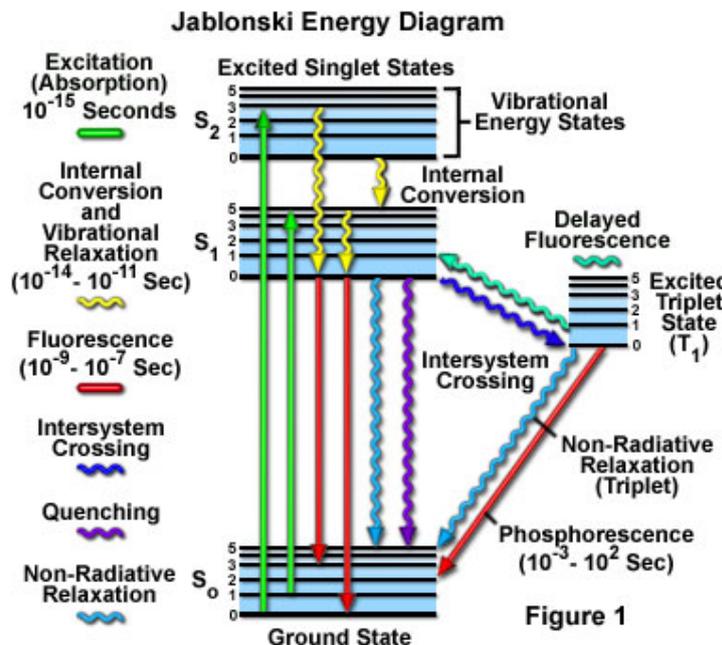


Spettroscopia di fluorescenza: spettri di emissione della dansil-alanina e della GFP

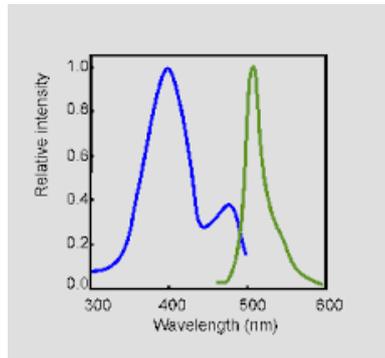
La fluorescenza è un processo fotofisico secondo il quale una molecola eccitata con radiazioni di una determinata frequenza emette radiazioni nel corso di una transizione ad un livello energetico inferiore. La fluorescenza è quindi l'emissione di luce dovuta alla transizione di elettroni da un livello energetico maggiore ad uno minore. Essa segue ad un evento di eccitazione causato dall'assorbimento di radiazione elettromagnetica a lunghezze d'onda inferiori rispetto a quelle emesse e la differenza tra le due lunghezze d'onda è nota come **shift di Stokes**. L'origine di questa differenza dipende dal fatto che l'emissione avviene quando una parte dell'energia vibrazionale è già stata ceduta all'ambiente. I **diagrammi di Jablonski** mostrano i livelli energetici di una molecola e i processi fotofisici che si verificano nell'interazione di una molecola con la radiazione elettromagnetica.



Le applicazioni della fluorescenza in biochimica sono numerose:

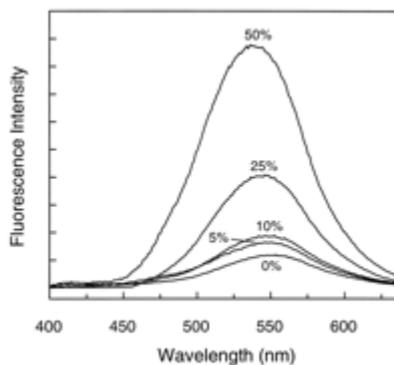
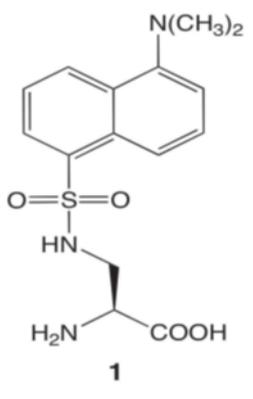
- **misure quantitative**
- **analisi della struttura di proteine**
 - esposizione al solvente per denaturazione (fluorescenza del triptofano)
 - analisi di quenching della fluorescenza
- **studio delle interazioni tra proteine (FRET)**

Green Fluorescent Protein (GFP)



Green Fluorescent Protein (GFP) isolata dalla medusa *Aequorea victoria* è una proteina fluorescente di 238 amminoacidi (peso molecolare circa 27 kDa). È costituita da 11 foglietti beta disposti a barile- β e due segmenti ad alfa elica, uno alla base del barile, l'altro lungo il suo asse centrale. Quest'ultima elica contiene il fluoroforo, formato per ciclizzazione di Ser65 - Tyr66 - Gly67. La struttura, nel complesso, è molto compatta, in modo da proteggere il fluoroforo da reazioni con altre molecole che lo potrebbero inattivare. Lo spettro di assorbimento presenta dei picchi a lunghezze d'onda di 395 nm e 475 nm mentre lo spettro di emissione ha un picco massimo intorno a 505 nm. E' possibile pertanto eccitare la molecola sia con una radiazione ultravioletta (395 nm), che con una radiazione nello spettro visibile (475 nm), ed in entrambi i casi la GFP emetterà una radiazione di colore verde (505 nm).

Dansil-alanina



Spettri di emissione della dansil-alanina in presenza di concentrazioni crescenti di etanolo

La dansil-alanina è un amminoacido fluorescente che può essere incorporato geneticamente nella sequenza amminoacidica di una proteina mediante l'uso di tRNA soppressori non-senso. Lo spettro di assorbimento presenta un picco massimo a 340 nm, mentre lo spettro di emissione presenta un picco massimo a 550-570 nm ed è sensibile alla polarità dell'ambiente: si sposta verso il blu quando il fluoroforo è immerso in un ambiente idrofobico. Anche la resa quantica della dansil-alanina è sensibile all'idrofobicità del mezzo, con una resa quantica superiore in solventi a bassa polarità. Pertanto, analogamente allo studio della fluorescenza intrinseca del triptofano, l'analisi degli spettri di fluorescenza della dansil-alanina incorporata in proteine può fornire informazioni su cambiamenti conformazionali delle proteine.

Materiale

Tubo da 15 ml contenente PBS
Tubo da 15 ml contenente Etanolo
Proteina GFP
Soluzione di dansil-alanina

Preparazione delle seguenti diluizioni

A dansil-alanina 1:100 in PBS (1.5 ml)
B dansil-alanina 1:200 in etanolo (1.5 ml)
C GFP 1:20 in PBS (1.5 ml)

Spettri di emissione della dansil-alanina

Registrare gli spettri di emissione nell'intervallo 400-650 nm (λ eccitazione 340 nm)

- 1 PBS
- 2 campione A (dansil-alanina in PBS)
- 3 etanolo
- 4 campione B (dansil-alanina in etanolo)

Spettri di emissione della GFP

Registrare gli spettri nell'intervallo 450-600 (λ eccitazione 395 nm per il fluoroforo GFP)

- 1 PBS
- 2 campione C (GFP 1:20)

Registrare gli spettri nell'intervallo 300-550 (λ eccitazione 295 nm per il triptofano)

- 1 PBS
- 2 campione C (GFP 1:20)