04.09.2015

Определение оптимальной концентрации FMN в реакционной смеси

Лукьяненко К.А.

Сибирский федеральный университет, МОЛПИТ

**Введение.**

Одной из задач нашего гранта является исследование влияния растворителей, используемых при герметизации ПММА, на ферменты NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазу, бактериальную люциферазу и NADH. Для подготовки к этому эксперименту необходимо определить оптимальную концентрацию FMN, при которой не будет происходить ингибирования реакции люминесценции из-за излишка FMN и при этом не будет его недостатка.

Целью этого эксперимента является определение оптимальной концентрации FMN в реакционной смеси кюветы. Для этого был поставлен ряд задач:

1. Приготовить растворы FMN с различной степенью разбавления с шагом в два раза, начиная с концентрации $C\left(FMN\right)=10^{-3}$.
2. Измерить кинетику люминесценции дисков Энзимолюма при различных концентрациях FMN в реакционной смеси.

**Материалы и оборудование.**

1. Диски Энзимолюма в 3% крахмальном геле от 26.08.2015
2. Раствор FMN от 04.09.2015 концентрацией $C\left(FMN\right)=10^{-3}$
3. Вода дистиллированная
4. Кюветный люминометр Promega GloMax 20/20
5. Стеклянная кювета
6. Микропипетка
7. Пинцет

**Методы.**

Алгоритм измерения на кюветном люминометре:

1. Диск помещается в кювету
2. Добавляется 375 мкл дистиллированной воды
3. Из инжектора добавляется 25 мкл FMN
4. Сразу же начинается измерение кинетики в течение 120 секунд
5. После измерения 4 повторов происходила смена FMN в люминометре

Контроль температуры отсутствует. Температура комнатная.

Важно: диск при добавлении воды в кювету должен всплыть на поверхность, иначе раствор FMN не успевает диффундировать до дна и кинетика люминесценции имеет очень долгий выход на максимум и при этом меньшую максимальную интенсивность. В некоторых случаях реакция свечения может даже не начаться.

**Результаты и обсуждение.**

В ходе работы были получены значения максимальной интенсивности в зависимости от концентрации FMN. Были выбраны следующие точки концентрации: $10^{-3} М, 5∙10^{-4} М, 2.5∙10^{-4} М, 1.25∙10^{-4} М, 0.625∙10^{-4} М, 0.3125∙10^{-4} М, 0.15625∙10^{-4} М, 0.078125∙10^{-4} М$. Результаты измерений приведены на рисунке ниже. В качестве погрешности указано стандартное отклонение.

Рисунок 1. Максимум интенсивности свечения в зависимости от концентрации FMN.

 Видно, что оптимальной концентрацией FMN является значение $5∙10^{-4} М$. При этом значении максимальна интенсивность свечения биолюминесцентной реакции.

**Выводы.**

1. Оптимальной концентрацией FMN является значение $5∙10^{-4} М$ при составе реакционной смеси: 375 мкл дистиллированной воды и 25 мкл FMN.