

Corso per progressione verticale D
Ambito biologico per le esigenze del Polo Scientifico Didattico di Ravenna



Tecniche di separazione e analisi macromolecolare

Prof. Giorgio Sartor
22 novembre 2005

Copyright © 2001-2005 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Di cosa si parla

- **Biomonitoraggio**
- **Tecniche di analisi**
 - Centrifugazione
 - Cromatografia
 - Spettrofotometria e fluorescenza

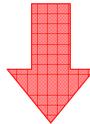
Biomonitoraggio

La regolare e sistematica valutazione delle condizioni dell'ambiente mediante un insieme di metodiche che utilizzano specie animali o vegetali per misurare l'impatto degli agenti inquinanti sull'ambiente.

Biomarcatori di inquinamento

- Le risposte che un organismo genera nei confronti dei composti inquinanti rappresentano potenziali

Biomarkers



- Variazione indotta da un contaminante a livello di componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione.

Biomarkers

Misura funzionale
dell'esposizione ad agenti
stressori espressa a livello sub-
organismico, fisiologico,
comportamentale.

(McCarthy and Munkittrick, 1996)

Perché i biomarkers

- Rapporto costo-risultato
- Rapidi
- Robusti
- Informativi
- Rappresentano differenti livelli biologici
- Generali/specifici
- (Semplici)

Biomarkers

- Biomarkers generali
 - Sono indice di una alterazione generale dell'ambiente.
- Biomarkers specifici
 - Sono la risposta ad uno specifico inquinante.
- Batteria di biomarkers
 - Insieme di biomarcatori in grado di dare risposte integrate.

Biomonitoraggio mediante biomarkers

• VANTAGGI

- Precocità della risposta
- Rivela l'effetto sinergico degli inquinanti
- Rivela l'inquinamento anche quando la causa è scomparsa

• SVANTAGGI

- Influenza delle condizioni chimico-fisiche ambientali sugli organismi
- Variabilità biologica
 - Età
 - Genere
 - Stato riproduttivo
 - Stadio di sviluppo
 - Dieta
 - Isoenzimi

Tecniche di analisi

- Tecniche separative
 - Centrifugazione
 - Cromatografia
 - Elettroforesi
 - Tecniche analitiche
 - Cromatografia
 - Elettroforesi
 - Blotting
 - Spettrofotometria
-
- Permettono l'isolamento di particelle subcellulari, macromolecole al fine di studiarle separatamente dal contesto ed evitare interazioni.
-
- Permettono di determinare la concentrazione e le proprietà specifiche di cellule, particelle subcellulari, macromolecole.

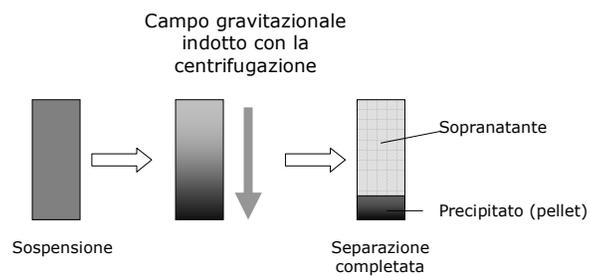
Tecniche separative: Centrifugazione

Ovvero: gravità artificiale.

Centrifugazione

- Una centrifuga è usata per separare particelle subcellulari e, in alcuni casi macromolecole:
 - che si separano in base a:
 - Dimensione
 - Densità
 - Forma
- Metodo:
 - Viene sfruttata la differenza di densità tra le particelle ed il mezzo in cui sono sospese
 - Alle sospensioni viene applicato un campo gravitazionale artificiale attraverso la rotazione ad alta velocità (Campo centrifugo).

Il principio della centrifugazione



Centrifughe



- Centrifuga da banco



- Ultracentrifuga

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

13

Campo centrifugo

- Il campo centrifugo (G) è dato da:

$$G = \omega^2 r$$

- Dove ω è la velocità di rotazione espressa in radianti·s⁻¹
 r è la distanza dall'asse di rotazione.
- Per esprimere la velocità di rotazione in giri·min⁻¹ (RPM):

$$\omega = \frac{2\pi \cdot RPM}{60}$$

- Il campo centrifugo viene quindi definito come:

$$G = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600} \cdot r$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

14

Campo centrifugo relativo

- In genere il campo centrifugo viene espresso come *campo centrifugo relativo* (RCF) come multiplo della costante gravitazionale ($980 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$):

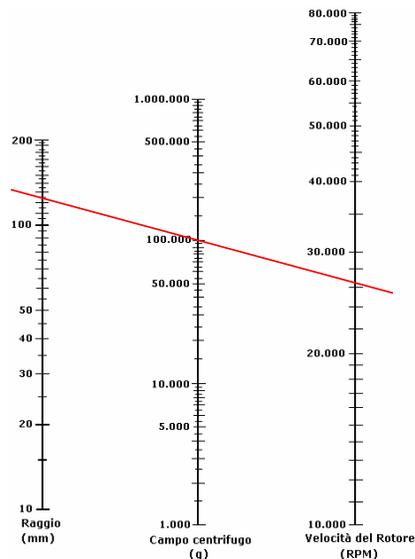
$$RCF = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600 \times 980} \cdot r$$

- Che diventa:

$$RCF = 1.11 \times 10^{-5} \cdot (RPM)^2 \cdot r$$

Nomogramma

- È quindi semplice convertire un campo centrifugo relativo ottenuto attraverso una centrifugazione effettuata con un rotore che ha un raggio definito (r) ad una certa velocità di rotazione (RPM) con un'altra centrifuga ed un altro rotore.



Velocità di sedimentazione

- La velocità di sedimentazione di una particella sferica dipende, oltre che dal campo gravitazionale anche da altri parametri attraverso la legge di Stokes:

Velocità di sedimentazione della particella

Raggio della particella

Densità della particella

Densità del mezzo

Costante per una sfera

Viscosità del mezzo

Campo gravitazionale

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{r_p^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)}{\eta} \cdot g$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

17

Velocità di sedimentazione

- Se una particella ha una densità uguale a quella del mezzo:

$$\rho_p = \rho_m$$
$$\rho_p - \rho_m = 0$$
$$v = 0$$

- Non vi è sedimentazione.

gs © 2001-2005 ver 2.0

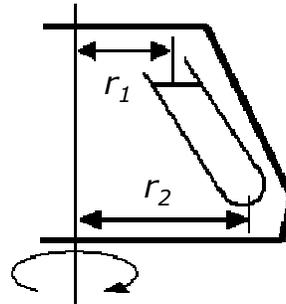
Tecniche analitiche

18

Tempo di sedimentazione

- Il tempo di sedimentazione si ottiene attraverso l'integrazione della legge di Stokes tra due raggi:
 - r_1 = raggio di rotazione alla superficie e
 - r_2 = raggio di rotazione al fondo

$$t = \frac{9}{2} \cdot \frac{\eta}{\omega^2 \cdot r_p^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)} \cdot \ln \frac{r_2}{r_1}$$

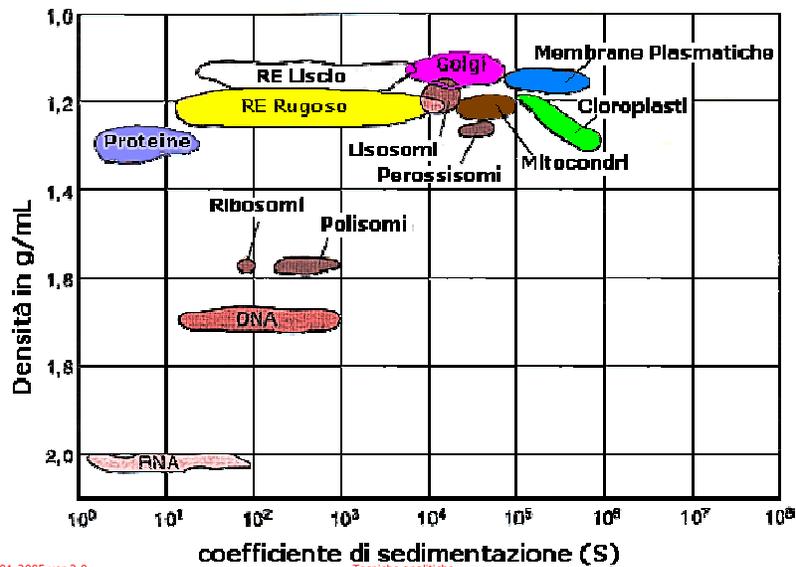


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

19

Coefficiente di sedimentazione



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

20

Centrifugazione(i)

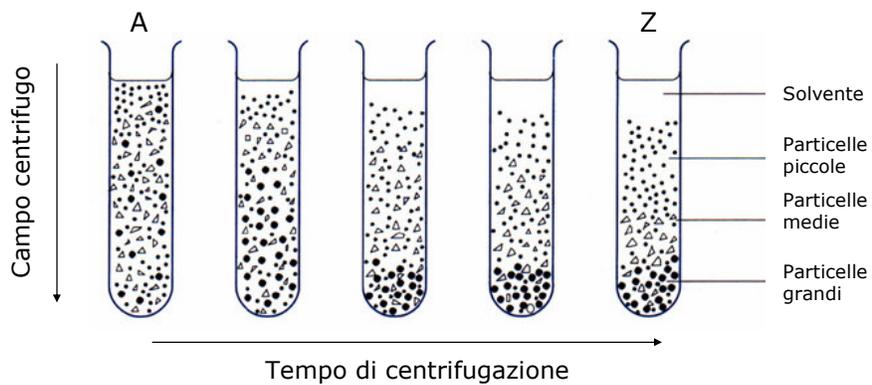
- Tecniche centrifugazione:
 - Centrifugazione differenziale
 - Centrifugazione zonale
 - Centrifugazione isopicnica
 - Centrifugazione isopicnica con gradiente

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

21

Centrifugazione differenziale



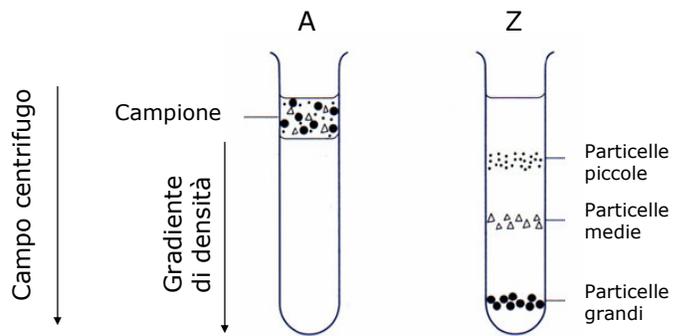
- All'inizio le particelle sono distribuite uniformemente nel mezzo (A), alla fine (Z) sono sedimentate in funzione delle loro dimensioni e della loro densità.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

22

Centrifugazione zonale



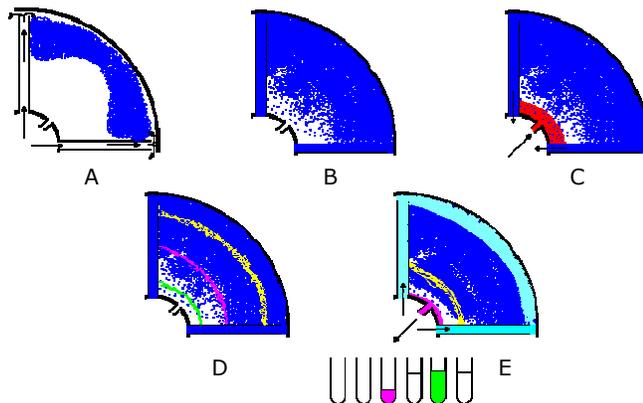
- All'inizio le particelle sono stratificate al di sopra del gradiente (A), alla fine (Z) sono sedimentate in funzione delle loro dimensioni, della loro densità e della densità del mezzo.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

23

Centrifugazione zonale (caricamento ed eluizione in moto)



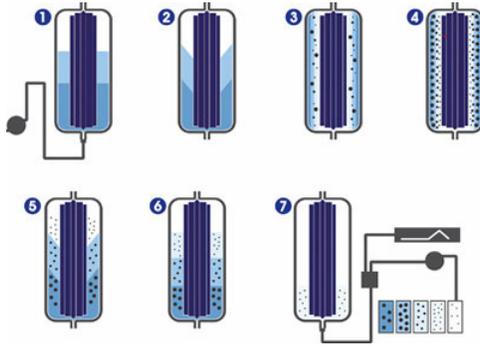
- Il rotore, in moto a bassa velocità, viene caricato con il gradiente dalla periferia.
- Il gradiente è formato
- Viene caricato il campione dal centro.
- Il rotore viene portato in velocità e avviene la sedimentazione.
- Il rotore viene rallentato e le bande vengono eluite usando un solvente più denso.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

24

Centrifugazione zonale (con centrifuga apposita)



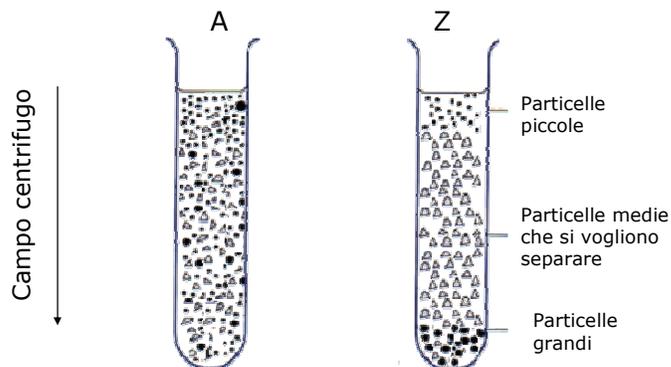
1. Il gradiente è caricato nel rotore.
2. il rotore è accelerato lentamente, il gradiente si riorienta
3. Il campione è pompato ad una estremità del rotore
4. Il campione sedimenta radialmente
5. Alla fine il rotore decelera lentamente,
6. Il gradiente si riorienta senza disturbare le bande di particelle
7. Le bande vengono estratte usando una pompa peristaltica.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

25

Centrifugazione isopicnica



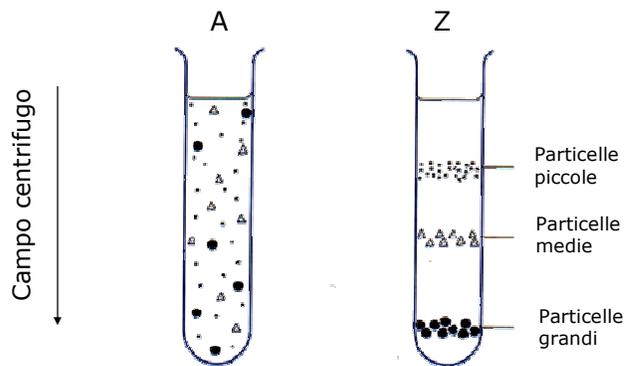
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A) che ha densità uguale a quella delle particelle che si vogliono separare, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del mezzo uguale alla loro.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

26

Centrifugazione isopicnica con gradiente



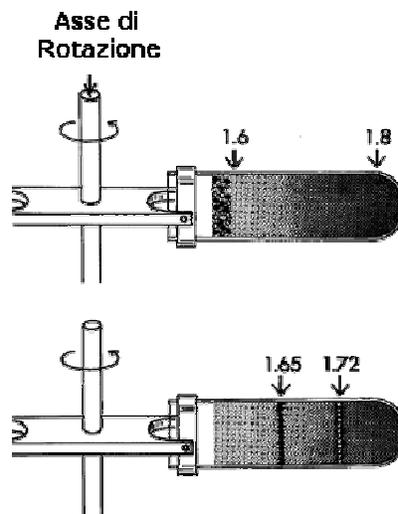
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A), durante la centrifugazione si forma il gradiente, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del gradiente uguale alla loro.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

27

Gradiente su rotore swing-out



gs © 2001-2005 ver 2.0

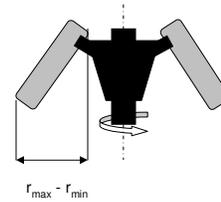
Tecniche analitiche

28

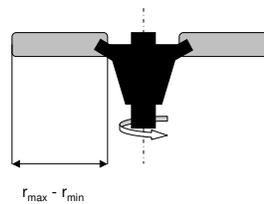
Rotori

- I rotori ad angolo fisso hanno piccole differenze tra r_{\max} e r_{\min}
- Il tempo richiesto per la sedimentazione è minore per rotori ad angolo fisso
- I rotori ad angolo fisso sono più pesanti e necessitano di una maggiore energia per operare
- I rotori a bracci mobili (Swing out) sono da preferire per centrifugare cellule e particelle
- Per sedimentare macromolecole e particelle fini si usano rotori ad angolo fisso
- I rotori a bracci mobili sono da preferire per la centrifugazione su gradiente.

Rotore ad angolo fisso



Rotore swing-out



Centrifughe



• Centrifuga da banco



• Ultracentrifuga

Rotori

- Rotore swing-out



- Rotore ad angolo Fisso



- Rotore zonale

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

31

Tecniche separative: Cromatografia

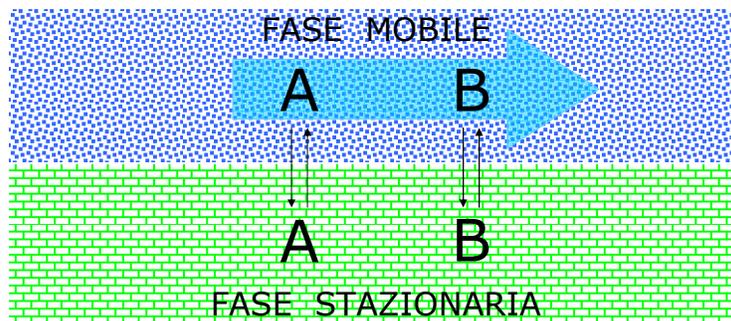
Si chiama cromatografia perché, in origine, permetteva di separare miscele di colori.

Metodi cromatografici

- Le particelle subcellulari, le macromolecole (proteine) differiscono in dimensione e carica, i metodi cromatografici usano queste differenze per la separazione e l'identificazione.
- Il principio si basa sulla differente affinità che una macromolecola ha per una fase stazionaria rispetto alla affinità per una fase mobile.
- Le due fasi sono tra di loro non miscibili.

Metodi cromatografici

EQUILIBRIO



Cromatografie

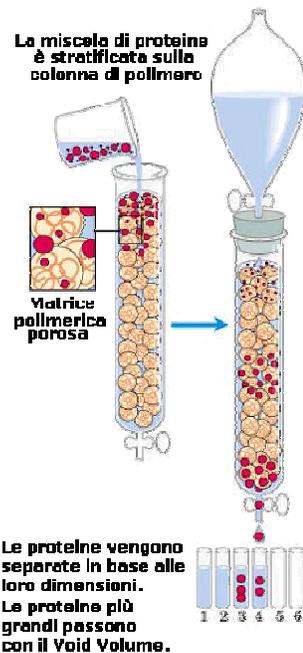
- Gel filtrazione
 - Separazione in base alle dimensioni
- Scambio ionico
 - Separazione in base alla carica
- Per affinità
 - Affinità per ligandi (anticorpi)
 - Proteine ingegnerizzate (His-tag)

Coefficiente di partizione - α

- Il coefficiente di partizione tra le due fasi, α , è definito come il rapporto tra il soluto adsorbito sulla fase stazionaria rispetto a quello in soluzione nella fase mobile.
 - $\alpha = 0$ nessun adsorbimento
 - $\alpha = 1$ tutto adsorbito

Gel filtrazione

- L'interazione avviene tra la proteina e la matrice polimerica.
- La matrice polimerica è fatta di microsferi con porosità controllata.
- Le proteine interagiscono con i pori delle microsferi e vengono trattenute in base alla loro dimensione.
- Se una proteina, molto grande, non interagisce con la matrice esce con un volume di eluente pari al Void Volume (volume vuoto).

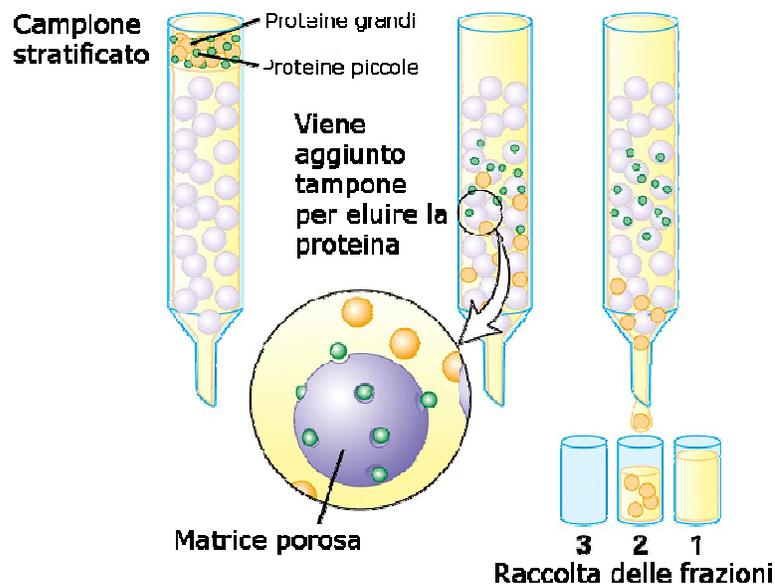


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

37

Gel filtrazione

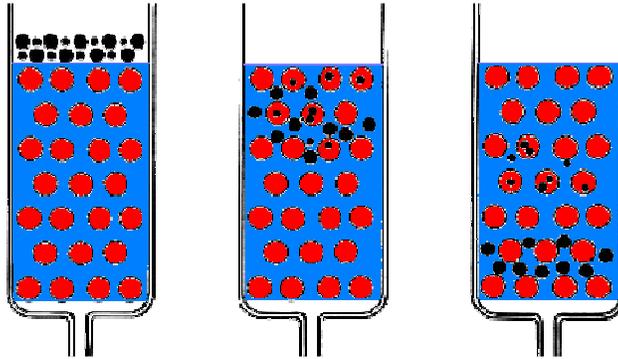


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

38

Gel filtrazione



- Matrice
- Proteine che non interagiscono con la matrice
- Proteine trattenute dalla matrice
- Void Volume (volume vuoto, VV)

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

39

Gel filtrazione

- Vantaggi
 - Semplice
 - Prevedibile
- Svantaggi
 - Bassa capacità (piccoli volumi)
 - Soluzioni non viscosi

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

40

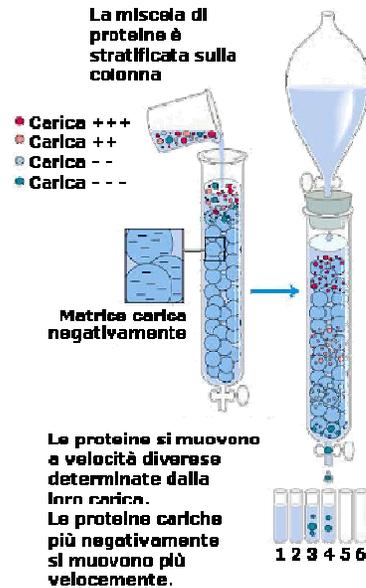
Cromatografia scambio ionica

- **Scambio anionico**

- A pH maggiore del pI (almeno una unità) la proteina è carica negativamente e lega la colonna a scambio anionico.
- L'eluizione avviene con $[Cl^-]$ crescente o abbassando il pH (più difficile da controllare).

- **Scambio cationico**

- A pH minore del pI (almeno una unità) la proteina è carica positivamente e lega la colonna a scambio cationico.
- L'eluizione avviene con $[Na^+]$ crescente o alzando il pH.

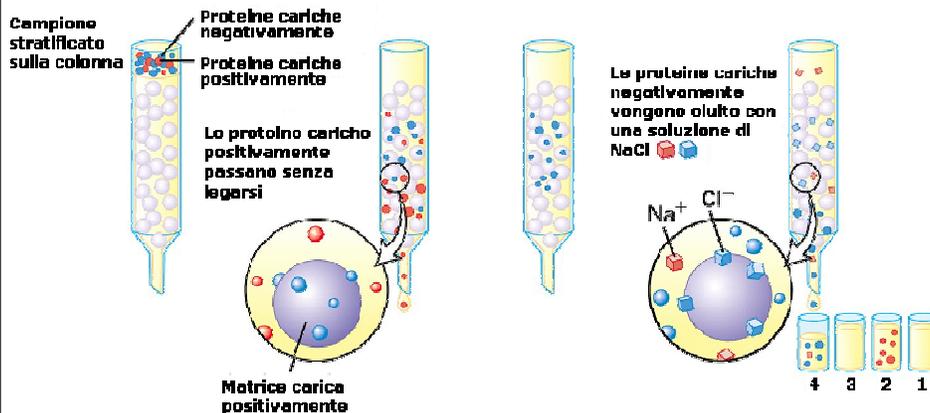


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

41

Cromatografia scambio ionica



gs © 2001-2005 ver 2.0

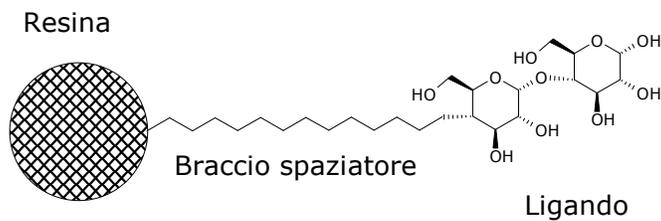
Tecniche analitiche

42

Cromatografia scambio ionica

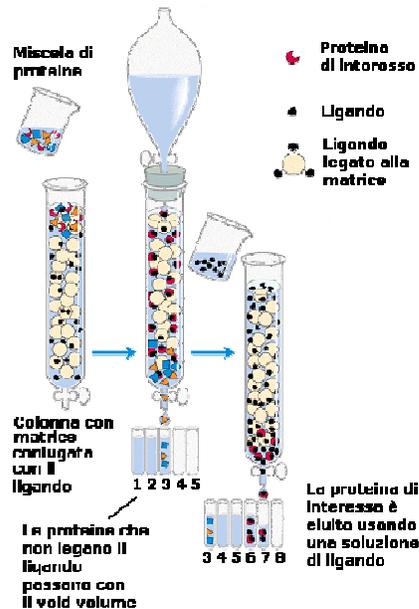
- **VANTAGGI**
 - Per grandi volumi,
 - Grandi quantità di proteina (1-5 g proteina per 100 ml),
 - Matrice molto robusta,
 - Condizioni molto flessibili, possibili molte variazioni.
- **SVANTAGGI**
 - Proteine allo stesso pH e concentrazioni di sali della colonna.
 - Ciò può essere scomodo poiché poi occorre passare in dialisi per togliere i sali.

Cromatografia di affinità



Cromatografia di affinità

- Un ligando ad alta affinità per la proteina è legato alla matrice
- La proteina di interesse si lega al ligando e viene immobilizzata sulla colonna
- Le altre proteine vengono "lavate" via.
- La proteina di interesse viene eluita usando una soluzione di ligando.



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

45

Affinity tags

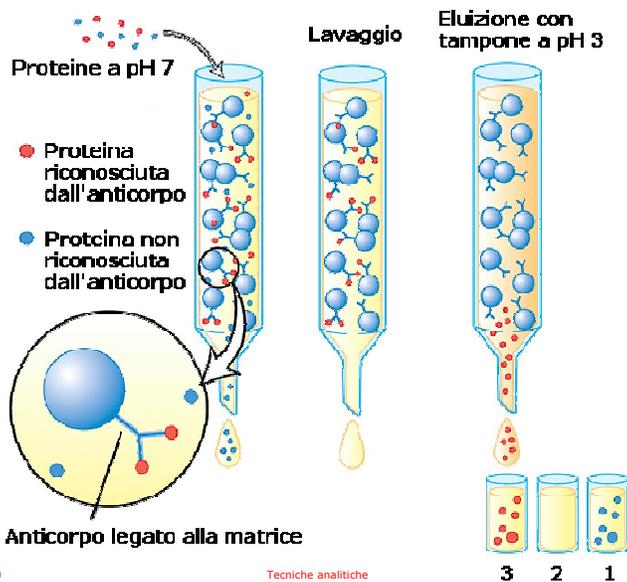
- Gli affinity tags sono si ottengono attraverso la preparazione di proteine ricombinanti. Alla proteina di interesse è legato un tag che presenta affinità con un ligando:
 - TAG
 - GST (glutathione-S-transferasi)
 - MBP (maltose binding protein)
 - biotina
 - Poli-His
 - LIGANDO
 - Glutathione
 - Maltosio
 - Avidina
 - Nichel, Zinco
- Le proteine contenenti affinity tags sono poi isolati per cromatografia di affinità con i ligandi legati alla colonna.
- Le proteine isolate possono poi venire primate degli affinity tag attraverso proteolisi specifica.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

46

Cromatografia di affinità con anticorpi



Cromatografia di affinità

- VANTAGGI
- Alta affinità, costanti di dissociazione nell'ordine del μM , nM o anche pM.
- Legame tutto o nulla:
- Possibili molte variazioni (affinity tags)
- SVANTAGGI
- L'ingombro sterico spesso abbassa la capacità
- Il braccio spaziatore può avere influenza sul legame
- L'eluizione può richiedere un eluente specifico

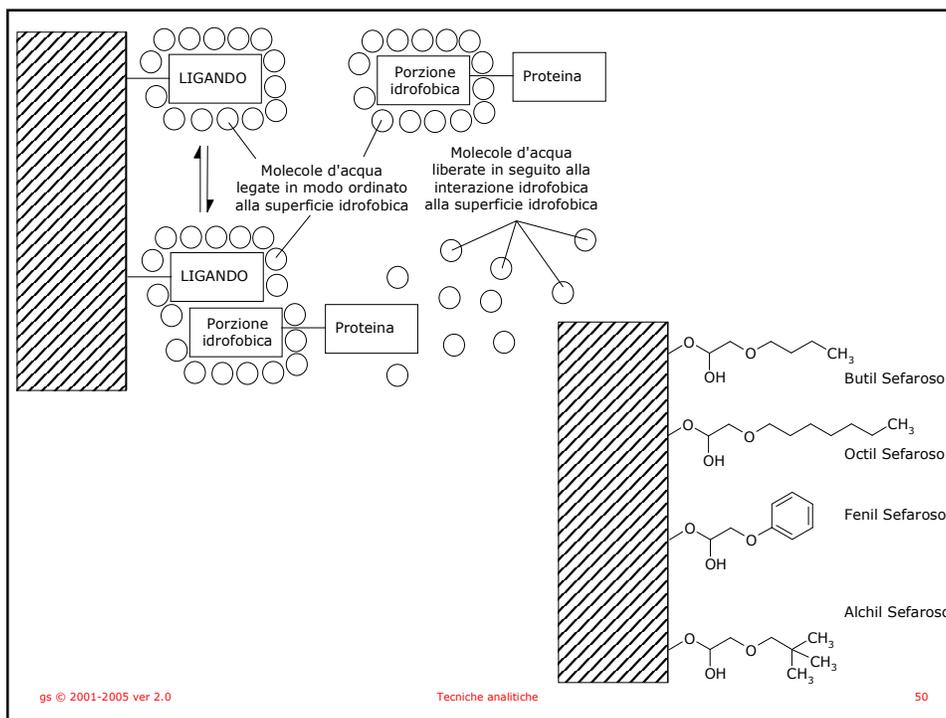
Cromatografia per interazione idrofobica (HIC)

- È un tipo di cromatografia sviluppato per la purificazione di proteine, le separa sulla base della loro idrofobicità di superficie.
- I sali ad alta concentrazione riescono ad esporre le regioni idrofobiche, sottraendo le molecole d'acqua ordinate
- le proteine tendono così ad interagire fra loro ("salting out"). Nella HIC queste regioni così esposte tendono ad interagire con una fase stazionaria costituita da gruppi idrofobici.
- È una cromatografia che è vantaggioso applicare ad esempio dopo il frazionamento con ammonio solfato.
- L'eluizione può essere fatta con forza ionica decrescente oppure per "spiazzamento" con detergenti non ionici (Tween 20, Triton X-100).
- Potenziali svantaggi:
 - in alcuni casi le condizioni di eluizione possono provocare denaturazione.
 - non è predicibile, può applicarsi bene ad alcune proteine ma non ad altre.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

49

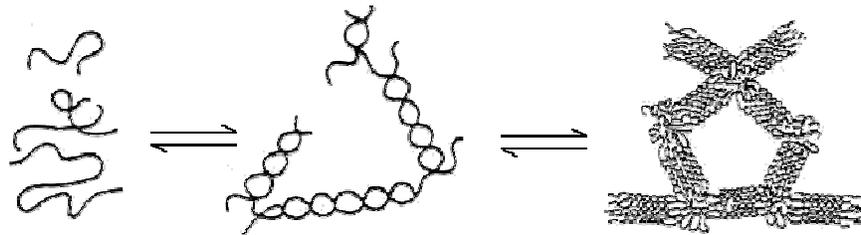


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

50

Formazione della matrice



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

51

Tipi di matrici utilizzate

- **Agarosio** Polisaccaride derivante da particolari alghe rosse costituito da residui alternati di D-galattoso e 3,6-anidro-L-galattoso. Disponibile commercialmente come Sepharose, Sepharose CL (cross-linking con 2,3-dibromopropanolo), Superose, Bio-Gel A. Limiti di esclusione 10-40000 kD.
- **Cellulosa** Polimero di unità glucosidiche unito da legami β -1,4. Tramite epicloridrina vengono ottenuti i legami crociati essenziali per l'utilizzo come matrice in cromatografia, il numero dei quali determina la dimensione dei pori.
- **Destrano** Polimero di residui di glucosio uniti da legami β -1,6 prodotto dal batterio *Leuconostoc mesenteroides*. In commercio con il nome di Sephadex. La porosità dei gel a base di destrano è controllata dalla massa molecolare del destrano usato e dall'introduzione di legami crociati ottenuti con epicloridrina. Limiti di esclusione 0.7-800 kD.
Il Sephacryl è destrano con legami crociati ottenuti con N,N'-metilene bisacrilamide. Limiti di esclusione 1-8000 kD. Il Superdex è un gel composto costituito da destrano covalentemente legato ad agarosio.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

52

Tipi di matrici utilizzate

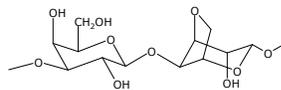
- **Poliacrilamide**: Polimero di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilamide (quest'ultimo determina la formazione di legami crociati). E' disponibile in commercio come Bio-GelP, con limiti di esclusione tra 0.2 e 400 kD.
- **Polistirene** Polimero di stirene legato con divinilbenzene.
- **Silice** Polimero prodotto a partire dall'acido ortosilicico. I molti gruppi silanolo (Si-OH) rendono la matrice altamente idrofila. Il loro eccesso può essere eliminato derivatizzando con triclormetilsilano.

gs © 2001-2005 ver 2.0

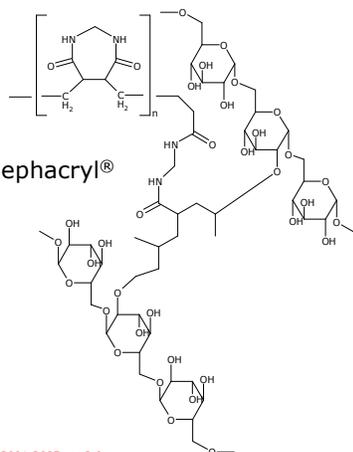
Tecniche analitiche

53

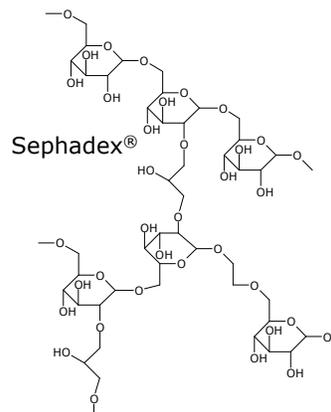
Matrici



Agarosio

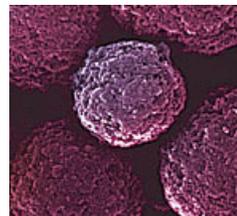


Sephacryl®



Sephadex®

Silice



gs © 2001-2005 ver 2.0

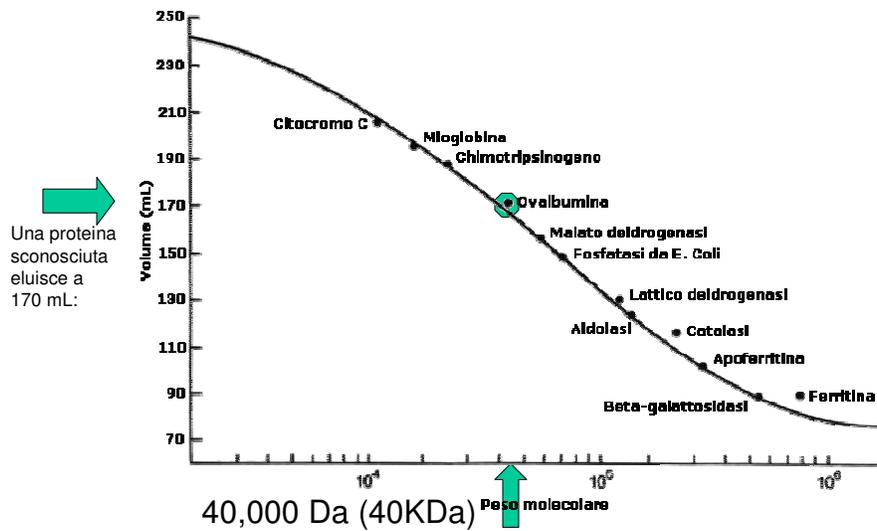
Tecniche analitiche

54

Cromatografia come tecnica analitica

Separare e riconoscere

Determinazione peso molecolare



Una proteina sconosciuta eluisce a 170 mL:

L'intervallo di peso molecolare dipende dalla dimensione dei pori della matrice

| Materiale | intervallo PM |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| • Dextran Sephadex G-25 | 1000-5000 |
| • Dextran Sephadex G-200 | 5000-800,000 |
| • Polyacrylamide Bio-gel P-60 | 3000-60,000 |
| • Agarose Bio-gel A-150 M | 1×10^6 - 150×10^6 |
| • La velocità dipende dalla forma | |
| - Denaturazione | |

La cromatografia come sistema analitico

- Gel filtrazione
 - Massa della proteina
- Poly Acrilamide Gel Electrophoresis
 - Denaturante (SDS-PAGE)
 - Non denaturante

Elettroforesi

- Sotto l'azione di un campo elettrico particelle cariche migrano verso l'elettrodo di segno opposto.
- È una tecnica soprattutto ANALITICA ma anche PREPARATIVA.
- È un mezzo di separazione molto potente, fra i più usati in biochimica

Forza elettrica : $F_{el} = q \cdot E$ (carica · campo elettrico applicato)
 Forza frizionale : $F_{fr} = f \cdot v$ (fattore di frizione · velocità)
 Fattore di frizione: $f = 6\pi r \eta$ (r = raggio, η = viscosità del mezzo)

- Quando si bilanciano:

$$q \cdot E = f \cdot v$$

$$v = \frac{q}{f} \cdot E$$

mobilità elettroforetica : $\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$

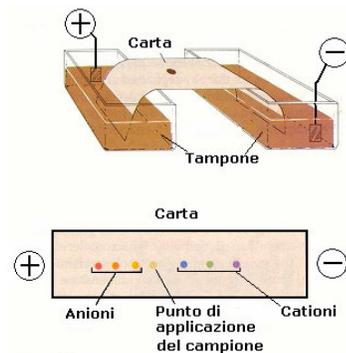
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

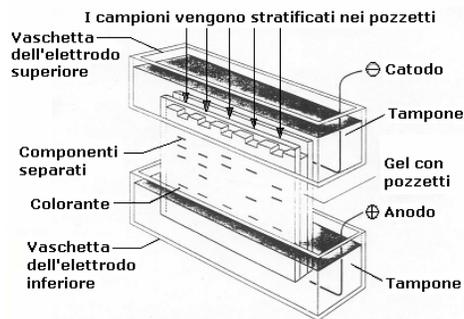
59

Elettroforesi su supporto

su carta



su gel



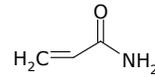
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

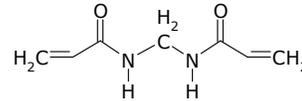
60

Poly Acrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)

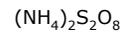
- Acrilamide monomero (neurotossico)



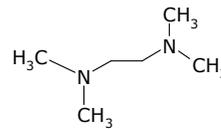
- N,N'-bisacrilamide (BIS) ramificante



- Ammonio persolfato (APS) forma radicali



- N,N,N,N-Tetrametil-Etilenediamina (TEMED) stabilizza i radicali

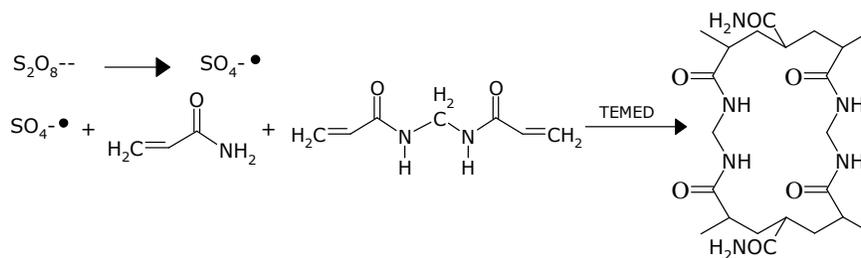
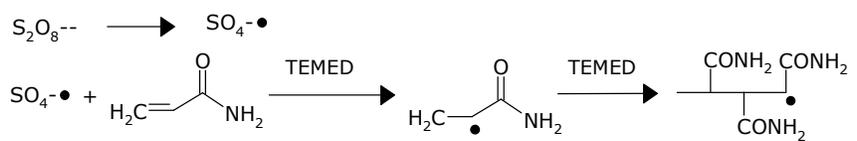


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

61

Polimerizzazione



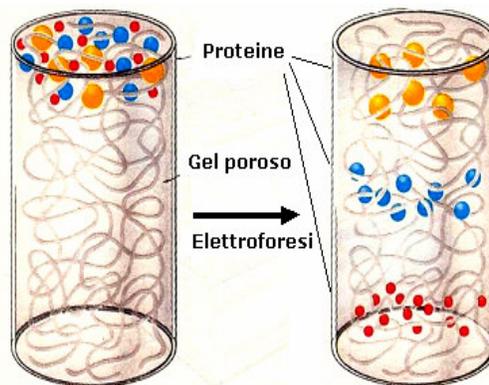
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

62

Elettroforesi

- Il passaggio di corrente elettrica attraverso il gel permette la migrazione delle proteine (caricate negativamente a pH >8) verso l'anodo.
- La porosità del gel determina la resistenza al passaggio delle molecole, quelle di maggior dimensioni saranno più rallentate.



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

63

Struttura del gel

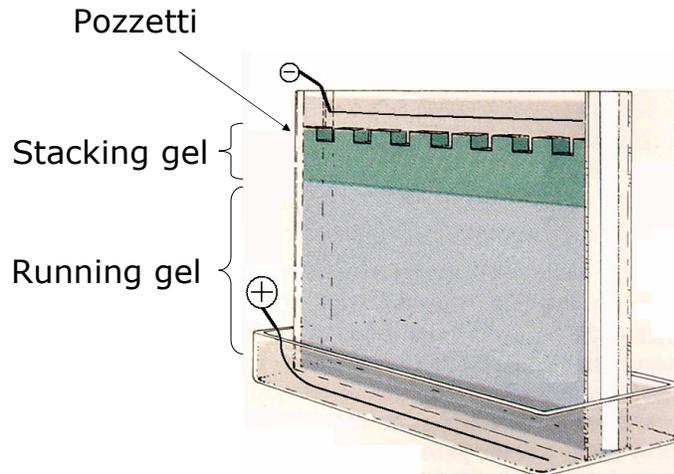
- Il gel consiste in due gel a differenti concentrazioni di acrilamide e a diverso pH
- Running gel:
 - Questo gel viene fatto per primo e si trova nella parte inferiore, attraverso questo gel avviene la separazione delle proteine in base al peso molecolare.
 - La concentrazione di acrilamide definisce le proprietà separative del gel.
 - Il pH è basico (8.3) per avere le proteine nella forma anionica affinché migrino verso l'anodo.
- Stacking gel:
 - Ha una concentrazione di acrilamide minore (4.5%) ed è a pH 6.8 in modo da permettere l'entrata simultanea delle proteine nel running gel appena viene applicato il campo elettrico.
 - Viene polimerizzato in presenza di un pettine per creare i pozzetti.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

64

Struttura del gel



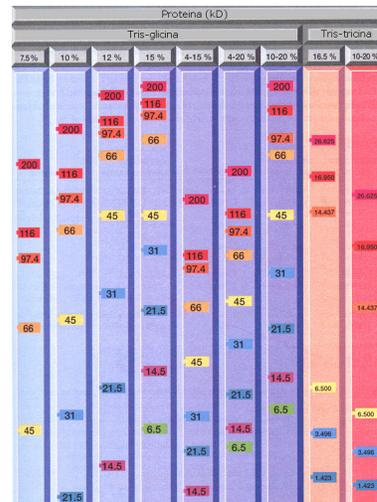
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

65

Proprietà separative

| % Acrilamide nel running gel | Intervallo di pesi molecolari separabili |
|------------------------------|--|
| 5 - 10 | 20.000 - 150.000 |
| 10 - 15 | 10.000 - 80.000 |
| >15 | < 15.000 |
| Bisacrilamide = 5% | |



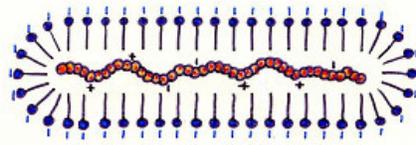
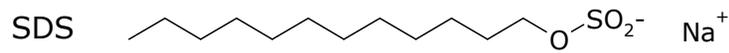
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

66

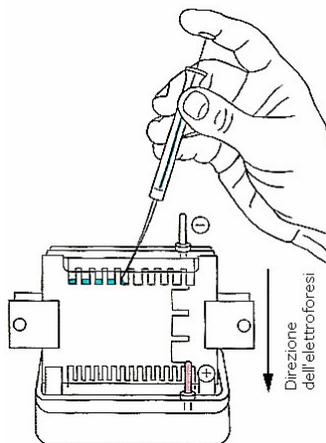
SDS-PAGE

- La presenza di un detergente come il sodio dodecilsolfato (SDS) provoca la denaturazione delle proteine e la loro copertura con cariche negative.

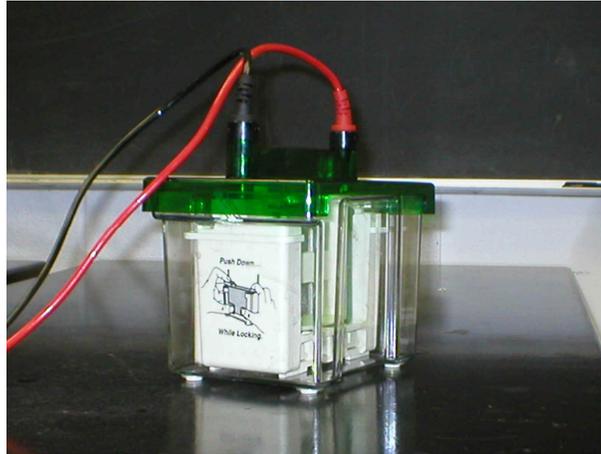


- Permettendo la determinazione dei pesi molecolari.

Caricamento di un gel



Cella per elettroforesi

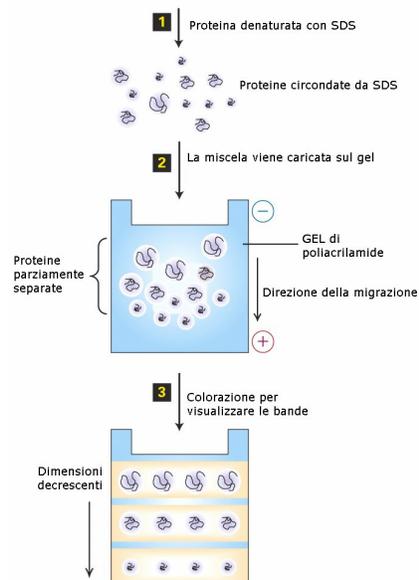


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

69

SDS-PAGE



- Separazione di proteine denaturate

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

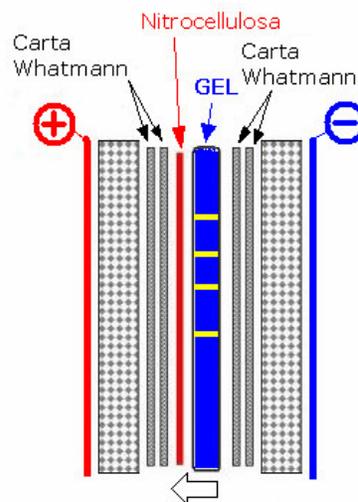
70

Colorazioni del GEL

- Il gel può essere colorato con:
- Coloranti (Blù di Coomassie, nero d'amido)
- Metalli
 - **Rame** C. Lee, A. Levin and D. Branton: Copper staining: a five- minute protein stain for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels; *Anal. Biochem.* (1987) 166, 303-312;
 - **Argento** Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (1987) 8, 93-99.

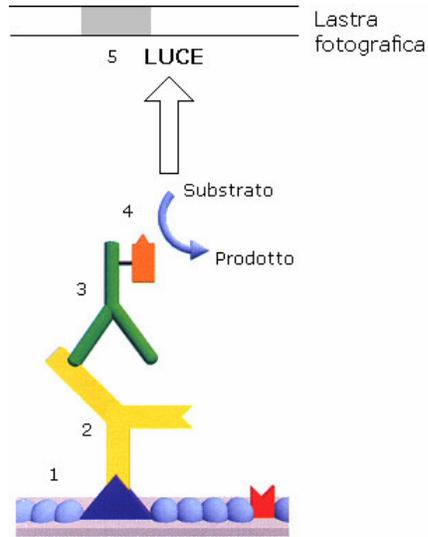
Colorazioni del GEL

- Le proteine possono essere trasferite su un supporto più stabile (nitrocellulosa) e quindi colorate usando anticorpi specifici
 - Western-blotting



Western-blotting

1. Proteina su nitrocellulosa
2. Anticorpo specifico per la proteina
3. Anti-anticorpo coniugato con una
4. Attività enzimatica che produce luce che impressiona
5. una lastra fotografica



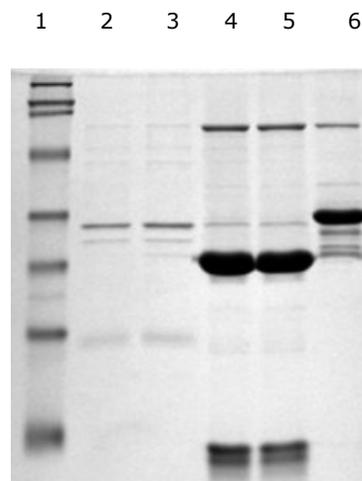
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

73

Risultato

Lane 1: standard pei molecolari
Lane 2-6: campioni

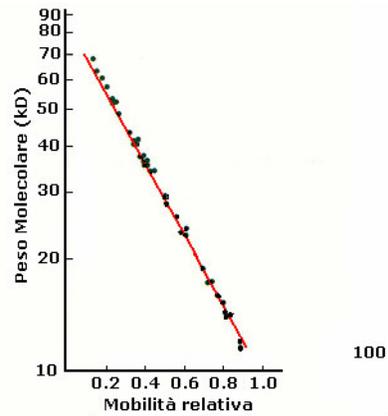


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

74

Risultato



Weber, K. e Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

Tecniche analitiche: Spettrofotometria

Interpretare uno spettro

Spettroscopia

- Tutte le spettroscopie consistono nella misura delle interazione energia-materia.
- L'assorbimento di energia da parte di una molecola può provocare delle variazioni chimiche o fisiche (proprietà degli elettroni o del nucleo) della specie chimica.
- L'assorbimento o l'emissione possono fornire informazioni sulla struttura della molecola e/o le variazioni che una essa subisce.

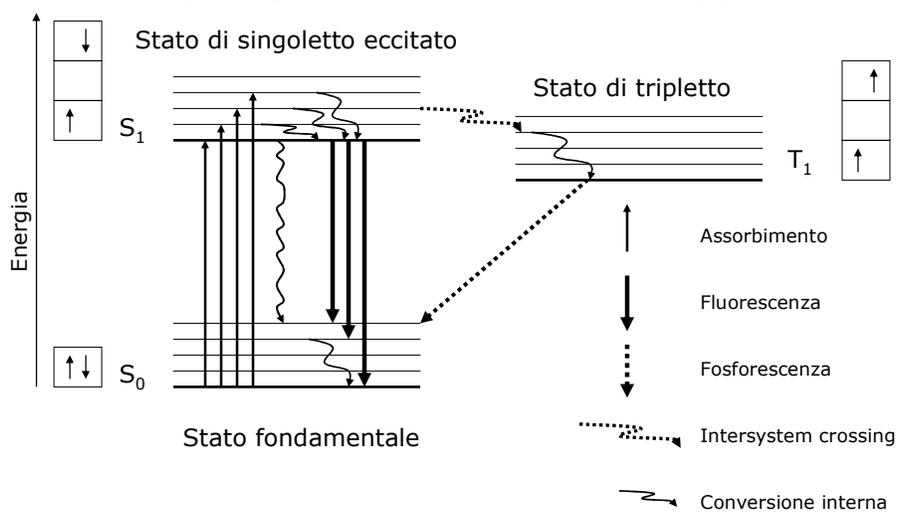
Interazione tra energia e materia

| λ (nm) | ν (Hz) | Regione dello spettro | Interazioni (Spettroscopia) |
|--|---------------------------------------|-----------------------|--|
| $10^6 - 10^{10}$ | $3 \cdot 10^{11} - 3 \cdot 10^7$ | Radio | Spin nucleare, spin elettronico (NMR - EPR) |
| $10^3 - 10^5$ | $3 \cdot 10^{14} - 3 \cdot 10^{12}$ | Radiazioni InfraRosse | Vibrazioni, rotazioni (IR) |
| $4 \cdot 10^2 - 8 \cdot 10^2$ (400-800) | $7.5 \cdot 10^{14} - 3 \cdot 10^{14}$ | Luce Visibile | Transizioni elettroniche (Spettroscopie ottiche) |
| $2 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^2$ (200-300) | $1.5 \cdot 10^{15} - 1 \cdot 10^{15}$ | Luce UltraVioletta | |
| $10^{-3} - 10^0$ | $3 \cdot 10^{20} - 3 \cdot 10^{17}$ | Raggi X | Gusci interni (Spettroscopie X) |

Principio di Frank-Condon:

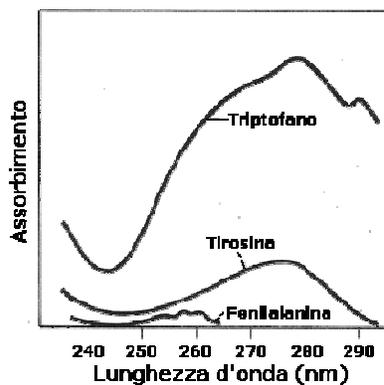
Durante la transizione NON CAMBIA LA POSIZIONE degli atomi della molecola.

Le transizioni elettroniche (Diagramma di Jablonsky)



Lo spettro

- È la rappresentazione grafica dell'intensità della luce (trasmessa o assorbita) in funzione della lunghezza d'onda che colpisce il campione.
- Se una soluzione è colorata significa che assorbe la luce del "colore" complementare



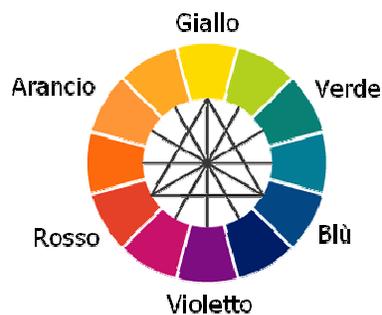
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

81

Lo spettro

- È la rappresentazione grafica dell'intensità della luce (trasmessa o assorbita) in funzione della lunghezza d'onda che colpisce il campione.
- Se una soluzione è colorata significa che assorbe la luce del "colore" complementare

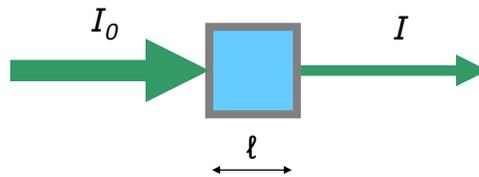


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

82

Legge di Lambert-Beer

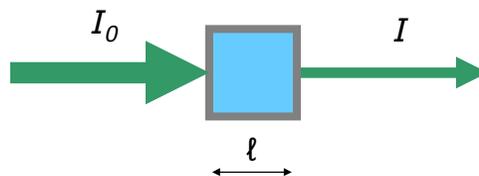


$$T = \frac{I}{I_0};$$
$$0 < T < 1$$

La trasmittanza T è una
funzione esponenziale di:
 l = percorso ottico
 ϵ = assorbanza
concentrazione unitaria
 C = concentrazione

$$T = 10^{-\epsilon l c}$$

Legge di Lambert-Beer



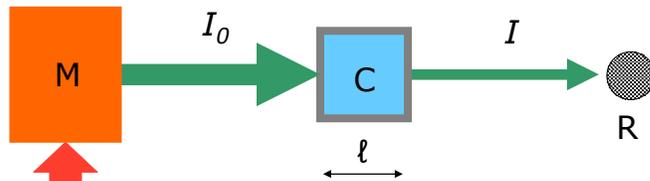
Trasmittanza

$$T = 10^{-\epsilon l c}$$

$$-\log T = \log \frac{1}{T} = \epsilon l c = A$$

Assorbanza

Lo strumento



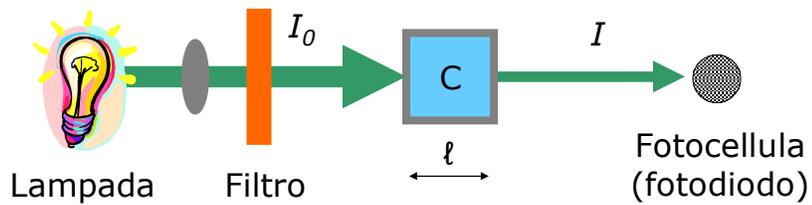
- S = sorgente
- M = sistema di selezione del "colore"
- C = campione
- R = rivelatore

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

85

Lo strumento

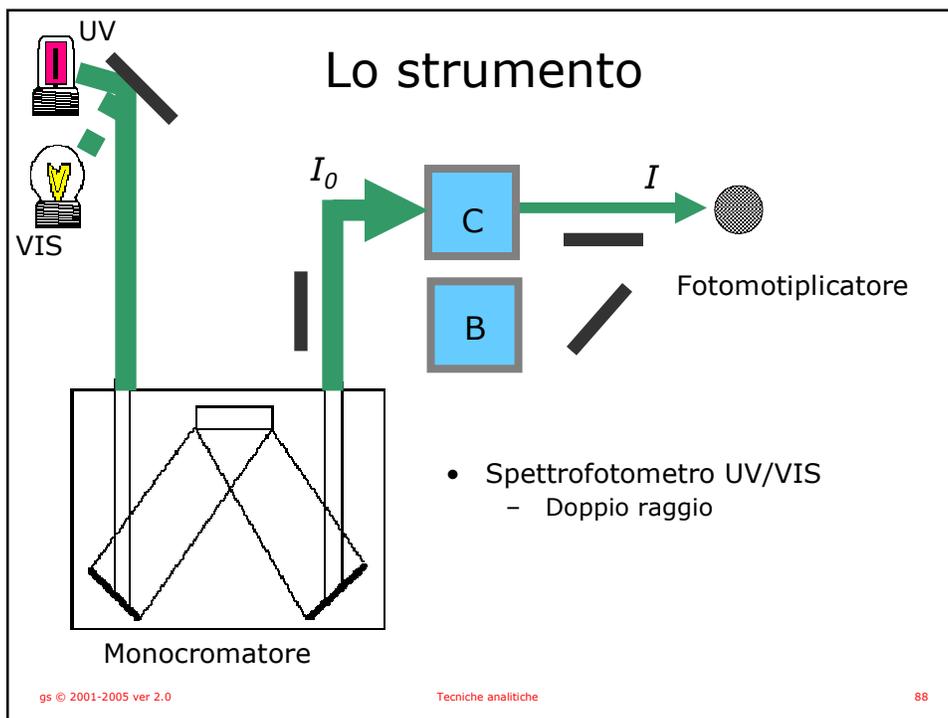
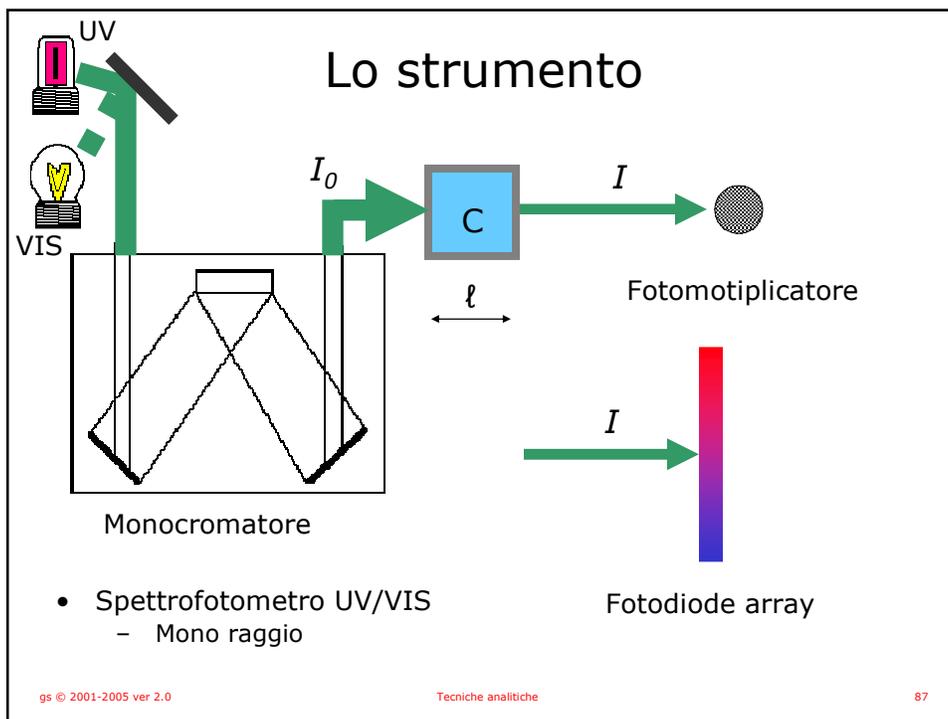


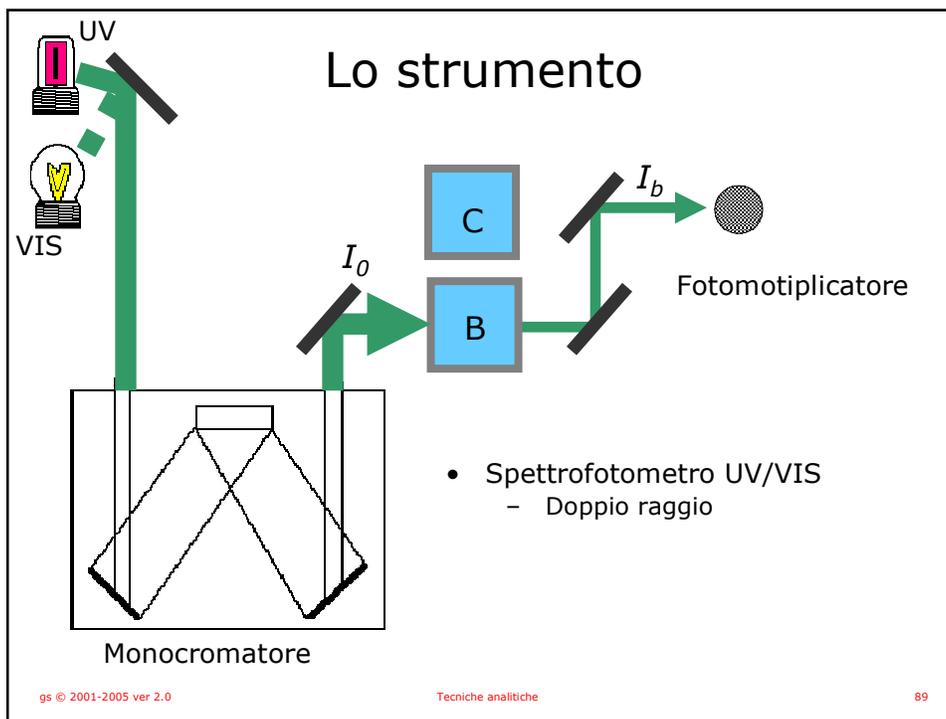
- Colorimetro (fotometro)

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

86





- ## Problemi
- Concentrazione
 - Troppo bassa
 - Troppo alta
 - Torbidità
 - Lunghezza d'onda
 - Contenitori
- gs © 2001-2005 ver 2.0 Tecniche analitiche 90

Determinazione spettrofotometrica di proteine

- Misura diretta a 280 nm
 - Aminoacidi aromatici
- Misura diretta a 205 nm
 - Legame peptidico
- Metodi indiretti
 - Biureto
 - Folin-Lowry
 - Acido bicinconinico
 - Bradford (blù di Coomassie)

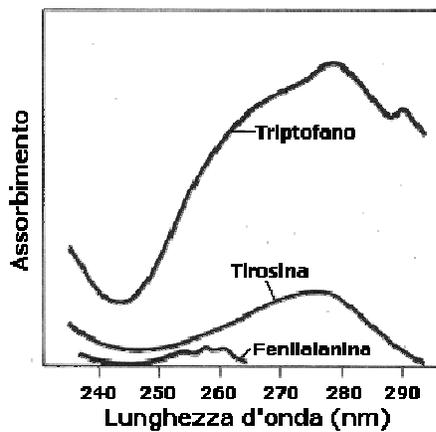
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

91

Aminoacidi aromatici

| | Lunghezza d'onda | Assorbanza molare ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |
|--------------|------------------|--|
| Fenilalanina | 257.4 nm | 197 |
| Tirosina | 274.6 nm | 1420 |
| Triptofano | 279.8 nm | 5600 |



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

92

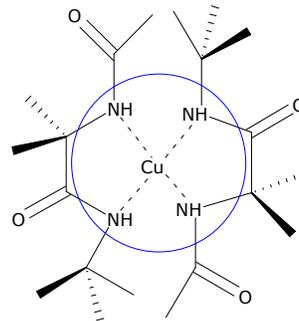
Aminoacidi aromatici

- Empiricamente il coefficiente di estinzione molare di un polipeptide può essere determinato misurando l'assorbimento a 280 nm:

$$\text{Coefficiente di estinzione Molare} = \frac{\text{Numero di Tyr} \times 1280 + \text{numero di Trp} \times 5690}{\text{Peso molecolare}}$$

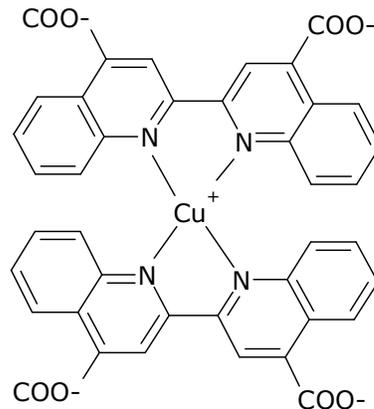
Metodi indiretti

- **Biureto:**
 - CuSO_4 in ambiente basico
 - Formazione di complessi rameici con i legami peptidici
 - Assorbimento a 550 nm
 - Interferiscono ioni NH_4^+
 - Si producono ioni Cu^+ dalla riduzione ad opera di aminoacidi aromatici
- **Folin-Lowry**
 - Gli ioni Cu^+ riducono una miscela di acidi misti fosfomolibdotungstici (reattivo di Folin-Ciocalteu)
 - Assorbimento a 750 nm



Metodi indiretti

- **Acido biconinico (BCA)**
 - Gli ioni Cu^+ riducono l'acido biconinico che assorbe a 562 nm
 - Semplice e sensibile



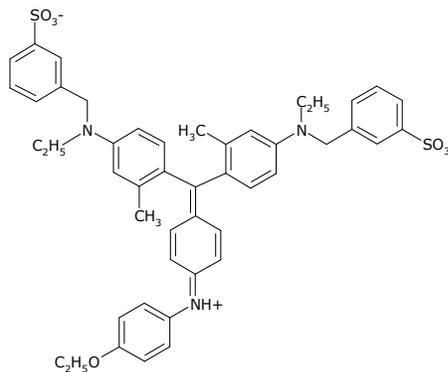
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

95

Metodi indiretti

- **Bradford**
 - Si basa sul legame del colorante Blù di Coomassie® con aminoacidi aromatici e ionici
 - Si legano da 1.5 a 3 mole di colorante per carica positiva della molecola



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

96

Assorbimento e fluorescenza

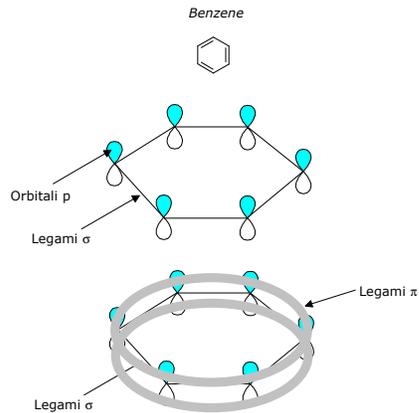
Un poco più nel dettaglio

Tipi di transizione

- L'assorbimento di luce da parte di una molecola corrisponde ad un assorbimento di energia che promuove un elettrone da uno stato fondamentale ad uno stato eccitato (singoletto eccitato).
- Una volta eccitata elettronicamente una molecola torna al più basso stato eccitato attraverso una serie di rilassamenti vibrazionali e rotazionali che dissipano energia senza emissione di luce (*conversione interna*).

Elettroni

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



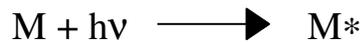
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

99

Lo stato eccitato

- L'assorbimento
 - Formazione dello stato eccitato



- L'emissione
 - Decadimento dello stato eccitato



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

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

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

100

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).

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



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

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

Cinetica dei fenomeni

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

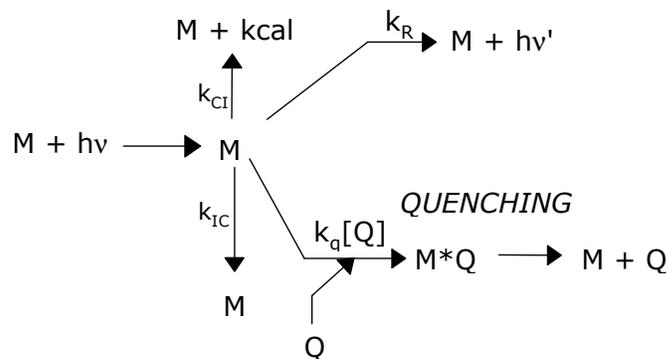
I processi di fosforescenza ed intersystem crossing prevedono l'inversione dello spin dell'elettrone, processo proibito, che però avviene poiché esiste l'interazione spin-orbita, cioè l'accoppiamento dello spin degli elettroni con i momenti angolari orbitali.

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**

In sintesi



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

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

Φ_f = 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).

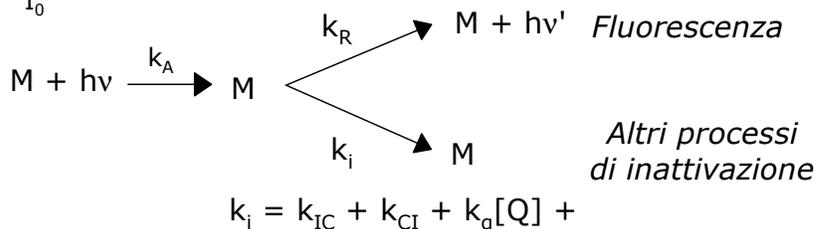
Illuminazione

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



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

- In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

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

Condizioni fotostazionarie

In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

$$k_A k_R [M] hn = k_R (k_R + k_i) [M^*]$$

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

fotoni emessi per unità di tempo

fotoni assorbiti per unità di tempo

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

Relazioni fondamentali

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

$$\Phi_f = \frac{k}{\{k_R + k_{iC} + k_{Ci} + k_q[Q] + \dots\}} = \frac{k}{k_R + k_i}$$

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

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

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

109

Identikit di una molecola fluorescente

- Una molecola è fluorescente quando:
 - Ha uno spettro di assorbimento (un elettrone, n o π , raggiunge uno stato eccitato);
 - Lo stato eccitato ha un tempo di vita (si rilassa lo stato eccitato);
 - Lo stato eccitato non si rilassa completamente allo stato fondamentale.

- **COMPOSTI AROMATICI!!!**

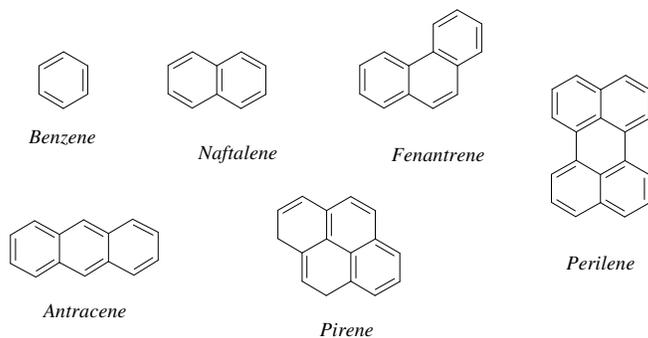
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

110

Sono in genere fluorescenti...

- I policiclici aromatici e i loro derivati:



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

111

Effetto dei sostituenti sulla fluorescenza del benzene

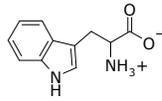
| Molecola | $\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm) | Intensità | Molecola | $\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm) | Intensità |
|-------------------------|---|-----------|-----------------------------|---|-----------|
| <chem>c1ccccc1</chem> | 270-310 | 10 | <chem>Oc1ccccc1</chem> | 285-265 | 18 |
| <chem>Cc1ccccc1</chem> | 270-320 | 17 | <chem>[O-]c1ccccc1</chem> | 310-400 | 10 |
| <chem>Clc1ccccc1</chem> | 275-345 | 7 | <chem>Nc1ccccc1</chem> | 310-405 | 20 |
| <chem>Ic1ccccc1</chem> | - | 0 | <chem>[NH3+]c1ccccc1</chem> | - | 0 |

gs © 2001-2005 ver 2.0

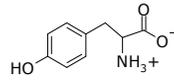
Tecniche analitiche

112

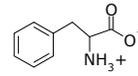
Biomolecole fluorescenti...



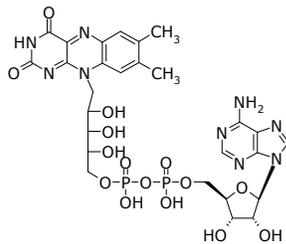
Triptofano (W)



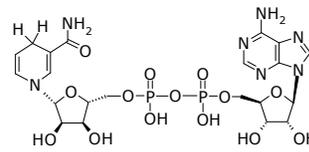
Tirosina (Y)



Fenilalanina (P)



FAD



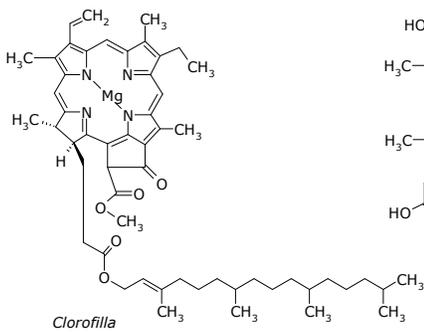
NADH

gs © 2001-2005 ver 2.0

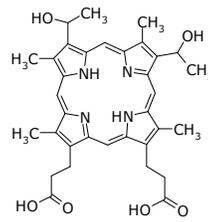
Tecniche analitiche

113

...altre biomolecole fluorescenti...



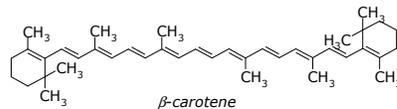
Clorofilla



Ematoporfirina



GFP



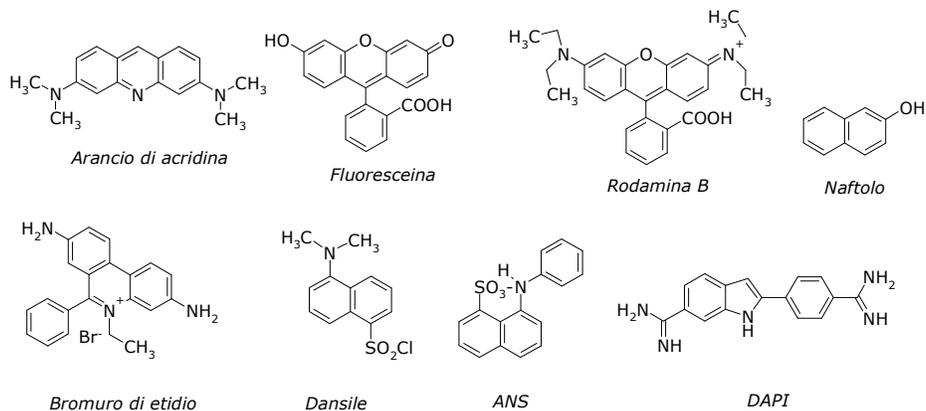
β -carotene

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

114

...e molecole fluorescenti usate in biologia



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

115

Strumentazione

- Fluorimetro "statico":
 - Sorgente: continua (*lampada a scarica in Xenon*).
 - Misura: Φ_f e gli spettri di emissione.
- Fluorimetro "dinamico":
 - Sorgente: pulsata (*Laser, luce di sincrotrone, lampada pulsata*).
 - Misura: tempi di vita di fluorescenza (τ_f).

gs © 2001-2005 ver 2.0

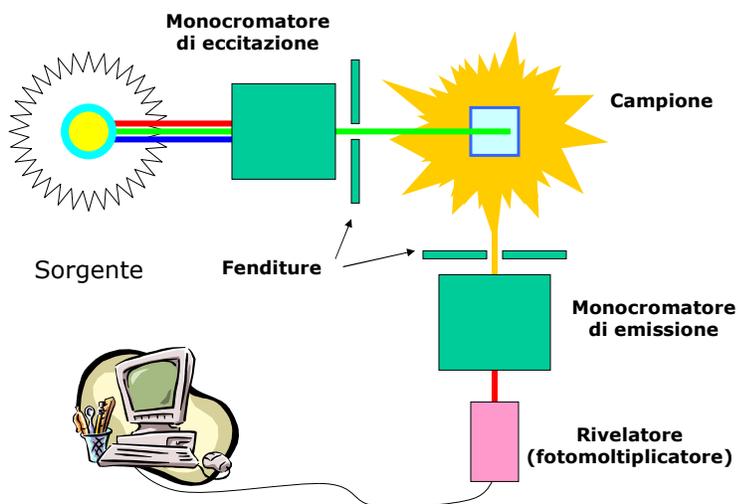
Tecniche analitiche

116

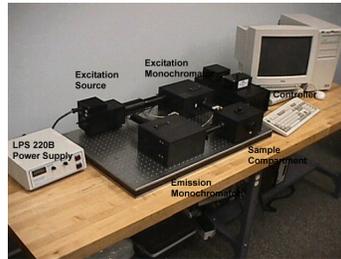
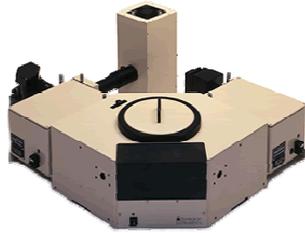
Schemi ottici

- A **L**: il più comune.
- A **T**: misure di anisotropia di fluorescenza.
- A 0° : microscopia, epiluminescenza, analisi di superfici o strati.

Geometria a 90°



Fluorimetri

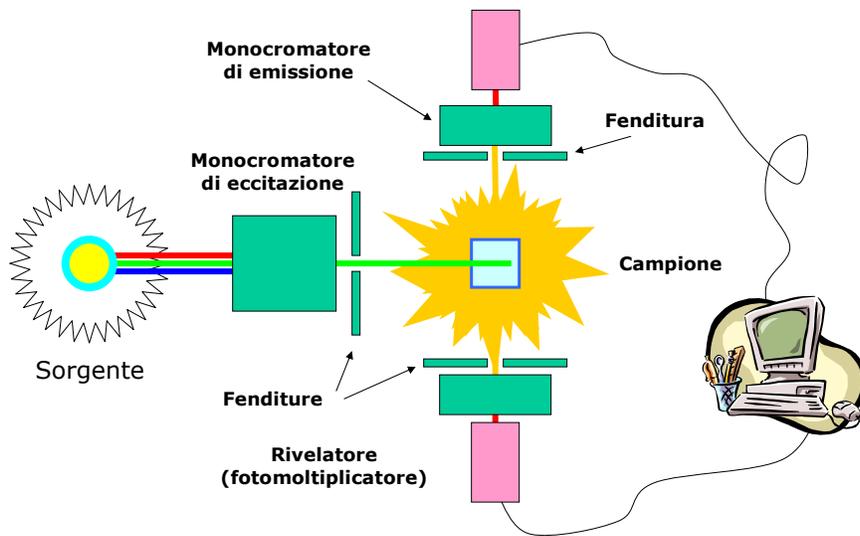


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

119

Geometria a T



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

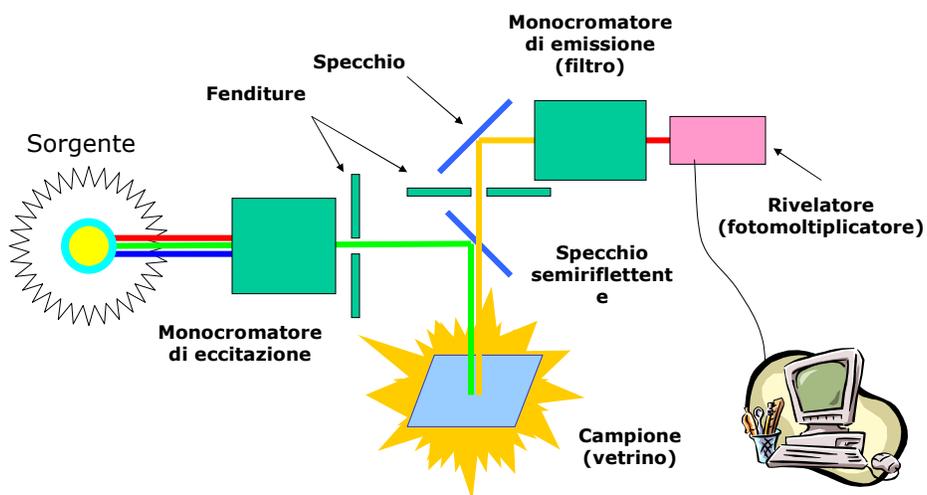
120

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.

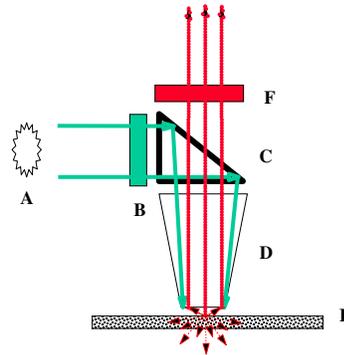


Geometria a 0°



Microscopio a fluorescenza

- A. Lampada
- B. Filtro di eccitazione
- C. Prisma semiriflettente
- D. Obiettivo
- E. Oggetto
- F. Filtro in emissione

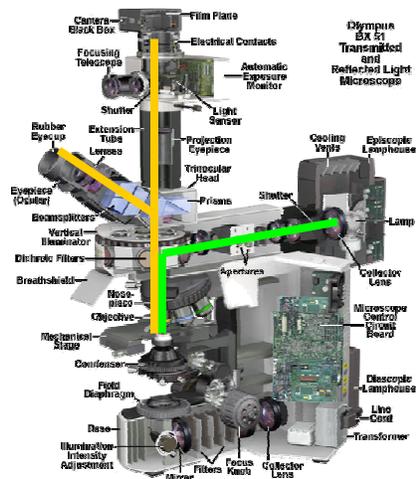


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

123

Microscopio a fluorescenza



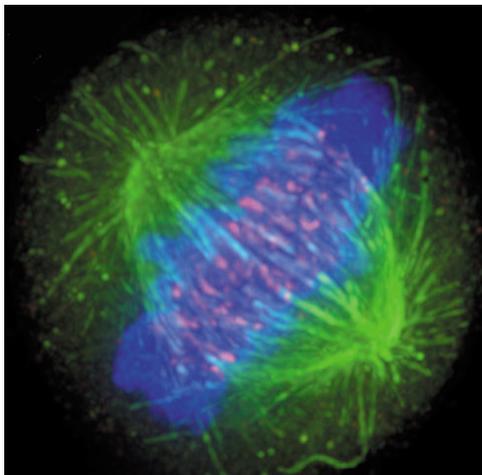
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

124

Cosa si può vedere in un microscopia a fluorescenza

- Blu** DAPI legato al DNA.
- Rosso** anticorpo fluorescente legato al centromero.
- Verde** anticorpo fluorescente legato alla tubulina.



Spettri di assorbimento ed eccitazione

- La differenza tra le due risposte spettrali
 - Assorbimento è il segnale di estinzione della luce a causa della transizione elettronica.
 - Eccitazione è il segnale di emissione della luce assorbita ad una data lunghezza d'onda.
- Quando una molecola emette luce significa che ha sempre assorbito energia. Quando una molecola assorbe non sempre emette luce.

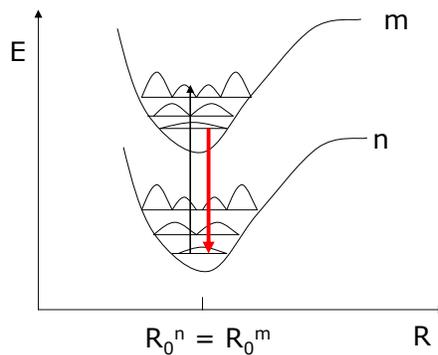
Spettri di assorbimento ed emissione

- I fenomeni di disattivazione non radiativa (k_i) dissipano l'energia accumulata dallo stato eccitato.
- L'emissione avverrà quindi ad energia più bassa (maggiore lunghezza d'onda).
- La differenza in energia è detta "Stokes' shift".

$$E = h\nu; \nu = c/\lambda$$

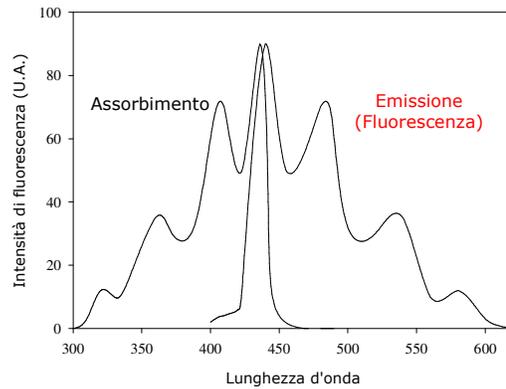
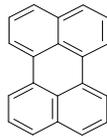
Transizione simmetrica

- Se la configurazione dello stato eccitato è simile allo stato fondamentale si osserva una simmetria speculare tra lo spettro di eccitazione e lo spettro di emissione.



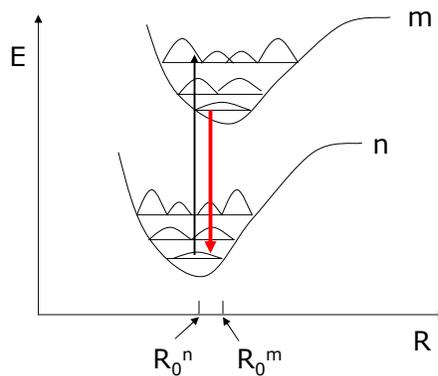
Perilene

- Il perilene ha una struttura compatta, non ci sono variazioni di struttura allo stato eccitato, si ha simmetria speculare.



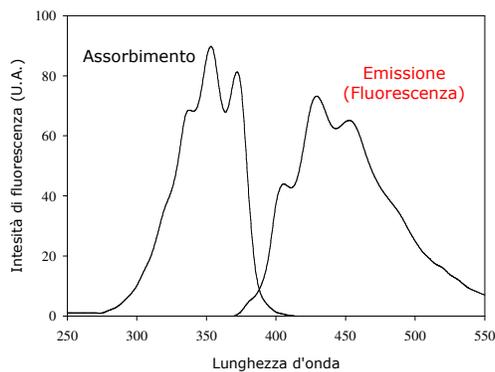
Transizione asimmetrica

- Se lo stato eccitato subisce una perturbazione (cambia la struttura della molecola, avvengono reazioni allo stato eccitato, vi è energy transfer o charge transfer, ecc.) si perde la simmetria speculare tra lo spettro di eccitazione e lo spettro di emissione.



Difenilesatriene (DPH)

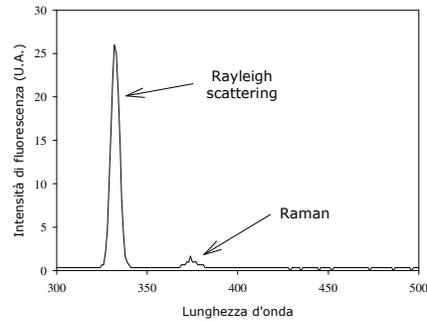
- Il DPH può subire una isomerizzazione *cis-trans* allo stato eccitato. Lo spettro di emissione non è speculare a quello di eccitazione.



Artefatti spettrali

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

Rayleigh scattering e Raman



- Spettro di emissione di H₂O 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 λ tra i due picchi nelle due situazioni è diversa ma corrisponde ad una uguale differenza in termini di energia.

La fluorescenza in laboratorio

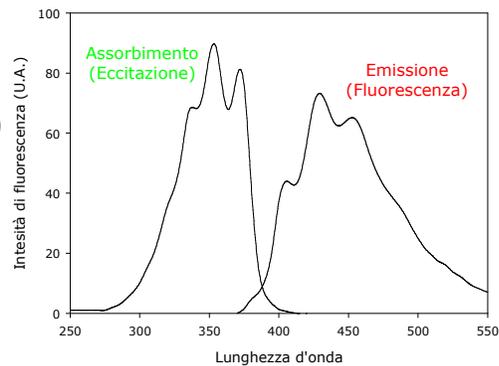
- Ambiente isotropo (soluzione):
 - Informazioni dagli spettri;
 - Artefatti ed errori strumentali ed a carico del campione;
 - Determinazione di Φ_f ;
 - Quenching;
 - Reazioni allo stato eccitato.
- Ambiente anisotropo (macromolecole e/o strutture sopramolecolari):
 - Polarizzazione ed anisotropia di fluorescenza.

Spettri in soluzioni

- 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.

Spettri eccitazione e di emissione

- Spettro di emissione:
 - $\lambda_{ex} = 340$ nm, scansione dell'emissione da 370 nm a 550 nm
- Spettro di eccitazione:
 - $\lambda_{em} = 430$ nm, scansione dell'eccitazione da 250 nm a 420 nm



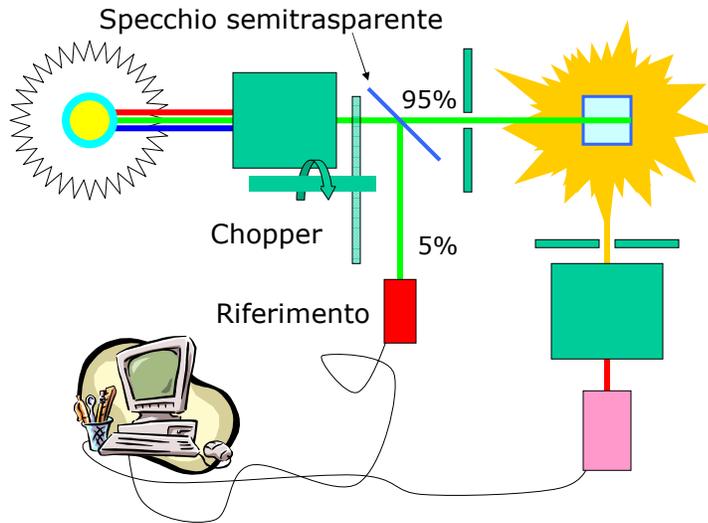
Informazioni dagli spettri

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

Artefatti ed errori sistematici

- A carico dello strumento:
 - Spettro della sorgente non continuo e/o fluttuante.
 - Luce diffusa dall'ottica, principalmente i monocromatori (stray light).
- A carico del campione
 - Effetto di filtro interno (Inner Filter Effect).
 - Torbidità.

Correzione per le fluttuazioni della sorgente

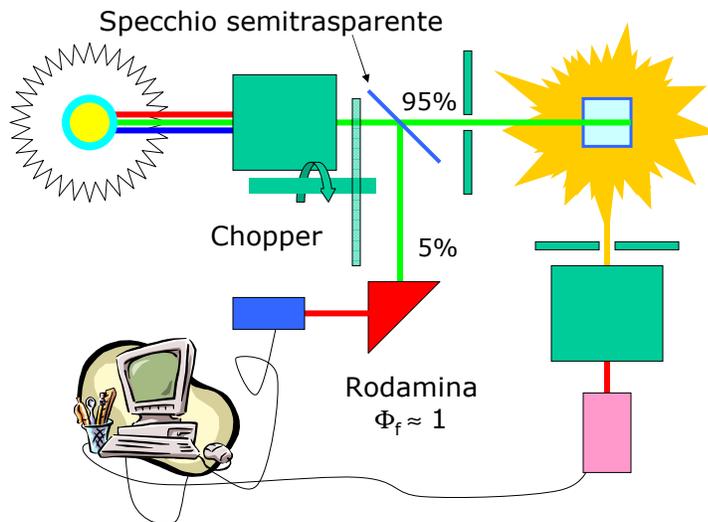


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

139

Correzione per la non linearità della sorgente

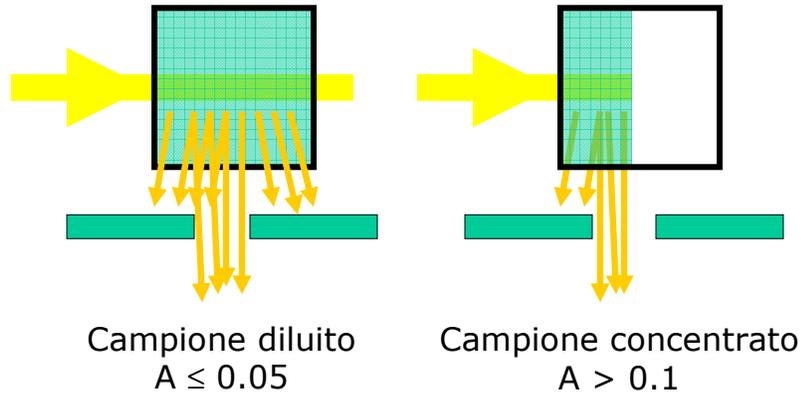


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

140

Inner Filter Effect



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

141

Correzione del Inner Filter Effect

- Diluizione del campione (aumenta la fluorescenza).
- Correzione della fluorescenza osservata per l'assorbimento.

$$F_c = F_o * 10^{\frac{A(\lambda_{ex}) + A(\lambda_{em})}{2}}$$

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

142

Torbidità

- Amplifica il Rayleigh scattering, più verso il blu che verso il rosso.

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

Determinazione di Φ_f

- Assoluto
 - Sfera di integrazione

- Relativo

$$\Phi_f = \Phi_{rif} \cdot (Area_f / Area_{rif}) \cdot (A_{rif} / A_f) \cdot (\eta^2_f / \eta^2_{rif})$$

Dove:

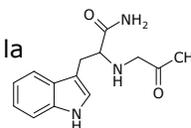
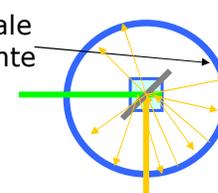
Φ_{rif} = quantum yield del composto di riferimento;

Area = integrale dello spettro di emissione;

A = assorbimento a λ_{ex} (< 0.05);

η = indice di rifrazione del mezzo;

Nel caso di proteine si usa come riferimento la N-acetil-triptofanamide (NATA) $\Phi_{rif} = 0.14$.



Fattori che influenzano Φ_f

- Temperatura:
 - Aumenta il fenomeno della conversione interna a causa dell'aumento dell'agitazione termica:
all'aumentare della temperatura cala Φ_f
- Presenza di "quenchers".
 - Lo stato eccitato si depopola per vie alternative o non si forma.
 - Stabilizzazione dello stato di tripletto (O_2 , lantanidi...)
 - Lo stato eccitato si depopola via intersystem crossing.

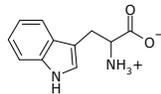
Quenching

- Collisionale
 - Molecole in soluzione (quenchers) che reagiscono con lo stato eccitato depopolandolo.
- Statico
 - Molecole in soluzione che reagiscono con lo stato fondamentale impedendo il raggiungimento dello stato eccitato.

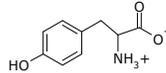
Quenching

- 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.

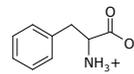
Fluorofori intrinseci



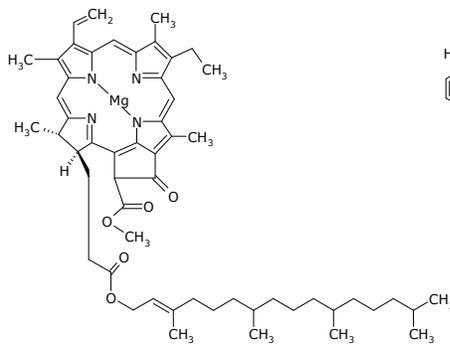
Triptofano (W)



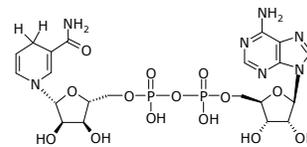
Tirosina (Y)



Fenilalanina (P)

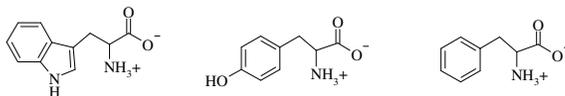


Clorofilla a



NADH

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**
 - Per fanatici.

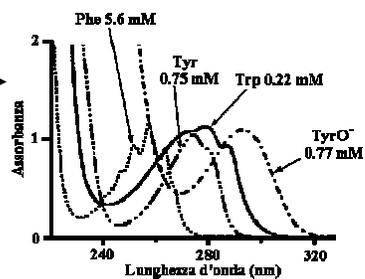
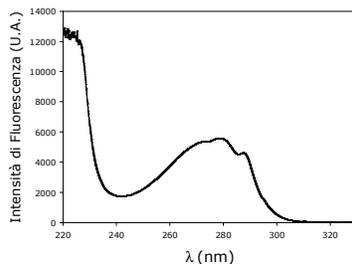
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

149

Fluorescenza intrinseca di proteine

- Spettri di assorbimento
- Spettro di eccitazione del Trp ($\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$)



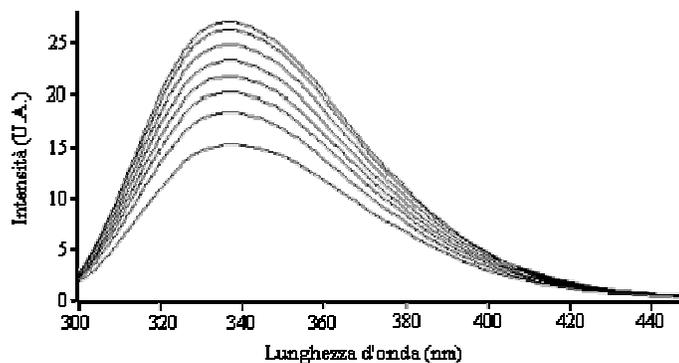
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

150

Fluorescenza intrinseca di proteine

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



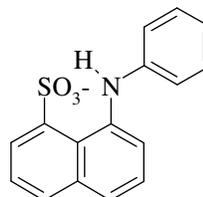
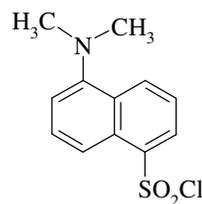
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

151

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.



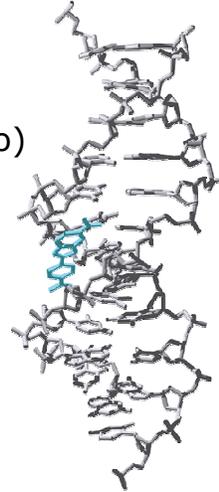
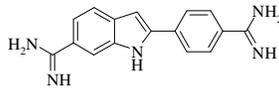
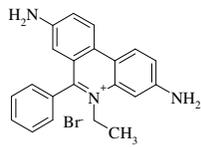
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

152

Sonde fluorescenti per acidi nucleici

- Intercalanti
 - Etidio bromuro (propidio ioduro)
 - DAPI



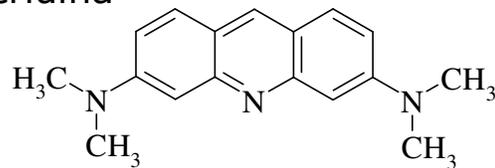
gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

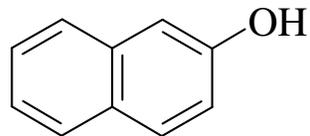
153

Indicatori fluorescenti

- Di pH: Arancio di acridina



- Di excited state proton transfer: Naftolo

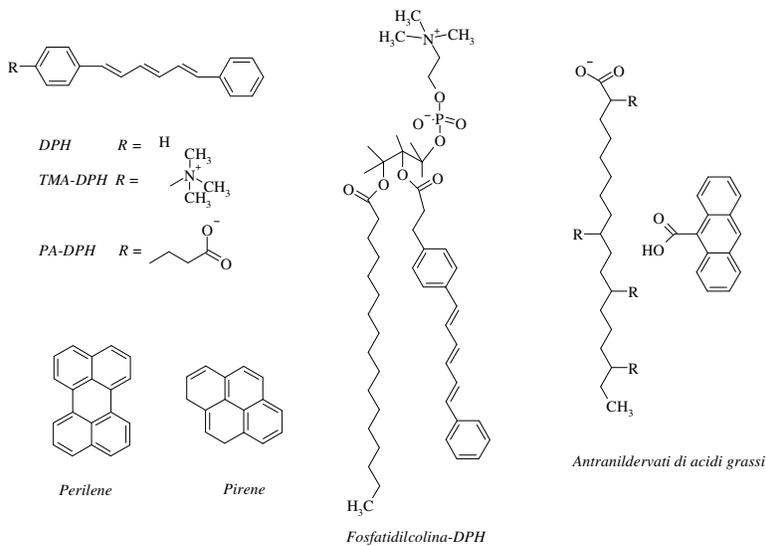


gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

154

Sonde fluorescenti di membrana



gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

155

Sonde per ioni metallici

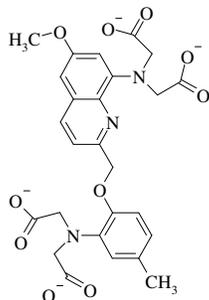
- Solo alcuni metalli sono fluorescenti (lantanidi).
- In genere i metalli sono "quencher" perché depopolano lo stato eccitato attraverso meccanismi di trasferimento di carica (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}).
- I metalli come il Ca^{2+} hanno bisogno di sonde.

gs © 2001-2005 ver 2.0

Tecniche analitiche

156

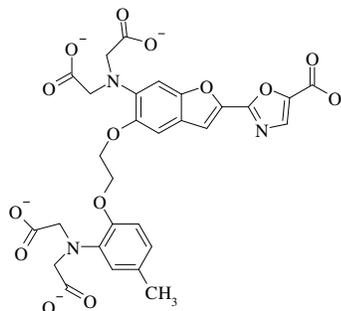
Sonde per il calcio



QUIN-2

I generazione

8-amino-2-[(2-amino-5-metilfenossi)metil]-6- metossichimolina-N,N,N',N'-tetraacetato



FURA-2

II generazione

1-[6-amino-2-(5-carbossi-2-ossazolil)-5-benzofuranilossi]-2-(2-amino-5-metilfenossi) etano-N,N,N',N'-tetraacetato

A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties*

(Received for publication, August 25, 1994)

Grazegorz Grynkiewicz[†], Martin Poenie, and Roger Y. Tsien[§]

From the Department of Physiology-Anatomy, University of California, Berkeley, California 94720

FURA-2

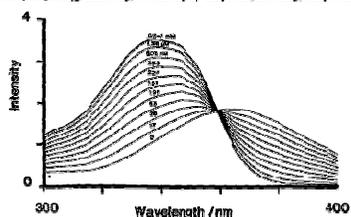


FIG. 3. Excitation spectra for 1 μ M fura-2 at 20 °C in buffers with free Ca²⁺ values ranging from <1 nM to >10 μ M. The excitation band width was 1.9 nm, the emission was collected at 510 nm with 4.6 nm band width, and the spectra were automatically corrected for wavelength band and monochromator characteristics using a rhodamine B quantum counter. The titration was done starting with 5 μ l of 100 mM KCl, 10 mM K₂MOFES, 10 mM K₂H₂EGTA, 1 μ M fura-2, adjusting the pH to 7.20, recording the spectrum, then discarding 0.5 ml of this solution and replacing with 0.5 ml of 100 mM KCl, 10 mM K₂MOFES, 10 mM K₂CaEGTA, 1 μ M fura-2, readjusting the pH to 7.20, and recording the spectrum which was then in 0 mM K₂H₂EGTA and 1 mM K₂CaEGTA. Subsequent iterations to reach 10 mM CaEGTA, 100-nM EGTA, α = 2–10, were done by discarding 5.0/10.0 ml and replacing with equal volumes of the 10 mM K₂CaEGTA, 1 μ M fura-2 stock. After α = 10 had been reached to give a free Ca²⁺ between 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M, addition of 1 mM CaCl₂ had no further effect on the spectrum. Equality of Ca and EGTA contents in the K₂CaEGTA solutions was insured by titration of K₂H₂EGTA and CaCl₂ to the potentiometric end point measured with a Ca²⁺-selective electrode. EGTA was Fisher Chemical "puriss." grade.

Grazie a...

- ... Bruna Gravina, Irene Tamburin, Christian Asirelli, Federico Caselli, Francesco Ferretti, Giuseppe Giammanco, Najmi Gambi che, nell'ambito delle loro tesi di laurea in Scienze Ambientali, hanno prodotto testi, immagini, figure e diapositive, utilizzate in questa presentazione.

Giorgio Sartor

...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www1.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
- **Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**
Università di Bologna a Ravenna
Corso di Laurea in Scienze Ambientali