

Tecniche spettroscopiche

RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

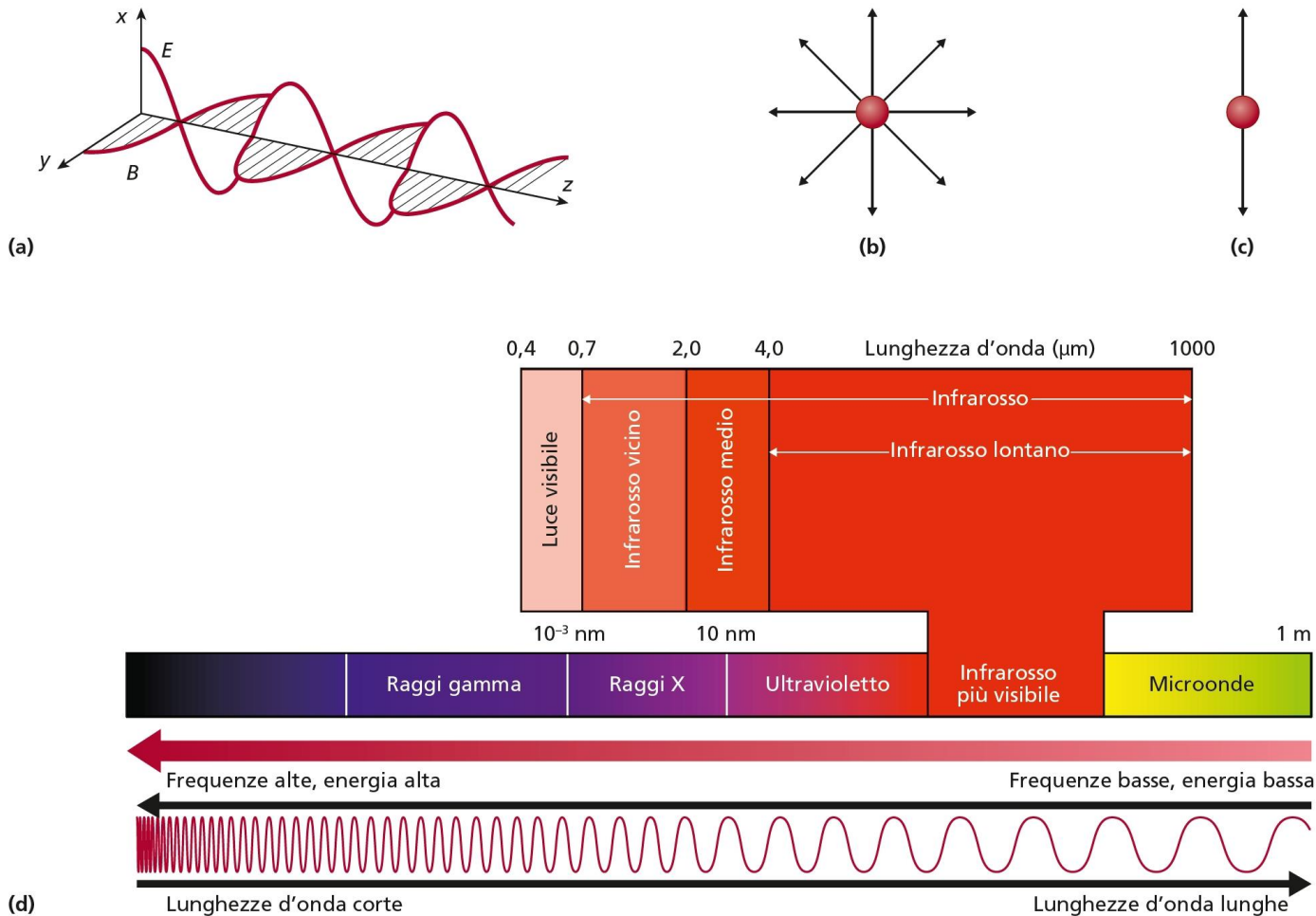


Figura 6.1

(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.**

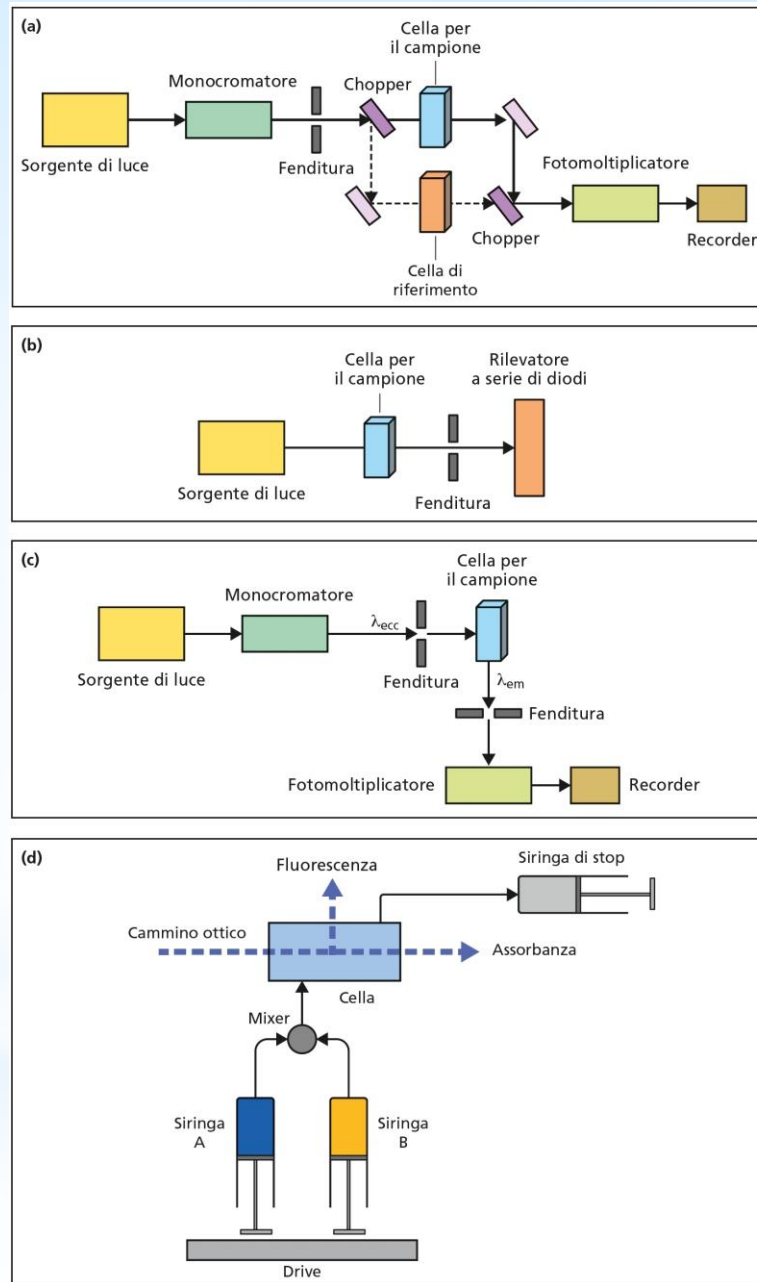
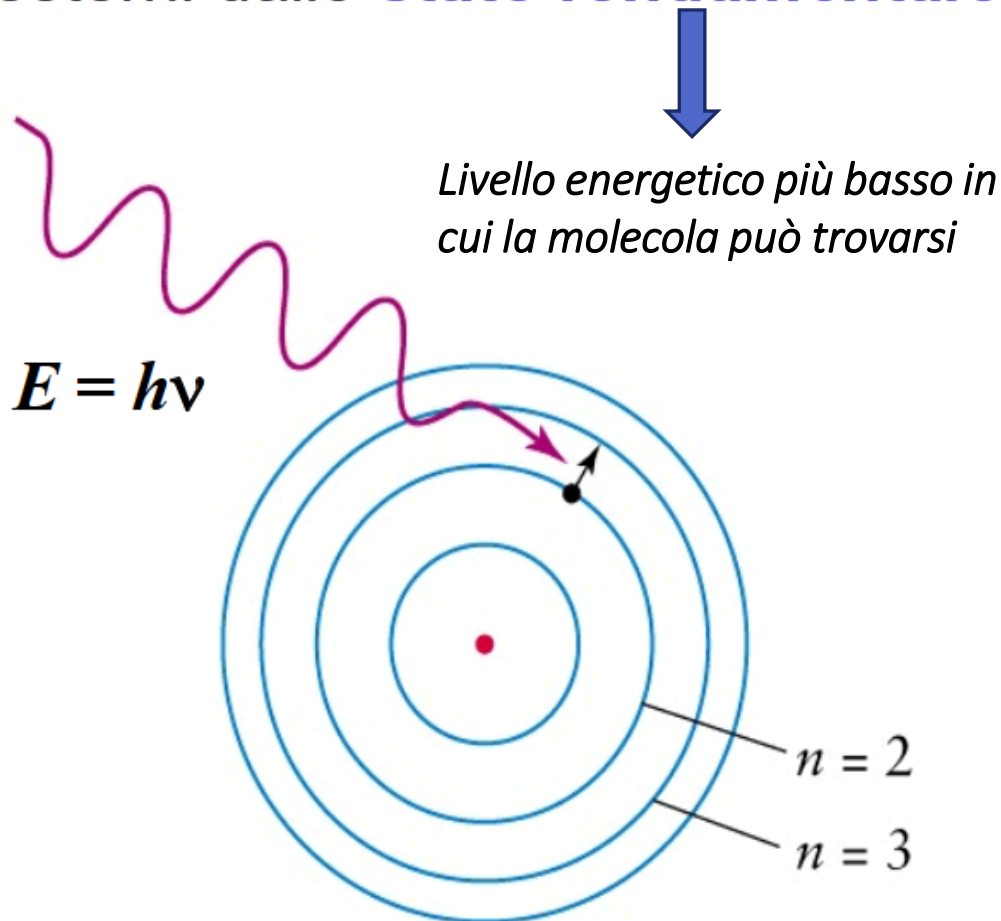


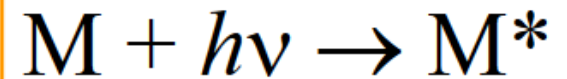
Figura 6.2
Schemi generali di configurazione dei seguenti strumenti di misura: (a) spettrofotometro a doppio raggio per spettroscopia di assorbimento; a seconda della sorgente, permette di effettuare misure nell'UV, nel visibile o nell'infrarosso; (b) spettrofotometro con rivelatore a serie di diodi;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

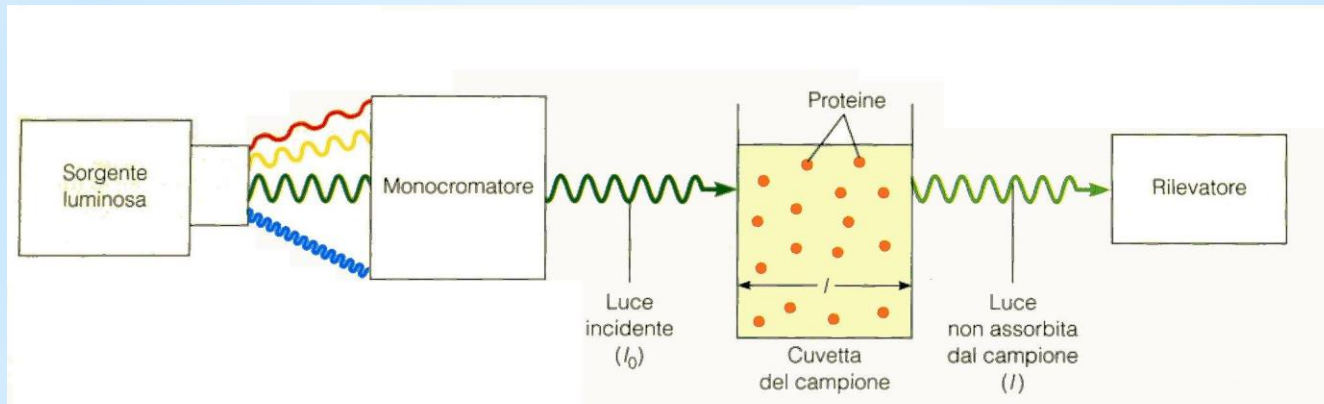


Livello energetico superiore a quello fondamentale



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:

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

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

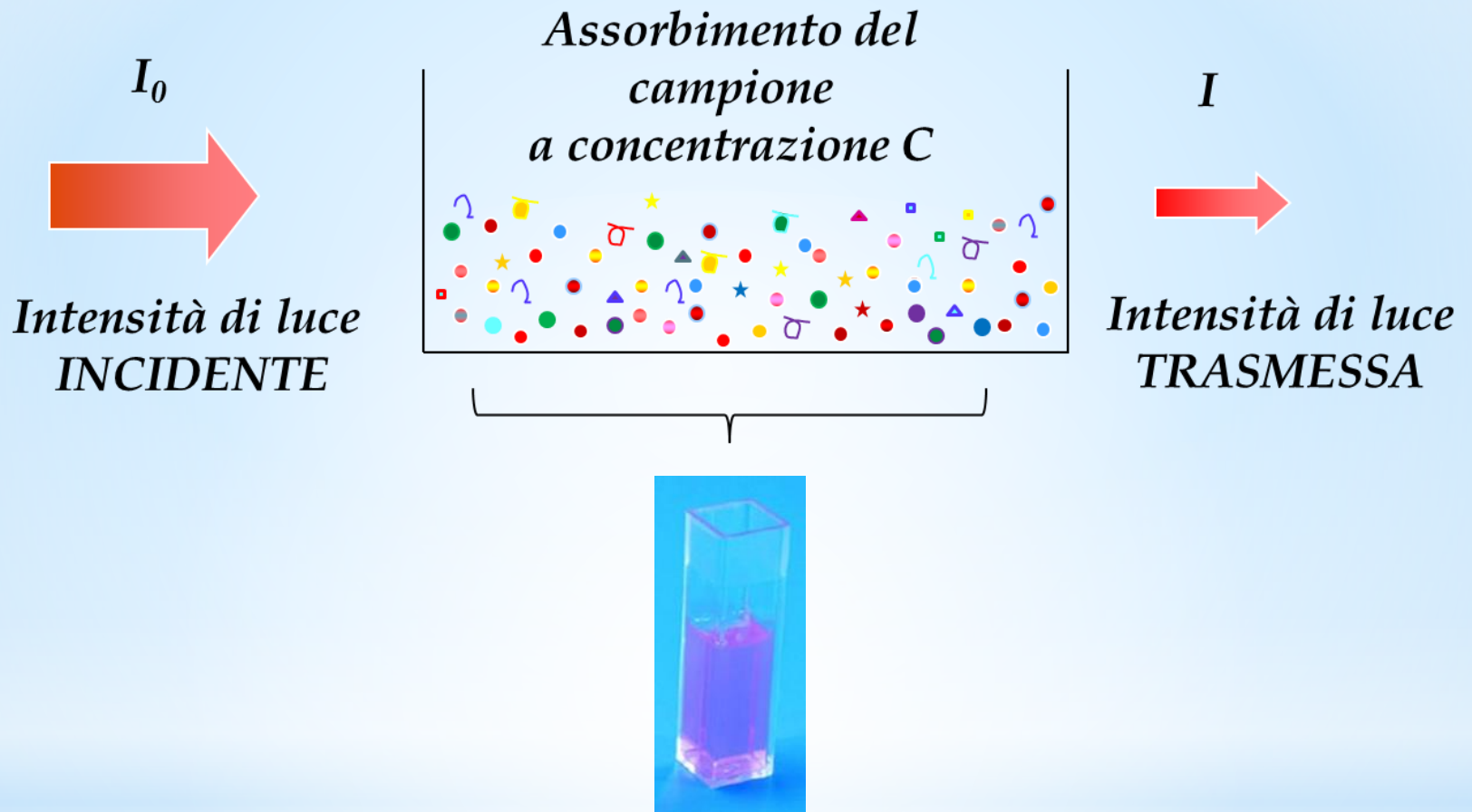
I_0 = Intensità della radiazione incidente;

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

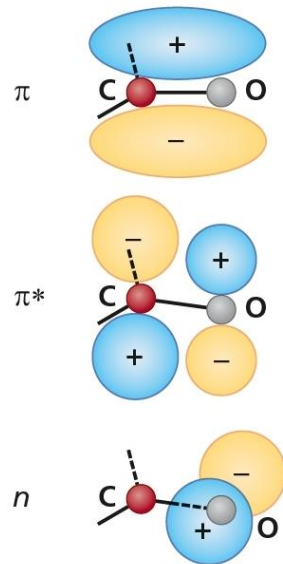


Maggiore è la quantità di molecole che la luce incontra, maggiore è l'assorbimento, minore è l'intensità di luce trasmessa.

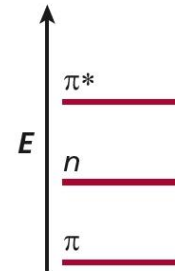
L'assorbimento di una radiazione è un processo praticamente istantaneo che avviene in tempi dell'ordine dei femtosecondi (10^{-15} s)

Figura 6.3

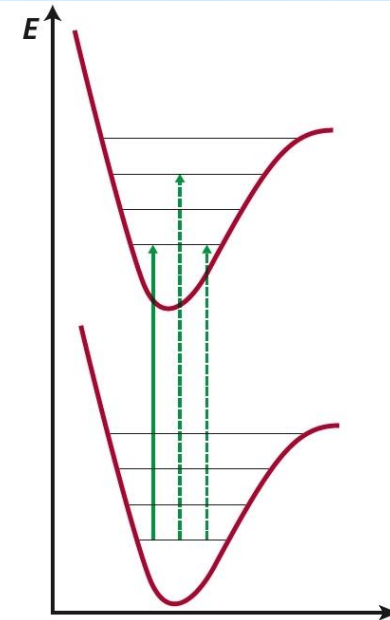
(a) Orbitali molecolari π , π^* e n del gruppo C=O; (b) energie relative alla base del fenomeno di assorbimento della radiazione elettromagnetica; (c) curve di Morse, che illustrano gli stati vibrazionali dello stato fondamentale e dello stato eccitato. Le linee verticali rappresentano le transizioni 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} ($\cdot 10^{-3}$) ($M^{-1} cm^{-1}$) |
|---|-------------------------|--|
| Aminoacidi | | |
| Tryptofano | 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 |

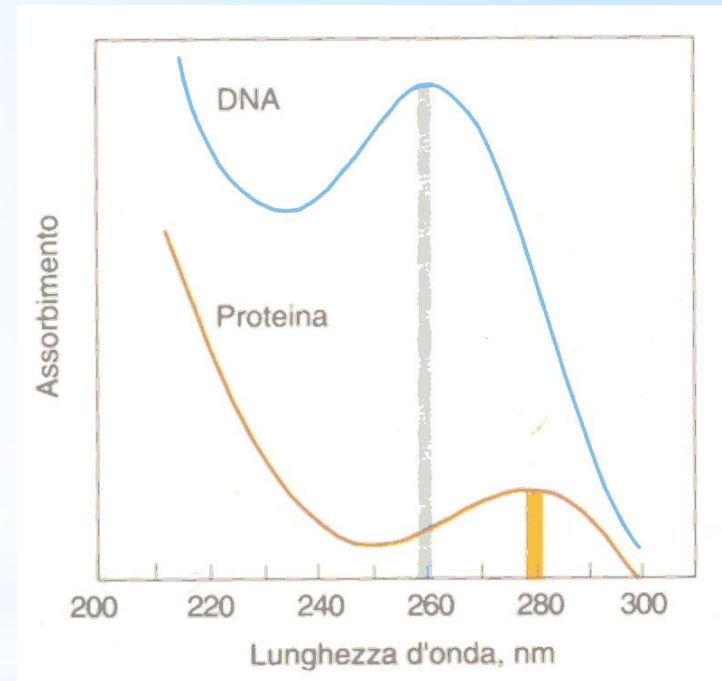
Ogni proteina ha un ϵ differente

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** - biuretto, Lowry, **Bradford**)

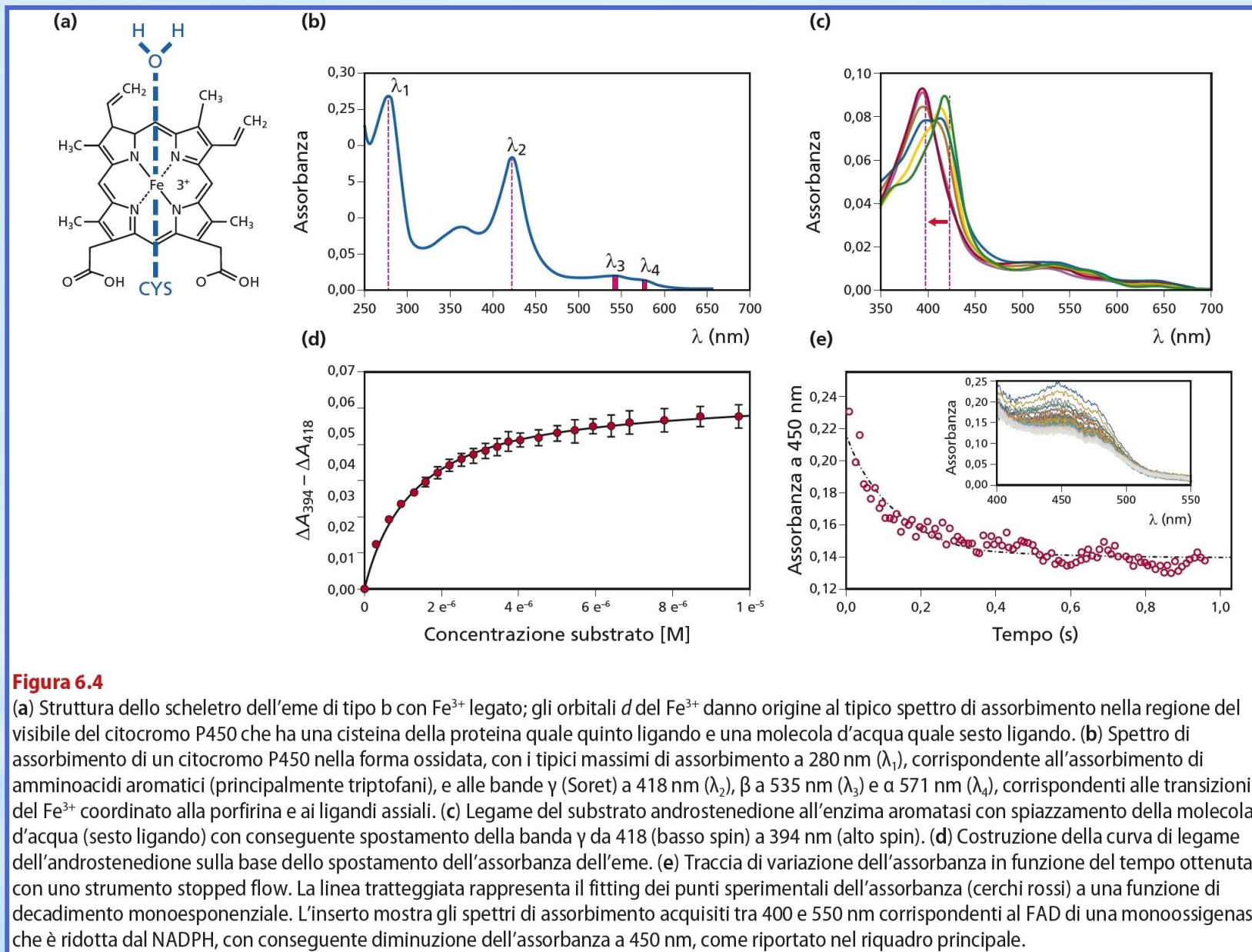


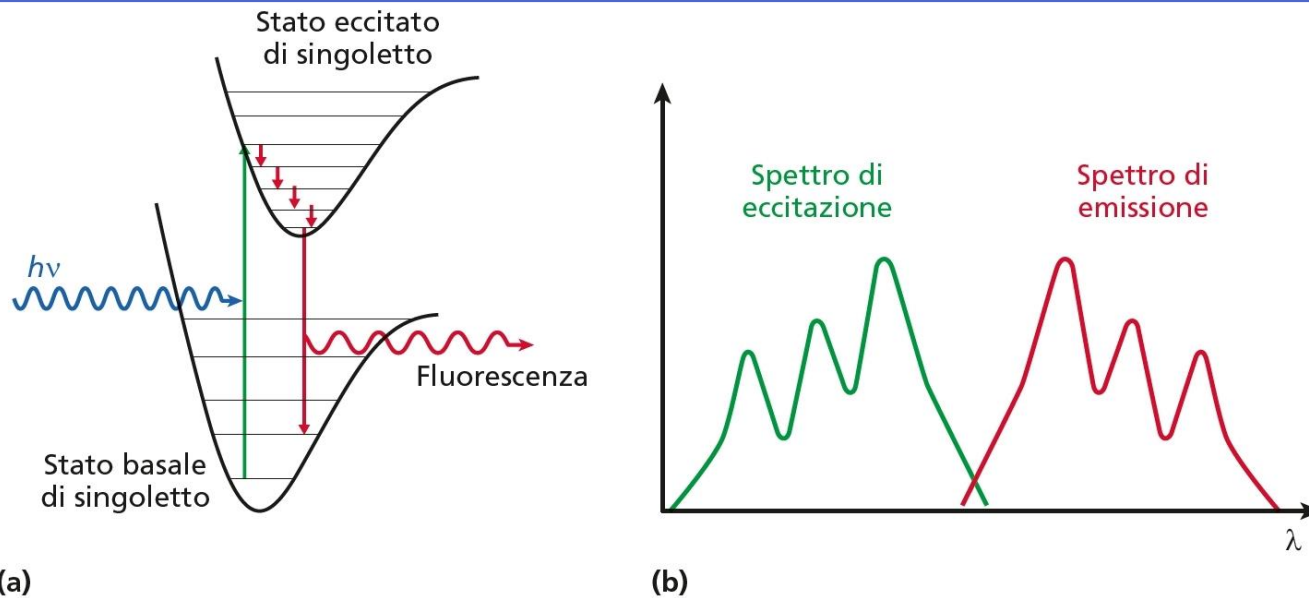
Figura 6.4

(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 amminoacidi 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).

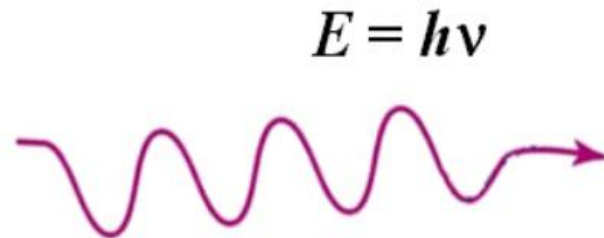
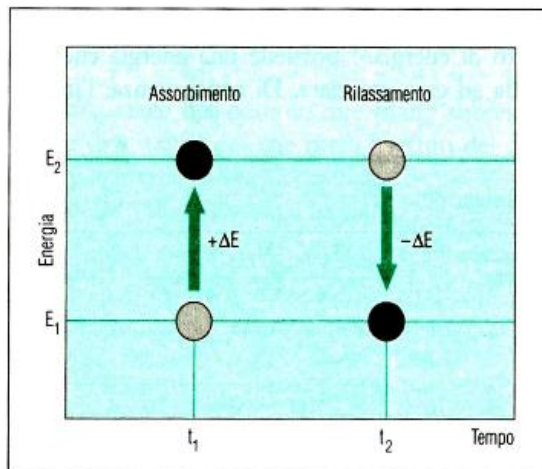
PRINCIPI DELLA FLUORESCENZA

- 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

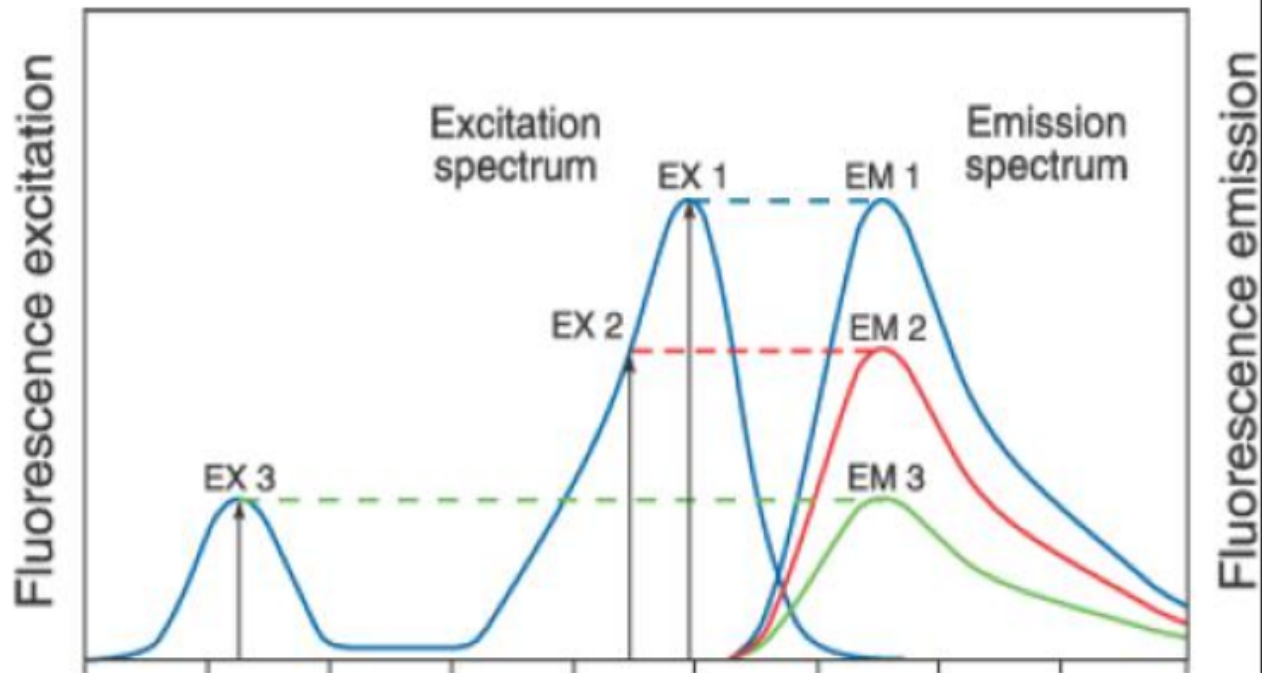
Assorbimento ed emissione di energia da parte della materia. All'istante t_1 , l'atomo o la molecola nel suo stato fondamentale (livello di energia E_1) assorbe una quantità di energia $\Delta E (= E_2 - E_1)$ e passa in uno stato eccitato (livello di energia E_2). Subito dopo avviene un processo di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



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**



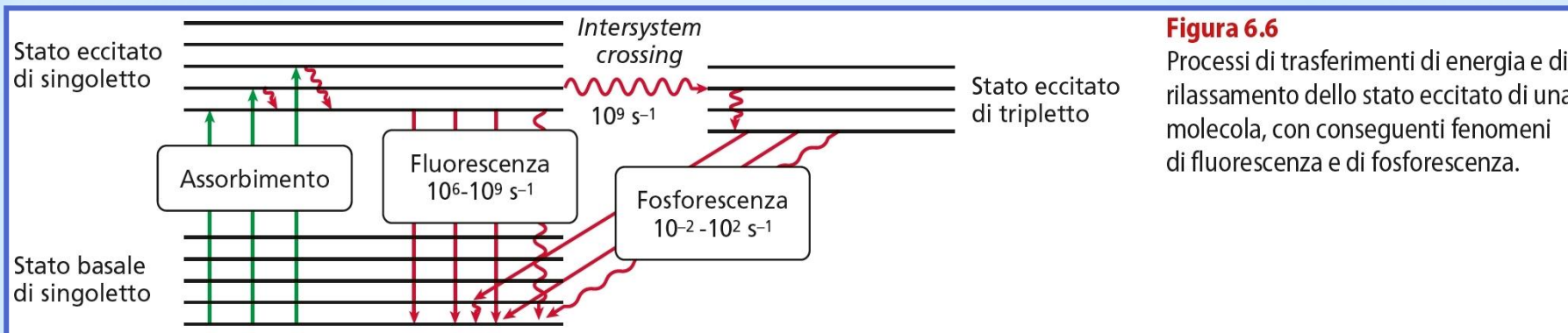


Figura 6.6

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

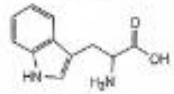
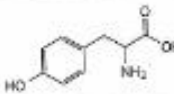
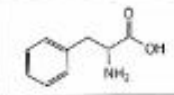
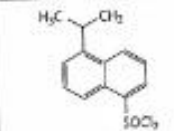
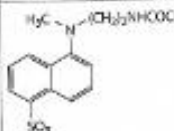
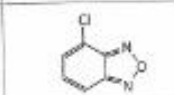
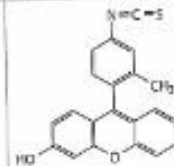
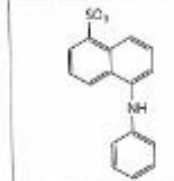
▪ La frazione delle molecole eccitate che vengono riportate allo stato fondamentale grazie alla fluorescenza è definita come **RESA QUANTICA**

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

$$F_\lambda = I_A \Phi_F$$

I_A = popolazione iniziale nello stato eccitato

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-etilbrenzo-2-oss-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.



VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

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

1. **EMISSIONE DI FLUORESCENZA**



2. **CONVERSIONE INTERNA**



3. **CONVERSIONE INTERSISTEMA**



4. **SMORZAMENTO PER COLLISIONI**



VARIABILI CHE INFLUENZANO IL FENOMENO DELLA FLUORESCENZA

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

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

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

4. SMORZAMENTO PER COLLISIONI




* L'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.

(*)

b) Tipo di transizione

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

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

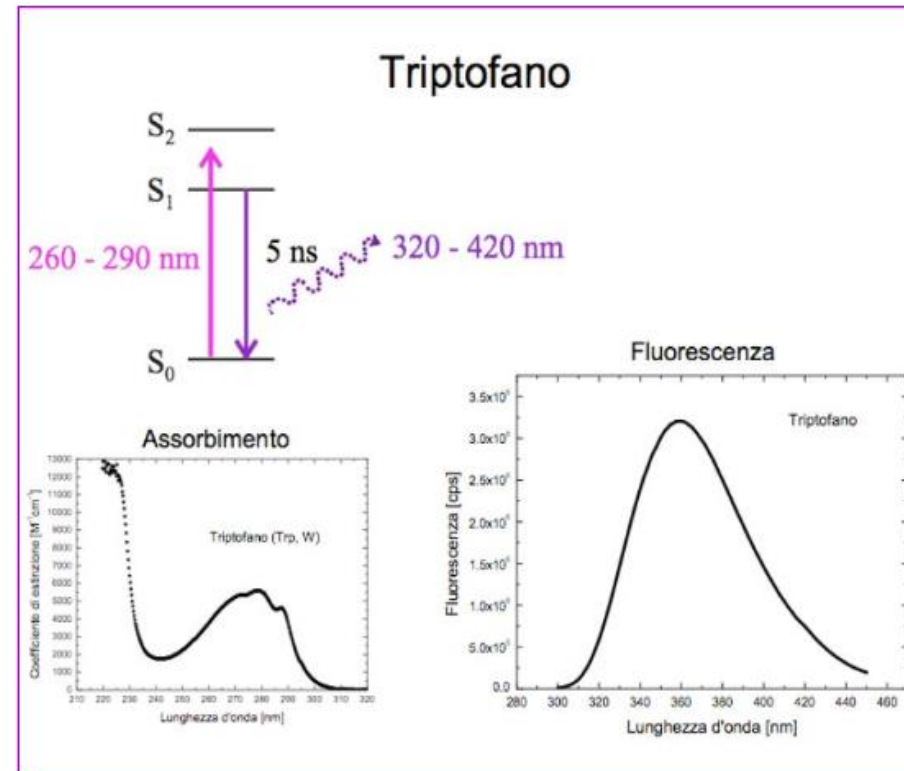
Infatti l'assorbività molare della transizione $n \rightarrow \pi^*$, che rappresenta una misura della probabilità che la transizione avvenga, è da 100 a 1000 volte minore di quella della transizione $\pi \rightarrow \pi^*$.

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?

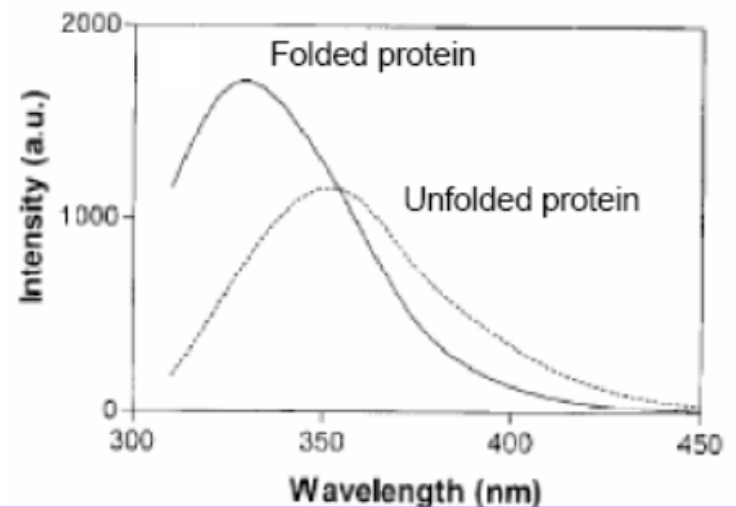
perche' gli aminoacidi aromatici (fenilalanina, istidina, triptofano e tirosina) emettono luce di fluorescenza, in particolare il **triptofano** ha uno spettro piu' intenso degli altri.

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:



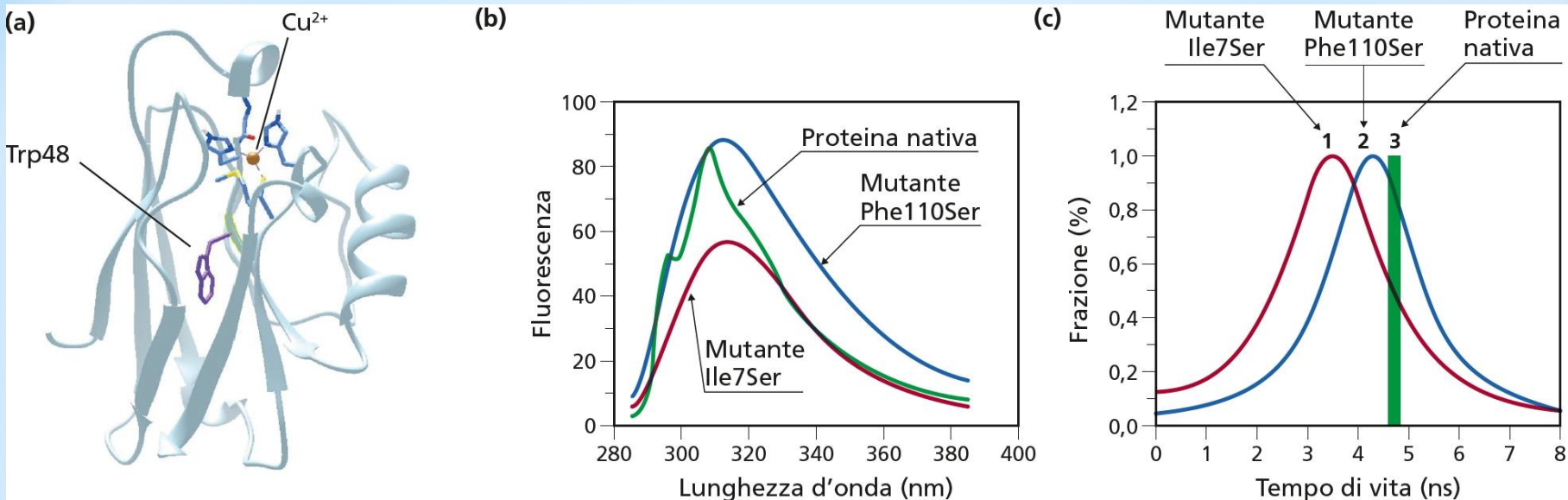


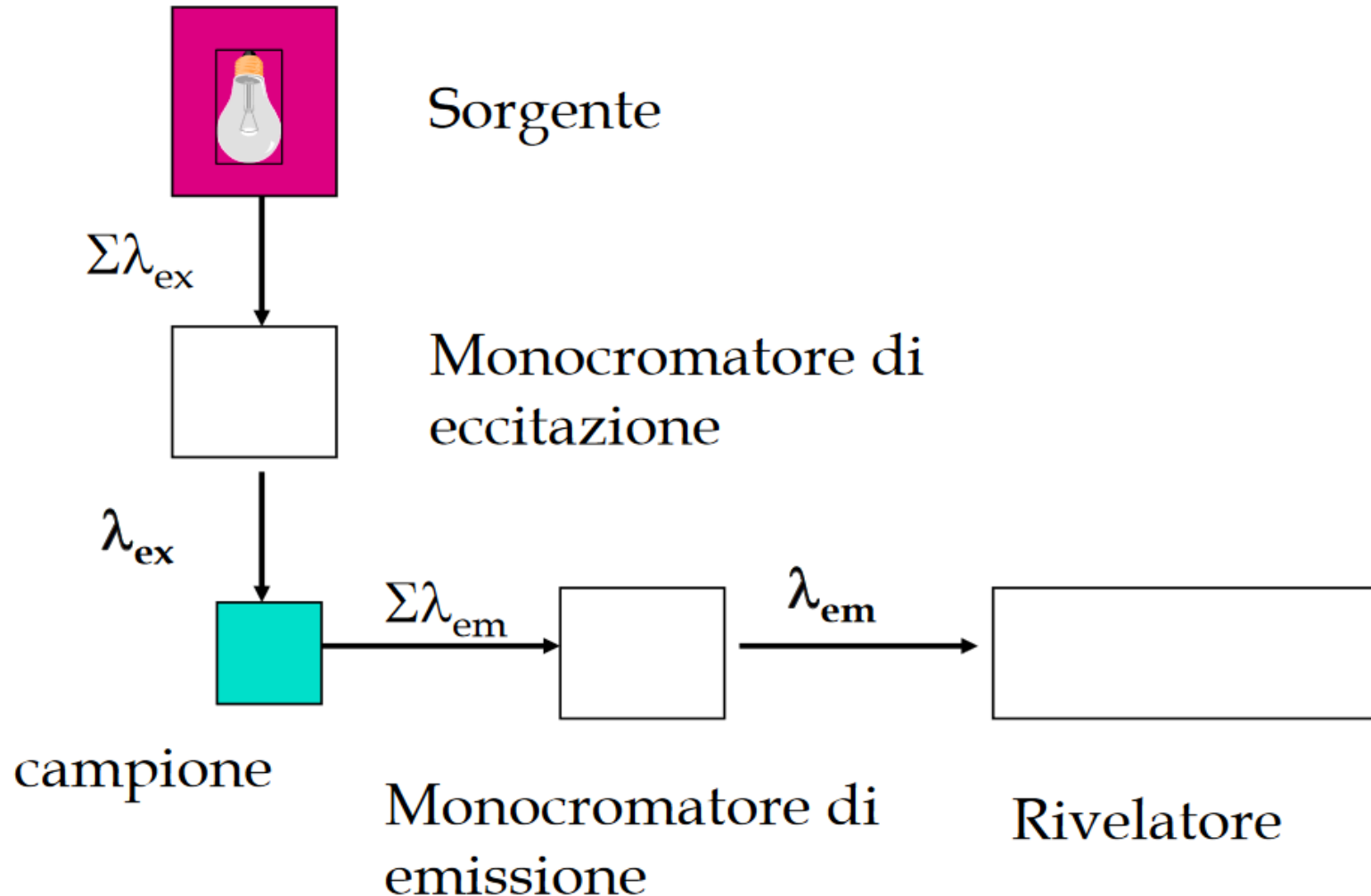
Figura 6.8

(a) Struttura cristallografica dell'azzurina da *Pseudomonas aeruginosa*. In evidenza le catene laterali che legano il Cu²⁺ e il Trp48 (magenta), completamente mascherato nel cuore idrofobico della proteina. (b) Spettri di emissione di fluorescenza del Trp48 nella proteina nativa (linea verde). Notare le

transizioni che questo unico cromoforo genera quando è immobilizzato e mascherato dall'acqua nel cuore idrofobico della proteina. Nei mutanti Ile7Ser (linea rossa) e Phe110Ser (linea blu) lo spettro di emissione evidenzia significativi cambiamenti dovuti ad una maggiore flessibilità di Trp48. (c) Distribuzione di Lorentz dei tempi di

vita di fluorescenza dei campioni di cui al punto (b), in cui si evidenzia l'assenza di distribuzione per la proteina nativa (3) dovuta alla rigidità del Trp48 (eccitazione a 295 nm), mentre si ha uno spostamento del valore medio e una distribuzione di Lorentz nel caso dei mutanti Ile7Ser (1) e Phe110Ser (2), coerente con una maggiore flessibilità della catena laterale del Trp48.

Diagramma di uno spettrofotofluorimetro





Applicazioni

- **Analisi qualitativa:**

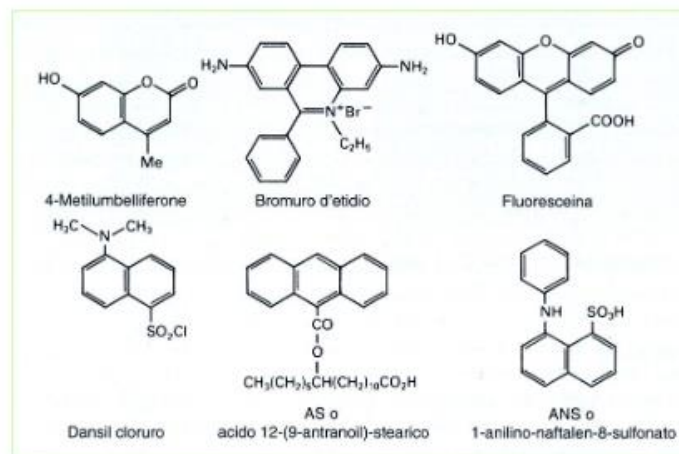
- Identificazione della struttura di una sostanza (confronto tra spettro di assorbimento e spettro di emissione; analisi degli effetti del pH, del solvente, del tempo di decadimento)
- Analisi della struttura delle proteine (*fluorescenza dei residui aromatici*)
- Studi di trasferimento dell'energia (*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**.

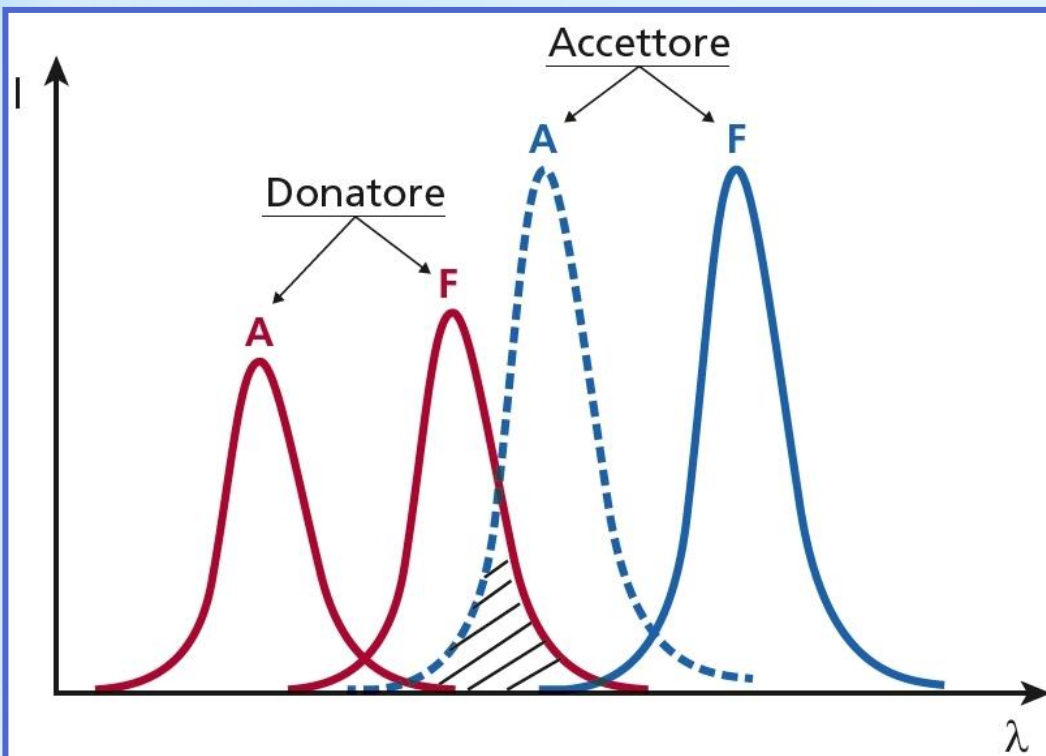


Figura 6.9

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.

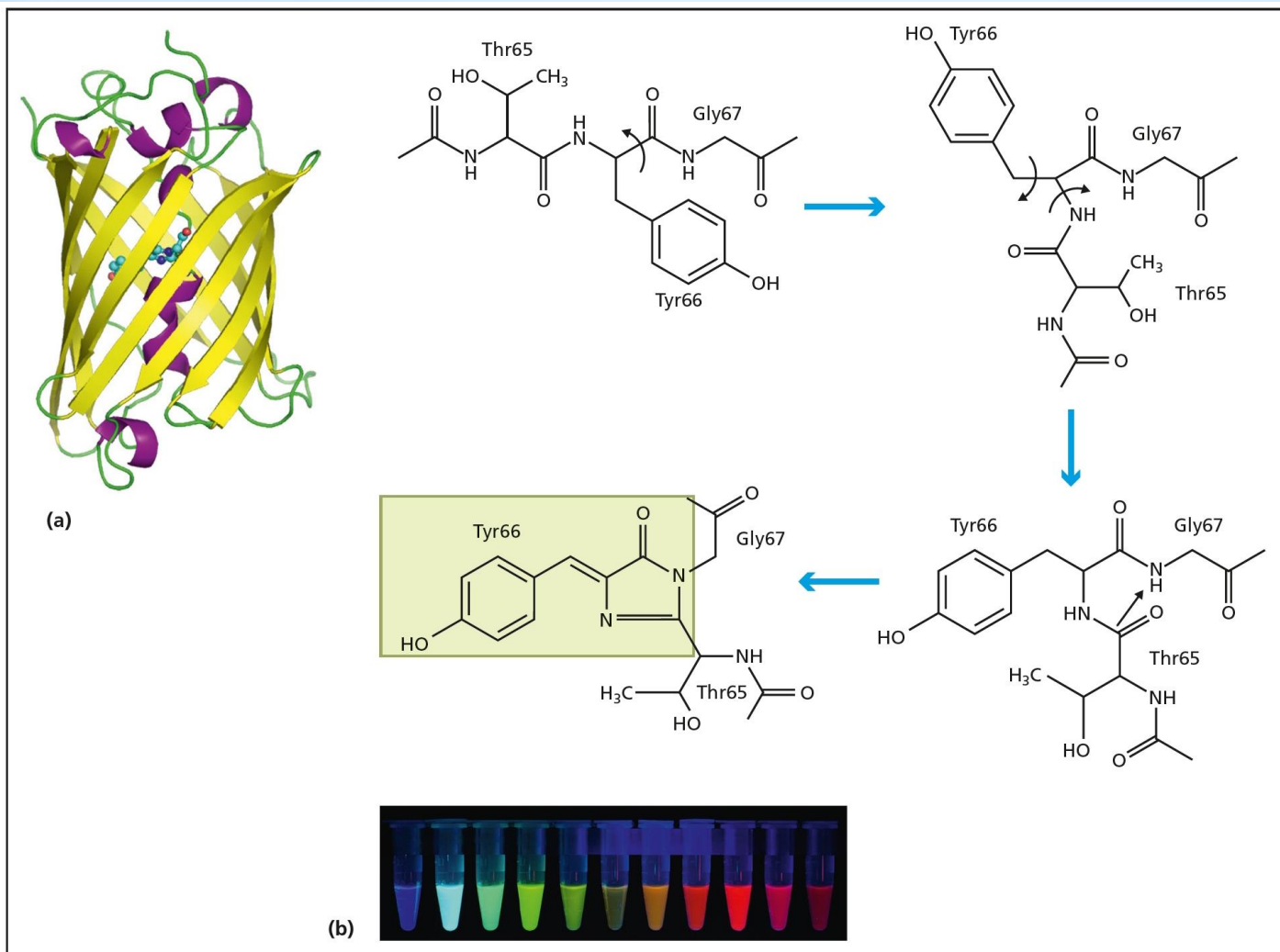


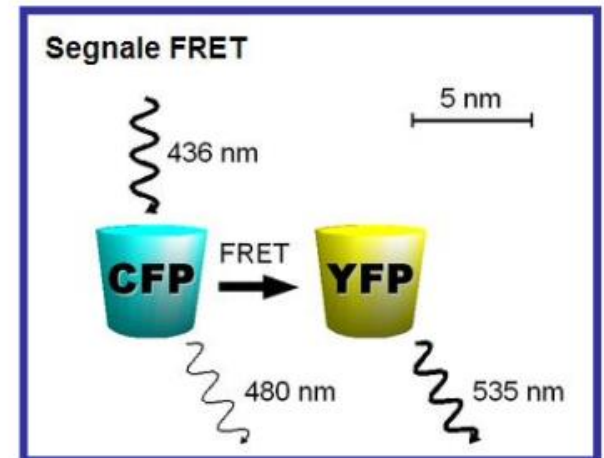
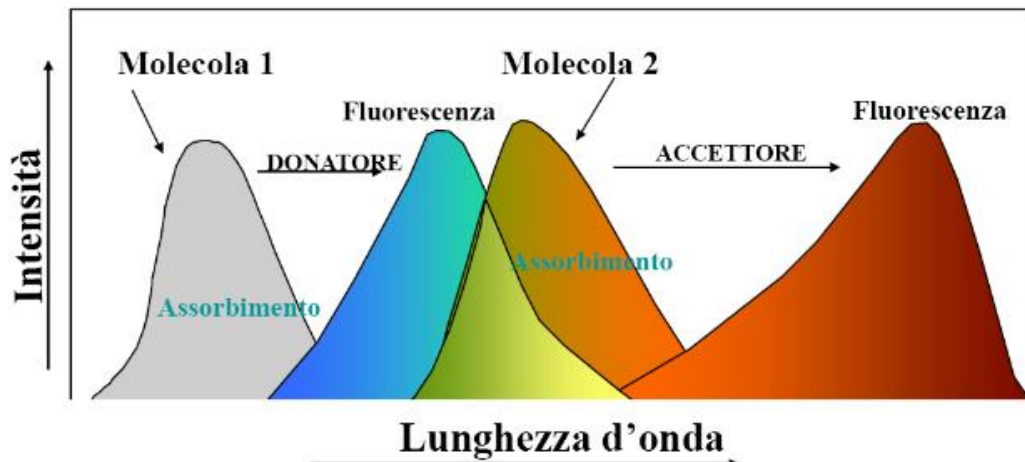
Figura 6.10

(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).

