

Giorgio Sartor  
 Laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale (EPB)  
 Scienze Ambientali – Università di Bologna a Ravenna



## Spettroscopia di Fluorescenza Principi e metodi

## Indice

- La teoria.
- La pratica
  - Molecole fluorescenti.
  - La strumentazione.
  - Gli spettri.
  - La fluorescenza in laboratorio.
  - Le applicazioni in biologia.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

2

## 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

3

## Interazione tra energia e materia

$\lambda$ (nm)	$\nu$ (Hz)	Regione dello spettro	Interazioni (Spettroscopia)
$10^6 - 10^{10}$	$3 \cdot 10^{11} - 3 \cdot 10^{17}$	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)

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

4

### Luminescence

Spontaneous emission of radiation from an electronically or vibrationally excited species not in thermal equilibrium with its environment.

See also *bioluminescence, chemiluminescence, electro-generated chemiluminescence, fluorescence, phosphorescence, photoluminescence, radioluminescence, sonoluminescence, thermoluminescence, triboluminescence.*  
 1996, 68, 2252; 1994, 66, 2522; see also O.B. 184, 231; 1990, 62, 2200

IUPAC Compendium of Chemical Terminology

2nd Edition (1997)

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

5

## Assorbimento e fluorescenza

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

6

## Principio di Frank-Condon:

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

7

## Tempi

- ASSORBIMENTO:  $10^{-15}$  s (fs)
- EMISSIONE:  $10^{-12}$  s -  $10^3$  (ps - ore)
  - Fluorescenza:  $10^{-12}$  s -  $10^{-6}$  s (ps -  $\mu$ s)
  - Fosforescenza:  $10^{-6}$  -  $10^3$  ( $\mu$ s - ore)

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

8

## Spettroscopia di fluorescenza vs. Assorbimento

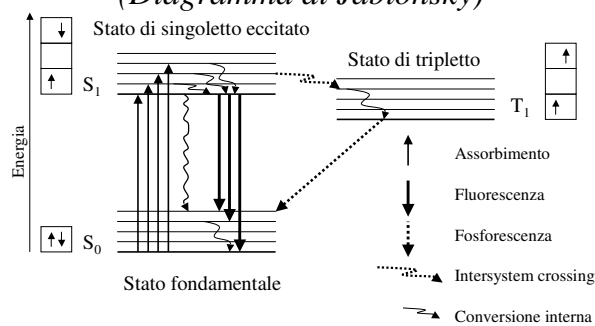
- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Vantaggi:</b><ul style="list-style-type: none"><li>– Non tutte le molecole che assorbono emettono</li><li>– Segnali significativi anche a concentrazioni bassissime (nM)</li><li>– Effetti del solvente</li><li>– Unità arbitrarie</li></ul></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Svantaggi</b><ul style="list-style-type: none"><li>– Non tutte le molecole che assorbono emettono</li><li>– Segnali significativi anche a concentrazioni bassissime (nM)</li><li>– Effetto del solvente</li><li>– Unità arbitrarie</li></ul></li></ul> |
|---|---|

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

9

## Le transizioni elettroniche (Diagramma di Jablonsky)



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

10

## 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*).

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

11

## Transizioni elettroniche

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

12

## Lo stato eccitato

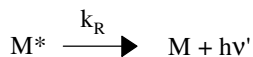
- Assorbimento

- Formazione dello stato eccitato



- Emissione

- Decadimento dello stato eccitato



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

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

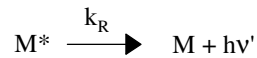
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

13

## Significato di $k_R$

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



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

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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

14

## 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

15

## 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:

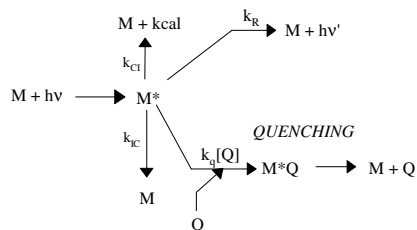
**IL NUMERO DI FOTONI EMESSI È MINORE DEL NUMERO DI FOTONI ASSORBITI**

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

16

## In sintesi



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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

17

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

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

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

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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

18

## Illuminazione

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

- Condizioni fotostazionarie
- Condizioni transienti

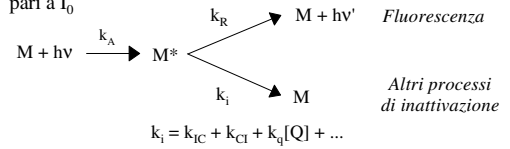
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

19

## Condizioni fotostazionarie

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



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

- In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

20

## Condizioni fotostazionarie

In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

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

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

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

fotoni emessi per unità di tempo

fotoni assorbiti per unità di tempo

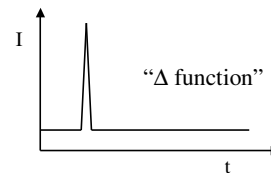
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

21

## Condizioni transienti

- Illuminazione con un FLASH di luce di durata trascurabile.



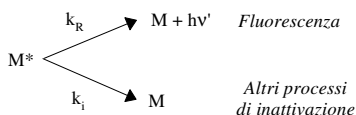
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

22

## Condizioni transienti

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



- da cui...

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

23

## Condizioni transienti

- da cui:  $d[M^*]/dt = - (k_R + k_i) [M^*]$

- Integrando fra 0 e t:

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

$$t = 0 \rightarrow [M^*] = [M^*]_0 \rightarrow \text{costante} = \ln[M^*]$$

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

24

## Condizioni transienti

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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

25

## Condizioni transienti

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

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

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

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

← Tempo di vita media di fluorescenza

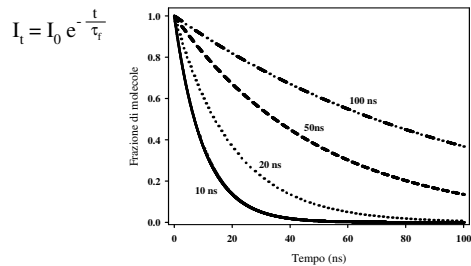
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

26

## Decadimento di fluorescenza

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



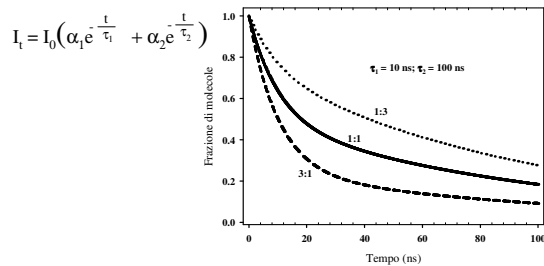
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

27

## Decadimento di fluorescenza

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



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

28

## Condizioni transienti

- Per quanto riguarda il quantum yield:

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

29

## Relazioni fondamentali

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

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

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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

30

## Identikit di una molecola fluorescente

- Una molecola è fluorescente quando:
  - Ha uno spettro di assorbimento (un elettrone,  $n$  o  $\pi$ , raggiunge uno stato eccitato);
  - Lo stato eccitato ha un tempo di vita (si rilassa lo stato eccitato);
  - Molecola planare
- **COMPOSTI AROMATICI!!!**

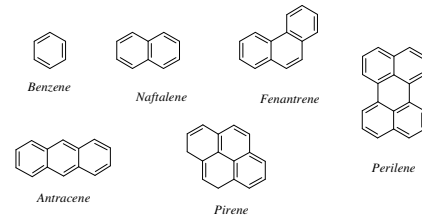
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

31

## Sono fluorescenti...

- Gli aromatici ed alcuni loro derivati:



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

32

## Effetto dei sostituenti sulla fluorescenza del benzene

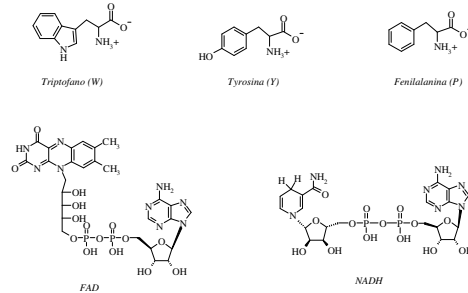
Molecola	$\lambda_{ex} - \lambda_{em}$ (nm)	Intensità	Molecola	$\lambda_{ex} - \lambda_{em}$ (nm)	Intensità
	270-310	10		285-265	18
	270-320	17		310-400	10
	275-345	7		310-405	20
	-	0		-	0

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

33

## Biomolecole fluorescenti...

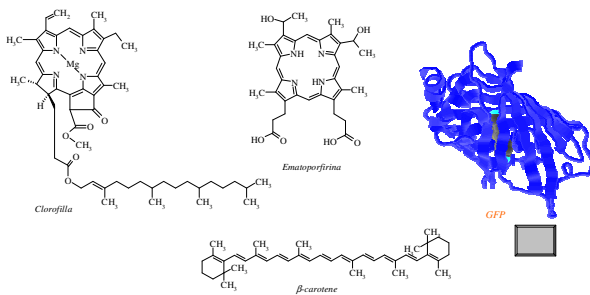


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

34

## ...altre biomolecole fluorescenti...



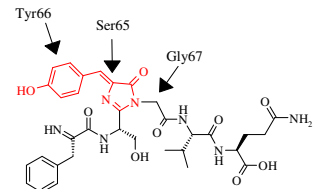
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

35

## Fluoroforo della GFP

- Il fluoroforo della GFP proviene da una modificazione postrascrittoriale della proteina con condensazione di tre AA (Ser65, Tyr66, Gly67)

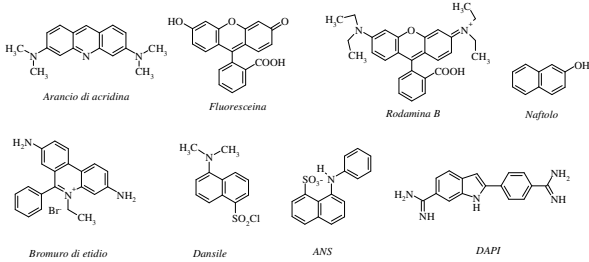


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

36

## ...e molecole fluorescenti usate in biologia



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

37

## Strumentazione

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

38

## Schemi ottici

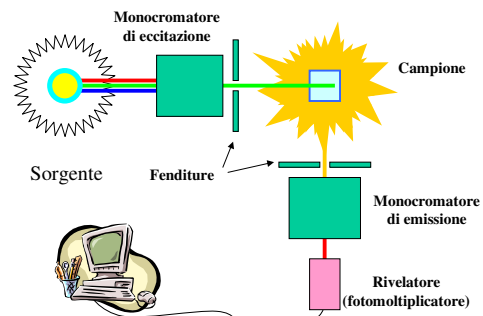
- A L: il più comune.
- A T: misure di anisotropia di fluorescenza.
- A 0°: microscopia, epiluminescenza, analisi di superfici o strati.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

39

## Geometria a 90°

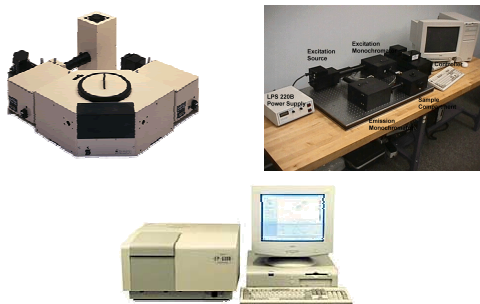


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

40

## Fluorimetri

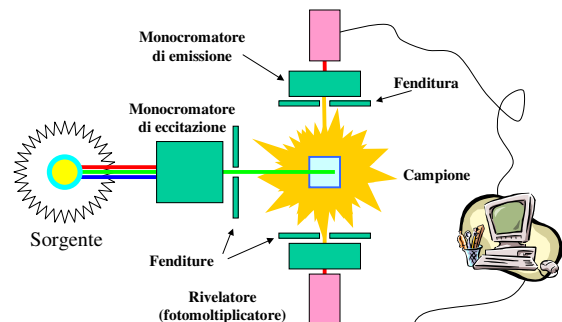


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

41

## Geometria a T



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

42

## 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.

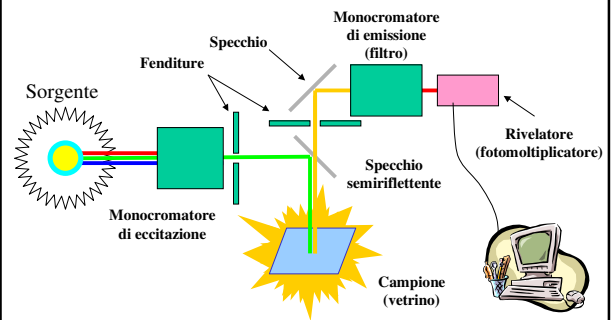


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

43

## Geometria a 0°



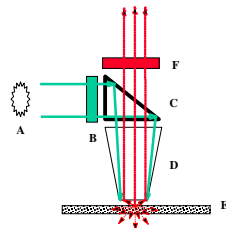
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

44

## Microscopio a fluorescenza

- Lampada
- Filtro di eccitazione
- Prisma semiriflettente
- Obiettivo
- Oggetto
- Filtro in emissione

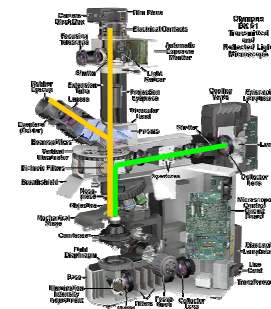


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

45

## Microscopio a fluorescenza



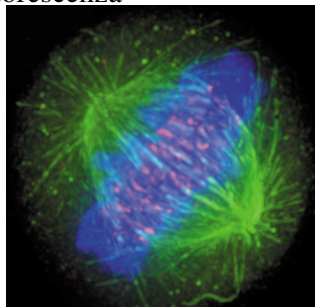
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

46

## 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.



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

47

## 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

48



## 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".

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

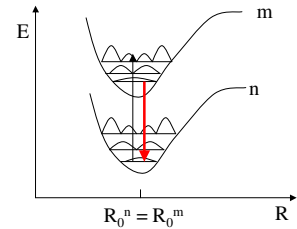
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

49

## 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.



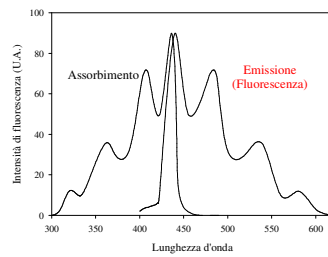
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

50

## Perilene

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



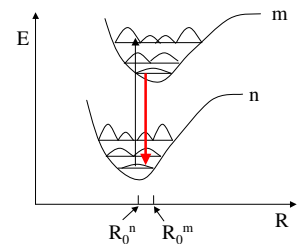
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

51

## 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.



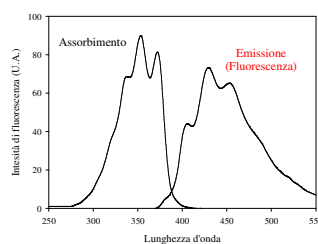
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

52

## Difenilesatriene (DPH)

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



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

53

## Artefatti spettrali

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

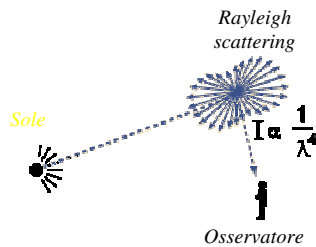
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

54

## Rayleigh scattering

- Ciò che rende il cielo colorato.



La forte dipendenza del Rayleigh scattering dalla lunghezza d'onda aumenta l'intensità della luce a lunghezza d'onda più corta dando al cielo il colore blu. Lo scattering a 400 nm è circa 10 volte maggiore rispetto a quello a 700 nm. A secondo dell'angolo di incidenza il cielo si colora di rosso, gli oggetti lontani si scuriscono ecc.

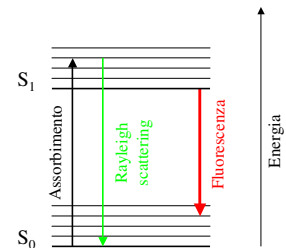
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

55

## Rayleigh scattering

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

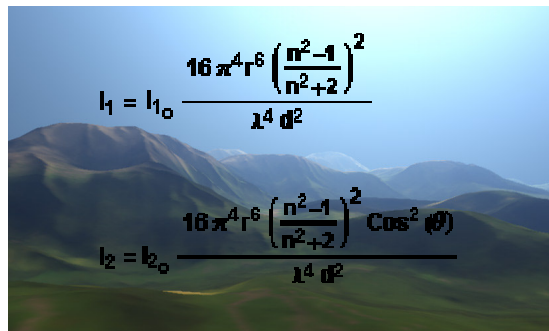


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

56

## Rayleigh scattering



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

57

## Raman

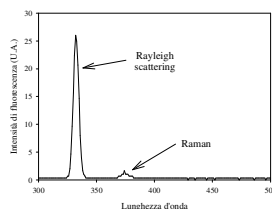
- Picchi satelliti del picco di Rayleigh dovuti alle transizioni vibrazionali del solvente ( $[H_2O] = 55M$ ).
- I picchi sono posizionati ad una distanza fissa (in termini di energia) prima e dopo il picco di Rayleigh (Stokes e anti-Stokes).
- La spettroscopia Raman è una tecnica che investiga gli stati vibrazionali (e rotazionali) delle molecole. Ha bisogno di sorgenti molto intense (laser o luce di sincrotrone) per dare informazioni.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

58

## Rayleigh scattering e Raman



- Spettro di emissione di  $H_2O$  con  $\lambda_{ex} = 337$  nm
- Nello spettro di eccitazione la situazione è rovesciata: prima il Raman poi il Rayleigh. La differenza in termini di  $\lambda$  tra i due picchi nelle due situazioni è diversa ma corrisponde ad una uguale differenza in termini di energia.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

59

## Indice

- La teoria.
- La pratica
  - Molecole fluorescenti.
  - La strumentazione.
  - Gli spettri.
  - La fluorescenza in laboratorio.
  - Le applicazioni in biologia.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

60

## La fluorescenza in laboratorio

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

61

## Spettri in soluzione

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

62

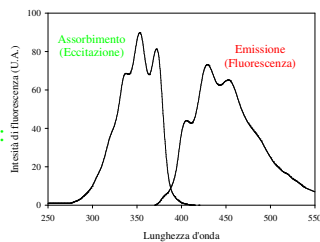
## Spettri eccitazione e di emissione

### • 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



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

63

## Informazioni dagli spettri

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

64

## Artefatti ed errori sistematici

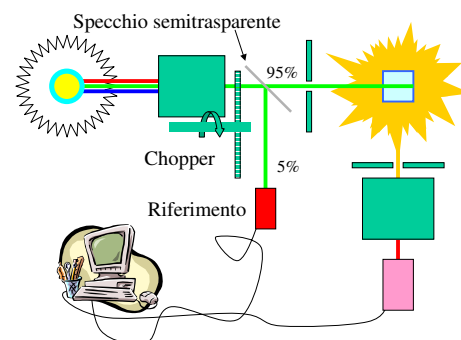
- A carico dello strumento:
  - Spettro della sorgente non continuo e/o fluttuante.
  - Luce diffusa dall'ottica, principalmente i monocromatori (stray light).
- A carico del campione
  - Effetto di filtro interno (Inner Filter Effect).
  - Torbidità.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

65

## Correzione per le fluttuazioni della sorgente

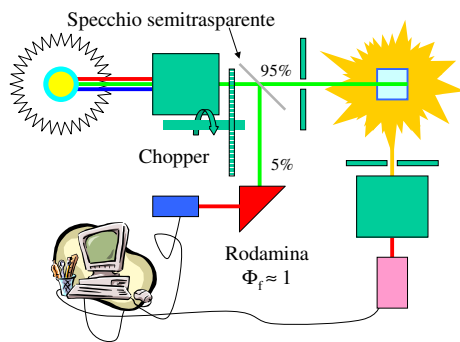


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

66

## Correzione per la non linearità della sorgente

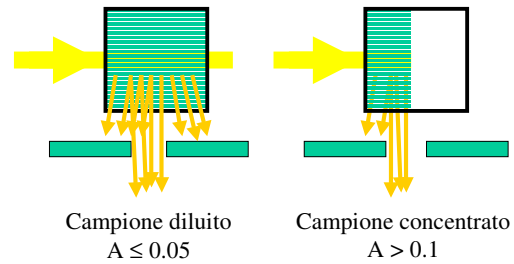


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

67

## Inner Filter Effect



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

68

## 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/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

69

## Torbidità

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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

70

## Determinazione di $\Phi_f$

- Assoluto
  - Sfera di integrazione
- Relativo

$$\Phi_f = \Phi_{rif} \cdot (Area_e/Area_{rif}) \cdot (A_{rif}/A_e) \cdot (\eta^2_r/\eta^2_{rif})$$

Dove:

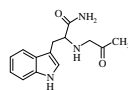
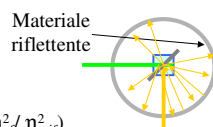
$\Phi_{rif}$  = quantum yield del composto di riferimento;

Area = integrale dello spettro di emissione;

A = assorbimento a  $\lambda_{ex}$  (< 0.05);

$\eta$  = indice di rifrazione del mezzo;

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



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

71

## Fattori che influenzano $\Phi_f$

- Temperatura:
  - Aumenta il fenomeno della conversione interna a causa dell'aumento dell'agitazione termica: all'aumentare della temperatura cala  $\Phi_f$ .
- Presenza di "quencher".
  - 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

72

## 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

73

## 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.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

74

## Quenching collisionale

$$\Phi_0 = \frac{k_R}{k_R + k_i + 0}; \quad \Phi = \frac{k_R}{k_R + k_i + k_q[Q]}$$

$$\Phi_0/\Phi = 1 + \tau_0 k_q[Q]$$

$$\tau_0/\tau = 1 + \tau_0 k_q[Q]$$

$$\Phi_0/\Phi = \tau_0/\tau$$

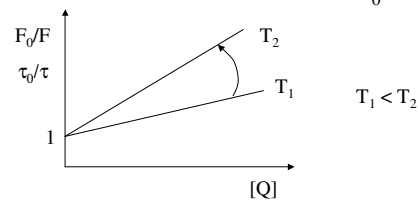
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

75

## Quenching collisionale

- Relazione di Stern-Volmer  $k_{sv} = \tau_0 k_q$   
 $F_0/F = 1 + k_{sv}[Q]$



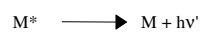
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

76

## Quenchers “collisionali”

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



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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

77

## Quenchers “statici”

- Reazioni redox allo stato fondamentale.
- Legame di metalli pesanti (Cu<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>)

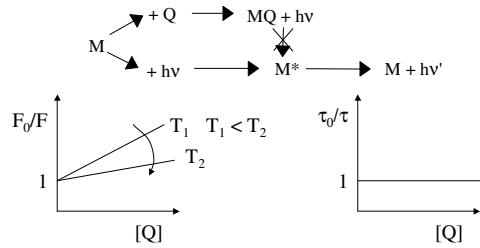
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

78

## Quenching statico

- Si forma un complesso allo stato fondamentale NON è fluorescente.



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

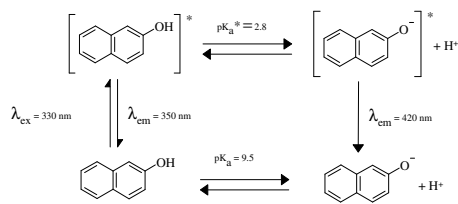
79

## Reazioni allo stato eccitato

(ciò che avviene in un lampo)

## Reazioni acido base

- Naftolo, fenolo, tirosina, ...



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

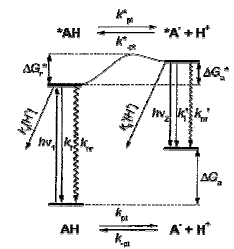
81

## Excited state proton transfer

- Il valore di  $pK_a^*$  si ottiene da:

$$pK_a^* = pK_a - (h\nu_1 - h\nu_2) / 2.3RT$$

- Equazione di Förster



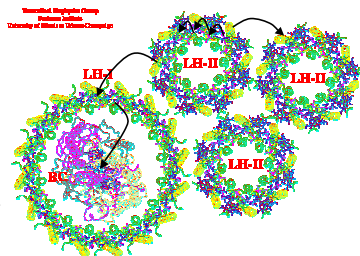
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

82

## Resonance energy transfer

- È il fenomeno che permette il trasferimento di energia da una molecola allo stato eccitato (Donatore) ad un'altra molecola (Accettore).

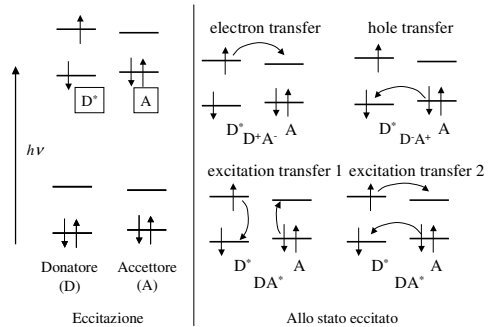


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

83

## Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



gs/epb 2004

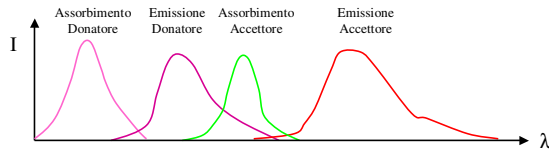
Spettroscopia di fluorescenza

84

## FRET

- Affinché fra due molecole possa esservi RET (coppia Donatore-Acettore) devono verificarsi alcune condizioni descritte dall'equazione di Förster che definisce l'energy transfer:

$$W_{DA} = 8.8 \cdot 10^{17} \cdot \frac{k_r^D}{n^4} \cdot \frac{\kappa^2}{R^6} \cdot \int \frac{\epsilon_A(\tilde{\nu}) F_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}$$



gs/epb 2004

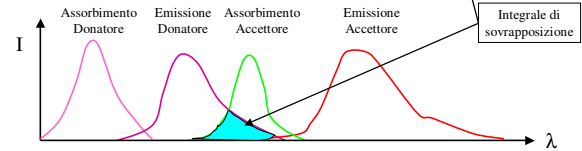
Spettroscopia di fluorescenza

85

## FRET

$$W_{DA} = 8.8 \cdot 10^{17} \cdot \frac{k_r^D}{n^4} \cdot \frac{\kappa^2}{R^6} \cdot \int \frac{\epsilon_A(\tilde{\nu}) F_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}$$

Labels in diagram: Costante radiativa del donatore ( $k_r^D$ ), Fattore di allineamento dipolare ( $\kappa^2$ ), Indice di rifrazione del mezzo ( $n$ ), DISTANZA DONATORE ACCETTORE ( $R$ ), Integrale di sovrapposizione.



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

86

## FRET

- L'equazione di Förster viene riscritta come:

$$W_{DA} = k_r^D \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \text{ in } s^{-1}$$

$$R_0 = \left( 8.8 \cdot 10^{23} \cdot \frac{\kappa^2}{n^4} \cdot \int \frac{\epsilon_A(\tilde{\nu}) \cdot F_D(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \right)^{\frac{1}{6}} \text{ in Angstrom}$$

- $R_0$  è la distanza alla quale avviene in 50% di FRET.
- Ciò permette di misurare la distanza tra donatore ed accettore (0-10 nm).

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

87

## FRET: istruzioni per l'uso

- Si misura l'efficienza di FRET:
 
$$E_{DA} = 1 - (F_{da} / F_d); E_{DA} = 1 - (\tau_{da} / \tau_d)$$
- Che è legata alla distanza come:
 
$$E_{DA} = R_0^6 / (R_0^6 + R^6); R = R_0 (1/E_{DA} - 1)^{1/6}$$
- Con:  $R_0 = [8.8 \cdot 10^{23} k^2 n^{-4} \Phi_D J]^{1/6}$  in Å
  - $k = 2/3$  (varia da 0 a 4)
  - $n = 1.4$  per proteine (varia da 1.33 a 1.6)
  - $\Phi_D$  = quantum yield del donatore
  - $J$  = integrale di sovrapposizione

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

88

## FRET: utilità

- In proteine permette di misurare la distanza tra due siti legando loro una coppia Donatore-Acettore:

Donatore	Accettore	$R_0$ (Å)
Fluoresceina	Tetrametilrodamina	55
5-(2-iodoacetamidoetil) aminonafthalene-1-solfonato (IAEDANS)	Fluoresceina	46
5-(2-acetamidoetil) aminonafthalene-1-solfonato (EDANS)	4-((4-(dimetilamino) fenil)azo)benzoato (DABCYL)	33

Altre coppie... dal catalogo Molecular Probes <http://www.probes.com/>

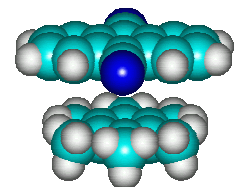
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

89

## Formazione di eccimeri

- Due o più molecole possono formare complessi allo stato eccitato
- Si osserva la formazione di nuove bande di eccitazione e/o emissione che non appartengono ai monomeri e la cui intensità dipende dalla concentrazione.



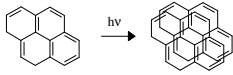
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

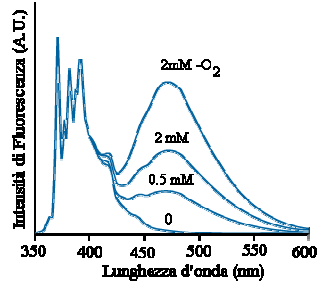
90

## Formazione di eccimeri

- Il pirene in etanolo forma eccimeri.



- La formazione di eccimeri è anche funzione della mobilità della molecola.

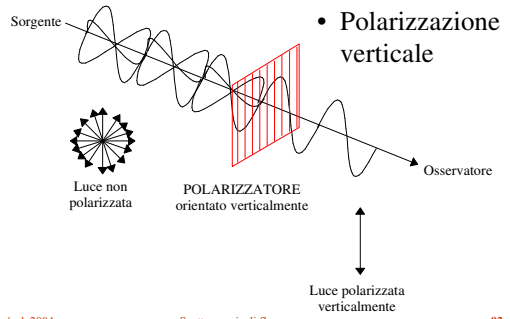


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

91

## La luce polarizzata

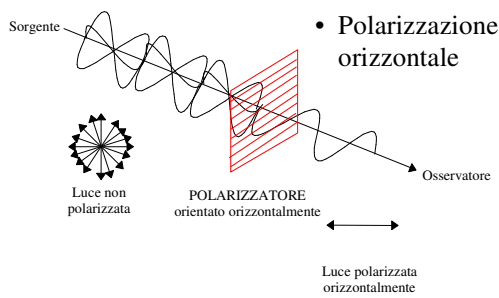


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

92

## La luce polarizzata



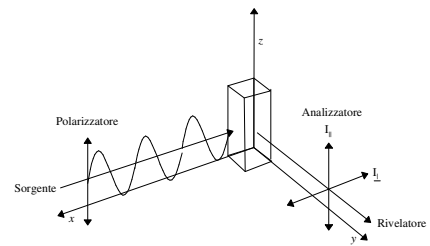
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

93

## Anisotropia di fluorescenza

- Eccitazione con luce polarizzata



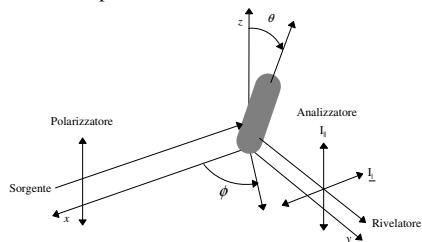
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

94

## Fotoselezione

- Se si eccita con luce polarizzata verticalmente (z) vengono eccitate preferenzialmente le molecole il cui dipolo di assorbimento è parallelo a z.



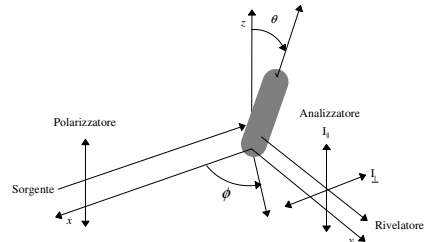
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

95

## Fotoselezione

- La frazione di molecole eccitate tra  $\theta, \theta + d\theta$  e  $\phi, \phi + d\phi$  è data da:  $W(\theta, \phi)d\theta d\phi = (3/4\pi)\cos^2\theta \sin\theta d\theta d\phi$



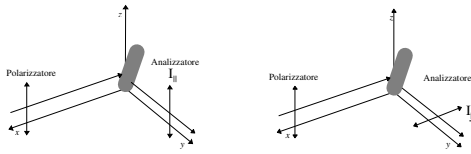
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

96



## Polarizzazione ed anisotropia



- Polarizzazione  $p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$   $r = \frac{2}{3} \left( \frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right)^{-1}$
- Anisotropia  $r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$   $r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{totale}}$

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

97

## Valori limite...

- Sistema immobile (cristallo) i cui dipoli sono orientati e paralleli a z:  
 $I_{||} = 1; I_{\perp} = 0; r = p = 1$
- Sistema immobile (cristallo) i cui dipoli sono orientati e perpendicolari a z:  
 $I_{||} = 0; I_{\perp} = 1; r = -1/2; p = -1;$
- Sistema immobile i cui dipoli non sono orientati (vetro):  
 $p = 1/2; r = 2/5 = 0.4;$

gs/epb 2004

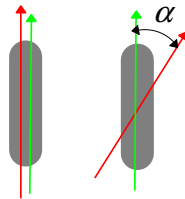
Spettroscopia di fluorescenza

98

## ... non basta

- Sistema immobile i cui dipoli non sono orientati (vetro) ed il dipolo della transizione di assorbimento è parallelo al dipolo della transizione di eccitazione:

- $p = 1/2; r = 2/5 = 0.4;$
- Altrimenti:  
 $r = (3 \cos^2 \alpha - 1)/5;$
- Se  $\alpha = 56^\circ$   $\cos^2 \alpha = 1/3; r = 0$   
 $56^\circ =$  angolo magico



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

99

## A cosa può servire la polarizzazione

- Determinare le dimensioni di una macromolecola (Perrin):

$$\left( \frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right) = \left( \frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + 3 \frac{\tau_f}{\phi} \right)$$

- Il tempo di correlazione rotazionale ( $\phi$ ) (il tempo per ruotare di un angolo il cui coseno sia  $1/e$ , circa  $68.5^\circ$ ) è legato alle dimensioni della molecola ( $V$ ) alla viscosità ( $\eta$ ) e alla temperatura ( $T$ ) (Stokes).

$$\phi = \frac{V\eta}{RT}$$

- Quindi:

$$\left( \frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right) = \left( \frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + 3\tau_f \frac{RT}{V\eta} \right) \quad \frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left( 1 + 3\tau_f \frac{RT}{V\eta} \right)$$

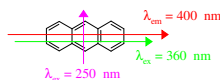
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

100

## Dipoli di transizione

- Per alcune molecole esistono più dipoli di transizione (assorbimento e/o emissione), per esempio l'antracene:



- I valori limite variano in funzione della  $\lambda_{ex}$  :  
 $\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}; \lambda_{em} = 400 \text{ nm}; r = -1/5 = -0.2$   
 $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}; \lambda_{em} = 400 \text{ nm}; r = 2/5 = 0.4$

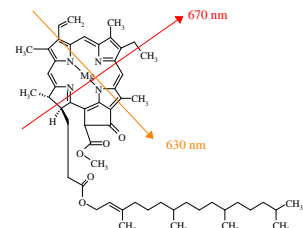
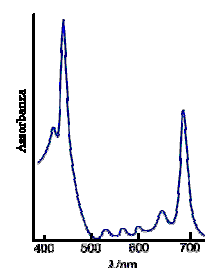
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

101

## Dipoli di transizione

- clorofilla a

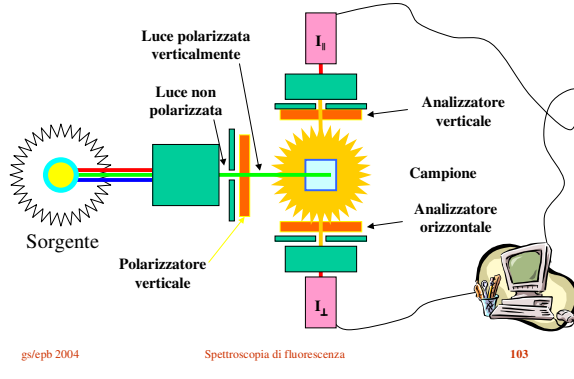


gs/epb 2004

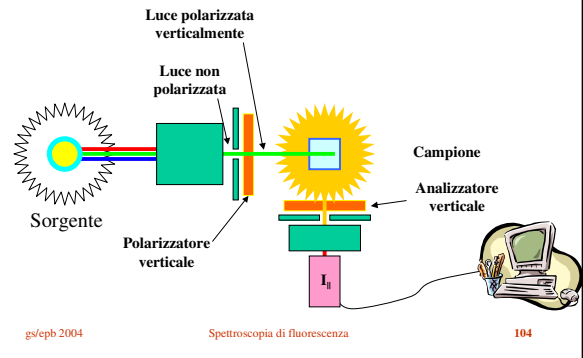
Spettroscopia di fluorescenza

102

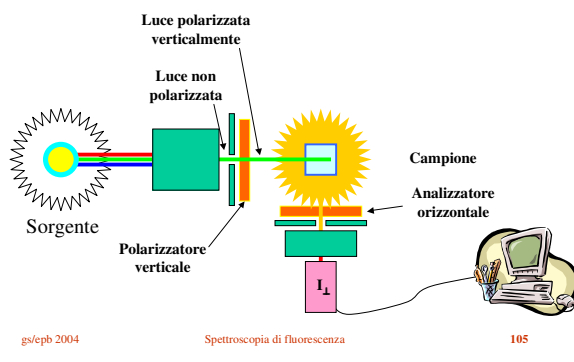
## Geometria a T (strumento ideale)



## Geometria a L



## Geometria a L



## Determinazione di r (p)

- Si fanno le misure di intensità con eccitazione verticale ed emissione verticale ed orizzontale:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

- Occorre determinare il "G factor" (G = grating) attraverso l'eccitazione orizzontale.

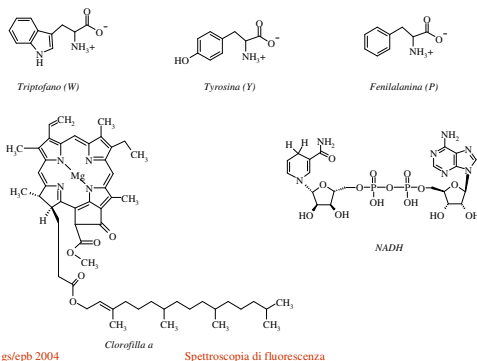
$$G = \frac{I_{\perp}^0}{I_{\parallel}^0} \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp} \cdot G}{I_{\parallel} + 2I_{\perp} \cdot G}$$

gs/epb 2004

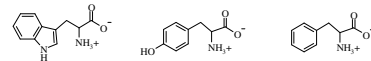
Spettroscopia di fluorescenza

106

## Fluorofori intrinseci



## Fluorescenza intrinseca di proteine



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

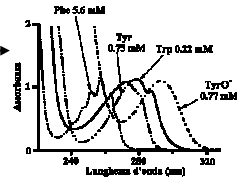
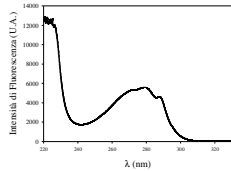
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

108

## Fluorescenza intrinseca di proteine

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



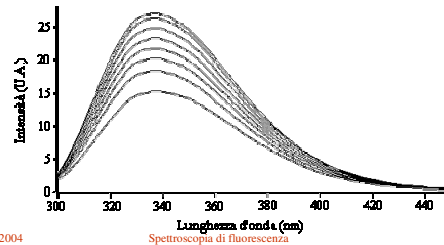
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

109

## Fluorescenza intrinseca di proteine

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



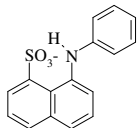
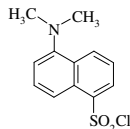
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

110

## 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.



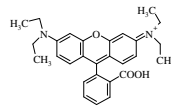
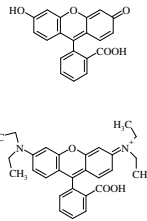
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

111

## Sonde fluorescenti per FRET

- Fluoresceina e rodamina
  - Sono usate come accettori, o come coppia donatore/accettore, in esperimenti di FRET.



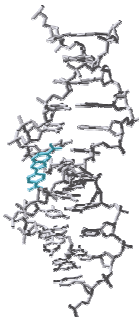
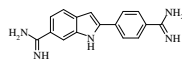
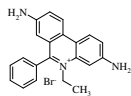
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

112

## Sonde fluorescenti per acidi nucleici

- Intercalanti
  - Etidio bromuro (propidio ioduro)
  - DAPI



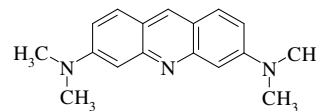
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

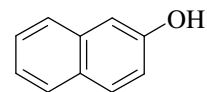
113

## Indicatori fluorescenti

- Di pH: Arancio di acridina



- Di excited state proton transfer: Naftolo



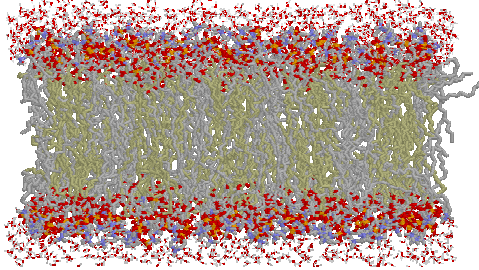
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

114

## Fluorescenza di membrane

- Le membrane non sono fluorescenti: servono delle sonde:

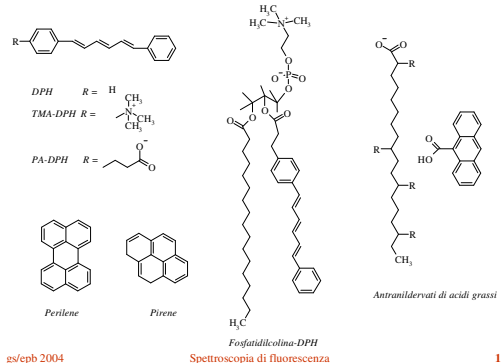


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

115

## Sonde fluorescenti di membrana

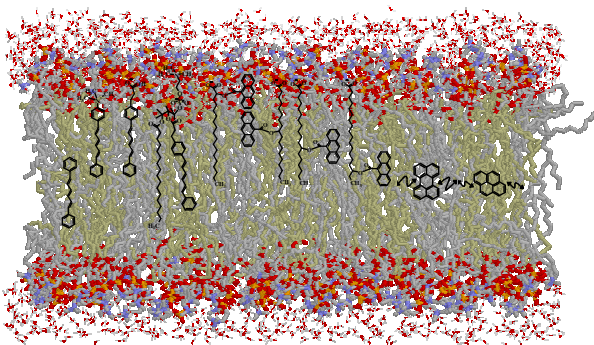


gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

116

...che hanno localizzazioni più o meno "certe"



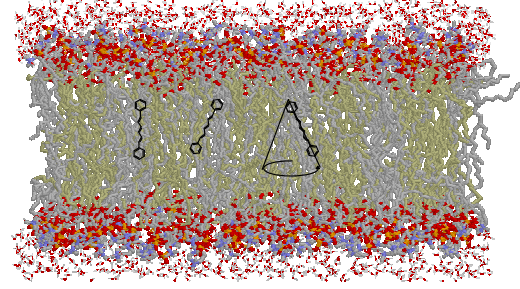
gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

117

## Le sonde di membrana

- Si usano per misure di anisotropia di fluorescenza e danno informazioni sulla "fluidità" della membrana.



gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

118

## Sonde per ioni metallici

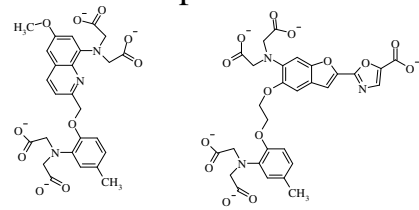
- Solo alcuni metalli sono fluorescenti (lantanidi).
- In genere i metalli sono "quenchers" perché depopolano lo stato eccitato attraverso meccanismi di trasferimento di carica ( $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ).
- I metalli come il  $Ca^{2+}$  hanno bisogno di sonde.

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

119

## Sonde per il calcio



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

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

gs/epb 2004

Spettroscopia di fluorescenza

120

© 2004 Society for Experimental Biology and Medicine     © 2004 Society for Experimental Biology and Medicine  
**A New Generation of  $Ca^{2+}$  Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties<sup>1</sup>**

Received for publication August 28, 2004

Georgios Giyabkiewicz, Martin Perrais, and Roger Y. Tsien<sup>2</sup>  
 From the Department of Psychology, University of California, Berkeley, California 94720

# FURA-2

**Fig. 2. Excitation spectra for 1  $\mu$ M Fura-2 at 20 nM in buffer.** ...

gs/epb 2004     Spettroscopia di fluorescenza     121

## Fluorescenza “dinamica”

- Teoria
- Strumentazione
  - Sorgenti e rivelatori
- Decadimento di fluorescenza.
  - Determinazione e significato di  $\tau_i$  e  $a_i$
- Decadimento dell’anisotropia
  - Determinazione e significato di  $\phi_p$ ,  $b_p$ ,  $r_0$  e  $r_\infty$

gs/epb 2004     Spettroscopia di fluorescenza     122

## ...e poi

- FRAP (fluorescence recovery after photobleaching);
- TPE (two photons excitation);
- CLSM (confocal laser scanning microscopy)
- Citometria a flusso.

gs/epb 2004     Spettroscopia di fluorescenza     123

# Fine ...

## ...per ora!