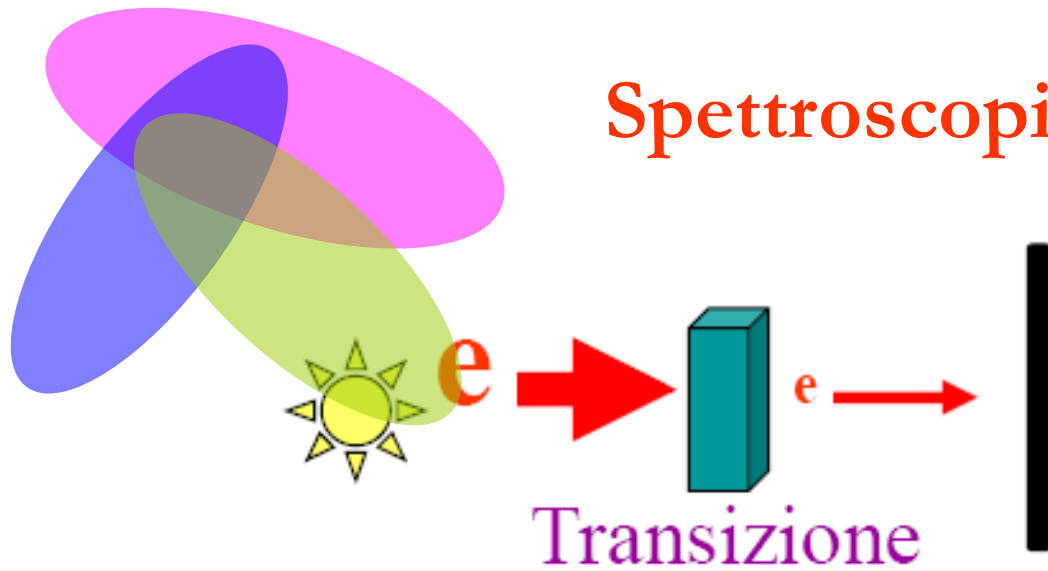
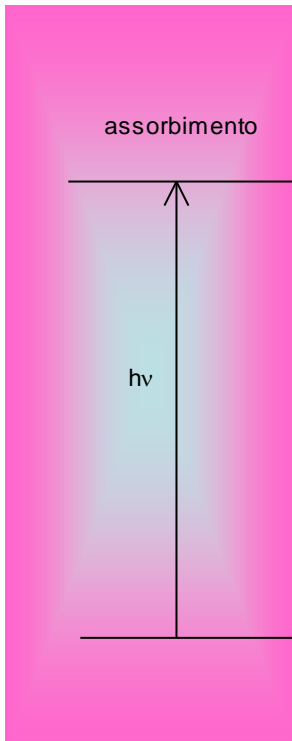


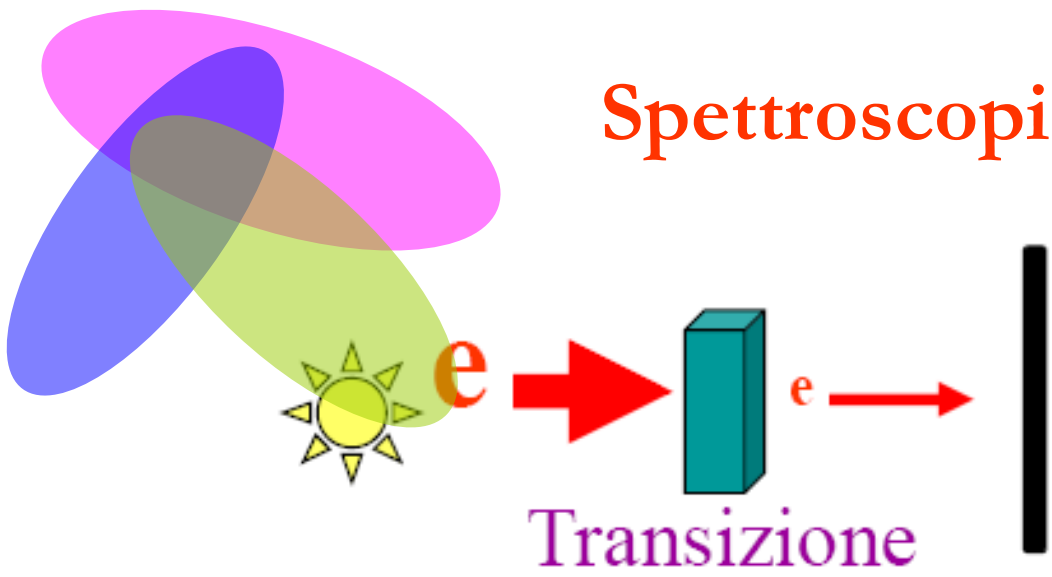
Spettroscopia di Fluorescenza



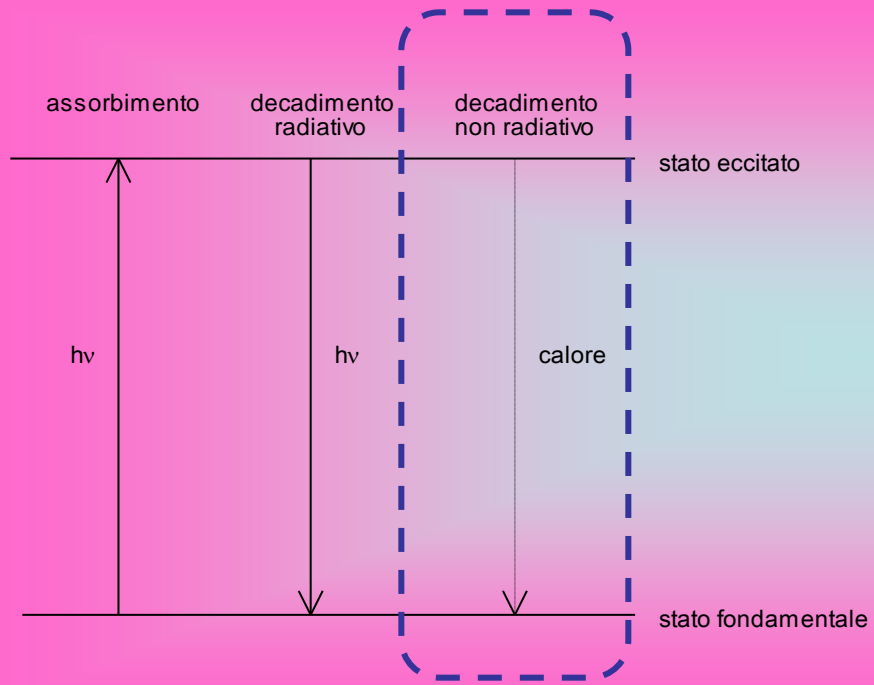
- L'assorbimento avviene quando la radiazione causa un aumento di energia nel sistema con cui interagisce.



Spettroscopia di Fluorescenza

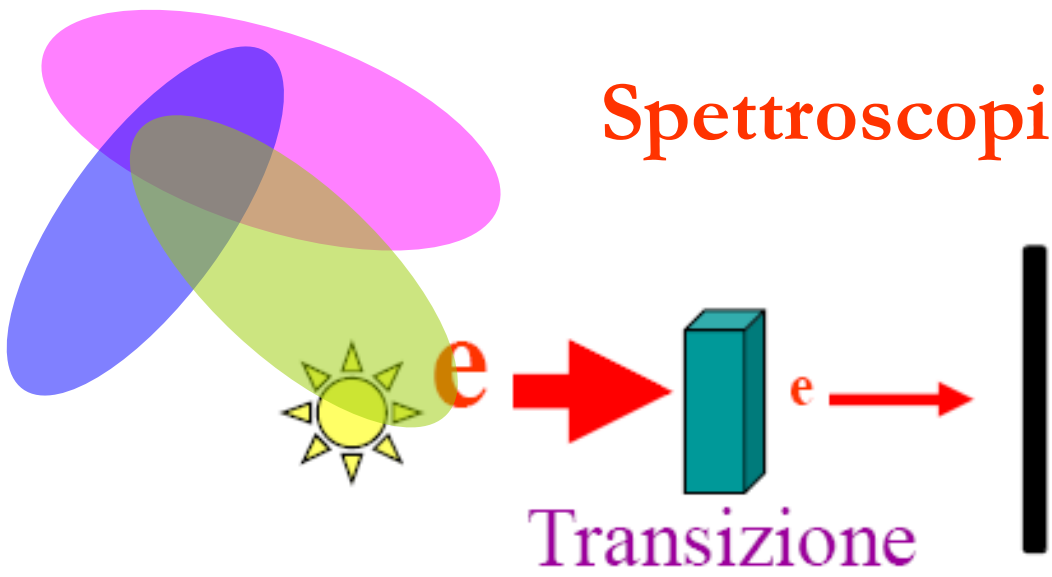


•L'assorbimento avviene quando la radiazione causa un aumento di energia nel sistema con cui interagisce.

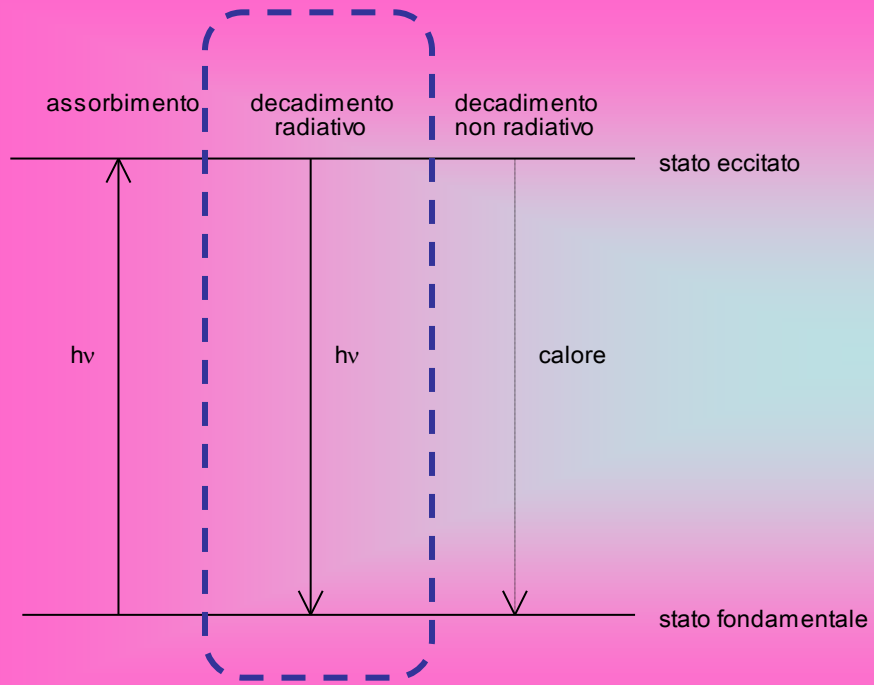


la maggior parte delle molecole trasferisce l'eccesso di energia all'intorno con un **processo non radiativo**: l'energia emessa, sotto forma di calore, permette alle molecole circostanti di compiere vibrazioni, rotazioni e traslazioni.

Spettroscopia di Fluorescenza

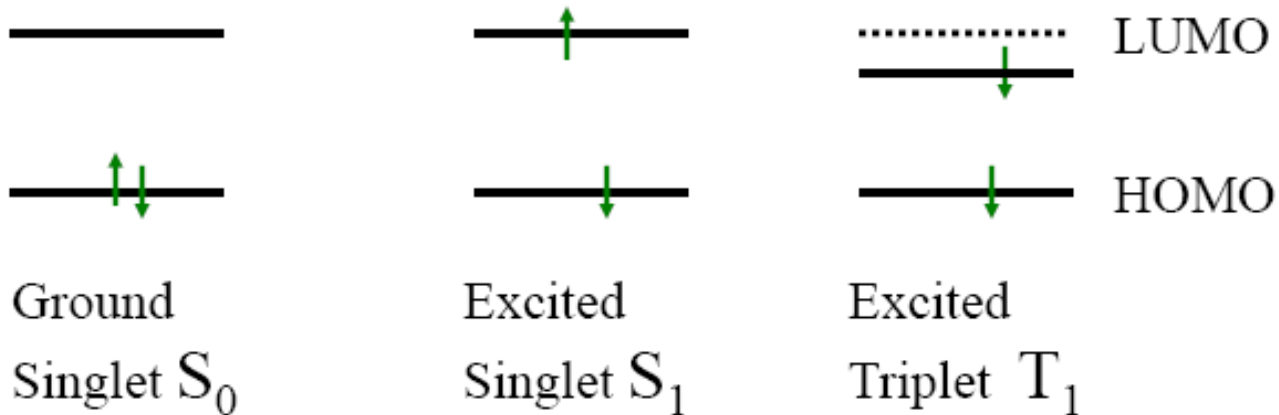


•L'assorbimento avviene quando la radiazione causa un aumento di energia nel sistema con cui interagisce.



una piccola parte delle molecole, invece, subisce un **decadimento radiativo** dove l'energia in eccesso viene liberata sotto forma di fotoni.

Spettroscopia di Fluorescenza

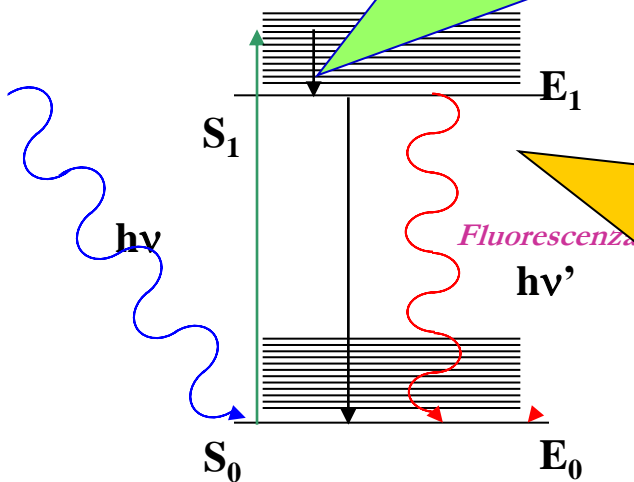


La maggior parte delle molecole, nello stato elettronico fondamentale, si trova in uno stato di singoletto, S_0 (ossia tutti gli elettroni hanno spin appaiati e 2 elettroni per orbitale molecolare).

L'assorbimento di radiazione più probabile è quello che avviene con conservazione della molteplicità di spin, e porta perciò ad uno stato di singoletto eccitato: S_1, S_2, \dots, S_n (primo, secondo, etc. ennesimo stato di singoletto eccitato) a seconda della lunghezza d'onda del fotone assorbito.

diagramma di Jablonski

(1) Nel caso in cui la molecola sia eccitata ad un sottolivello vibrazionale superiore, può rilassarsi velocemente tramite **decadimento non radiativo** al livello vibrazionale più basso (**conversione interna**), cioè attraverso cessione dell'eccesso di energia vibrazionale alle altre molecole mediante urti, fondamentalmente con aumento dell'agitazione termica dell'ambiente (calore) (i tempi caratteristici sono dell'ordine di 10^{-12} s).



(2) Da questo livello vibrazionale la molecola può :

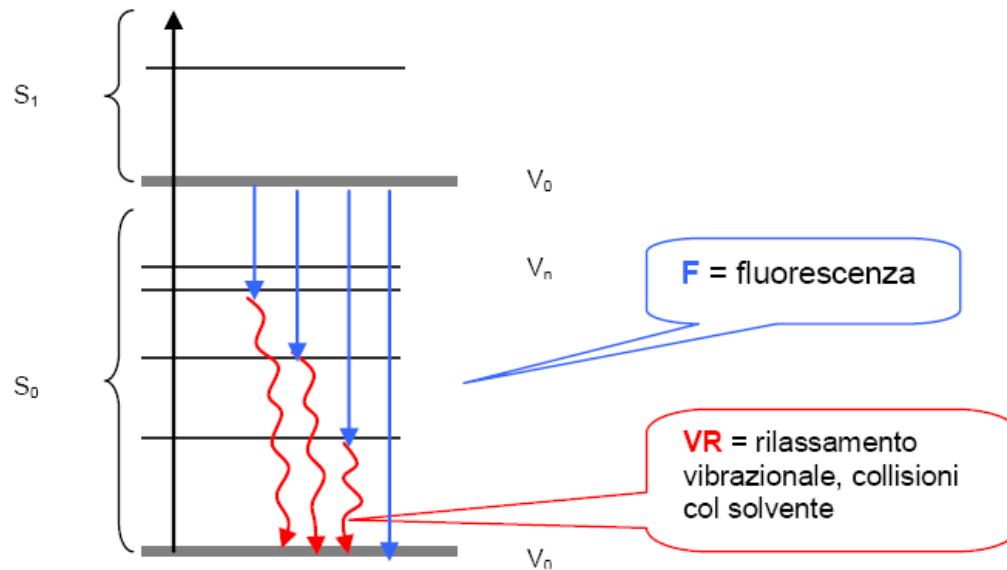
- decadere radiativamente allo stato fondamentale emettendo un fotone ad energia $h\nu'$ minore di quella $h\nu$ assorbita inizialmente. Questo fenomeno di emissione di luce si chiama **fluorescenza**.
- può ricadere nello stato fondamentale S_0 senza emettere radiazione

- ▶ Radiazione assorbita
- ▶ Eccitazione
- ▶ Decadimenti non radiativi
- ▶ Decadimenti radiativi

In fluorescenza lo spin dell'elettrone eccitato non cambia durante la transizione.



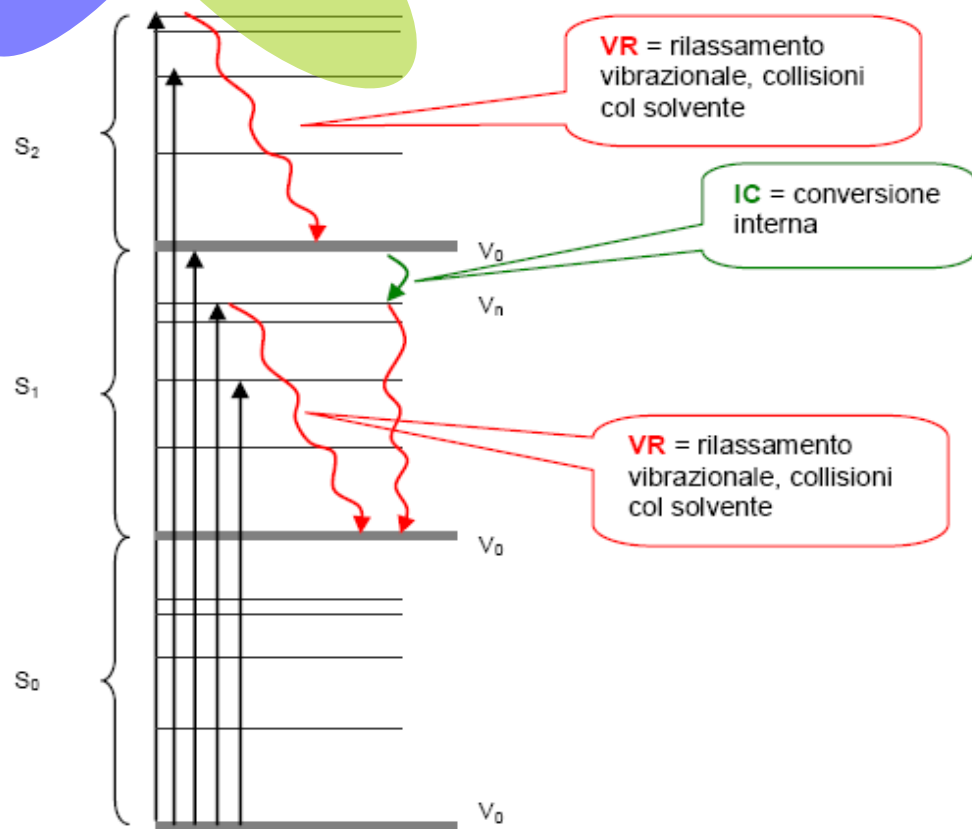
Nell'**emissione di fluorescenza** le molecole S_1 **emettono fotoni** di varia energia a seconda del sottolivello vibrazionale (dello stato S_0) implicato nel processo di transizione:



Le molecole però non rimangono nei sottolivelli più alti di v_0 perché successivamente subiscono un ulteriore rilassamento vibrazionale, con perdita di energia sotto forma di calore, raggiungendo il sottolivello v_0 .

Lo spettro di emissione di fluorescenza implica che solo lo stato S_1 (primo stato eccitato) emetta radiazioni

Ad esempio, in questo caso, sia che il sistema venga eccitato verso lo stato S_1 o verso lo stato S_2 , si ottiene lo stesso tipo di spettro di emissione fluorescente, in quanto esso tra origine solo dallo stato S_1 .



La molecole che hanno raggiunto lo stato S_2 , devono raggiungere lo stato S_1 , prima di poter emettere fluorescenza.

Lo stato S_2 possiede numerosi sottolivelli vibrazionali; tutte le molecole che vengono a trovarsi nello stato S_2 cadono o si rilassano al sottolivello v_0 dello stato S_2 , per rapido **rilassamento vibrazionale**.

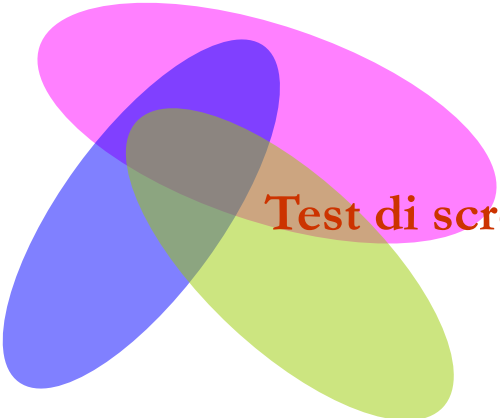
In questo processo l'energia vibrazionale in eccesso viene trasferita via collisioni.

La fluorescenza viene spesso usata in **ambito bio-medico**, ad esempio quando vengono eseguite **biopsie** e quindi preparati istologici, in cui si mettono **in evidenza particolari antigeni tramite anticorpi “coniugati” con particolari sostanze fluorescenti**. Successivamente si osserva al microscopio illuminando il preparato in diasopia (dall'alto), con luce UV, saranno quindi visibili solo le porzioni che contengono gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi.

Immunofluorescenza è una delle tecniche più usate tra le **reazioni sierologiche**, di fondamentale importanza in microbiologia, immunologia, o comunque nel laboratorio biomedico, per rilevare in un certo campione la **presenza di specifici antigeni o anticorpi ignoti la cui controparte nota (quella a disposizione del ricercatore o laboratorista) è variamente legata ad un marcatore**.

Il marcatore è un **fluorocromo**, ovvero un colorante che assorbendo onde ad alta frequenza (ultravioletti) emette nel visibile.

Il fluorocromo più impiegato è *l'isotiocianato di fluorescina* (o semplicemente fluorescina) che assorbendo raggi ultravioletti, dunque con l'ausilio di un microscopio illuminato da una fonte adatta, emette luce verde.



**Test in immunofluorescenza:
Test di screening sensibile per la determinazione di anticorpi
anti virus herpes simplex.**

In presenza di anticorpi anti virus herpes simplex 2 nel campione, si ottiene una tipica fluorescenza delle cellule infette - soprattutto nel citoplasma, meno nei nuclei delle cellule.

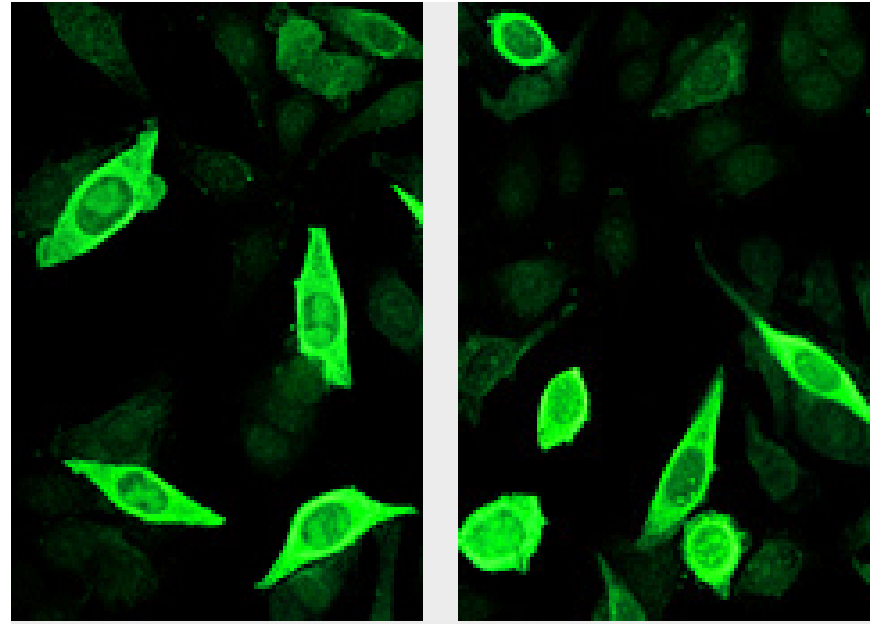
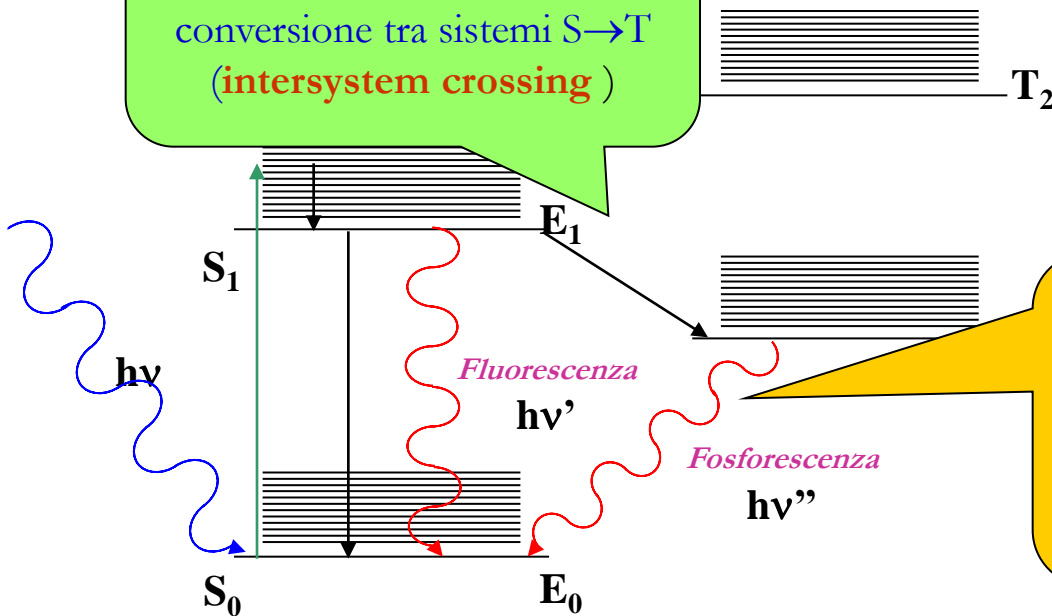


diagramma di Jablonski

La transizione di uno stato fondamentale di singoletto (S_0) al primo stato di tripletto eccitato (T_1) ha una scarsissima probabilità di avvenire in quanto è una transizione proibita.

(1) La molecola può decadere non radiativamente con una lenta conversione tra sistemi $S \rightarrow T$ (intersystem crossing)



(2) Successivamente il tripletto si rilassa radiativamente allo stato fondamentale S_0 emettendo un fotone ad energia minore di quella assorbita inizialmente (fosforescenza)

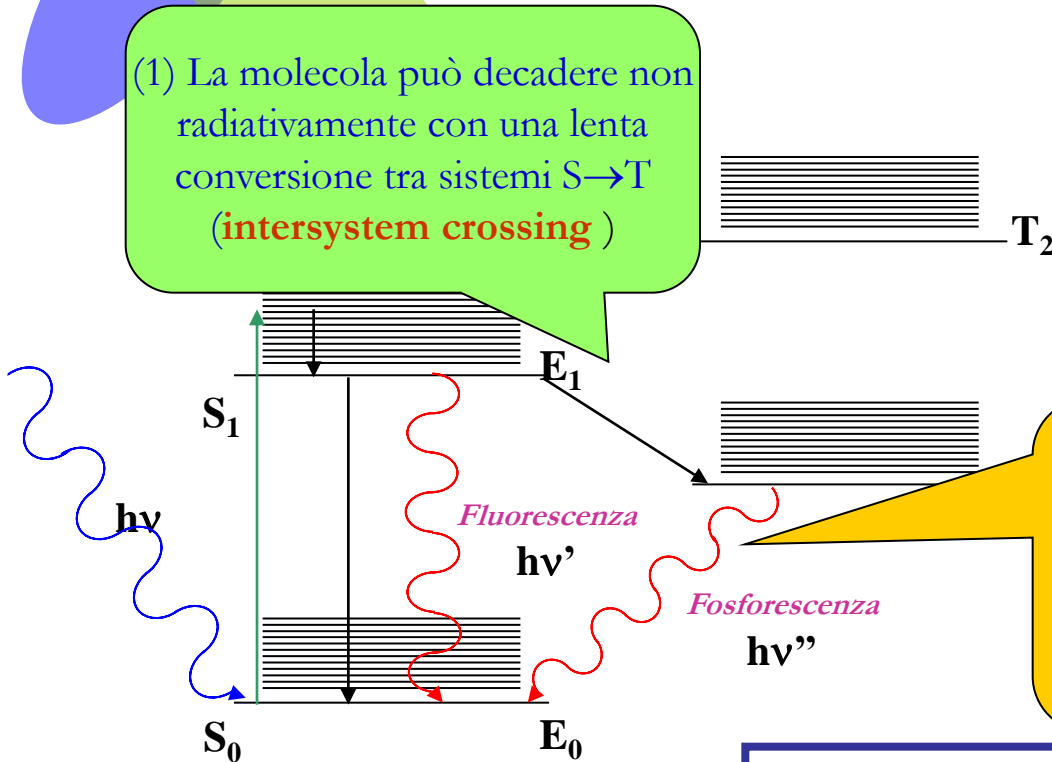
- Radiazione assorbita
- Eccitazione
- Decadimenti non radiativi
- Decadimenti radiativi

Se la transizione è accompagnata da una variazione di spin, la fotoluminescenza viene chiamata fosforescenza.

diagramma di Jablonski

La transizione di uno stato fondamentale di singoletto (S_0) al primo stato di tripletto eccitato (T_1) ha una scarsissima probabilità di avvenire in quanto è una transizione proibita.

(1) La molecola può decadere non radiativamente con una lenta conversione tra sistemi $S \rightarrow T$ (**intersystem crossing**)



(2) Successivamente il tripletto si rilassa radiativamente allo stato fondamentale S_0 emettendo un fotone ad energia minore di quella assorbita inizialmente (**fosforescenza**)

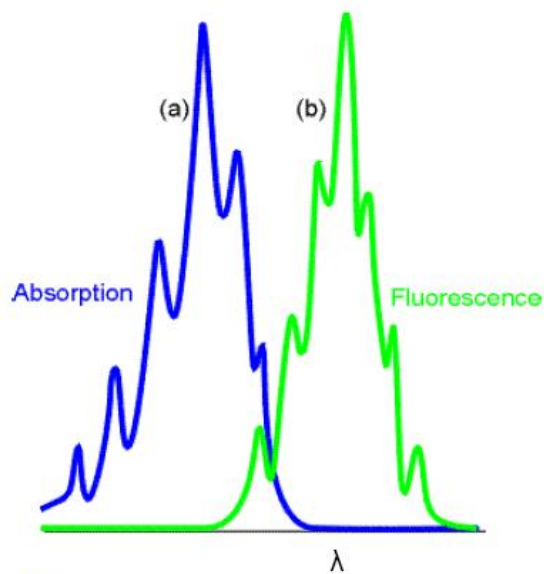
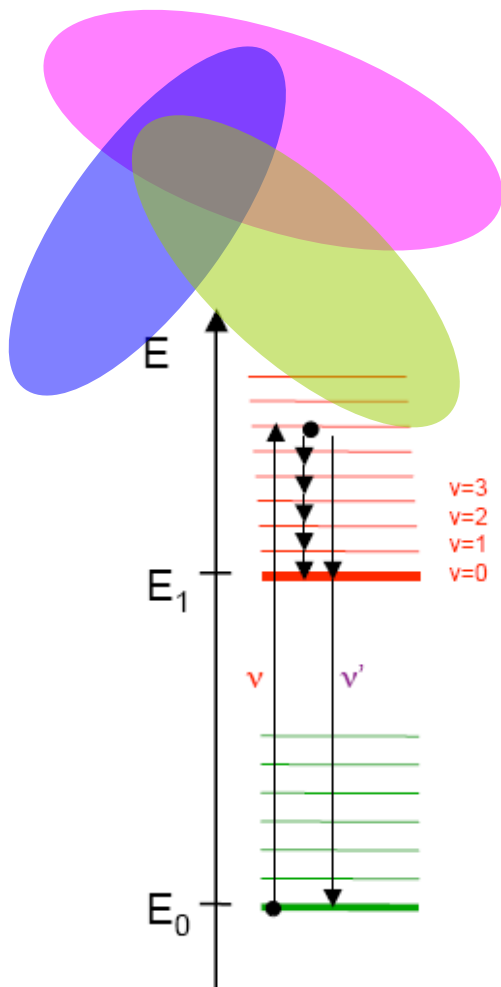
- Radiazione assorbita
- Eccitazione
- Decadimenti non radiativi
- Decadimenti radiativi

La **fluorescenza** avviene con un tempo dell'ordine di **nanosecondi**, invece la **fosforescenza**, a causa della lentezza delle transizioni $S \rightarrow T$ e $T \rightarrow S$ (transizione proibita), ha tempi che vanno dall'ordine dei **millisecondi** fino ai minuti.

Nella *fluorescenza* l'effetto è immediato e si interrompe appena viene interrotta la fonte di energia,

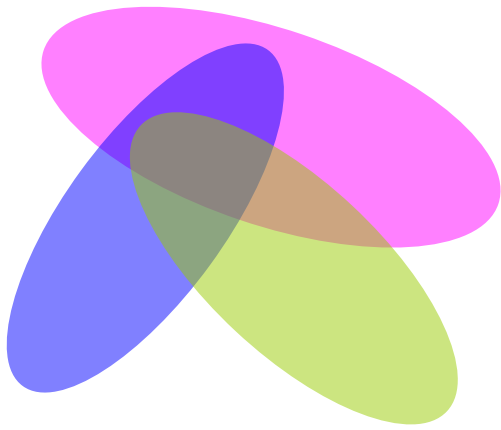
Nella *fosforescenza* l'effetto continua anche dopo.

Spettroscopia di Fluorescenza



L'assorbimento mostra una struttura caratteristica dello stato superiore

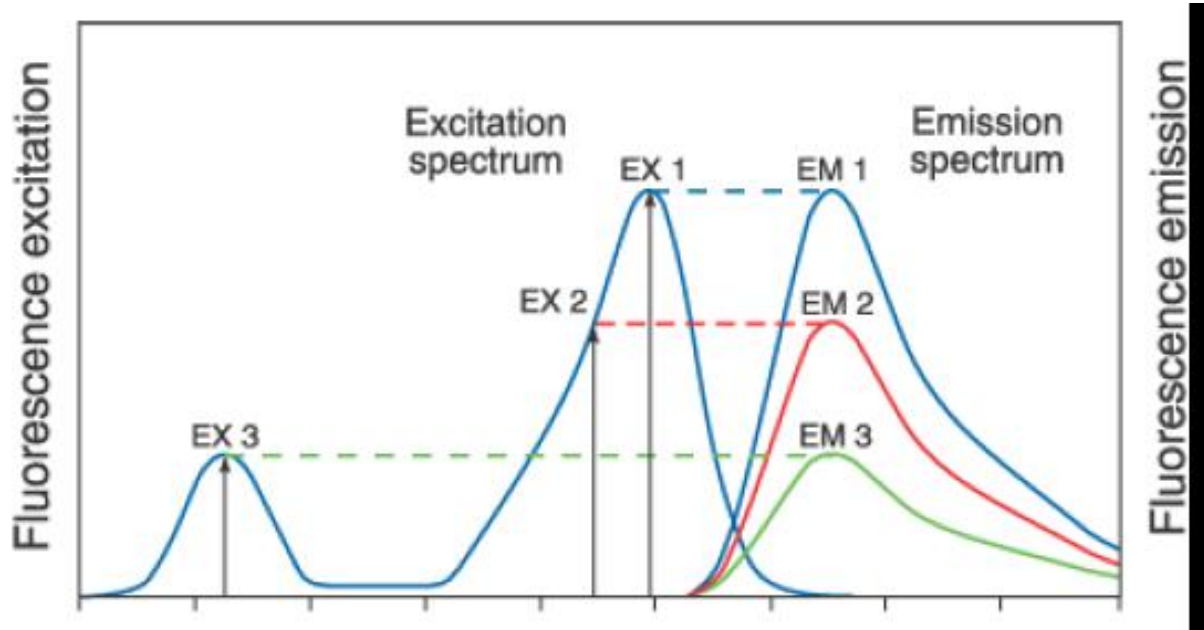
La fluorescenza mostra una struttura caratteristica dello stato elettronico inferiore. E' spostata a frequenze piu' basse



Spettroscopia di Fluorescenza

Lo spettro di emissione e la λ_{\max}
non dipendono dalla $\lambda_{(\text{exc})}$

**L'intensità di fluorescenza e $\lambda_{\max(\text{em})}$ sono sensibili
all'intorno**





VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

Tutte le molecole che assorbono nel visibile/UV sono quindi potenzialmente fluorescenti, ma il fenomeno è in realtà rilevante solo per alcune di esse a causa dell'esistenza di fenomeni dissipativi non radiativi che competono con l'emissione di radiazione.

Ci sono quattro processi di disattivazione dello stato S_1 a T ambiente, che permettono alla molecola di perdere il suo eccesso di energia elettronica e di ritornare allo stato S_0 .

1. **EMMISSIONE DI FLUORESCENZA**



2. **CONVERSIONE INTERNA**



3. **CONVERSIONE INTERSISTEMA**



4. **SMORZAMENTO PER COLLISIONI**





VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

Tutte le molecole che assorbono nel visibile/UV sono quindi potenzialmente fluorescenti, ma il fenomeno è in realtà rilevante solo per alcune di esse a causa dell'esistenza di fenomeni dissipativi non radiativi che competono con l'emissione di radiazione.

Ci sono quattro processi di disattivazione dello stato S_1 a T ambiente, che permettono alla molecola di perdere il suo eccesso di energia elettronica e di ritornare allo stato S_0 .

Un esempio di Q è l'ossigeno che smorza una quantità significativa della fluorescenza degli idrocarburi aromatici.

4. SMORZAMENTO PER COLLISIONI



* L' O_2 inibisce anche la fosforescenza. Ciò spiega perché, mentre è facile osservare la fosforescenza dei solidi a T ambiente, è spesso impossibile osservare la fosforescenza delle soluzioni: le molecole di O_2 , assorbendo energia per collisione con le specie eccitate, smorzano la loro fosforescenza. Per evitare questo le soluzioni vengono raffreddate in azoto liquido (77°K) e fatte congelare.



VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

1. **SOLVENTE:** Il solvente può interagire sia con lo stato fondamentale ma ancor più con lo stato eccitato.
2. **pH:** può influenzare l'assetto elettronico della molecola, soprattutto se possiede idrogeni a carattere acido; ad es. molti fenoli sono fluorescenti a pH neutro o acido e non lo sono a pH alcalini
3. **TEMPERATURA:** incide sulla viscosità della matrice e quindi può favorire o meno le collisioni con le particelle che circondano la molecola; per le misure fluorescenti in genere si opera a temperatura ambiente proteggendo il campione dal calore generato dalle lampade.
4. **MATRICI:** può contenere sostanze che assorbono parte della radiazione eccitante o emessa.
5. **SMORZAMENTO:** le varie interazioni chimiche con particolari specie chimiche eventualmente presenti nella matrice possono determinare una attenuazione del segnale.
6. **CONCENTRAZIONE:** l'emissione fluorescente aumenta con la concentrazione in modo lineare solo per valori bassi di quest'ultima.



*VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA
FLUORESCENZA*

Resa quantica

Φ = numero di fotoni emessi / numero di fotoni assorbiti

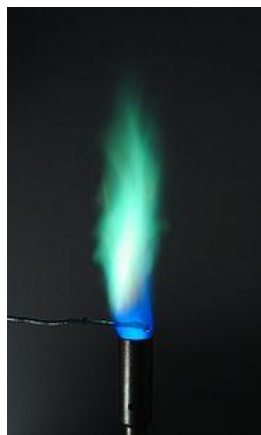
Per molte molecole la resa quantica è tra 0.3 e 0.7.

VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

• Quando una molecola emette luce significa che ha sempre assorbito energia. Quando una molecola assorbe non sempre emette luce. (*)

(*) Anche gli atomi possono emettere luce. In chimica, il **saggio alla fiamma** è una semplice tecnica di analisi qualitativa per verificare la presenza di ioni di metalli alcalini, alcalino-terrosi e alcuni metalli di transizione.

Si basa sull'emissione di luce di determinate frequenze da parte degli atomi di un campione, eccitati per via termica.

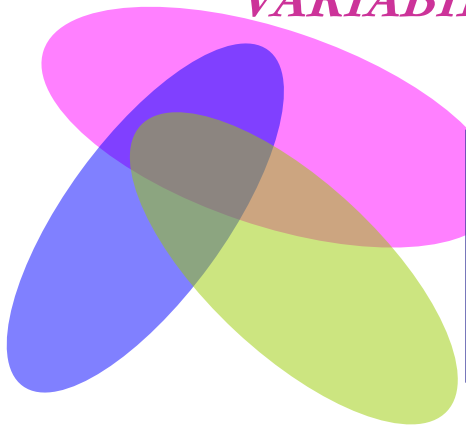


Sale di rame



Sale di sodio

VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA



• Quando una molecola emette luce significa che ha sempre assorbito energia. Quando una molecola assorbe non sempre emette luce. (*)

b) Tipo di transizione

Il fenomeno della fluorescenza è legato all'assorbimento di radiazioni ultraviolette con $\lambda > 250$. Radiazioni a lunghezza d'onda inferiore hanno sufficiente energia da comportare la disattivazione degli stati eccitati mediante meccanismi diversi. Raramente si osserva perciò la fluorescenza dovuta a transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Questo tipo di emissione è limitato ai processi a bassa energia $\pi \rightarrow \pi^*$ o $n \rightarrow \pi^*$, a seconda di quale delle due abbia energia minore.

Empiricamente si osserva che **la fluorescenza si presenta più comunemente in composti nei quali la transizione a energia più bassa è del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$** . La resa quantica di questo tipo di transizione è maggiore sia perché c'è una maggiore probabilità che avvenga (la vita media dello stato eccitato è di 10^{-9} - 10^{-7} s contro i 10^{-7} - 10^{-5} s dello stato eccitato di una transizione $n \rightarrow \pi^*$) sia perché i processi che competono con la fluorescenza avvengono con un minor facilità.

Infatti l'assorbività molare della transizione $n \rightarrow \pi^*$, che rappresenta una misura della probabilità che la transizione avvenga, è da 100 a 1000 volte minore di quella della transizione $\pi \rightarrow \pi^*$.



FLUORESCENZA PRIMARIA

(naturale, spontanea, propria, intrinseca, autofluorescenza)

Tipica di molte sostanze naturali sia nel mondo vegetale che animale (fisiologicamente presente in molti tessuti).

*Praticamente **tutte le clorofille** sono fluorescenti

***Molti pigmenti naturali** specialmente quelli di natura lipidica hanno emissioni fluorescenti tipiche (lipofuscine, cerebrosidi).

***Alcuni aminoacidi importanti:** Triptofano e Tirosina (e quindi le proteine che li contengono).

***Molti enzimi e coenzimi** (es. NAD).

***Molte vitamine** (soprattutto dei gruppi A e D)

***Molti farmaci e molecole "aromatiche"** in generale (es. farmaci antitumorali e antibiotici).

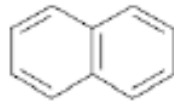
Spettroscopia di Fluorescenza

Sono in genere fluorescenti...

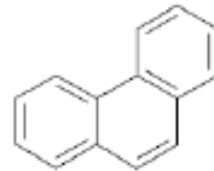
- I policiclici aromatici e i loro derivati:



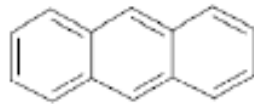
Benzene



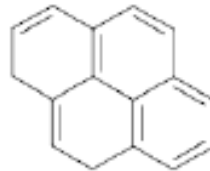
Naftalene



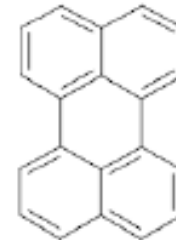
Fenantrene



Antracene



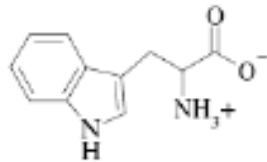
Pirene



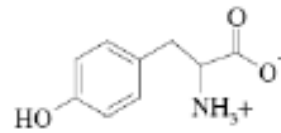
Perilene

Spettroscopia di Fluorescenza

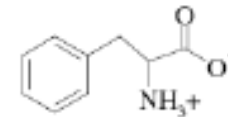
Sono in genere fluorescenti...



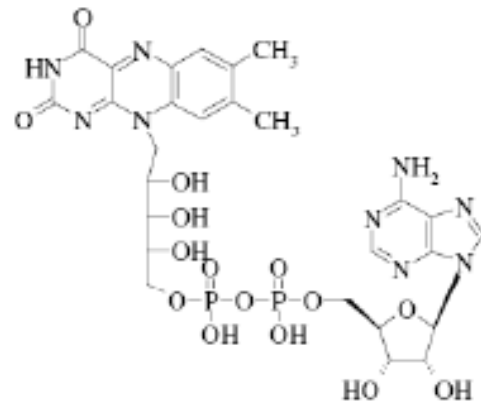
Triptofano (W)



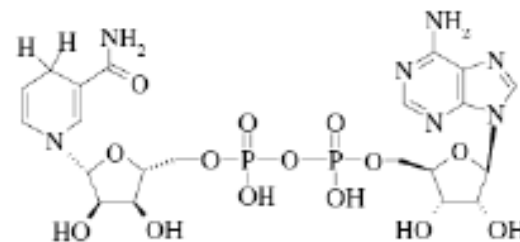
Tirosina (Y)



Fenilalanina (P)



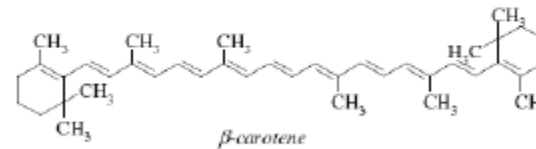
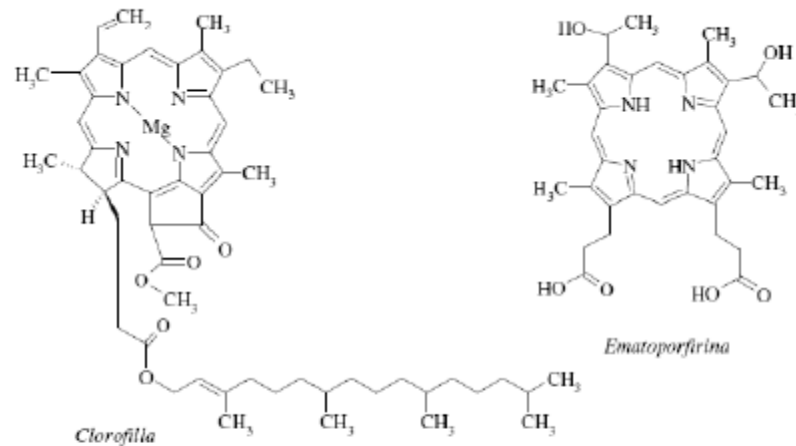
FAD

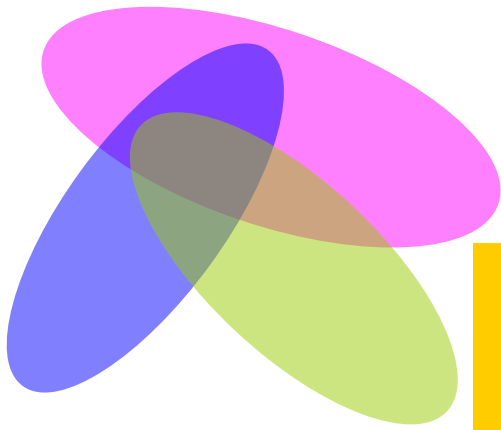


NADH

Spettroscopia di Fluorescenza

Sono in genere fluorescenti...





FLUORESCENZA SECONDARIA

(indotta, artificiale)

Appositamente "indotta" nel campione da esaminare attraverso l'impiego di vari procedimenti.

- **Fluorocromizzazione** (diretta o a più stadi) mediante "marcatori" fluorescenti (fluorocromi) (*)
- Indotta da **trattamenti chimici e/o chimico-fisici** atti a modificare sostanze già presenti nel campione che diventano quindi prodotti fluorescenti.

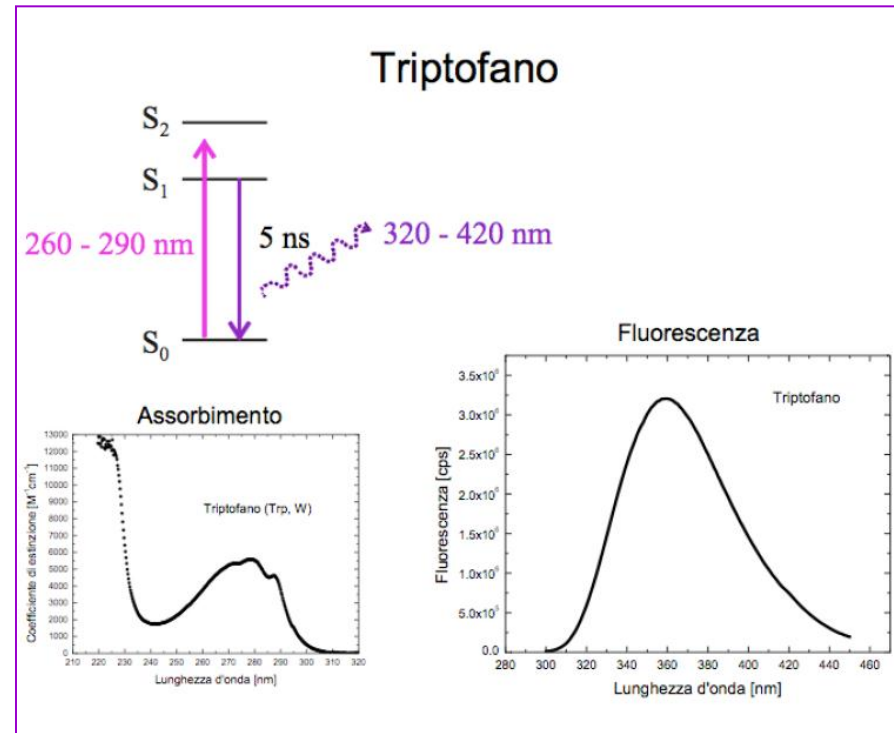


Spettroscopia di Fluorescenza

Perche' e' importante in biologia?

perche' gli aminoacidi aromatici (fenilalanina, istidina, triptofano e tirosina) emettono luce di fluorescenza, in particolare il **triptofano** ha uno spettro piu' intenso degli altri.

Questa luce dipende dall'ambiente circostante e permette di ottenere informazioni sullo stato di una proteina (es. se un TRP e' nascosto o esposta all'acqua).





Spettroscopia di Fluorescenza

Perche' e' importante in biologia?

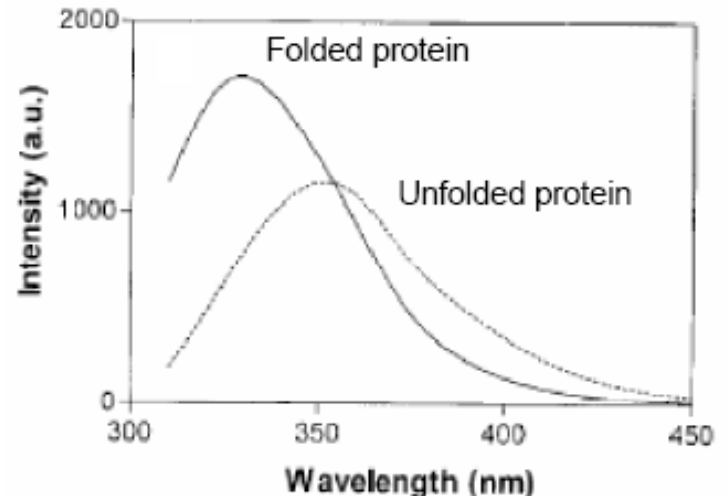
perche' gli aminoacidi aromatici (fenilalanina, istidina, triptofano e tirosina) emettono luce di fluorescenza, in particolare il **triptofano** ha uno spettro piu' intenso degli altri.

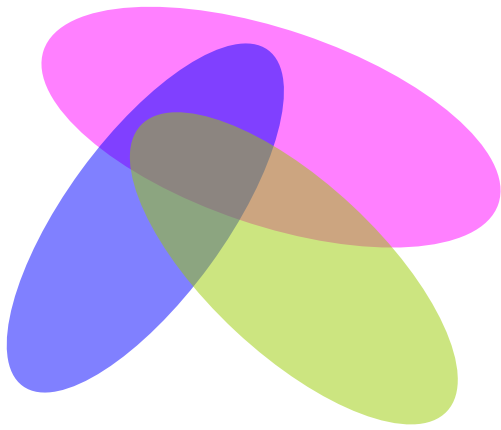
Questa luce dipende dall'ambiente circostante e permette di ottenere informazioni sullo stato di una proteina (es. se un TRP e' nascosto o esposto all'acqua).

Il massimo dell'emissione è molto sensibile alla polarità dell'intorno.

Ad esempio un triptofano in acqua emette a 350 nm mentre un triptofano ben protetto dalla proteina emette a 330 nm.

Typical result:





Spettroscopia di Fluorescenza

Perche' e' importante in biologia?

* perche' e' sempre possibile attaccare delle piccole molecole fluorescenti, tipo la fluorescina, a molecole non fluorescenti molto piu' grandi tipo DNA e proteine

* perche' si puo' inserire il gene di una proteina fluorescente (GFP) in qualsiasi parte del DNA.

Spettroscopia di Fluorescenza

L'intensità della radiazione fluorescente I_f ci è data dalla relazione:

$$I_f = K \cdot (I_{\text{incidente}} - I_{\text{uscente}})$$

I_f = intensità della radiazione fluorescente

$I_{\text{incidente}}$ = intensità della radiazione incidente sul campione

I_{uscente} = intensità della radiazione uscente dal campione

K = costante che dipende dal rendimento quantico del processo di fluorescenza

Dalla legge di Lambert – Beer, però, noi sappiamo che:

$$A = -\log \frac{I_{\text{uscente}}}{I_{\text{incidente}}} = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

$$\frac{I_{\text{uscente}}}{I_{\text{incidente}}} = 10^{-\varepsilon \cdot d \cdot c}$$

$$I_{\text{uscente}} = I_{\text{incidente}} \cdot 10^{-\varepsilon \cdot d \cdot c}$$



Spettroscopia di Fluorescenza

L'intensità della radiazione fluorescente I_f ci è data dalla relazione:

$$I_f = K \cdot (I_{\text{incidente}} - I_{\text{uscente}})$$

I_f = intensità della radiazione fluorescente

$I_{\text{incidente}}$ = intensità della radiazione incidente sul campione

I_{uscente} = intensità della radiazione uscente dal campione

K = costante che dipende dal rendimento quantico del processo di fluorescenza

Sostituendo nell'espressione iniziale abbiamo che l'intensità della radiazione fluorescente è data dall'espressione:

$$\begin{aligned} I_f &= K \cdot I_0 - K \cdot I \\ &= K \cdot I_0 - (K \cdot 10^{-\varepsilon \cdot d \cdot c}) \\ &= K \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot d \cdot c}) \end{aligned}$$



Spettroscopia di Fluorescenza

L'intensità della radiazione fluorescente I_f ci è data dalla relazione:

$$I_f = K \cdot (I_{\text{incidente}} - I_{\text{uscente}})$$

I_f = intensità della radiazione fluorescente

$I_{\text{incidente}}$ = intensità della radiazione incidente sul campione

I_{uscente} = intensità della radiazione uscente dal campione

K = costante che dipende dal rendimento quantico del processo di fluorescenza

Facendo quindi l'espansione in serie di McLaurin dell'esponenziale otteniamo una relazione che mostra come l'intensità della fluorescenza sia direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita:

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot (2,303 \varepsilon \cdot d \cdot c)$$

Questa relazione vale però solo per soluzioni molto diluite, la cui concentrazione sia inferiore a 10^{-5} M (quindi parliamo di soluzioni da 10 a 100 volte più diluite di quelle che si usano per una determinazione UV): per questo la spettroscopia di fluorescenza è adatta per la determinazione di analiti in tracce!



Spettroscopia di Fluorescenza

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot (2,303 \varepsilon \cdot d \cdot c)$$

A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (fluoroforo) ($2,3\varepsilon dc < 0,05$), l'intensità della radiazione fluorescente (I_f) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = Kc$$

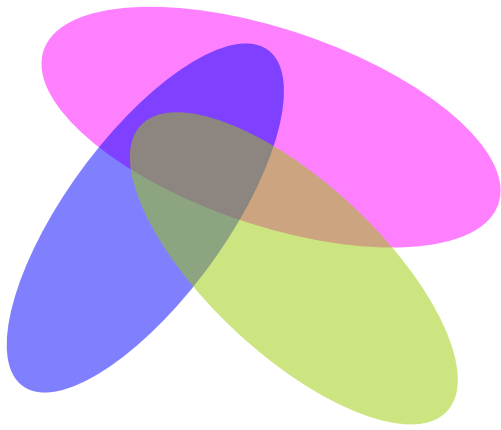
Una misura assoluta di fluorescenza richiederebbe una conoscenza esatta del numero di fotoni emessi ed assorbiti. Ciò è praticamente difficile da realizzare e l'intensità di fluorescenza è espressa in termini relativi o per confronto con una soluzione standard con resa quantica nota.



Spettroscopia di Fluorescenza

Per concentrazioni maggiori ($2,3\epsilon dc > 0,05$) la linearità viene meno a causa di due fattori:

- **Autoestinzione** Collisione fra molecole eccitate.
- **Autoassorbimento** La lunghezza d'onda di emissione si sovrappone a quella di assorbimento. La fluorescenza diminuisce man mano che il fascio di luce attraversa la soluzione.



Spettroscopia di Fluorescenza

Rispetto alla spettrofotometria UV/Vis, la spettroscopia a fluorescenza può avere dei vantaggi:

- a) Alta sensibilità (anche fino a 1000 volte superiore)
- b) Aumentata specificità

Limiti o complessità:

- a) Non tutti i composti sono fluorescenti
- b) Possibilità di quenching



Applicazioni

- **Analisi qualitativa:**

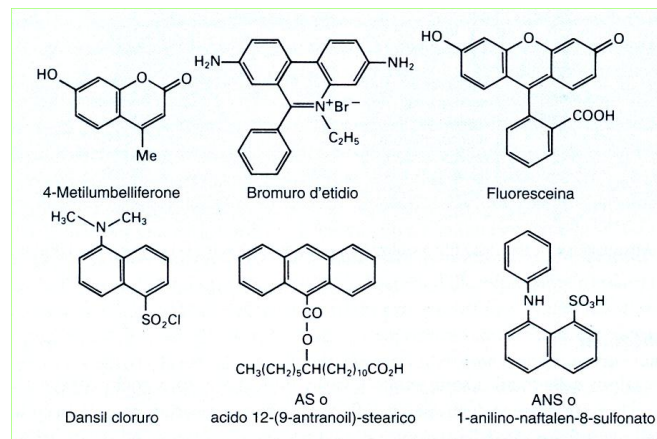
- Identificazione della struttura di una sostanza (confronto tra spettro di assorbimento e spettro di emissione; analisi degli effetti del pH, del solvente, del tempo di decadimento)
- Analisi della struttura delle proteine (*fluorescenza dei residui aromatici*)
- Studi di trasferimento dell'energia (*trasferimento dell'energia per risonanza tra un gruppo donatore ed uno accettore, che si verifica quando questi sono alla distanza opportuna ed esiste una sovrapposizione tra lo spettro di emissione del primo e lo spettro di eccitazione del secondo*)
- Separazione di cellule tramite marcatura con anticorpi fluorescenti
- Dosaggi enzimatici e misure di cinetica enzimatica

Applicazioni

•Analisi quantitativa:

- Misura della concentrazione di molecole fluorescenti (*fluorescenza intrinseca*) o di molecole non fluorescenti previa derivatizzazione con fluorofori o utilizzo di sonde fluorescenti (*fluorescenza estrinseca*).

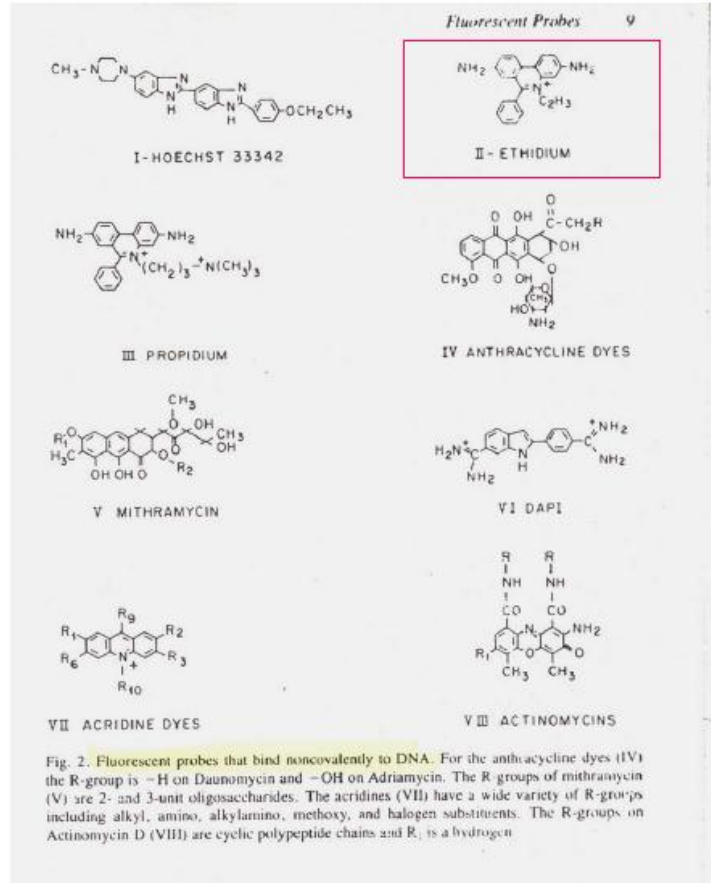
La fluorescenza di alcuni fluorofori è smorzata quando questi si legano ad una determinata molecola o macromolecola (*bromuro di etidio – DNA*). Questo fenomeno viene sfruttato per ottenere misure quantitative di materiali presenti anche in concentrazioni molto basse.

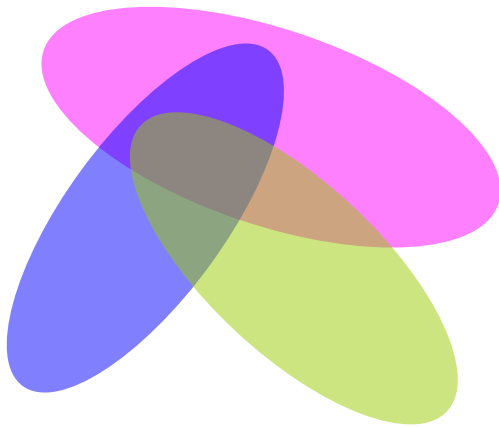




Spettroscopia di Fluorescenza

Intercalanti



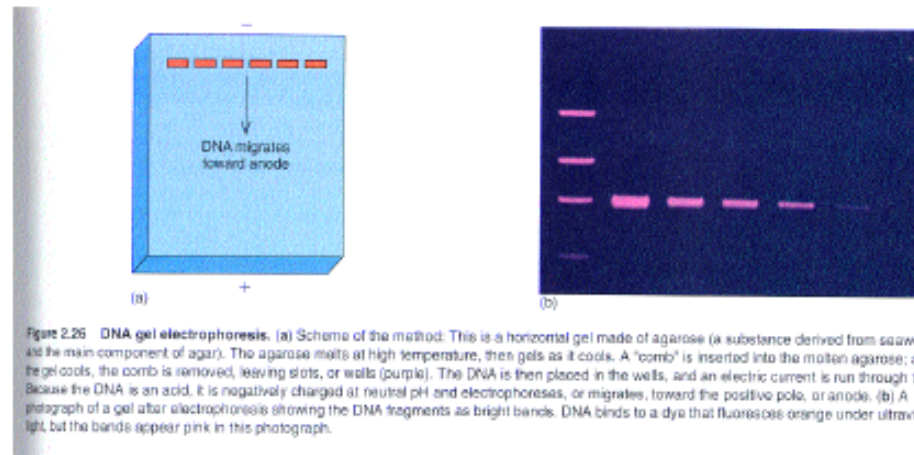


Spettroscopia di Fluorescenza

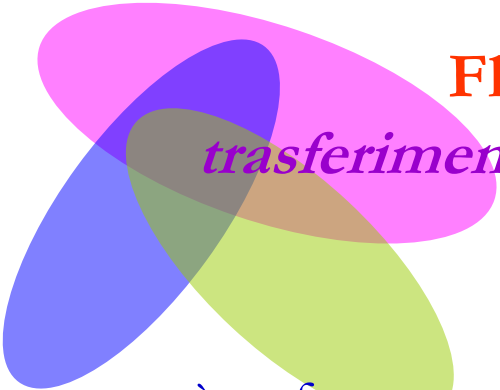
EtBr: uso come colorante del DNA

Elettroforesi in gel di agarosio consente di separare il DNA in funzione della lunghezza.

0.5-2 % di agarosio e tamponi Tris-Borato o Tris-acetato pH 8 +/- EtBr in basse concentrazioni.




Varianti: elettroforesi in campo elettrico pulsante per separare frammenti di grosse dimensioni oppure cromosomi di piccole Dimensioni (es. cromosomi di lievito).



Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

- è un fenomeno di trasferimento energetico tra fluorofori
- E' una tecnica molto usata per la visualizzazione di molecole biologiche (come proteine, lipidi o acidi nucleici) in rapporto tra loro
- **Permette di individuare e caratterizzare con estrema precisione la distanza tra due molecole.** Il meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette **donatore e accettore**.

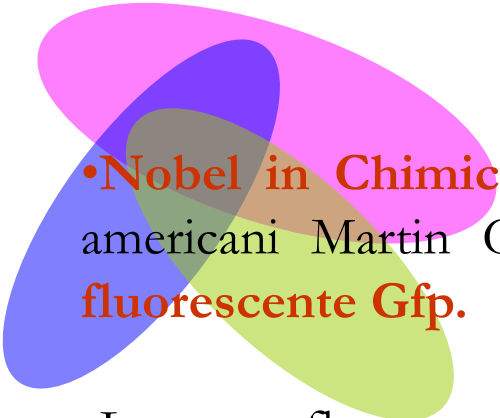


Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

I fluorofori più usati nella FRET sono quelli della **famiglia della GFP** (*Green Fluorescent Protein*).

Si tratta di **molecole proteiche** molto più maneggevoli dei classici fluorofori organici (che presentano notevoli problemi di purificazione, modificazione chimica ed iniezioni intracellulari). La GFP (e le molecole da essa derivate, RFP che emette nel rosso, BFP e CFP nel blu, YFP nel giallo) può infatti essere fusa con la proteina da monitorare attraverso tecnologie di ingegneria genetica.



• **Nobel in Chimica 2008** allo scienziato giapponese Osamu Shimomura e agli americani Martin Chalfie e Roger Y. Tsien **per la scoperta della proteina fluorescente Gfp.**

• La green fluorescent protein (GFP, in italiano proteina fluorescente verde) è una *proteina espressa nella medusa Aequorea victoria*. Grazie alla sua proprietà di fluorescenza, alle sue modeste dimensioni e alla possibilità di modificarne entro certi limiti le caratteristiche spettroscopiche, la GFP è diventata negli ultimi decenni un diffuso **strumento per esperimenti e tecniche di biologia molecolare.**

• La GFP, se colpita e eccitata da una radiazione ad una specifica lunghezza d'onda, è in grado di riemettere luce di colore verde acceso. Sono ormai molte comunque le forme di GFP modificate, in grado di assorbire e emettere radiazione diverse da quelle della proteina originaria.

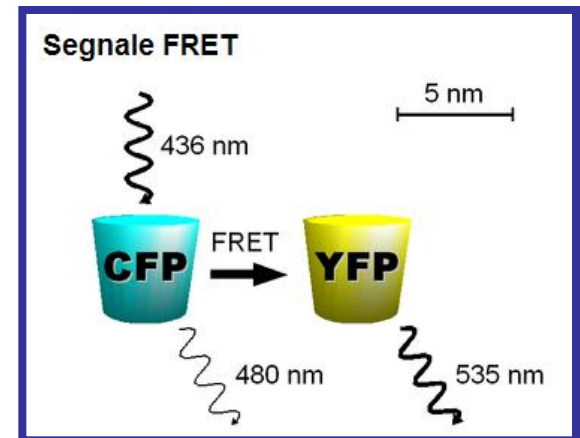
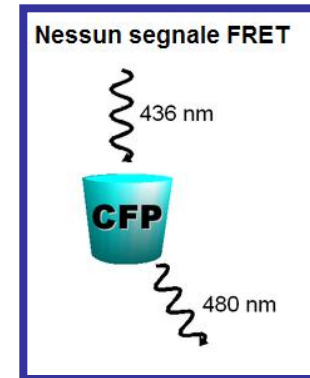
• Con l'aiuto della Gfp, i ricercatori hanno messo a punto modi di osservare processi che prima erano invisibili, come lo sviluppo delle cellule nervose nel cervello o la crescita delle cellule tumorali.

Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

Verso uno di questi due “fluorofori”, detto donatore, viene diretta un'onda luminosa ad una λ specifica (tipicamente, quella relativa al suo picco di assorbimento). Il donatore, eccitato, può emettere fluorescenza secondo il suo spettro tipico di emissione.

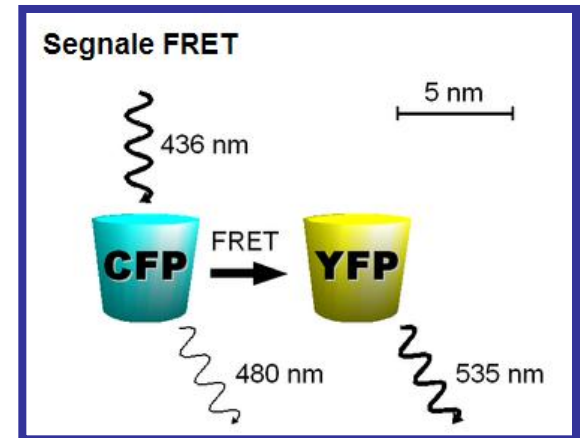
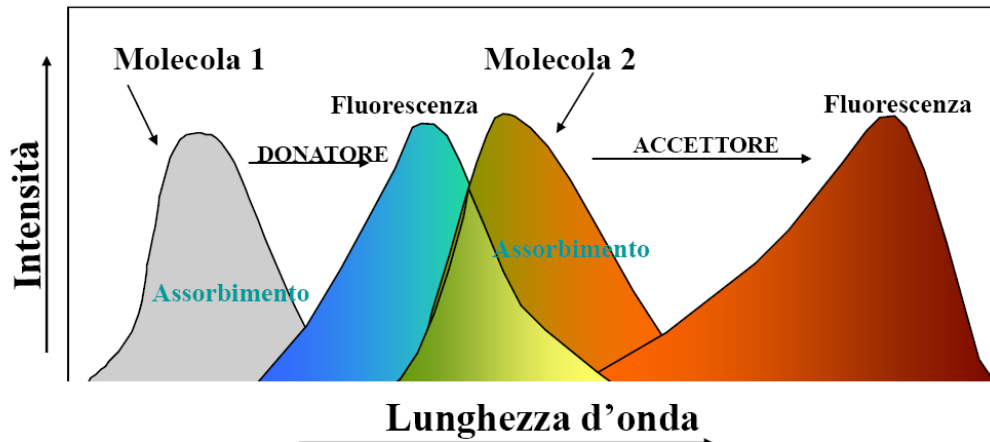
Se lo spettro di emissione del donatore si sovrappone in maniera consistente a quello di assorbimento dell'accettore (se, cioè, i salti energetici associati ai due processi sono simili), il donatore eccitato non emette luce ma “passa” l'eccitazione in maniera risonante all'accettore (in modo più o meno efficiente), che emetterà un quanto luminoso alla sua lunghezza d'onda caratteristica.




Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

Nell'immagine a lato, il donatore è CFP (Cyan Fluorescent Protein), l'accettore YFP (una variante della Yellow Fluorescent Protein): lo spettro di emissione di CFP e quello di assorbimento di YFP si sovrappongono ampiamente tra i 450 e i 550 nm (area grigia), quindi si tratta di una buona coppia di molecole utilizzabili in FRET.

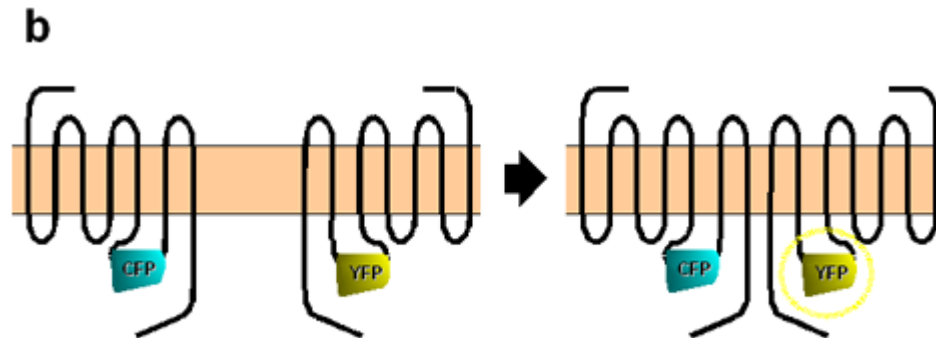




Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

La FRET è uno strumento utile nella **quantificazione delle interazione tra macromolecole biologiche** (proteina-proteina, proteina-acido nucleico, proteina-lipide).



Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

Per **monitorare i cambiamenti conformazionali** all'interno della macromolecola, ad esempio, è possibile marcarla in due siti differenti, lontani tra loro più di 10 nm: se la proteina cambia conformazione, avvicinando i due siti, la FRET può avere luogo ed è in grado di dare segnale. Se il cambiamento conformazionale è dovuto all'interazione con un ligando, è possibile, a monte, posizionare uno dei due fluorofori direttamente sul ligando

