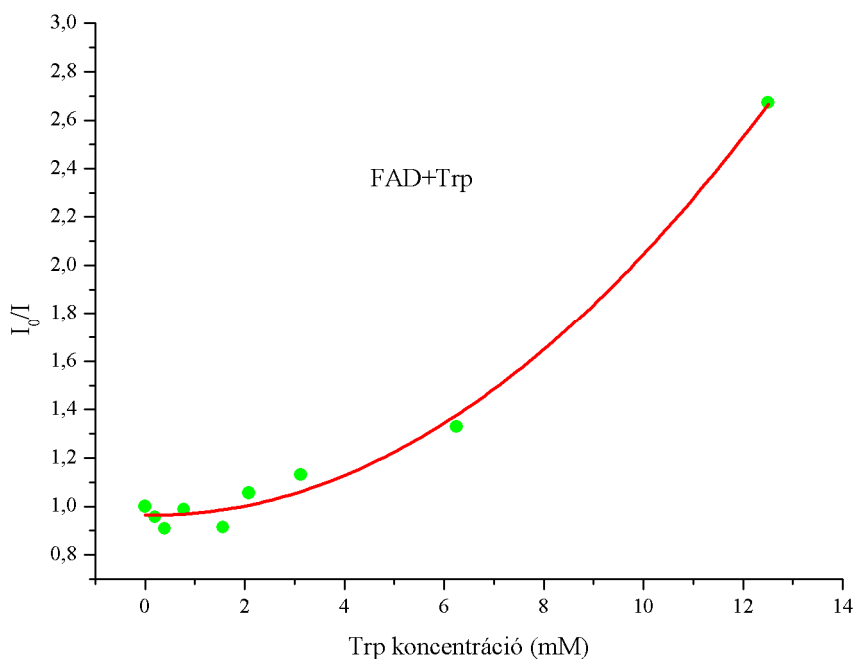
Fluoreszcencia élettartam kioltás FAD+Trp esetén:



22. ábra

Amint látható az élettartamot quencheli a hozzáadott triptofán (ez dinamikus quenchelést jelent, az ütközésekből fakadóan, azaz már gerjesztett molekulákat sugárzás nélkül alapállapotba juttat). A kapott dinamikus Stern-Volmer konstans értéke, az egyenes meredeksége: 0,01447 1/mM.

Fluoreszcencia intenzitás kioltás FMN+Trp esetén:



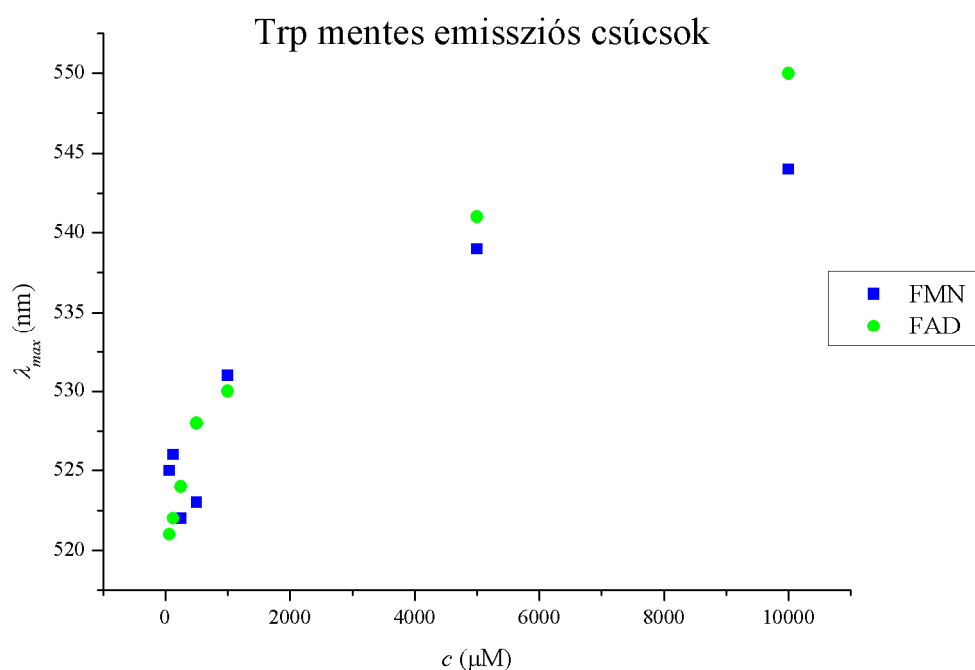
23. ábra

Látható, hogy a kapott grafikon nem egyenes, felfelé ível (ellentétben az élettartam kioltásnál kapottal), ez azért van, mivel bizonyos quenchelő molekulák már a gerjesztéskor olyan közel vannak a quenched molekulákhoz, hogy azok egyből quenchelik őket a gerjesztés után, így azok fluoreszcenciáját már eleve nem észleljük (ezért intenzitás tekintetében erősebb quenchelést kapunk).

c) Mérések összevetése

Triptofán mentes emissziós mérések:

FMN			FAD		
c_{FMN} (μ M)	λ_{max} (nm)	elt. (nm)	c_{FAD} (μ M)	λ_{max} (nm)	elt. (nm)
10000	544	0	10000	550	0
5000	539	-5	5000	541	-9
1000	531	-13	1000	530	-20
500	523	-21	500	528	-22
250	522	-22	250	524	-26
125	526	-18	125	522	-28
62,5	525	-19	62,5	521	-29

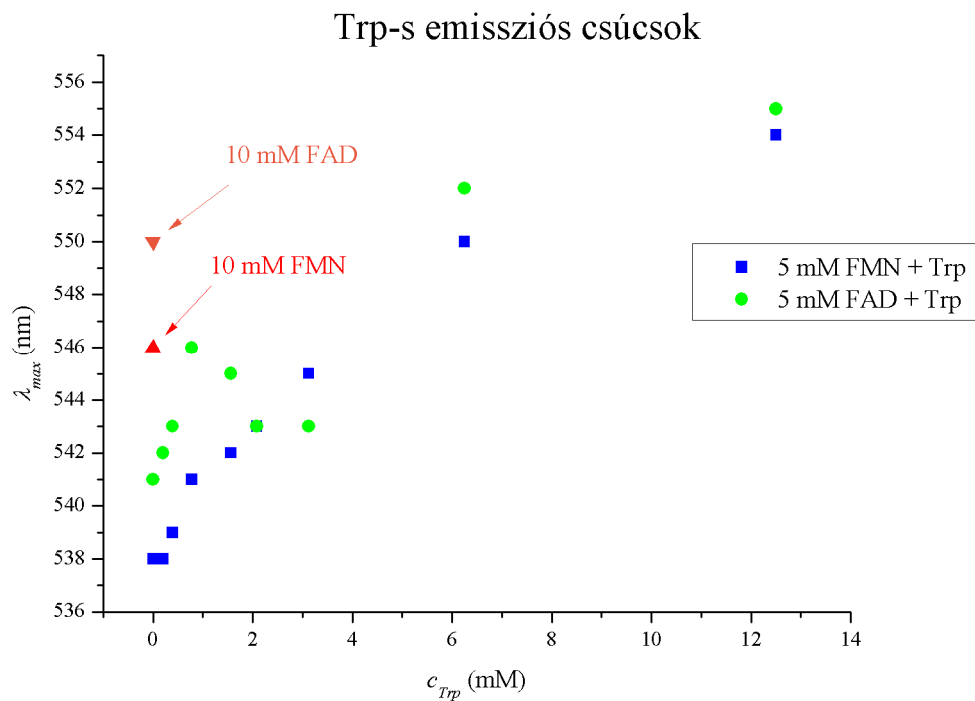


24. ábra

Megfigyelés: a FAD, ahogy csökken a koncentráció, úgy erősebben tolódik az ultra-tartomány irányába, mint az FMN.

Triptofános emissziós mérések:

FMN					FAD				
$c_{\text{FMN}}(\text{mM})$	$c_{\text{Trp}}(\text{mM})$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\text{elt.}(\text{nm})$	$\Sigma \text{elt.}(\text{nm})$	$c_{\text{FAD}}(\text{mM})$	$c_{\text{Trp}}(\text{mM})$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\text{elt.}(\text{nm})$	$\Sigma \text{elt.}(\text{nm})$
10	-	546			10	-	550		
5	12,5	554	8	16	5	12,5	555	5	14
5	6,25	550	4	12	5	6,25	552	2	11
5	3,125	545	-1	7	5	3,125	543	-7	2
5	2,0835	543	-3	5	5	2,0835	543	-7	2
5	1,5625	542	-4	4	5	1,5625	545	-5	4
5	0,78125	541	-5	3	5	0,78125	546	-4	5
5	0,390625	539	-7	1	5	0,390625	543	-7	2
5	0,1953125	538	-8	0	5	0,1953125	542	-8	1
5	-	538			5	-	541		

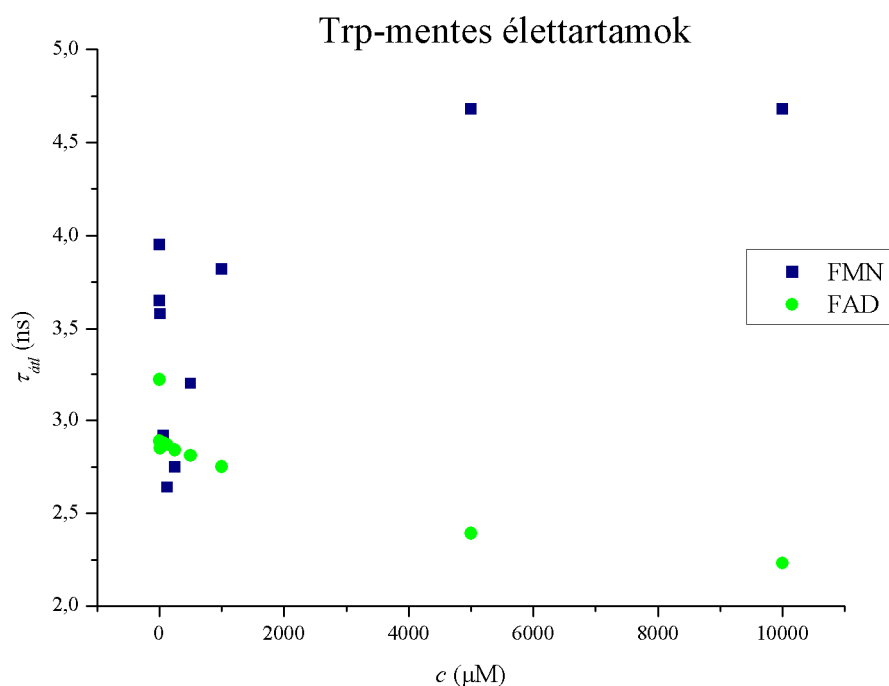


25. ábra

Megfigyelés: az FMN-t a hozzáadott triptofán jobban tolja az infra-tartomány irányába, mint a FAD-ot.

Triptofán-mentes élettartam mérések:

FMN			FAD		
c_{FMN} (μ M)	τ (ns)	$elt.$ (ns)	c_{FAD} (μ M)	$\tau_{átl}$ (ns)	$elt.$ (ns)
10000	4,68	0,00	10000	2,23	0,00
5000	4,68	0,00	5000	2,39	0,16
1000	3,82	-0,86	1000	2,75	0,52
500	3,20	-1,48	500	2,81	0,58
250	2,75	-1,93	250	2,84	0,61
125	2,64	-2,03	125	2,87	0,64
62,5	2,92	-1,76	62,5	2,88	0,65
12,5	3,58	-1,10	12,5	2,85	0,62
2,5	3,95	-0,72	2,5	2,89	0,66
0,5	3,65	-1,03	0,5	3,22	0,99

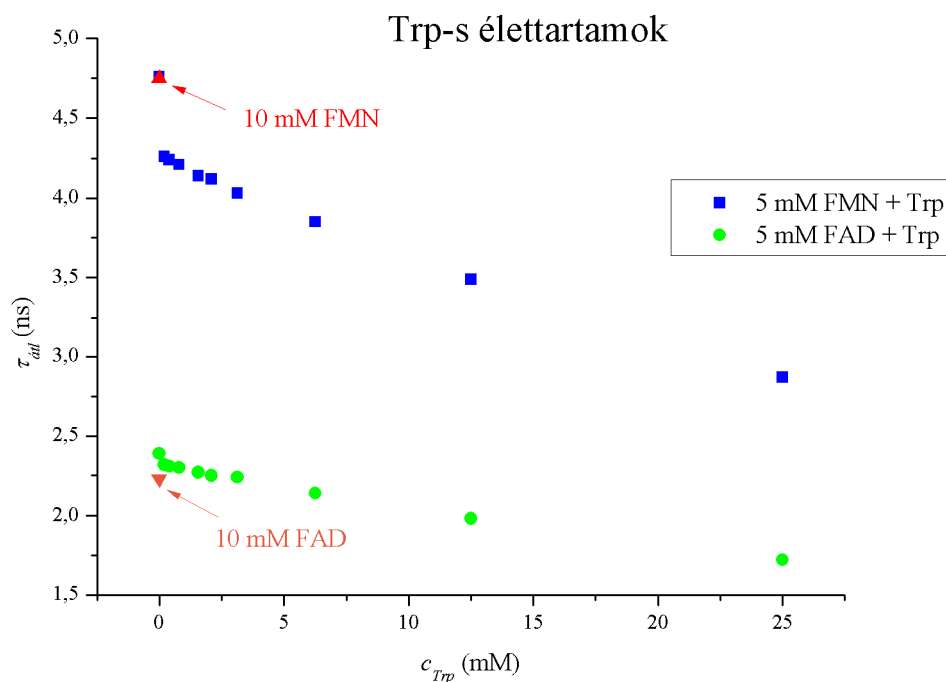


26. ábra

Megfigyelés: a két anyag élettartama másképp változik a koncentráció változás során: az FMN élettartama általában elmondható, hogy csökken, míg a FAD-é nő, ha a koncentrációt csökkentjük.

Triptofános élettartam mérések:

FMN					FAD				
c_{FMN} (mM)	c_{Trp} (mM)	τ (ns)	$elt.$ (ns)	$\Sigma elt.$ (ns)	c_{FAD} (mM)	c_{Trp} (mM)	τ_{dtl} (ns)	$elt.$ (ns)	$\Sigma elt.$ (ns)
10	-	4,75			10	-	2,23		
5	25	2,87	-1,89	-1,89	5	25	1,72	-0,51	-0,67
5	12,5	3,49	-1,27	-1,27	5	12,5	1,98	-0,25	-0,41
5	6,25	3,85	-0,90	-0,90	5	6,25	2,14	-0,09	-0,24
5	3,125	4,03	-0,72	-0,72	5	3,125	2,24	0,00	-0,15
5	2,0835	4,12	-0,63	-0,64	5	2,0835	2,25	0,02	-0,14
5	1,5625	4,14	-0,61	-0,61	5	1,5625	2,27	0,04	-0,12
5	0,78125	4,21	-0,55	-0,55	5	0,78125	2,30	0,07	-0,09
5	0,390625	4,24	-0,52	-0,52	5	0,390625	2,31	0,08	-0,07
5	0,1953125	4,26	-0,50	-0,50	5	0,195312	2,32	0,09	-0,06
5	-	4,76			5	-	2,39		



27. ábra

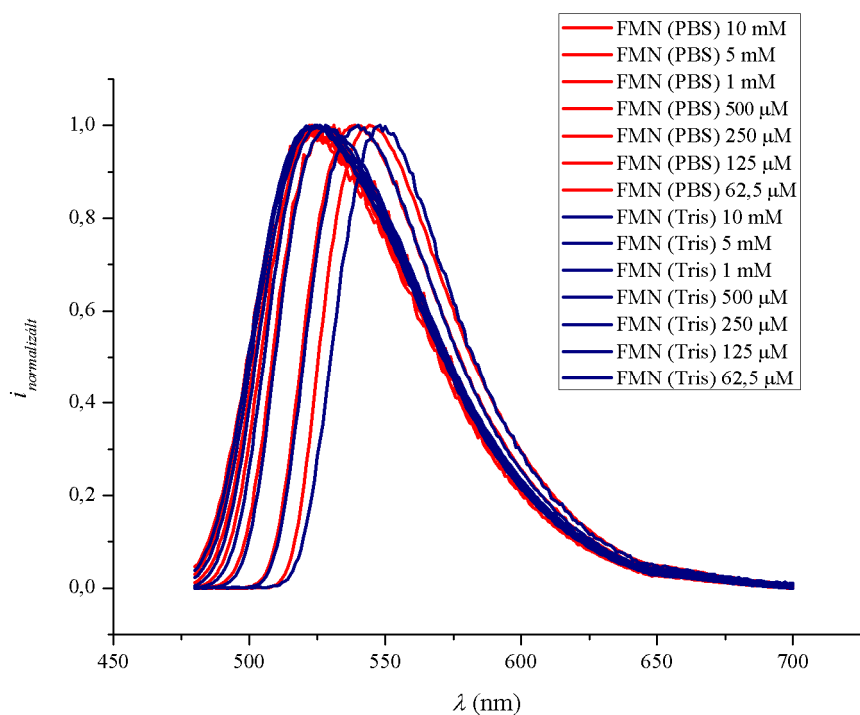
Megfigyelés: a Triptofán az FMN élettartamot jobban lecsökkenti, mint a FAD élettartamot.

2. Mérések Tris pufferben:

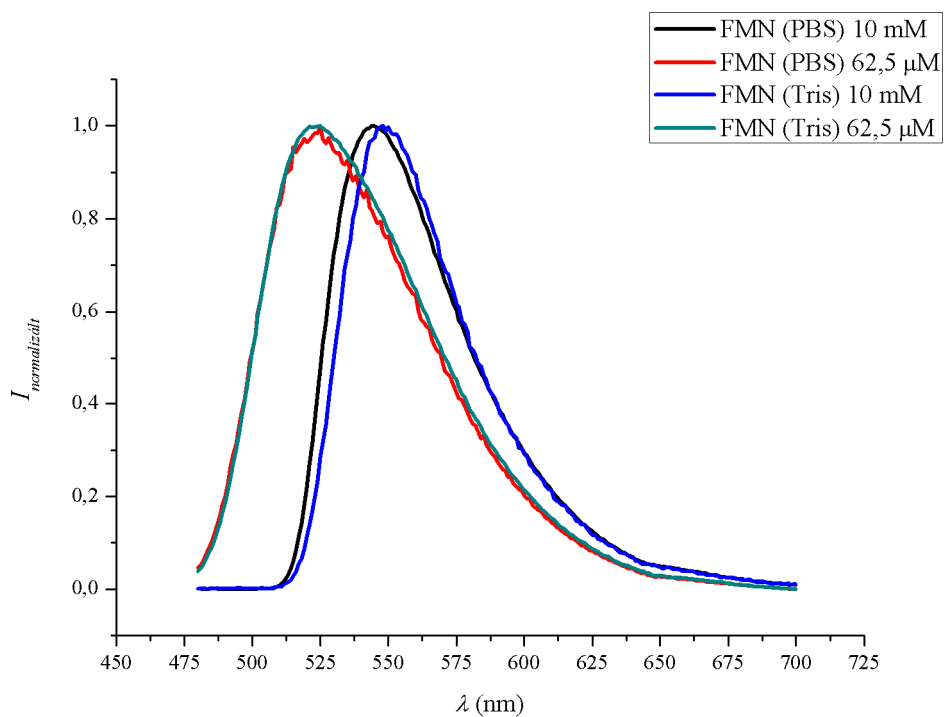
Az elvégzett emissziós méréseket megismételttem PBS (pH: 7.0) puffer helyett Tris (p: 7.33) puffert használva, hogy ellenőrizzem, hogy a méréseket a puffer típusa befolyásolja-e.

A PBS-Tris mérés sorozat párokat egy grafikonra tettem, hogy össze lehessen őket hasonlítani (megjegyzés: Tris-es mérések esetén a görbe eltolódás a koncentráció változás során ugyanabba az irányba történt, mint a PBS mérések esetén, így a grafikonokon külön színnel nincsenek jelölve, hogy melyik görbe melyik koncentrációhoz tartozik, mivel a minden mérést tartalmazó grafikonok csak átfogó, és könnyen átlátható képet akarnak adni arról, hogy a kétféle puffer más mértékben hat-e az oldatokra). Az átláthatóság kedvéért a szélső koncentrációkat külön is ábrázoltam, jelölve a különböző koncentrációkat is.

FMN-es mérések:



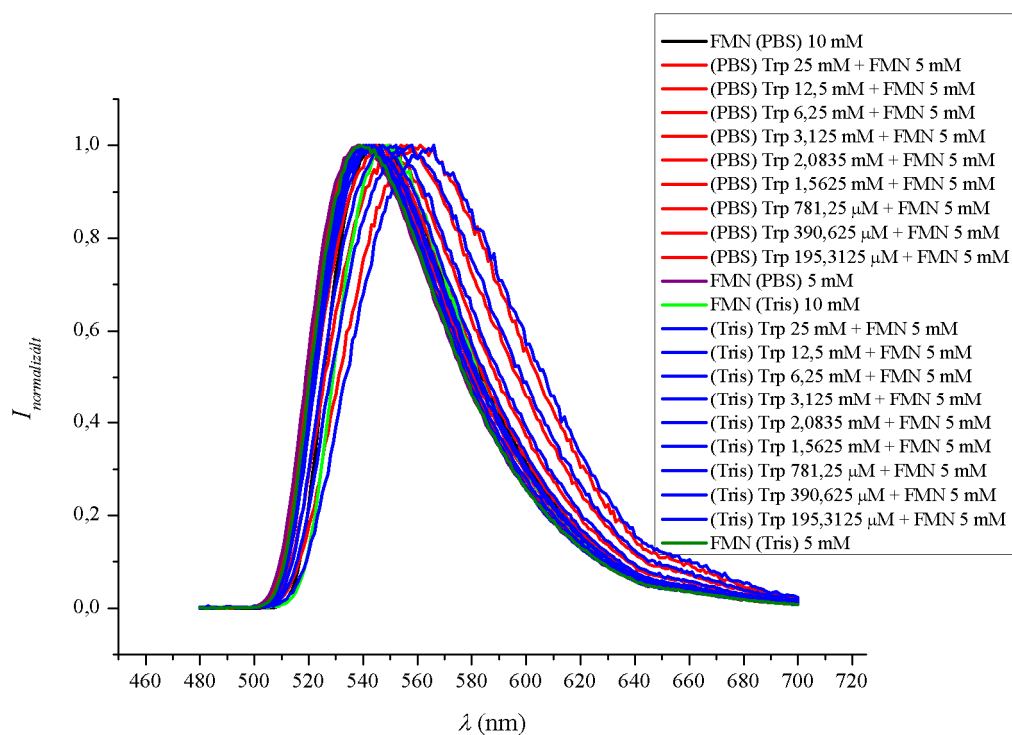
28. ábra



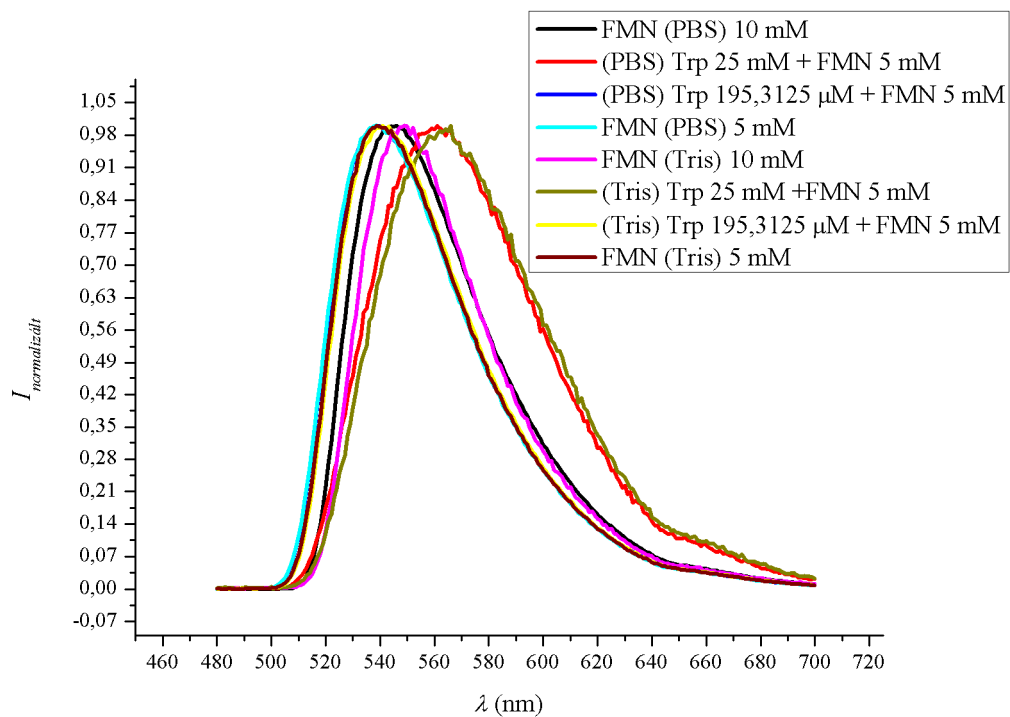
29. ábra

Megfigyelés: látható, hogy a két puffer használata közt nincs érdembeli különbség.

FMN+Trp-s mérések:



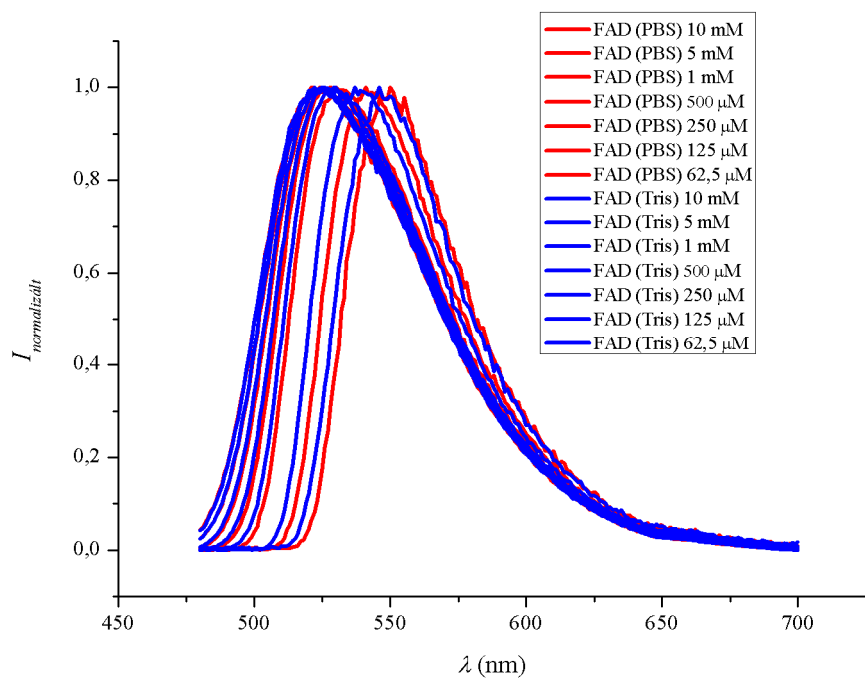
30. ábra



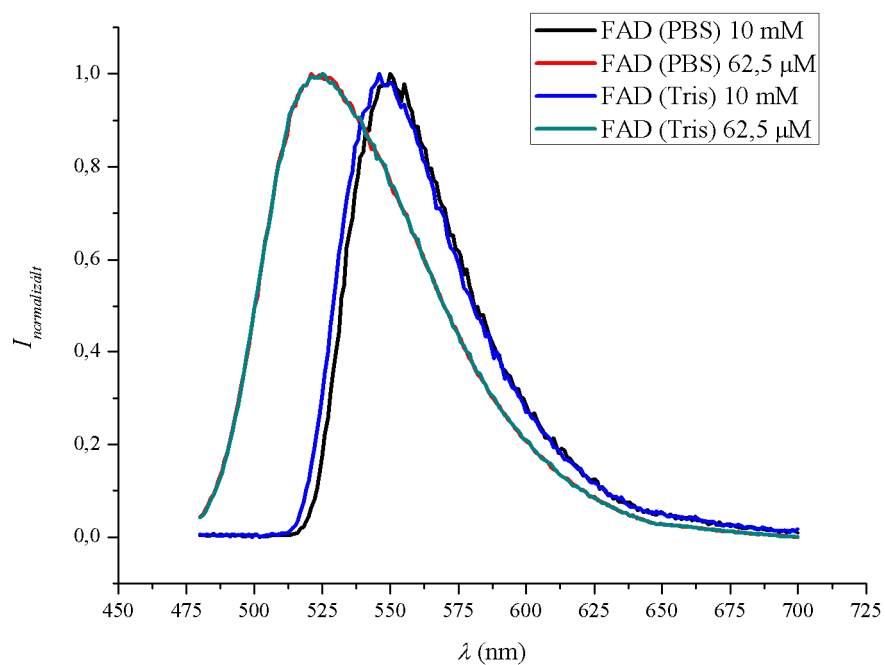
31. ábra

Megfigyelés: látható, hogy a két puffer használata közt nincs érdembeli különbség.

FAD-os mérések:



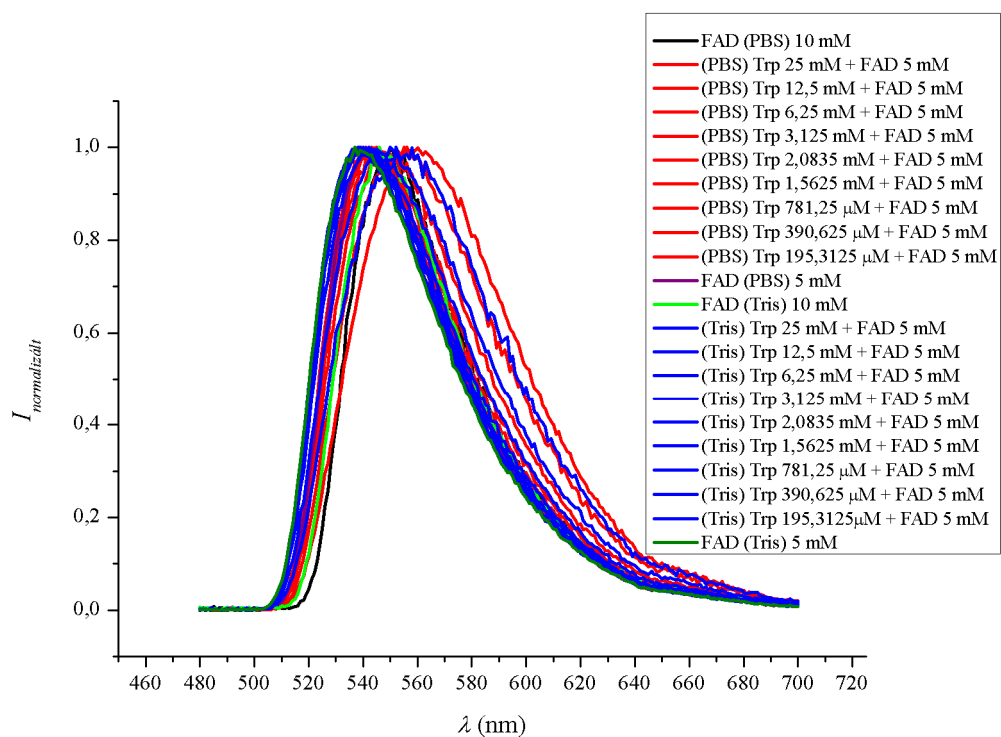
32. ábra



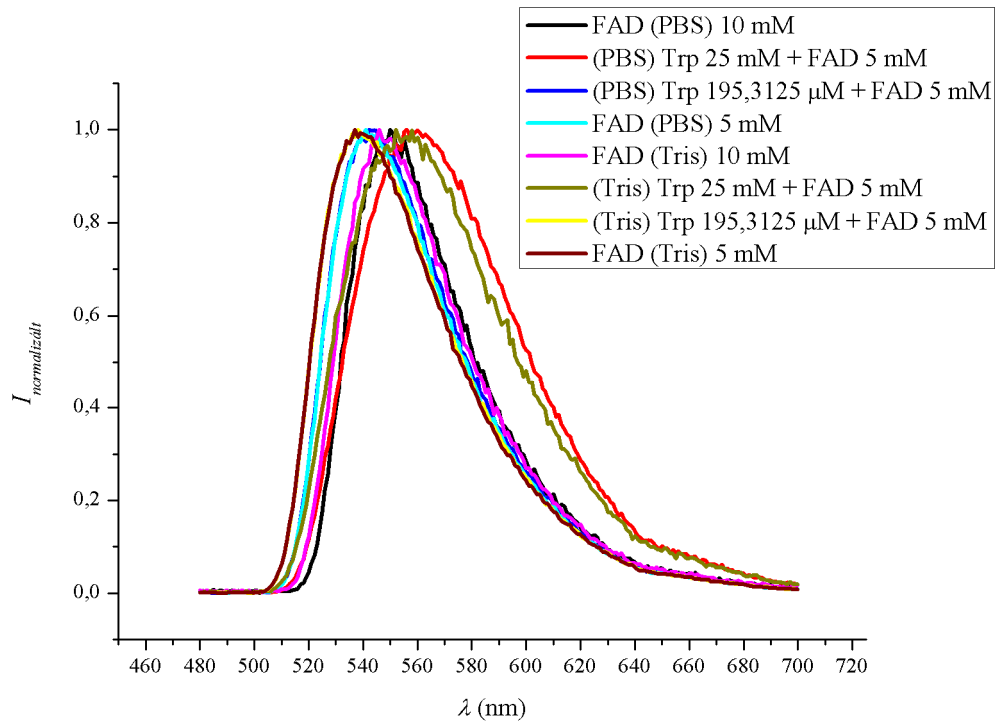
33. ábra

Megfigyelés: látható, hogy a két puffer használata közt nincs érdembeli különbség.

FAD+Trp-s mérések:



34. ábra

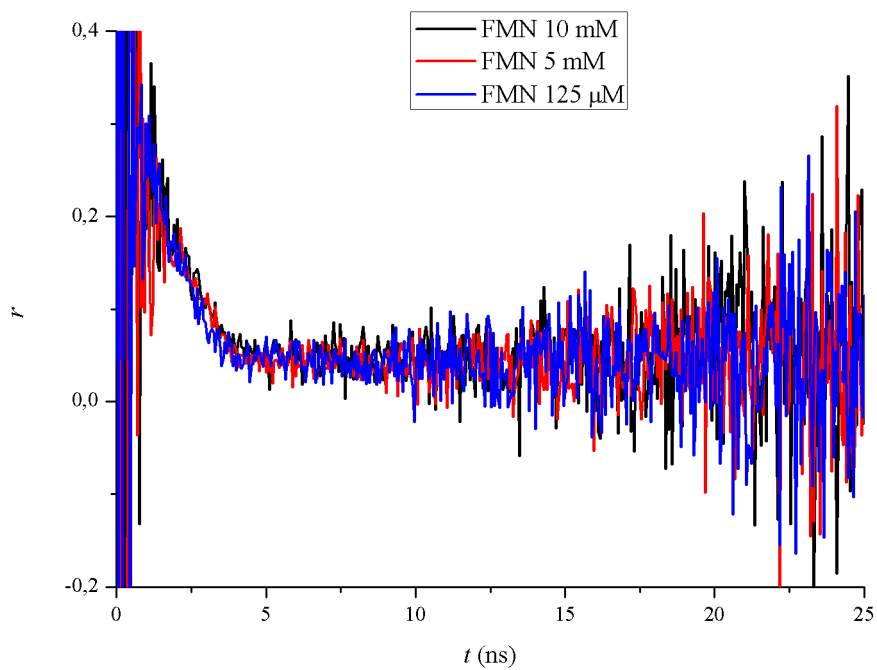


35. ábra

Megfigyelés: látható, hogy a két puffer használata közt nincs érdembeli különbség.

3. Anizotrópiás mérések:

FMN:

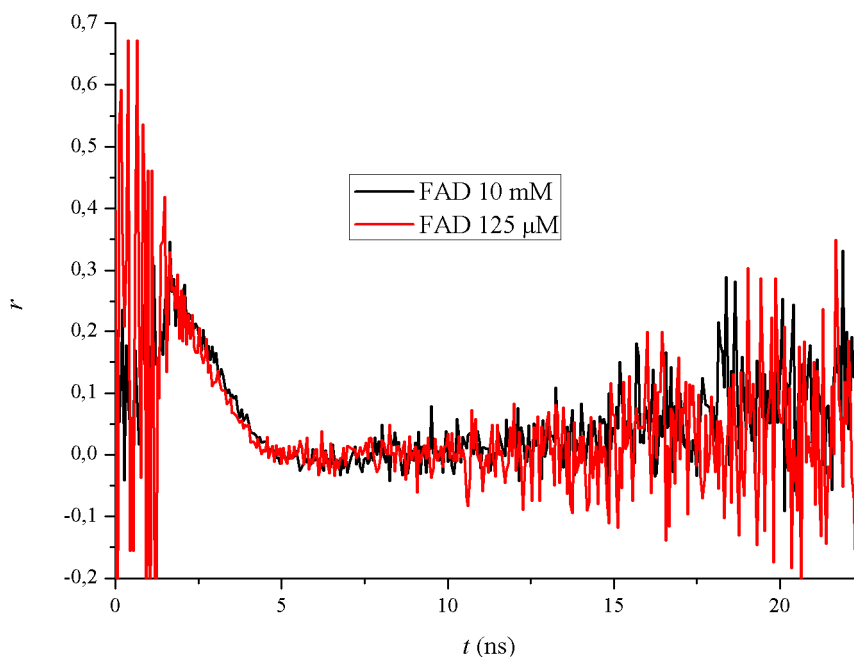


36. ábra

Megjegyzés: mivel az anizotrópia lecsengés időbeliségére voltam kíváncsi, így a görbéket az y-tengely mentén az összehasonlíthatóság végett egymásba shifteltem.

Megfigyelés: az anizotrópia lecsengést láthatólag nem befolyásolja a koncentráció.

FAD:



37. ábra

Megfigyelés: az anizotrópia lecsengést láthatólag nem befolyásolja a koncentráció.

V. Összegzés, megállapítások:

FMN és FAD esetén is az emissziós görbe a koncentráció csökkenésével az ultratartomány irányába tolódik (ennek oka lehet, hogy koncentrált állapotban dimereket képeznek magukkal, megváltoztatva az energia szint átmenetek nagyságát). Ha Triptofánt adunk az oldatokhoz, a görbék az infratartomány irányába tolódnak. Az élettartam mérések azt mutatták, hogy a koncentráció változásra másképp reagál az FMN és a FAD molekula: FMN élettartama általában véve csökken, ha a koncentrációja csökken, FAD esetén pedig növekedés figyelhető meg (FAD esetén ennek oka, hogy koncentrált állapotban az adenin gyűrűje közel zárul a FAD törzsi részéhez, és így képes elektron transzferre, meggyorsítva a lecsengést). A hozzáadott Triptofán mindkét anyag élettartamát lecsökkenti. A mérésekben nem játszott döntő szerepet a használt puffer. FMN, és FAD anizotrópiás lecsengési ideje nem függ a koncentrációjuktól (tehát, ha van is dimer képződés, annak nincs hatása anizotrópiás mérésekre: a dimerképződés nem változtatja meg a forgásszimmetriát).

Forrásjegyzék:

[1] Lukacs et al., J. Phys. Chem. B, 2013