

A tropical beach at night, illuminated by a dense field of bioluminescent organisms in the shallow water, creating a vibrant blue glow. The scene includes palm trees and a sandy shore under a dark sky.

Lezione 5: fluorescenza e chemiluminescenza

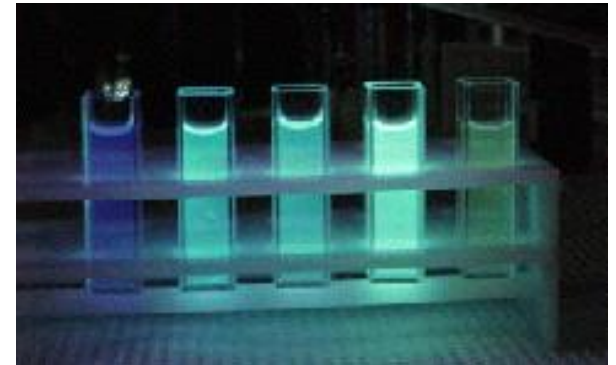
Corso di Laboratorio di Chimica e Biochimica
Anno accademico 2020-21
Marco Scocchi

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**).

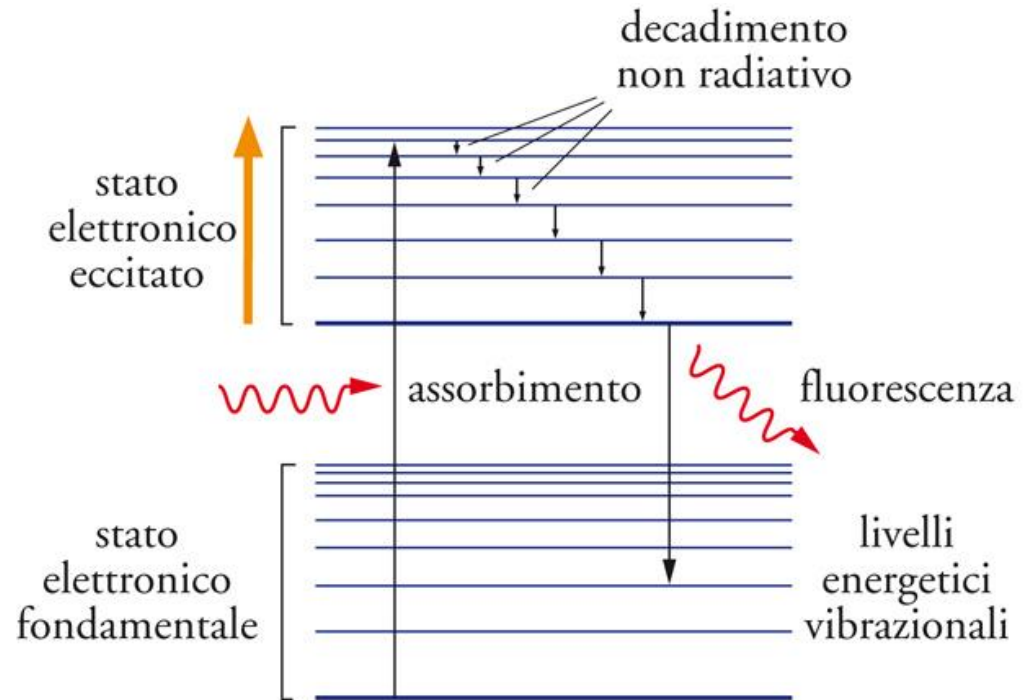


La fluorescenza

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.

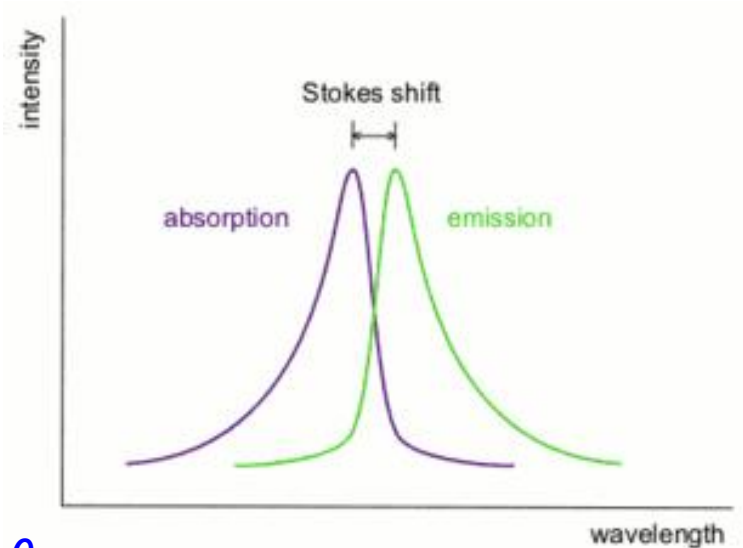
L'elettrone ritorna allo stato elettronico fondamentale (rilassamento) attraverso una serie di rilassamenti vibrazionali e rotazionali (10^{-12} s) che dissipano l'energia senza emissione di luce (decadimento non radiativo).



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) L'energia del fotone di emissione (E_{em}) è sempre inferiore a quella del fotone di eccitazione (E_{ecc}). La differenza di energia, e quindi di λ della radiazione emessa (luce di fluorescenza), dà luogo allo spostamento (shift) di Stokes. L'entità dello spostamento dipende dal tipo di fluoroforo (molecola fluorescente).



Shift (spostamento) di Stokes = $\lambda_{em} - \lambda_{ecc} > 0$

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:

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

$\phi > 0$ = fluoroforo/fluorocromo

Intensità di fluorescenza

L'intensità di fluorescenza (I_F) emessa può essere utilizzata per determinare la quantità (concentrazione) di un fluoroforo.

Per soluzioni diluite, dal momento che F è proporzionale all'assorbimento e alla resa quantica Φ della sostanza:

$$F \propto \Phi * A$$

$$I_F = 2,3 I_0 \Phi * C * \epsilon_\lambda * l$$

I_0 = Intensità della luce di eccitazione

C = concentrazione molare del composto fluorescente;

l = cammino ottico, in cm, del raggio che attraversa il campione;

ϵ = coefficiente di estinzione molare del composto che assorbe alla lunghezza d'onda λ

Quindi, l'intensità di fluorescenza (I_F) è proporzionale alla concentrazione del fluoroforo, al coefficiente di estinzione molare (ϵ), al cammino ottico, e alla resa quantica.

Brillantezza (brightness): $\epsilon_\lambda \times \Phi$

Solo a basse concentrazioni I_F è proporzionale alla concentrazione della molecola



Sensibilità della fluorescenza all'ambiente

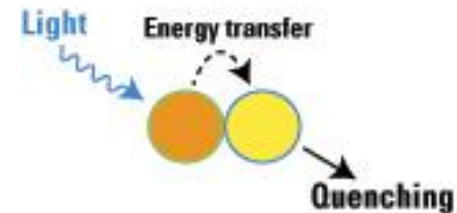
Le interazioni tra fluorofori e altre specie molecolari rendono **la fluorescenza sensibile all'ambiente**.

Specie molecolari che assorbono l'energia del fluoroforo determinano uno smorzamento (**quenching**) della fluorescenza riducendo la resa quantica.

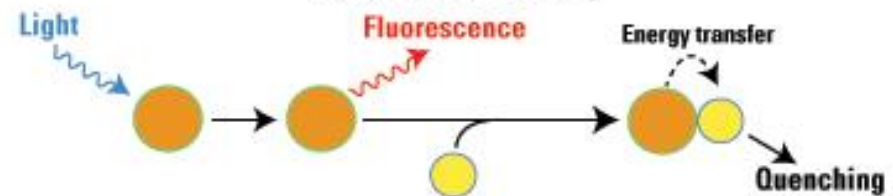
- **quenching statico o di contatto**: formazione di complessi non fluorescenti dovuti al contatto con una molecola vicina smorzatrice.

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

Contact Quenching

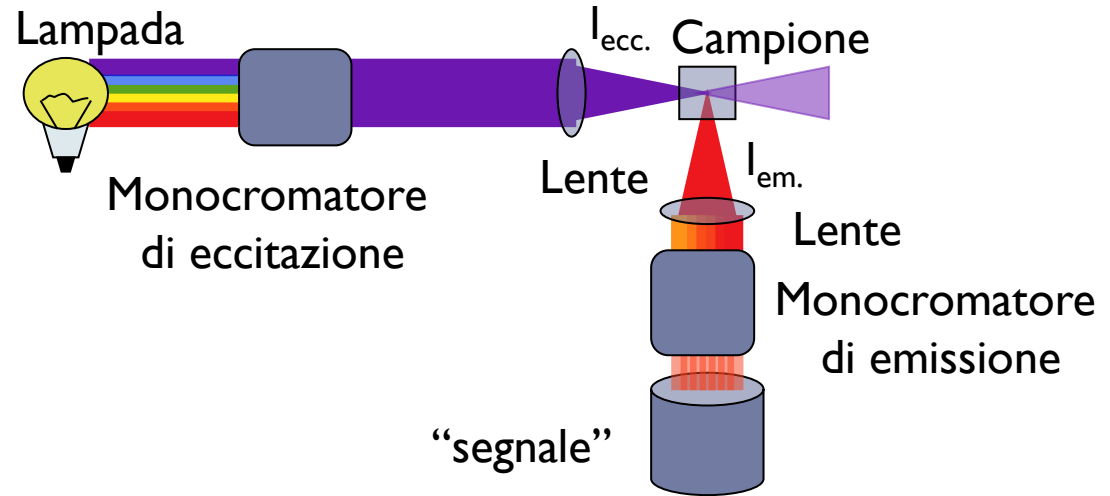
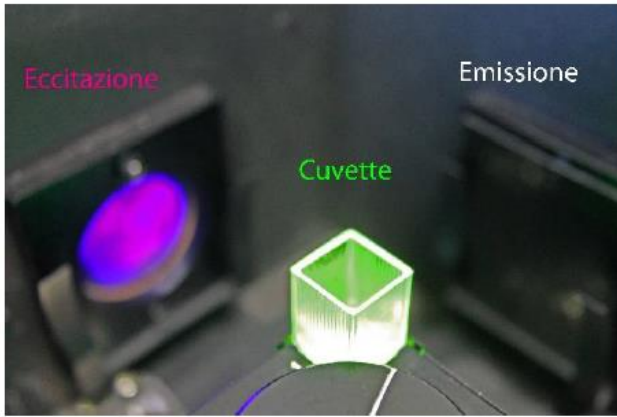


Collision Quenching



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}).

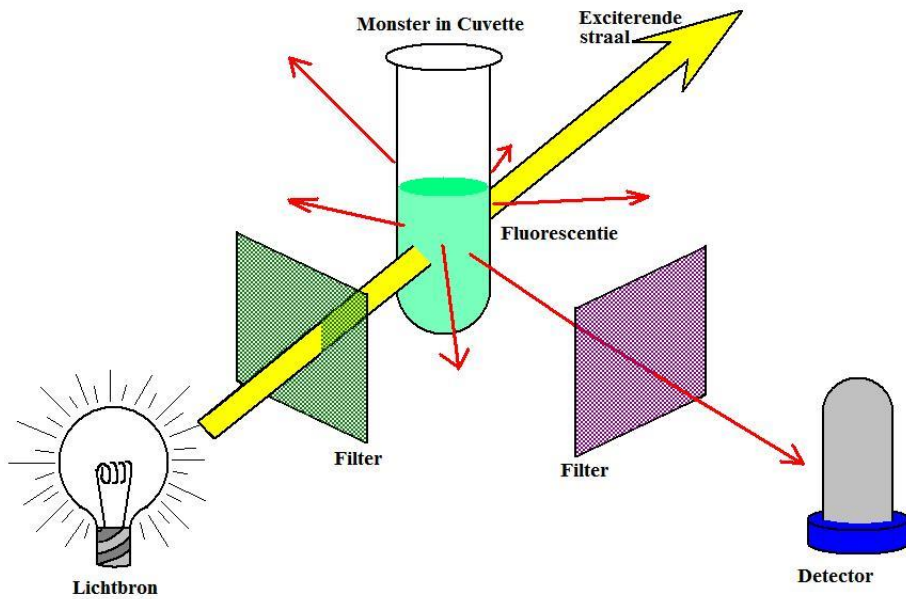
L'intensità di fluorescenza I_f rilevata è misurata in unità arbitrarie (u.a.): dipende, oltre che dal campione anche dalle caratteristiche dello strumento

Infatti

$$I_f < I_{em}$$

Per dosare un campione da misure di I_f è necessario costruirsi una curva di calibrazione utilizzando campioni a concentrazione nota.

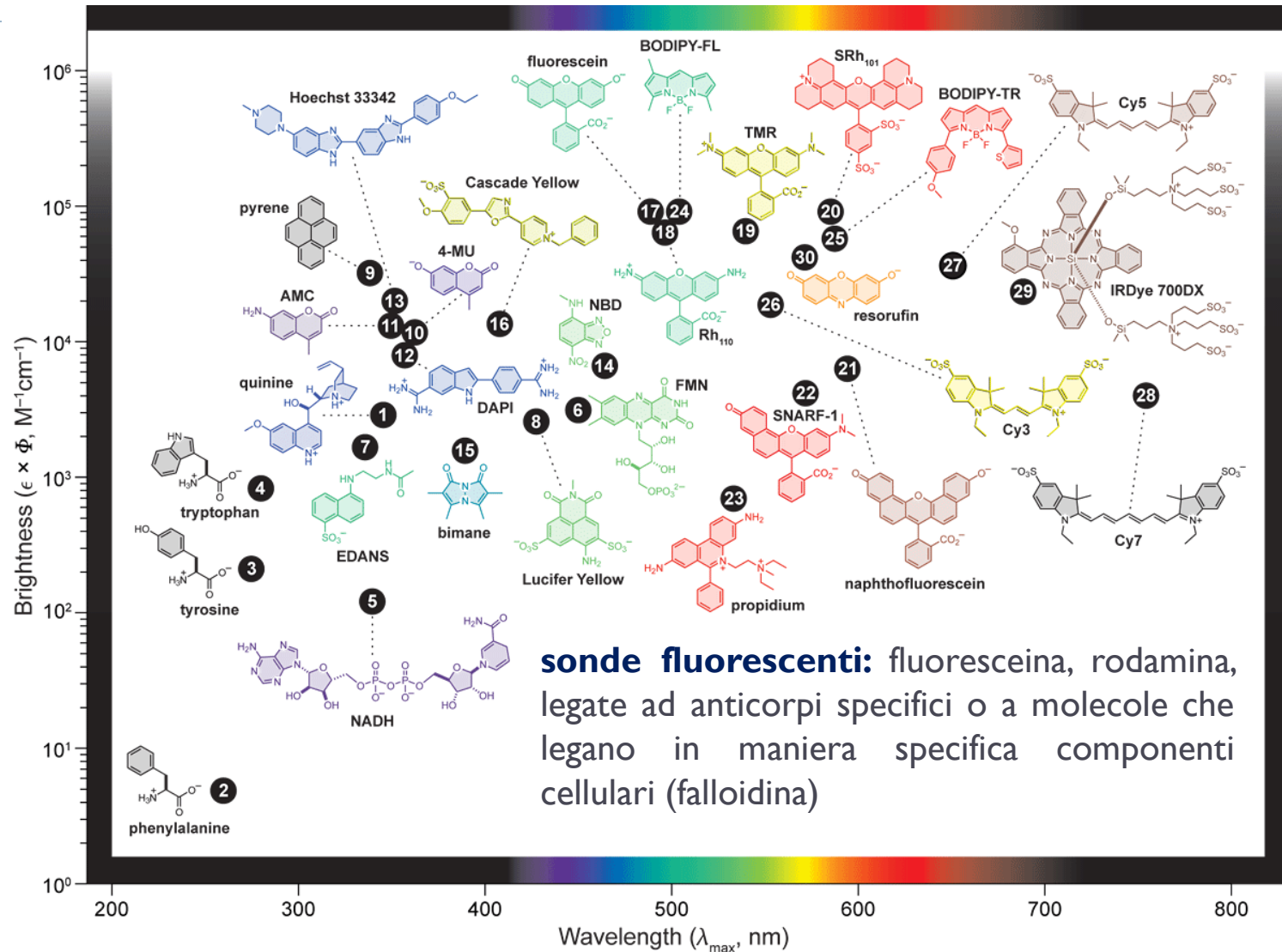
Fluorimetro glomax



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



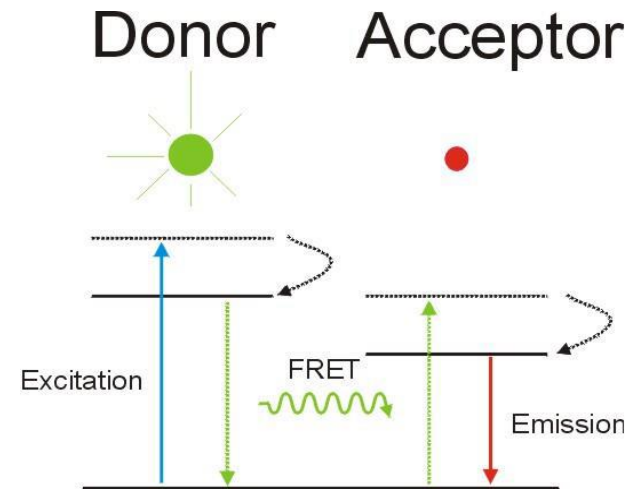
Molecole fluorescenti (fluorofori) in biologia



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**), un donatore ed un accettore, coniugati alle molecole in esame.



- Indicazioni sulla mobilità di fluorofori (es. legame di un ligando alla macromolecola) 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.



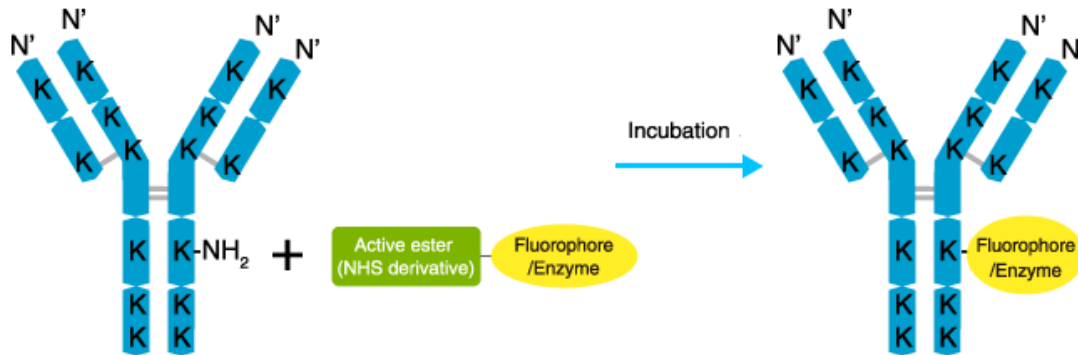
Utilizzo della fluorescenza in biochimica/biologia

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.



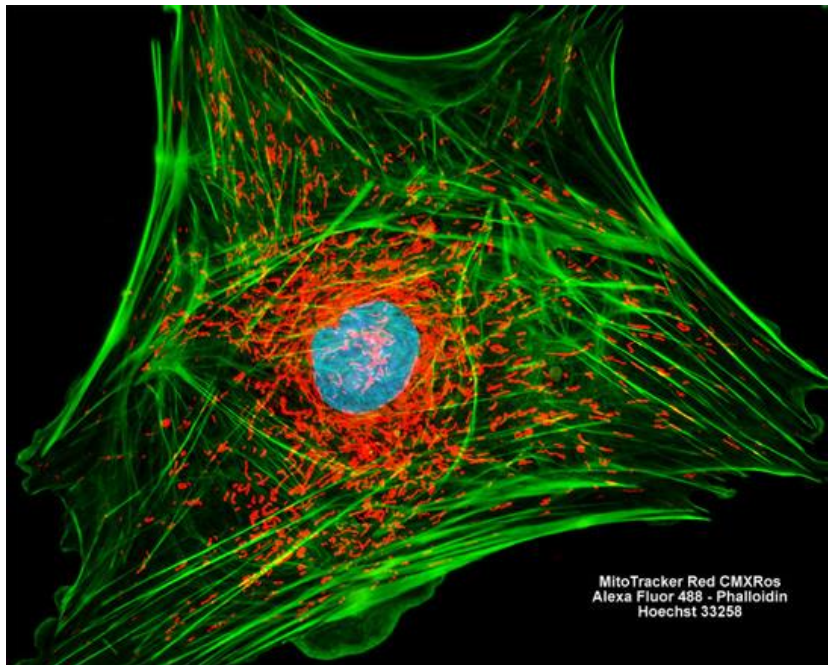
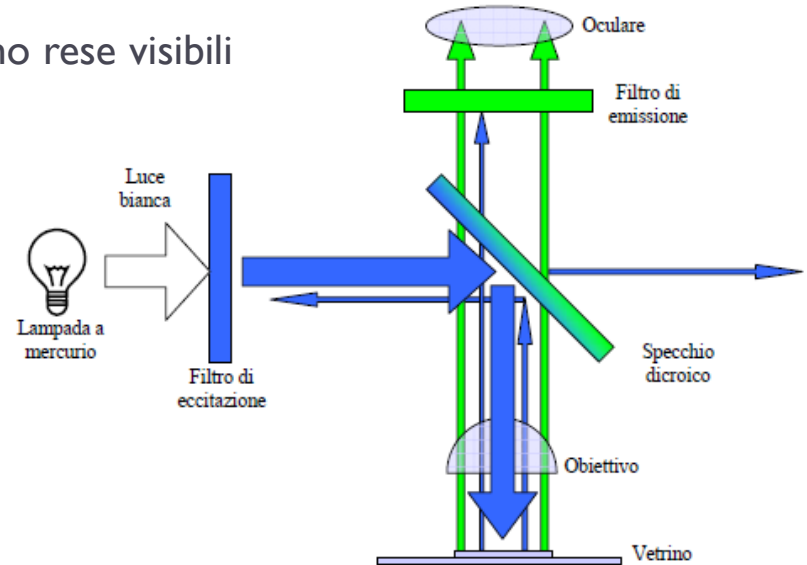
Coniugazione (marcatura) di una proteina (es Immunoglobulina) con un fluoroforo o con un enzima



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.



Esempio in figure: Cellule epiteliali ovariche in coltura al microscopio confocale a fluorescenza:

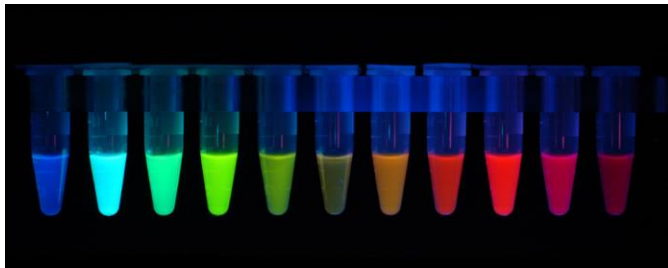
- I nuclei sono evidenziati in blu (Hoechst 33258),
- L'actina in verde (falloidina-alexa fluor 488),
- i mitocondri in rosso (mito tracker red)

Green fluorescent protein

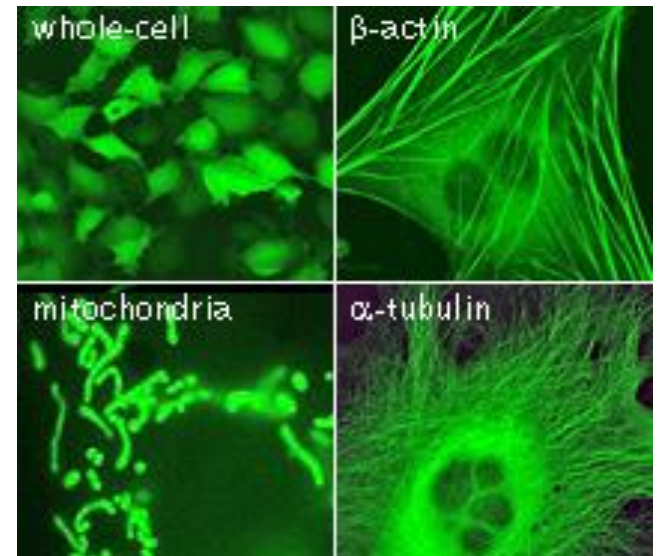
Proteine cellulari possono essere tracciate con la fluorescenza, se prodotte in fusione con proteine fluorescenti (GFP, Green fluorescence protein).

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

Il fluoroforo è costituito da tre aminoacidi Ser 65-Tyr 66-Gly 67. modificati posttraduzionalmente.



forme di GFP modificate



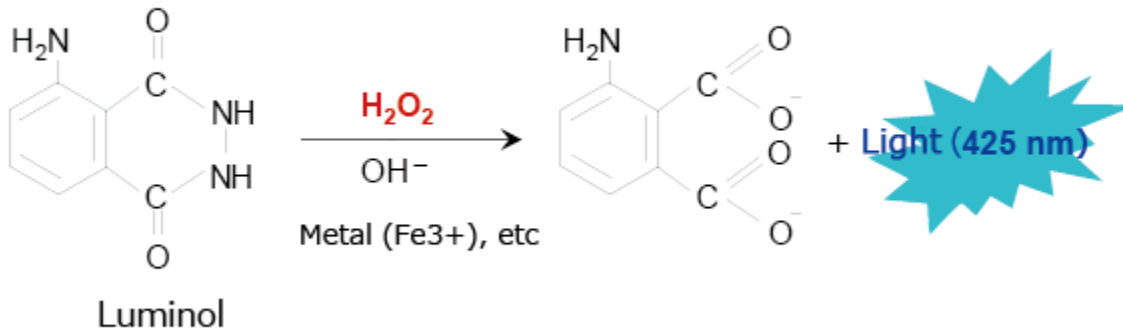


La chemiluminescenza

Chemiluminescenza: emissione di radiazione dovuta ad una reazione (bio)chimica. La luminescenza si produce dal ritorno allo stato fondamentale di una specie eccitata formata come intermedio durante la reazione chimica.

Riguarda alcuni tipi di ossidoriduzioni altamente esoergoniche.

Esempio di reazione chemiluminescente (non enzimatica)



- 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



La bioluminescenza

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

Le reazioni bioluminescenti, sono di vario tipo, utilizzano meccanismi differenti.

In generale seguono il seguente schema in cui è presente un substrato (**luciferina**), un enzima (**luciferasi**) ed eventuali cofattori (es ATP o NAD(P)+/NAD(P)H) che prendono parte alla reazione.



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



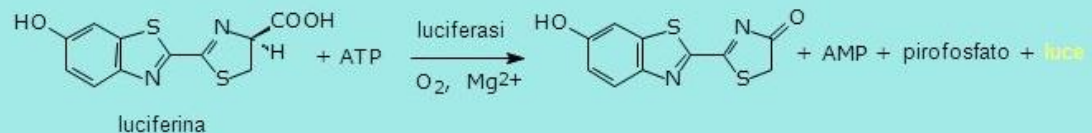
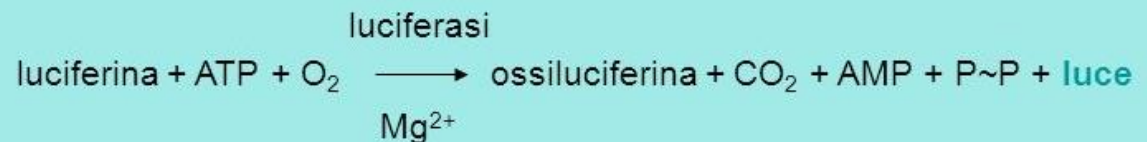
La luminometria – applicazioni della chemiluminescenza

Luminometria: tecnica usata per misurare la chemiluminescenza. 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

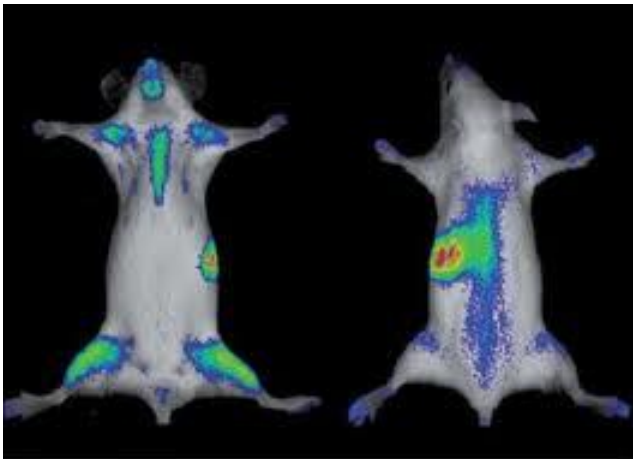
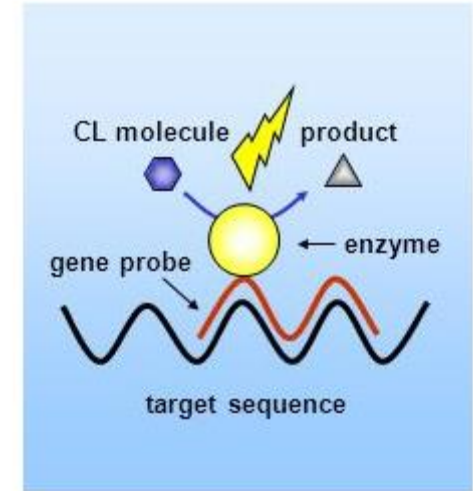
La [ATP] presente in un campione biologico può essere valutata dall'intensità di luce prodotta in presenza di un sistema luciferasi/luciferina



Dosaggio di ATP

Applicazioni della bioluminescenza

Riconoscimento di sequenze di DNA (target sequence) tramite marcatura del DNA con una sonda (gene probe) oligonucleotidica costituita da un tratto di DNA legato covalentemente ad un enzima (luciferasi). Il DNA target viene rilevato dall'aggiunta di un substrato chemiluminescente della luciferasi.



In vivo imaging

Espressione di un gene target in vivo. Il gene in studio è stato sostituito con quello della luciferasi (gene reporter) e del . In questo modo è possibile studiare l'espressione del gene in vivo (nel topo) rilevando l'emissione di luce attraverso i tessuti (in vivo imaging).

La chemiluminescenza permette una maggiore selettività rispetto alle tecniche che utilizzano la fluorescenza che è naturalmente presente in molte molecole (interferenti).