

Fluorescenza

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

13 Maggio 2024

Indice

1	Introduzione	2
1.1	Strumentazione	3
1.1.1	Dipendenza della fluorescenza dal guadagno del tubo fotomoltiplicatore	4
1.2	Proprietà della fluorescenza	5
1.2.1	Stokes Shift	5
1.2.2	Regola di Kasha	7
1.2.3	Mirror Rule	7
1.2.4	Dipendenza della fluorescenza dall'assorbanza	8
2	Denaturazione della BLG	12
2.1	Analisi dati	13
2.2	Conclusioni	15
2.2.1	Confronto con i risultati ottenuti mediante dicroismo circolare	15
3	Binding dell'ANS	16
3.1	Relazione tra concentrazione proteina e fluorescenza dell'ANS	16
3.2	Procedura sperimentale	17
3.3	Analisi dati	18
3.4	Conclusioni	22

Abstract

In questo esperimento si sono analizzate due principali dinamiche: la denaturazione della proteina Beta-Lactoglobulina (BLG), usando il cloruro di guanidinio (GuHCl), e l'analisi della fluorescenza del sale ANS (8-Anilino-1-naphthalene-sulfonic acid), in relazione al suo binding con la proteina BSA (Bovine Serum Albumin). Per il primo aspetto, si è osservato lo spettro di fluorescenza di soluzioni con crescenti concentrazioni di GuHCl per monitorare i cambiamenti conformazionali della BLG. Si sono inoltre comparati i risultati a quelli ottenuti mediante dicroismo circolare, in particolare si sono confrontati i valori della differenza nell'energia libera di Gibbs associata al processo di denaturazione in acqua. Per il secondo, è stata valutata la fluorescenza di soluzioni di ANS mantenendo costante la sua concentrazione, mentre quella della BSA è stata ridotta progressivamente, permettendo di studiare l'interazione tra ANS e BSA, determinando il numero di siti di legame e osservando come l'interazione influenzi la fluorescenza del complesso.

In aggiunta, sono state verificate alcune proprietà teoriche come lo Stokes shift, la regola di Kasha e la dipendenza della fluorescenza dall'assorbanza, utilizzando soluzioni di rodamina. Si è anche osservato l'effetto di variazioni del gain del fototubo sull'acquisizione dello spettro.

1 Introduzione

La fluorescenza è il fenomeno dell'emissione di luce da parte di una sostanza che ha assorbito radiazione elettromagnetica. Questo processo avviene quando una molecola, precedentemente eccitata da un fotone ad alta energia, ritorna al suo stato fondamentale emettendo un fotone di energia inferiore. La luce emessa ha una lunghezza d'onda maggiore (e quindi energia minore) rispetto alla luce assorbita, un fenomeno noto come Stokes Shift.

L'unità fondamentale responsabile della fluorescenza all'interno di una molecola è chiamata **fluoroforo**.

Il processo di fluorescenza può essere descritto utilizzando il diagramma di Jablonski (Figura [1]), che rappresenta i vari stati elettronici e vibrazionali di una molecola e le transizioni tra di essi. Quando una molecola assorbe un fotone, passa dal suo stato elettronico fondamentale (S_0) a uno stato eccitato (S_1 o superiore). Successivamente, se la molecola si trova sul sottostato più basso del primo stato eccitato, $S_{1,0}$, essa può fare fluorescenza e tornare sullo stato fondamentale. Altrimenti, se si trova su uno stato con maggiore energia può perdere parte di questa attraverso processi non radiativi, come l'internal conversion, l'interazione con il solvente o il rilassamento vibrazionale, prima di emettere un fotone e tornare allo stato fondamentale.¹

¹Chiaramente la molecola potrebbe tornare allo stato fondamentale anche senza fare fluorescenza del tutto, per esempio potrebbe passare dallo stato di tripletto ed essere successivamente diseccitata in maniera del tutto dissipativa.

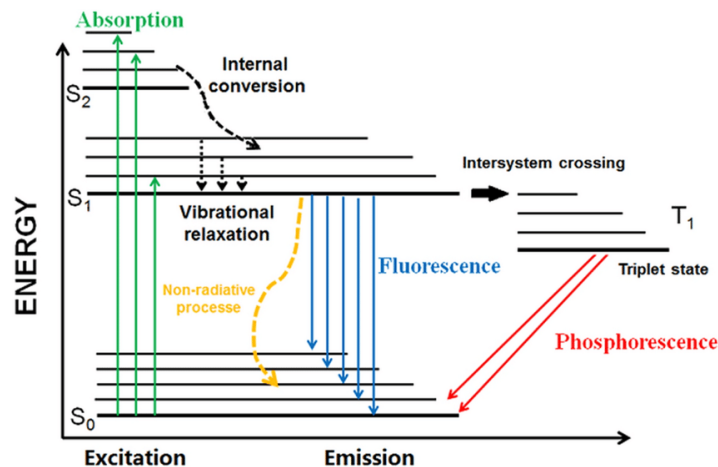


Figura 1. *Diagramma di Jablonski* che illustra i vari stati elettronici e vibrazionali e le transizioni tra di essi. Le frecce ascendenti rappresentano l'assorbimento di fotoni, mentre le frecce discendenti indicano l'emissione di fotoni e i processi non radiativi.

1.1 Strumentazione

Lo strumento impiegato per gli scopi dell'esperimento è uno spettrofluorimetro (rappresentazione schematica in figura [2]). Una sorgente produce un fascio di luce bianca, il quale passa attraverso un monocromatore che ne seleziona una singola lunghezza d'onda. Quindi il fascio monocromatico viene collimato e arriva sul campione.

La luce emessa dal campione viene poi nuovamente collimata e passa attraverso un altro monocromatore, dopodiché arriva sul rivelatore.

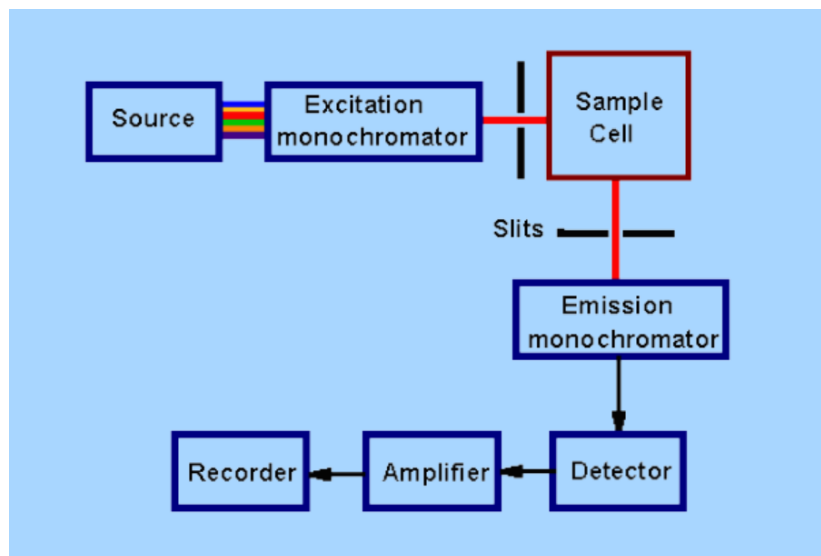


Figura 2. *Rappresentazione schematica delle componenti di uno spettrofluorimetro*

Utilizzando uno spettrofluorimetro è possibile effettuare due tipologie di misure:

- **Spettro di emissione:** si fissa con il primo monocromatore una lunghezza d'onda di eccitazione e, tramite il secondo monocromatore, si varia la lunghezza d'onda di emissione osservata.
- **Spettro di eccitazione:** si varia la lunghezza d'onda di eccitazione e si osserva l'emissione del campione ad una determinata lunghezza d'onda.

1.1.1 Dipendenza della fluorescenza dal guadagno del tubo fotomoltiplicatore

La fluorescenza è legata al guadagno (*gain*) del tubo fotomoltiplicatore, ovvero del rivelatore dello spettrofluorimetro.

Eccitando con luce di lunghezza d'onda pari a 526 nm una soluzione di rodamina in acqua di assorbanza $A = 0.01^2$, sono stati acquisiti gli spettri di fluorescenza nell'intervallo $530 - 650\text{ nm}$, al variare del gain del rivelatore. Il risultato è riportato nel grafico che segue.

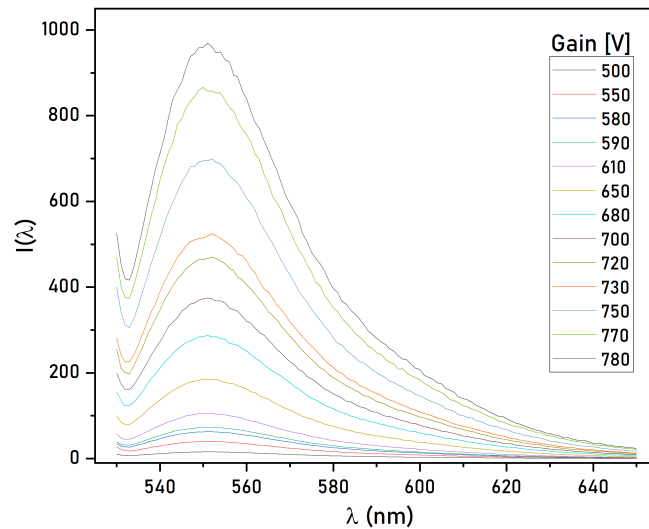


Figura 3. Gain del fototubo e spettri di fluorescenza: per studiare l'andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione del guadagno del fotomoltiplicatore, per diversi guadagni sono stati acquisiti gli spettri di fluorescenza di una soluzione di rodamina in acqua di assorbanza $A = 0.01$.

Come previsto, all'aumentare del gain si sono osservati spettri di emissione via via più alti.

Per un'analisi quantitativa, si è stimato il massimo di ogni spettro tramite un fit parabolico attorno al picco³. Tali valori, con le relative incertezze ottenute dall'interpolazione, sono stati rappresentati in funzione del gain e interpolati con l'andamento atteso dato da $y = a + bx^n$, dove il parametro n rappresenta il numero di *dinodi* del fototubo. Per facilitare la convergenza del fit, il parametro a è stato fissato al suo valore atteso, cioè 0. Il risultato è riportato nel grafico che segue.

²Si è utilizzato un campione a bassa assorbanza in modo da poter indagare la relazione tra intensità di fluorescenza e guadagno del fototubo anche per grandi valori di quest'ultimo. Infatti, si è riusciti a selezionare un voltaggio di 780 V senza raggiungere la saturazione.

³Si è sempre utilizzata l'equazione della parabola con coordinate del vertice per parametri.

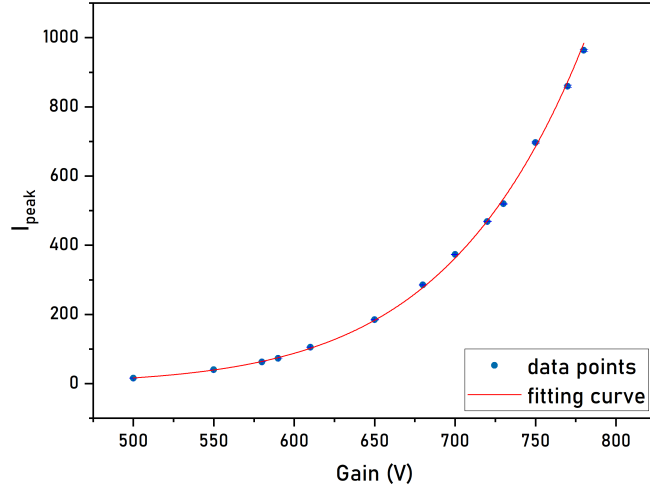


Figura 4. Andamento I vs Gain: i massimi degli spettri di fluorescenza sono stati rappresentati in funzione dei corrispondenti guadagni del fototubo. L'andamento di tali misure è stato confrontato con quello atteso, dato da $y = a + bx^n$, dove il parametro n rappresenta il numero di dinodi del rivelatore. Si è ottenuto il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 88$.

I dati sono ben distribuiti attorno al modello. Tuttavia, le barre di errore non intersecano la curva di fit, infatti $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$: si ritiene che l'errore sui massimi di intensità restituito dal fit parabolico sia una sottostima dell'incertezza reale, in quanto non tiene conto degli errori commessi durante la fase sperimentale di preparazione dei campioni (errori dovuti all'incertezza degli strumenti con cui sono stati preparati) e di acquisizione degli spettri.

Il numero di dinodi stimato attraverso l'interpolazione è:

$$n = (9.22 \pm 0.03)$$

1.2 Proprietà della fluorescenza

Come già accennato in precedenza, nella fluorescenza vi è un fenomeno detto **Stokes Shift**. Ci sono altre tre importanti proprietà associate alla fluorescenza che sono la **regola di Kasha**, la **Mirror rule** e la **dipendenza della fluorescenza dall'assorbimento**. In questa sezione si vogliono spiegare queste quattro proprietà della fluorescenza.

1.2.1 Stokes Shift

Lo Stokes Shift è il fenomeno per cui la luce emessa da un fluoroforo ha una lunghezza d'onda maggiore (e quindi energia minore) rispetto alla luce assorbita. Questo avviene perché, dopo l'assorbimento del fotone e l'eccitazione della molecola a uno stato elettronico superiore, essa perde parte dell'energia assorbita attraverso processi non radiativi, come il rilassamento vibrazionale o l'internal conversion, prima di emettere un fotone di energia inferiore. Questo spostamento tra i massimi di assorbimento ed emissione è caratteristico di ogni molecola fluorescente e permette di distinguere la luce emessa dalla luce eccitante.

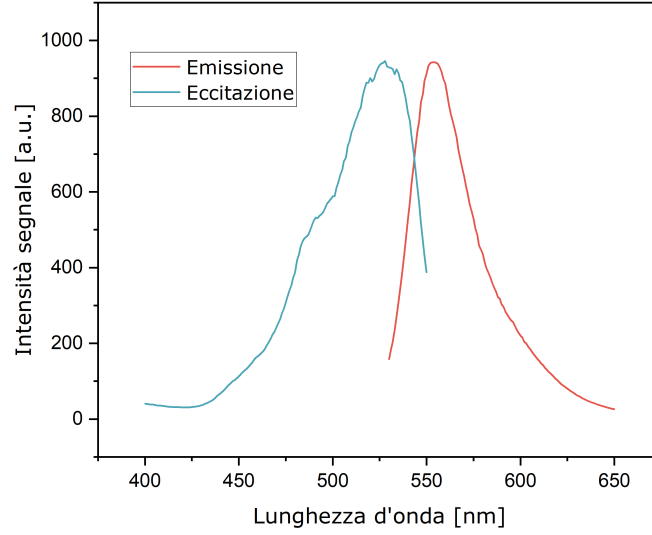


Figura 5. Stokes Shift: Lo spettro di emissione (fluorescenza) si trova a lunghezze d'onda maggiori rispetto allo spettro di eccitazione (che è quasi sempre proporzionale a quello di assorbimento).

Per ottenere il grafico di sopra si è prima misurato lo spettro di emissione di una soluzione di rodamina 6g, impostando come lunghezza d'onda di eccitazione $\lambda_e = 526 \text{ nm}$ e osservando l'intensità del segnale di fluorescenza nel range $530 - 650 \text{ nm}$. Si è poi acquisito lo spettro di eccitazione osservando l'intensità di fluorescenza alla lunghezza d'onda di 555 nm (picco di emissione della rodamina 6g) mentre si variava la lunghezza d'onda di eccitazione nel range $400 - 550 \text{ nm}$.⁴ Al fine di stimare lo Stokes Shift come

$$\Delta\lambda = \lambda_{\text{emission}}^{\text{max}} - \lambda_{\text{excitation}}^{\text{max}} \quad (1)$$

si sono calcolate le lunghezze d'onda in corrispondenza dei due picchi tramite fit parabolici. Propagando opportunamente l'errore⁵, si è ottenuto il seguente risultato:

$$\Delta\lambda = (26.9 \pm 0.2) \text{ nm}$$

Grazie alle relazioni tra energia e frequenza e tra frequenza e lunghezza d'onda di un fotone:

$$\begin{cases} E = h\nu \\ c = \lambda\nu \end{cases},$$

è stato possibile calcolare la variazione di energia associata allo Stokes Shift, data da

$$\Delta E = \frac{hc}{\Delta\lambda} = (46.2 \pm 0.3) \text{ eV}$$

ΔE rappresenta l'energia media dissipata in processi non radiativi durante la fase di diseccitazione.

⁴Si noti che per entrambe le misure si è mantenuto lo stesso valore di gain del fototubo paria a 490 V .

⁵L'errore sullo Stokes Shift è la somma in quadratura degli errori sulle lunghezze d'onda al picco.

1.2.2 Regola di Kasha

La regola di Kasha stabilisce che l'emissione di fluorescenza avviene principalmente dal sottolivello vibrazionale più basso del primo stato elettronico eccitato. Dopo l'assorbimento di un fotone e l'eccitazione a uno stato vibronico più alto del primo stato eccitato ($S_{1,0}$), la molecola tende a rilassarsi rapidamente a $S_{1,0}$ attraverso processi non radiativi, come l'internal conversion e il rilassamento vibrazionale. Pertanto, l'emissione di fluorescenza avviene generalmente con una lunghezza d'onda caratteristica dello stato vibrazionalmente più basso del primo stato eccitato, indipendentemente dall'energia iniziale del fotone assorbito.

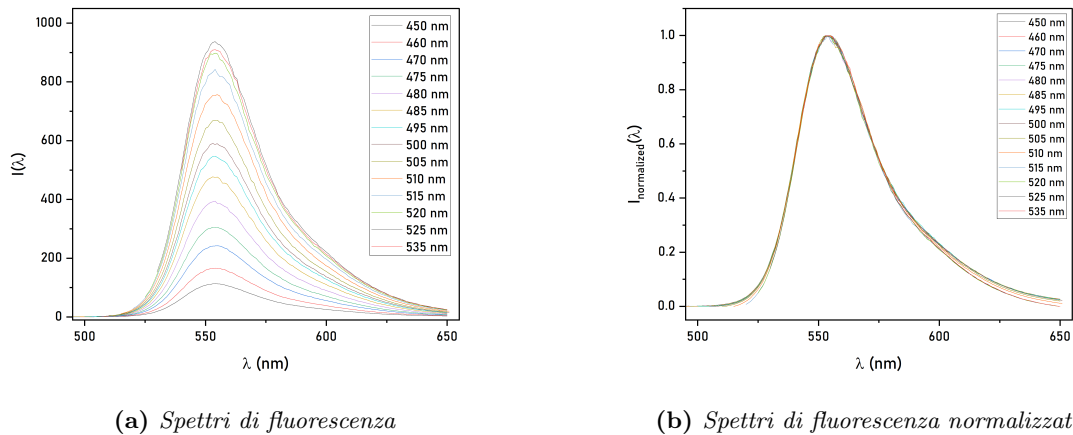


Figura 6. Spettri di fluorescenza acquisiti con diverse lunghezze d'onda d'eccitazione. Si osserva che il picco di emissione è indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione, come previsto dalla regola di Kasha. La legenda indica la lunghezza d'onda di eccitazione.

La regola di Kasha può essere osservata acquisendo gli spettri di fluorescenza della rodamina eccitata a diverse lunghezze d'onda (figura [6]). Per evidenziare meglio l'effetto, gli spettri sono stati normalizzati in modo tale che l'intensità al picco fosse 1.

Si noti che le code sono la parte più "disaccoppiata" poiché in queste zone il rapporto segnale/rumore è basso.

1.2.3 Mirror Rule

La mirror rule afferma che se i livelli vibrazionali dello stato S_0 e quelli dello stato S_1 (o altro stato eccitato sul quale viene "innalzata" la molecola dall'assorbimento dei fotoni) hanno la stessa spaziatura (ΔE), allora gli spettri di assorbimento ed emissione di una molecola sono speculari. Questo avviene perché i processi di assorbimento ed emissione coinvolgono le stesse transizioni vibrazionali tra gli stati elettronici in quanto, come già detto l'emissione tende ad avvenire dal sottostato vibrazionalmente rilassato di S_1 . Di conseguenza, la distribuzione delle intensità delle bande vibrazionali è simile in entrambi gli spettri, portando a una forma speculare.

Un esempio in cui non vale totalmente la mirror rule è lo spettro della rodamina (figura [5]); infatti in questo caso notiamo un "gomito" nello spettro di eccitazione (quasi sempre proporzionale a quello di assorbimento) che non è presente in quello di emissione. Si osserva però comunque che il picco principale rispetta la mirror rule.

1.2.4 Dipendenza della fluorescenza dall'assorbanza

All'aumentare della concentrazione del fluoroforo e quindi dell'assorbanza ($A = \varepsilon CL$), l'intensità del segnale di fluorescenza inizialmente aumenta quasi linearmente, ma ad alti valori di assorbanza raggiunge un plateau ⁶. Questo comportamento è descritto dalla relazione:

$$I = I_0 (1 - e^{-2.303 \cdot A}) \quad \text{dove } A = \varepsilon CL \quad (2)$$

Ciò è dovuto all'effetto di **Inner Filter**: la fluorescenza emessa dai fluorofori ad alte concentrazioni può essere riassorbita, diminuendo quindi l'intensità del segnale rilevato.

Con l'obiettivo di verificare la validità della relazione (2), sono state preparate soluzioni di rodamina in acqua caratterizzate da differenti concentrazioni del colorante, quindi da diversi valori di assorbanza. Nella tabella che segue sono riportati i valori target ed i valori veri di assorbanza delle soluzioni preparate in laboratorio⁷. Nell'analisi dei dati raccolti si sono sempre considerati i valori veri.

A_{target}	A_{vero}
0.50	0.498
0.40	0.401
0.30	0.300
0.20	0.200
0.10	0.100
0.08	0.080
0.06	0.060
0.04	0.041
0.02	0.020
0.01	0.010

Tabella 1. *Valori target e valori veri di assorbanza delle soluzioni di rodamina preparate in laboratorio.*

Di ciascuna soluzione è stato acquisito lo spettro di emissione nell'intervallo 530 – 650 nm, eccitando il campione sempre alla lunghezza d'onda di 526 nm. Ogni spettro è stato acquisito fissando il guadagno del tubo fotomoltiplicatore a 500 V. Il risultato è riportato nel grafico che segue.

⁶In realtà, per valori ancora maggiori di assorbanza, il segnale di fluorescenza tende ad annullarsi.

⁷Per via di errori sperimentali nella preparazione delle soluzioni, i valori di assorbanza reali non coincidono con quelli target. Tuttavia ciò non crea alcun problema se si tiene conto degli effettivi valori di assorbanza.

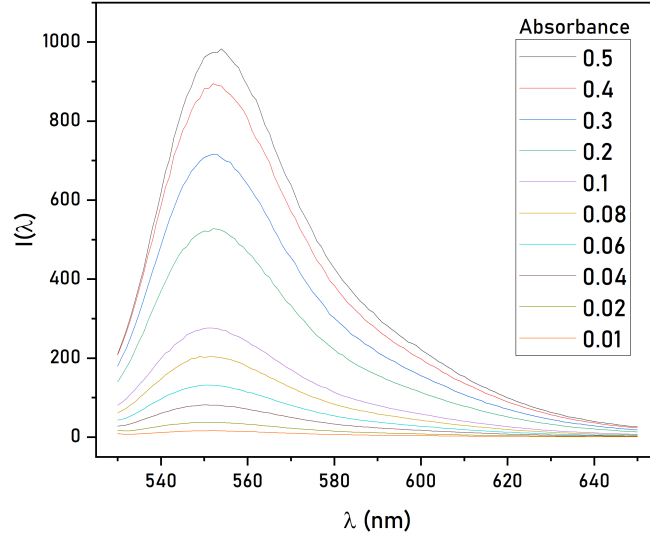


Figura 7. Assorbanza e spettri di emissione: per studiare l'andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione dell'assorbanza del campione, sono state preparate soluzioni di rodamina di diversa concentrazione. Di ognuna è stato acquisito lo spettro di emissione nell'intervallo 530–650 nm, fissando la lunghezza d'onda di eccitazione a 526 nm.

A questo punto, attraverso fit parabolici⁸ attorno al picco, si è stimato il valore di intensità massimo per ciascuno spettro. I valori ottenuti sono stati rappresentati in funzione dell'assorbanza del campione e interpolati con la funzione $y = a(1 - be^{-2.303 \cdot x})$. Si è trascurata l'incertezza sui valori di assorbanza, mentre ai valori di intensità al picco è stato attribuito l'errore restituito dal fit.

⁸Si è sempre utilizzata l'equazione della parabola con coordinate del vertice per parametri.

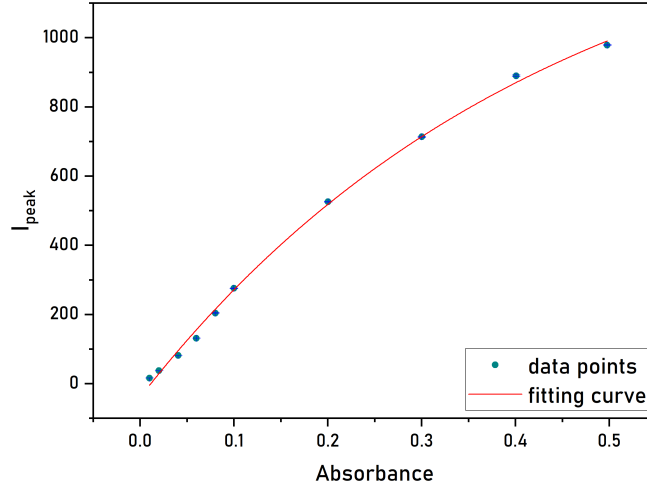


Figura 8. Andamento I vs A : i massimi degli spettri di emissione sono stati rappresentati in funzione dei corrispondenti valori di assorbanza. L'andamento osservato è stato confrontato, tramite interpolazione con la funzione $y = a(1 - be^{-2.303 \cdot x})$, con quello atteso (2), ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 24634$.

Per quanto riguarda la bontà del fit, valgono le stesse considerazioni fatte sopra. I dati sono ben distribuiti attorno al modello. Tuttavia, le barre di errore non intersecano la curva di fit, infatti $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$: si ritiene che l'errore sui massimi di intensità restituito dal fit parabolico sia una sottostima dell'incertezza reale, in quanto non tiene conto degli errori commessi durante la fase sperimentale di preparazione dei campioni (errori dovuti all'incertezza degli strumenti con cui sono stati preparati) e di acquisizione degli spettri.

Per verificare che i dati seguano l'andamento atteso (2), è necessario anche assicurarsi che la stima del parametro a sia compatibile con il suo valore vero, cioè 1. A tal fine è stato eseguito il test di compatibilità, ottenendo il seguente risultato:

$$t = \frac{|b - 1|}{\sigma_b} = \frac{1.027}{0.008} \approx 3.4.$$

La probabilità di trovare un valore di b che disti da 0 più di t deviazioni standard vale allora

$$\alpha = 1 - \int_{-t}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz \approx 0 < 5\%,$$

dunque non c'è compatibilità. La ragione risiede nella grande precisione della stima del parametro b , forse legata alla già citata sottostima dell'incertezza sui valori di intensità massima.

Limite lineare

Nel limite $A \ll 1$, la relazione (2) diventa *lineare*. In particolare, assume la forma seguente:

$$I = 2.303 I_0 \varphi f(\lambda) dA, \quad (3)$$

dove φ e $f(\lambda)$ rappresentano rispettivamente la resa quantica del fluoroforo, cioè il rapporto tra il numero di fotoni emessi e il numero di fotoni assorbiti, e il profilo della banda spettrale; I_0 e d rappresentano invece l'intensità della luce incidente e l'efficienza del rivelatore.

Allora, partendo da valori di assorbanza maggiori, si sono via via eliminati i dati raccolti, fermandosi quando l'andamento delle misure, qualitativamente, cominciava a essere lineare. Di seguito è rappresentato l'andamento delle prime tre misure, che è stato interpolato con la funzione $y = a' + b'x$. Gli errori utilizzati sono gli stessi del fit esponenziale.

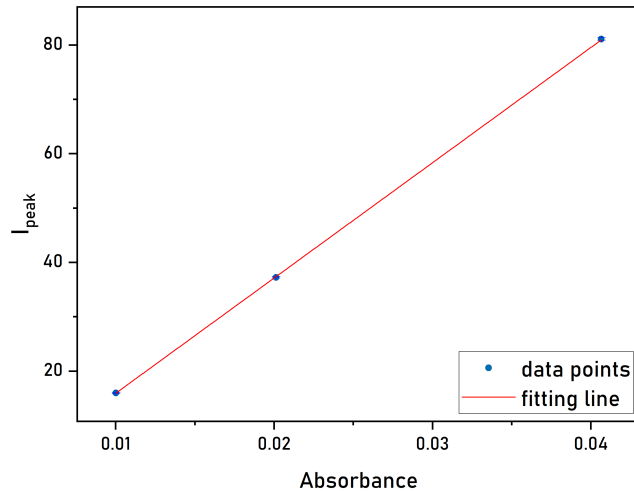


Figura 9. Andamento I vs A , limite lineare: quando $A \ll 1$, la relazione tra intensità al picco e assorbanza diventa lineare. Nella pratica, vale l'approssimazione lineare fintanto che $A < 0.05$. I primi tre dati sono stati interpolati con la funzione $y = a' + b'x$, ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 1.7$.

Nonostante il numero ridotto di dati a disposizione non consenta di fare considerazioni di carattere statistico, si osserva che le tre misure e le loro barre di errore, sono ben distribuite attorno alla retta di interpolazione. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 20\% > 5\%$. Pertanto, per valori di assorbanza $A < 0.05$, risulta valida l'approssimazione lineare.

Commento: Si potrebbe provare ad effettuare dei fit lineari partendo con un certo numero di punti e riducendolo di volta in volta; in questo modo, osservando il valore del χ^2 , sarebbe possibile stabilire fin dove è valida l'approssimazione lineare. Tuttavia, dato che gli errori associati all'intensità del picco sono stati sottostimati (come già discusso in precedenza), questo approccio risulterebbe non significativo in quanto i valori dei χ^2 sarebbero molto elevati e poco descrittivi del reale andamento.

2 Denaturazione della BLG

La Beta-LactoGlobulina contiene due gruppi triptofano, uno localizzato sulla superficie della proteina (Trp₁₉) e l'altro posizionato all'interno del core idrofobico (Trp₆₁). Il gruppo Trp, quando esposto in ambiente idrofilo, mostra un picco di fluorescenza attorno ai 350 nm, mentre nel nucleo idrofobico della proteina il picco si osserva intorno ai 320 nm. Durante il processo di denaturazione, l'ambiente a cui è esposto il triptofano varia e di conseguenza varia il suo picco di emissione in quanto subisce quenching da parte dell'acqua. È quindi possibile monitorare la denaturazione della proteina analizzando lo spettro di fluorescenza in soluzioni con concentrazioni crescenti di denaturante, in questo caso il cloruro di guanidinio (GuHCl). Il segnale, y , varia in base allo stato di denaturazione della proteina secondo la legge⁹:

$$y = \frac{y_N + y_D \cdot \exp \left[-m \left(C_D^{\text{mid point}} - C_D \right) / RT \right]}{1 + \exp \left[-m \left(C_D^{\text{mid point}} - C_D \right) / RT \right]} \quad (4)$$

Dove:

- y : la lunghezza d'onda del picco del segnale di fluorescenza osservato.
- y_N : la lunghezza d'onda del picco di fluorescenza della proteina nativa (non denaturata).
- y_D : la lunghezza d'onda del picco del segnale di fluorescenza della proteina denaturata.
- m : coefficiente che descrive la sensibilità del processo di denaturazione alla concentrazione del denaturante.
- $C_D^{\text{mid point}}$: la concentrazione di denaturante alla quale metà delle molecole di proteina sono denaturate.
- C_D : la concentrazione del denaturante (GuHCl).
- R : la costante universale dei gas.
- T : la temperatura assoluta in Kelvin.

Le misure di fluorescenza sono state pianificate utilizzando una concentrazione 5 μM di proteina e le seguenti concentrazioni di GuHCl: 0M, 1M, 2M, 2.5M, 3M, 4M e 5M. Tuttavia, a causa di errori sperimentali nella preparazione delle soluzioni, le concentrazioni effettivamente utilizzate sono le seguenti:

Concentrazioni GuHCl [M]						
0.000	0.993	2.009	2.500	3.162	3.974	4.985

Concentrazioni Proteina [μM]						
5.075	5.251	4.969	5.404	5.055	5.514	5.368

⁹Si veda la sezione (1.2) della relazione sul dicroismo per una spiegazione più dettagliata. Si noti inoltre che è stato utilizzato il LEM (Liner Extrapolation Model).

2.1 Analisi dati

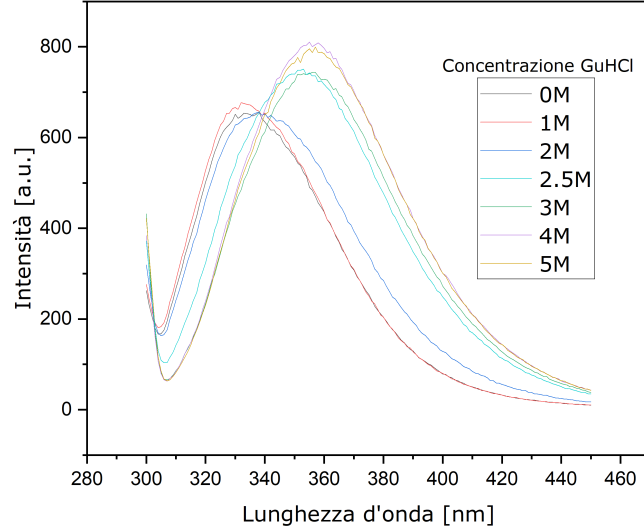


Figura 10. Spettri di fluorescenza: si sono acquisiti gli spettri di fluorescenza di soluzioni contenenti la proteina e diverse concentrazioni di denaturante.

Dagli spettri di fluorescenza acquisiti a diverse concentrazioni di GuHCl (figura [10]), sono stati trovati i valori delle lunghezze d'onda ai picchi effettuando dei fit parabolici attorno a questi tramite la funzione $y = A(x - x_v)^2 + y_v$. Sono di seguito riportate le lunghezze d'onda ai picchi (y_p , tabella [2]), con i relativi errori (prodotti dal fit).

concentrazione GuHCl [M]	x_p	errore x_p
0.000	334,96	0,14
0.993	334,66	0,17
2.009	338,92	0,13
2.500	352,34	0,10
3.162	355,52	0,12
3.974	356,11	0,09
4.985	356,39	0,14

Tabella 2. Lunghezza d'onda ai picchi: sono riportati i valori delle lunghezze d'onda (ed i relativi errori) ai picchi di ciascuno spettro di fluorescenza acquisiti a diverse concentrazioni di GuHCl.

Sono stati poi interpolati, mediante la funzione (4), i valori delle lunghezze d'onda al picco in funzione della corrispondente concentrazione di denaturante presente in soluzione. In questo modo si è ottenuto il valore della concentrazione di denaturante al mid-point: $C_D^{\text{mid point}} = (2.24 \pm 0.01) M$. Si noti che per far convergere il fit si è impostata manualmente la temperatura $T = 293K$.

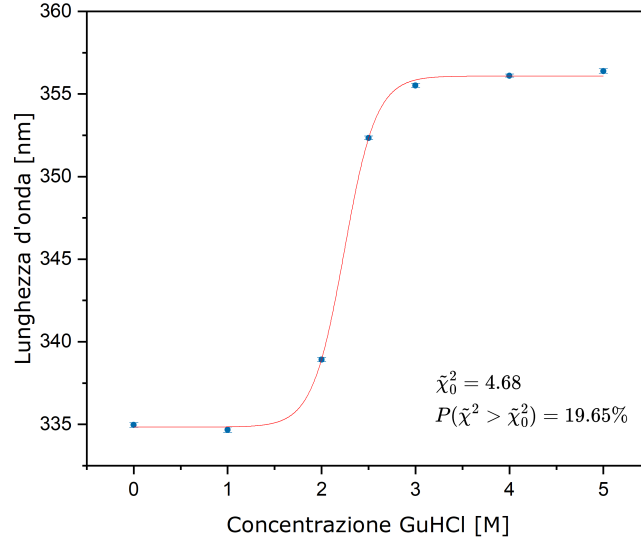


Figura 11. *Fit del picco del segnale in funzione della concentrazione di GuHCl:* sono rappresentati i valori delle lunghezze d'onda al picco in funzione della concentrazione di denaturante ed il fit effettuato con la (4). Il fit si adatta bene ai dati.

$y_N[nm]$	$y_D[nm]$	$C_D^{midpoint}[M]$	$m[kJ \cdot l \cdot mol^{-2}]$
334.83 ± 0.23	356.08 ± 0.14	2.24 ± 0.01	14.9 ± 0.6

Tabella 3. *Parametri restituiti dal fit.*

Il fit risulta adattarsi bene ai dati, infatti $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_0^2) = 19.65\% > 5\%$ ed i valori dei parametri ottenuti sono riportati nella tabella sopra (Tabella [3]). Infine da $C_D^{mid point}$ ed m si è ricavato il valore della variazione di energia libera di Gibbs associata al processo di denaturazione in acqua:

$$\Delta G_D^{H_2O} = m \cdot C_D^{midpoint} = (33.4 \pm 1.4) kJ/mol$$

L'incertezza è stata ottenuta propagando opportunamente l'errore sui due parametri, secondo la formula $\sigma_{\Delta G_D^{H_2O}} = \Delta G_D^{H_2O} \sqrt{(\sigma_m/m)^2 + (\sigma_{C_D^{midpoint}}/C_D^{midpoint})^2}$.

2.2 Conclusioni

È stato osservato come i dati del segnale, ovvero il valore della lunghezza d'onda del picco di emissione dello spettro, seguano l'andamento teorico descritto dall'equazione (4); infatti si è ottenuto un ottimo fit $P(\chi^2 > \tilde{\chi}_0^2) = 19.65\%$.

Inoltre, qualitativamente, osserviamo che i parametri y_N e y_D sembrano rispecchiare i valori teorici della fluorescenza del triptofano in ambiente idrofobico, $\lambda = 350 \text{ nm}$, e idrofilo, $\lambda = 320 \text{ nm}$.

Le principali difficoltà si sono riscontrate nella preparazione delle soluzioni; tuttavia, tenendo conto delle effettive masse inserite di ciascun composto è stato possibile calcolare la reale concentrazione di denaturante presente in soluzione.

2.2.1 Confronto con i risultati ottenuti mediante dicroismo circolare

È stato confrontato il valore della concentrazione di denaturante al mid-point ($C_D^{midpoint}$) ottenuto in questo esperimento, ovvero $(2.24 \pm 0.01) M$, con quello ottenuto seguendo il segnale di ellitticità molare del dicroismo circolare nel range $224 - 226 \text{ nm}$ (range su cui è stato mediato il valore di ellitticità molare), ovvero $(2.30 \pm 0.07) M$. Si osserva una buona compatibilità tra i due valori:

$$t = \frac{|\Delta C_D^{mid \text{ point}}|}{\Delta \sigma} = \frac{|\Delta C_D^{mid \text{ point}}|}{\sqrt{(0.01M)^2 + (0.07M)^2}} = \frac{|-0.06|}{0.071} = 0.85 < 1$$

Per quanto riguarda la variazione di energia libera di Gibbs in assenza di denaturante ($\Delta G_D^{H_2O}$), il valore ottenuto è significativamente diverso rispetto a quello ottenuto tramite dicroismo circolare. Questa discrepanza è evidentemente dovuta al diverso valore del coefficiente m . Una possibile spiegazione è legata al fatto che il processo di denaturazione della BLG non segue un modello a due stati, ma include uno stato intermedio.

Il dicroismo circolare rivela i cambiamenti conformazionali nella struttura secondaria della proteina, mentre la fluorescenza rileva i cambiamenti nella lunghezza d'onda di emissione del triptofano. Poiché questi due metodi osservano aspetti diversi del processo di denaturazione, possono riflettere in modo differente l'energia libera associata ai cambiamenti strutturali.

In particolare, il dicroismo circolare misura le transizioni nella struttura secondaria che potrebbero non corrispondere direttamente ai cambiamenti nell'ambiente del triptofano rilevati dalla fluorescenza. Quando la proteina passa dallo stato nativo a uno stato intermedio e infine allo stato denaturato, il triptofano può sperimentare cambiamenti ambientali significativi, influenzando la fluorescenza in modo diverso rispetto ai cambiamenti, probabilmente più lievi¹⁰, nella struttura secondaria rilevati dal dicroismo circolare. Di conseguenza, la variazione dell'energia libera di Gibbs può risultare maggiore nella fluorescenza a causa della sensibilità del triptofano ai cambiamenti locali nel suo microambiente.

¹⁰Il passaggio allo stato intermedio ha probabilmente più influenza sul triptofano rispetto che sulla struttura secondaria della proteina.

3 Binding dell'ANS

In questa seconda parte si vuole studiare l'interazione del ANS(1-8-anilino-naftalene-sulfonato) con la proteina BSA(Bovine Serum Albumin). L'ANS quando legato alla BSA fluoresce fortemente, in quanto si inserisce nel core idrofobico della proteina. Invece non fluoresce quando si trova da solo in soluzione in quanto i processi di diseccitazione non radiativa prevalgono.

3.1 Relazione tra concentrazione proteina e fluorescenza dell'ANS

Si può ottenere una relazione tra il segnale di fluorescenza dell'ANS e la concentrazione della BSA procedendo nel seguente modo. Si ipotizzi che la BSA abbia n siti di legame indipendenti (ovvero la probabilità del ligando di legarsi all' i -esimo sito non dipende da quali altri siti sono già legati). Chiamiamo $[L]$ la concentrazione del ligando (ovvero l'ANS) non legato, $[P]$ la concentrazione della BSA disponibile per legarsi con l'ANS (ovvero che non abbia tutti i siti di legame occupati¹¹) e $[PL]$ la concentrazione di proteina legata. Si consideri ora la costante di associazione totale:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

Se C_B è la concentrazione di ligando legato, C_F la concentrazione di ligando libero (ovvero $[L]$) e $C_T = C_B + C_F$ la concentrazione di ligando totale; allora la costante di associazione può essere riscritta come:

$$K_a = \frac{C_B}{(nP - C_B) C_F} = \frac{C_B}{(nP - C_B) (C_T - C_B)}$$

Infatti è evidente che $[P] = nP - C_B$, con P concentrazione di molecole di proteina, in quanto la proteina può legare n ligandi. A questo punto si riscrive l'equazione precedente come:

$$C_B = K_a[nPC_T - nPC_B - C_B C_T + C_B^2]$$

$$C_B^2 - C_B \left[nP + C_T \frac{1}{K_a} \right] + nPC_T = 0$$

e quindi le soluzioni sono:

$$C_B = \frac{1}{2} \left[(nP + C_T + K_a^{-1}) \pm \sqrt{(nP + C_T + K_a^{-1})^2 - 4nPC_T} \right] \quad (5)$$

Chiaramente però la soluzione col "+" è da scartare in quanto non fisica, dato che comporterebbe l'assurdo: $C_B > C_T$. A questo punto si procede legando C_B con il segnale osservato, ovvero l'intensità di fluorescenza. Definiamo I_B l'intensità di fluorescenza dovuta al ligando legato e I_F quella dovuta al ligando libero. Si ha:

$$I_B = C_B \eta_B$$

$$I_F = C_F \eta_F$$

dove η_B ed η_F rappresentano le efficienze quantiche dei due segnali di fluorescenza; questi fattori tengono conto sia della resa quantica dei processi che dell'efficienza del rivelatore (oltre a contenere tutte le altre costanti). Il segnale osservato sarà l'intensità totale:

$$I = I_B + I_F = C_B \eta_B + C_F \eta_F = C_B(\eta_B - \eta_F) + C_T \eta_F$$

¹¹Si noti che in $[P]$ ciascuna molecola di BSA viene conteggiata $n - k$ volte, con k numero di siti occupati. Sostanzialmente $[P]$ rappresenta la concentrazione di siti di legame liberi.

Chiamando $\Delta\eta = \eta_B - \eta_F$

$$I = C_B \Delta\eta - \eta_F$$

$C_T \eta_F$ è una costante e rappresenta l'intensità di fluorescenza quando tutti i ligandi sono liberi; verrà chiamata I_0 . Quindi sostituendo C_B con la (5) si ha¹²:

$$I = \frac{\Delta\eta}{2} \left[(nP + C_T + K_d) - \sqrt{(nP + C_T + K_d)^2 - 4nPC_T} \right] + I_0 \quad (6)$$

3.2 Procedura sperimentale

Si è utilizzato uno spettrofluorimetro per acquisire gli spettri di fluorescenza di diverse soluzioni di BSA, ANS ed un tampone fosfato (PBS). Si è diminuita di volta in volta la concentrazione della proteina, mantenendo costante quella di ANS.

È stata preparata una soluzione iniziale di BSA ed ANS rispettivamente con concentrazioni: $C_{BSA} = 86.13 \mu M$ e $C_{ANS} = 5 \mu M$. Si è inoltre preparato uno stock di 30 ml di una soluzione di ANS a $5 \mu M$ in tampone fosfato, utilizzato per diluire progressivamente la concentrazione di BSA mantenendo costante quella di ANS. Ciascuna soluzione successiva è stata preparata prendendo un volume uguale della soluzione stock (di ANS e PBS) e della soluzione precedente, permettendo così da dimezzare la concentrazione di BSA mantenendo inalterata quella di ANS.

Infine si è anche acquisito lo spettro di una soluzione contenente solo ANS $5 \mu M$ e PBS. Sono riportate nella tabella sottostante le concentrazioni di proteina per ciascuna soluzione preparata:

# soluzione	$C_{BSA} [\mu M]$
0	86,13
1	43,09
2	21,50
3	10,77
4	5,39
5	2,63
6	1,32
7	0,66
8	0,33
9	0,16
10	0,08
11	0,00

Tabella 4. Concentrazioni di BSA: sono riportate le concentrazioni di BSA utilizzate in ciascuna soluzione. La concentrazione dell'ANS è invece mantenuta costante a $5 \mu M$.

¹² $K_d = K_a^{-1}$ è la costante di dissociazione.

3.3 Analisi dati

Dagli spettri di fluorescenza ottenuti (figura [12]) si è ricavata l'intensità al picco interpolando, in un intorno di quest'ultimo, con una parabola. Si è utilizzata l'espressione $y = A(x - x_v)^2 + y_v$.

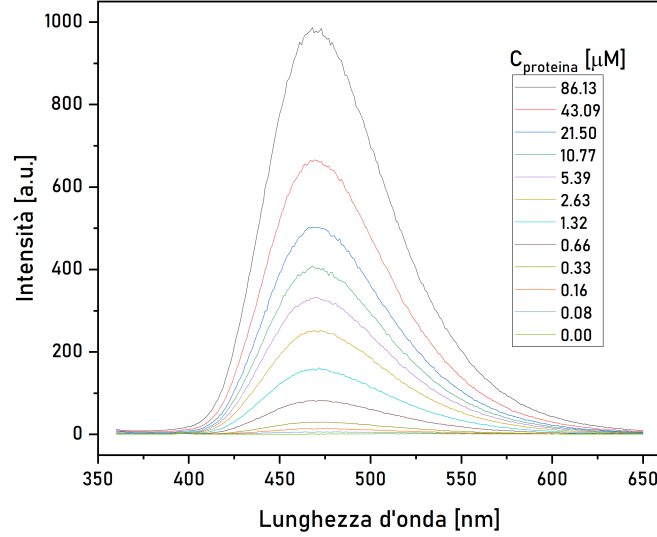


Figura 12. Spettri di fluorescenza: si sono acquisiti gli spettri di fluorescenza delle diverse soluzioni contenenti una stessa concentrazione di ANS e diverse concentrazioni di BSA.

Si sono quindi interpolati (figura [13]) i valori di intensità al picco in funzione della concentrazione di proteina utilizzando l'espressione (6). La concentrazione totale del ligando, C_T , è stata impostata uguale a $5 \mu M$; inoltre si è utilizzato $I_0 = 0$ in quanto, osservando lo spettro di fluorescenza della soluzione contenente solo ANS, si è notato che era sostanzialmente nullo.

Dal fit si ricava il numero di siti di legame n e la costante di dissociazione K_d (oltre al parametro $\Delta\eta/2$ che però non è di interesse per questo esperimento).

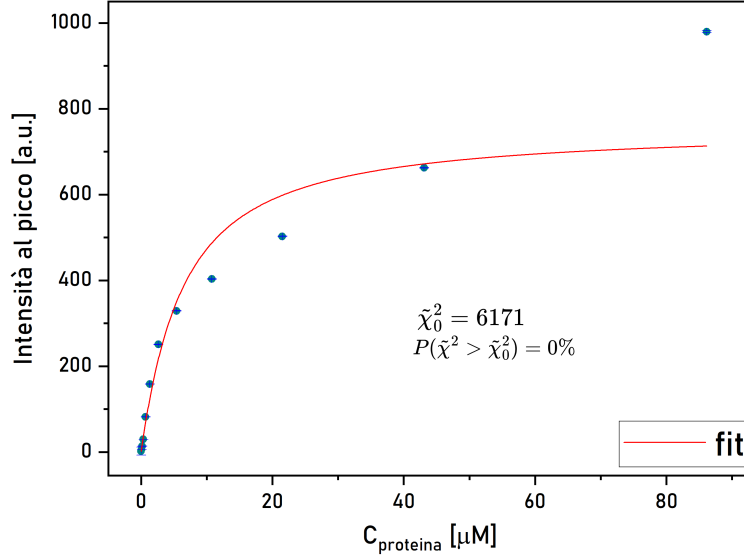


Figura 13. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA: si sono fittati i valori di intensità al picco in funzione delle concentrazioni di proteina, con l'espressione (6).*

Tuttavia il fit non è risultato buono, infatti si ha $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$.

I valori dei parametri ottenuti, con i relativi errori, sono riportati nella seguente tabella¹³:

n	K_d	$\Delta\eta/2$
3.0 ± 0.3	16	66

Tabella 5. Risultati fit: *sono riportati i valori dei parametri ottenuti dal fit con i relativi errori.*

Dall'osservazione qualitativa della Figura [13], si è notato che l'ultimo punto sembrava discostarsi significativamente dall'andamento degli altri punti. Si è quindi provato a rimuoverlo per rifare l'analisi. Tuttavia, i risultati ottenuti dopo questa modifica (figura [14]) non sono migliorati, come evidenziato dalla probabilità $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\%$, inferiore alla soglia del 5%.

¹³Nel fit iniziale, abbiamo fissato $n = 3$ (come previsto teoricamente) e permesso ai parametri K_d e $\Delta\eta/2$ di variare. Successivamente, questi parametri sono stati bloccati per permettere la variazione di n . Questa procedura è stata adottata a causa del limitato numero di dati disponibili, che rendeva difficile la convergenza del fit. Di conseguenza, nella tabella solo n ha un errore associato.

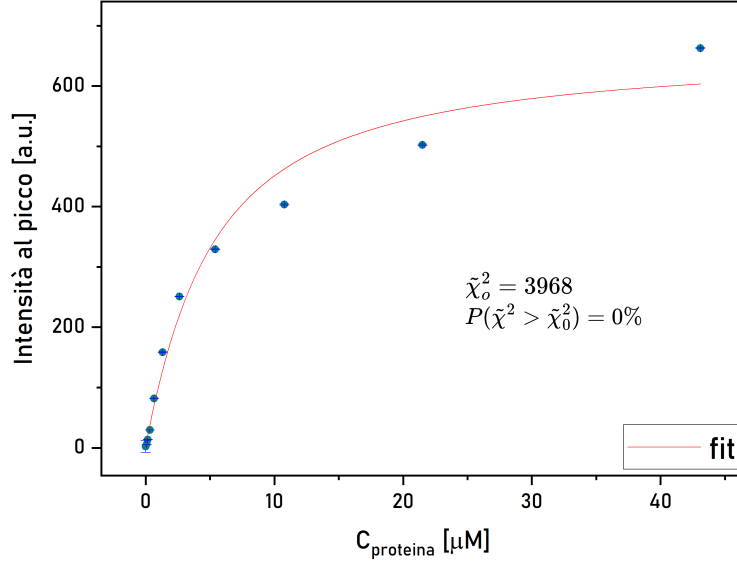


Figura 14. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA, avendo rimosso il punto a $C_{BSA} = 86.13 \mu M$.*

I parametri ottenuti in questo fit sono riportati nella seguente tabella¹⁴:

n	K_d	$\Delta\eta/2$
3 ± 4	12 ± 20	66

Tabella 6. Risultati fit: sono riportati i valori dei parametri ottenuti dal fit con i relativi errori

In questo caso inoltre i valori di n e di K_d sono assolutamente non significativi visto che gli errori superano i valori stessi.

Si è infine provato a rimuovere un ulteriore punto (quello a $C_{BSA} = 43.09 \mu M$), che nuovamente sembrava distaccarsi molto dall'andamento dei punti precedenti. Ma ancora una volta si ottiene un fit pessimo (figura [15]) e di nuovo $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\%$.

¹⁴Anche in questo caso, come per il fit precedente, si sono fatti prima variare K_d e $\Delta\eta/2$. Tuttavia questa volta, quando si è lasciato variare n , si è lasciato variare anche K_d ; per questo motivo si ha anche un errore su tale parametro.

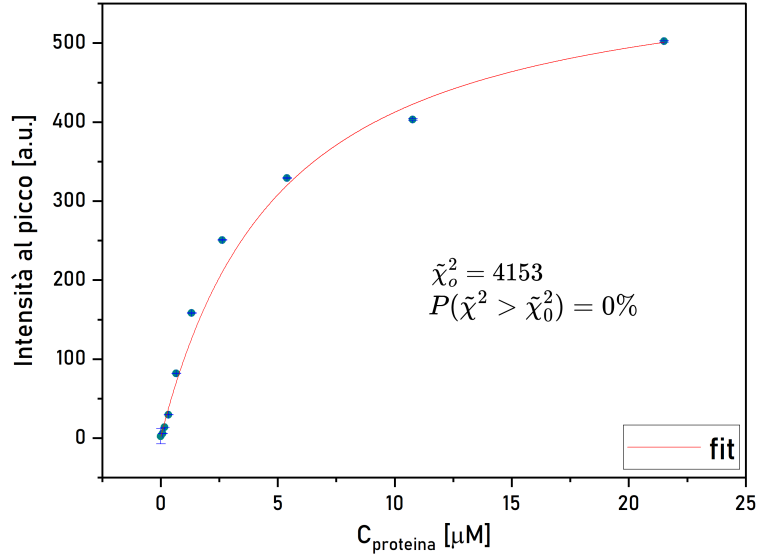


Figura 15. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA, avendo rimosso i punti a $C_{BSA} = 86.13\mu M$ e $C_{BSA} = 43.09\mu M$.*

I parametri ottenuti in questo fit sono riportati nella seguente tabella:

n	K_d	$\Delta\eta/2$
7 ± 10	32 ± 50	61

Tabella 7. Risultati fit: sono riportati i valori dei parametri ottenuti dal fit con i relativi errori

Anche in questo caso i parametri n e K_d hanno un errore associato maggiore del loro valore e dunque non sono significativi.

3.4 Conclusioni

Come già detto i fit effettuati non risultano buoni (hanno tutti $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$) e dunque le stime dei parametri n e K_d non sono significative. Si ipotizza che questi risultati possano essere ricondotti principalmente a tre fattori:

1. La quantità di dati raccolti, ovvero il numero di spettri acquisiti a diverse concentrazioni di BSA, non è sufficiente per far convergere correttamente il fit con i tre parametri liberi. Infatti per effettuare i fit si è prima dovuto fissare $n = 3$ (si è utilizzato 3 perché è il valore teorico atteso), facendo variare i parametri K_d e $\Delta\eta/2$ e successivamente fissare uno o due di questi parametri e permettere ad n di variare.
2. Nel preparare le diverse soluzioni non sempre si è riusciti a combinare esattamente lo stesso volume della soluzione precedente e della soluzione stock di ANS e PBS; questo potrebbe aver portato a soluzioni in cui la concentrazione di ANS non era costante ed era diversa da $5\ \mu M$. Vista la natura progressiva del processo di preparazione delle soluzioni queste imprecisioni possono solo essere andate peggiorando.
3. Potrebbe essere che i siti di legame non siano in realtà indipendenti. Questo vorrebbe dire che l'equazione (6) non è corretta in questo caso. Effettivamente, da un'osservazione qualitativa dei fit, sembrerebbe che i dati non siano ben descritti dalla funzione teorica.

Concludiamo comunque osservando che dal primo fit si ottiene un valore di n vicino a quello teorico e con un errore non eccessivamente elevato (tabella [6]). Tuttavia non possiamo considerarlo un risultato significativo.