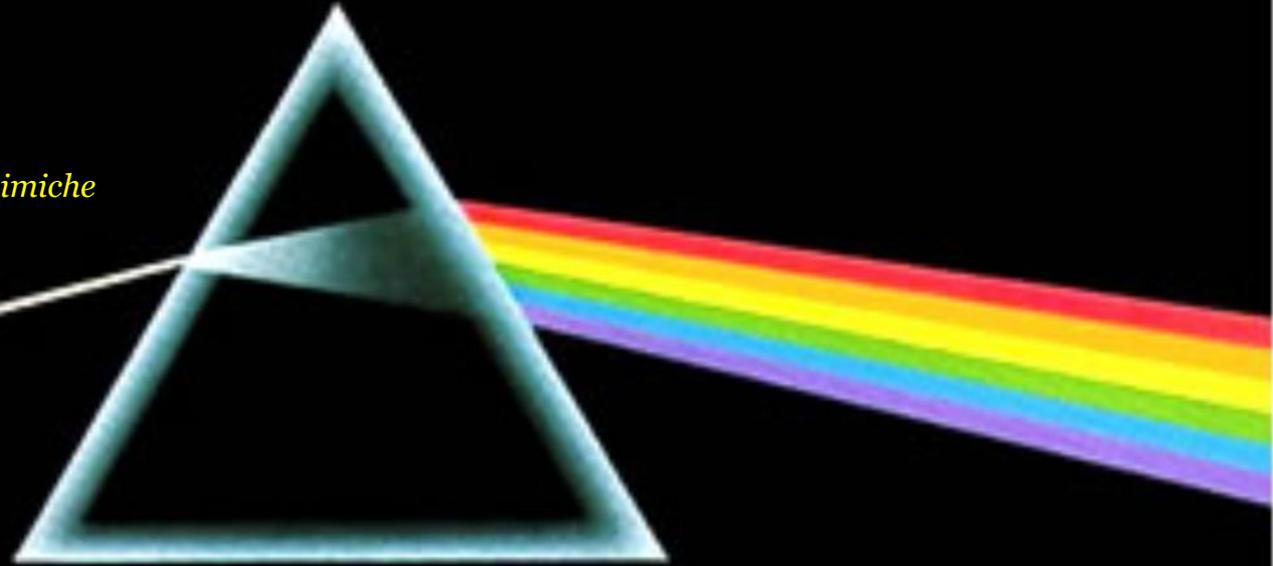


Corso di  
**Proprietà di  
Biopolimeri**

*Prof. R. Urbani*

*Dipartimento di Scienze Chimiche  
e Farmaceutiche  
a.a. 2023-2024*



**FLUORESCENZA**

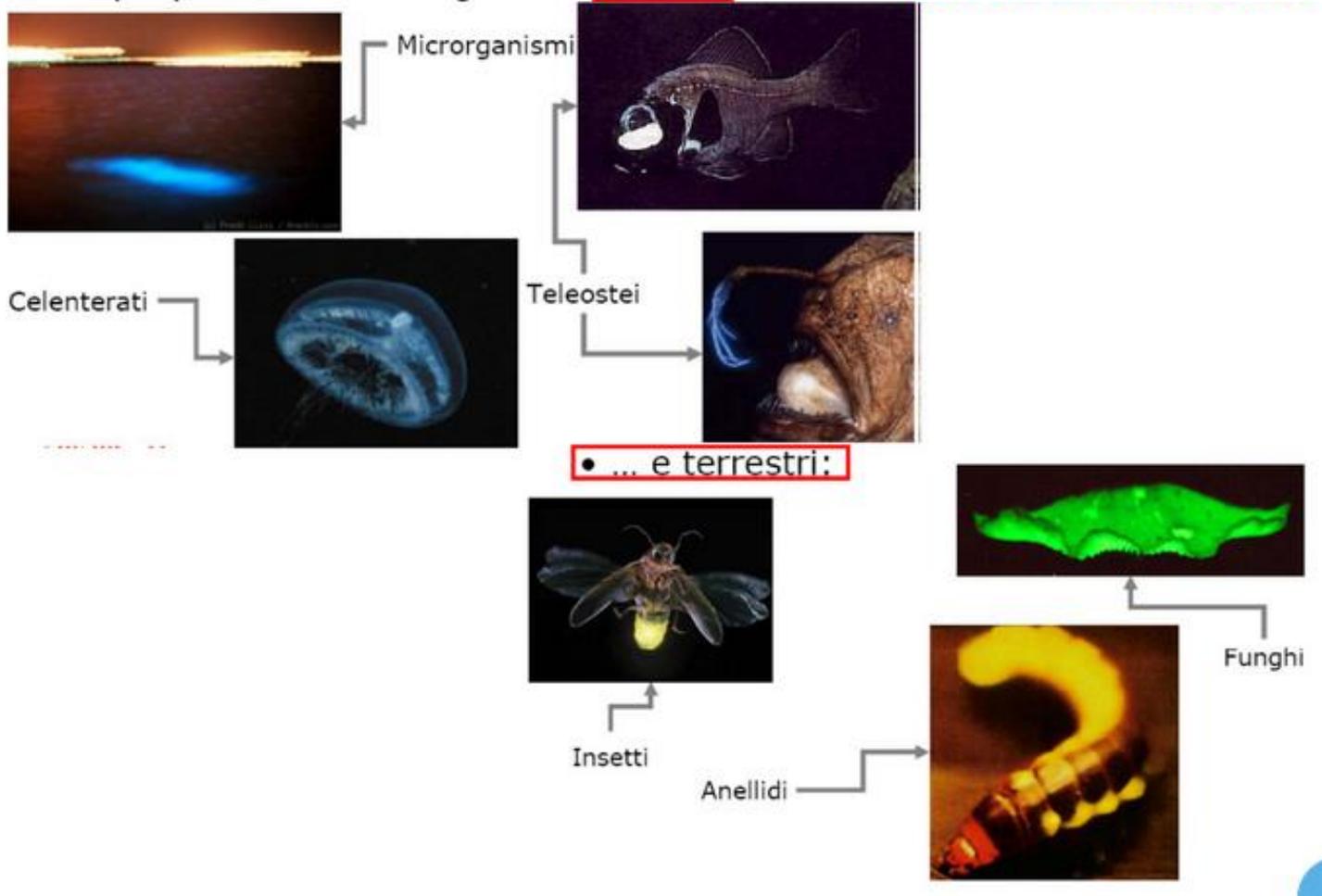
# LUMINESCENZA

La luminescenza è un processo di emissione di radiazioni a seguito di un assorbimento di energia.

TIPO	CAUSA
Elettroluminescenza	corrente elettrica in gas ionizzato o semiconduttore
Radioluminescenza	materiale radioattivo incorporato nel fosforo
<b>Chemiluminescenza</b>	<b>reazione chimica</b>
<b>Bioluminescenza</b>	<b>reazione enzimatica</b>
Termoluminescenza	temperatura e radioattività
Triboluminescenza	rottura di cristalli
Sonoluminescenza	onde sonore in liquidi
Fotoluminescenza	assorbimento di luce

# BIOLUMINESCENZA

- Il fenomeno della bioluminescenza è proprio di alcuni organismi **marini**:

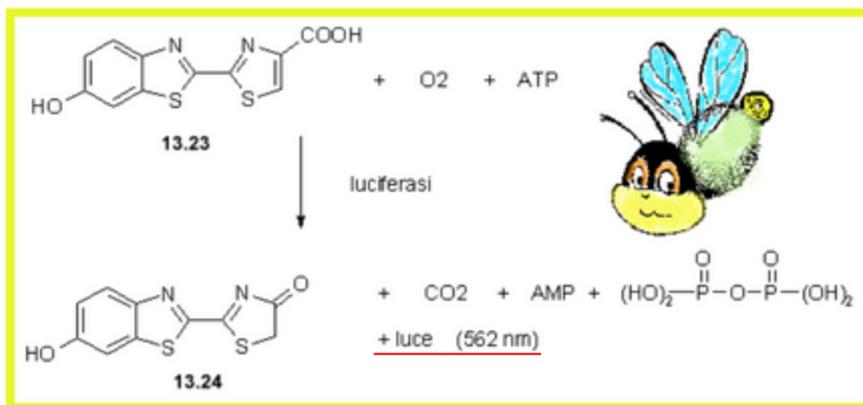


## LA LUCIFERINA (BIOLUMINESCENZA)

I sistemi più conosciuti e utilizzati in chimica clinica sono la luciferasi batterica e quella estratta dalla lanterna della lucciola.

Nella luminescenza delle lucciole, la **luciferina** (13.23) viene ossidata dall'ossigeno dell'aria a **ossiluciferina** (13.24). Sono necessari sia l'**ATP** che l'**enzima luciferasi** per attivare la luciferina.

La **resa quantica** della bioluminescenza delle lucciole è **estremamente alta (F = 0.88)**, circa 10 volte maggiore di quella dei sistemi sintetici luminescenti.

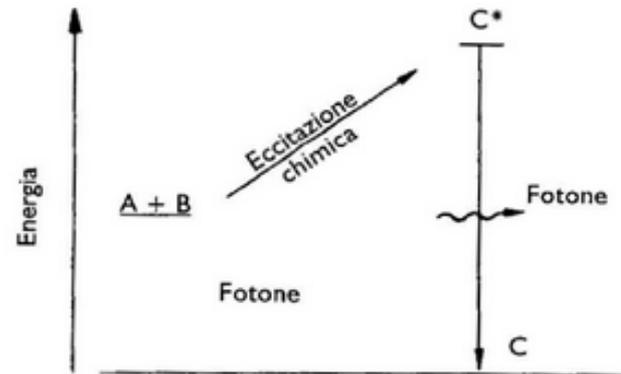


Per far avvenire la reazione è necessaria la presenza di l'ATP.

E' quindi possibile impiegare questa tecnica analitica per la misura dell'ATP e di tutte le attività enzimatiche ATP-dipendenti (ATP-asi; CPK, esochinasi, piruvatochinasi, etc). nonché dei substrati corrispondenti (ADP, creatinfosfato, glucosio, fosfoenolpiruvato, etc.).

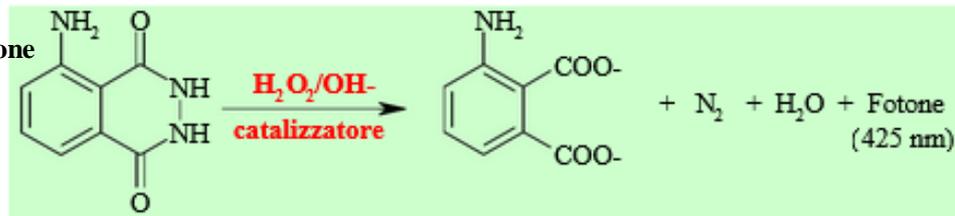
# CHEMILUMINESCENZA

Schema di meccanismo di emissione in luminescenza  
A,B = reagenti;  
C\* = prodotto di reazione in uno stato elettronico eccitato  
C = prodotto di reazione allo stato fondamentale



**CHEMILUMINESCENZA (CL)** - l'energia necessaria viene fornita da una reazione chimica

5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione



**Ossidazione di Luminolo in ambiente alcalino**

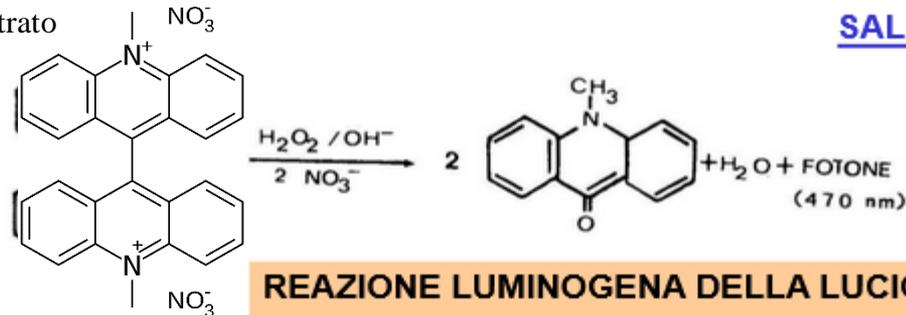
La sua ossidazione viene condotta in ambiente alcalino per opera di agenti ossidanti tipo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OCl<sup>-</sup>, I<sub>2</sub>, MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>, in presenza di opportuni catalizzatori quali il ferricianuro, ioni metallici, etc.



## SALI DI ACRIDINIO

Composti come la **lucigenina** mostrano un comportamento simile a quello del luminolo emettendo luce a seguito di ossidazione in ambiente alcalino con un'efficienza quantica di 0.1-0.2.

bis-*N*-metilacridinio nitrato



## SALI DI ACRIDINIO

### REAZIONE LUMINOGENA DELLA LUCIGENINA

**Altri esteri di acridinio** come i fenilcarbossilati di acridinio emettono luce in presenza di sola acqua ossigenata in ambiente alcalino e **non richiedono alcun intervento catalitico**. Composti di questo tipo sono stati prevalentemente impiegati per la preparazione di traccianti polipeptidici da usare in metodi di dosaggio immunologico.

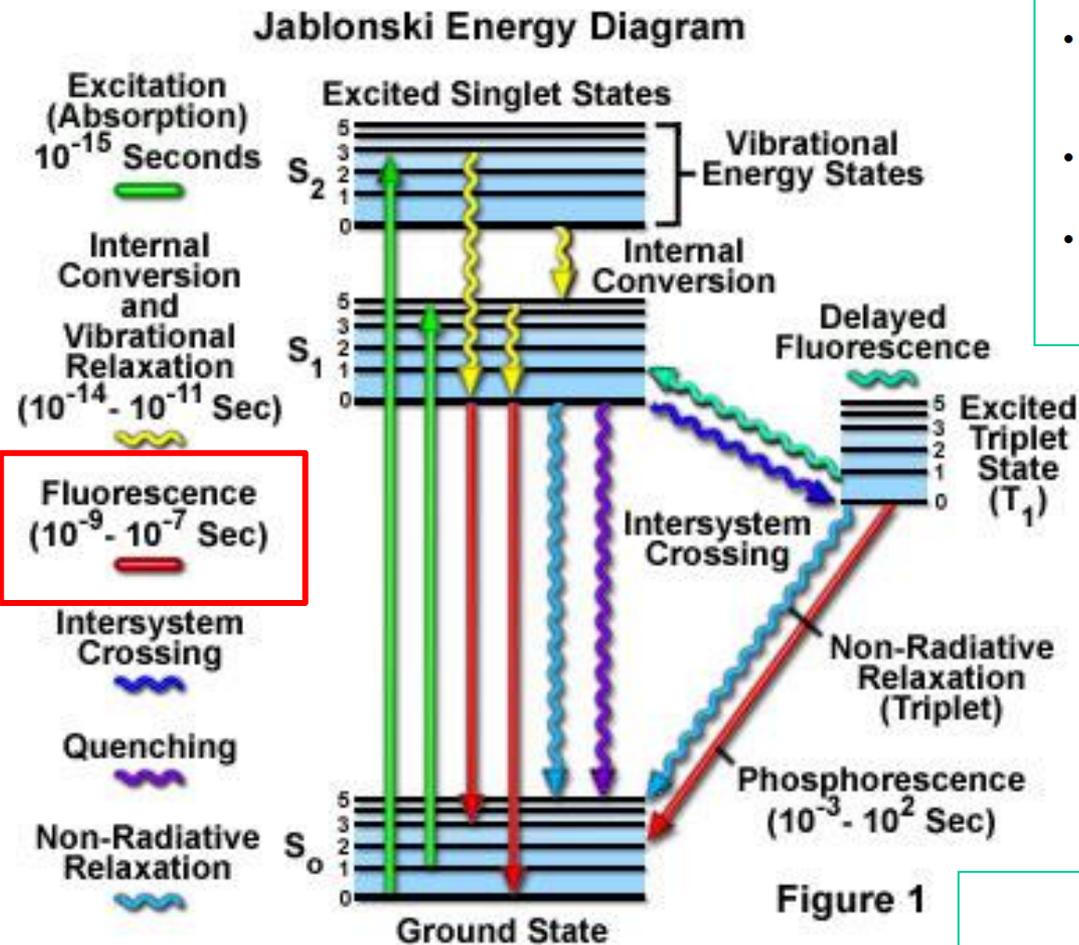
È usato per le sue proprietà di chemiluminescenza, come marcatore dell'anione superossido  $\text{O}_2^-$  in biochimica



# Assorbimento e fluorescenza

- Si parla di fluorescenza quando si osserva un processo di emissione di luce a seguito del rilassamento di uno stato elettronico eccitato generato da un assorbimento di luce.
- La scala dei tempi con la quale avviene l'emissione è diversa da quella con la quale avviene l'assorbimento.
- Come conseguenza sono diverse le proprietà della materia che influiscono sui due fenomeni e, quindi, diverse le informazioni che se ne possono ricavare.

# Elettroni



- Le transizioni elettroniche coinvolte sono in genere del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$  (molto raramente sono coinvolti elettroni  $\sigma$ ).
- Gli elettroni coinvolti nella transizione di fluorescenza sono generalmente elettroni  $\pi$ .
- La fluorescenza si osserva generalmente nei composti che presentano transizioni  $\pi^* \rightarrow \pi$ .

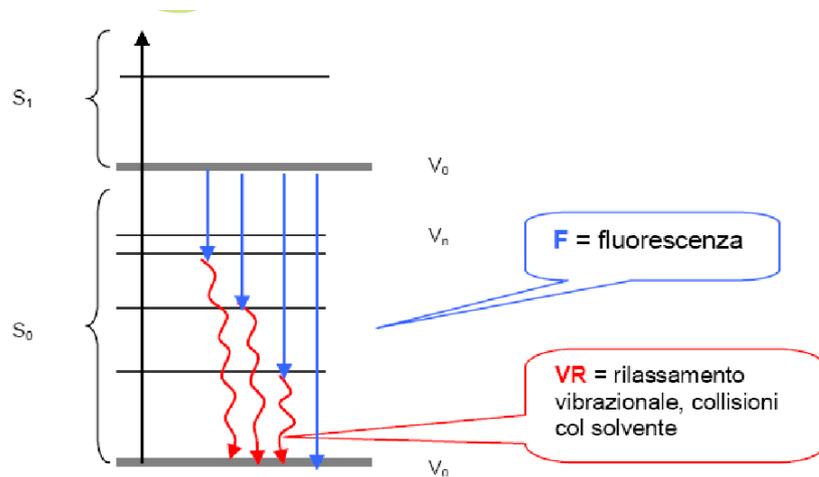
la transizione di uno stato fondamentale di singoletto ( $S_0$ ) al primo stato di tripletto eccitato ( $T_1$ ) ha una scarsissima probabilità di avvenire in quanto è una transizione proibita (regole di selezione).

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.

## Cinetica dei fenomeni

- Fluorescenza  $k_R = 10^8 \text{ s}^{-1}$
- Fosforescenza  $k_P = 10^2 - 10^4 \text{ s}^{-1}$
- Intersystem crossing  $k_{IC} = 10^8 \text{ s}^{-1}$
- Conversione interna  $k_{CI} = 10^{13} \text{ s}^{-1}$

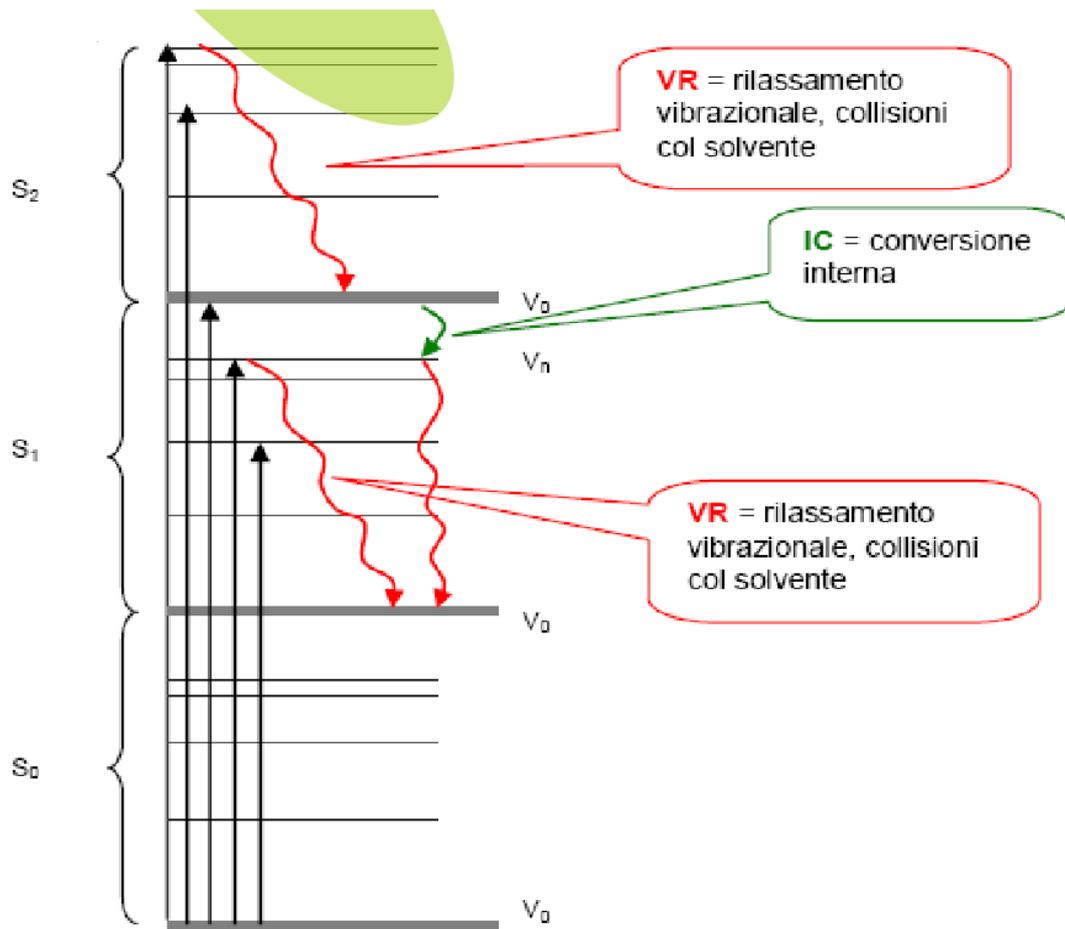
Le molecole nello stato  $S_1$  emettono fotoni di varia energia a seconda del sottolivello vibrazionale (dello stato  $S_0$ ) implicato nel processo di transizione



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

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 trae 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.

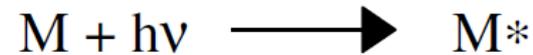
## Le regole della Fluorescenza

1. **Principio di Franck-Condon:** i nuclei sono stazionari durante le transizioni elettroniche, quindi le eccitazioni sono relative a livelli vibrazionali eccitati dello stato elettronico eccitato
2. **L'emissione** si ha dal livello più basso dello stato vibrazionale dello stato di singoletto eccitato più basso perché il rilassamento dai livelli vibrazionali eccitati è molto più veloce dell'emissione.
3. **Shift di Stokes** : l'emissione ha sempre un'energia più bassa dell'assorbimento a causa del rilassamento nucleare nello stato eccitato

# Lo stato eccitato

- L'assorbimento

- Formazione dello stato eccitato



- L'emissione

- Decadimento dello stato eccitato



$$v = -k_R [M^*]$$

$$d[M^*]/dt = -k_R [M^*]$$

## Significato di $k_R$

- $k_R$  è la costante di velocità della reazione di decadimento dello stato eccitato e viene espressa in  $s^{-1}$  (reazione di I ordine) .



$$d[M^*]/dt = -k_R [M^*]$$

**RAPPRESENTA IL  
NUMERO DI EVENTI  
PER L'UNITÀ DI TEMPO**

$$k_R = 1/\tau_R \quad (s^{-1})$$

tempo di rilassamento

## Variabili che influenzano la **fluorescenza**

- Resa quantica
- Tipi di transizioni nella fluorescenza
- Effetti della rigidità strutturale
- Effetti della temperatura e del solvente
- Effetto del pH sulla fluorescenza
- Effetto della concentrazione sull'intensità della fluorescenza

# Processi radiativi e non-radiativi

- Oltre a conversione interna ed intersystem crossing, altri processi, *non radiativi*, competono con la fluorescenza (*processo radiativo*).
- In soluzione questi processi depopolano lo stato eccitato in modo non radiativo, quindi:

**IL NUMERO DI FOTONI EMESSI È  
MINORE DEL NUMERO DI FOTONI  
ASSORBITI**

- Il rapporto tra fotoni emessi ed assorbiti è il rendimento quantico della molecola.

$$\Phi_f = \text{quantum yield}$$

# $\Phi_f = \text{quantum yield}$

- Il quantum yield (rendimento quantico, efficienza quantica) della molecola.

$$\Phi_f = \frac{\text{Numero di fotoni emessi}}{\text{Numero di fotoni assorbiti}}$$

$$0 \leq \Phi_f \leq 1$$

- Per  $\Phi_f = 0$  la molecola non è fluorescente (in quelle condizioni).

**N.B.**

L'efficienza quantica di una reazione chemiluminescente non supera in genere il valore di 0.01. Nel caso delle reazioni bioluminescenti, l'efficienza quantica è molto superiore (0.1-0.9).

- **Tipi 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 di bassa energia



- **Efficienza quantica e tipi di transizione**

la fluorescenza è più frequentemente associata con le transizioni



perché la resa quantica di questo tipo di transizione è maggiore e 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 il coefficiente di estinzione 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  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

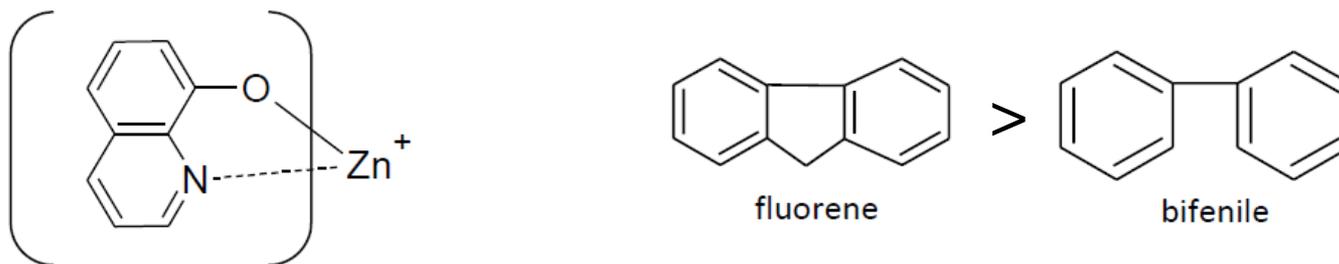
- **Fluorescenza e struttura**

- La fluorescenza più intensa e più utile è presentata da composti contenenti dei **gruppi funzionali aromatici** con dei livelli di bassa energia per le transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$ .
- Fluorescenza minore possono avere anche i composti contenenti **gruppi carbonilici alifatici** e **alicyclici** o strutture a doppi legami ad elevata coniugazione
- La maggior parte degli **idrocarburi aromatici** non sostituiti dà fluorescenza in soluzione e l'efficienza quantica solitamente aumenta col numero degli anelli ed il loro grado di condensazione.

## • Effetti della rigidità strutturale

Nelle molecole flessibili c'è una maggiore probabilità che avvenga un processo di conversione interna con conseguente disattivazione non radiante.

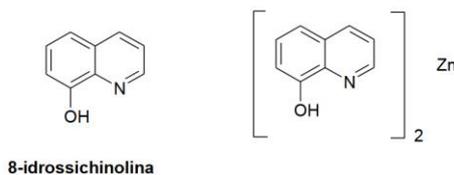
Quindi, in generale, la fluorescenza è particolarmente favorita nelle molecole che possiedono una struttura rigida.



L'efficienza quantica del biphenile è di circa 0.2 mentre quella del fluorene è quasi 1.0

La rigidità abbassa la velocità di rilassamento non radiativo così il rilassamento per fluorescenza ha tempo sufficiente per avvenire.

In alternativa, per aumentare la rigidità strutturale di una molecola flessibile si può farla adsorbire su una superficie solida oppure formare chelati a struttura rigida.

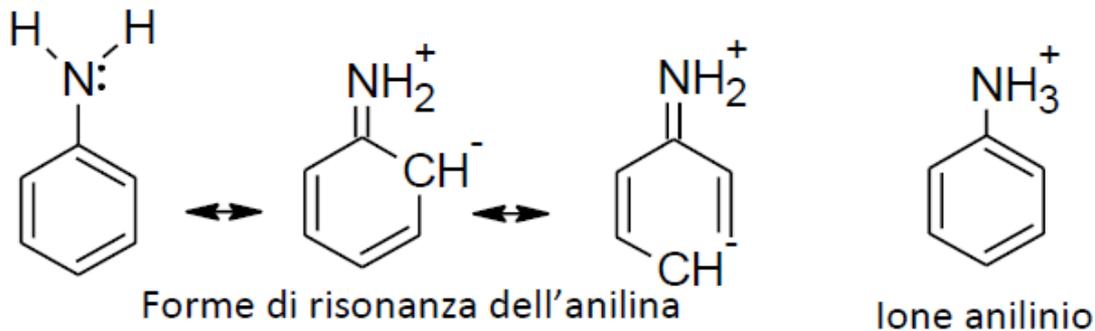


- **Effetti della temperatura e del solvente**

- Per la maggior parte delle molecole l'efficienza quantica della fluorescenza diminuisce aumentando la temperatura, perché l'aumento della frequenza delle collisioni a temperature elevate rende maggiore la probabilità di disattivazione per conversione esterna, cioè per collisione delle molecole con quelle del solvente e degli altri soluti presenti in soluzione.
- La fluorescenza di una molecola viene diminuita da alcuni solventi o da altri soluti contenenti, per esempio, degli atomi pesanti (p.e.:  $\text{CBr}_4$  e Et-I).

## • Effetto del pH sulla fluorescenza

- La fluorescenza di un composto aromatico avente dei sostituenti acidi o basici sull'anello dipende solitamente dal pH che può influenzare l'assetto elettronico della molecola; ad es. molti fenoli sono fluorescenti a pH neutro o acido e non lo sono a pH alcalini
- Sia la lunghezza d'onda che l'intensità dell'emissione sono generalmente diverse per le forme ionizzata e non ionizzata del composto.
- I cambiamenti sono dovuti alle quantità diverse delle specie risonanti associate con le forme acide o basiche delle molecole:



- La possibilità di più forme di risonanza rende stabile lo stato eccitato e favorisce il fenomeno della fluorescenza.

- **Effetto della concentrazione:**

l'emissione fluorescente aumenta con la concentrazione in modo lineare solo per valori bassi di quest'ultima.

- A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (*fluoroforo*), l'intensità della fluorescenza ( $I_f$ ) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2,3I_0\varepsilon_\lambda cdQ$$

$c$  è la *concentrazione del fluoroforo*

$d$  è il *cammino ottico* della luce nella soluzione fluorescente

$\varepsilon_\lambda$  è il *coefficiente di estinzione molare* del fluoroforo

$I_0$  è l'*intensità* della radiazione incidente

$Q$  è la *resa quantica*

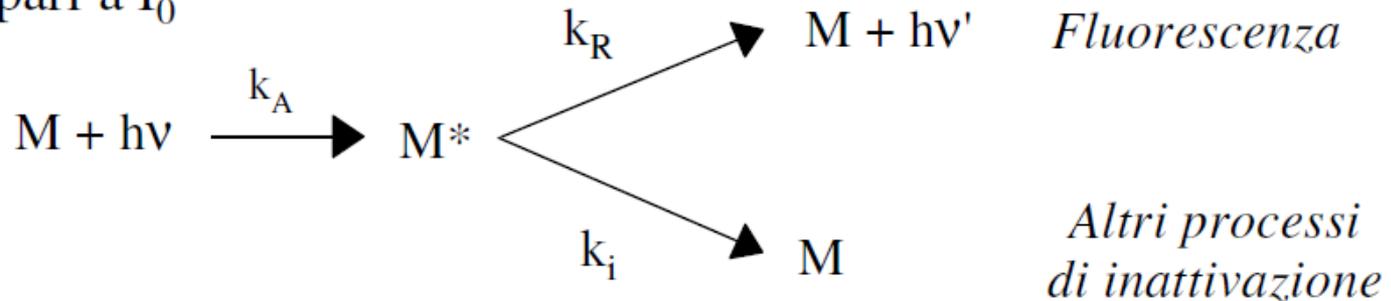
# Illuminazione

Le condizioni di illuminazione con le quali si può rivelare la fluorescenza sono:

- Condizioni fotostazionarie
- Condizioni transienti

# Condizioni fotostazionarie

- Corrispondono ad una eccitazione costante con intensità pari a  $I_0$



$$k_i = k_{IC} + k_{CI} + k_q[Q] + \dots$$

$$d[M^*]/dt = k_A [M] h\nu - (k_R + k_i) [M^*]$$

- In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

$$d[M^*]/dt = 0; \quad k_A [M] h\nu = (k_R + k_i) [M^*]$$

# Condizioni fotostazionarie

In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

$$k_A k_R [M] h\nu = k_R (k_R + k_i) [M^*]$$

$$\frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{k_R [M^*]}{k_A [M] h\nu}$$

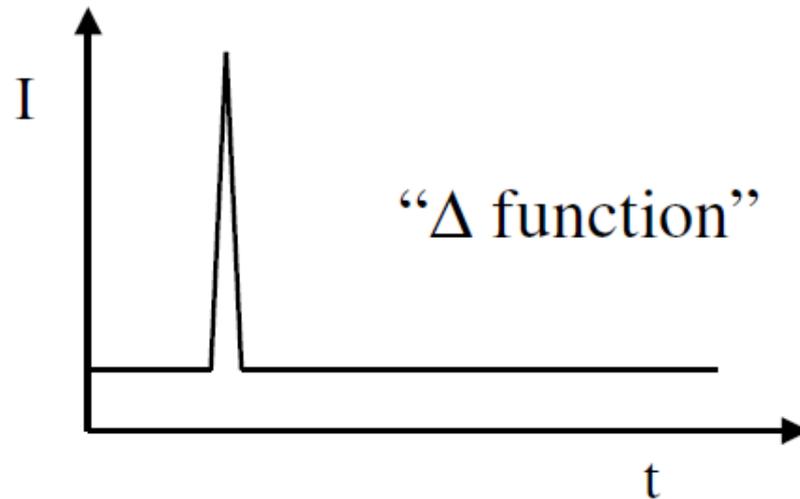
fotoni emessi  
per unità di tempo

fotoni assorbiti  
per unità di tempo

$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i}$$

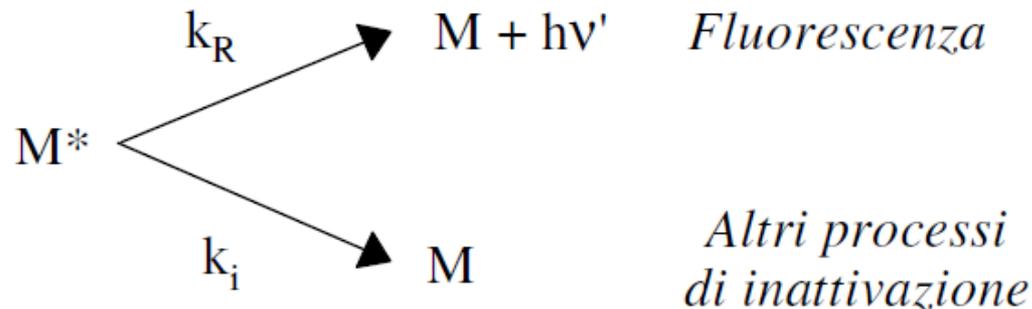
# Condizioni transienti

- Illuminazione con un  
di luce di durata  
trascurabile.



# Condizioni transienti

- Un impulso provoca una concentrazione iniziale ( $t = 0$ ) di  $M^*$  ( $[M^*]_0$ ) che può decadere, come già visto, con emissione o no di luce.



- da cui...

# Condizioni transienti

- da cui:  $d[M^*]/dt = - (k_R + k_i) [M^*]$
- Integrando fra 0 e t:

$$\ln[M^*]_t = - (k_R + k_i) t + \text{costante}$$

$$t = 0 \longrightarrow [M^*] = [M^*]_0$$

$$\text{costante} = \ln[M^*]_0$$

# Condizioni transienti

- Se definiamo:  $k_f = k_R + k_i$
- e:  $k_f = 1/\tau_f$
- Abbiamo la funzione di decadimento di fluorescenza:

$$[M^*]_t = [M^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$

# Condizioni transienti

- Moltiplicando entrambi i termini per  $k_R$  si ottiene:

$$k_R[M^*]_t = k_R[M^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$

Funzione di decadimento di fluorescenza  $\rightarrow I_t = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_i}$$

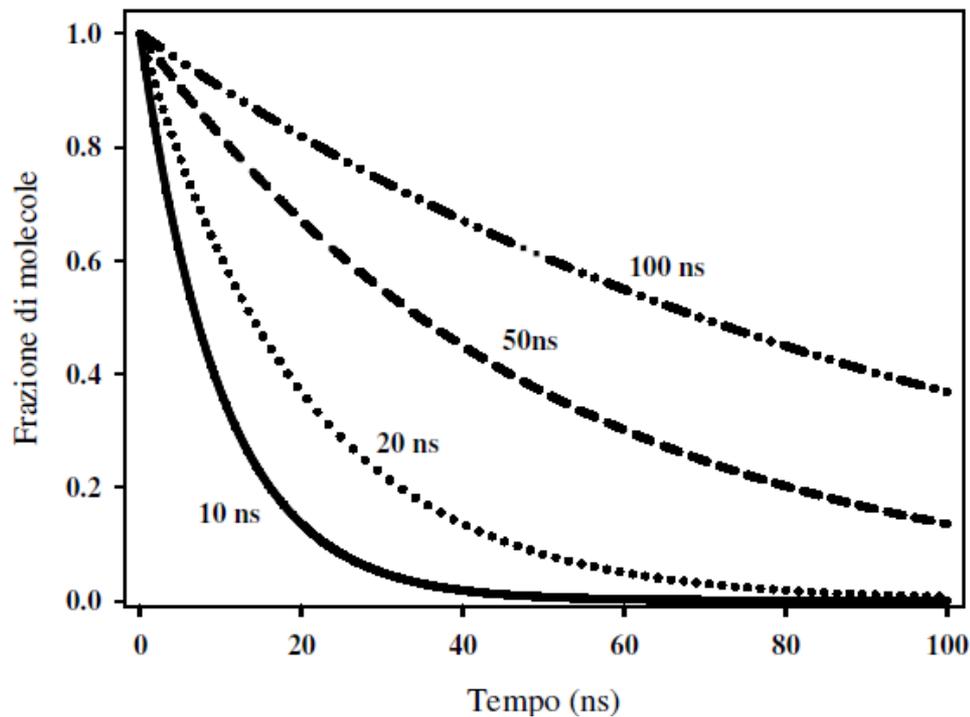
Tempo di vita media di fluorescenza

Da questa equazione si può dire che  $\tau$  è il tempo in cui l'intensità di fluorescenza decade a  $1/e$  della fluorescenza iniziale e cioè a circa il 37%

# Decadimento di fluorescenza

- La funzione di decadimento può essere monoesponenziale (una sola specie eccitata che decade con un unico tempo di vita):

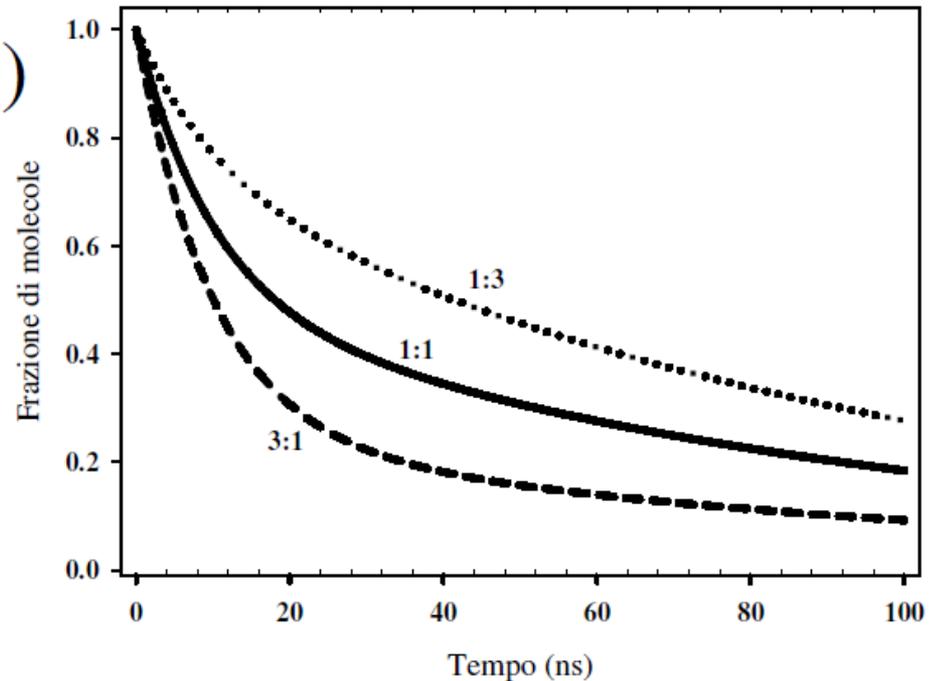
$$I_t = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$



# Decadimento di fluorescenza

- La funzione di decadimento può essere multiesponenziale (due o più specie che decadono con diversi tempi di vita):

$$I_t = I_0 \left( \alpha_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right)$$



# Condizioni transienti

- Per quanto riguarda il quantum yield:

$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{\tau_f}{\tau_R}$$

# Relazioni fondamentali

$$k_R = \frac{1}{\tau_R} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

$$\Phi_f = \frac{k_R}{\{k_R + k_{IC} + k_{CI} + k_q[Q] + \dots\}} = \frac{k_R}{k_R + k_i}$$

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_i}$$

$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{\tau_f}{\tau_R}$$

## FLUORESCENZA PRIMARIA

(naturale, spontanea, propria, intrinseca, autofluorescenza)

## FLUORESCENZA SECONDARIA

(indotta, artificiale)

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



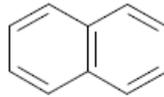
- **Fluorocromizzazione** (diretta o a più stadi) mediante "marcatori" fluorescenti (fluorocromi)
- Indotta da **trattamenti chimici e/o chimico-fisici** atti a modificare sostanze già presenti nel campione che diventano quindi prodotti fluorescenti.

# Sono in genere fluorescenti...

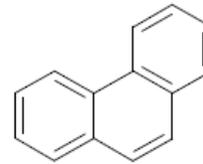
- I policiclici aromatici e i loro derivati:



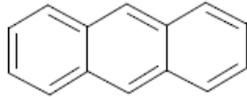
*Benzene*



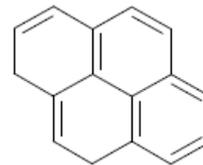
*Naftalene*



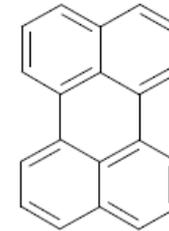
*Fenantrene*



*Antracene*



*Pirene*



*Perilene*

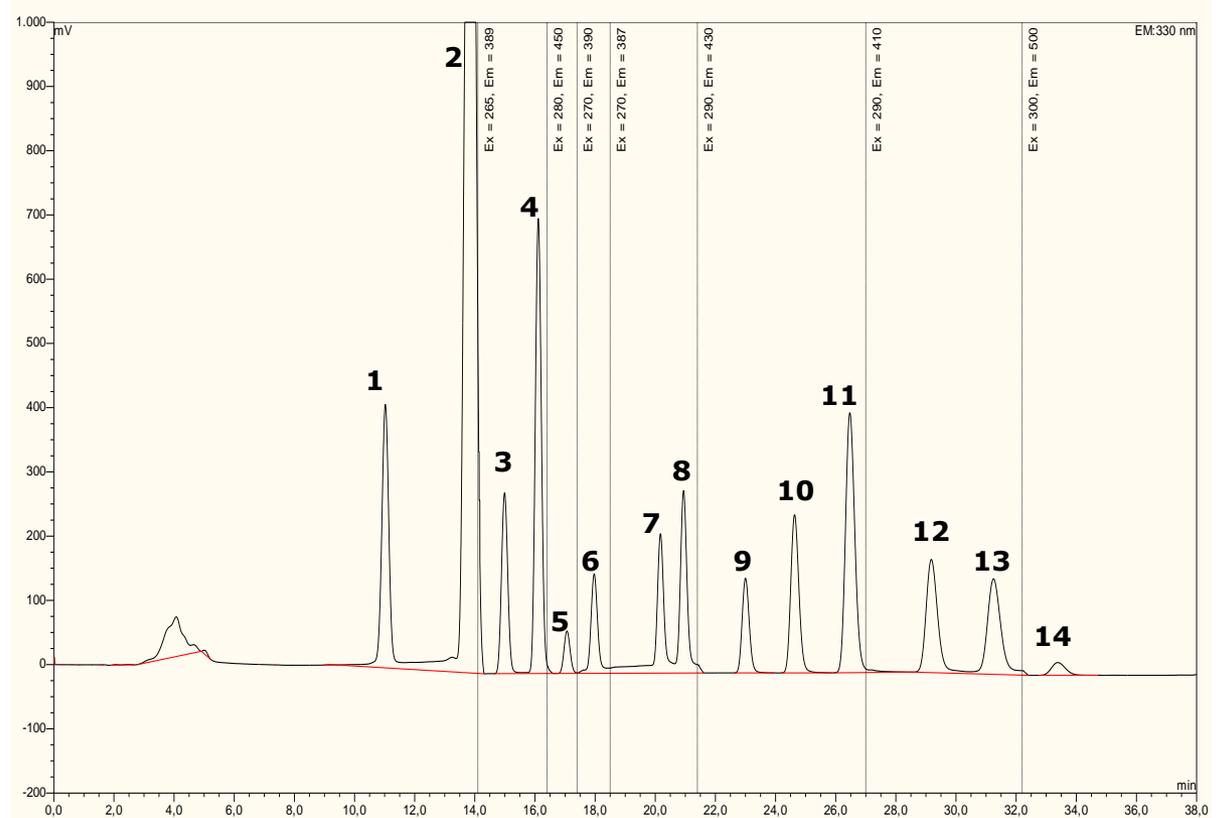
In HPLC

IPA	TEMPO DI RITENZIONE (approssimato al minuto)	L'UNGHEZZA D'ONDA DI ECCITAZIONE	L'UNGHEZZA D'ONDA DI EMISSIONE
Acenaftene			
Fluorene	6 min.	280 nm	330 nm
Fenantrene	7 min.	246 nm	370 nm
Antracene	8 min.	250 nm	406 nm
Fluorantene	9 min.	280 nm	450 nm
Pyrene	10 min.	270 nm	390 nm
Benzo(b)fluorantene	17 min.	290 nm	430 nm
Benzo(k)fluorantene	19 min.	290 nm	430 nm
Benzo(a)pyrene	20 min.	290 nm	430 nm
Dibenzo(ah)antracene	22 min.	290 nm	410 nm
Benzo(ghi)perylene	23 min.	290 nm	410 nm
Indeno(123cd)pyrene	24 min.	300 nm	500 nm

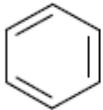
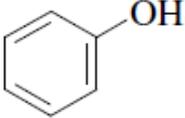
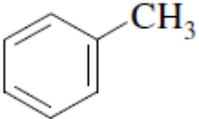
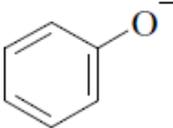
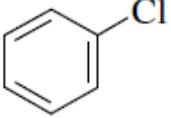
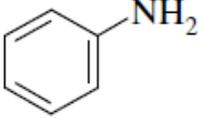
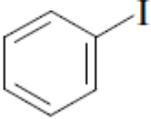
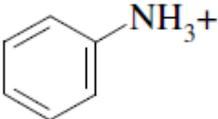
**Tab. 2** Tempi di ritenzione, lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione degli IPA indagati

# IPA standard

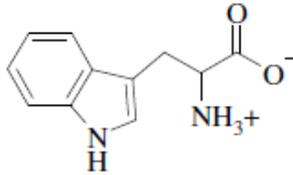
1	<b>11.2</b>	Naftalene
2	<b>14.5</b>	Acenaftene
2	<b>14.5</b>	Fluorene
3	<b>15.1</b>	Fenantrene
4	<b>16.2</b>	antracene
5	<b>17.1</b>	fluorantene
6	<b>18.0</b>	pirene
7	<b>20.3</b>	benzo(a)antracene
8	<b>20.9</b>	crisene
9	<b>23.1</b>	benzo(b)fluorantene
10	<b>24.6</b>	benzo(k)fluorantene
11	<b>26.5</b>	benzo(a)pirene
12	<b>29.2</b>	dibenzo(a,h)antracene
13	<b>31.3</b>	benzo(g,h,i)perilene
14	<b>33.3</b>	indeno(1,2,3-cd)pirene



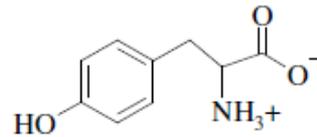
# Effetto dei sostituenti sulla fluorescenza del benzene

Molecola	$\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm)	Intensità	Molecola	$\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm)	Intensità
	270-310	10		285- 365	18
	270-320	17		310-400	10
	275-345	7		310-405	20
	-	0		-	0

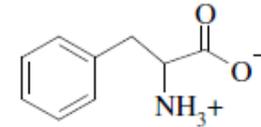
# Biomolecole fluorescenti...



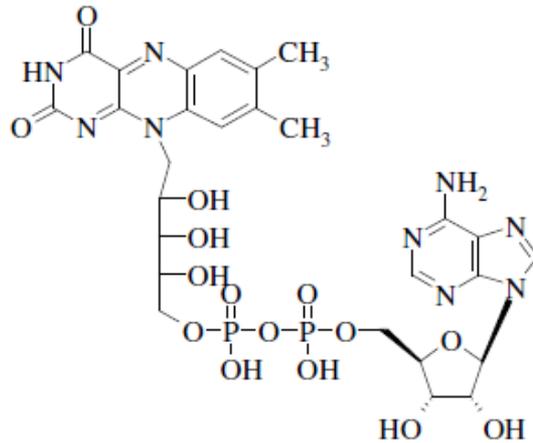
*Triptofano (W)*



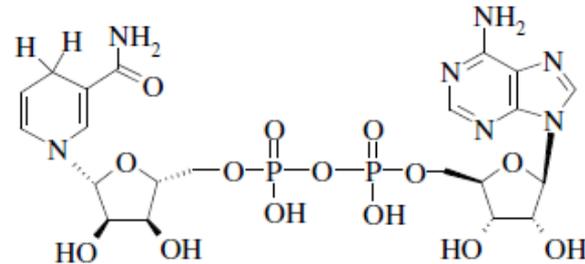
*Tirosina (Y)*



*Fenilalanina (P)*

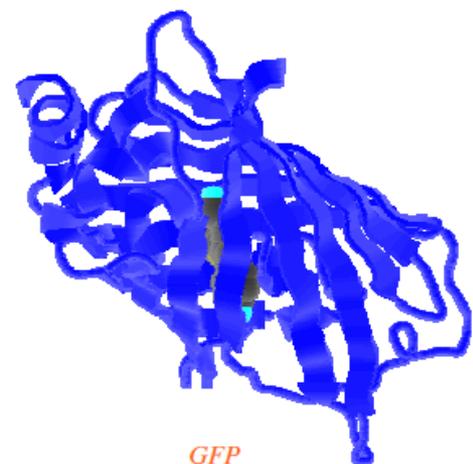
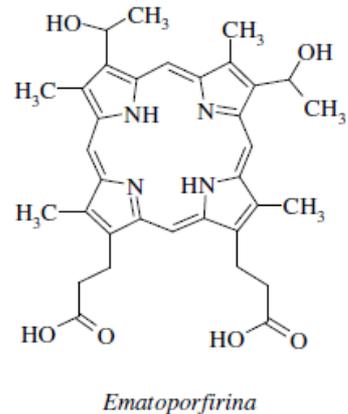
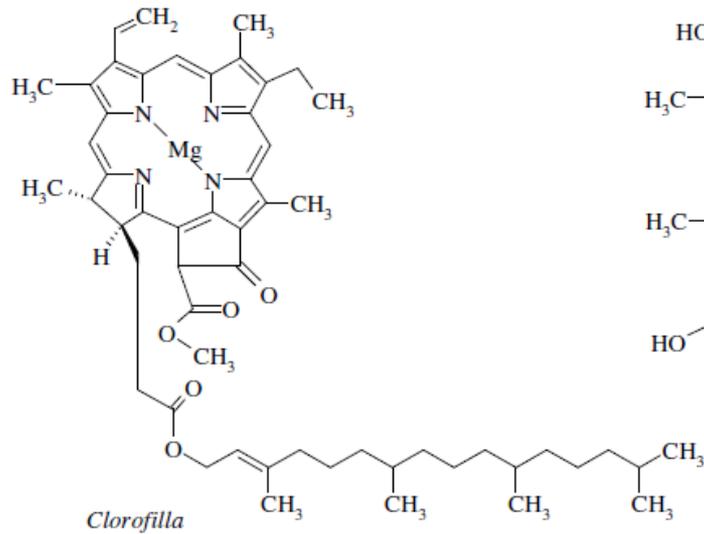


*FAD*

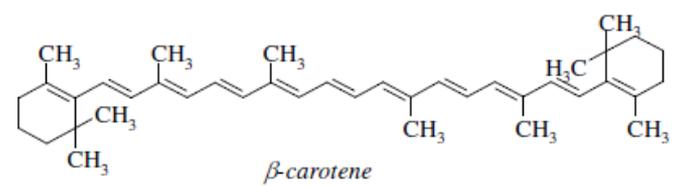


*NADH*

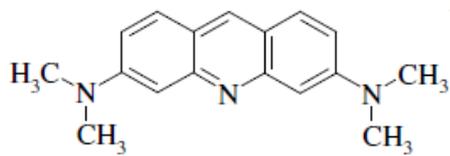
# ...altre biomolecole fluorescenti...



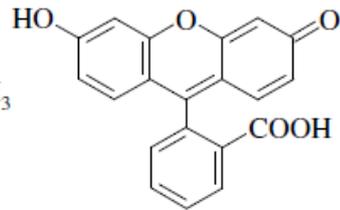
*GFP*



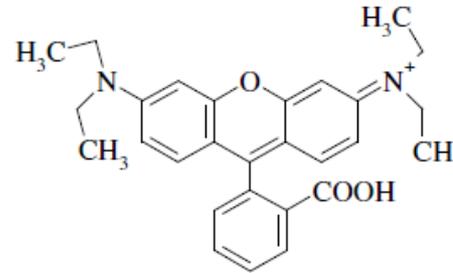
# ...e molecole fluorescenti usate in Biochimica



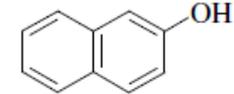
*Arancio di acridina*



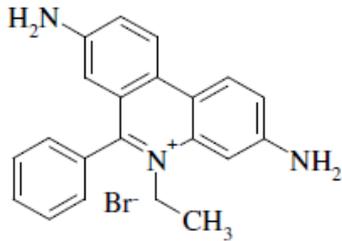
*Fluoresceina*



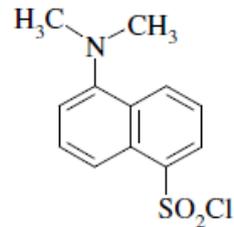
*Rodamina B*



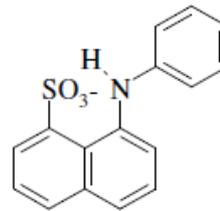
*Naftolo*



*Bromuro di etidio*

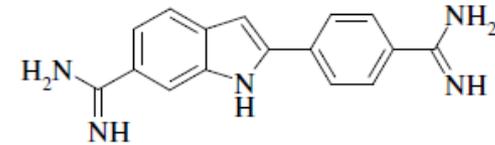


*Dansile*



*ANS*

8-anilino 1-naftalene sulfonato



*DAPI*

4',6-diamidin-2-fenilindolo

# Rodamina B

## per esame istologico

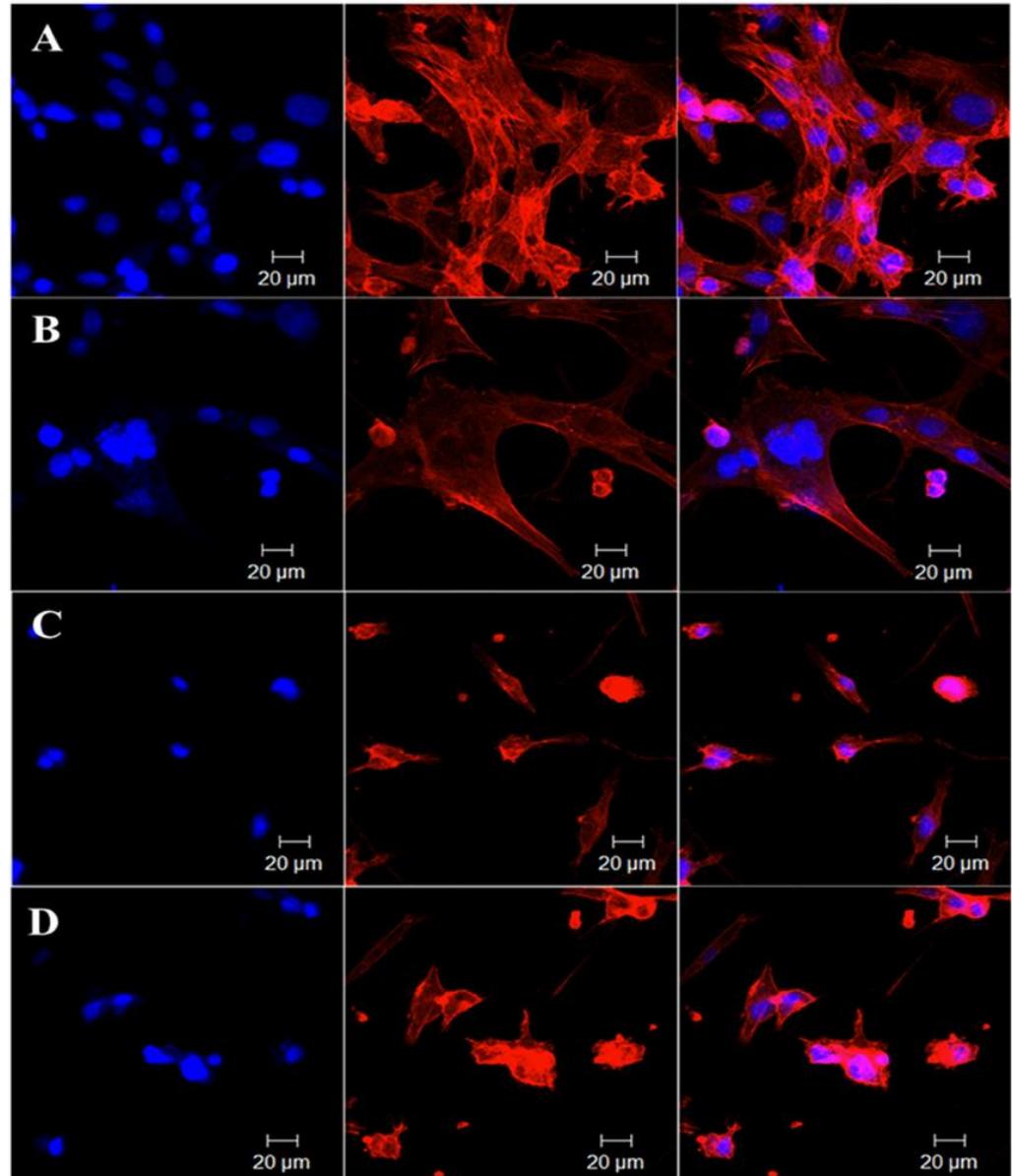
multifunctional nanocomposite consisting of Graphene Oxide–Iron Oxide -**Doxorubicin** (GO-IO-DOX)

In vitro cytoskeletal **imaging with Rhodamine B** displaying localized tumoricidal effects of

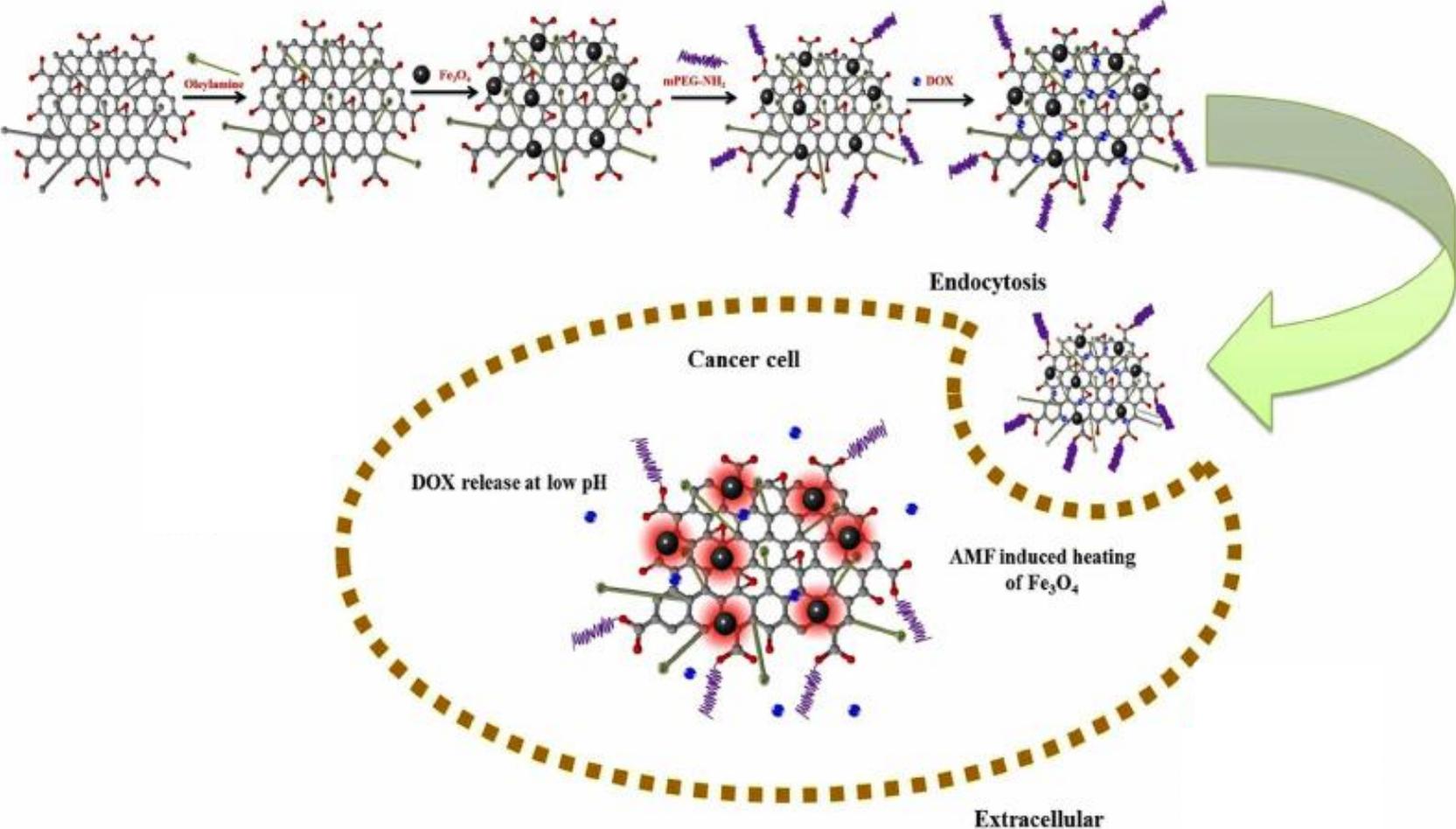
- ( A ) control
- ( B ) GO-IO-MH
- ( C ) GO-IO-DOX
- ( D ) GO-IO-DOX-MH.

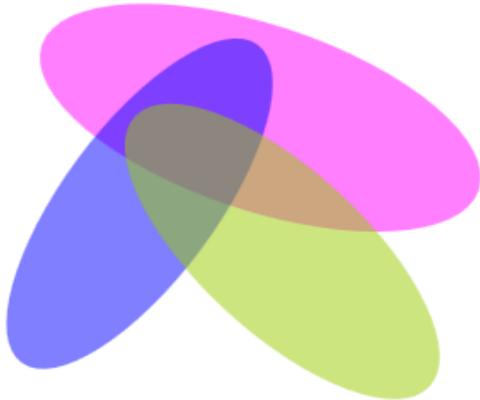
**Rhodamine B** è spesso utilizzata come colorante tracciante in acqua per determinare la velocità e la direzione del flusso e del trasporto nei tessuti.

I coloranti di rodamina sono fluorescenti e possono quindi essere rilevati facilmente e a basso costo.



# Graphene Oxide–Iron Oxide -Doxorubicin





# Spettroscopia di Fluorescenza

## Perchè è importante in Biochimica ?

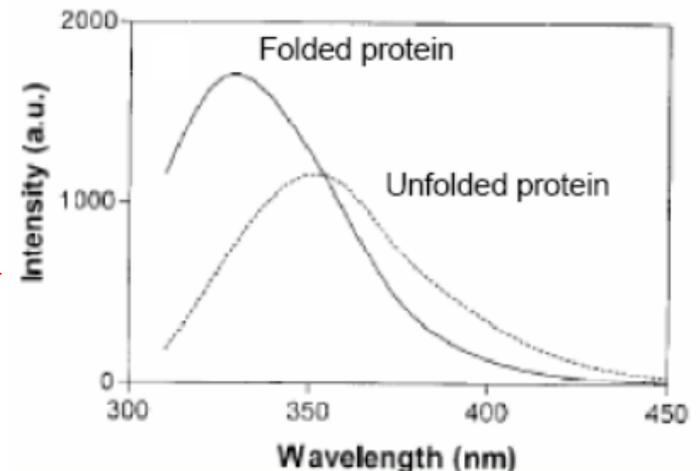
perche' gli aminoacidi aromatici (fenilalanina, istidina, triptofano e tirosina) emettono luce di fluorescenza, in particolare il **triptofano** ha uno spettro piu' intenso degli altri.

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).

*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:

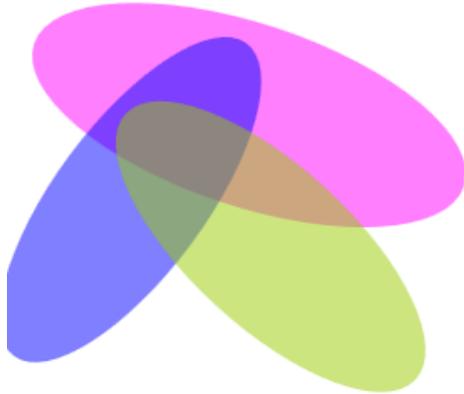


**Table 8-2**

Fluorescence characteristics of protein and nucleic acid constituents and coenzymes

Substance	Conditions	Absorption		Fluorescence <sup>§</sup>		$\tau_F$ (nsec)	Sensitivity $\epsilon_{\max}\phi_F$ $\times 10^{-2}$
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ $\times 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\phi_F$		
Tryptophan	H <sub>2</sub> O, pH 7	280	5.6	348	0.20	2.6	11.
Tyrosine	H <sub>2</sub> O, pH 7	274	1.4	303	0.14	3.6	2.0
Phenylalanine	H <sub>2</sub> O, pH 7	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08
Y base	Yeast tRNA <sup>Phe</sup>	320	1.3	460	0.07	6.3	0.91
Adenine	H <sub>2</sub> O, pH 7	260	13.4	321	$2.6 \times 10^{-4}$	<0.02	0.032
Guanine	H <sub>2</sub> O, pH 7	275	8.1	329	$3.0 \times 10^{-4}$	<0.02	0.024
Cytosine	H <sub>2</sub> O, pH 7	267	6.1	313	$0.8 \times 10^{-4}$	<0.02	0.005
Uracil	H <sub>2</sub> O, pH 7	260	9.5	308	$0.4 \times 10^{-4}$	<0.02	0.004
NADH	H <sub>2</sub> O, pH 7	340	6.2	470	0.019	0.40	1.2

<sup>§</sup> Values shown for  $\phi_F$  are the largest usually observed. In a given case actual values can be considerably lower.



# Spettroscopia di Fluorescenza

## Perchè è importante in Biochimica ?

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

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

# Analisi Quantitativa

## Spettroscopia di Fluorescenza

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

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

$I_f$  = intensità della radiazione fluorescente

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

$I_{\text{uscente}}$  = intensità della radiazione uscente dal campione

$\Phi$  = costante che dipende dal rendimento quantico del processo di fluorescenza

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

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

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

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

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

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

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

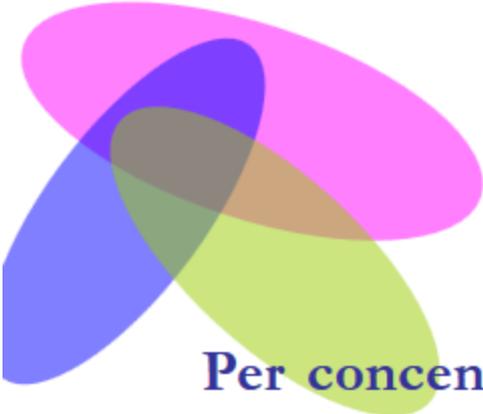
$$I_f = \Phi \cdot I_0 \cdot (2,303 \varepsilon \cdot d \cdot c)$$

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!

A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (fluoroforo) ( $2,3 \times 10^{-5} < c < 0,05$ ), l'intensità della radiazione fluorescente ( $I_f$ ) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = \Phi c$$

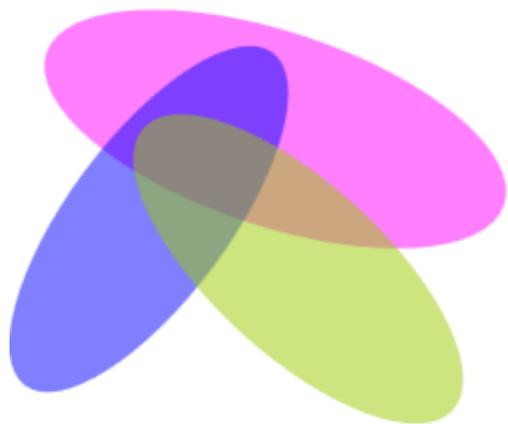
Una misura assoluta di fluorescenza richiederebbe una conoscenza esatta del numero di fotoni emessi ed assorbiti. Ciò è praticamente difficile da realizzare e l'intensità di fluorescenza è espressa in termini relativi o per confronto con una soluzione standard con resa quantica nota.



# 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

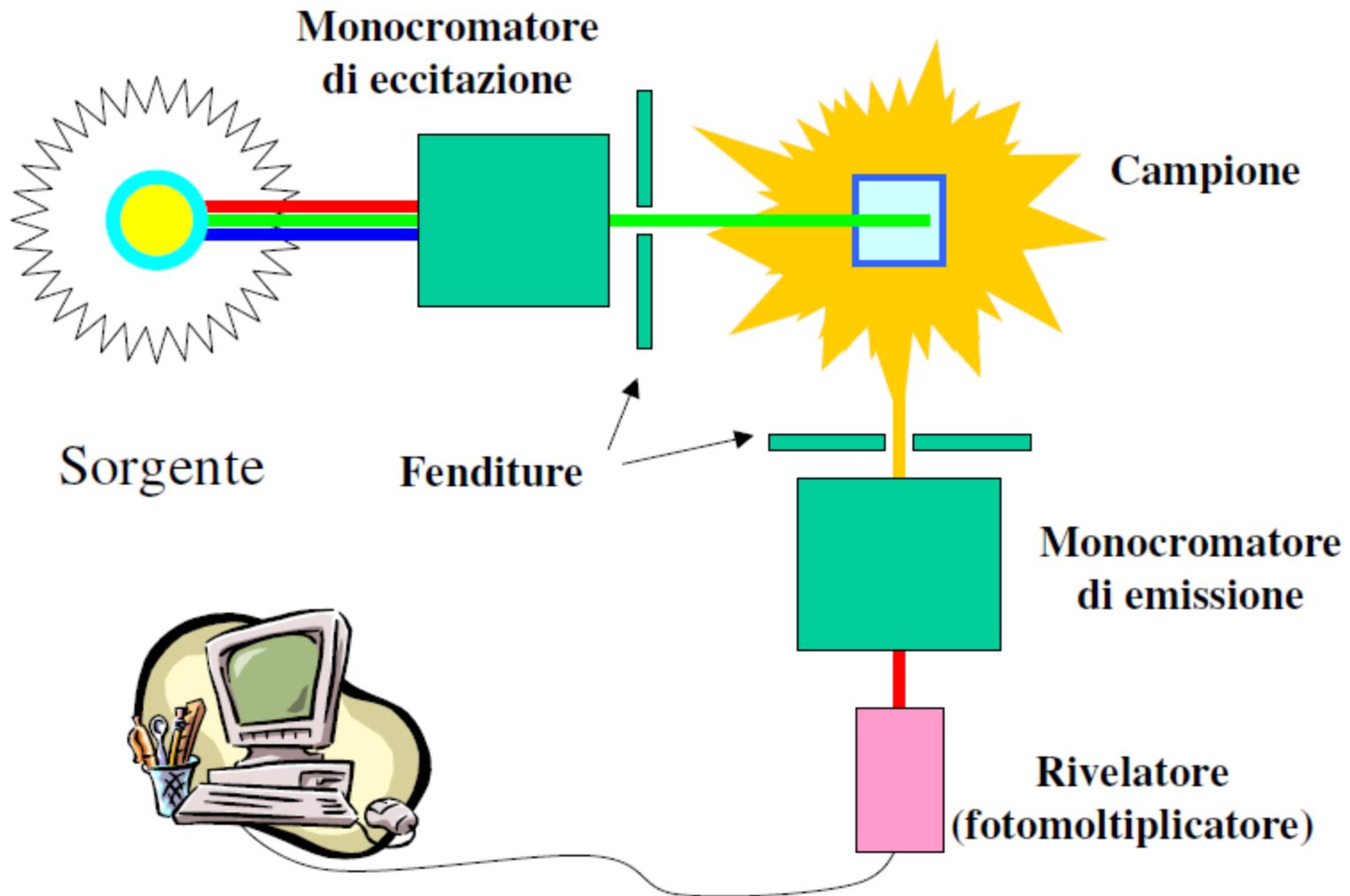
# Strumentazione

- Fluorimetro “statico”:
  - Sorgente: continua (*lampada a scarica in Xenon*).
  - Misura:  $\Phi_f$  e gli spettri di emissione.
- Fluorimetro “dinamico”:
  - Sorgente: pulsata (*Laser, luce di sincrotrone, lampada pulsata*).
  - Misura: tempi di vita di fluorescenza ( $\tau_f$ ).

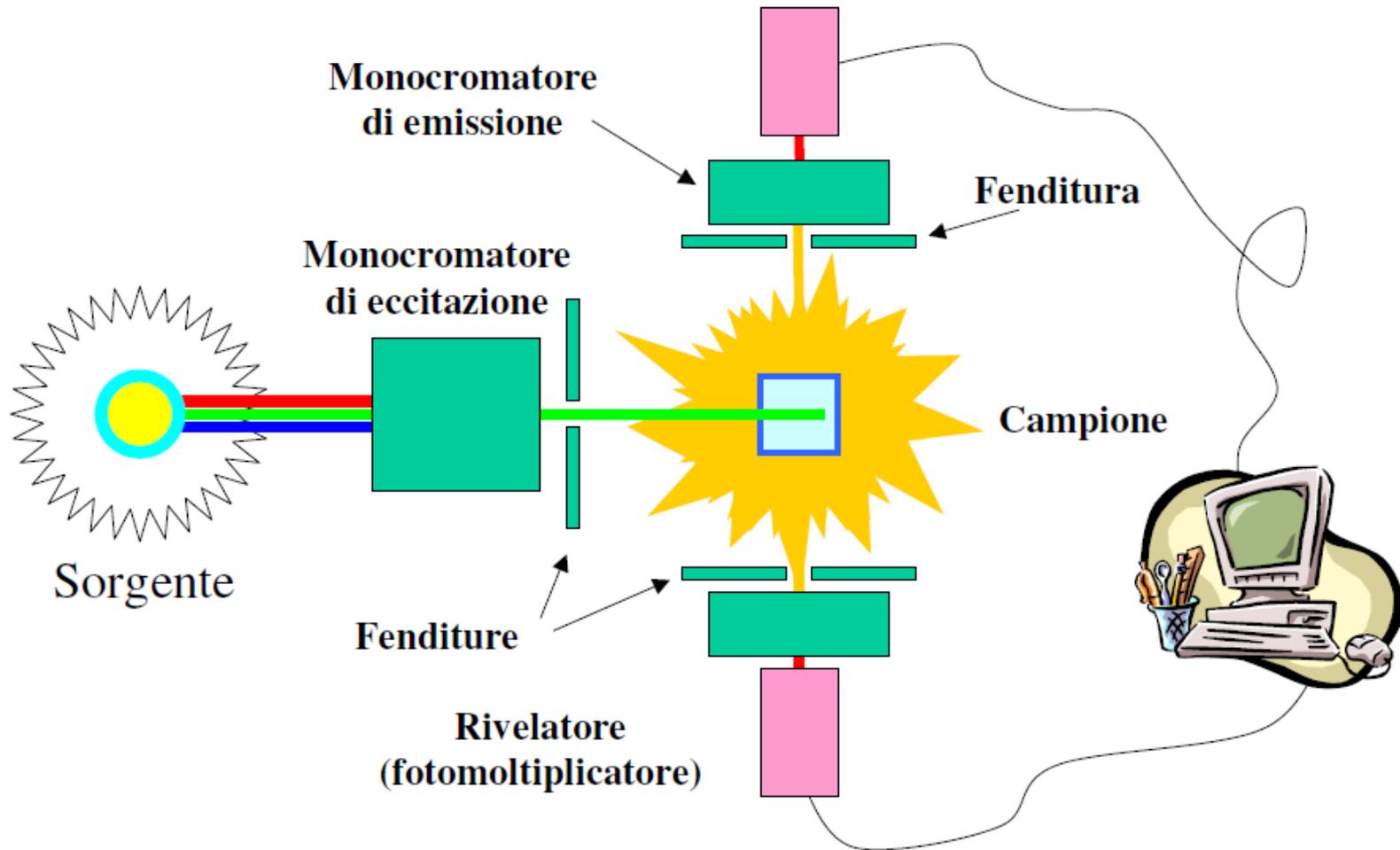
# Schemi ottici

- **A L**: il più comune.
- **A T**: misure di anisotropia di fluorescenza.

# Geometria a 90°



# Geometria a T



# Spettri in soluzione

- Spettro di emissione
  - Si illumina il campione con luce a lunghezza d'onda costante e si fa una scansione del monocromatore di emissione.
- Spettro di eccitazione
  - Si fa una scansione del monocromatore di eccitazione tenendo fissa la lunghezza d'onda del monocromatore di emissione.

# La “vetreria”

- Vista la geometria degli strumenti i campioni deve essere contenuti in “cuvettes” che abbiano le quattro pareti trasparenti.
- Possibilmente in quarzo (il vetro è opaco nell’UV),
- Ma con sorgenti di alta intensità (laser) il quarzo è (leggermente) fluorescente.



# Relazioni fondamentali

$$k_R = \frac{1}{\tau_R} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

$$\Phi_f = \frac{k_R}{\{k_R + k_{IC} + k_{CI} + k_q[Q] + \dots\}} = \frac{k_R}{k_R + k_i}$$

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_i}$$

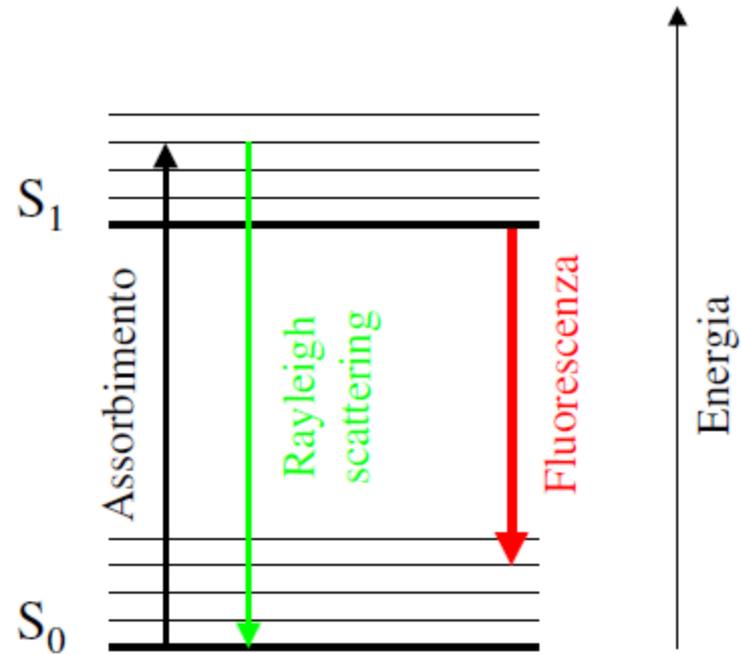
$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{\tau_f}{\tau_R}$$

# Artefatti spettrali

- Alcuni segnali che non derivano dalla fluorescenza sono sempre presenti negli spettri di eccitazione ed emissione:
  - Rayleigh scattering
  - Raman

# Rayleigh scattering

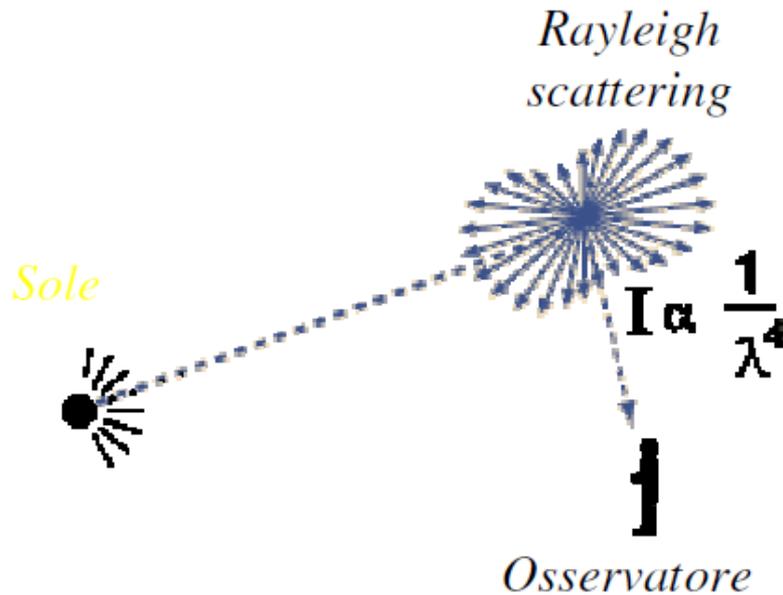
- Emissione di fotoni alla stessa energia dei fotoni assorbiti dovuta alla diffusione elastica.
- È funzione inversa di  $\lambda^4$  e diretta di  $r^6$ .
- La luce di scattering è polarizzata.



# Rayleigh scattering

- Ciò che rende il cielo colorato.

La forte dipendenza del Rayleigh scattering dalla lunghezza d'onda aumenta l'intensità della luce a lunghezza d'onda più corta dando al cielo il colore blu. Lo scattering a 400 nm è circa 10 volte maggiore rispetto a quello a 700 nm.

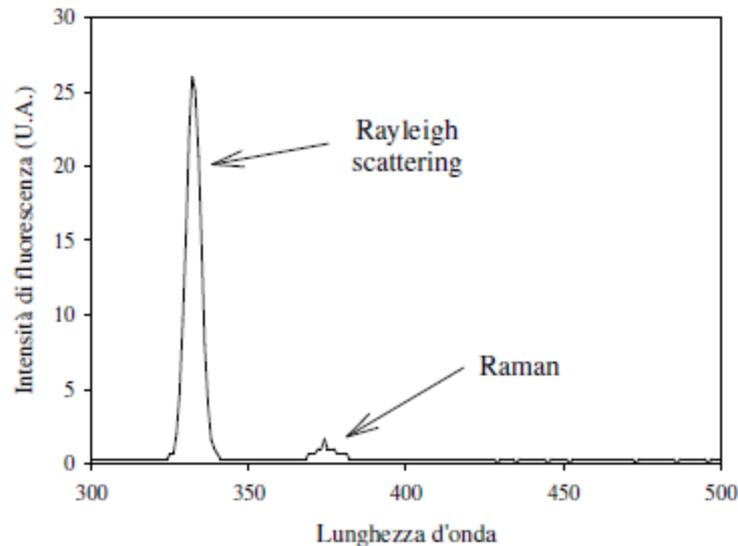


$$I = I_0 \frac{16\pi^4 r^6 \left[ \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right]^2 \cos^2 \theta}{\lambda^4 d^2}$$

# Raman

- Picchi satelliti del picco di Rayleigh dovuti alle transizioni vibrazionali
- I picchi sono posizionati ad una distanza fissa (in termini di energia) prima e dopo il picco di Rayleigh (Stokes e anti-Stokes).
- La spettroscopia Raman è una tecnica che investiga gli stati vibrazionali (e rotazionali) delle molecole. Ha bisogno di sorgenti molto intense (laser o luce di sincrotrone) per dare informazioni.

# Rayleigh scattering e Raman



- Spettro di emissione di H<sub>2</sub>O con  $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$
- Nello spettro di eccitazione la situazione è rovesciata: prima il Raman poi il Rayleigh. La differenza in termini di  $\lambda$  tra i due picchi nelle due situazioni è diversa ma corrisponde ad una uguale differenza in termini di energia.

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. **EMISSIONE DI FLUORESCENZA**



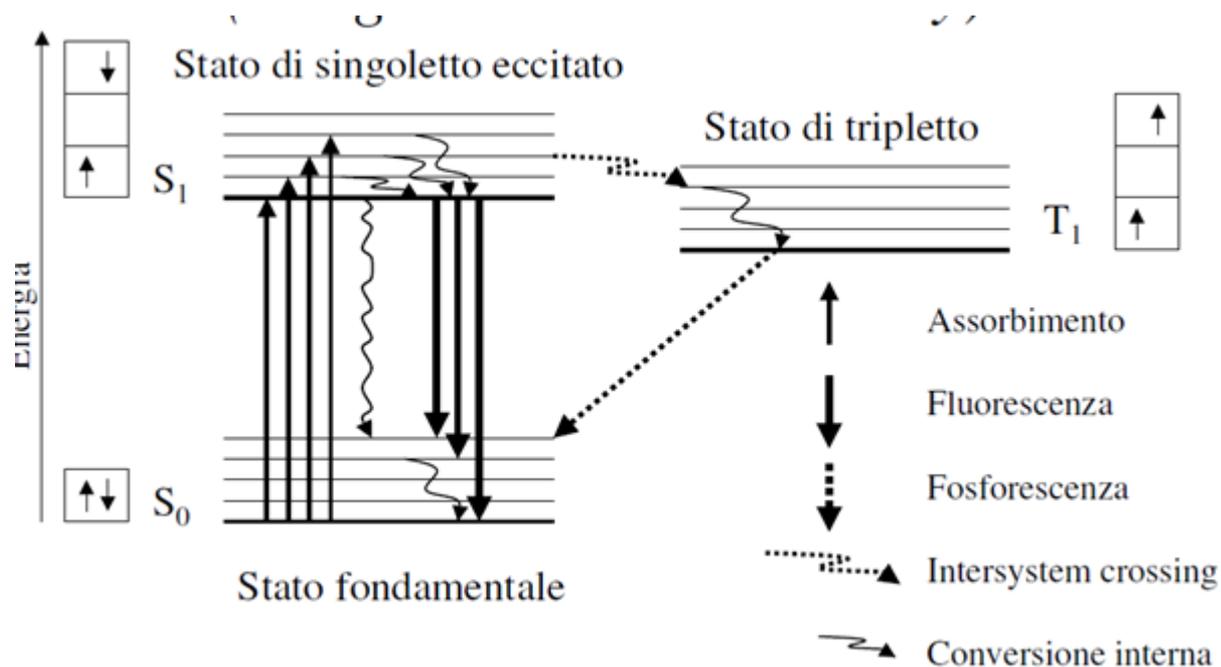
2. **CONVERSIONE INTERNA**



3. **CONVERSIONE INTERSISTEMA**



4. **SMORZAMENTO PER COLLISIONI**



# Quenching (“spegnimento”)

In soluzione possono essere presenti composti **inibitori** della fluorescenza, cioè sostanze che attenuano la fluorescenza (quenching della fluorescenza).

Le reazioni di quenching dei soluti sono uno strumento molto prezioso per lo studio delle proteine, di membrane e altri assemblaggi macromolecolari, fornendo **informazioni sulla posizione dei gruppi fluorescenti nella struttura molecolare** esaminata.

**N.B.:** Un fluoroforo che si trova sulla **superficie** di una struttura di questo tipo sarà relativamente accessibile ad un quencher. Al contrario, un fluoroforo localizzato all'interno di una struttura macromolecolare sarà meno accessibile.

Pertanto, l'esperimento di quenching può essere utilizzato per sondare le caratteristiche topologiche/conformazionali della struttura esaminata e per rilevare cambiamenti strutturali che possono essere causati da aggiunta di composti esterni o da un variazione delle condizioni fisiche.

Nei comuni esperimenti di quenching, il quencher viene aggiunto in un secondo momento alla soluzione contenente il fluoroforo.

L'analisi della dipendenza dalla concentrazione del quencher dell'intensità della fluorescenza  $F$ , della resa quantica  $\Phi$  o del tempo di vita  $\tau$ , fornisce informazioni quantitative sull'accessibilità del cromoforo all'interno della soluzione macro o supramolecolare.

# Quenching

A seconda della natura chimica dell'agente di quenching e del cromoforo, si possono distinguere due forme di quenching: **dinamico** o **statico**.

## STATICO

Molecole in soluzione che reagiscono con lo stato fondamentale producendo un complesso non fluorescente impedendo così il raggiungimento dello stato eccitato.

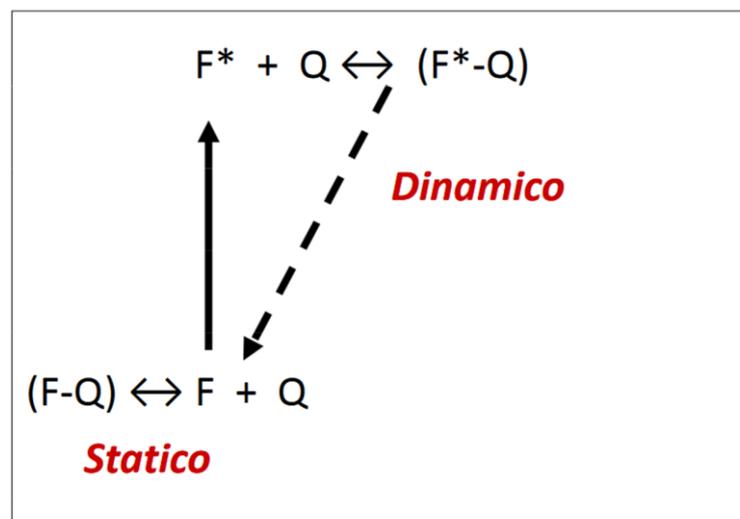
Aumentando la concentrazione del quencher diminuisce  $F$  o  $\Phi$ , ma  $\tau$  non cambia

## DINAMICO (o collisionale)

Molecole in soluzione che reagiscono con lo stato eccitato depopolandolo.

Si trovano sparsi in soluzione e scontrandosi con la specie eccitata, ne assorbono energia.

Competono con il processo di deattivazione.



# Quenching

- Non è sempre un fenomeno negativo, può essere usato come tool per dare informazioni su:
  - Struttura di macromolecole.
  - Accessibilità al solvente.
  - Intorno chimico del fluoroforo.

# Quenchers “collisionali”

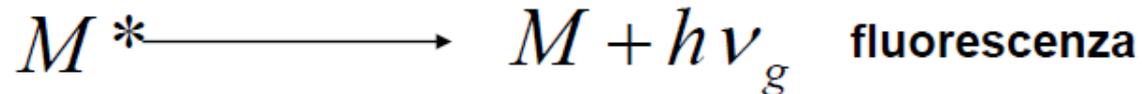
- Depopolano lo stato eccitato attraverso una cinetica di II ordine:



- KI (I<sup>-</sup>)
- Cs<sup>+</sup>
- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- Acrilamide
- Ossigeno
- Radicali (nitrossidi)

# Quenching

Il fluoroforo eccitato può collidere con un'altra molecola per trasferire energia in un secondo tipo di processo non radiativo (**quenching**)



Le rese quantiche di fluorescenza sono:

$$\Phi_0 = \frac{k_r}{k_r + k_i} \quad \Phi = \frac{k_r}{k_r + k_i + k_q[Q]}$$

*[Q] concentrazione dei quencher*

# Quenching dinamico

La concentrazione di fluorofori eccitati è sempre prossima a 0. Il quencher è sempre in grande eccesso e la sua concentrazione può essere considerata costante (pseudo-prim'ordine).

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -(k_r + k_i + k_q[Q])[M^*]$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_i + k_q[Q]}$$

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_i + k_q[Q]}$$

$$\Phi < \Phi_0$$

$$\tau < \tau_0$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{k_r + k_i + k_q[Q]}{k_r + k_i} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_r + k_i} =$$

$$= 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r + k_i}$$

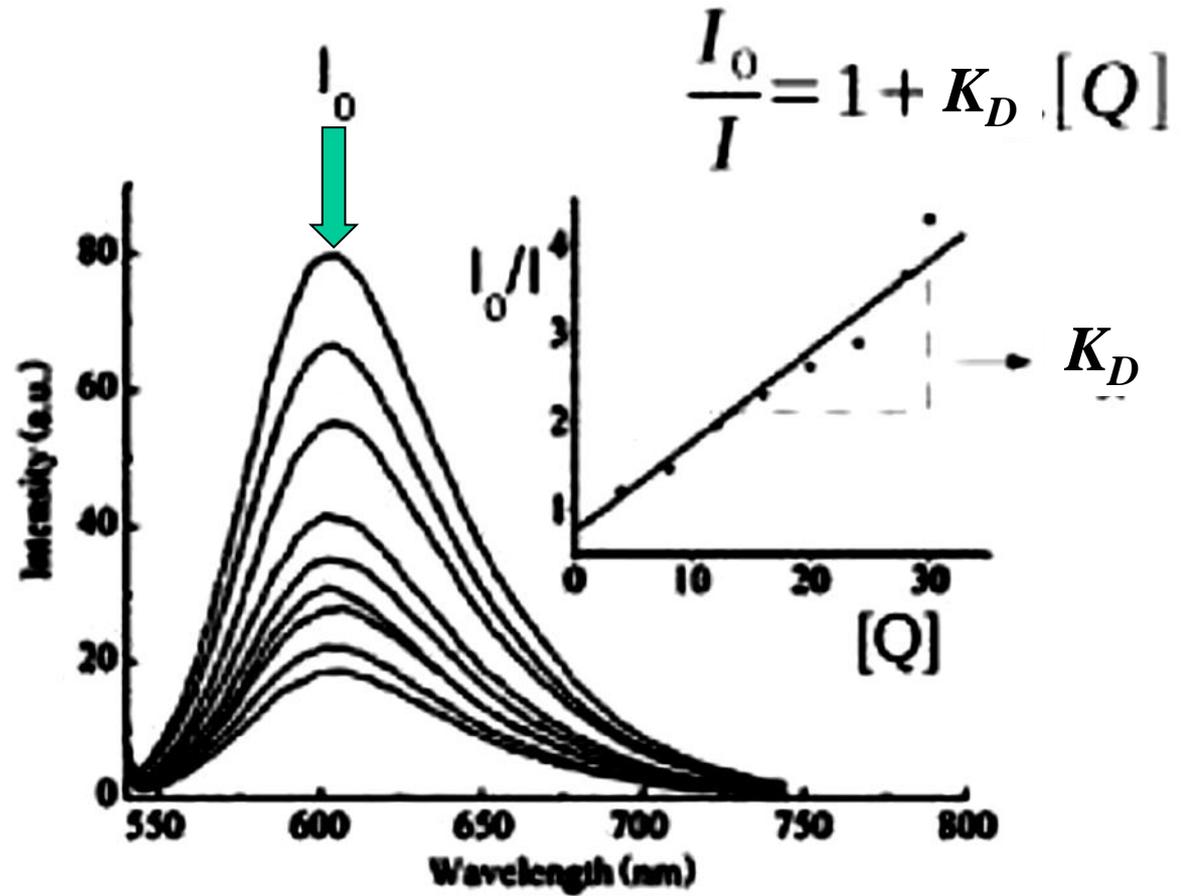
$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_r + k_i + k_q[Q]}{k_r + k_i} =$$

$\tau_0$  tempo di vita di M\* in assenza di Q  
 $\tau$  tempo di vita di M\* in presenza di Q

Costante di quenching  $K_D = \tau_0 k_q$

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{M^0}{M} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D [Q]$$

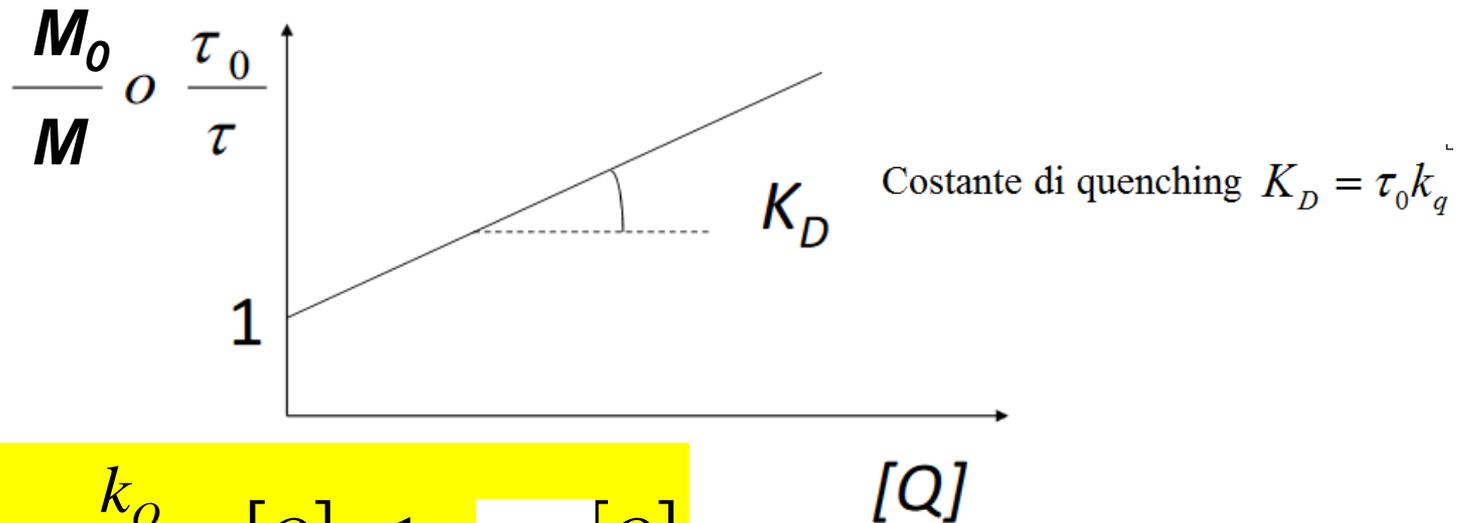
**Equazione  
di  
Stern-Volmer**



$$\frac{I_F}{I_{FQ}} = 1 + \frac{k_Q}{k_r + k_{nr}} [Q] = 1 + K_D [Q]$$

La dipendenza dalla concentrazione del quenching dinamico o collisionale è descritta dall'equazione di Stern-Volmer

$$\frac{M_0}{M} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D [Q]$$



$$\frac{I_F}{I_{FQ}} = 1 + \frac{k_Q}{k_r + k_{nr}} [Q] = 1 + K_D [Q]$$

L'intensità può essere misurata in funzione del quencher (o di altri agenti aggiunti, come protoni o co-solventi) per ottenere informazioni sull'accessibilità dinamica e altre relazioni tra gruppi vicini

Da considerazioni fisiche, la costante di quenching  $k_q$  può essere espressa come:

$$k_q = 4\gamma\pi D r N'$$

dove  $\gamma$  è l'efficienza della reazione di quenching,  $D$  è la somma dei coefficienti di diffusione del quencher e del cromoforo,  $r$  è la somma dei raggi molecolari del quencher e del cromoforo e  $N'=6,02 \cdot 10^{20}$  (numero di molecole per milimole).

Il coefficiente di diffusione di ogni specie  $i$  può essere espresso dalla relazione di Stokes-Einstein:

$$D_i = kT/6\pi \eta r_i$$

dove  $k$  è la costante di Boltzmann e  $\eta$  è la viscosità della soluzione. Ne consegue che la **costante di quenching aumenta con l'aumentare della temperatura  $T$**  per effetto della diffusione sul quenching dinamico.

Un altro meccanismo di quenching dinamico della fluorescenza è legato alla **natura chimica** del cromoforo e del quencher.

I quencher contenenti **alogeni o metalli pesanti** aumentano la velocità del processo IC (generalmente indotto da un meccanismo di accoppiamento spin-orbitale).

Il **quenching dell'acrilammide dei triptofani** nelle proteine è probabilmente dovuto al trasferimento di elettroni dallo stato eccitato dell'indolo all'acrilammide.

In altri casi un fluoroforo può essere «quenziato» **simultaneamente** sia per quenching dinamico che statico. La caratteristica del quenching misto è che il grafico della dipendenza della resa quantica dalla concentrazione o dei rapporti di intensità mostra una curvatura verso l'alto.

In questo caso l'equazione di Stern-Volmer deve essere modificata, ottenendo un'equazione del secondo ordine in [Q].

Type of fluorophore	Used quenchers
Indole	Carboxy groups, chlorinated compounds, dimethylformamide
Tyrosine	Disulphides
Tryptophan	Acrylamide, histidine, succinimide, trifluoroacetamide, iodide, disulphides
Naphthalene	Halogens, nitroxides
Anthracene	Amines, halogens, thiocyanate
Anthranoyloxy probes	Tetracaine
Quinolinium ions and their betaines	Chloride, bromide, iodide
Pyrene	Halothane
Carbazole	Amines, chlorinated compounds, halogens
Common quencher for almost all dyes	Oxygen

Il quenching statico della fluorescenza dipende dalla formazione di un complesso non fluorescente tra il fluoroforo e il quencher.

Una forma modificata dell'equazione di Stern-Volmer che descrive i dati di quenching quando sono presenti **sia il quenching dinamico che quello statico** ha la forma seguente:

$$F_0/F = (1 + k_q\tau_0[Q]) (1 + K_D[Q])$$

$K_D$  è la costante di equilibrio per la formazione del complesso.

**Il quenching dinamico** è un processo che compete con l'emissione per il depopolamento dello stato eccitato; di conseguenza, il tempo di vita della fluorescenza **diminuisce** in proporzione alla resa

**Il quenching statico** riduce solo la **resa**, poiché il tempo di vita dei fluorofori non complessati rimane costante.

In nessun caso, tuttavia, è possibile una curvatura verso l'alto nei diagrammi di Stern-Volmer, a meno che non agiscano due modalità di quenching, statico e dinamico, sulla stessa popolazione.

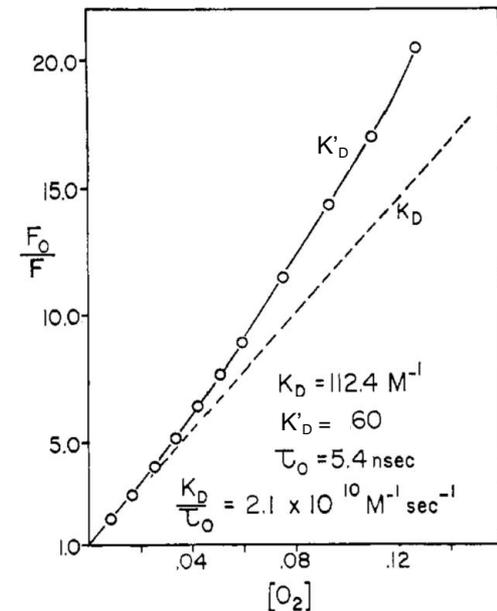


FIGURE 7:  
Oxygen quenching of perylene in dodecane.

# Quenching di proteine

Uno degli obiettivi principali degli studi biofisici sulla struttura e sulla funzione delle proteine è quello di **identificare i domini proteici** che sono responsabili dell'interazione dell'intera proteina con leganti fisiologicamente rilevanti.

Le proteine contengono di solito diversi residui di **triptofano**, che possono essere distribuiti nei diversi domini proteici.

Poichè ognuno di questi residui di triptofano è situato **in un ambiente diverso**, ogni residuo potrebbe presentare un diverso profilo di decadimento della fluorescenza e un'accessibilità diversa alle molecole di quencher.

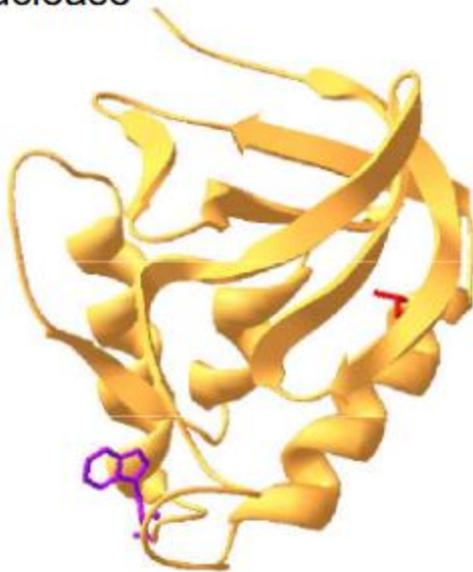
Utilizzando la spettroscopia di fluorescenza, può essere determinato con un'elevata accuratezza il tempo di decadimento  $\tau$  del triptofano in proteine.

Protein	Native protein (0.1 M phosphate, pH 7) $k_q \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$		Denatured protein (6 M guanidine-HCl added) $k_q \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	
	Oxygen	Iodide	Oxygen	Iodide
Tryptophan	12.0	3.9	5.9	1.9
<i>n</i> -Ac-Try-NH <sub>2</sub>	11.6	3.8	7.3	2.1

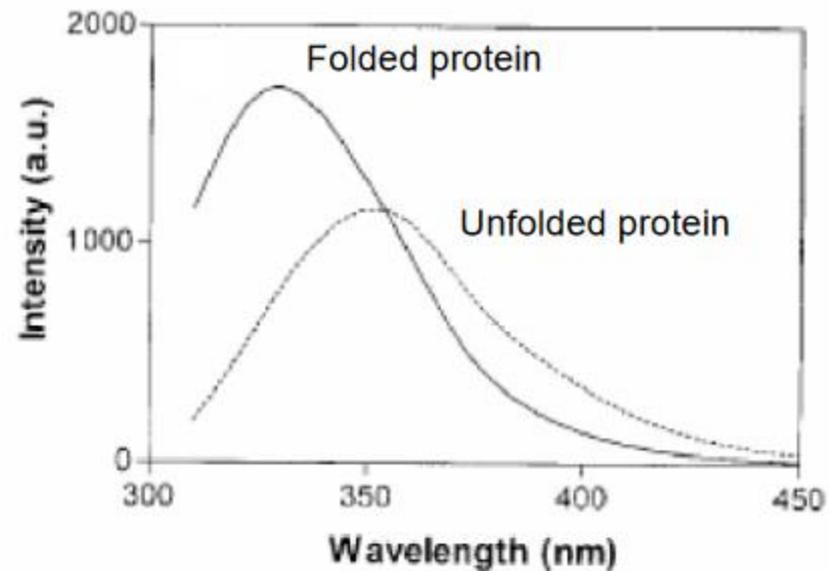
SOURCE: Adapted from J. R. Lakowicz and G. Weber, *Biochemistry* 12:4171 (1973).

# La fluorescenza del triptofano (o di altri Fluorofori) dipende dalla localizzazione

Nuclease



Typical result:



Lo spettro di **emissione** della catena laterale **indolica** del triptofano è molto sensibile alla polarità dell'ambiente in cui si trova, fornendo una utile sonda per distinguere lo stato nativo e denaturato delle proteine.

Questa sensibilità ambientale è una conseguenza del fatto che l'emissione di fluorescenza di un fluoroforo compete con **processi molecolari che avvengono sulla scala temporale del processo di emissione**

In altre parole, l'emissione di fotoni può avvenire sulla stessa **scala temporale di nanosecondi** del movimento rotazionale e traslazionale di piccole molecole e catene laterali di proteine.

**La fluorescenza è intrinsecamente sensibile ai processi su scala dei nanosecondi, rendendo così la fluorescenza utile per ottenere informazioni sulla dinamica delle proteine e informazioni strutturali** (ad esempio, le distanze  $D \rightarrow A$ )

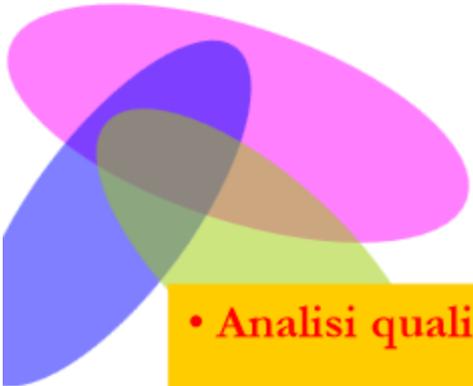
L'applicazione forse più frequente della fluorescenza è quella di **sonda per le transizioni conformazionali**, comprese le transizioni di folding-unfolding, il legame con i ligandi e i processi di associazione proteina-proteina

Il contributo dei singoli residui di triptofano è molto importante.

E' stato riscontrato che il massimo di emissione delle proteine varia da meno di 330 nm a oltre 350 nm.

Questo intervallo di massimi di emissione, che ora sappiamo può arrivare fino a **308 nm** per un residuo di triptofano, è stato dimostrato come una misura abbastanza buona e conveniente **dell'esposizione** al solvente dei residui di triptofano nelle proteine.

Dato che la carica elettrostatica locale può giocare un ruolo importante, il modello che è emerso è che i residui di **triptofano sepolti** nelle regioni del nucleo apolare delle proteine hanno blue-shift, **fino a 308 nm**, e che i residui di triptofano che sono **esposti all'acqua (al solvente polare)** hanno un'emissione verso il rosso di **circa 350 nm**.



# Applicazioni della fluorimetria

- **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

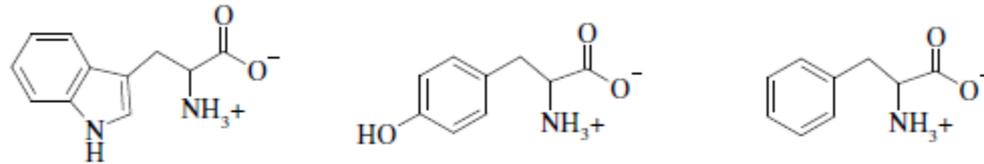
- **Analisi quantitativa:**

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

# Informazioni dagli spettri

- Intensità e posizione delle bande
  - Intorno chimico;
  - Reazioni allo stato eccitato;
  - Reazioni allo stato fondamentale;
  - Interazione con altre molecole;
  - Concentrazione;

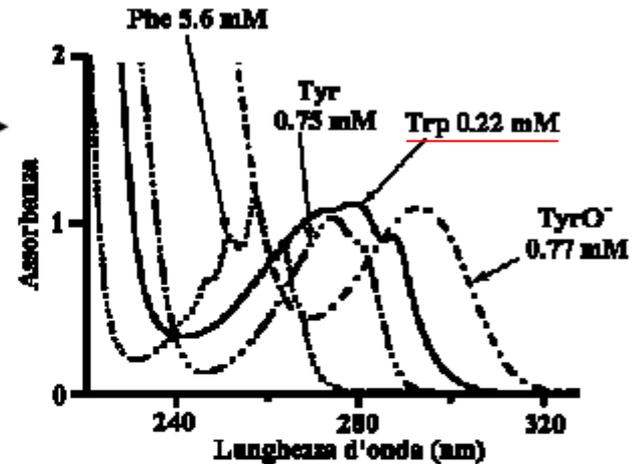
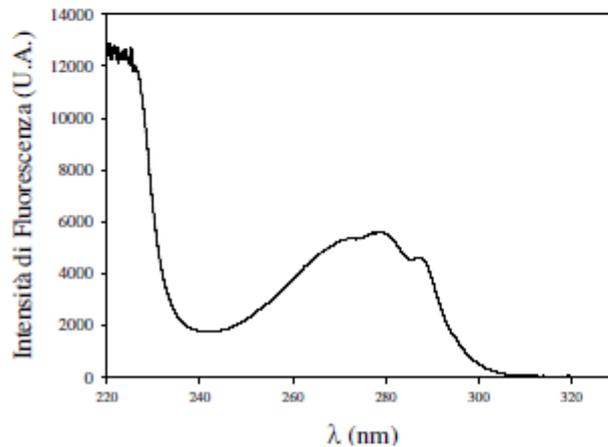
# Fluorescenza intrinseca di proteine



- Triptofano
  - Il più efficiente ed il più usato,
  - A secondo del suo intorno chimico varia il suo spettro.
- Tirosina
  - Può esistere come tirosinato.
  - Può dare energy transfer con il triptofano (difficile).
- Fenilalanina

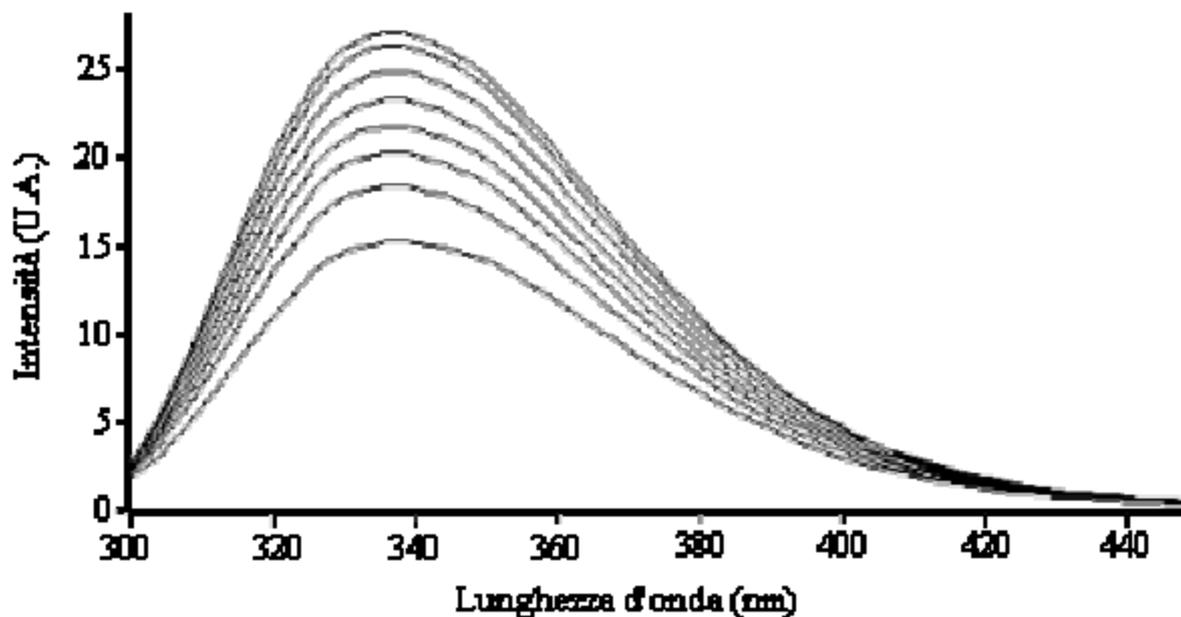
# Fluorescenza intrinseca di proteine

- Spettri di assorbimento
- Spettro di eccitazione del Trp ( $\lambda_{exc}=250\text{ nm}$ )



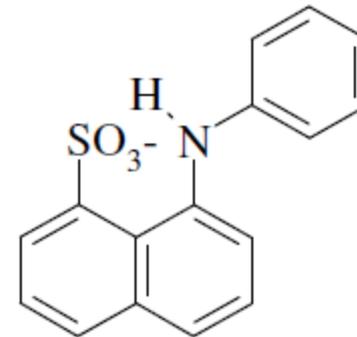
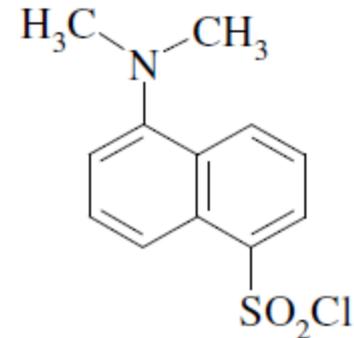
# Fluorescenza intrinseca di proteine

- Spettro di emissione del Trp ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ) in soluzione acquosa a temperature variabili.



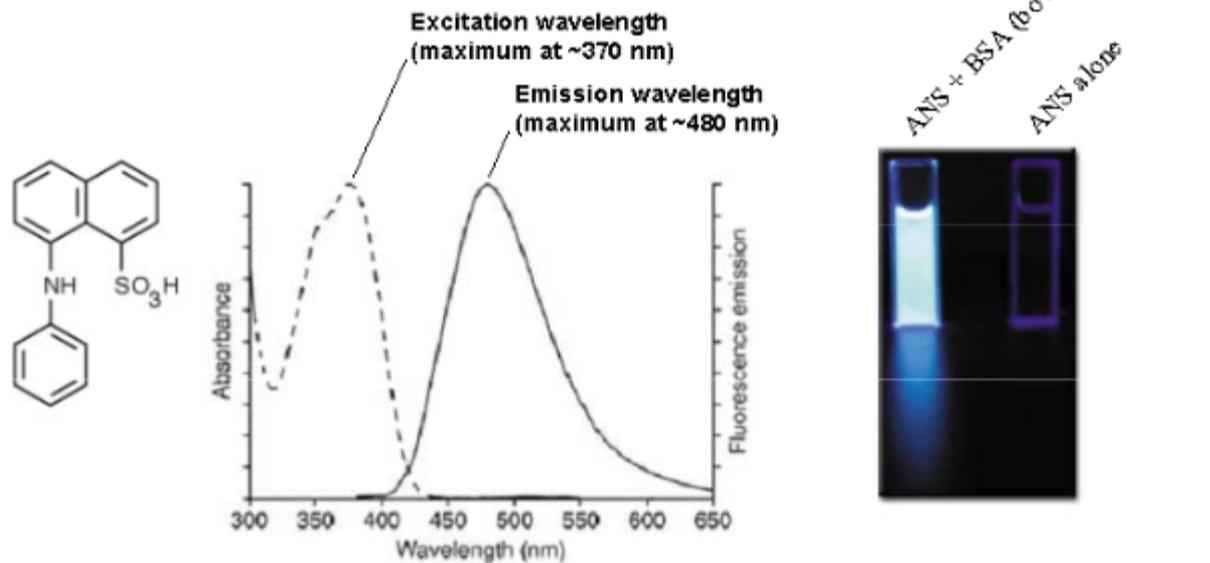
# Sonde fluorescenti per proteine

- Dansile (e derivati: EDANS; IAEDANS)
  - Usato per fare il “labelling” covalente di proteine al gruppo amminico;
  - Usati per FRET;
- ANS
  - Usato per studiare il “molten globule state”. Si lega in modo non covalente preferibilmente ai domini idrofobici delle proteine.
  - In ambiente idrofobico è più fluorescente che in acqua.



1-anilino-8-naftalene sulfonato

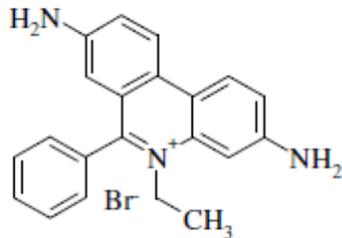
# L'ANS può essere usato per studiare la conformazione delle proteine



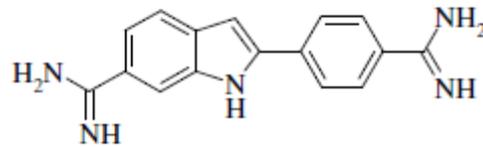
L'intensità ed il massimo di fluorescenza cambiano in seguito al legame ad una regione idrofobica delle proteine

# Sonde fluorescenti per acidi nucleici

- Intercalanti
  - Etidio bromuro (propidio ioduro)
  - DAPI

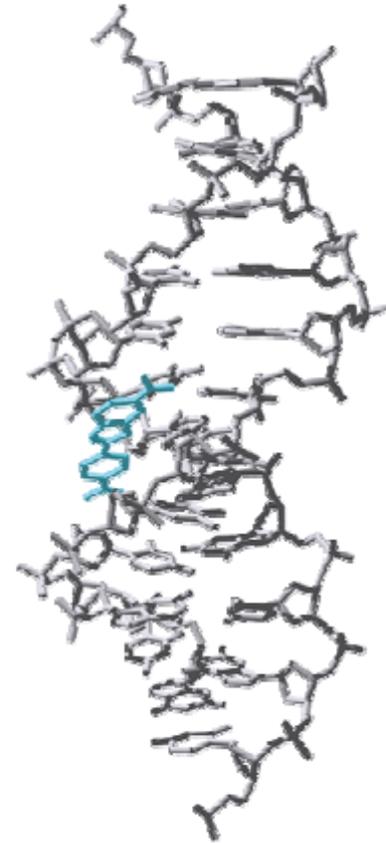
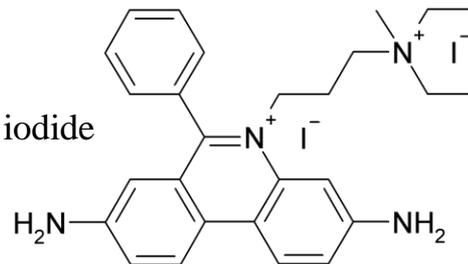


Bromuro di 3,8-diammino-5-etil-6-fenilfenantridinio



4',6-diamidin-2-fenilindolo

Phenanthridinium, 3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-fenil-, iodide



# Applicazioni del quenching di fluorescenza

Rivelazione e  
quantificazione di DNA

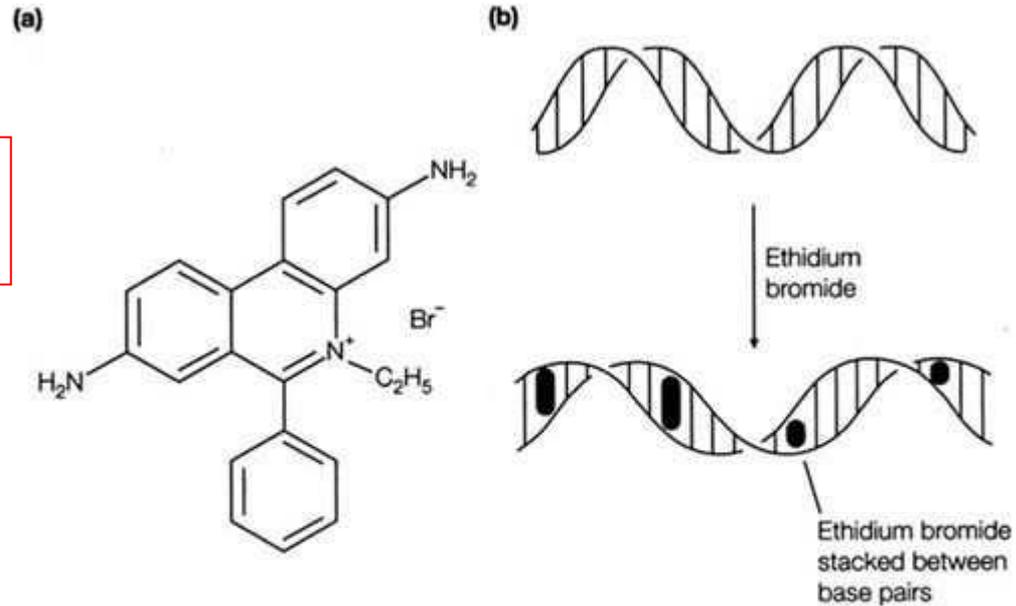
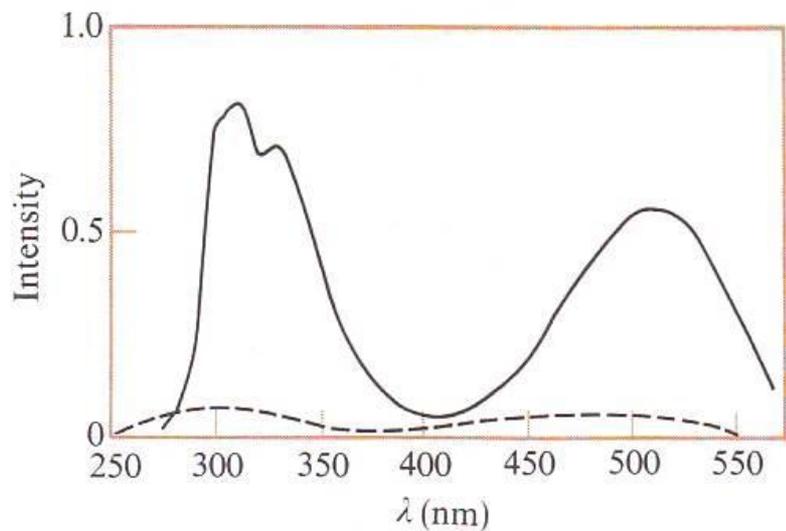
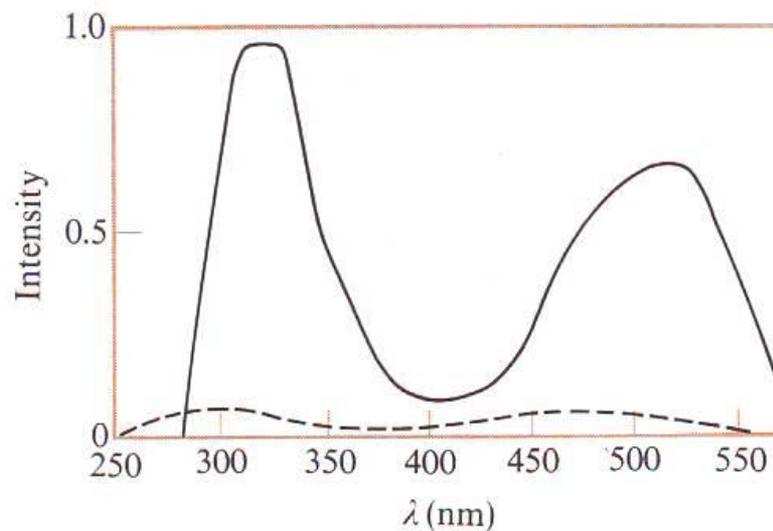


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



(a)



(b)

**Figure 8-17**

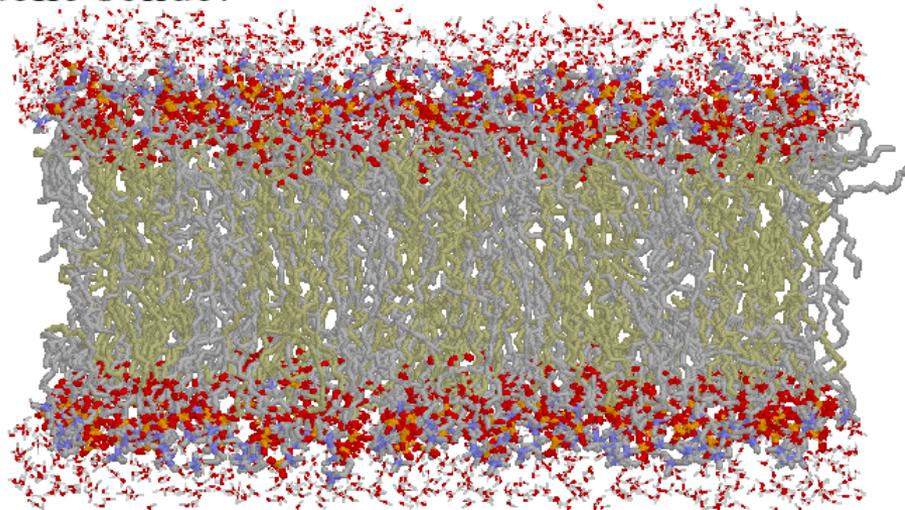
*Fluorescence excitation spectra of ethidium bromide in aqueous solution (dashed line) or bound (solid line) to (a) double-strand DNA or (b) RNA.*

## *Studio delle membrane cellulari*

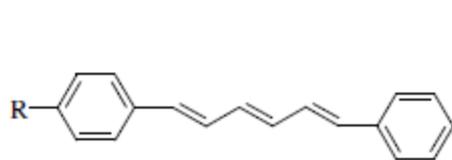
**quencher idrofili** → quantificazione dei triptofani facilmente accessibili al solvente

**quencher lipofili** permeano la membrana e si intercalano dentro di essa → quantificazione dei triptofani che costituiscono la componente apolare e normalmente non accessibile della proteina.

- Le membrane non sono fluorescenti: servono delle sonde:

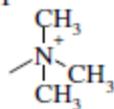


# Sonde fluorescenti di membrana

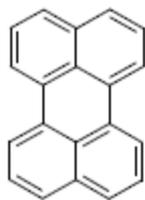
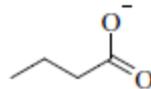


*DPH*      $R = H$

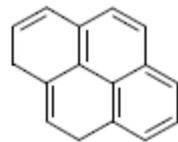
*TMA-DPH*    $R =$



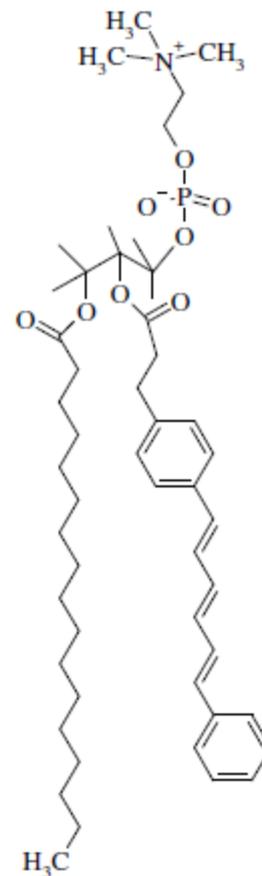
*PA-DPH*      $R =$



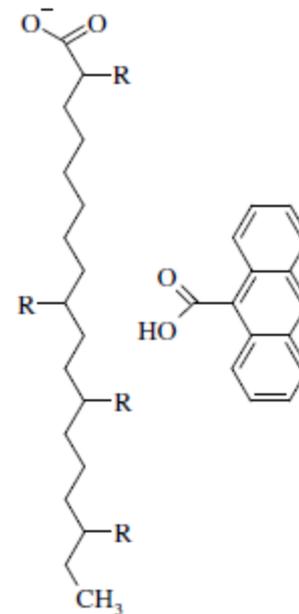
*Perilene*



*Pirene*

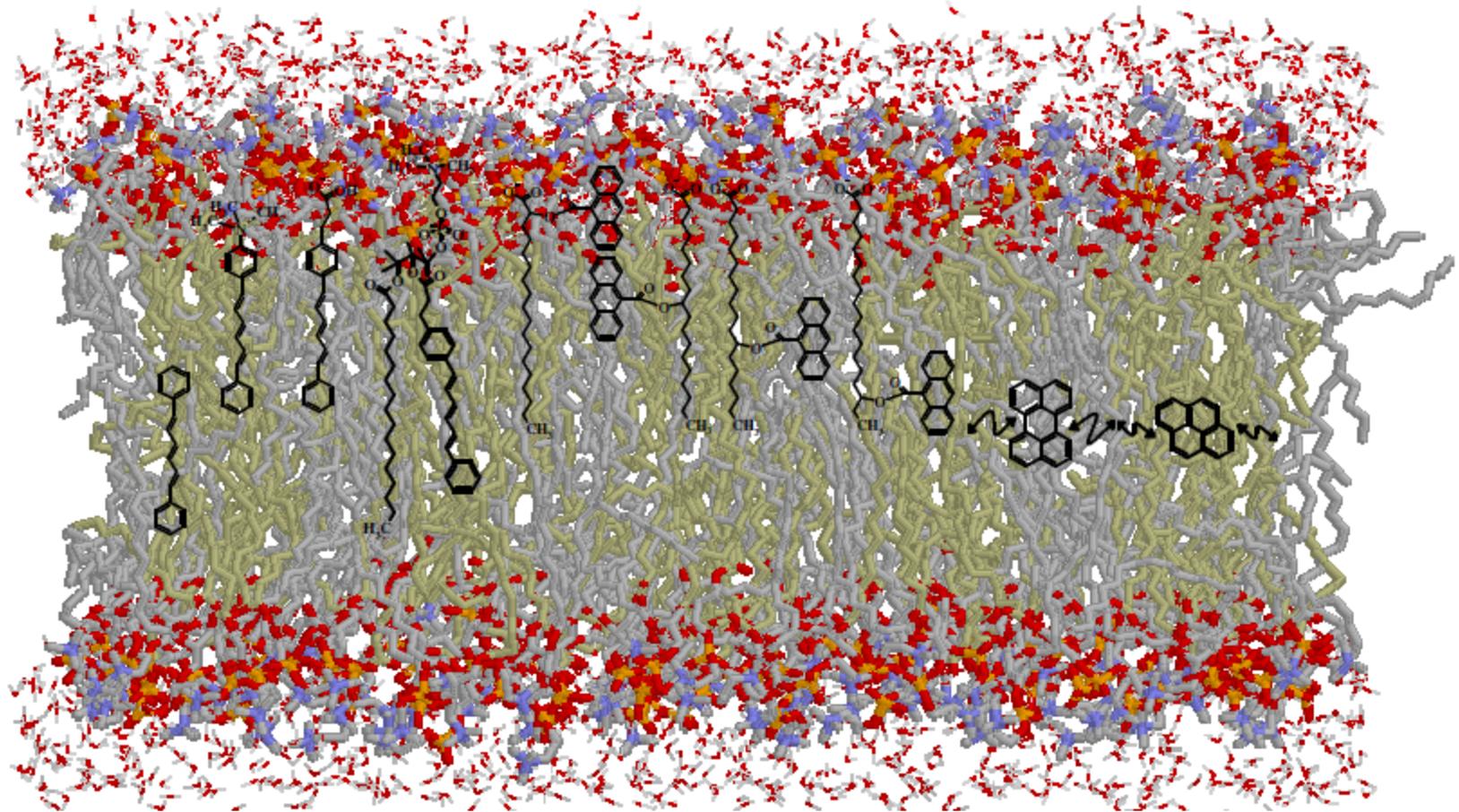


*Fosfatidilcolina-DPH*



*Antranildervati di acidi grassi*

...che hanno localizzazioni più o meno “certe”





Il quenching mediante **ossigeno** può essere usato con **fluorofori apolari intercalati** in membrane lipidiche, ad esempio per fornire informazioni sulla permeabilità dell'O<sub>2</sub> nelle membrane dei liposomi



quenching della fluorescenza eseguito con **quencher polari** può fornire informazioni sull'equilibrio di ripartizione di piccoli fluorofori (come alcune tossine) tra la fase liquida e le membrane fosfolipidiche



è possibile ottenere informazioni sull'equilibrio di **ripartizione fase polare / fase apolare** di alcune piccole molecole che agiscono come quencher (come alcuni anestetici), attraverso il quenching di fluorescenza di fluorofori presenti nella zona idrofila o nella zona lipofila delle proteine di membrana o di alcuni fosfolipidi.

## Trasferimenti di energia tra stati eccitati

Il tipo più semplice di trasferimento energetico è il trasferimento radiativo:

I fotoni emessi dalla molecola donatore sono riassorbiti dalla molecola accettore.  
Non c'è nessuna interazione diretta tra la molecola donatore ed accettore

# Trasferimenti di energia tra stati eccitati

Un altro tipo di trasferimento energetico avviene attraverso l'accoppiamento elettronico delle molecole

In questo caso la transizione non è radiativa ma avviene per deattivazione dello stato energetico eccitato e implica un riduzione della vita media della fluorescenza.(quenching)

il grado di eccitazione dipende **dalla distanza tra le molecole** ma anche **dalla sovrapposizione spettrale e dalla orientazione dei dipoli di transizione del donatore e dell'accettore**

# Trasferimenti di energia tra stati eccitati

A seconda della distanza e della intensità di accoppiamento tra le molecole possiamo distinguere due tipi di meccanismi per il trasferimento tramite accoppiamento elettronico:

- 
1. Trasferimento energetico per risonanza di Förster (FRET) per deboli accoppiamenti
  2. Trasferimento energetico di Dexter per accoppiamenti forti e moderati

Il FRET è il risultato di **interazioni dipolo:dipolo** (interazioni coulombiane)

Nel Dexter invece si ha uno **scambio elettronico vero e proprio** e quindi la distanza tra donatore e accettore deve essere all'intorno in cui le forze di Van der Waals sono valide (5 Angstroem)

# Trasferimento energetico di risonanza di fluorescenza (FRET)

Il trasferimento di energia di risonanza di fluorescenza (FRET) è un trasferimento non radiativo di energia di eccitazione da un cromoforo donatore a uno accettore, mediato da un'interazione a lungo raggio tra i **momenti di dipolo** di transizione dell'emissione e dell'assorbimento del donatore e dell'accettore

La fluorescenza intrinseca od estrinseca di una proteina può eccitare – mediante trasferimento di energia per risonanza – la fluorescenza di un altro fluoroforo aggiunto, spazialmente vicino; il fenomeno è indicato come **FRET, *Fluorescence Energy Transfer***.

Determinando le variazioni della fluorescenza del secondo fluoroforo a secondo che sia eccitato per irradiazione diretta o per FRET, si possono misurare con accuratezza le distanze tra residui amminoacidici e la localizzazione di metalli od altri ligandi.

Trovano largo uso come sonde fluorescenti proteine del tipo della ***Green Fluorescent Protein, GFP***.

**N.B.: è una tecnica per misurare distanze inter- o intra-molecolari nell'intervallo 1-10 nm**

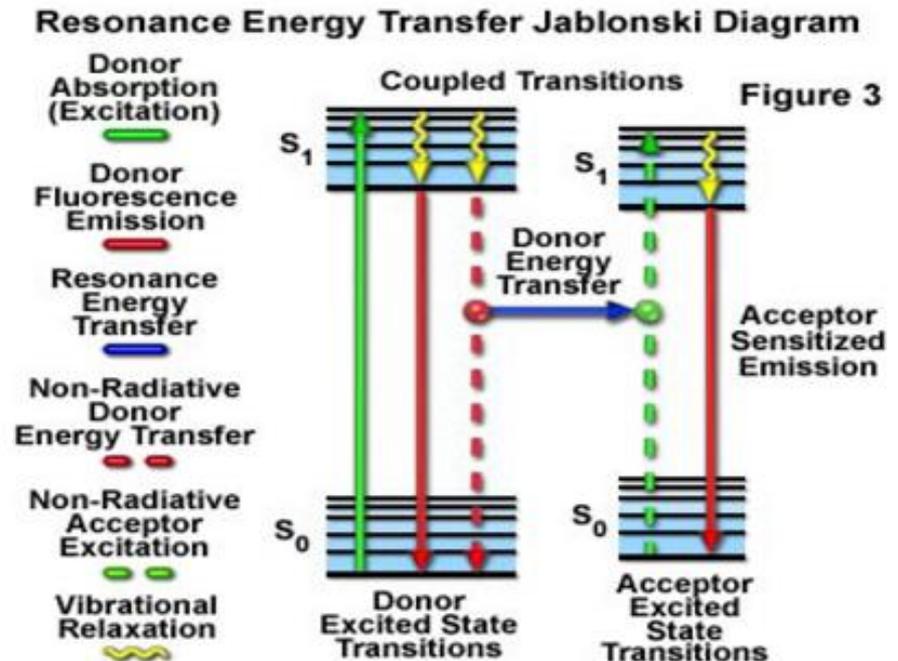
Il trasferimento energetico di risonanza di fluorescenza (FRET) è una interazione dipendente dalla distanza **tra gli stati elettronici eccitati** di due molecole di colorante fluorescente.

L' eccitazione è trasferita da una molecola **donatore** ad una molecola **accettore** senza emissione di un fotone.

Il FRET è un trasferimento **non radiativo** di energia da un fluoroforo (il donatore) ad un altro (l'accettore) per interazione dipolo-dipolo.

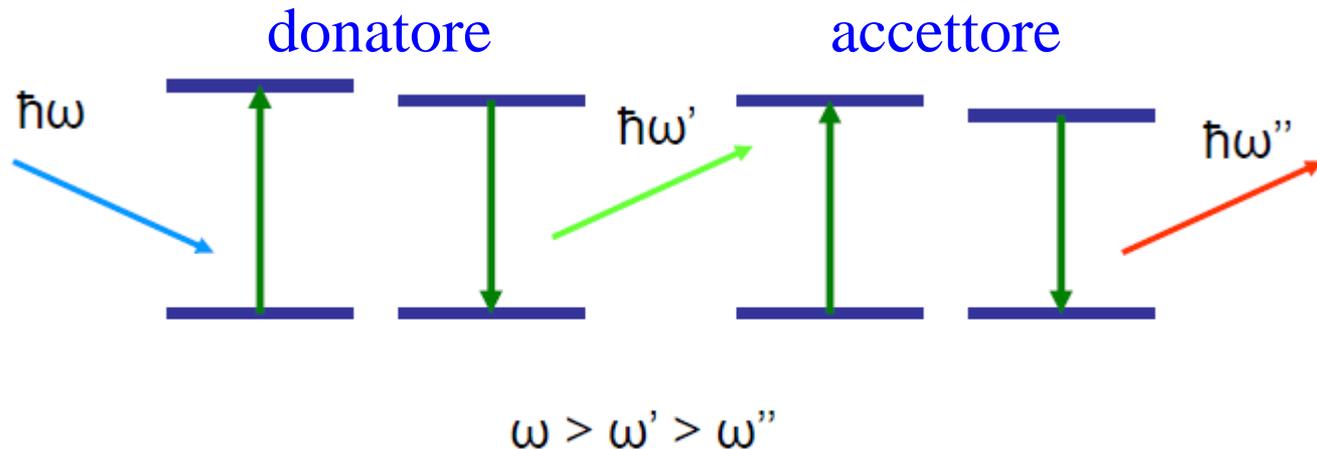
FRET è dipendente dall'inverso della **sesta potenza** della separazione intermolecolare, quindi utile per distanze dell'ordine delle dimensioni di macromolecole

## FRET



# Cosa NON È il meccanismo FRET

- L'energia NON è trasmessa da eventi di emissione di un donatore e di assorbimento di un accettore

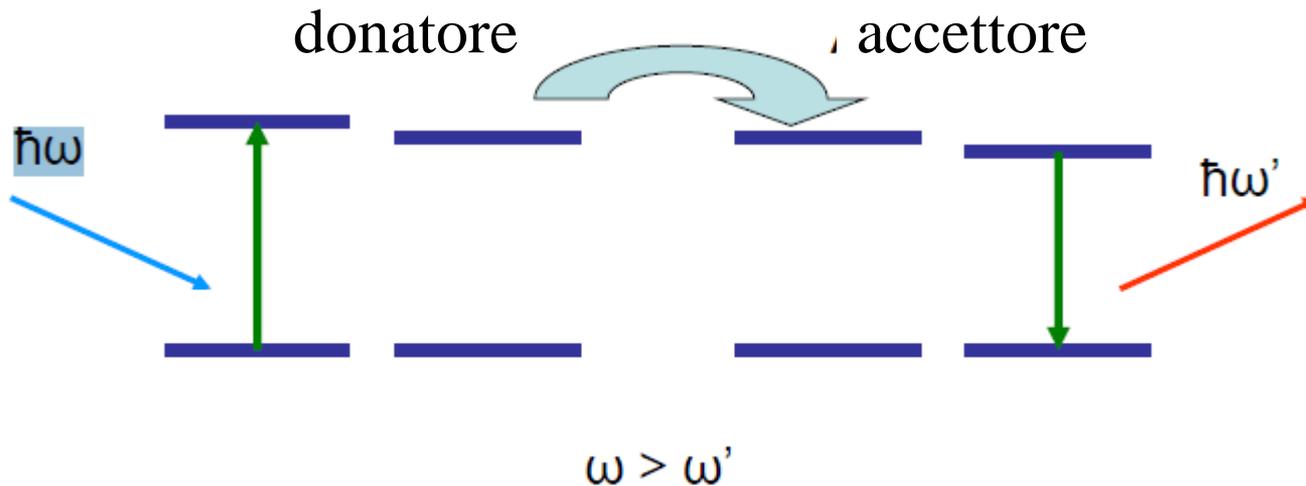
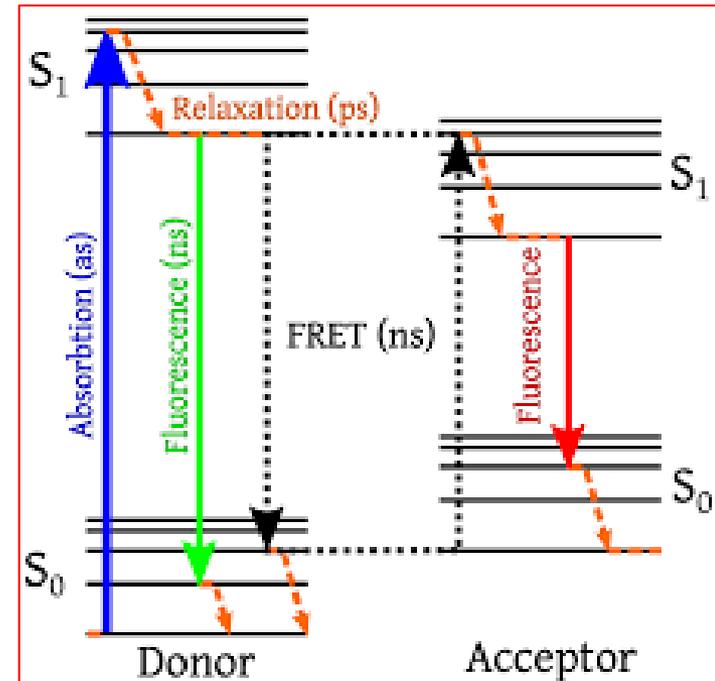


# Cosa E' il meccanismo del FRET

- Invece, il trasferimento di energia avviene attraverso un'interazione coulombiana tra i momenti di transizione (dipolare) del donatore e dell'accettore
- Nel caso di **accoppiamento**, la sovrapposizione di fluorescenza del donatore e l'assorbimento del accettore danno l'efficienza dell'effetto FRET.

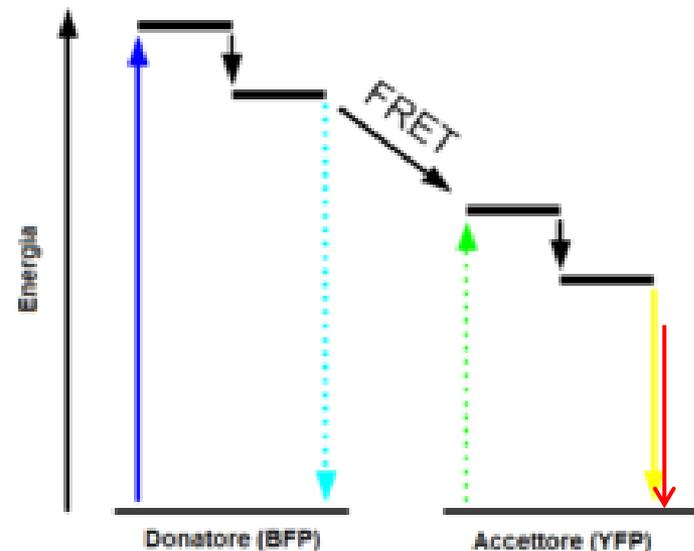
# Accoppiamento FRET

- Generalmente, si ha a che fare con un accoppiamento elettronico singoletto-singoletto tra gli stati del donatore e dell'accettore.



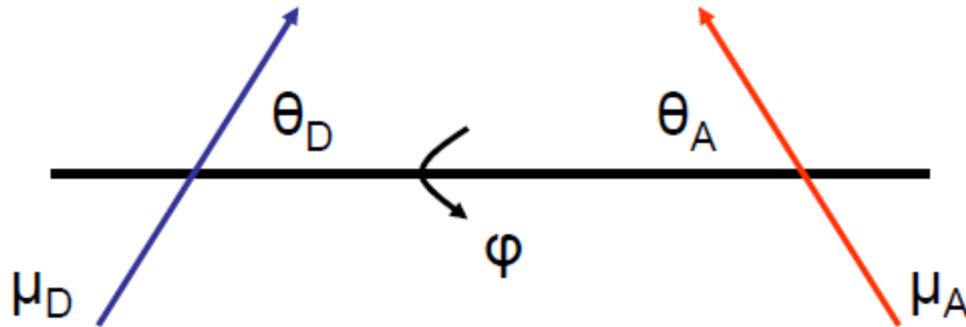
Il processo è schematizzato nell'immagine, che riassume i vari passaggi della FRET:

1. il donatore assorbe energia proveniente dall'onda luminosa e raggiunge uno stato eccitato (**linea blu continua**);
2. il donatore può emettere fluorescenza o emetterne in quantità ridotta (**linea azzurra tratteggiata**), trasferendo per risonanza il resto dell'energia associata alla discesa dallo stato eccitato (**linea nera**); più precisamente, quando l'accettore è sufficientemente vicino perché il trasferimento di energia abbia luogo, esso perturba la fluorescenza del donatore (fenomeno detto di “quenching”);
3. attraverso questo trasferimento di energia di origine non luminosa, l'accettore può assorbire (**linea verde tratteggiata**);
4. l'accettore produce fluorescenza (**linea rossa continua**).



# Accoppiamento FRET

- Approssimiamo questo accoppiamento coulombiano come accoppiamento dipolo-dipolo



dove  $\mu_A$  e  $\mu_D$  sono i momenti di dipolo di transizione del donatore e dell'accettore

$$\begin{aligned}
 V &= \frac{\vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A}{R^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_D \cdot \vec{R})(\vec{\mu}_A \cdot \vec{R})}{R^5} = \\
 &= k \frac{\mu_D \mu_A}{R^3} \\
 k &= \cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 k_{FRET} &\propto \left| \langle \psi_D \psi_{A^*} | V | \psi_{D^*} \psi_A \rangle \right|^2 = \frac{k^2}{R^6} \left| \langle \psi_D \psi_{A^*} | \mu_D \mu_A | \psi_{D^*} \psi_A \rangle \right|^2 = \\
 &= \frac{k^2}{R^6} \left| \langle \psi_D | \mu_D | \psi_{D^*} \rangle \right|^2 \left| \langle \psi_{A^*} | \mu_A | \psi_A \rangle \right|^2
 \end{aligned}$$

# FRET: Velocità di trasferimento

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \frac{\kappa^2 \Phi_D I}{n^4 R^6} \left( \frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N} \right)$$

$\tau_D$  = tempo di vita del donatore

$\kappa$  = fattore di orientamento dei momenti di dipolo

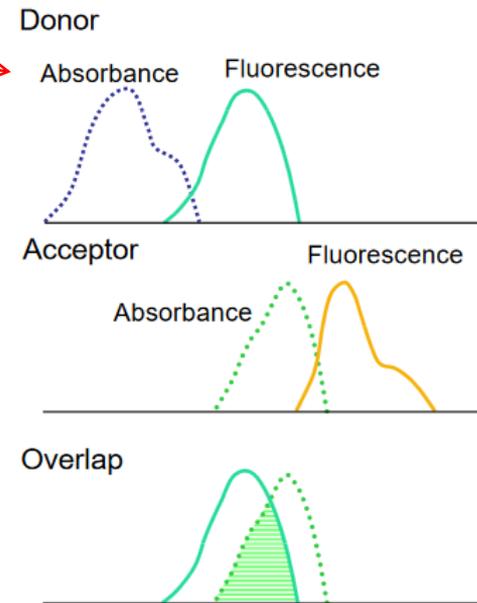
$\Phi_D$  = resa quantica di fluorescenza del donore in assenza del dell'acceptore

$I$  = sovrapposizione spettrale

$n$  = indice di rifrazione del mezzo

$R$  = separazione da centro a centro

$N$  = numero di Avogadro



# FRET: Efficienza di trasferimento

$$E = \frac{R^{-6}}{R^{-6} + R_0^{-6}} = \frac{1}{1 + \frac{R^6}{R_0^6}}$$

## Förster Radius ( $R_0$ )

The distance at which energy transfer is 50% efficient (i.e., 50% of excited donors are deactivated by FRET) is defined by the Förster radius ( $R_0$ ). The magnitude of  $R_0$  is dependent on the spectral properties of the donor and acceptor dyes

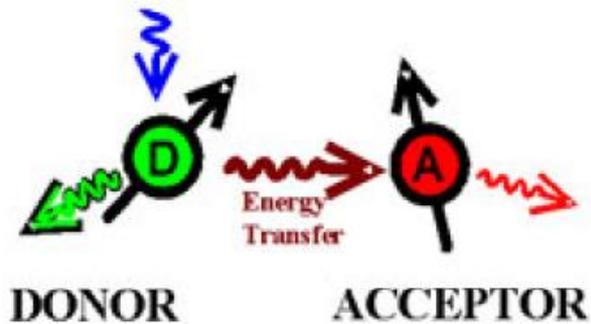
# FRET: Velocità di trasferimento

Scritto anche come:

$$k = \frac{\Phi_D}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

$$\text{dove } R_0 = \left( \frac{8.785 \times 10^{-25} I \kappa^2}{n^4} \right)^{1/6} \quad \begin{array}{l} \text{Distanza di} \\ \text{Förster} \end{array}$$

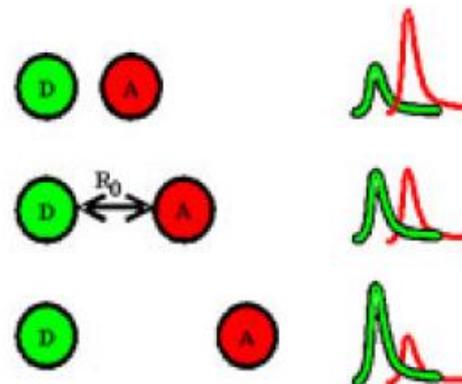
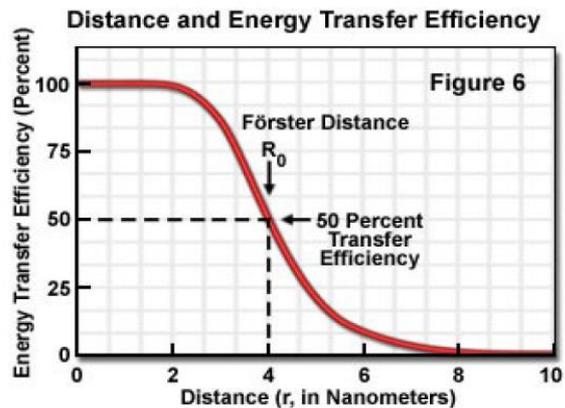
$R_0$  è la distanza a cui l'efficienza di trasferimento è del 50%



## Energy Transfer Efficiency

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

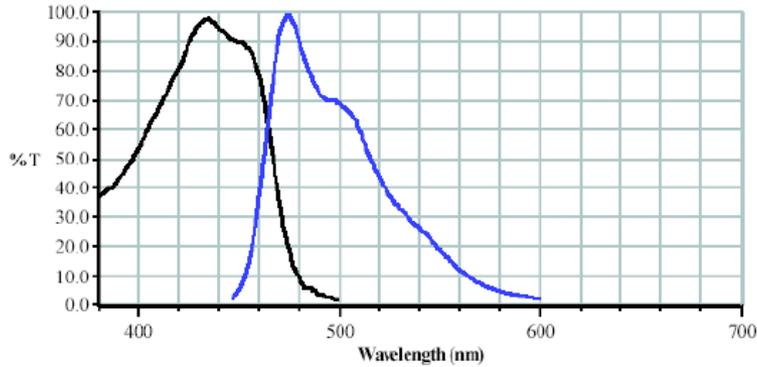
$R_0$  = 50% transfer efficiency distance  
3nm~7nm



## Förster Critical Distance for common RET Donor-Acceptor Pairs

Donor	Acceptor	Förster Distance (Nanometers)
Tryptophan	Dansyl	2.1
IAEDANS (1)	DDPM (2)	2.5 - 2.9
BFP	DsRFP	3.1 - 3.3
Dansyl	FITC	3.3 - 4.1
Dansyl	Octadecylrhodamine	4.3
CFP	GFP	4.7 - 4.9
CF (3)	Texas Red	5.1
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	4.9 - 5.5
Cy3	Cy5	>5.0
GFP	YFP	5.5 - 5.7
BODIPY FL (4)	BODIPY FL (4)	5.7
Rhodamine 6G	Malachite Green	6.1
FITC	Eosin Thiosemicarbazide	6.1 - 6.4
B-Phycoerythrin	Cy5	7.2
Cy5	Cy5.5	>8.0

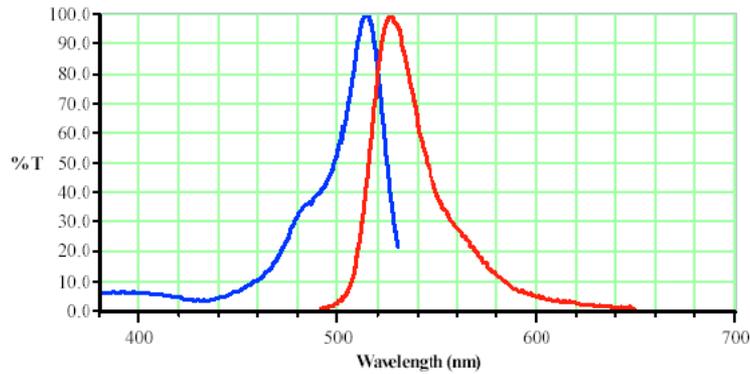
Figure 1



### Cyan Fluorescent Protein (CFP)

black graph = absorption  
blue graph = emission

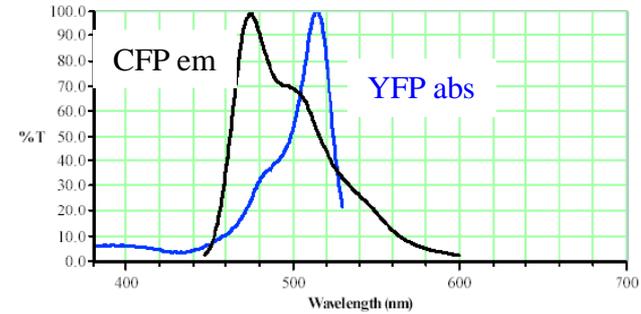
Figure 2



### Yellow Fluorescent Protein (YFP)

blue graph = absorption  
red graph = emission

Figure 3

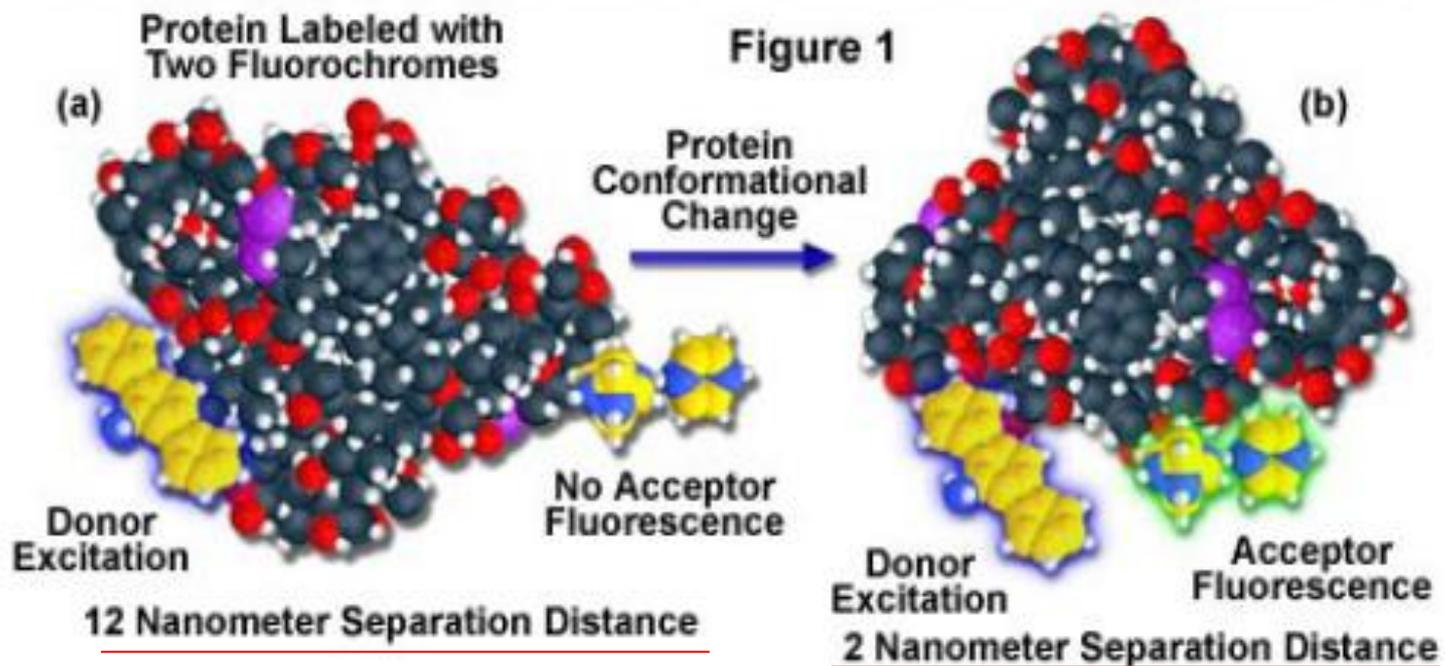


### CFP emission, YFP Absorption

black graph = cyan emission  
blue graph = yellow absorption

The emission curve (at least at the maxima) for the cyan protein almost completely overlaps with the absorption curve for the yellow protein, which is one of the prerequisites for FRET (Figure 3), and would seem to make the two molecules an excellent FRET pair.

## Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



# FRET Detection of *in vivo* Protein-Protein Interactions

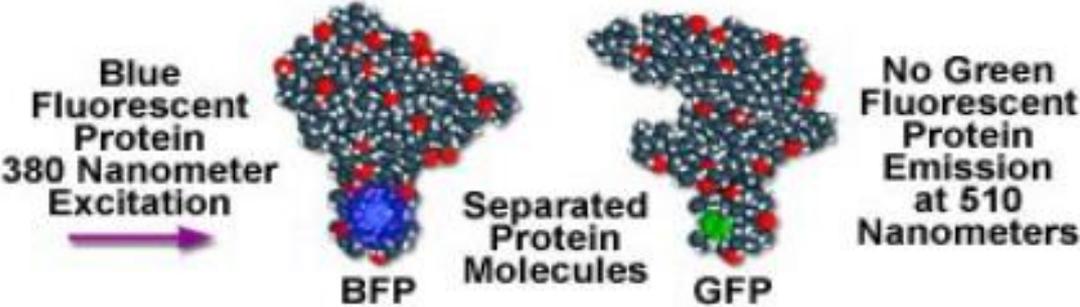
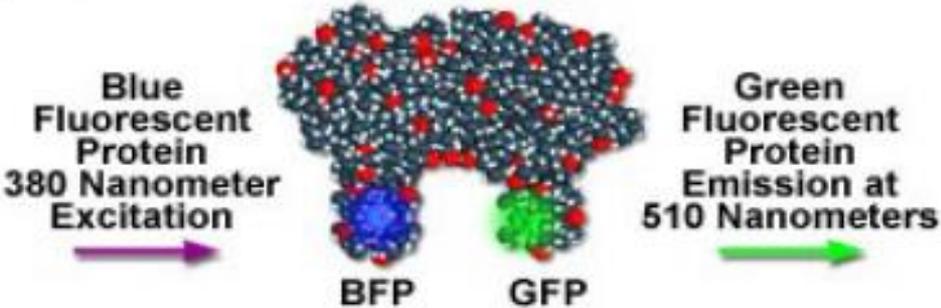


Figure 2 Intermolecular Association



# Requisiti per il FRET

Per fare una misura FRET, si ha bisogno di avere una coppia selezionata di coloranti fluorescenti che assicurino:

- Separazione degli spettri di assorbimento tra donatore ed accettore
- Grande sovrapposizione (>30%) tra la fluorescenza del donatore e l'assorbimento dell'accettore.
- Fluorescenze del donatore ed accettore relativamente efficienti.
- Separazione tra la fluorescenza del donatore e dell'accettore.

# Le proteine fluorescenti



• **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.

$$\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm e } 475 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$$

• 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.

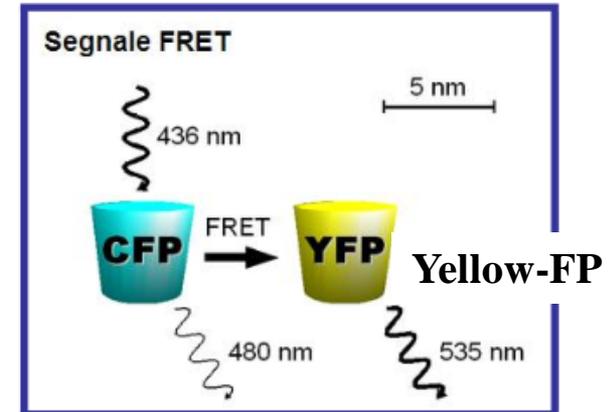
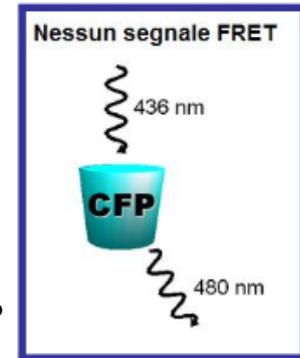
# Fluorescence Resonance Energy Transfer

*trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza*

Verso uno di questi due “fluorofori”, detto donatore, viene diretta un'onda luminosa ad una  $\lambda$  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.

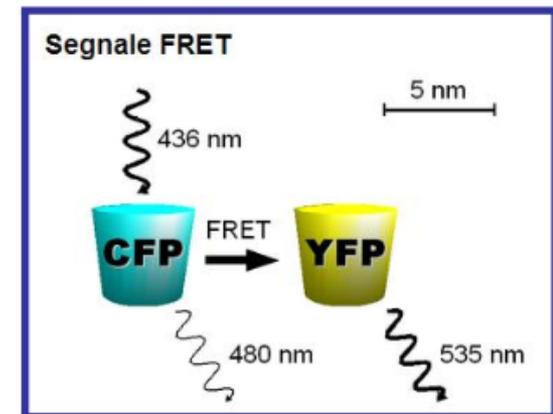
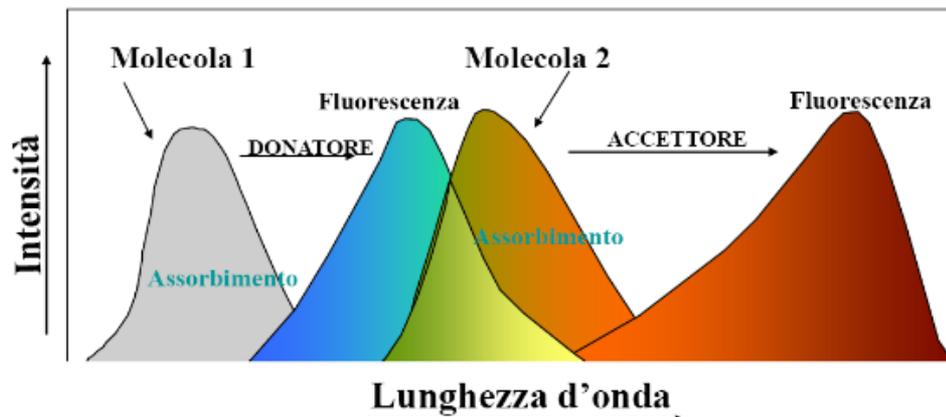
Cyan-FP



# 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 gialla) quindi si tratta di una buona coppia di molecole utilizzabili in FRET.

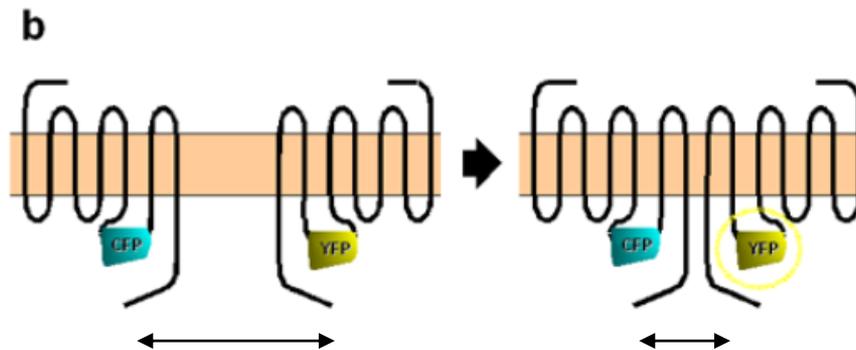




## Fluorescence Resonance Energy Transfer

*trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza*

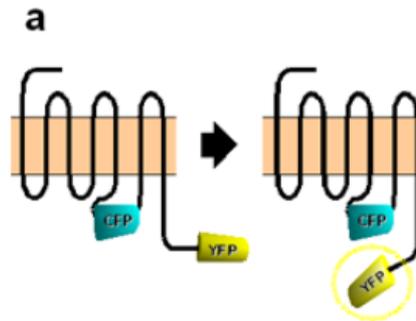
La FRET è uno strumento utile nella **quantificazione delle interazione tra macromolecole biologiche** (proteina-proteina, proteina-acido nucleico, proteina-lipide).



## 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

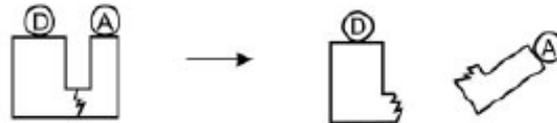


# FRET: applicazioni

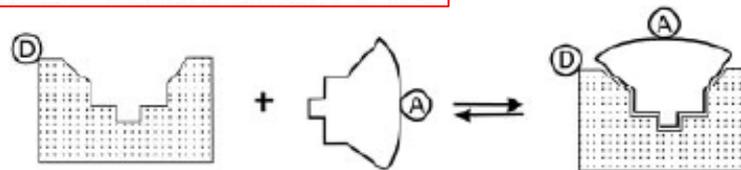
- CONFORMATIONAL CHANGES



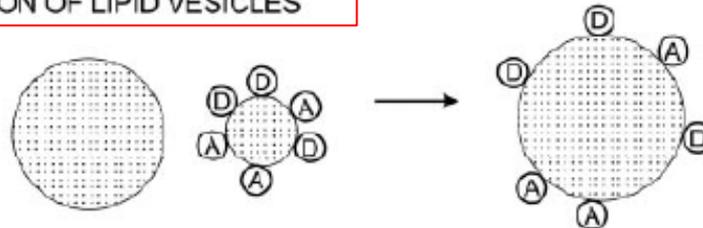
- HYDROLYSIS OF A SUBSTRATE



- INTERACTION LIGAND-RECEPTOR



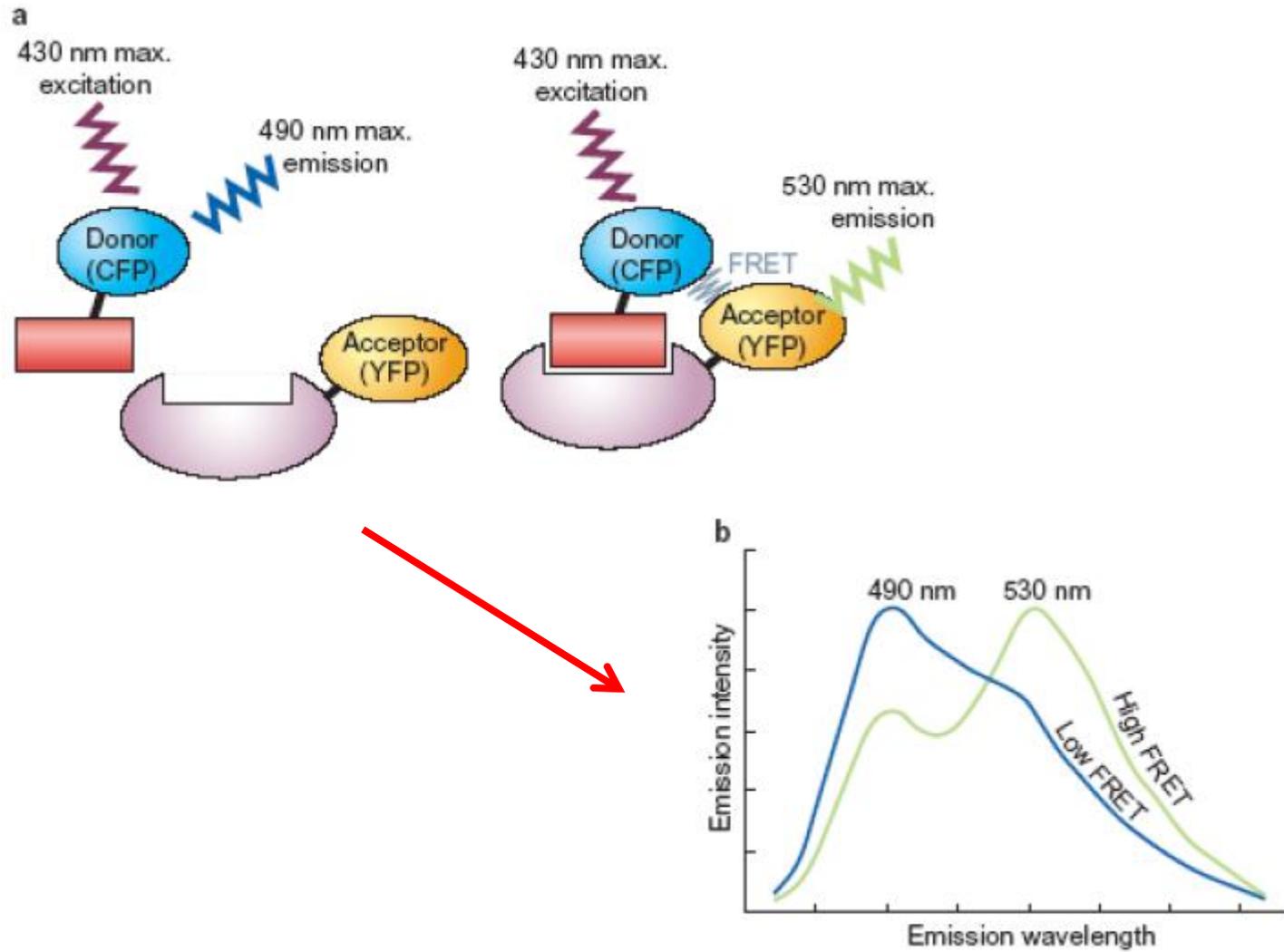
- FUSION OF LIPID VESICLES



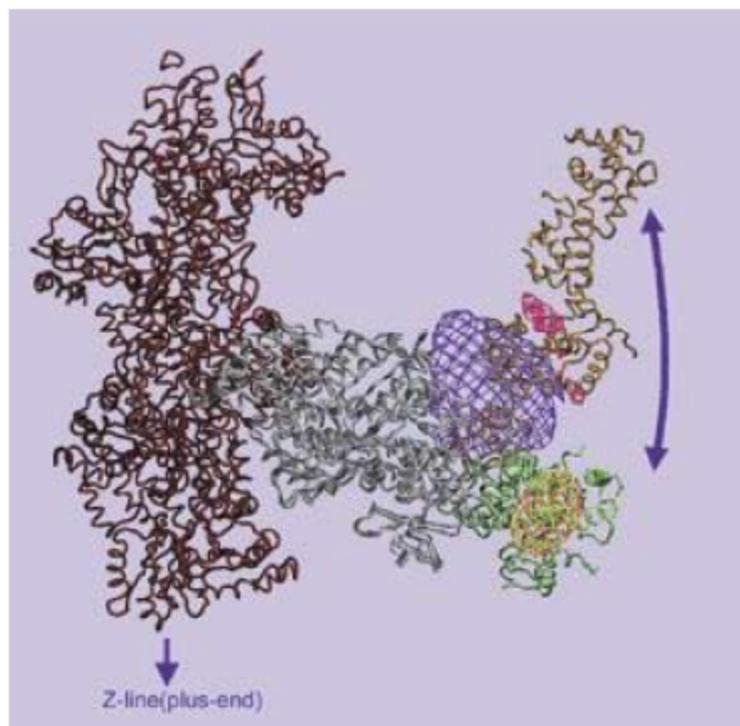
# Applicazioni del FRET

- Struttura e conformazione di proteine
- Distribuzione spaziale e assemblamento dei complessi proteici
  - Interazione recettore/legante
    - Immunoassays
  - Analisi delle interazioni delle singole molecole
    - Struttura e conformazione di acidi nucleici
    - Real-time PCR assays and SNP detection
- Rilevazione dell'ibridizzazione degli acidi nucleici
- Primer-extension assays for detecting mutations
  - Automated DNA sequencing
  - Distribuzione e trasporto dei lipidi
    - Membrane fusion assays

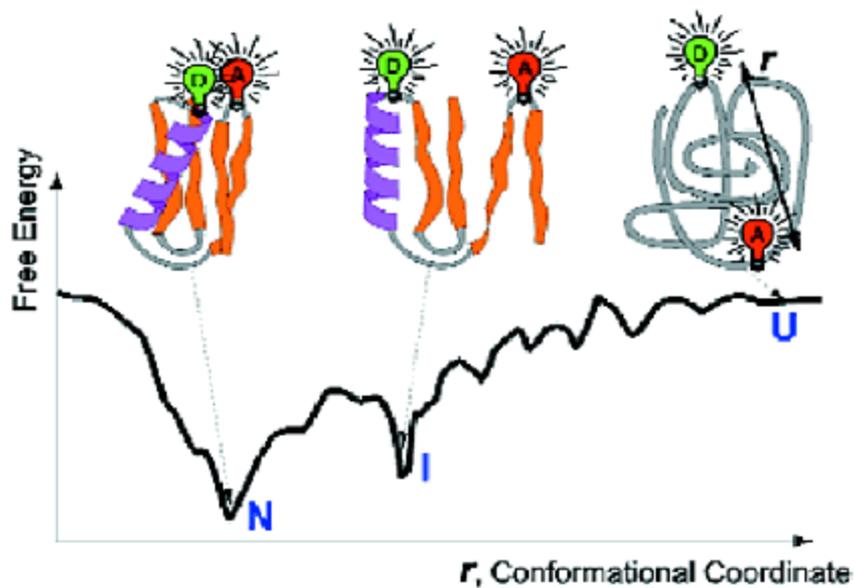
# Interazione recettore/legante



# FRET: applicazioni



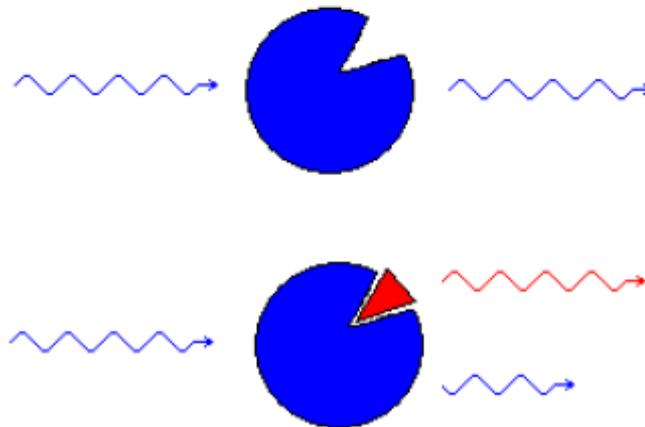
Struttura di macromolecole



# Realizzazione di biosensori

## « FRET Based Recognition Biosensor »

- Modified Biomolecule for Specificity



### Special Issue "FRET-Based Biosensors"

- [Special Issue Editors](#)
- [Special Issue Information](#)
- [Keywords](#)
- [Published Papers](#)

A special issue of *Biosensors* (ISSN 2079-6374).

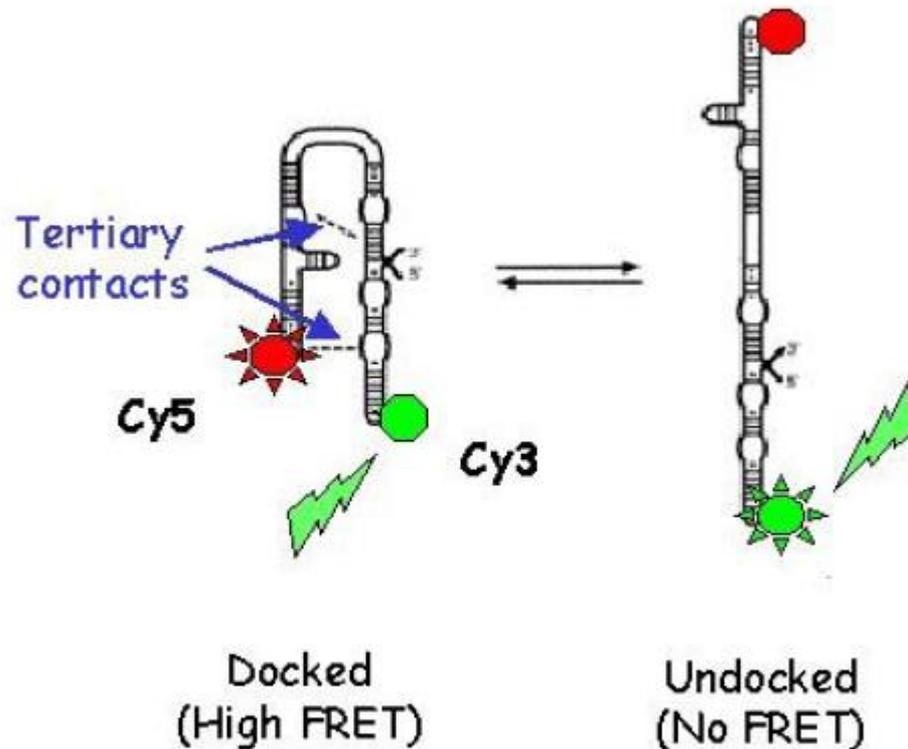
Deadline for manuscript submissions: **closed (1 December 2018)**

### Keywords

- FRET
- luminescence
- nanotechnology
- nanomaterials
- fluorescent probes
- diagnostics
- bioanalysis
- point-of-care
- imaging
- food safety
- environmental pollution

160-nucleotide P4-P6 domain of the Tetrahymena group I intron RNA

## P4-P6 Folding Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



**Mg<sup>2+</sup>-induced tertiary folding of pyrene-labeled P4-P6 domain.**

REPORT

## An early transition state for folding of the P4-P6 RNA domain

SCOTT K. SILVERMAN<sup>1,3</sup> and THOMAS R. CECH<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado at Boulder, Boulder, Colorado 80309-0215, USA

<sup>2</sup>Howard Hughes Medical Institute, University of Colorado at Boulder, Boulder, Colorado 80309-0215, USA

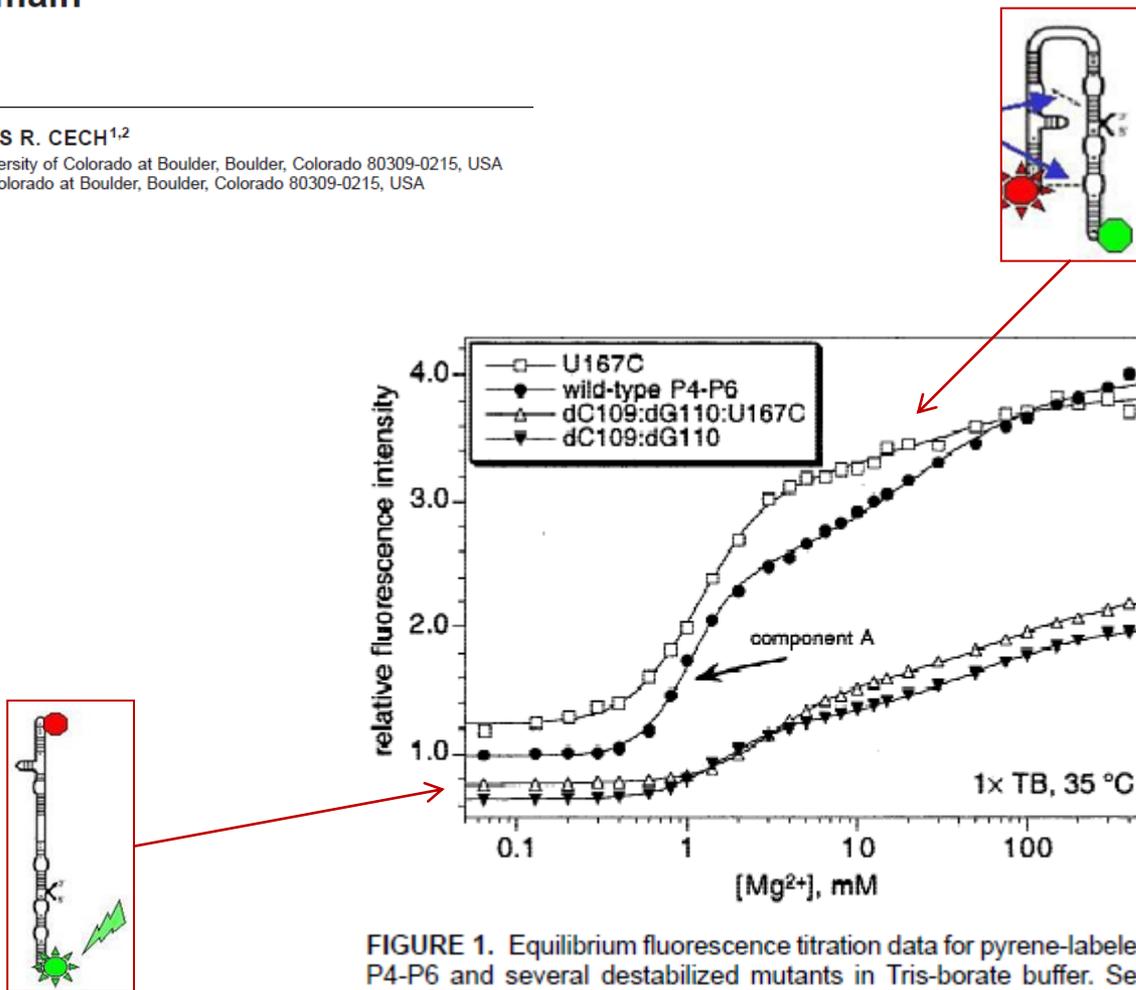


FIGURE 1. Equilibrium fluorescence titration data for pyrene-labeled P4-P6 and several destabilized mutants in Tris-borate buffer. See

# FRET: vantaggi

(rispetto ad altre tecniche strutturali, più potenti, come la cristallografia a raggi X o l'NMR)

- Strumentazione semplice ed economica.
- Elevata sensibilità (è richiesto poco campione).
- Esperimenti in soluzione, in condizioni fisiologiche.
- Possibilità di effettuare misure in vivo.
- Ampio intervallo di distanze misurabili.
- Risoluzione temporale nell'ordine dei nanosecondi.