Lezione 5: fluorescenza e chemiluminescenza

Corso di Laboratorio di Chimica e Biochimica
Anno accademico 2019-20

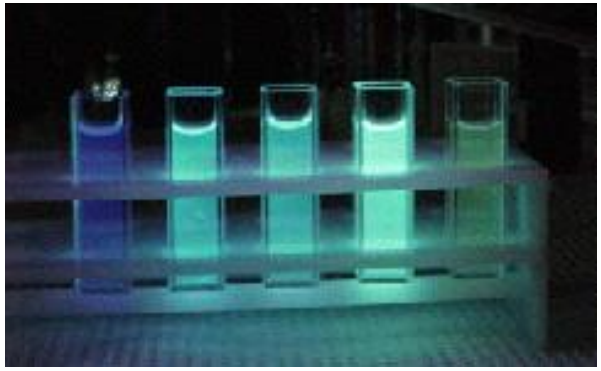
Marco Scocchi

La luminescenza

Luminescenza: fenomeno dovuto alla emissione di radiazione elettromagnetica. Si distingue in:

Fluorescenza (e fosforescenza**).** Determinate dall'emissione di parte delle radiazioni assorbite.

L'energia della luce assorbita da un composto qualsiasi viene generalmente dissipata sotto forma di calore, certe sostanze sono in grado di liberare parte di questa energia sotto forma di emissione di radiazioni.

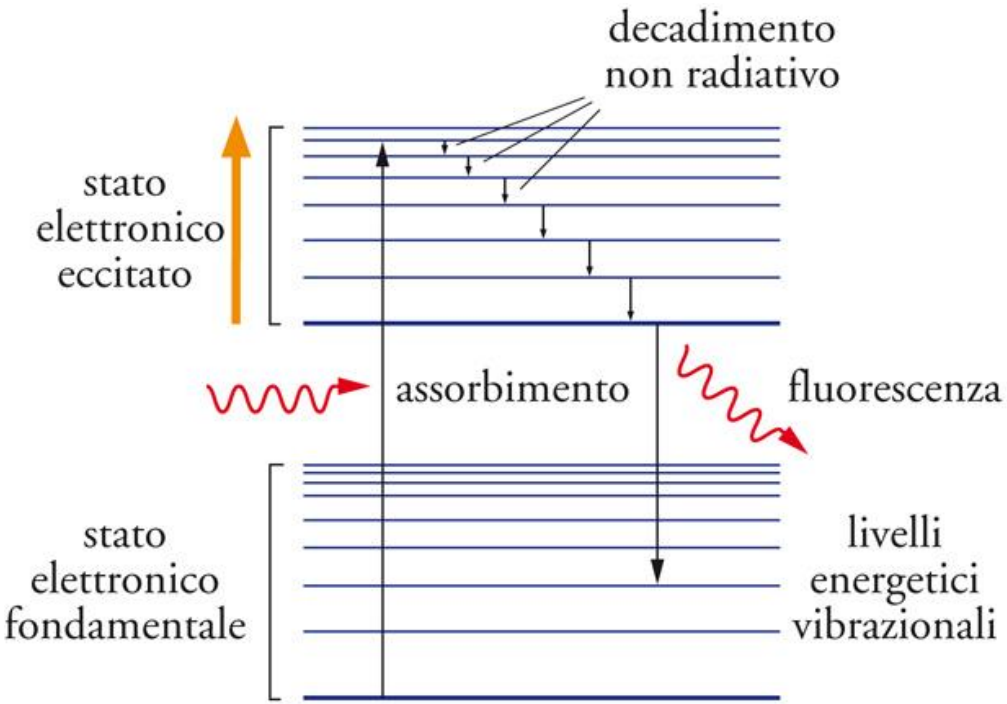


Chemiluminescenza: determinata dall'energia che si libera da una reazione chimica. Nei sistemi biologici queste reazioni sono catalizzate da enzimi (**bioluminescenza**).

La fluorescenza

Il ritorno di un elettrone dallo stato eccitato allo stato fondamentale si accompagna all'emissione di un fotone (fluorescenza o luce di fluorescenza).

La transizione (10^{-8} s) è accompagnata dall'emissione di radiazione di energia inferiore di quella assorbita.
L'elettrone ritorna al allo stato elettronico fondamentale (rilassamento) attraverso una serie di rilassamenti vibrazionali e rotazionali (10^{-12} s) che dissipano l'energia senza emissione di luce (decadimento non radioattivo).

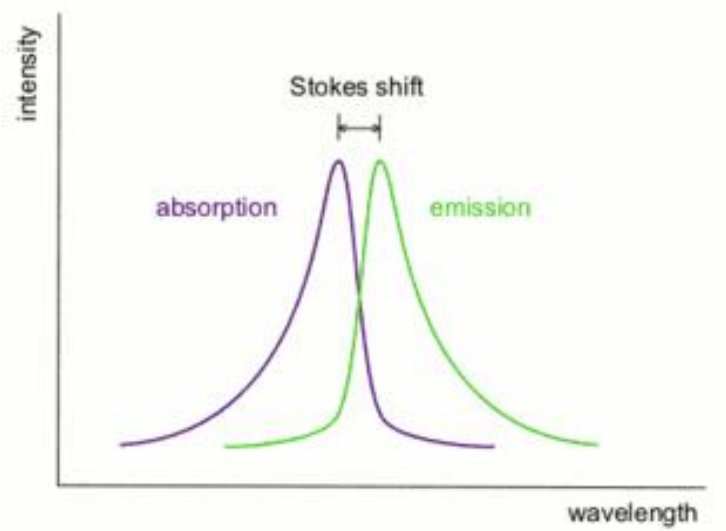


Fosforescenza: fenomeno diverso in cui l'emissione è molto più lenta e persiste anche quando l'eccitazione è terminata (sec-min).

Proprietà della fluorescenza

1) Enenria: la differenza fra l'energia del fotone di eccitazione (E_{ecc}) e quella del fotone di emissione (E_{em}) è una delle proprietà fondamentali che caratterizzano un fluoroforo, è detto:

shift di Stokes = E_{ecc}- E_{em}



Di conseguenza: λ della radiazione emessa (luce di fluorescenza) è sempre maggiore (ha meno energia) di quella assorbita.

2) Resa di fluorescenza: Il numero di fotoni emessi è sempre minore del numero di fotoni assorbiti. Resa (efficienza) quantica (Q o Φ) definisce questo rapporto:

$$\Phi = \text{resa quantica} = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}} \qquad 0 < \Phi \leq 1$$

$\phi > 0$ = fluoroforo/fluorocromo

Intensità di fluorescenza

L'intensità di fluorescenza (I_F) emessa può essere utilizzata a scopi quantitativi.

Per soluzioni diluite, I_F è proporzionale all'assorbimento e alla resa quantica della sostanza.

Quindi:

$$F \propto \Phi * A \qquad I_F = 2{,}3\, I_0\, \Phi * C * \varepsilon_\lambda * l$$

L'intensita di fluorescenza (F) è proporzionale alla concentrazione del fluoroforo, al coefficiente di assorbimento (ε) e alla resa quantica:

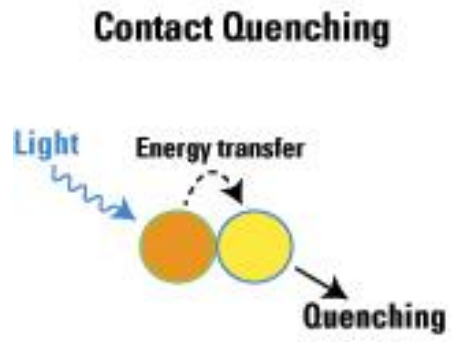
I_0 = Intensità della luce di eccitazione
C = concentrazione molare del composto fluorescente;
l = cammino ottico, in cm, del raggio che attraversa il campione;
e = coefficiente di estinzione molare del composto che assorbe alla lunghezza d'onda λ

Solo a basse concentrazioni I_F è proporzionale alla concentrazione della molecola

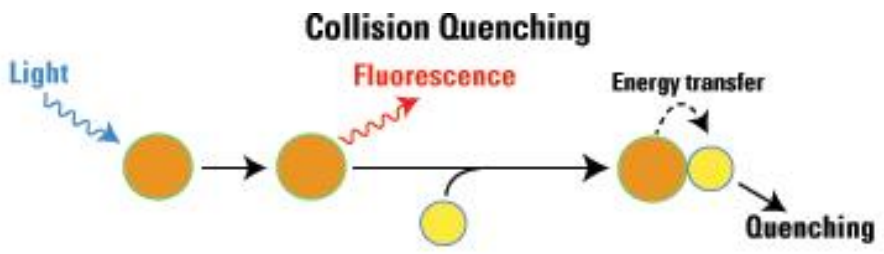
Sensibilità della fluorescenza all'ambiente

Le interazioni tra fluorofori e altre specie molecolari rendono la fluorescenza sensibile all'ambiente.

Specie molecolari che assorbono l'energia del fluoroforo determinano uno smorzamento (quenching) della fluorescenza.
-quenching statico, formazione di complessi non fluorescenti dovuti al contatto con una molecola smorzatrice.

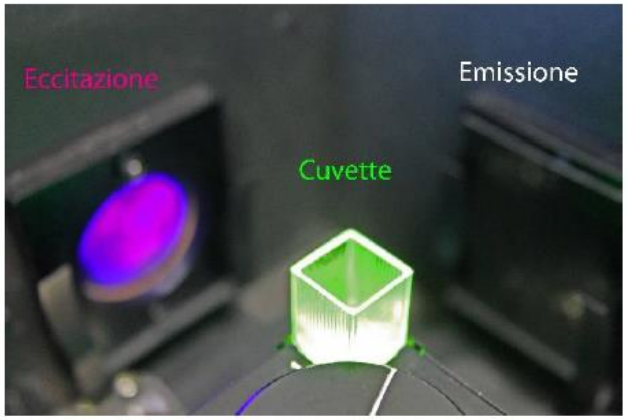


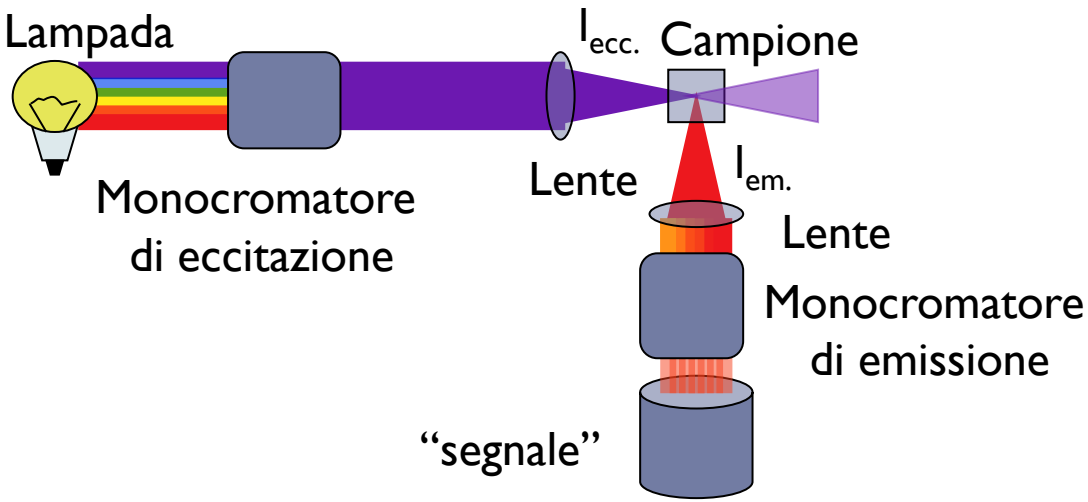
- quenching dinamico o collisionale sottraggono energia alla molecola eccitata per collisione. Se molecole dello stesso tipo: "self-quenching" (autosmorzamento)



F anche influenzata dalla polarità del solvente, e dal pH.

Il fluorimetro/spettrofluorimetro





Cuvette a 4 facce trasparenti

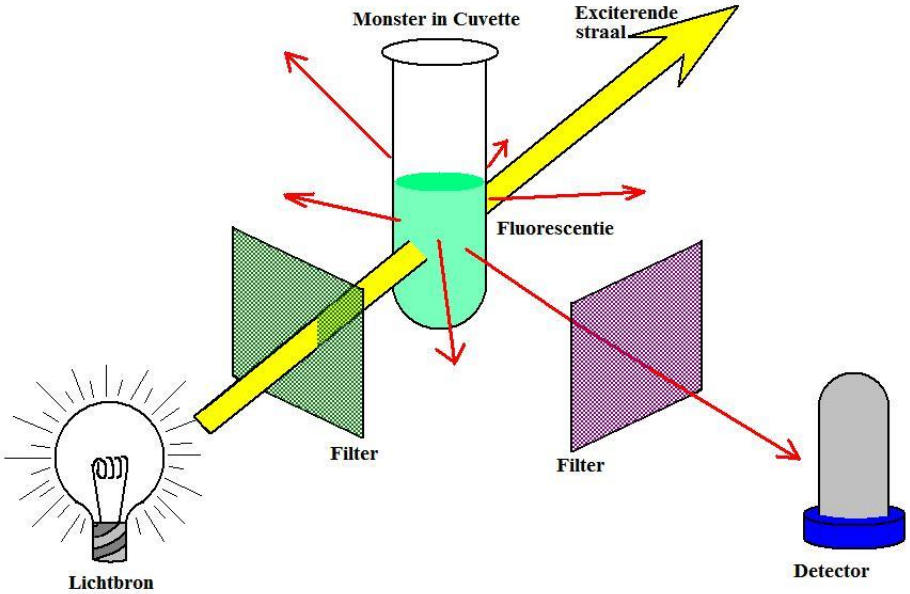
Misure di fluorescenza non sono un rapporto tra due intensità (I/I_0) ma misure di intensità luminosa (I_{em}).

L'intensità di fluorescenza I_f è misurata in unità arbitrarie (u.a.): e dipende, oltre che dal campione amche dalle caratteristiche dello strumento

$I_f < I_{em}$

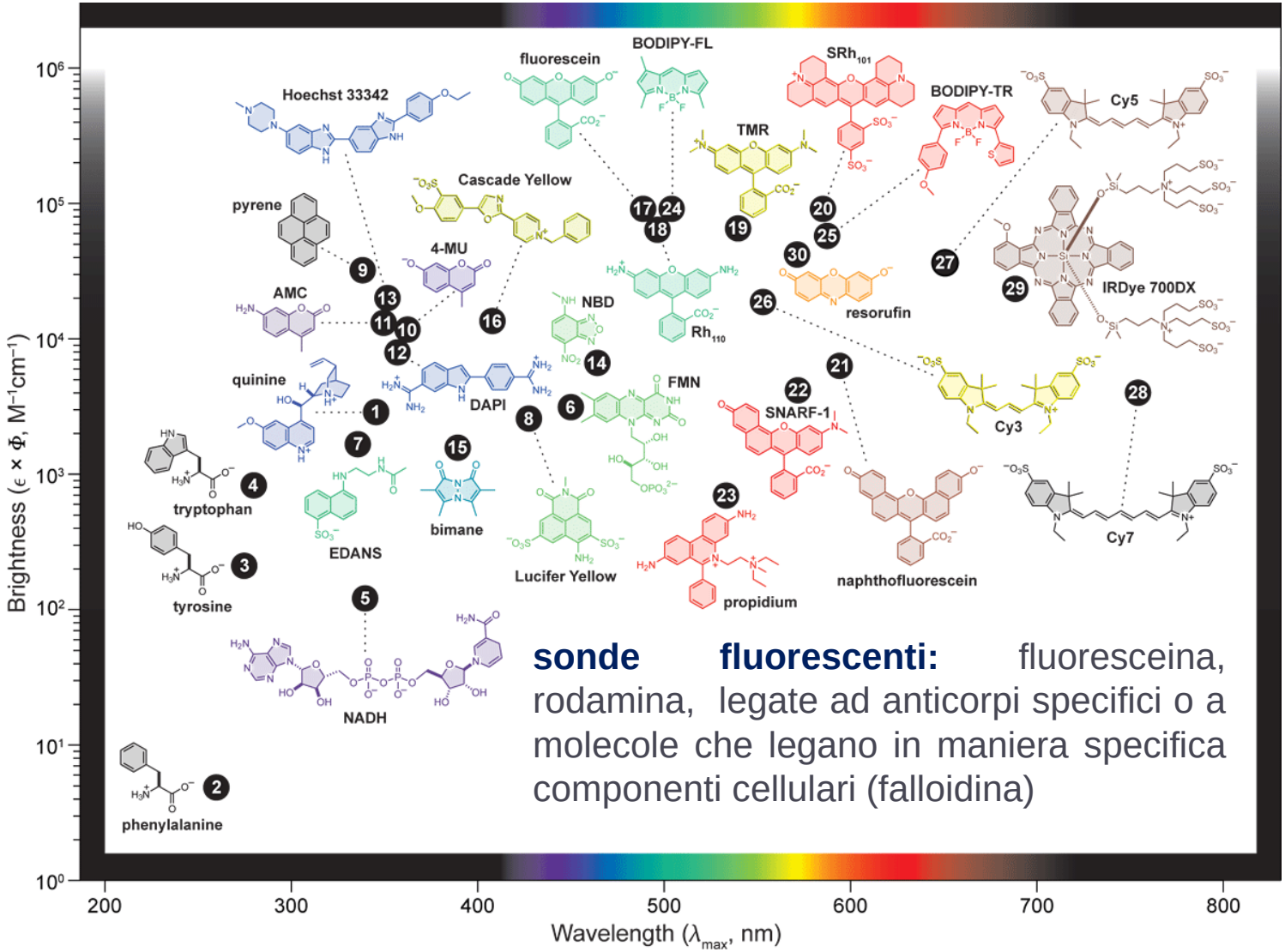
Per dosare un campione da misure di I_f è necessario costruirsi una curva di calibrazione

Fluorimetro glomax



Kit	Excitation Wavelength	Emission Wavelengths
UV (Cat.# E6072)	365nm	410–450nm
Blue (Cat.# E6071)	460nm	515–570nm
Green (Cat.# E6073)	525nm	580–640nm
Red (Cat.# E6074)	625nm	660–725nm
GFPUV (Cat.# E6075)	365nm	515–570nm

Molecole fluorescenti (fluorofori) in biologia

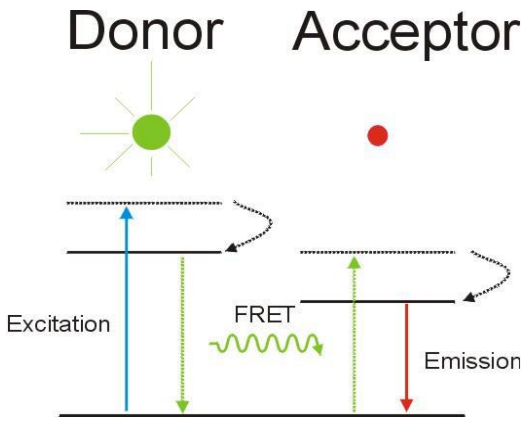


sonde fluorescenti: fluoresceina, rodamina, legate ad anticorpi specifici o a molecole che legano in maniera specifica componenti cellulari (falloidina)

Utilizzo della fluorescenza in biochimica/biologia

Fluorimetria/spettrofluorimetria:

- Concentrazione di molecole (nM)
- Interazioni tra molecole: distanza tra due fluorofori (**trasferimento di energia per risonanza, FRET**) coniugati alle molecole in esame.



- Informazioni strutturali: accessibilità di un fluoroforo (ligando) al solvente tramite **polarizzazione di fluorescenza**: fluoroforo viene eccitato con luce polarizzata, la radiazione di emissione, sarà anch'essa polarizzata; in caso contrario, la rotazione molecolare produrrà una perdita della polarizzazione di grado più o meno marcato in dipendenza dalla facilità di rotazione molecolare.

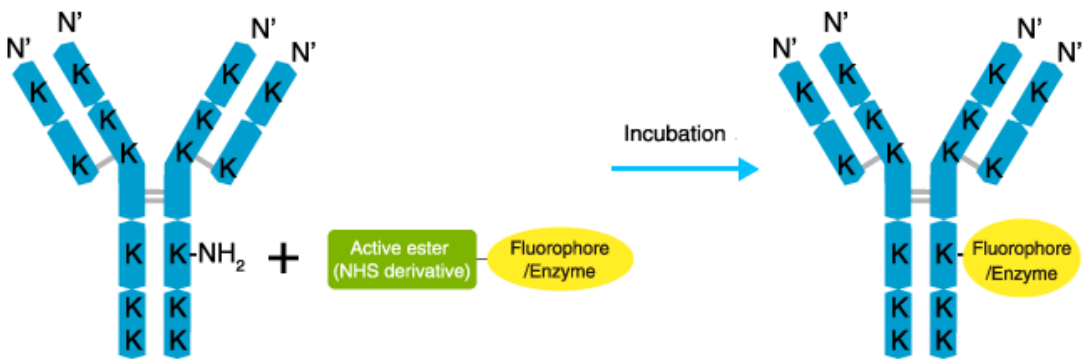
Utilizzo della fluorescenza in biochimica/biologia

Microscopia a fluorescenza.

- Visualizzazione di cellule e componenti subcellulari
- Localizzazione subcellulare di singole proteine.

Citofluorimetria

- Caratterizzazione fisica e/o biochimica (volume, granulosita', fluorescenza) di popolazioni cellulari in sospensione.

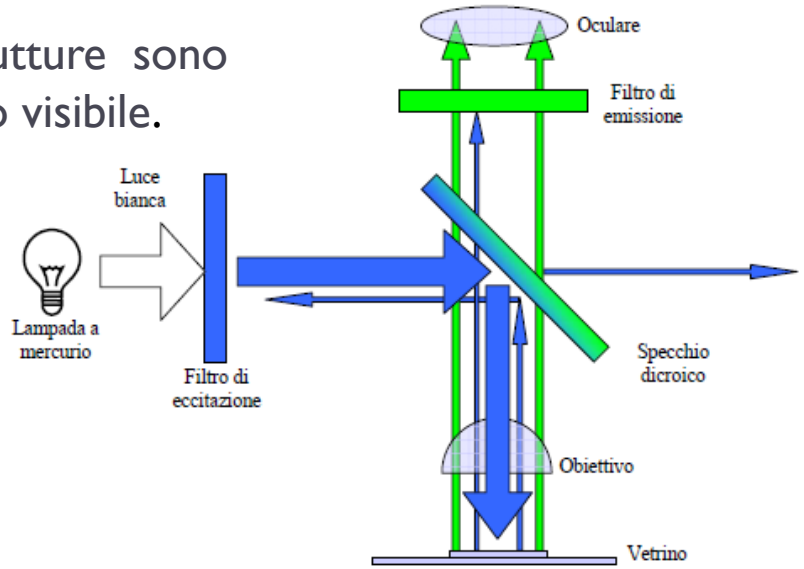


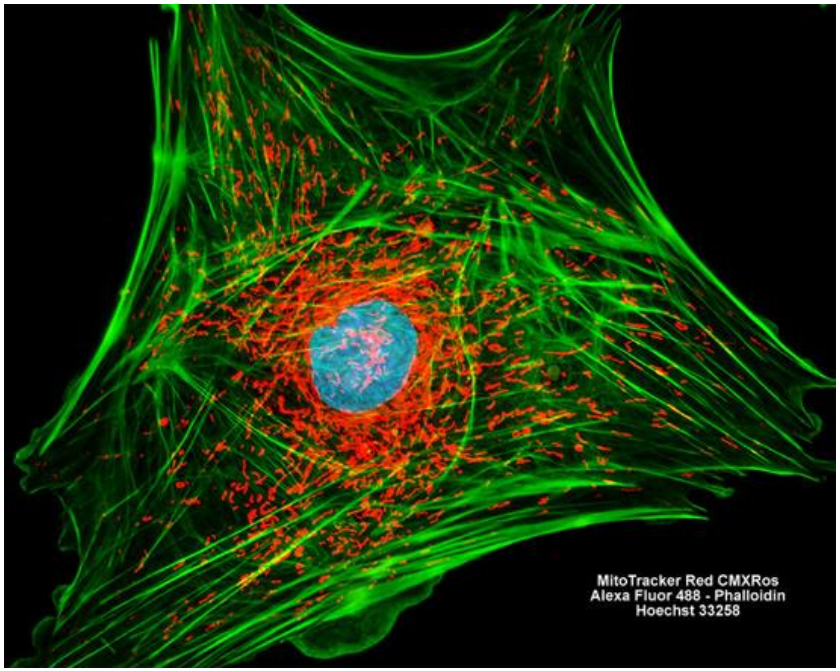
Coniugazione (marcatura) di una proteina (es Immunoglobulina) con un fluoroforo o con un enzima

Microscopia a fluorescenza/confocale

Microscopia che utilizza luce visibile/UV. le strutture sono rese visibili dalla fluorescenza emessa nello spettro visibile.

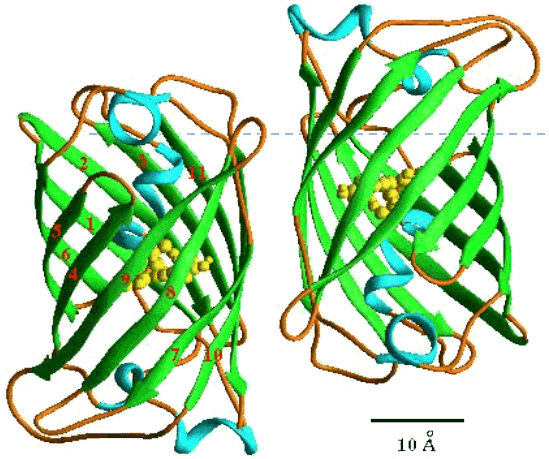
La luce viene generata da un laser che viene focalizzato dall'obiettivo sul campione, in modo da arrivare su un solo piano focale del campione.





Cellule epiteliali ovariche in coltura al microscopio confocale a fluorescenza:

- I nuclei sono evidenziati in blu (Hoechst 33258),
- L'actina in verde (falloidina-alexa fluor 488),
- i mitocondri in rosso (mito tracker red)

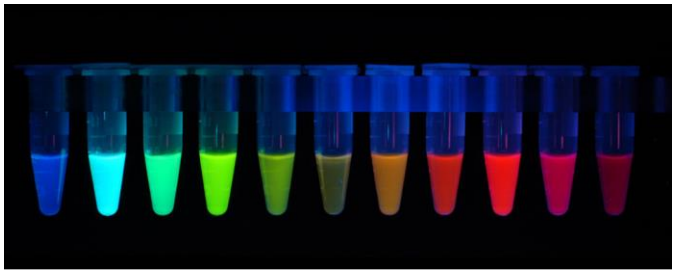


Green fluorescent protein

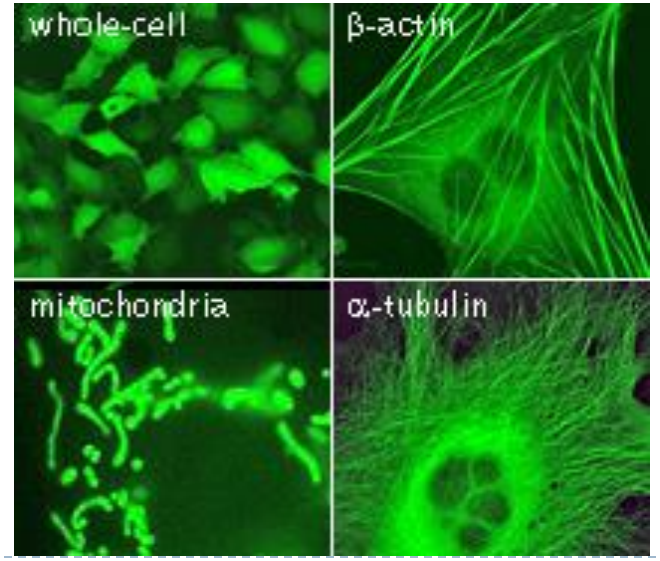
Proteine cellulari possono essere tracciate se prodotte in fusione con proteine fluorescenti (GFP, Green fluorescence proteins).

GFP, proteina fluorescente, eccitata da luce blu è in grado di emettere luce di colore verde acceso.

Il fluoroforo è dato da tre aminoacidi modificati posttraduzionalmente in seguito alla sintesi. Ser 65-Tyr 66-Gly 67.

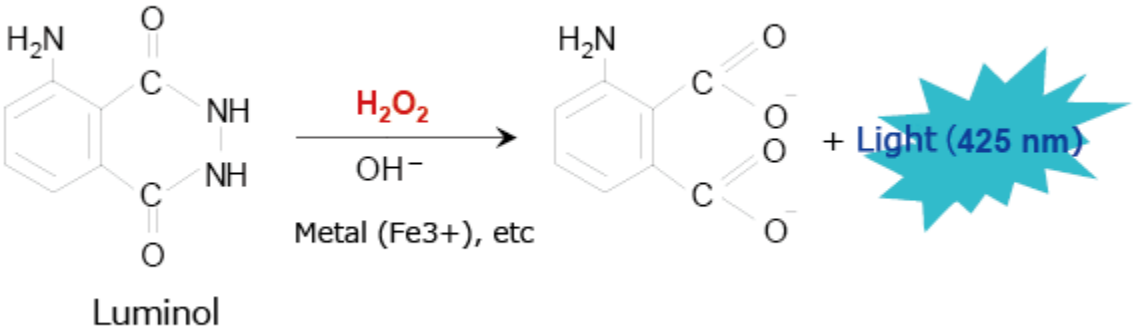


forme di GFP modificate



Chemiluminescenza

Emissione di radiazione luminescente prodotta dal ritorno allo stato fondamentale di una specie eccitata formatasi come intermedio durante una reazione chimica.
Riguarda alcuni tipi di reazioni chimiche (ossidoriduzioni)

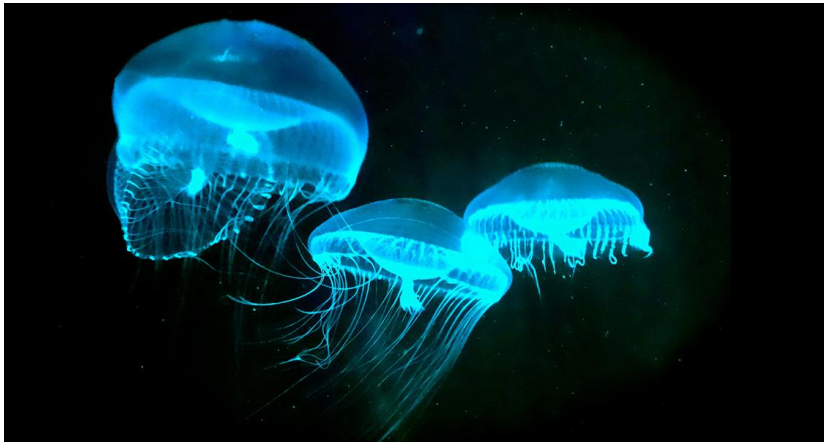


- Luminolo utilizzato per rivelare tracce di sangue

La reazione necessita di un catalizzatore (Fe^{+3}) In presenza di Fe^{+3} , dovuta ad esempio alla presenza di emoglobina ossidata, la reazione emette una luce bluastra

Bioluminescenza

Bioluminescenza: è un processo di emissione di luce visibile negli organismi viventi. E' dovuto ad una reazione chemiluminescente di tipo enzimatico.



Aequorea victoria: la bioluminescenza è tipica degli organismi degli abissi marini (>75% specie) ,

Reazioni bioluminescenti, varie tipi di reazioni, meccanismi differenti, seguono il seguente schema:

intermedio eccitato

Luciferina + O_2 $\xrightarrow[\text{luciferasi}]{}$ ossiluciferina * $\longrightarrow$ ossiluciferina + hv

Luciferasi (enzima) e luciferina sono termini generici per descrivere rispettivamente enzimi e substrati coinvolti nelle diverse reazioni bioluminescenti

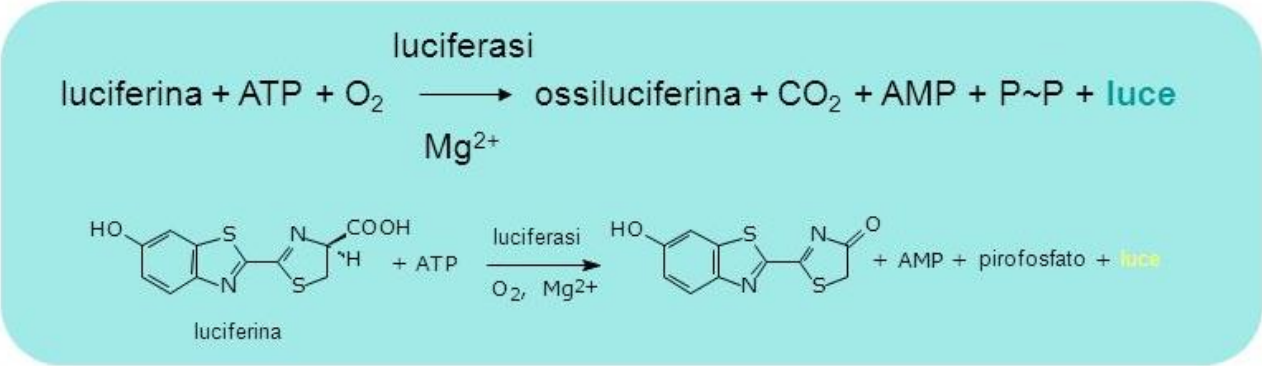
Luminometria – applicazioni della chemiluminescenza

Luminometria: tecnica usata per misurare la luminescenza. Luminometro: un fotomoltiplicatore collegato ad un amplificatore di corrente che raccoglie il segnale luminoso.

Chemiluminescenza utilizzata per:

- Dosaggio di substrati e attività enzimatiche che coinvolgono ATP o NAD(P)+/NAD(P)H
- Marcatura di anticorpi o altre molecole con traccianti enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina) che vengono rivelati con substrati chemiluminescenti.
- Tecniche di molecular Imaging

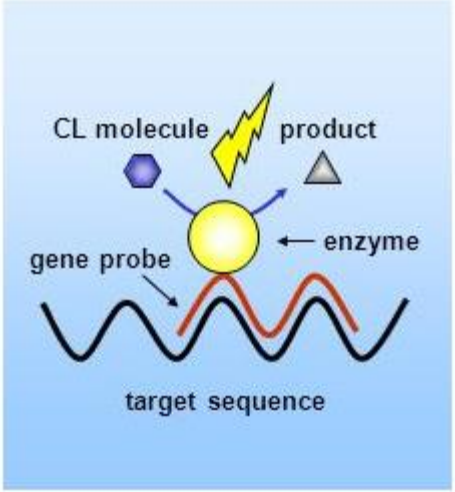
L'ATP presente in un campione biologico può essere dosato dall'intensità di luce prodotta in presenza di un sistema luciferasi/luciferina

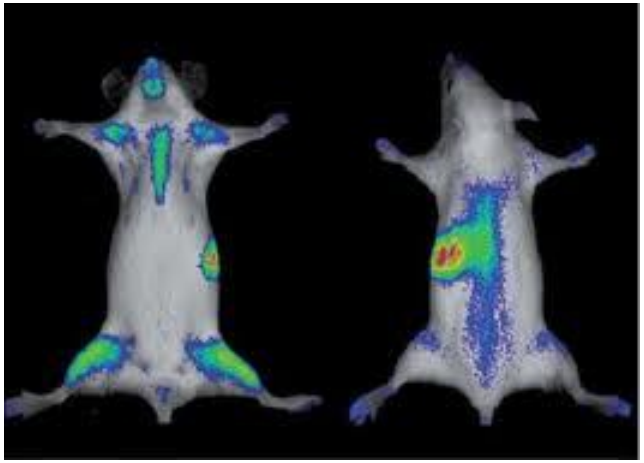


Dosaggio di ATP

Applicazioni della bioluminescenza

Marcatura di DNA: riconoscimento di una sequenza di DNA tramite sonda (probe) legata ad un enzima e aggiunta di una substrato chemiluminescente





In vivo imaging

Nell'animale analizzato il gene in studio è stato sostituito con quello di una luciferasi (gene reporter). In questo modo è possibile rilevare l'espressone in vivo del gene dall'emissione di luce.

Chemiluminescenza permette una maggiore selettività rispetto alle tecniche che utilizzano la fluorescenza che è naturalmente presente in molte molecole