

**Flavinok fotofizikájának vizsgálata spektroszkópai  
módszerekkel**

TDK dolgozat

Készítette: Karádi Kristóf

PTE TTK Fizika szak

Témavezető: Dr. Lukács András

PTE ÁOK Biofizika Intézet

Pécs

2014

# Tartalomjegyzék:

I. Függelék (3)

I.: Összefoglalás (absztrakt) (4)

II.: Bevezetés, és problémafelvetés (4)

III.: Mérési körülmények (6)

1. A mérés során használt anyagok listája (6)

2. A mérési beállításokról (6)

IV.: Mérési eredmények bemutatása (7)

1. Emissziós és élettartam mérések PBS pufferben (7)

a) Mérések FMN-el (7)

b) Mérések FAD-al (17)

c) Mérések összevetése (26)

2. Mérések Tris pufferben (30)

3. Anizotrópiás mérések (35)

V.: Összegzés, megállapítások (36)

Forrásjegyzék (36)

# 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.

## **A dolgozat lezárásának dátuma:**

2015.01.05. (megjegyzés: ez a formai módosítások utáni lezárás ideje, tartalmi módosítás a házi védés után nem történt)

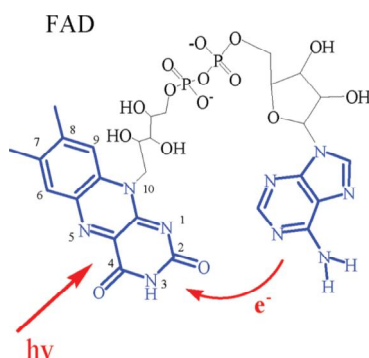
# I. Összefoglalás (absztrakt)

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.

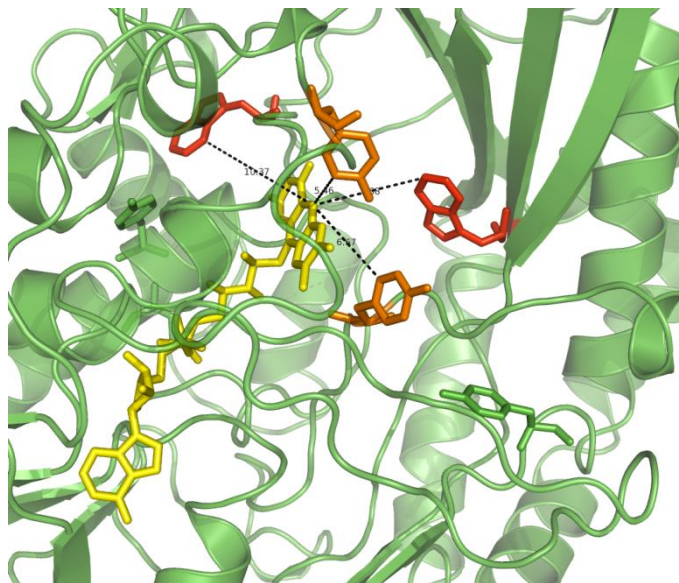
## II. Bevezetés és problémafelvetés

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 [1] Li et al, J Phys Chem B. 2009.

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

A 2. 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 ([2] 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:

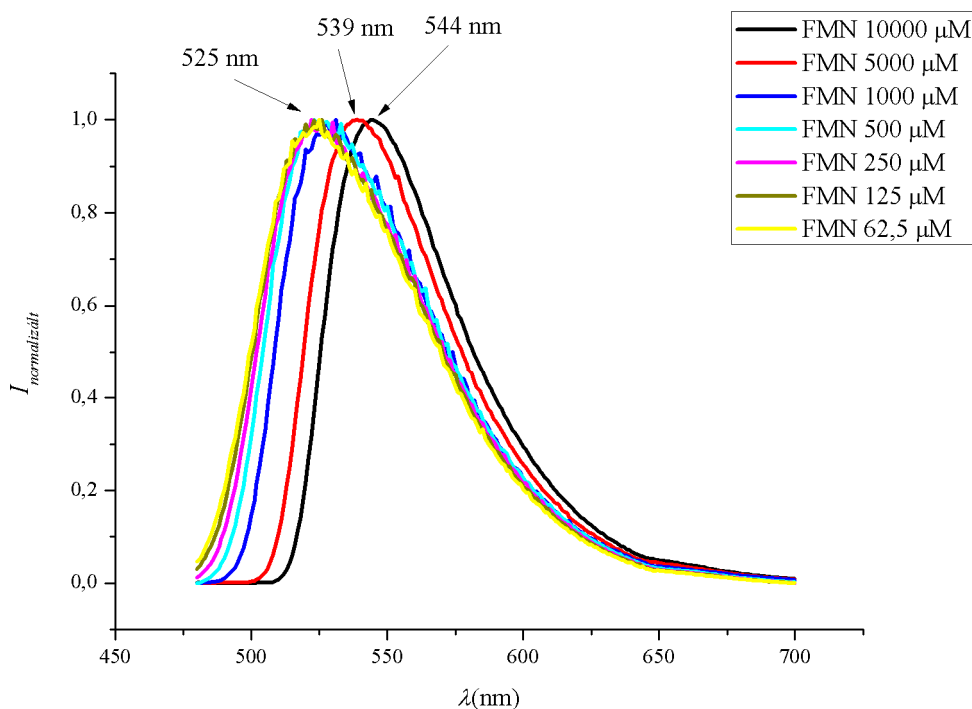
Horiba Jobin Yvon NanoLog készülékkel, a gerjesztés 450 nm-en történt, impulzus üzemű LED-et használva (impulzus szélesség 1,2 ns), a detektor 900 V-on üzemelt. A megfigyelt hullámhossz 540 nm volt (kivéve prompt, ahol a szórás mértem 450 nm-en), a mérések addig zajlottak, amíg a két polarizációs irány 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:

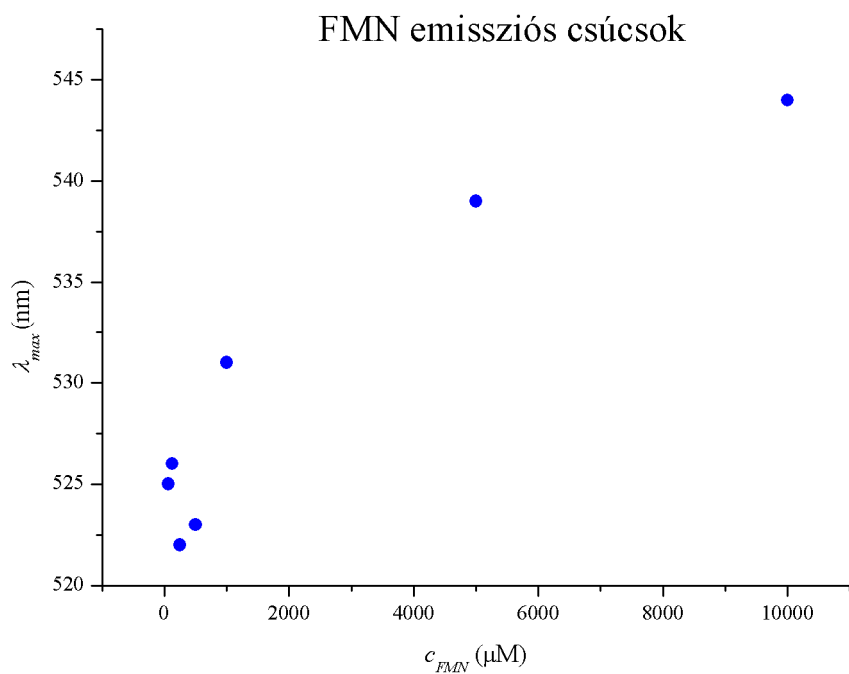


4. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

| $c_{FMN}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\lambda_{max}$ (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         |

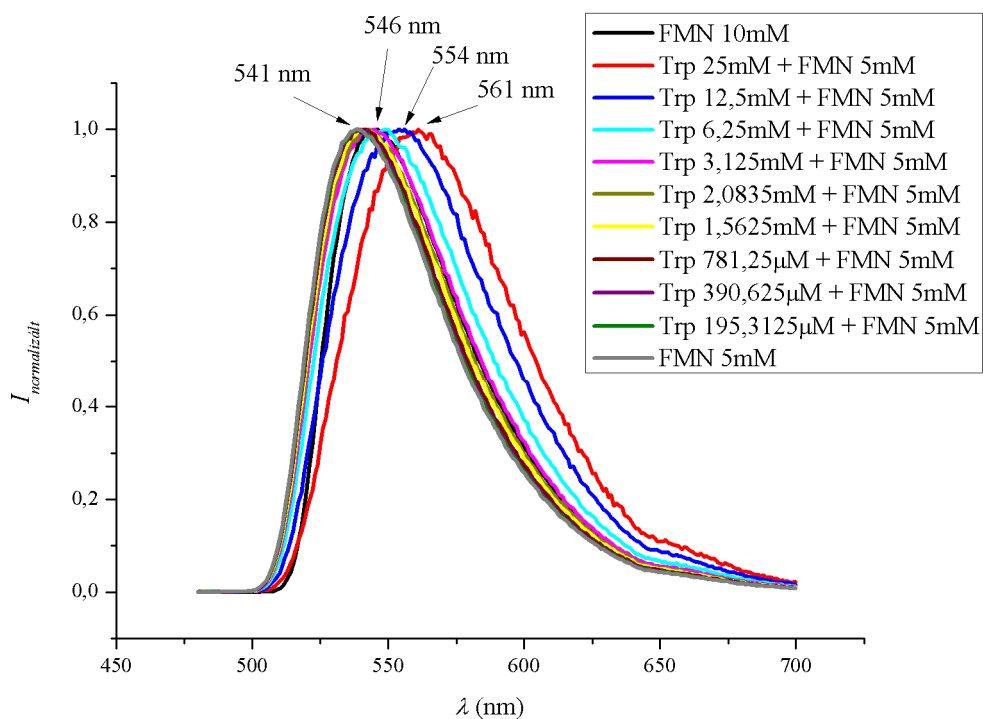
A táblázat grafikonos szemléltetése:



5. ábra

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

FMN+Trp emissziós mérés:



6. ábra

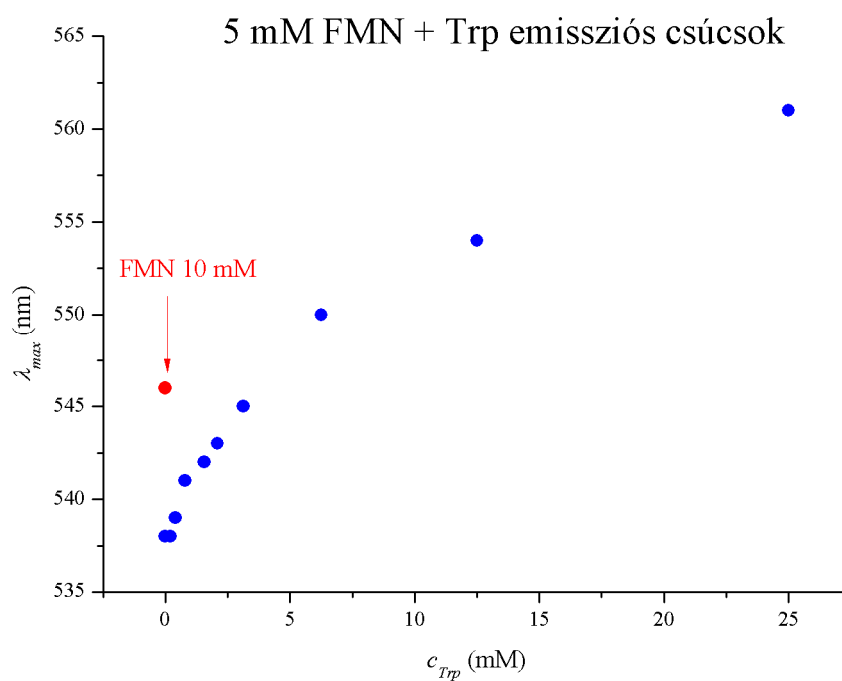
Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

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) | $\lambda_{max}$ (nm) | elt. (nm) | $\Sigma$ 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                  |           |                    |

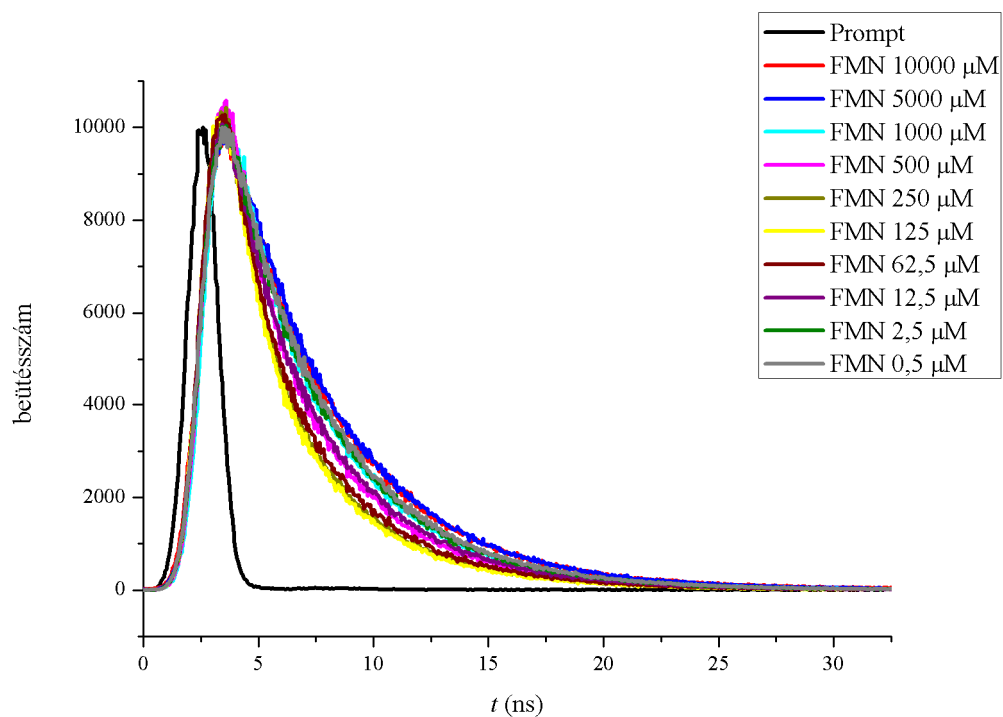
A táblázat grafikonos szemléltetése:



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:

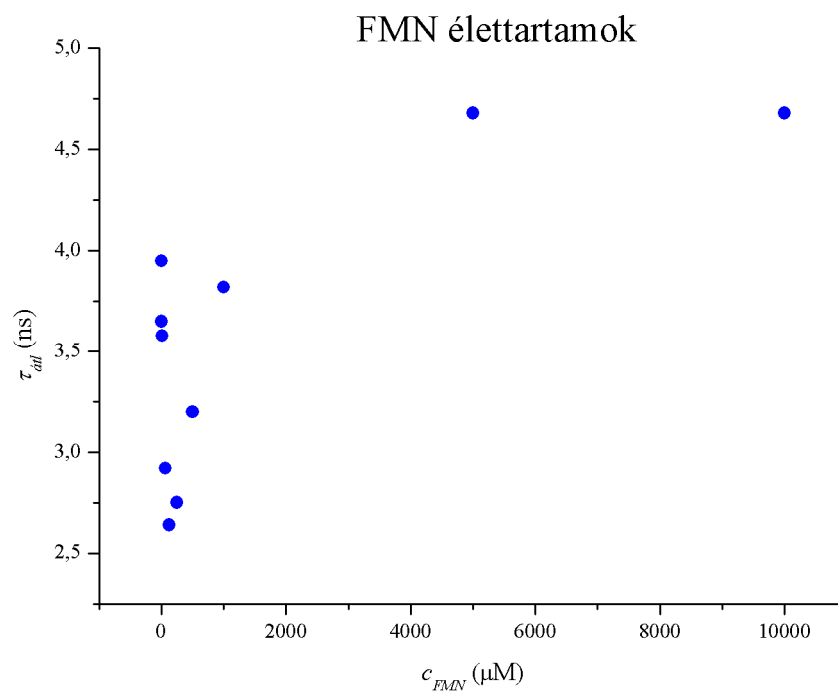


8. ábra

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

| $c_{FMN}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\tau_{\text{átl}}$ (ns) | $\chi^2$ | $e/t$ .(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       |

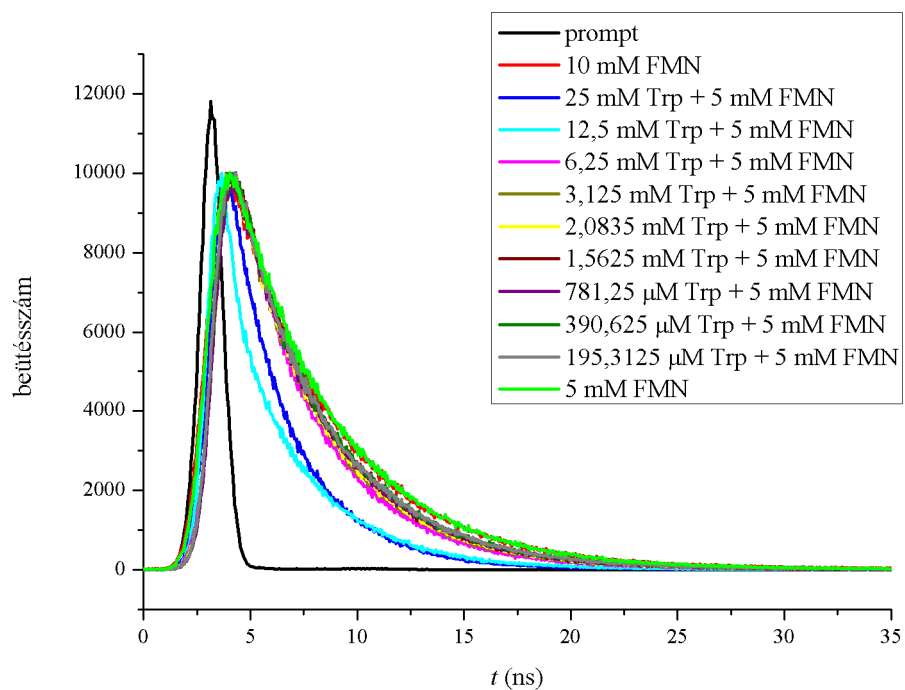
A táblázat grafikonos szemléltetése:



9. ábra

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

FMN+Trp élettartam mérés:

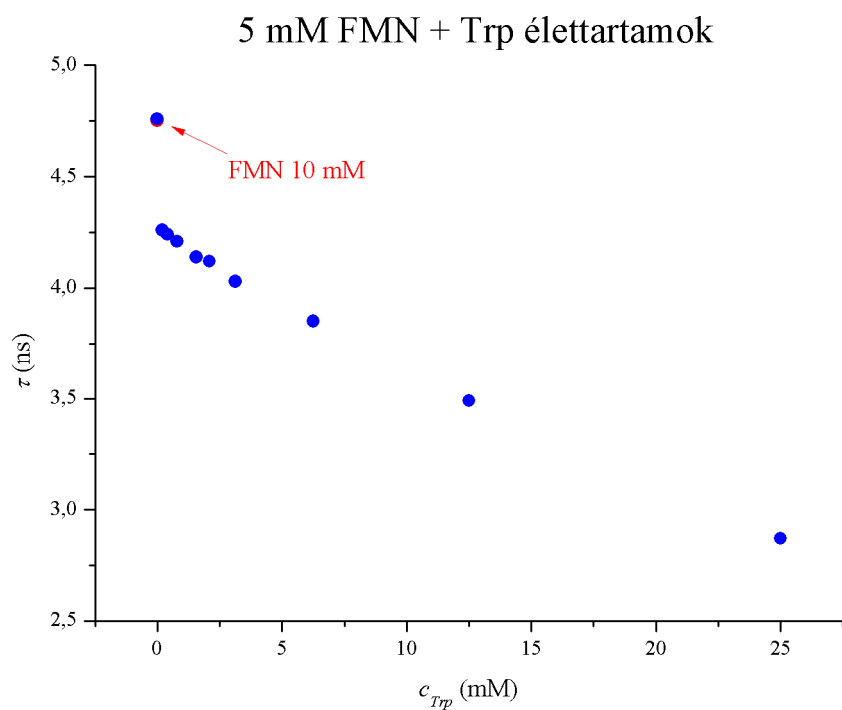


10. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

| $c_{FMN}$ (mM) | $c_{Trp}$ (mM) | $\tau$ (ns) | $\chi^2$ | $elt.$ (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     |             |                    |

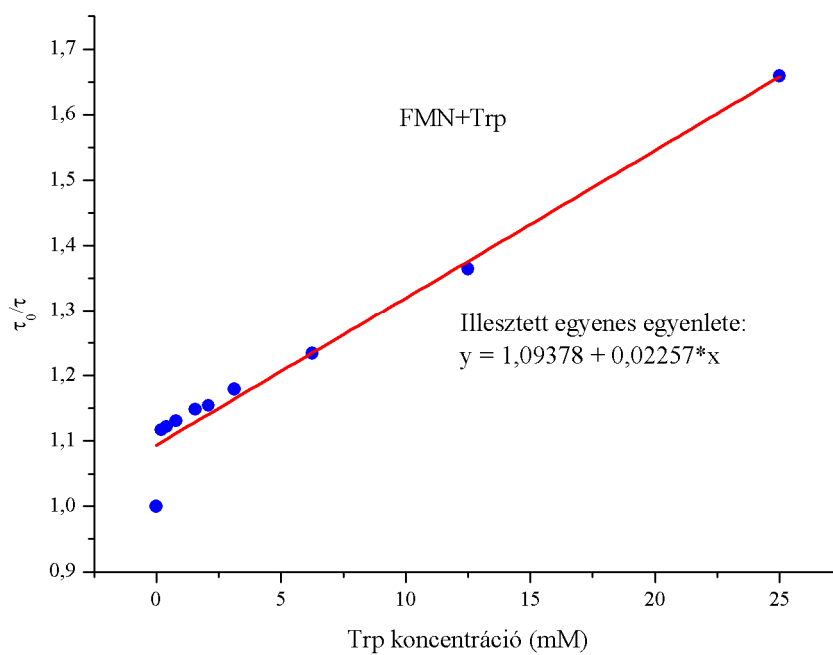
A táblázat grafikonos szemléltetése:



11. ábra

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

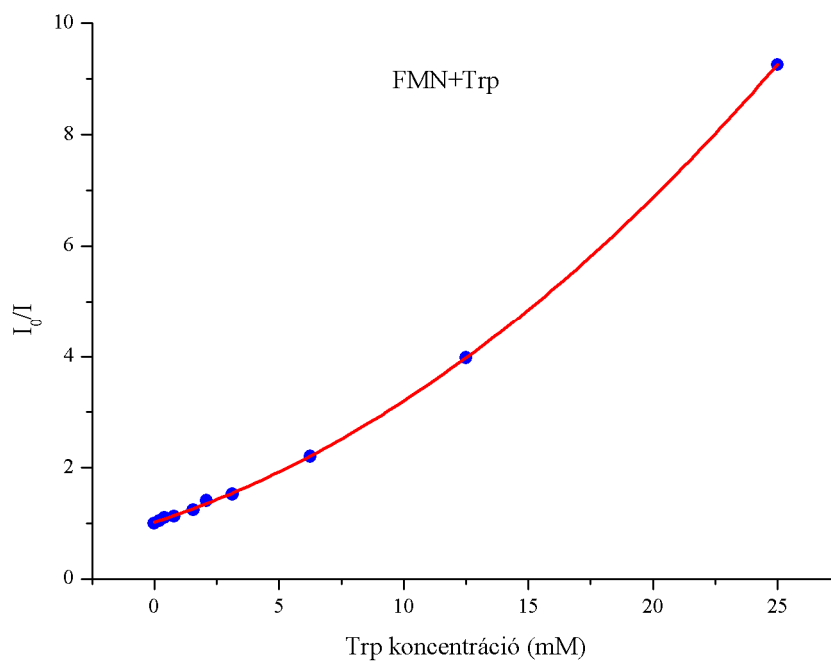
Fluoreszcencia élettartam kioltás FMN+Trp esetén:



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:

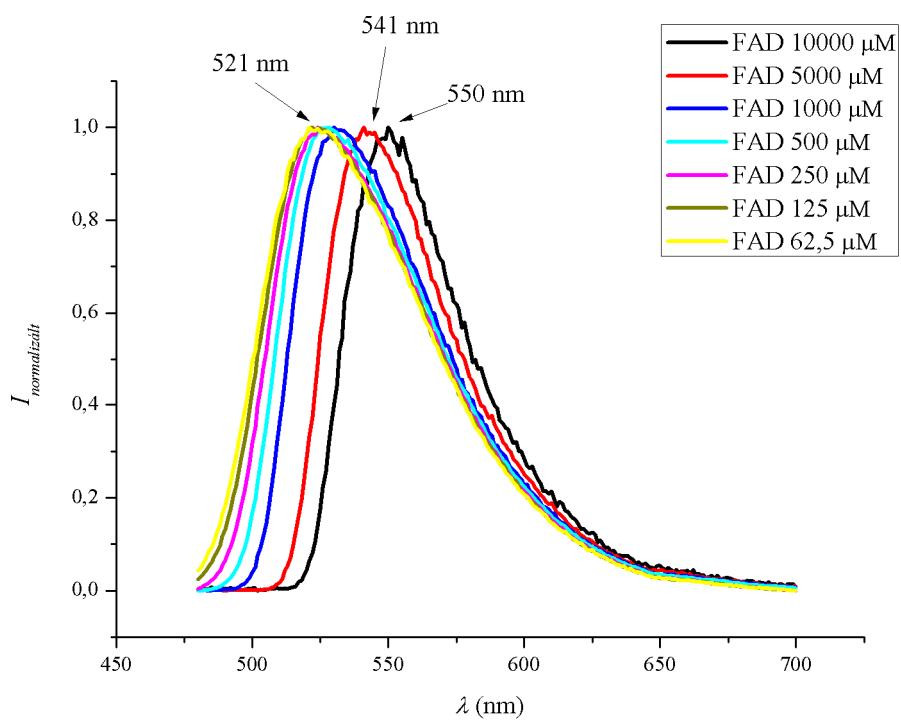


13. ábra

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:

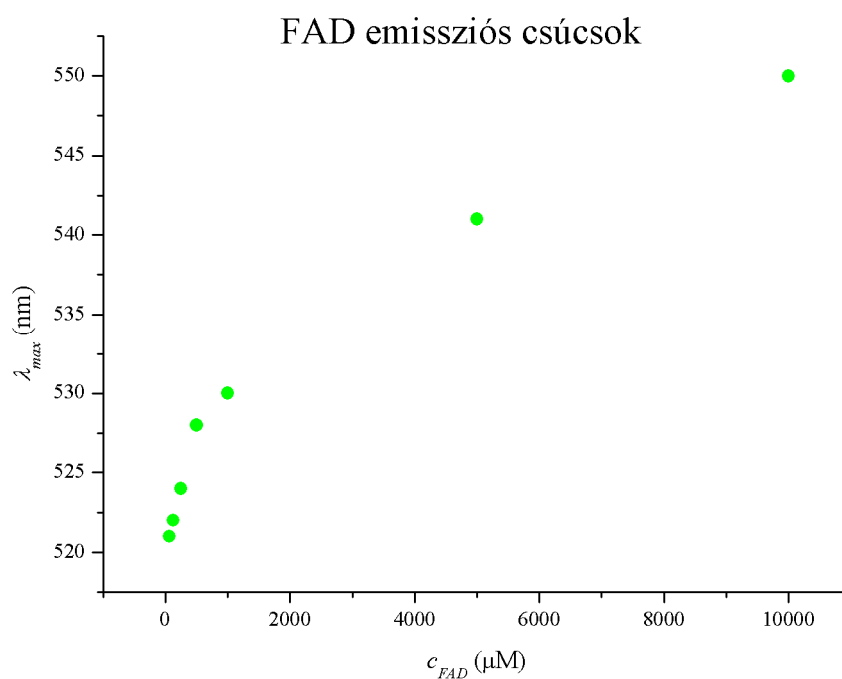


14. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

| $c_{FAD}$ ( $\mu M$ ) | $\lambda_{max}$ (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       |

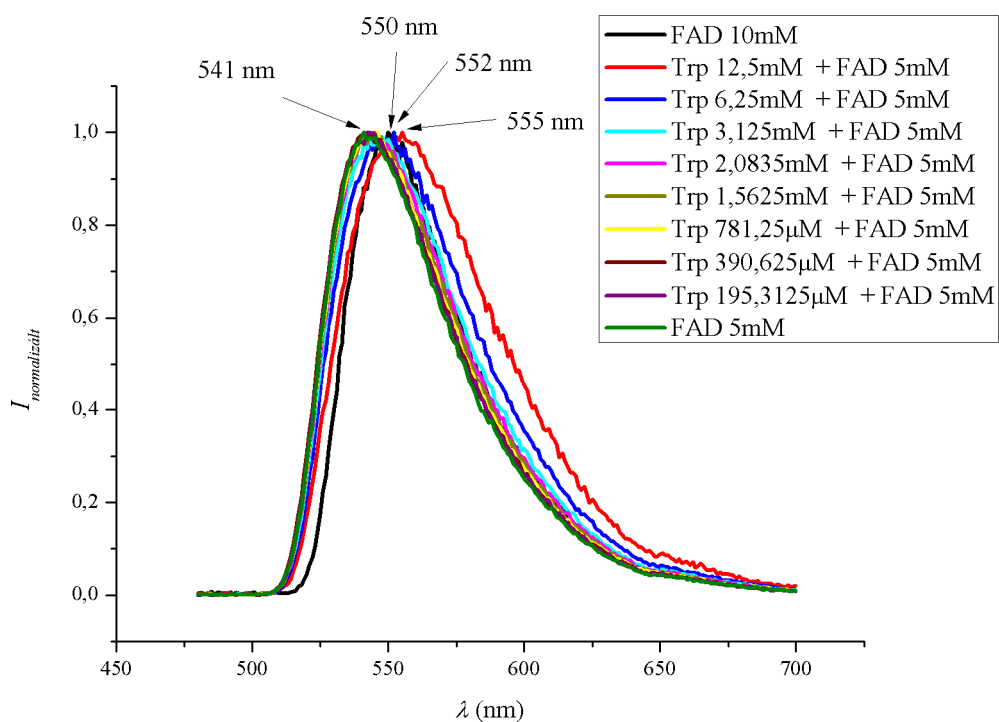
A táblázat grafikonos szemléltetése:



**15. ábra**

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

FAD+Trp emissziós mérés:

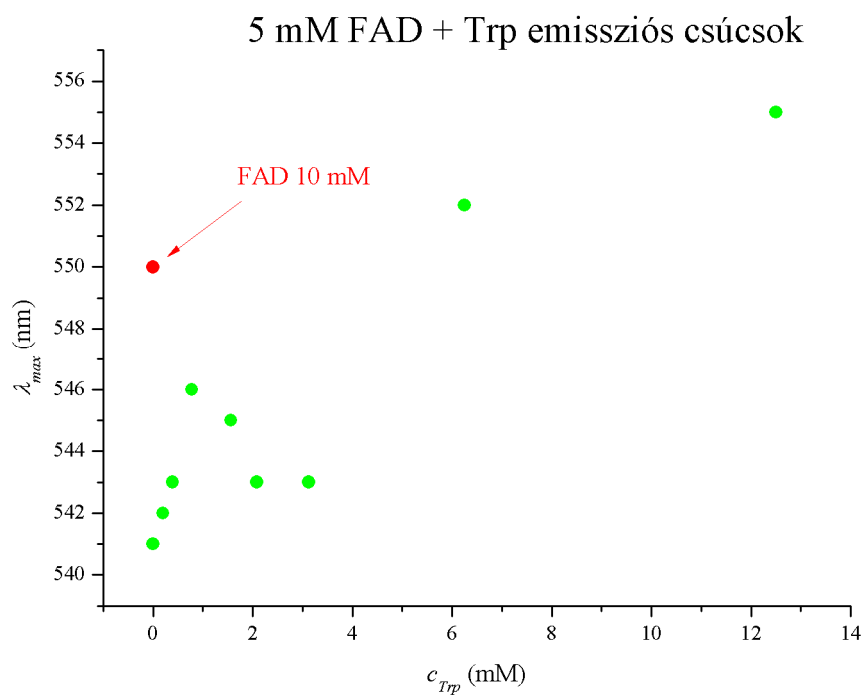


16. ábra

Emissziós csúcsok helyeit tartalmazó táblázat:

| $c_{FAD}$ (mM) | $c_{Trp}$ (mM) | $\lambda_{max}$ (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                  |             |                    |

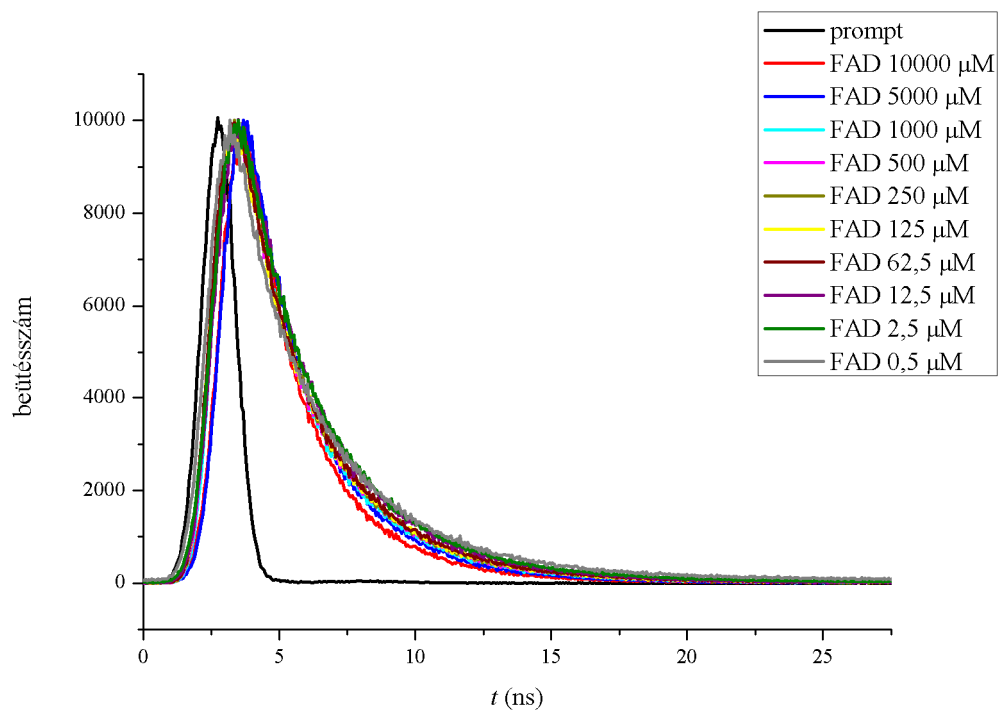
A táblázat grafikonos szemléltetése:



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:

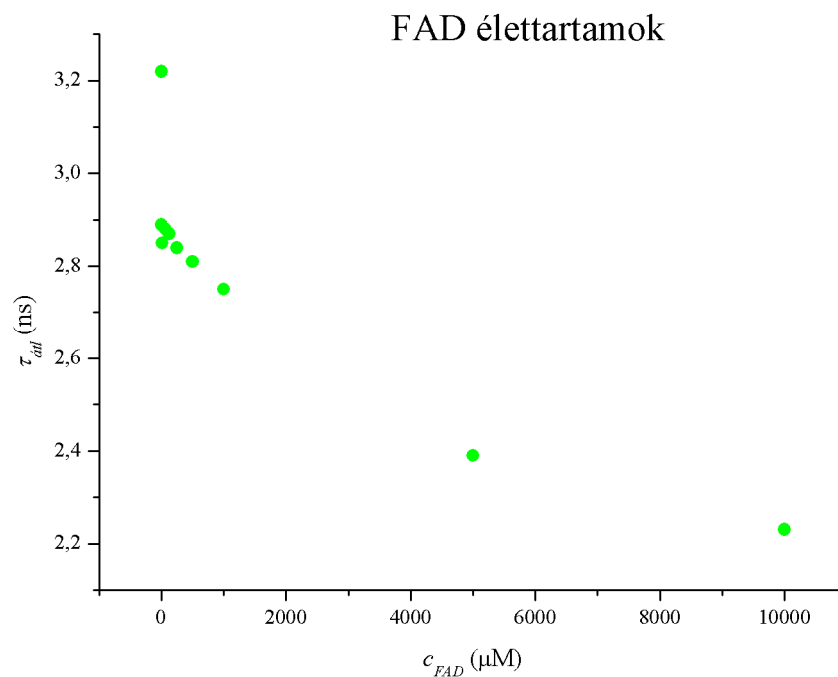


18. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

| $c_{FAD} (\mu\text{M})$ | $\tau_{\text{átl}} (\text{ns})$ | $\chi^2$ | $elt. (\text{ns})$ |
|-------------------------|---------------------------------|----------|--------------------|
| 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               |

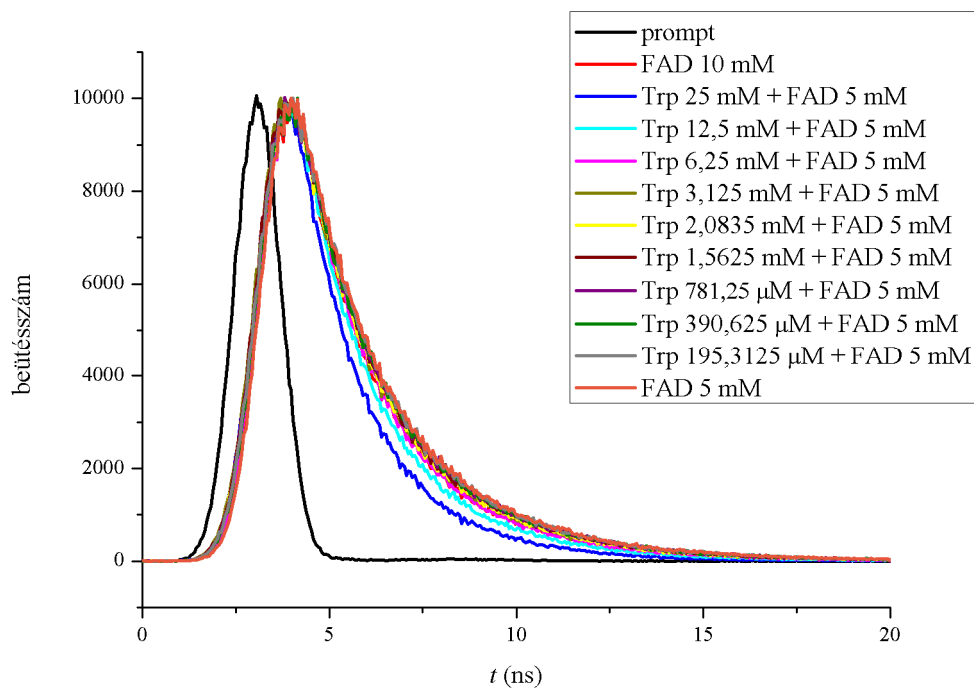
A táblázat grafikonos szemléltetése:



**19. ábra**

Megfigyelés: a FAD koncentráció csökkenésével az élettartam nő.

FAD+Trp élettartam mérés:

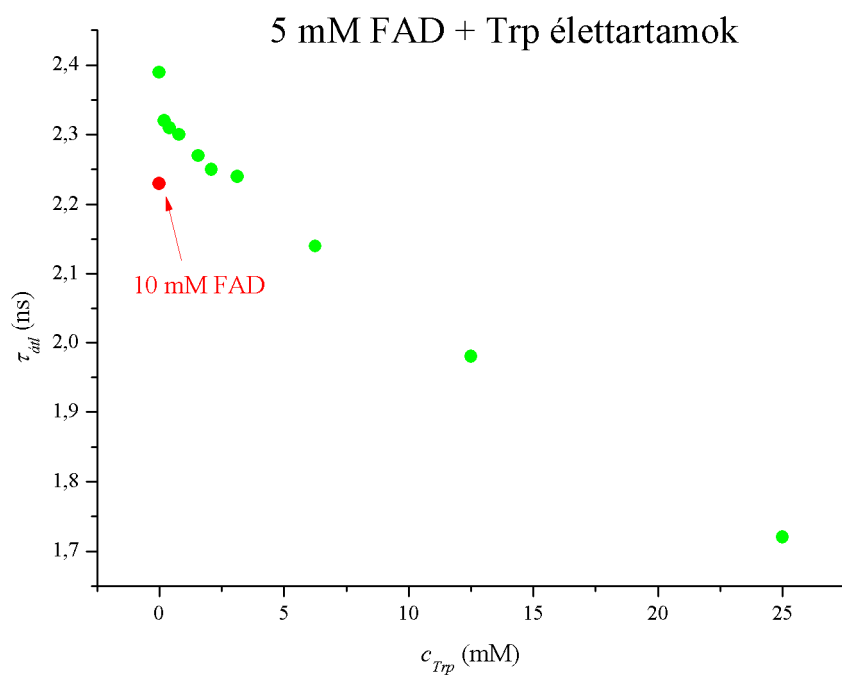


20. ábra

Kiértékelt adatok táblázata:

| $c_{FAD}$ (mM) | $c_{Trp}$ (mM) | $\tau_{\text{átl}}$ (ns) | $\chi^2$ | $elt.$ (ns) | $\Sigma elt.$ (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     |             |                    |

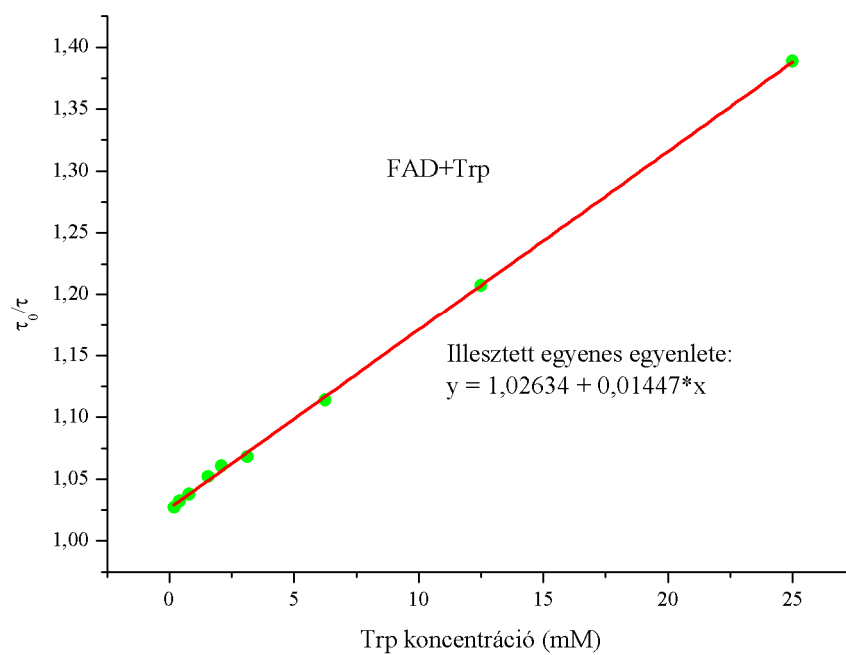
A táblázat grafikonos szemléltetése:



21. ábra

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

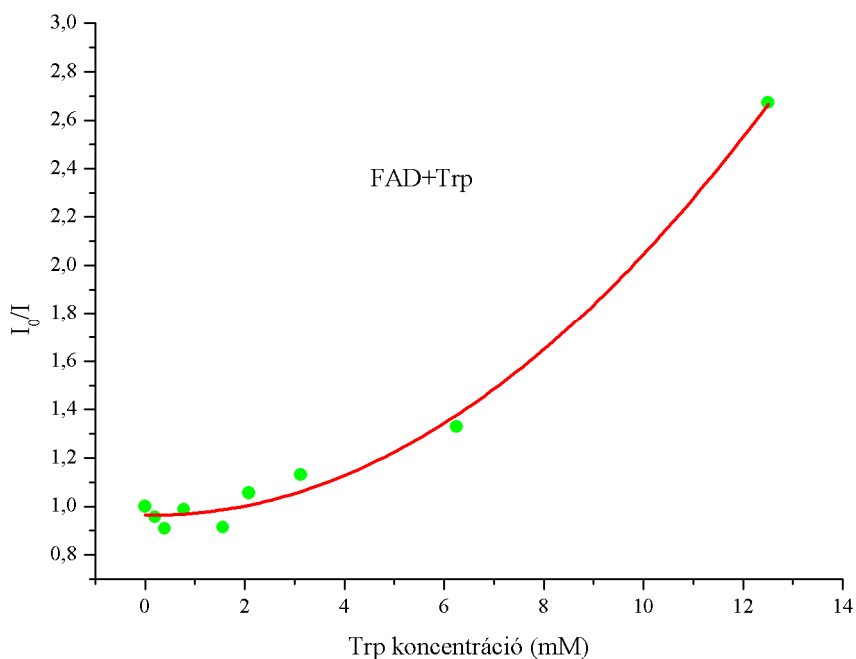
Fluoreszcencia élettartam kioltás FAD+Trp esetén:



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:



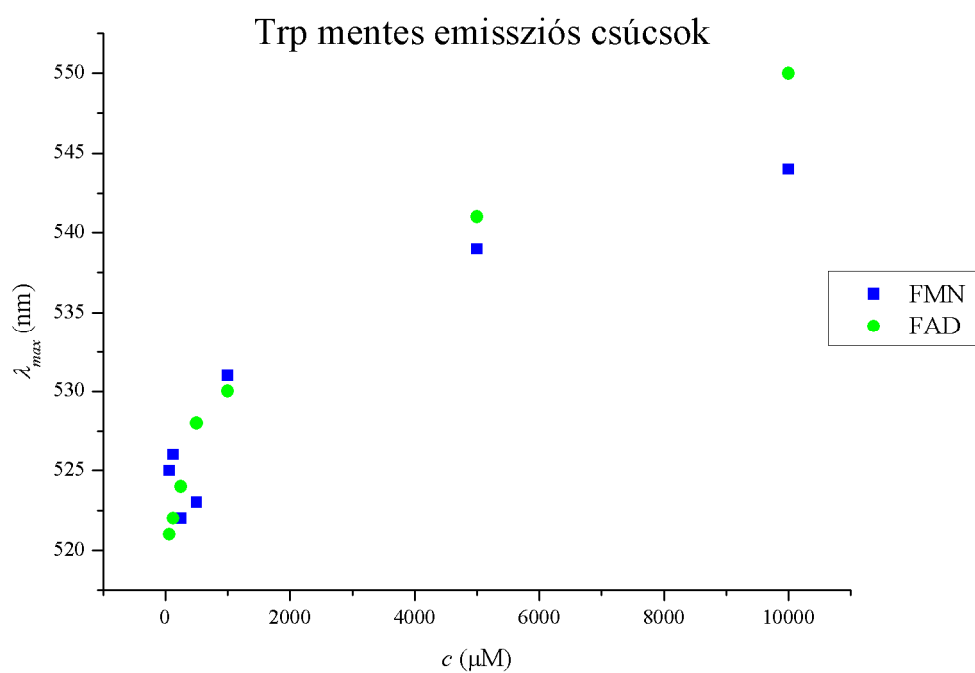
23. ábra

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                  |                      |           |
|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|
| $c_{FMN}$ ( $\mu$ M) | $\lambda_{max}$ (nm) | elt. (nm) | $c_{FAD}$ ( $\mu$ M) | $\lambda_{max}$ (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       |

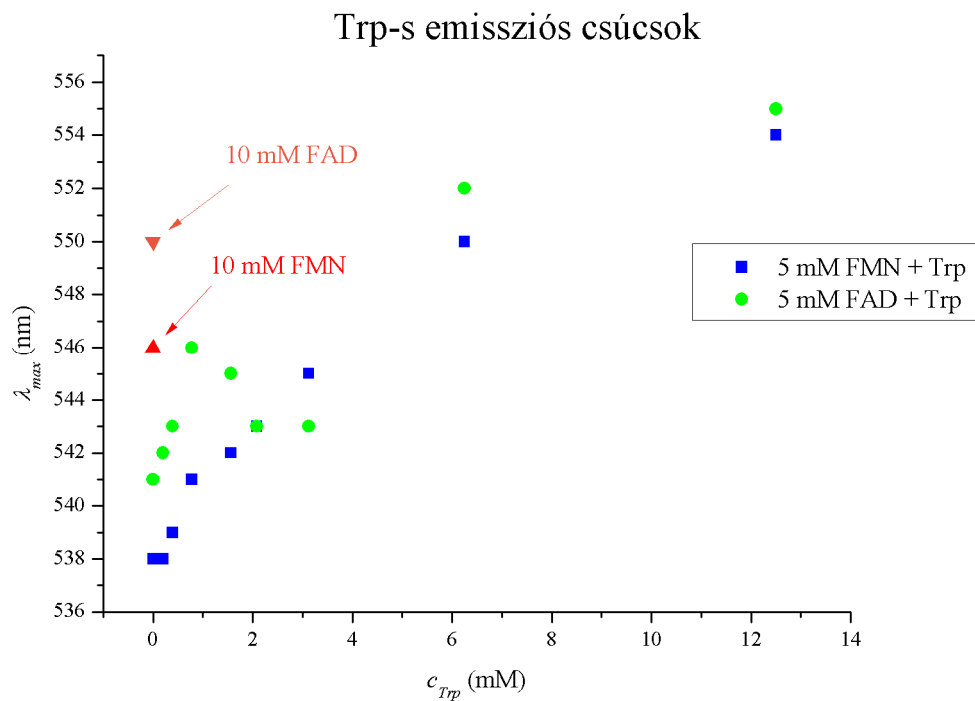


24. ábra

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

Triptofános emissziós mérések:

| FMN                  |                      |                            |                   |                          | FAD                  |                      |                            |                   |                          |
|----------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------|
| $c_{FMN}(\text{mM})$ | $c_{Trp}(\text{mM})$ | $\lambda_{max}(\text{nm})$ | $elt.(\text{nm})$ | $\Sigma elt.(\text{nm})$ | $c_{FAD}(\text{mM})$ | $c_{Trp}(\text{mM})$ | $\lambda_{max}(\text{nm})$ | $elt.(\text{nm})$ | $\Sigma elt.(\text{nm})$ |
| 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                        |                   |                          |

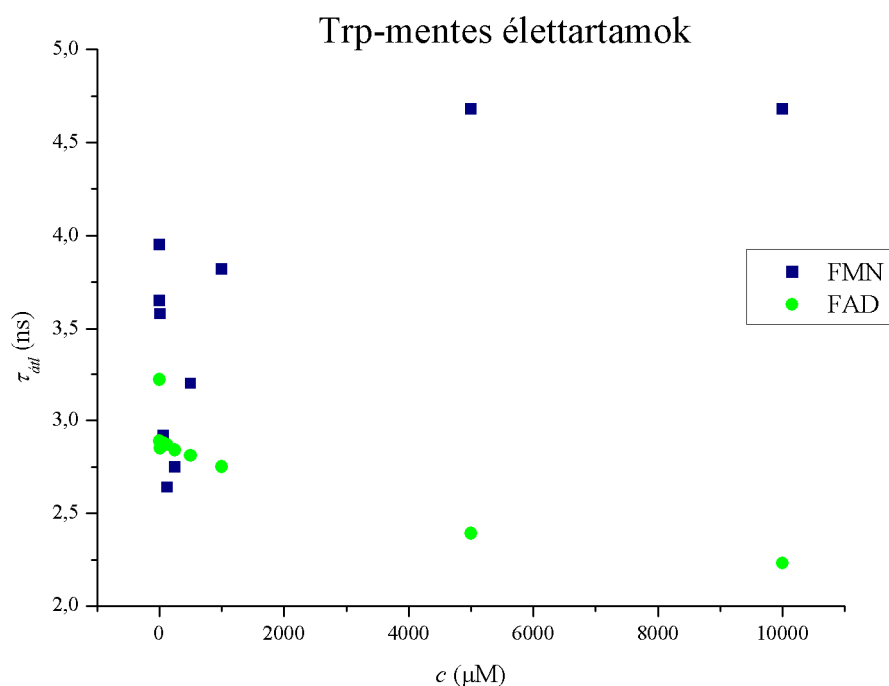


25. ábra

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

Triptofán-mentes élettartam mérések:

| FMN                  |             |             | FAD                  |                   |             |
|----------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------|
| $c_{FMN}$ ( $\mu$ M) | $\tau$ (ns) | $elt.$ (ns) | $c_{FAD}$ ( $\mu$ 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        |

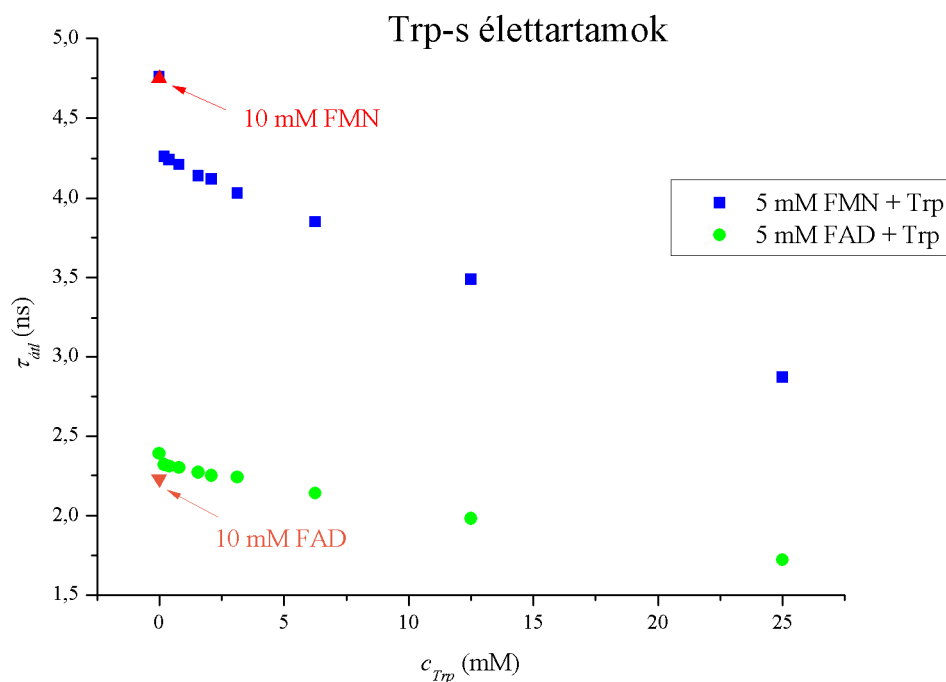


26. ábra

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) | $\tau$ (ns) | $elt.$ (ns) | $\Sigma elt.$ (ns) | $c_{FAD}$ (mM) | $c_{Trp}$ (mM) | $\tau_{dtl}$ (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

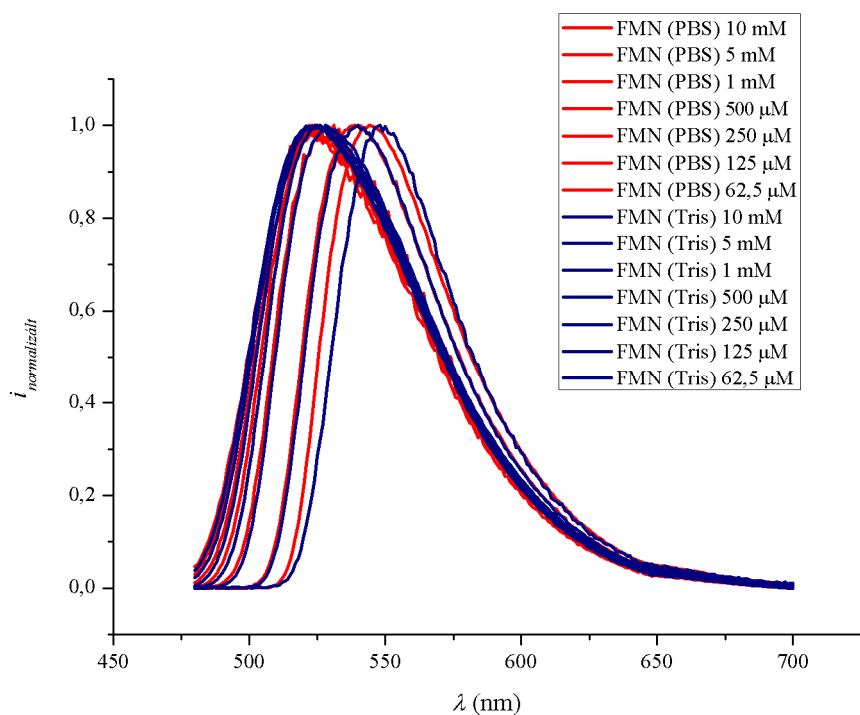
Megfigyelés: a Triptofán az FMN élettartamot jobban lecsökkenti, mint a FAD élettartamot.

## 2. Mérések Tris pufferben:

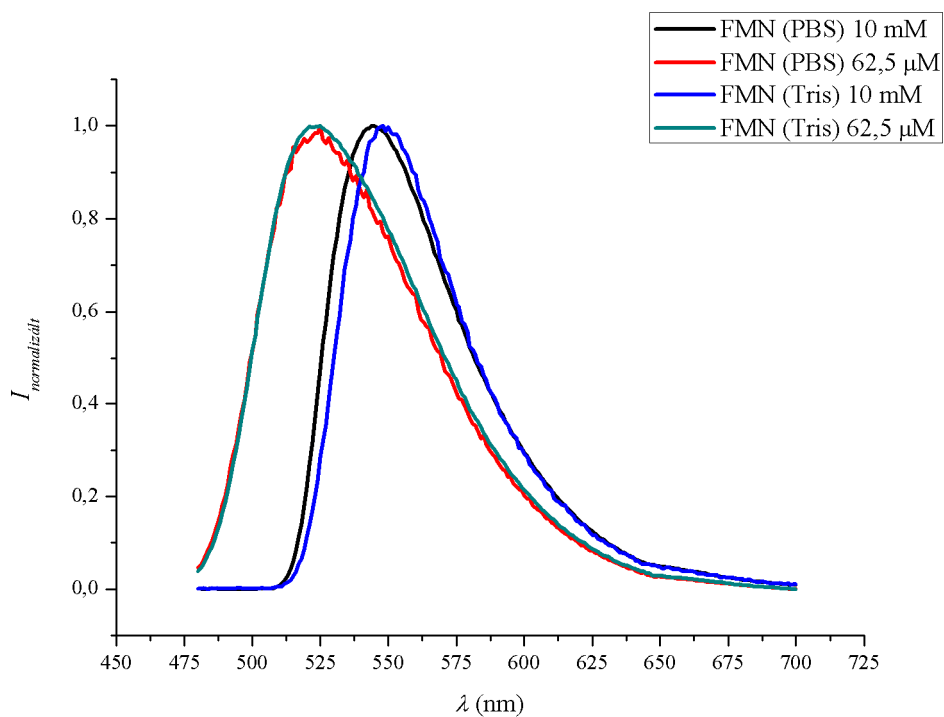
Az elvégzett emissziós méréseket megismételttem PBS (pH: 7.0) puffer helyett Tris (p: 7.33) puffert használva, hogy ellenőrizzem, hogy a méréseket a puffer típusa befolyásolja-e.

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:



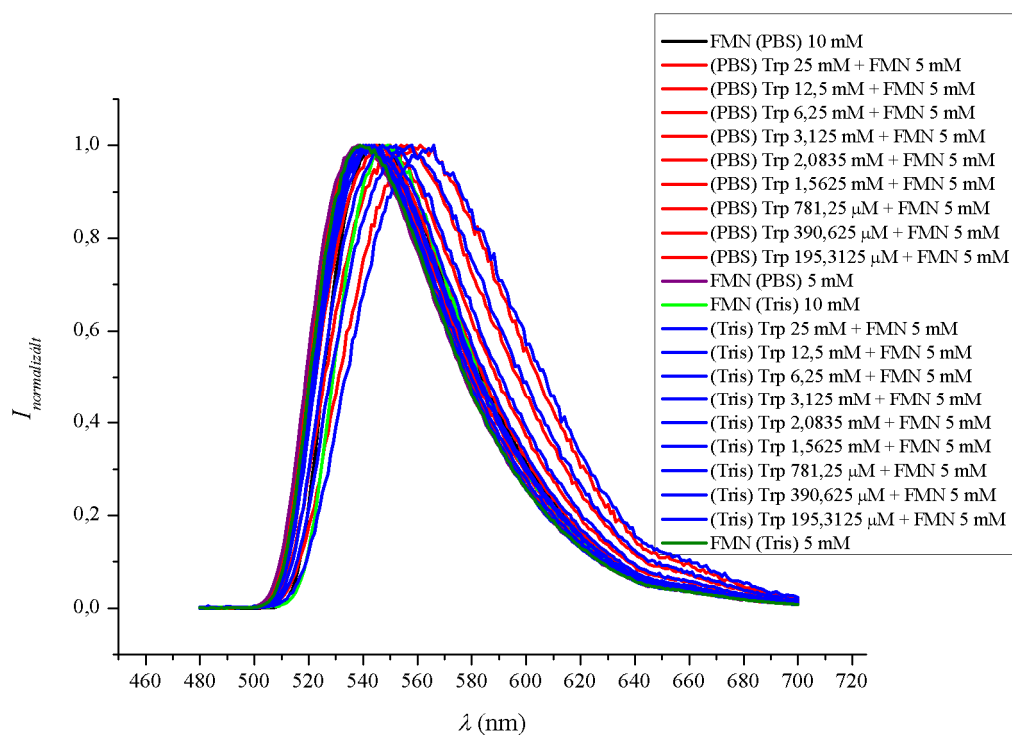
28. ábra



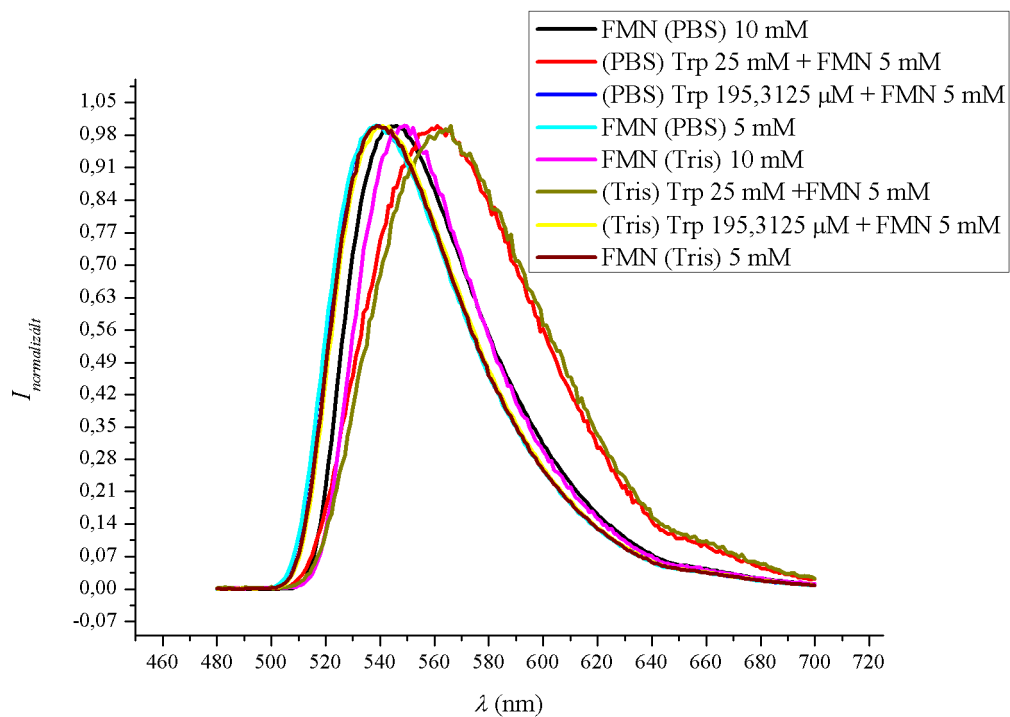
29. ábra

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

FMN+Trp-s mérések:



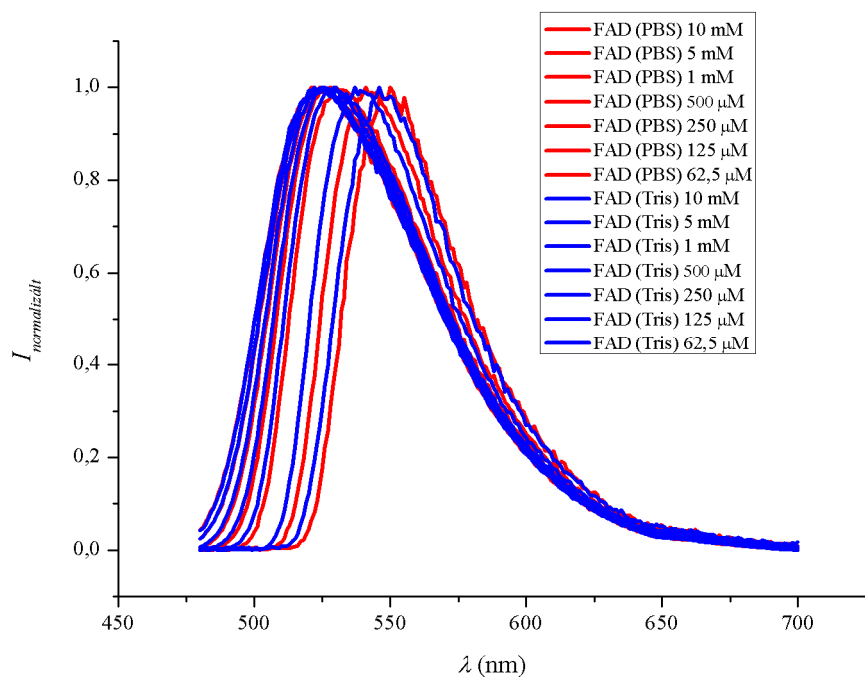
30. ábra



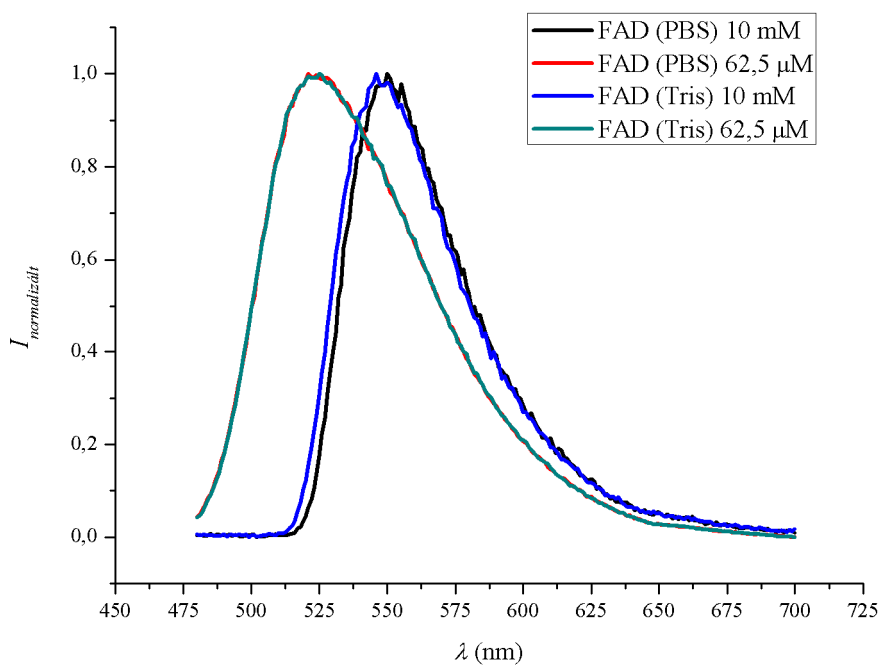
31. ábra

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

FAD-os mérések:



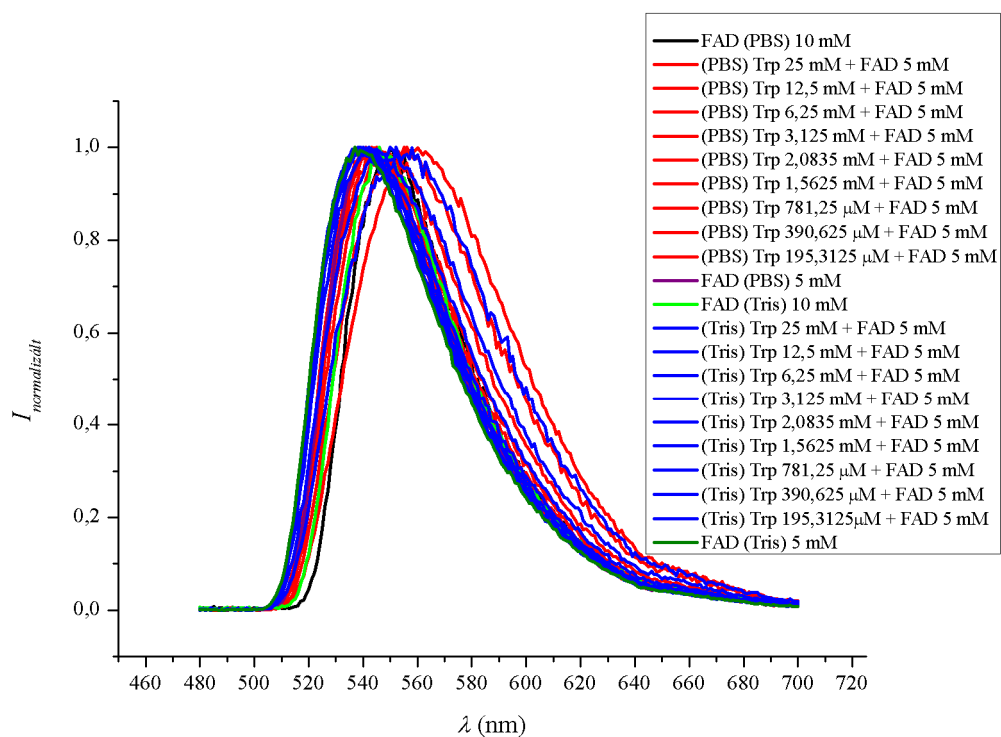
32. ábra



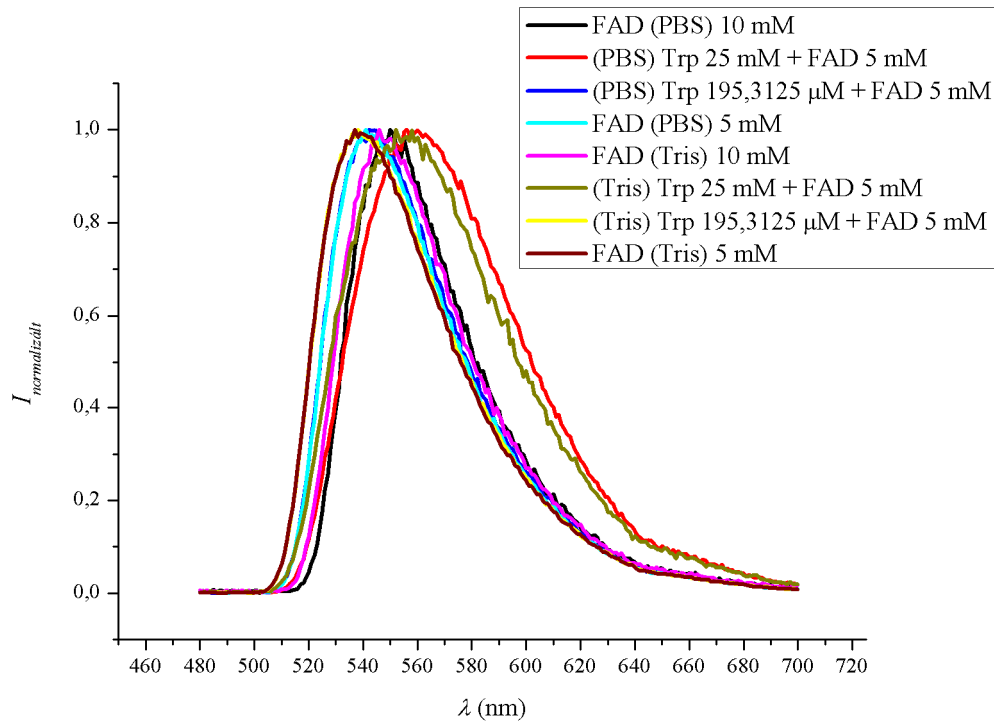
33. ábra

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

FAD+Trp-s mérések:



34. ábra

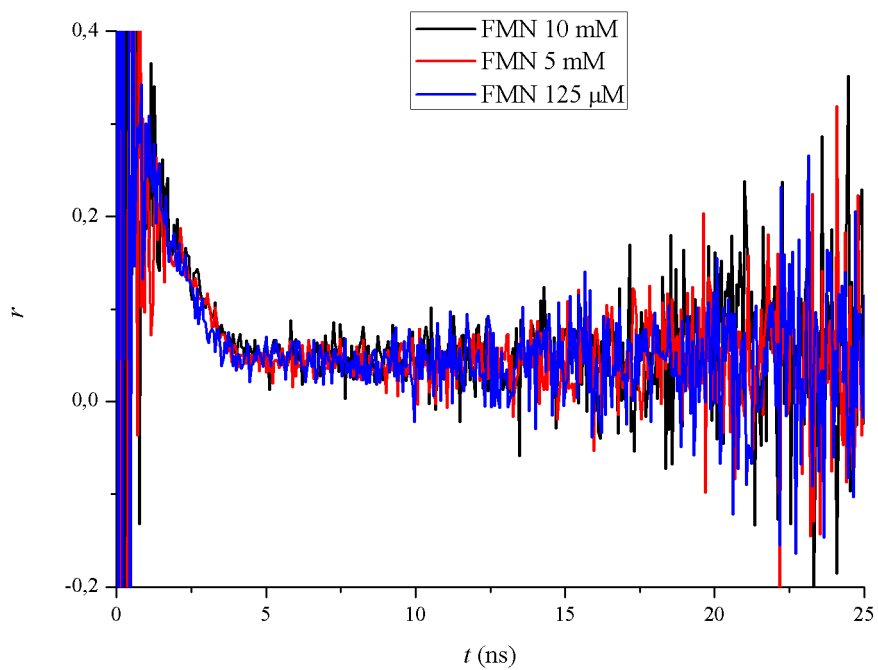


35. ábra

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

### 3. Anizotrópiás mérések:

FMN:

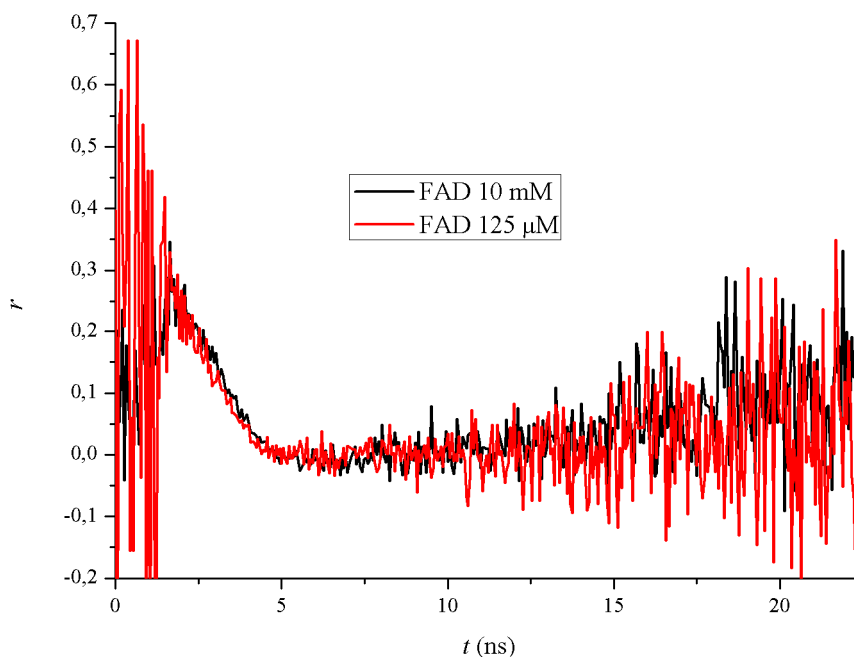


36. ábra

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] Li et al, J Phys Chem B. 2009.

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