

Tecniche spettroscopiche

Al termine della lezione lo studente dovrà essere in grado di:

- ❖ **Descrivere le proprietà fondamentali della radiazione elettromagnetica** (lunghezza d'onda, frequenza, energia) e le relazioni che le legano.
- ❖ **Enunciare e applicare la Legge di Lambert-Beer** per calcolare la concentrazione di una soluzione a partire dall'assorbanza misurata.
- ❖ **Distinguere le tre principali tecniche spettroscopiche in biochimica:** spettroscopia UV-Vis, fluorescenza e infrarosso.
- ❖ **Identificare i principali cromofori biologici** (amminoacidi aromatici, basi azotate, gruppi prostetici) e le rispettive lunghezze d'onda di assorbimento.
- ❖ **Spiegare il meccanismo fisico della fluorescenza**, il principio di Franck-Condon e lo Stokes shift.
- ❖ **Illustrare il principio e le applicazioni del FRET** (Fluorescence Resonance Energy Transfer) in biologia molecolare.
- ❖ **Riconoscere i fattori che influenzano l'intensità di fluorescenza** (solvente, pH, temperatura, smorzamento).

RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

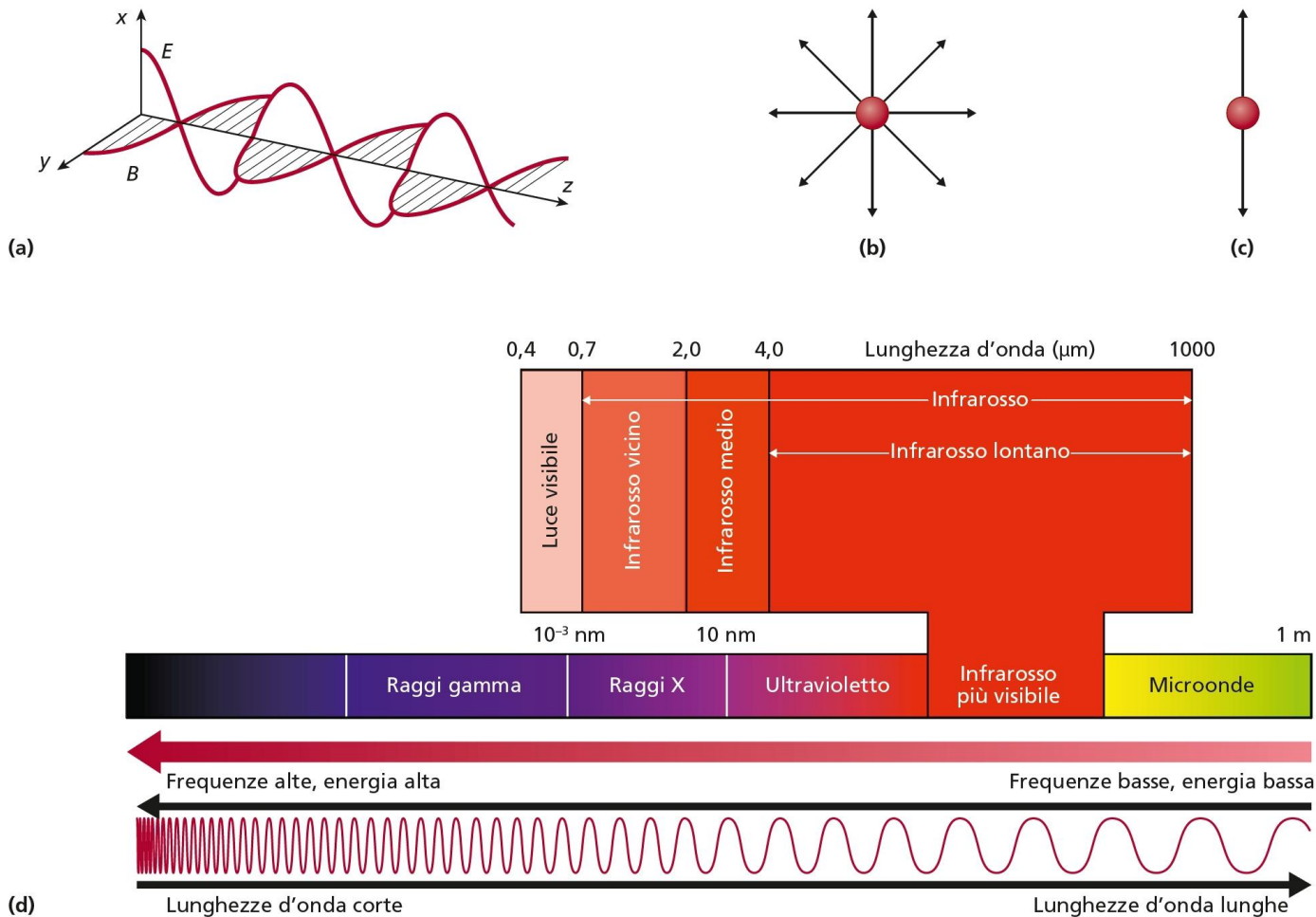


Figura 6.1

(a) Radiazione elettromagnetica, composta da onde magnetiche (B) e onde elettriche (E) che oscillano con orientamento perpendicolare le une rispetto alle altre. (b) Quando si guarda solamente al vettore elettrico lungo la direzione di propagazione z , si vedono le varie direzioni della radiazione non polarizzata. (c) Quando la luce è polarizzata oscilla solamente lungo un piano. (d) Regioni della radiazione elettromagnetica.

Una radiazione elettromagnetica è caratterizzata da:

- Una lunghezza d'onda (λ) che è la distanza fra due creste e si misura in nanometri (nm);
- Una frequenza (ν) che è posta in relazione a λ attraverso la velocità di propagazione (c);
- Un'energia (E) che si ricava attraverso:

$$\nu = c/\lambda$$

$$E = h\nu$$

$h =$ costante di Planck ($h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J s}$)

La spettroscopia è lo studio delle interazioni della radiazione elettromagnetica con la materia.

Per campioni di tipo biologico, in funzione dell'energia della radiazione e del tipo di interazione, si possono ottenere spettri di diverso tipo che forniscono diverse informazioni di carattere fisico e/o chimico sul campione da analizzare.



Informazioni sulla struttura della materia, sul microambiente che lo circonda e sulla loro dinamica molecolare

Le molecole sono soggette a moti Browniani che ne permettono la rotazione e la diffusione delle molecole in soluzione; L'energia termica (causa di moti vibrazionali) è strettamente legata alle proprietà dinamiche delle molecole.

Esistono diverse tecniche spettroscopiche in biochimica:

- **Spettroscopia di assorbimento della radiazione nell'ultravioletto e nel visibile;**
- **Fluorescenza;**
- **Spettroscopia di assorbimento dell'infrarosso.**

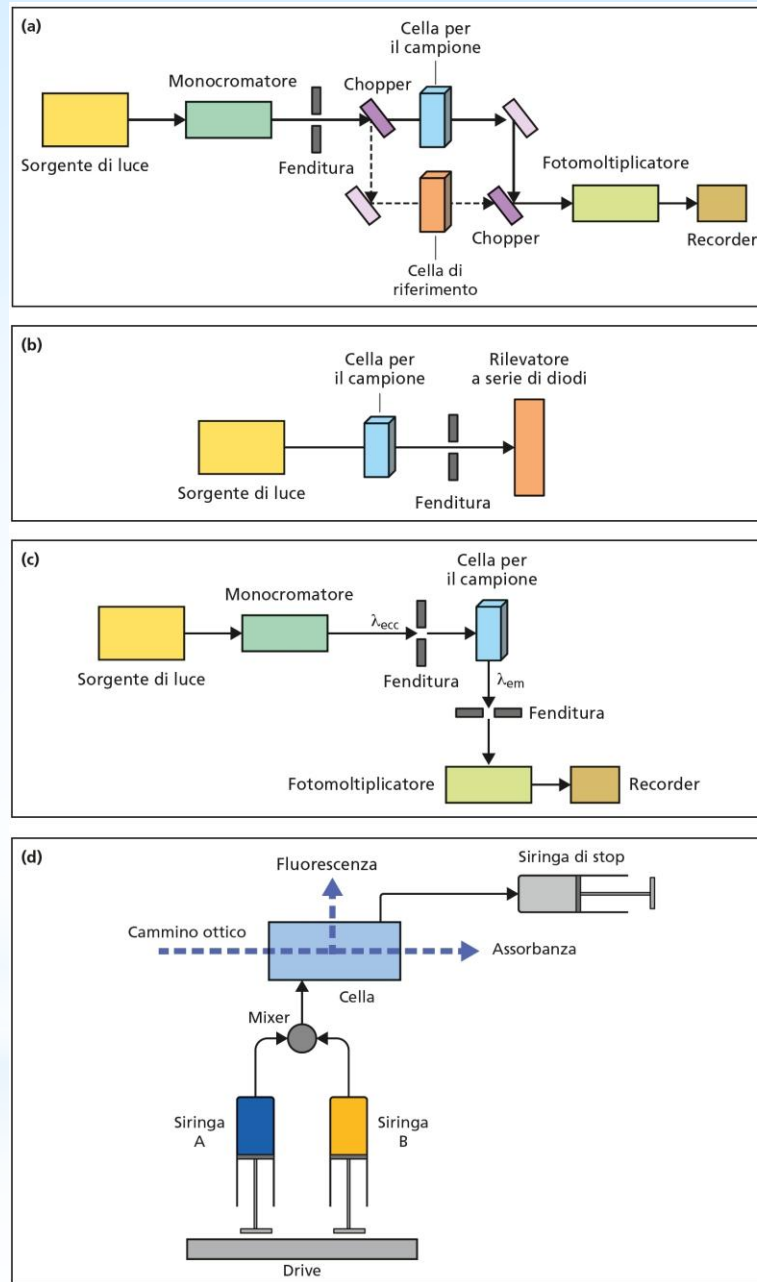
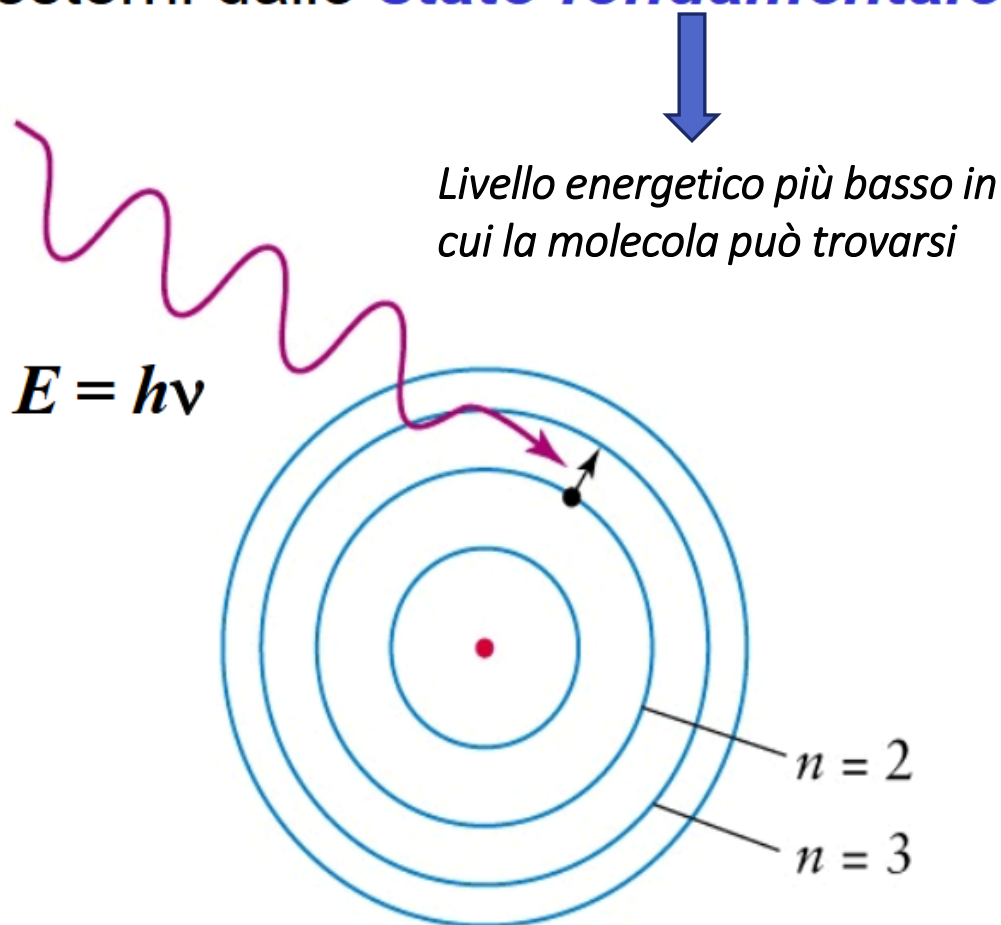


Figura 6.2
Schemi generali di configurazione dei seguenti strumenti di misura: (a) spettrofotometro a doppio raggio per spettroscopia di assorbimento; a seconda della sorgente, permette di effettuare misure nell'UV, nel visibile o nell'infrarosso; (b) spettrofotometro con rivelatore a serie di diodi; (c) spettrofluorimetro; (d) strumento per misure di stopped flow con rivelatore di assorbanza o fluorescenza.

Assorbimento di radiazione

Un fotone che incontra una molecola può essere assorbito provocando la “promozione” di uno degli elettroni più esterni dallo **stato fondamentale** ad uno **stato eccitato**.

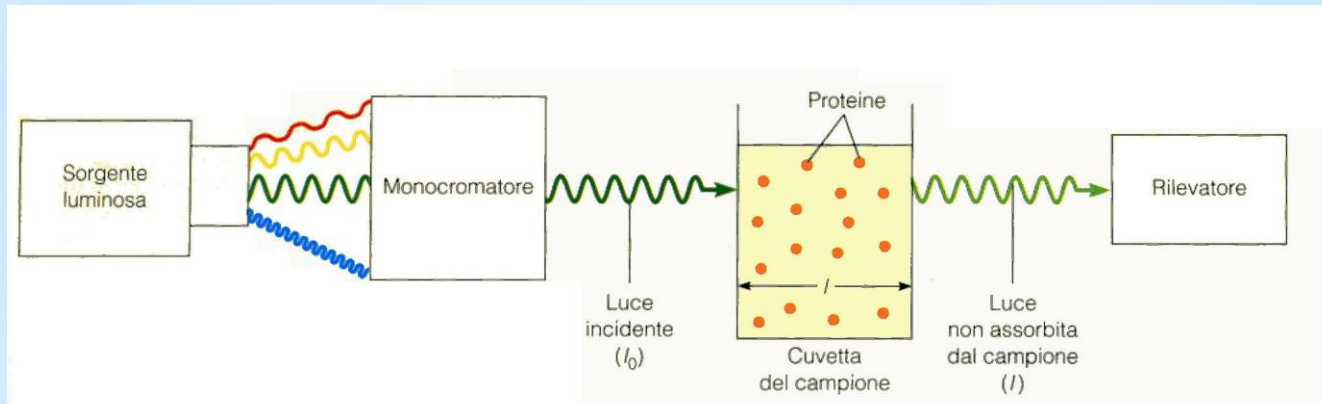


Livello energetico superiore a quello fondamentale



Perché un fotone sia assorbito occorre che la sua energia sia **esattamente** uguale alla differenza tra stato eccitato e stato fondamentale.

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO DELLA RADIAZIONE NELL'ULTRAVIOLETTO E NEL VISIBILE



Legge di Lambert-Beer:

$$\log_{10} (I_0/I_t) = \epsilon_{\lambda} [X] l$$

$$A_{\lambda} \text{ (Assorbanza)} = \epsilon_{\lambda} [X] l \quad \longrightarrow \quad [X] = A_{\lambda} / \epsilon_{\lambda} l$$

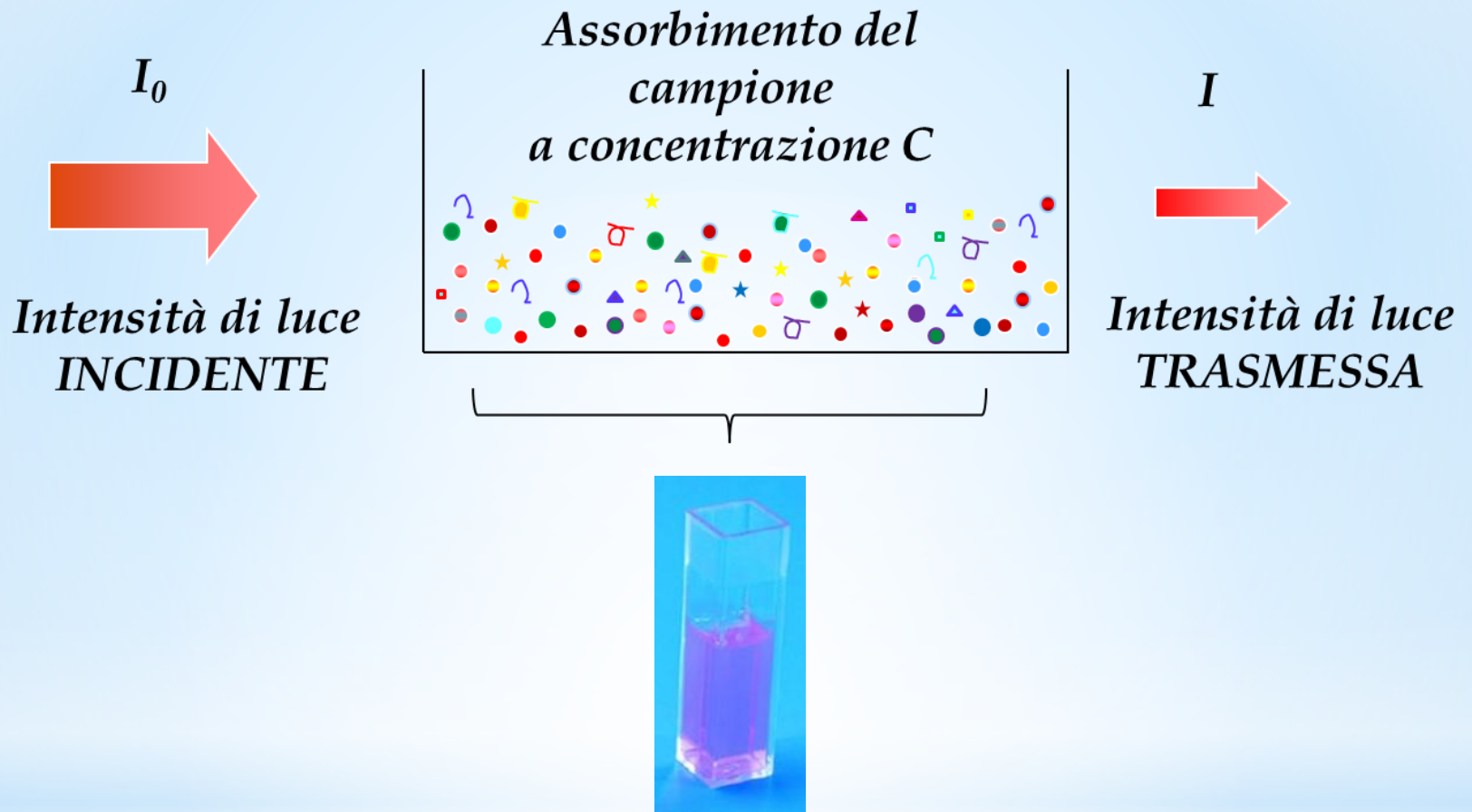
I_0 = Intensità della radiazione incidente;

I_t = intensità della radiazione trasmessa dal cromoforo e quindi (I_0/I_t) è l'intensità della radiazione assorbita;

ϵ = coefficiente di estinzione (coefficiente di assorbimento caratteristico del campione ad una particolare lunghezza d'onda in una serie definita di condizioni $[X]$; e molare ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$))

$\epsilon^{0.1\%}$ assorbanza allo 0.1% di proteina in soluzione (mg/ml);

l = cammino ottico (di solito 1 cm), ossia la lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione

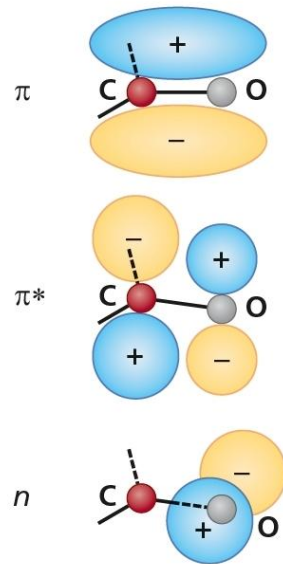


Maggiore è la quantità di molecole che la luce incontra, maggiore è l'assorbimento, minore è l'intensità di luce trasmessa.

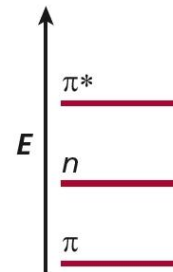
L'assorbimento di una radiazione è un processo praticamente istantaneo che avviene in tempi dell'ordine dei femtosecondi (10^{-15} s)

Figura 6.3

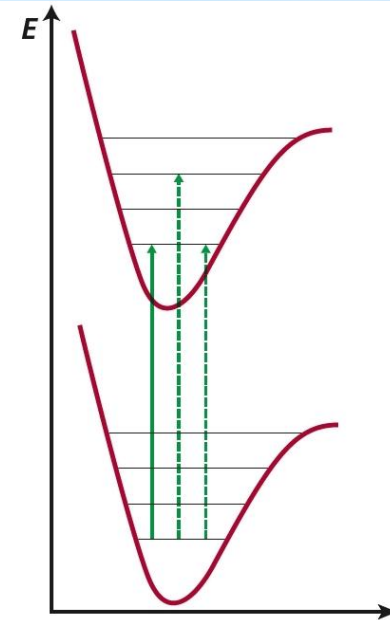
(a) Orbitali molecolari π , π^* e n del gruppo C=O; (b) energie relative alla base del fenomeno di assorbimento della radiazione elettromagnetica; (c) curve di Morse, che illustrano gli stati vibrazionali dello stato fondamentale e dello stato eccitato. Le linee verticali rappresentano le transizioni elettroniche tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato, le quali incontrano diversi livelli vibrazionali.



(a)



(b)



(c)

Principio Franck-Condon:

I nuclei rimangono fermi durante il tempo necessario per una transizione elettronica

CAMPIONI BIOLOGICI

I diversi tipi di orbitali molecolari danno origine a più tipi di transizione caratterizzati da differenti energie e quindi da diverse frequenze e lunghezze d'onda. Pertanto le biomolecole possono essere distinte in tre categorie principali:

- **I legami peptidici e gli amminoacidi**
- **Le base puriniche e pirimidiniche degli acidi nucleici**
- **I sistemi coniugati quali le porfirine.**

Tabella 6.1 Lunghezza d'onda del massimo di assorbimento (λ_{max}) e valori di coefficiente di estinzione molare (ϵ_{max}) di alcune molecole di interesse biochimico. I valori di alcuni di esse variano a seconda dello stato di ossidazione o di legame a proteine.

Molecola	λ_{max} (nm)	ϵ a λ_{max} ($\cdot 10^{-3}$) ($M^{-1} cm^{-1}$)
Amminoacidi		
Triptofano	280	5,6
	219	47,0
Tirosina	274	1,4
	222	8,0
	193	48,0
Fenilalanina	257	0,2
	206	9,3
	188	60,0
Istidina	211	5,9
Cisteina	250	0,3
Purine, pirimidine e loro derivati		
Adenina	260,5	13,4
Adenosina	259,5	14,9
Guanina	275	8,1
Guanosina	276	9,0
Citosina	267	6,1
Citidina	271	9,1
Uracile	259,5	8,2
Uridina	261,1	10,1
Timina	264,5	7,9
Timidina	267	9,7
DNA	258	6,6
RNA	258	7,4
Gruppi prostetici e cofattori		
NADH	340	6,23
	259	14,4
NAD ⁺	260	18
FMN	450	12,2
FAD	450	11,3
Eme	413	117

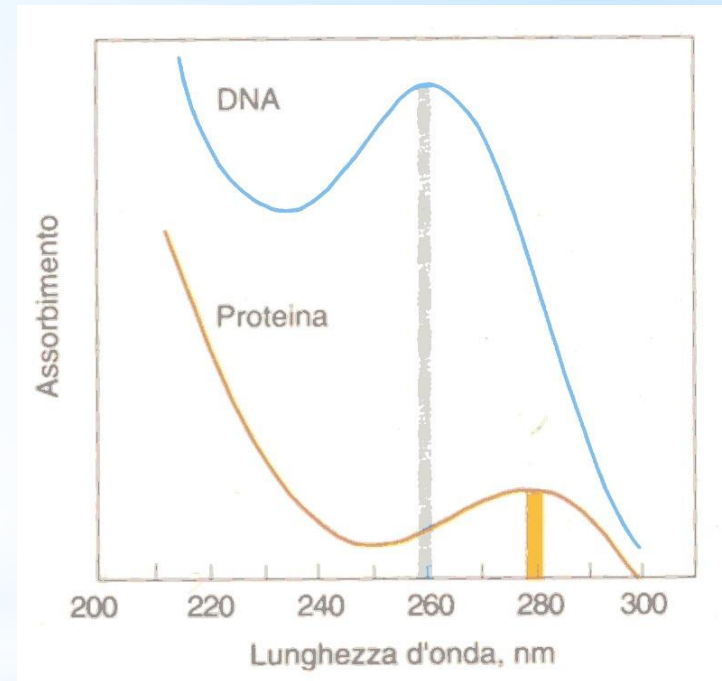
Ogni proteina ha un ϵ differente

CAMPIONI BIOLOGICI

Regione UV :

determinazione della **concentrazione** di proteine e acidi nucleici

- **Assorbimento delle proteine** dovuto alle catene laterali degli aa aromatici (regione 270-290 nm) (Tryptofano, tirosina, fenilalanina)
- **Assorbimento del DNA** (intorno a 260 nm) dovuto alle basi azotate



APPLICAZIONI

• STUDIO DI METALLOPROTEINE:

Alcune proteine contengono **gruppi cromofori** (Es. l'eme nell'emoglobina)
L'assorbimento nella regione visibile in questo caso può essere sfruttato per analizzare cambiamenti nella molecola all'intorno al cromoforo. Nel caso di Hb il grado di ossigenazione.

• CINETICA ENZIMATICA:

nel caso in cui substrato o prodotto di una **reazione enzimatica** assorbano luce in una regione dello spettro in cui non assorbono altri substrati o prodotti, la **cinetica di reazione** può essere seguita tramite spettrofotometria

• COLORIMETRIA:

Composti biochimici privi di colore possono essere convertiti in composti colorati da **reazioni cromogene**
(**Metodi colorimetrici** per la determinazione della concentrazione delle **proteine** - biureto, Lowry, **Bradford**)

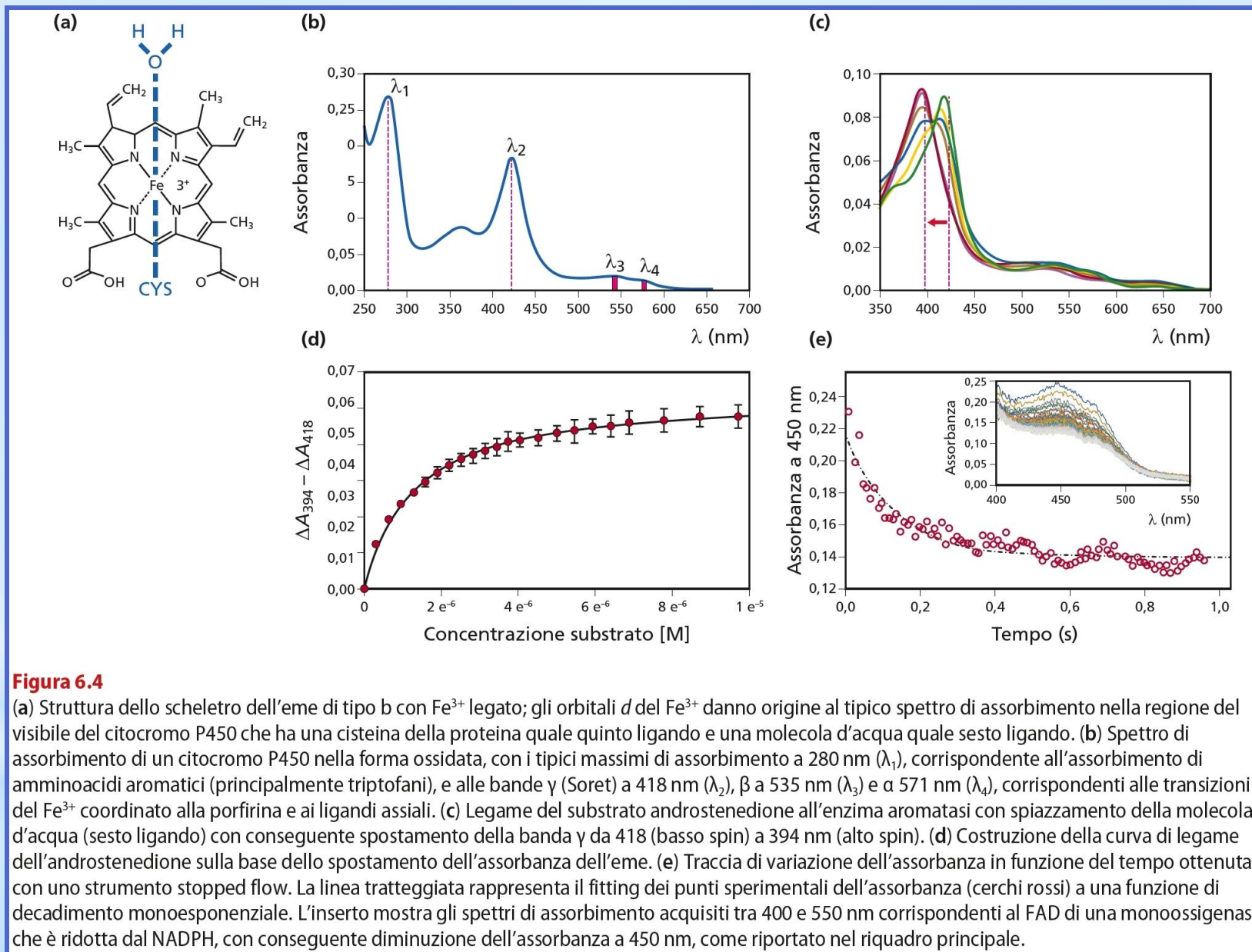


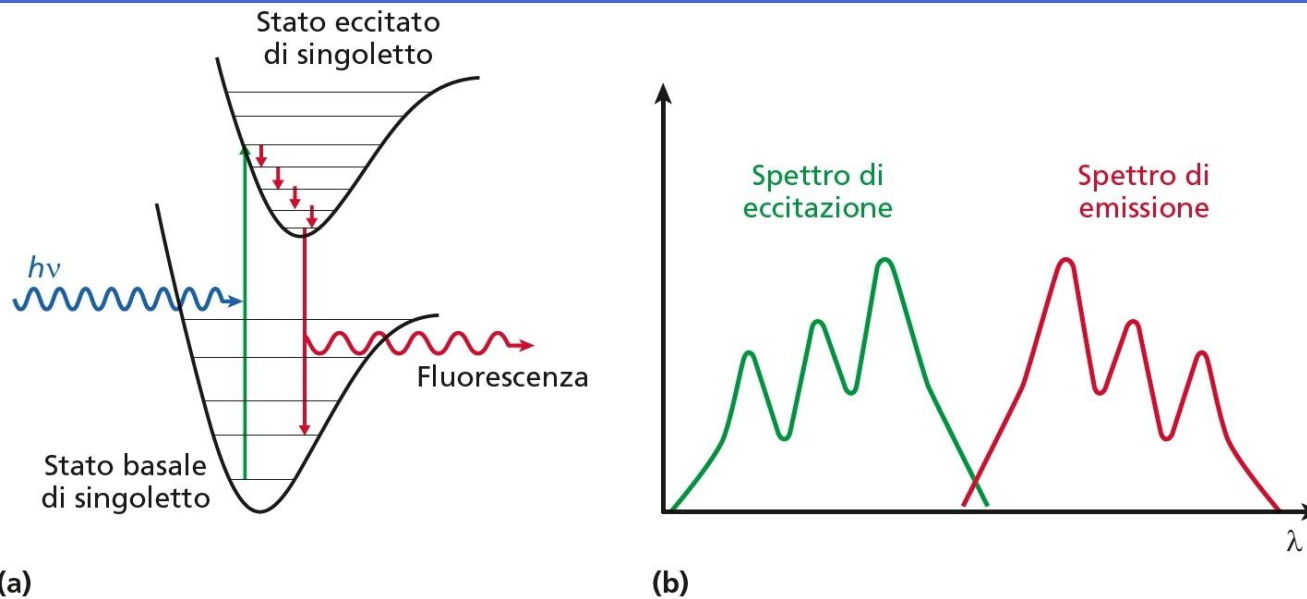
Figura 6.4

(a) Struttura dello scheletro dell'eme di tipo b con Fe^{3+} legato; gli orbitali d del Fe^{3+} danno origine al tipico spettro di assorbimento nella regione del visibile del citocromo P450 che ha una cisteina della proteina quale quinto ligando e una molecola d'acqua quale sesto ligando. (b) Spettro di assorbimento di un citocromo P450 nella forma ossidata, con i tipici massimi di assorbimento a 280 nm (λ_1), corrispondente all'assorbimento di aminoacidi aromatici (principalmente triptofani), e alle bande γ (Soret) a 418 nm (λ_2), β a 535 nm (λ_3) e α 571 nm (λ_4), corrispondenti alle transizioni del Fe^{3+} coordinato alla porfirina e ai ligandi assiali. (c) Legame del substrato androstenedione all'enzima aromatasi con spiazzamento della molecola d'acqua (sesto ligando) con conseguente spostamento della banda γ da 418 (basso spin) a 394 nm (alto spin). (d) Costruzione della curva di legame dell'androstenedione sulla base dello spostamento dell'assorbanza dell'eme. (e) Traccia di variazione dell'assorbanza in funzione del tempo ottenuta con uno strumento stopped flow. La linea tratteggiata rappresenta il fitting dei punti sperimentali dell'assorbanza (cerchi rossi) a una funzione di decadimento monoesponenziale. L'inserito mostra gli spettri di assorbimento acquisiti tra 400 e 550 nm corrispondenti al FAD di una monoossigenasi che è ridotta dal NADPH, con conseguente diminuzione dell'assorbanza a 450 nm, come riportato nel riquadro principale.

FLUORESCENZA

Figura 6.5

(a) Fenomeno dell'assorbimento e dell'emissione di fluorescenza secondo i diagrammi di Morse; (b) spettro di assorbimento e di emissione di un fluoroforo.



Fluorescenza: emissione di radiazione, di solito ad una lunghezza d'onda maggiore di quella di eccitazione (Stokes shift).

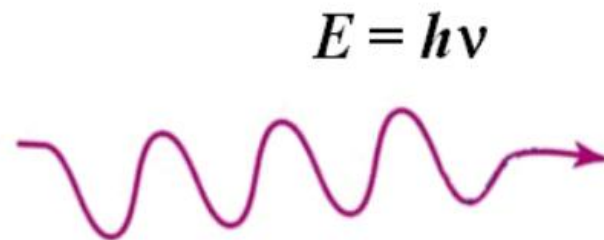
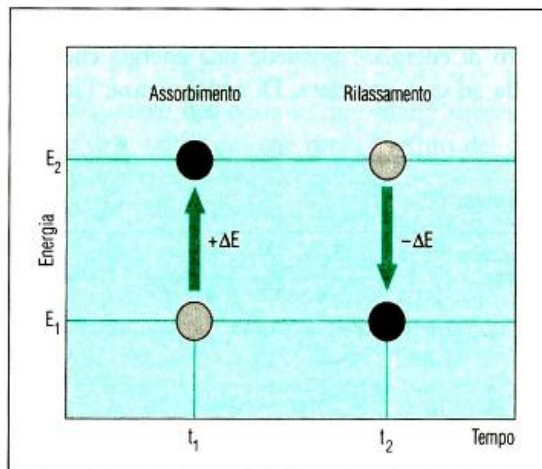
PRINCIPI DELLA FLUORESCENZA

- Se l'energia acquisita viene in parte riemessa come radiazione elettromagnetica si ha il fenomeno della fluorescenza. Cioè, il ritorno di un elettrone dallo stato eccitato allo stato fondamentale si accompagna all'emissione di un fotone.
- Poiché si perde energia nelle transizioni senza radiazioni che sempre si accompagnano alla transizione fluorescente, l'energia del fotone emesso è sempre minore dell'energia del fotone assorbito, cioè la lunghezza d'onda della luce fluorescente è sempre maggiore della lunghezza d'onda della luce eccitante.



Figura 7.10

Assorbimento ed emissione di energia da parte della materia. All'istante t_1 , l'atomo o la molecola nel suo stato fondamentale (livello di energia E_1) assorbe una quantità di energia $\Delta E (= E_2 - E_1)$ e passa in uno stato eccitato (livello di energia E_2). Subito dopo avviene un processo di rilassamento: all'istante t_2 la particella emette l'energia appena acquistata e ritorna al livello di partenza.



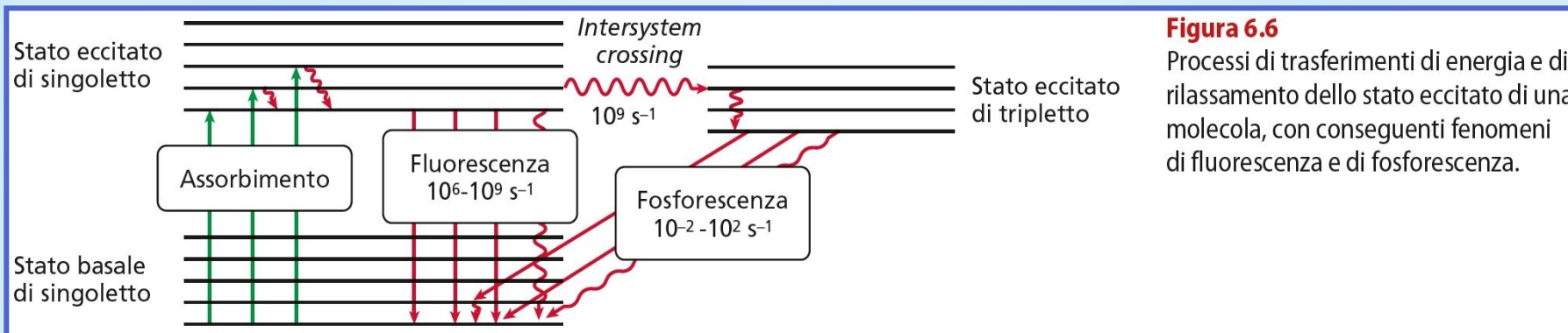


Figura 6.6
Processi di trasferimenti di energia e di rilassamento dello stato eccitato di una molecola, con conseguenti fenomeni di fluorescenza e di fosforescenza.

$$\Phi_f = \text{resa quantica} = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}}$$

$$0 \leq \Phi \leq 1$$

• τ_f tempo di vita (tempo di rilassamento) =

$$1/\tau_f = 10^4 \epsilon_{\text{max}}$$

Il tempo di vita è la misura di quanto a lungo una molecola esiste in un particolare stato

▪ La frazione delle molecole eccitate che vengono riportate allo stato fondamentale grazie alla fluorescenza è definita come **RESA QUANTICA**

• **L'INTENSITA' DI FLUORESCENZA (F_λ)** è:

$$F_\lambda = I_A \phi_F$$

per cui $F_\lambda = A \phi_F$

I_A = popolazione iniziale nello stato eccitato

Spettroscopia di Fluorescenza

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

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

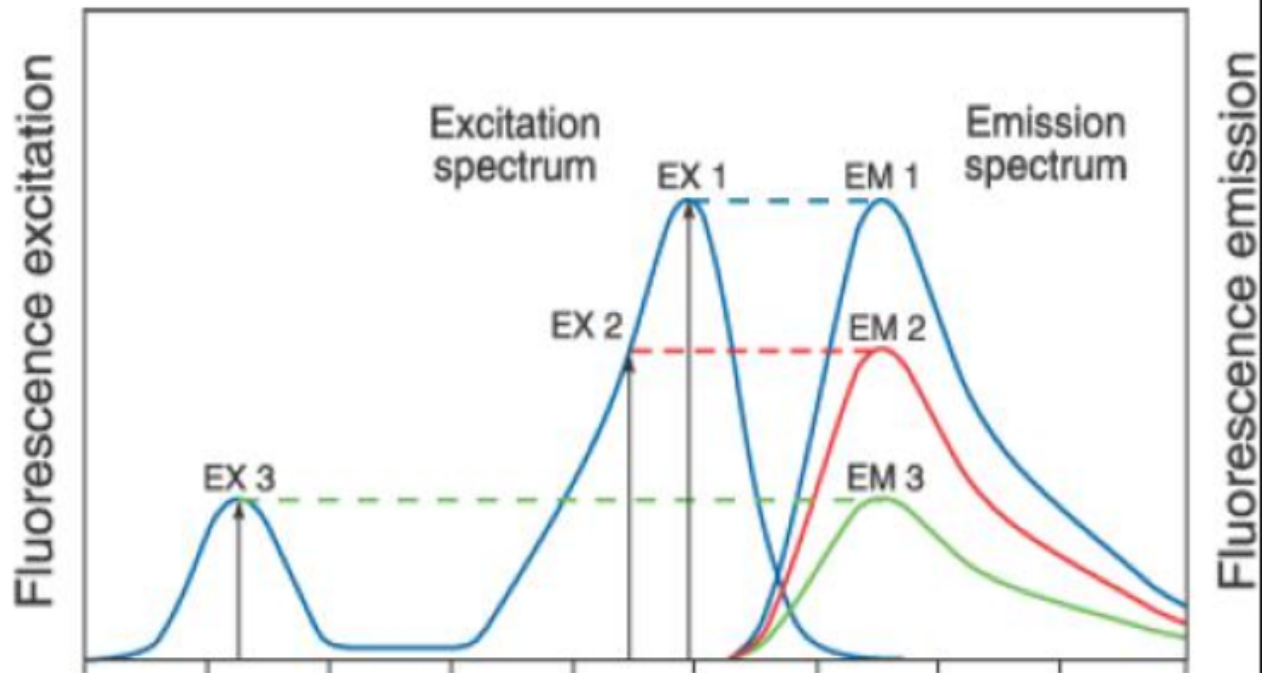
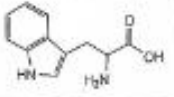
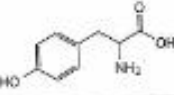
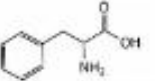
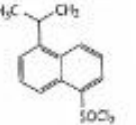
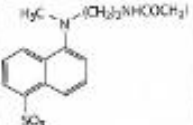
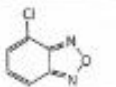
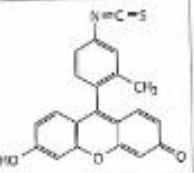
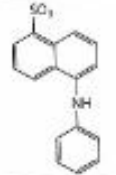


Tabella 6.2 Struttura e proprietà di alcuni fluorofori intrinseci ed estrinseci comunemente usati nello studio delle biomolecole.

Struttura	Assorbimento		Fluorescenza			Sensibilità $\epsilon_{max} \Phi_f$ (10^4)	
	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} (10^4)	λ_{max} (nm)	Φ_f	τ_f (ns)		
Fluorofori intrinseci							
Triptofano 	280	5,6	348	0,20	2,6	11,20	
Tirosina 	274	1,4	303	0,10	3,6	1,40	
Fenilalanina 	257	0,2	262	0,04	6,4	0,08	
Fluorofori estrinseci							
Cloruro di dansile 	330	3,4	510	0,10	13	3,40	
1,5-I-AEDANS 	360	6,6	480	0,50	15	34,0	
7-Cloro-4-nitrobenzo- 2-oxa-1,3-diazolo 	345	9,5	-	1	-	-	
Fluoresceina isotiocianato 	495	42	516	0,30	4,0	1,16	
8-Anilino-1-naftalene sulfonato 	374	6,0	454	0,98	16	67	

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.

FATTORI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

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

1. **EMISSIONE DI FLUORESCENZA**



2. **CONVERSIONE INTERNA**



3. **CONVERSIONE INTERSISTEMA**



4. **SMORZAMENTO PER COLLISIONI**



FATTORI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

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

4. SMORZAMENTO PER COLLISIONI



* L'O₂ inibisce anche la fosforescenza. Ciò spiega perché, mentre è facile osservare la fosforescenza dei solidi a T ambiente, è spesso impossibile osservare la fosforescenza delle soluzioni: le molecole di O₂, assorbendo energia per collisione con le specie eccitate, smorzano la loro fosforescenza. Per evitare questo le soluzioni vengono raffreddate in azoto liquido (77°K) e fatte congelare.

VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

Tipo di transizione

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

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

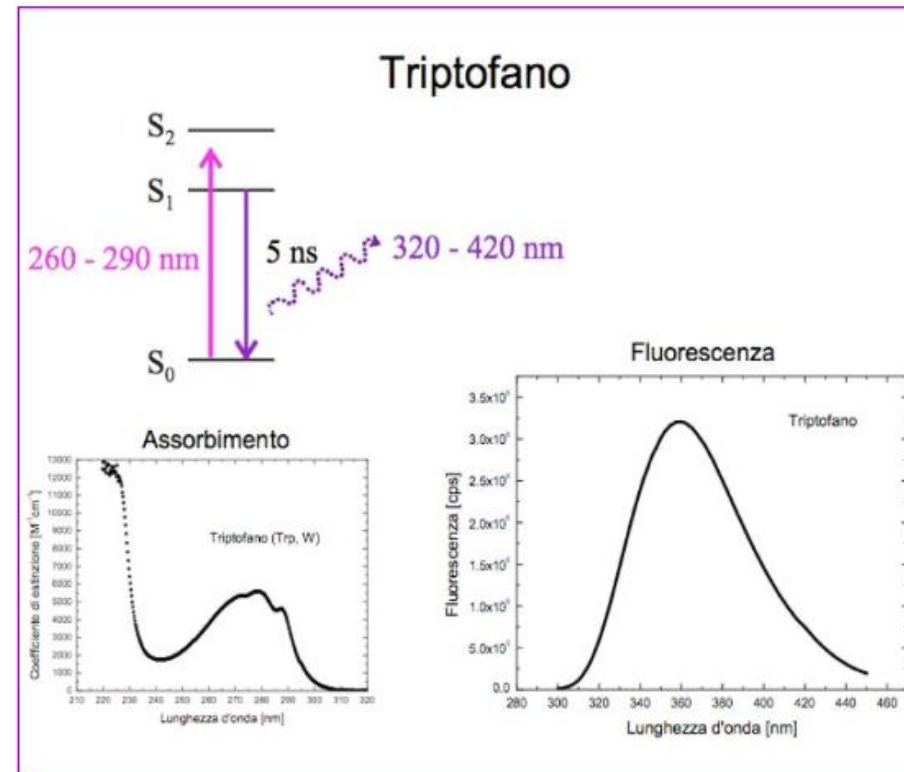
Infatti l'assorbività molare della transizione $n \rightarrow \pi^*$, che rappresenta una misura della probabilità che la transizione avvenga, è da 100 a 1000 volte minore di quella della transizione $\pi \rightarrow \pi^*$.

Spettroscopia di Fluorescenza

Perche' e' importante in biologia?

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

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



Spettroscopia di Fluorescenza

Perche' e' importante in biologia?

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

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

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

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

Typical result:

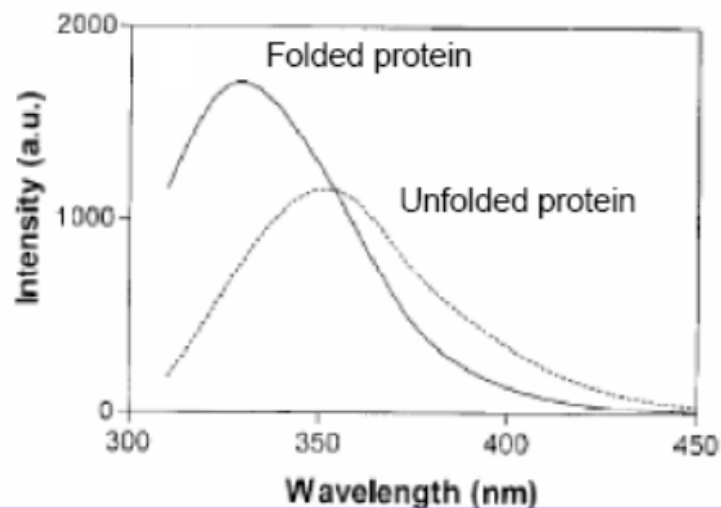
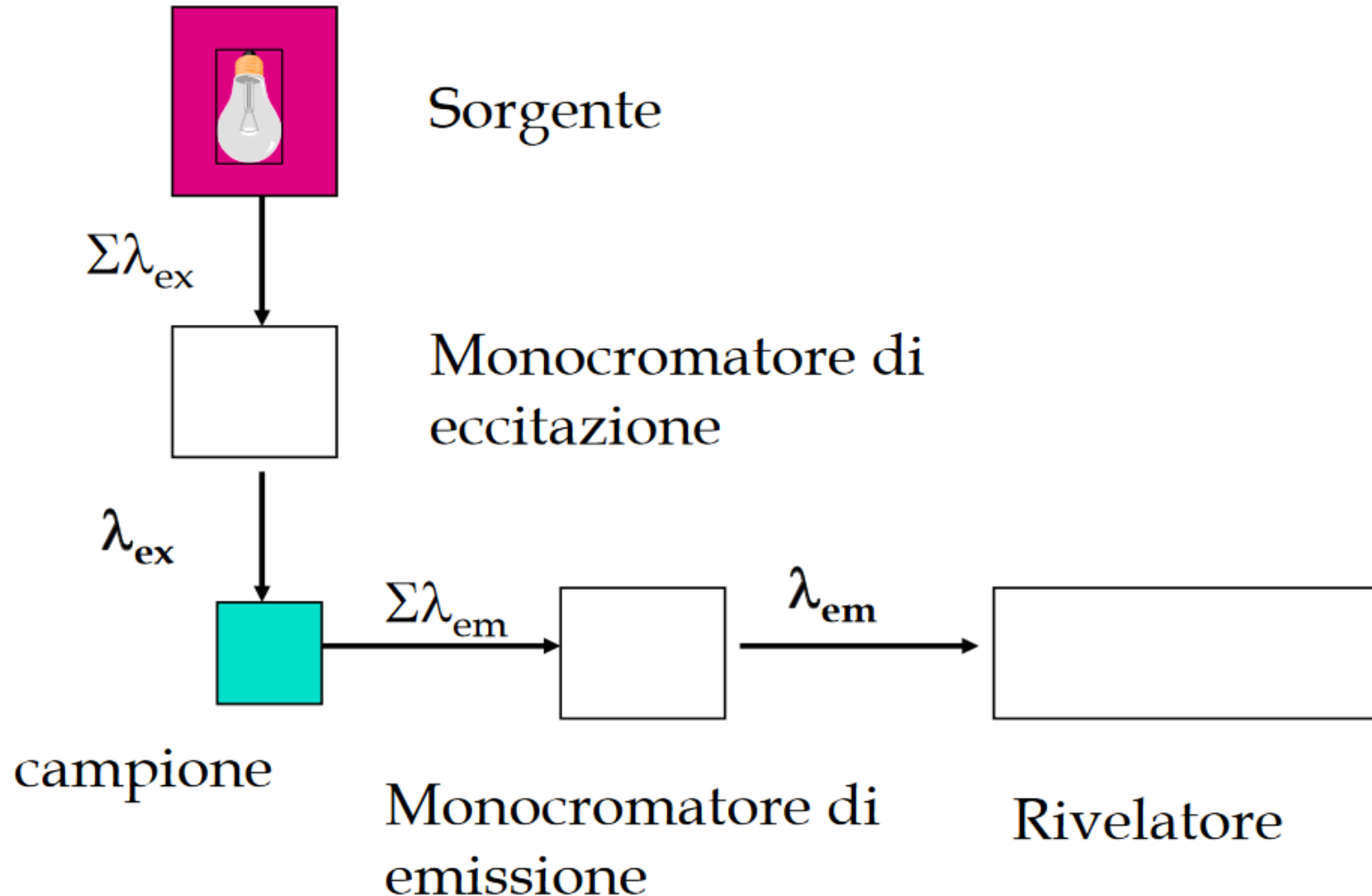


Diagramma di uno spettrofotofluorimetro



Applicazioni

- **Analisi qualitativa:**

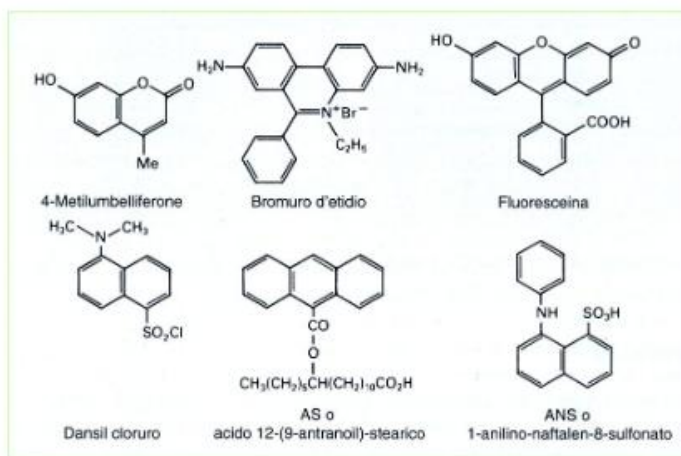
- Identificazione della struttura di una sostanza (confronto tra spettro di assorbimento e spettro di emissione; analisi degli effetti del pH, del solvente, del tempo di decadimento)
- Analisi della struttura delle proteine (*fluorescenza dei residui aromatici*)
- Studi di trasferimento dell'energia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


Applicazioni

•Analisi quantitativa:

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

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





Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

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

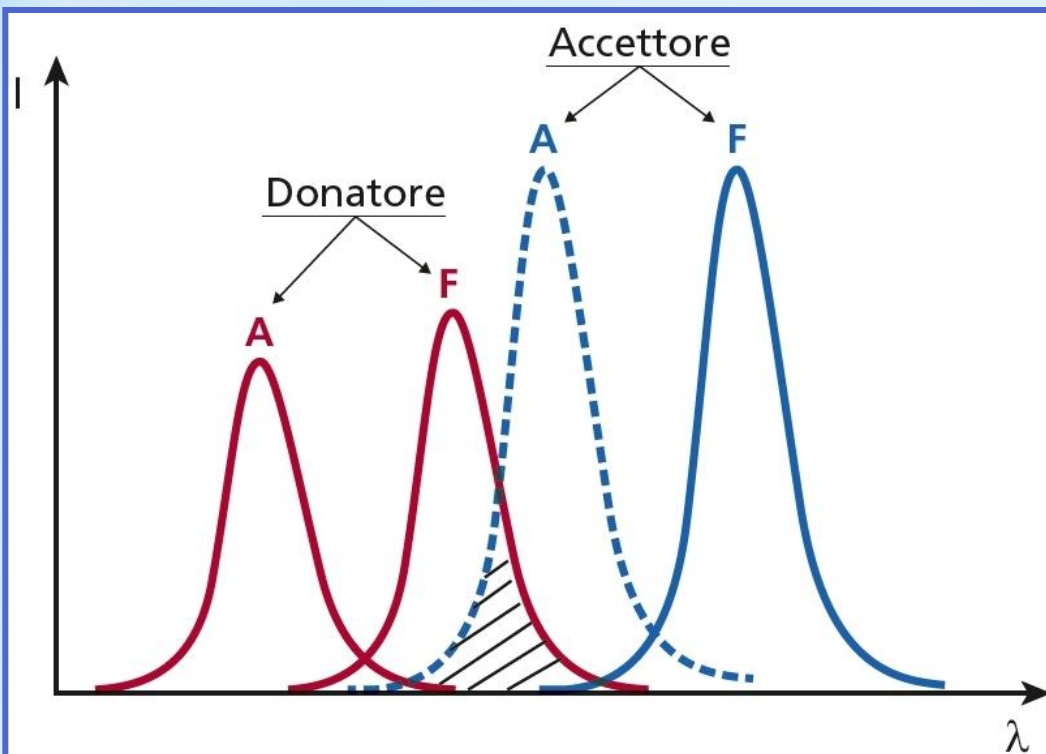


Figura 6.9

Trasferimento di energia per risonanza tra donatore e accettore. La zona tratteggiata rappresenta la regione di sovrapposizione tra l'emissione di fluorescenza del donatore e lo spettro di assorbimento dell'accettore (A = assorbimento; F = fluorescenza).

NB: Affinché il processo possa avvenire l'energia di emissione del donatore deve corrispondere all'energia di assorbimento dell'accettore, cioè deve essere in risonanza.

Nel caso in cui l'accettore non sia fluorescente l'energia viene dissipata in fenomeni non radiativi.



Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

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

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

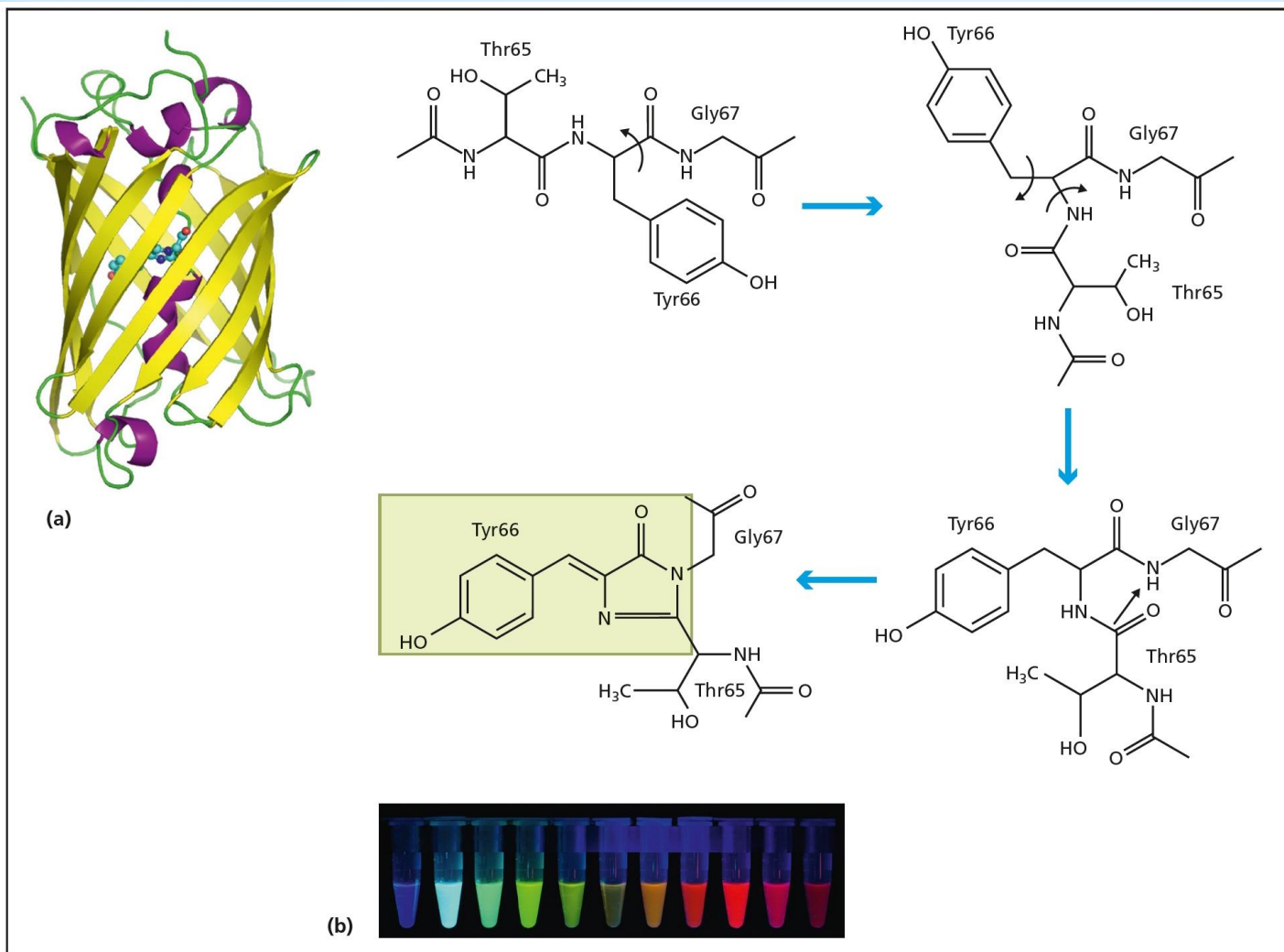
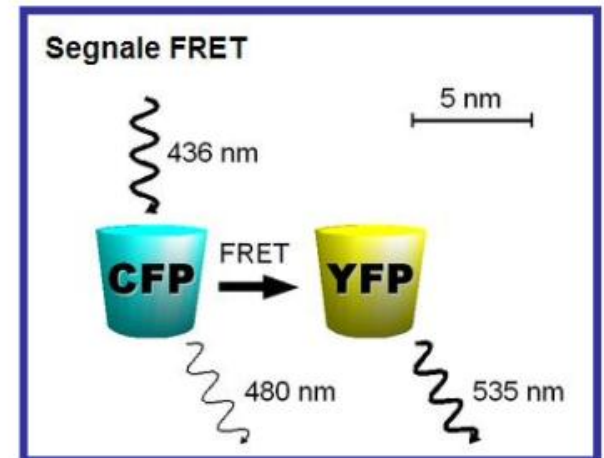
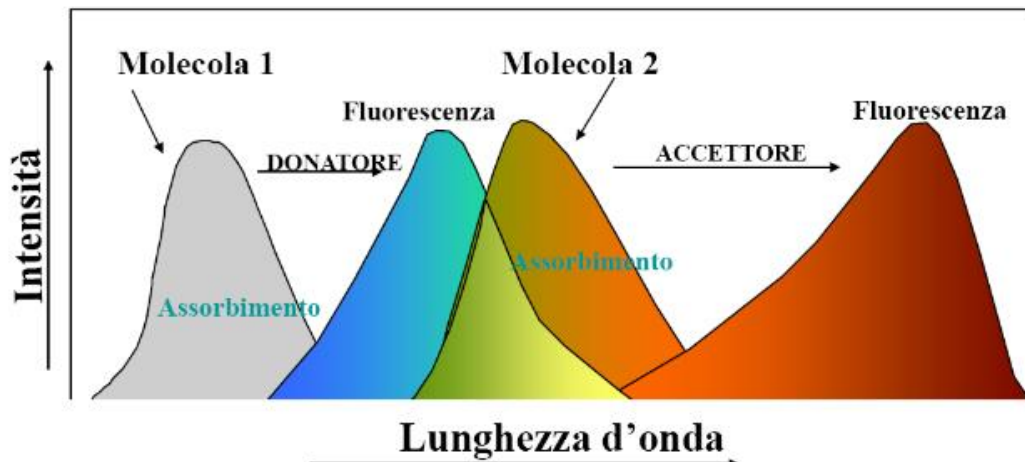



Figura 6.10
(a) Struttura cristallografica della proteina fluorescente verde (GFP) della medusa *Aequorea victoria*, dove è evidenziato il fluoroforo all'interno del barile- β della proteina. **(b)** Processo di formazione del fluoroforo a partire dai residui Thr(65), Tyr(66) e Gly(67), attraverso fenomeni di torsione, ciclizzazione, deidratazione e ossidazione. Come si vede dai colori delle provette, diverse mutazioni hanno dato origine a una vasta gamma di proteine fluorescenti con diversi spettri di assorbimento ed emissione.

Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

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

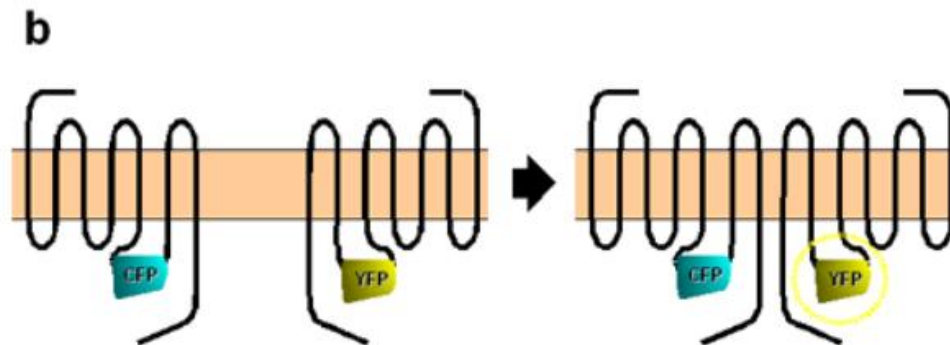




Fluorescence Resonance Energy Transfer

trasferimento di energia per risonanza dovuta a fluorescenza

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



CONCETTI CHIAVE

Radiazione elettromagnetica La radiazione è caratterizzata da lunghezza d'onda (λ), frequenza (ν) ed energia (E), legate dalle relazioni $\nu = c/\lambda$ ed $E = h\nu$. Frequenze alte corrispondono a energie alte e lunghezze d'onda corte (raggi γ , X, UV), mentre frequenze basse corrispondono a energie basse e lunghezze d'onda lunghe (infrarosso, microonde).

Assorbimento e transizioni elettroniche Quando un fotone incontra una molecola, può essere assorbito solo se la sua energia corrisponde *esattamente* alla differenza tra lo stato fondamentale e uno stato eccitato ($M + h\nu \rightarrow M^*$). L'assorbimento avviene in tempi dell'ordine dei femtosecondi (10^{-15} s) e i nuclei rimangono fermi durante la transizione — questo è il **Principio di Franck-Condon**.

Legge di Lambert-Beer È il principio fondamentale della spettroscopia di assorbimento UV-Vis:
$$A = \varepsilon \cdot [X] \cdot l$$
dove A è l'assorbanza, ε il coefficiente di estinzione molare ($M^{-1}cm^{-1}$), $[X]$ la concentrazione del campione e l il cammino ottico. Questa legge permette di ricavare la concentrazione di una molecola dalla misura dell'assorbanza, a patto che la relazione sia lineare (valida a basse concentrazioni).

Cromofori biologici principali Le biomolecole assorbono a lunghezze d'onda caratteristiche in funzione dei loro gruppi chimici:

• **Amminoacidi aromatici:** Trp (~280 nm), Tyr (~274 nm), Phe (~257 nm) → assorbimento caratteristico delle proteine

• **Basi azotate** del DNA e RNA: ~260 nm

• **Cofattori e gruppi prostetici:** NADH (340 nm), FAD (450 nm), eme (413 nm)

Il rapporto A_{260}/A_{280} è usato in pratica per valutare la purezza di un preparato: valori ~1.8 indicano DNA puro, ~2.0 RNA puro.

Fluorescenza e Stokes shift La fluorescenza è l'emissione di radiazione che avviene quando una molecola eccitata ritorna allo stato fondamentale ($M^* \rightarrow M + h\nu$). L'energia emessa è *sempre minore* di quella assorbita perché parte dell'energia si perde in transizioni vibrazionali non radiative: per questo la luce emessa ha sempre una λ maggiore rispetto a quella eccitante — questo disallineamento è detto **Stokes shift**.

Resa quantica e tempo di vita La **resa quantica** (Φ) è la frazione di molecole eccitate che ritornano allo stato fondamentale emettendo fluorescenza: $\Phi = \text{fotoni emessi} / \text{fotoni assorbiti}$ ($0 \leq \Phi \leq 1$). Il **tempo di vita** (τ) misura per quanto tempo una molecola resta nello stato eccitato prima di rilassarsi.

Processi competitivi con la fluorescenza Non tutte le molecole che assorbono luce emettono fluorescenza. I quattro processi che competono con l'emissione sono: (1) emissione di fluorescenza, (2) conversione interna, (3) conversione intersistema (→ fosforescenza), (4) smorzamento per collisioni con altre molecole (es. O_2 smorza la fluorescenza degli idrocarburi aromatici).

Fattori che influenzano la fluorescenza L'intensità e la λ_{max} di emissione sono sensibili all'ambiente molecolare. I principali fattori sono: solvente, pH, temperatura, composizione della matrice, smorzamento chimico e concentrazione. Questo rende la fluorescenza uno strumento sensibile per sondare la struttura e l'ambiente di una proteina (es. un Trp sepolto nel core idrofobico emette a ~ 330 nm, uno esposto all'acqua a ~ 350 nm).

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) È il trasferimento non radiativo di energia tra un fluoroforo **donatore** e un **accettore** vicino. Avviene solo quando: (a) i due fluorofori sono alla distanza giusta ($\sim 1-10$ nm) e (b) lo spettro di emissione del donatore si sovrappone allo spettro di assorbimento dell'accettore. Poiché l'efficienza del trasferimento dipende dalla distanza elevata alla sesta potenza (R^6), il FRET funziona come un vero e proprio **righello molecolare** per misurare distanze tra macromolecole. I fluorofori più usati sono quelli della famiglia GFP (CFP come donatore, YFP come accettore).

Esercizi Numerici (Lambert-Beer)

- Una soluzione di triptofano ha $A_{200} = 0.56$, $l = 1 \text{ cm}$, $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Calcolare $[\text{Trp}]$.
- Una proteina con $\epsilon_{200} = 42\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mostra $A = 0.84$. Qual è la sua concentrazione molare?
- Se $A_{260}/A_{280} = 1.8$, il campione è prevalentemente DNA o proteina? Perché?

Domande di Comprensione

- Perché la lunghezza d'onda di emissione della fluorescenza è sempre maggiore di quella di eccitazione?
- Quali amminoacidi contribuiscono maggiormente all'assorbimento UV delle proteine e a quale lunghezza d'onda?
- Cosa si intende per 'smorzamento della fluorescenza' e quale molecola biologica ne è un esempio classico?
- In un esperimento FRET, cosa succede al segnale del donatore quando le due molecole si avvicinano? E al segnale dell'accettore?

Domanda Applicativa

- Descrivi come utilizzeresti la spettroscopia di fluorescenza per determinare se una proteina è nella conformazione nativa o denaturata.

 **DOMANDE DI RIPASSO**