

2.1 Analisi dati

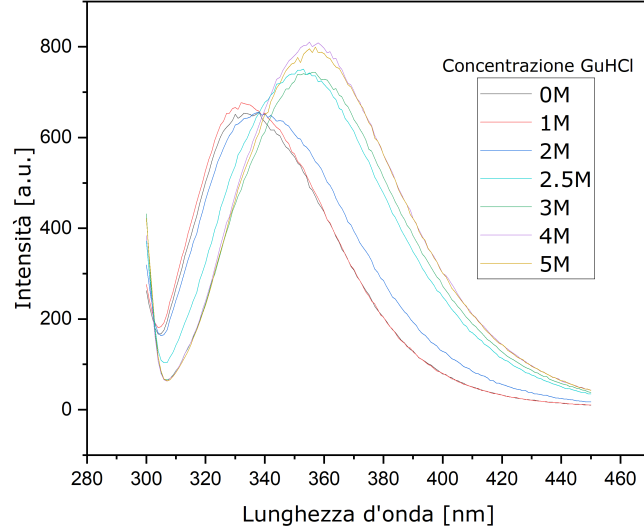


Figura 10. Spettri di fluorescenza: si sono acquisiti gli spettri di fluorescenza di soluzioni contenenti la proteina e diverse concentrazioni di denaturante.

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 $T = 293K$.

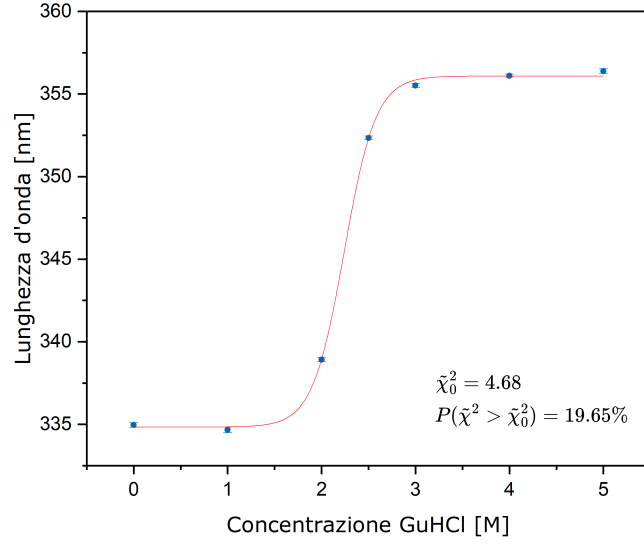


Figura 11. *Fit del picco del segnale in funzione della concentrazione di GuHCl:* sono rappresentati i valori delle lunghezze d'onda al picco in funzione della concentrazione di denaturante ed il fit effettuato con la (4). Il fit si adatta bene ai dati.

$y_N[nm]$	$y_D[nm]$	$C_D^{midpoint}[M]$	$m[kJ \cdot l \cdot mol^{-2}]$
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 $\sigma_{\Delta G_D^{H_2O}} = \Delta G_D^{H_2O} \sqrt{(\sigma_m/m)^2 + (\sigma_{C_D^{midpoint}}/C_D^{midpoint})^2}$.

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 $y = A(x - x_v)^2 + y_v$.

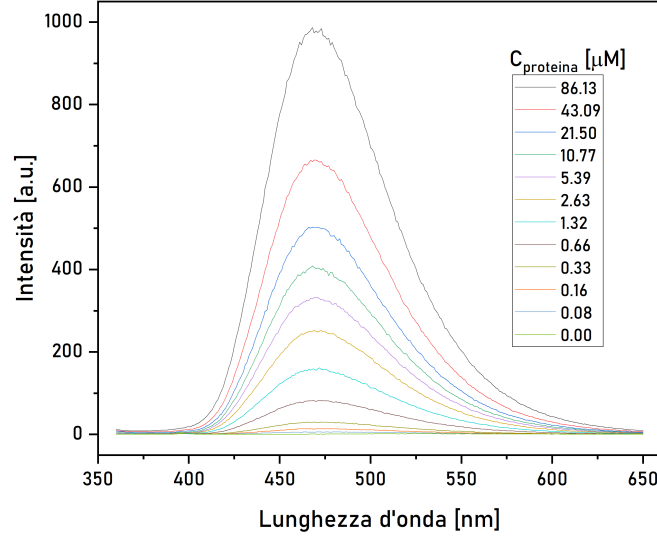


Figura 12. Spettri di fluorescenza: si sono acquisiti gli spettri di fluorescenza delle diverse soluzioni contenenti una stessa concentrazione di ANS e diverse concentrazioni di BSA.

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).

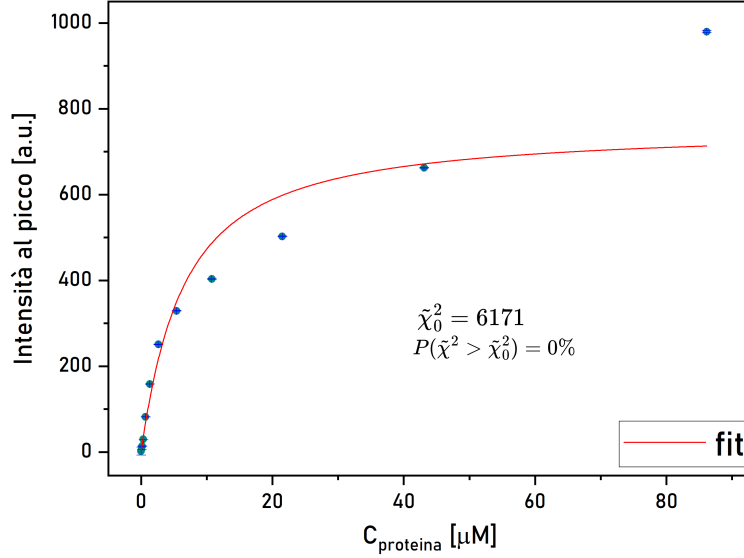


Figura 13. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA: si sono fittati i valori di intensità al picco in funzione delle concentrazioni di proteina, con l'espressione (6).*

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.

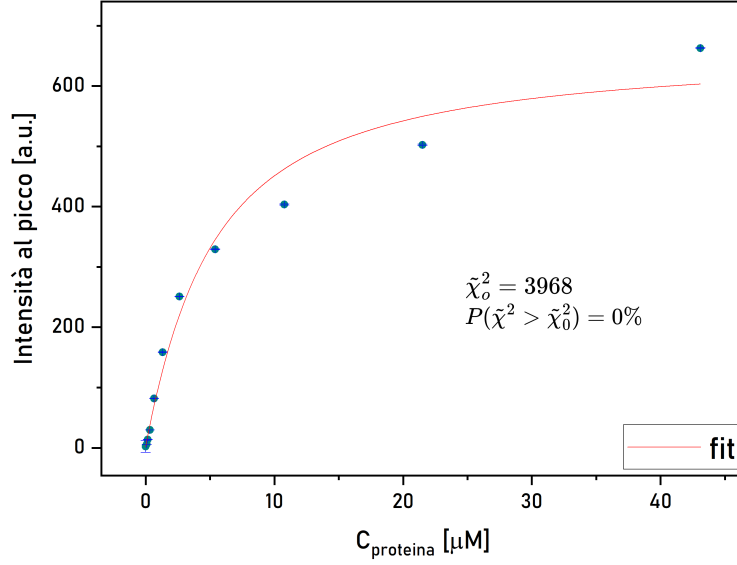


Figura 14. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA, avendo rimosso il punto a $C_{BSA} = 86.13 \mu M$.*

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.

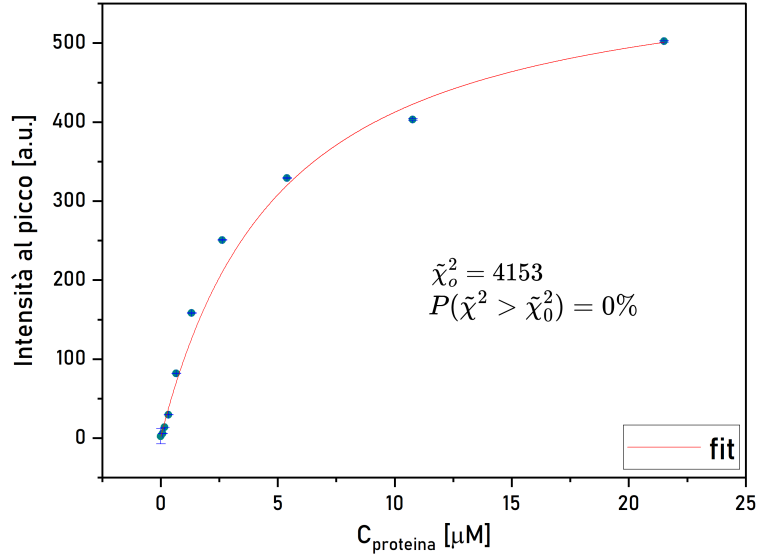


Figura 15. *Fit dell'intensità al picco vs concentrazione BSA, avendo rimosso i punti a $C_{BSA} = 86.13\mu M$ e $C_{BSA} = 43.09\mu M$.*

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.

4.1 Procedimento e analisi dati

Inizialmente è stato acquisito lo spettro di assorbimento di una soluzione contenente tampone fosfato e lisozima. Successivamente, la proteina è stata denaturata tramite riscaldamento, e si è proceduto con l'acquisizione di un secondo spettro (figura[19]). Si noti che, come spiegato nella sezione [2], è stato necessario acquisire anche lo spettro del solo tampone fosfato per sottrarlo agli spettri di interesse.

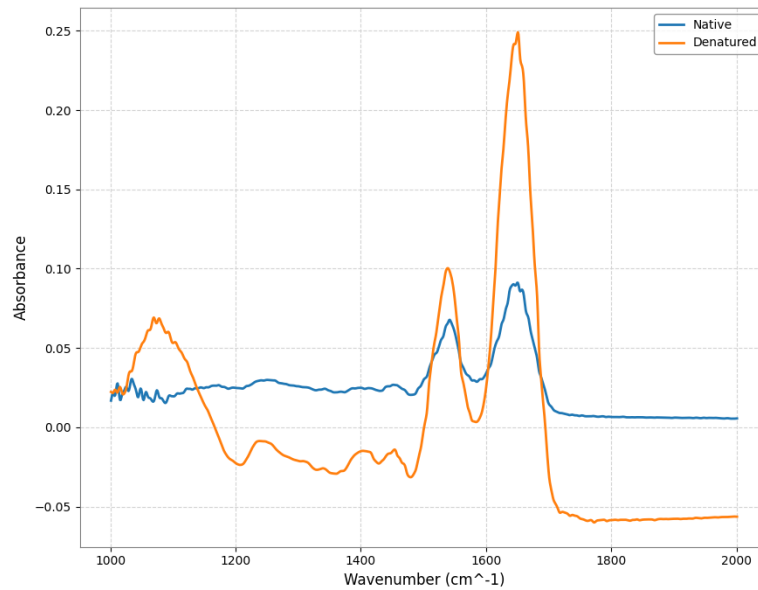


Figura 19. Spettro di assorbanza nativo e denaturato del lisozima: vengono riportati gli spettri di assorbanza acquisiti per il lisozima allo stato nativo e denaturato (per via termica). Il contributo del tampone è già stato sottratto.

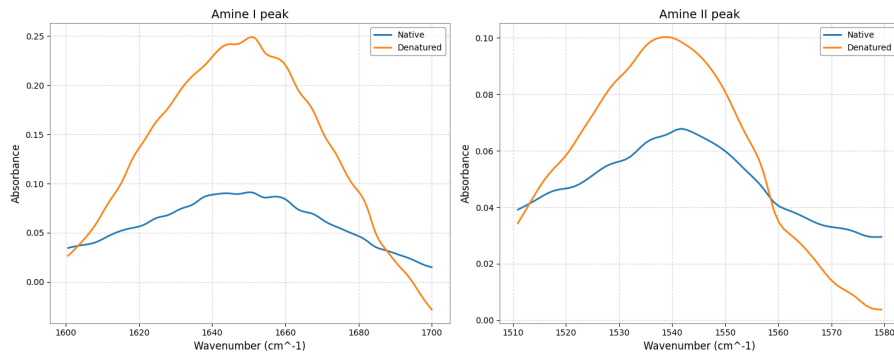


Figura 20. Picchi Amide I e Amide II: sono stati isolati i picchi utilizzando i range teorici, sia per lo spettro della proteina allo stato nativo che per quella denaturata.

Dagli spettri sono stati isolati i picchi (figura [20]), utilizzando i range teorici: $(1600 - 1700) \text{ cm}^{-1}$ per il picco dell'Amide I e $(1510 - 1580) \text{ cm}^{-1}$ per il picco dell'Amide II.

Per analizzare i picchi, si sono eseguiti fit multi-gaussiani, allo scopo di distinguere le componenti fini. A seguito della denaturazione, si prevede un aumento delle componenti associate ai *random coil* ed una diminuzione delle strutture più ordinate, come le α -eliche e i β -foglietti.

I fit sono stati impostati utilizzando, come valori iniziali per le medie delle gaussiane, i valori teoricamente attesi, riportati nella tabella seguente:

	Amide I	Amide II
α -elica:	1652 cm^{-1} (1649 – 1658)	1548 cm^{-1}
β -foglietti antiparalleli:	1629 e 1696 cm^{-1}	1530 cm^{-1}
β -foglietti paralleli:	1640 cm^{-1}	1540 cm^{-1}
turn:	1680 cm^{-1}	-
coil:	1656 cm^{-1}	1535 cm^{-1}

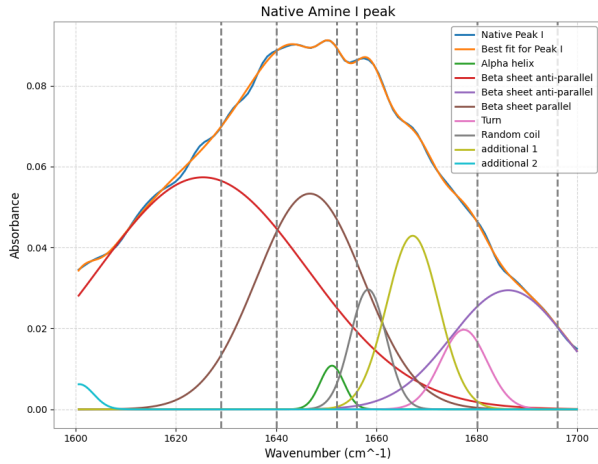
Tabella 1. Picchi teorici: picchi della "struttura fine" che ci si aspetta di trovare nei picchi Amide I ed Amide II dello spettro di assorbimento.

Inoltre, sono state aggiunte altre gaussiane in corrispondenza di ulteriori picchi visibili "ad occhio" sullo spettro di assorbimento impostando indicativamente il loro centro come valore iniziale per il valor medio. Nelle sezioni che seguono vengono riportati e discussi i risultati dei fit, rispettivamente per il picco Amine I ed Amine II.

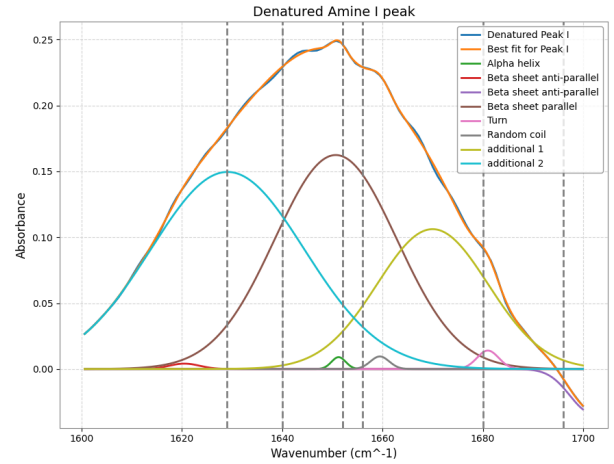
Il valore iniziale per il parametro dell'ampiezza è stato preso come il valore dello spettro in corrispondenza del valor medio iniziale moltiplicato per una costante ϵ . Il valore di tale costante è stato scelto essere $\epsilon = 0.9$ tramite trial and error.

Per quanto riguarda invece i valori iniziali delle σ , si sono scelti uguali per tutte le gaussiane e si è utilizzato un approccio di tipo "grid search"; ovvero si sono provati 20 valori nell'intervallo 1 – 15 e si è tenuto il fit con il minor χ^2 .

4.1.1 Amine I



(a) Fit del picco Amine I con lisozima nativo.



(b) Fit del picco Amine I con lisozima denaturato.

Figura 21. Fit del picco Amine I: sono riportati i fit multigaussiani fatti sui picchi Amine I dello spettro di assorbimento del lisozima nativo e denaturato. Le righe grigie tratteggiate rappresentano i picchi teorici riportati nella tabella [1]. Si noti che la legenda è basata sui valori della media della gaussiana impostati prima del fit.

Si osserva che la forma dei picchi più evidenti è stata ben catturata dal fit multigaussiano, mentre alcuni dei picchi sulle "spalle" non vengono ben descritti. Inoltre nel fit dello spettro denaturato (figura [21b]) si osserva che una delle gaussiane ha assunto un valore di ampiezza negativo; questo è dovuto al fatto che lo spettro del picco ha una coda con valori di assorbimento negativa. Chiaramente ciò è indice di un problema con la normalizzazione della baseline, effetto osservabile anche nello spettro completo per il lisozima denaturato in figura [19].

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1651	0.4	2.4	0.3	0.011	0.003
1625	7	21	5	0.057	0.007
1686	3	11.4	1.8	0.0294	0.0034
1647	1	10.6	1.8	0.053	0.025
1677	2.4	4.62	1.3	0.02	0.02
1658	0.7	3.5	0.6	0.030	0.012
1667	0.6	5.2	1.9	0.043	0.006
1601	1	2.8	0.9	0.0062	0.0022

Tabella 2. Risultati fit picco Amine I lisozima stato nativo: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [21a].

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1651	0.2	1.4	0.3	0.009	0.001
1621	1	3.0	0.9	0.004	0.001
1702	1	-4.3	0.6	-0.033	0.004
1651	2	12.2	2.2	0.16	0.05
1681	0.1	2.2	0.2	0.014	0.001
1659	0.2	1.9	0.3	0.0095	0.0014
1670	3	11.1	0.8	0.11	0.04
1629	3	15	1	0.15	0.02

Tabella 3. Risultati fit picco Amine I lisozima denaturato: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [21b].

Dai risultati dei fit (tabella [2] e tabella [3]), in maniera qualitativa, si sono associate le gaussiane che sembravano corrispondere ai picchi teorici (che sono rappresentati dalle linee grigie tratteggiate verticali in figura [21]). Le righe dei parametri corrispondenti alle gaussiane selezionate sono stati evidenziati colorandoli dello stesso colore della gaussiana nell'immagine dei fit. Di seguito viene riportata l'area delle gaussiane⁴ corrispondenti alle strutture: α -elica, β -foglietto e random coil.

	α -elica	β -foglietto	random coil
Nativa	0.07 ± 0.02	3 ± 0.8	0.3 ± 0.1
Denaturata	0.032 ± 0.008	5.6 ± 0.8	0.05 ± 0.01

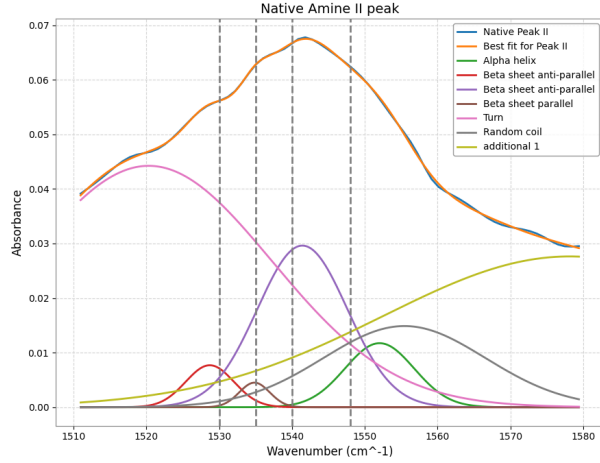
Si osserva che, come atteso, l'area della gaussiana legata alle α -eliche diminuisce quando la proteina viene denaturata. Tuttavia, contrariamente a quanto previsto, l'area relativa ai random coils non aumenta, ma anzi diminuisce. Invece l'area relativa ai β -foglietti aumenta al posto che diminuire.

Tuttavia il fit multi-gaussiano è molto sensibile al numero di gaussiane utilizzate; potrebbe essere, quindi, che non è stato utilizzato il numero corretto di gaussiane per poter descrivere tutti i picchi e questo potrebbe aver portato alcune delle gaussiane a "tentare di descrivere picchi che non gli competono".

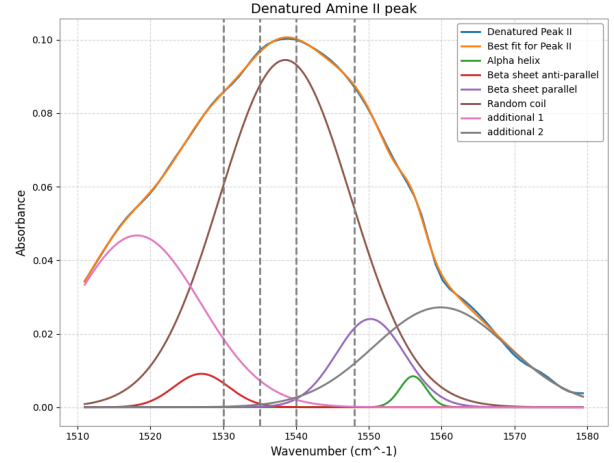
⁴L'area della gaussiana viene calcolata come: $A\sqrt{2\pi}\sigma$, con A ampiezza della gaussiana. L'errore viene propagato tramite:
 $\Delta \text{Area} = \sqrt{(\sigma\sqrt{2\pi}\Delta A)^2 + (A\sqrt{2\pi}\Delta\sigma)^2}$

4.1.2 Amine II

Si è proceduto in maniera del tutto analoga a quanto fatto per il picco dell'Amine I. Di seguito vengono riportati i grafici e le tabelle relative ai fit⁵.



(a) Fit del picco Amine II con lisozima nativo.



(b) Fit del picco Amine II con lisozima denaturato.

Figura 22. Fit del picco Amine II: sono riportati i fit multigaussiani fatti sui picchi Amine II dello spettro di assorbimento del lisozima nativo e denaturato. Le righe grigie tratteggiate rappresentano i picchi teorici riportati nella tabella [1]. Si noti che la legenda è basata sui valori della media della gaussiana impostati prima del fit.

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1552	3.0	4.7	3.5	0.012	0.054
1529	0.9	3.3	0.8	0.008	0.006
1541	6.0	6.2	2.5	0.030	0.106
1535	0.3	2.1	0.6	0.005	0.004
1520	143	16.9	58.3	0.044	0.449
1555	113	11.1	171.8	0.015	0.832
1578	637	25.6	791	0.028	0.195

Tabella 4. Risultati fit picco Amine II lisozima stato nativo: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [22a].

⁵Si noti che per far convergere il fit del picco dello spettro denaturato si è dovuta rimuovere una delle gaussiane aggiuntive (in particolare quella inizializzata con media 1575 cm^{-1}). Inoltre si è fatta variare la σ tra 1 e 20 prendendo 30 differenti valori.

Media	Err. Media	σ	Err. σ	Ampiezza	Err. Ampiezza
1556	0.12	1.8	0.24	0.008	0.002
1527	0.73	3.8	1.24	0.009	0.011
1550	0.71	4.7	1.69	0.024	0.031
1539	0.89	9.0	4.82	0.094	0.016
1518	4.18	8.7	1.74	0.047	0.019
1560	4.36	9.2	1.23	0.027	0.012

Tabella 5. Risultati fit picco Amine II lisozima denaturato: sono evidenziati i valori che si pensa corrispondano ai picchi teorici. Il colore con cui sono evidenziati corrisponde al colore della rispettiva gaussiana in figura [22a].

Di nuovo, analogamente a quanto fatto prima, in maniera qualitativa, si sono associate le gaussiane trovate ai picchi teorici. Di seguito viene riportata l'area delle gaussiane.

Si noti che in questo caso per il picco nello spettro nativo sono presenti sia i β -foglietti anti-paralleli che quelli paralleli; si è allora considerata la somma delle due aree.

Inoltre la gaussiana marrone in figura [22b] potrebbe essere associata sia al picco teorico a 1535 cm^{-1} , che corrisponde ai random coils, sia al picco a 1535 cm^{-1} , che corrisponde ai β -foglietti paralleli. Si è scelto allora di associarlo ad entrambi considerando il suo contributo equi-partito su queste due componenti.

	α -elica	β -foglietto	random coil
Nativa	0.14 ± 0.64	0.5 ± 1.7	0.026 ± 0.022
Denaturata	0.28 ± 0.38	0.27 ± 0.83	0.27 ± 0.83

È evidente che i valori ottenuti non permettano di effettuare nessun tipo di confronto in quanto l'errore relativo è praticamente sempre superiore al 100%. Anche in questo caso probabilmente il problema è legato al numero ed all'inizializzazione delle gaussiane.

3 Procedimento e analisi dati

3.1 Nanoparticelle

3.1.1 Variazione dell'angolo di rivelazione

Al fine di misurare indirettamente, tramite la relazione [3], il raggio di nanoparticelle di lattice di forma sferica, una soluzione acquosa di queste ultime è stata inserita nella cuvetta del portacampione. Fatto ciò, si sono acquisite le funzioni di autocorrelazione del segnale diffuso al variare dell'angolo di rivelazione θ tra la direzione del fascio incidente e il tubo fotomoltiplicatore. L'angolo θ è stato fatto variare tra 30° e 130° con un passo di 10° . Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di θ sono state acquisite dieci funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$, per una durata di 30 secondi ciascuna e utilizzando una frequenza di acquisizione pari a 100 kHz. Nel grafico che segue sono visualizzate le funzioni di autocorrelazione medie associate ai diversi angoli di rivelazione. L'asse delle ascisse è in scala logaritmica e a ogni valore di G è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza.

Nel grafico [5] sono riportati anche i segnali di intensità che sono stati autocorrelati dal correlatore digitale a disposizione in laboratorio (*ALV-7002*).

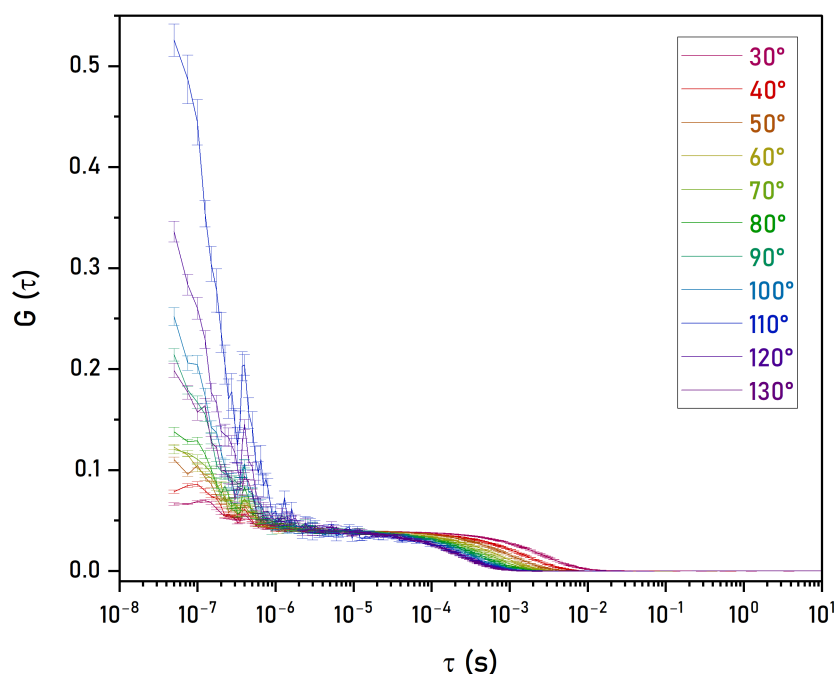


Figura 4. Funzioni di autocorrelazione e angoli di rivelazione: si è studiato l'andamento delle funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ al variare dell'angolo di rivelazione θ tra 30° e 130° con un passo di 10° . Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di θ sono state acquisite 10 funzioni di autocorrelazione, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza. La scala sull'asse delle ascisse è logaritmica.

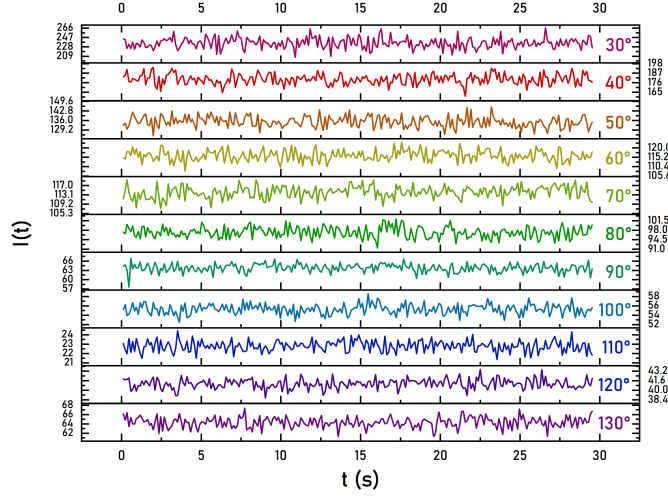


Figura 5. *Segnali di intensità e angoli di rivelazione:* per ogni angolo di rivelazione e per una durata complessiva di 30s, si è acquisita l'intensità del segnale diffuso, rivelato dal tubo fotomoltiplicatore. In tempo reale, il correlatore digitale ALV-7002 a disposizione in laboratorio ha autocorrelato tali segnali (vedi Fig.4).

Qualitativamente, una volta fissato θ , il segnale registrato dal tubo fotomoltiplicatore appare fluttuante attorno a un valore medio; al variare dell'angolo di rivelazione, si osserva che tale valore medio diminuisce tra 30° e 110° , poi aumenta.

Laddove l'intensità media è minore, è minore anche il rapporto segnale-rumore, che è quindi minimo quando l'angolo di rivelazione vale 110° e massimo a 30° . Questo fatto si riscontra nell'andamento delle funzioni di autocorrelazione riportate nel grafico [4], in cui quella relativa a 30° è decisamente meno rumorosa rispetto a quella relativa a 110° .

L'andamento esponenziale caratteristico delle funzioni di autocorrelazione si osserva per tempi di ritardo τ maggiori di $\sim 3 \cdot 10^{-6} s = 3 \mu s$. Prima, domina il rumore elettronico del rivelatore. Nel grafico che segue sono rappresentate le funzioni di autocorrelazioni medie nell'intervallo $3 \mu s - 1 s$. Si sono omesse le barre di errore per non rendere l'immagine troppo caotica.

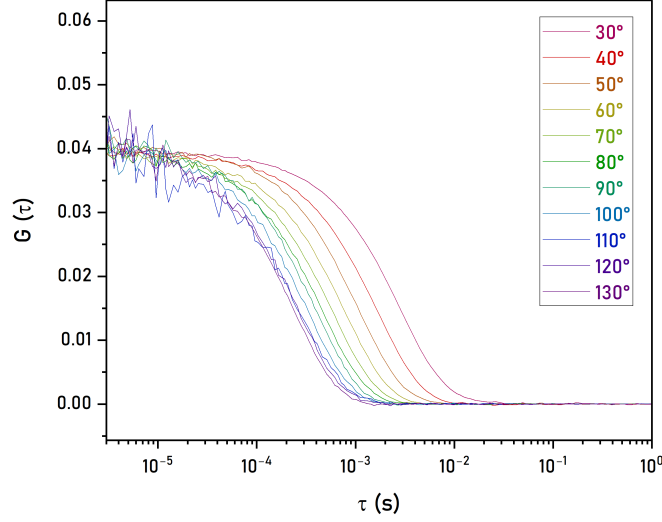


Figura 6. *Andamento esponenziale delle funzioni di autocorrelazione:* per ritardi temporali superiori a $\sim 3\mu s$, le funzioni di autocorrelazione acquisite in laboratorio assumono il caratteristico andamento esponenziale, descritto dalla funzione $y = ae^{-\gamma x} + b$.

Nell'intervallo in cui sono rappresentate, le funzioni di autocorrelazione della figura [6] sono state tutte interpolate con la funzione [5] con l'obiettivo di ricavare il valore di γ relativo a ciascun valore di θ considerato. Ciascun fit è stato condotto trascurando l'errore sui tempi di ritardo e pesando ciascun valore di G con la relativa incertezza.

I parametri a e b non dipendono dall'angolo di rivelazione, a differenza di γ i cui valori, assieme a quelli di $2q^2$, sono riportati nella tabella che segue⁵. Le incertezze sui valori di γ sono quelle restituite dai fit, invece quelle sui valori di $2q^2$ sono state calcolate propagando l'errore su θ , dato dalla sensibilità del goniometro del tubo fotomoltiplicatore, ovvero 0.25° .

⁵Nella formula [2] si sono usati i valori $\lambda = 633 \text{ nm}$ ed $n = 1.33$.

$2q^2(1/m^2)$	$\gamma(1/s)$
$(0.93 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.3455 \pm 0.0015) \cdot 10^3$
$(1.63 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.588 \pm 0.002) \cdot 10^3$
$(2.49 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.932 \pm 0.004) \cdot 10^3$
$(3.49 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(1.288 \pm 0.009) \cdot 10^3$
$(4.59 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(1.715 \pm 0.015) \cdot 10^3$
$(5.76 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(2.16 \pm 0.03) \cdot 10^3$
$(6.97 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(2.67 \pm 0.07) \cdot 10^3$
$(8.18 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.07 \pm 0.08) \cdot 10^3$
$(9.36 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.41 \pm 0.16) \cdot 10^3$
$(10.46 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.76 \pm 0.09) \cdot 10^3$
$(11.45 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(4.46 \pm 0.14) \cdot 10^3$

Tabella 1. Misure di $2q^2$ e γ : sono riportati i valori di $2q^2$ calcolati tramite la formula [5] e i valori di γ ricavati dall'interpolazione delle funzioni di autocorrelazione. L'incertezza sui primi è stata calcolata propagando l'errore di 0.25° su θ , sensibilità del goniometro del tubo fotomoltiplicatore, invece quella su γ proviene dall'operazione di fit.

Al fine di stimare il coefficiente di diffusione D tramite la relazione (6), le misure raccolte nella tabella [1] sono state interpolate con la funzione $y = ax + b$, pesando ciascuna misura con la sua incertezza. Il risultato è rappresentato nel grafico che segue.

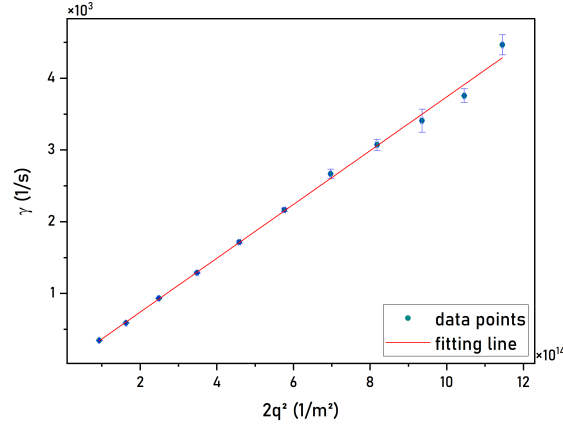


Figura 7. Fit lineare γ vs $2q^2$: al fine di stimare il coefficiente di diffusione D , le misure raccolte nella tabella [1] sono state interpolate con la funzione lineare $y = a + bx$, ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 1.2$.

La distribuzione dei dati attorno al modello mostra che, come atteso, l'andamento γ vs $2q^2$ è lineare. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 29\% > 5\%$ ⁶.

A rigore, per verificare che i dati seguano l'andamento atteso [6] è necessario anche assicurarsi che la stima del parametro a sia compatibile con il suo valore vero, cioè 0. A tal fine è stato eseguito il t -test, ottenendo il seguente risultato:

⁶Non avendo trascurato l'errore sulla variabile indipendente, nell'eseguire il test del χ^2 si è utilizzata la formula:

$$\chi_o^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i - (a + bx_i)}{\sqrt{(b\sigma_{x,i})^2 + \sigma_{y,i}^2}} \right)^2.$$

$$t = \frac{|a - 0|}{\sigma_a} = \frac{3.75 \cdot 10^{-2}}{0.03 \cdot 10^{-12}} \approx 1.36$$

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

$$\alpha = 1 - \int_{-t}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz \approx 17\% > 5\%,$$

dunque c'è compatibilità.

A partire dal valore del coefficiente di diffusione restituito dal fit, $D = (3.75 \pm 0.03) \cdot 10^{-12} m^2/s$, tramite la relazione [3] è stato possibile stimare il raggio idrodinamico delle nanoparticelle in soluzione⁷, commettendo un errore inferiore all'1%:

$$R_1 = (57.2 \pm 0.5) \text{ nm}. \quad (7)$$

3.1.2 Variazione dell'apertura dell'iride

Una seconda stima del raggio delle nanoparticelle di lattice è stata fatta variando un altro dei parametri sperimentali a disposizione, ovvero l'apertura dell'iride⁸. L'iride regola la frequenza dei fotoni rivelati dal fototubo: in laboratorio la sua apertura è stata variata 5 volte, da 50 a 150 kHz con un passo di 25 kHz . Come per l'angolo di diffusione, per ridurre l'errore statistico sono state acquisite⁹ 10 funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ per ogni valore di frequenza, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media. Il risultato è riportato nel grafico che segue. Si sono considerati tempi di ritardo superiori a $\sim 10^{-5}$, oltre i quali il caratteristico andamento esponenziale non è più disturbato dal rumore elettronico del rivelatore. L'asse delle ascisse è in scala logaritmica.

⁷Nell'equazione di Stokes-Einstein si sono utilizzati i seguenti valori: $T = 293 \text{ K}$, $\eta = 0.01 \text{ poise}$.

⁸L'angolo di rivelazione θ è stato mantenuto costante a 90° durante l'intero procedimento di misura.

⁹Si è mantenuta la frequenza di acquisizione di 100 kHz.

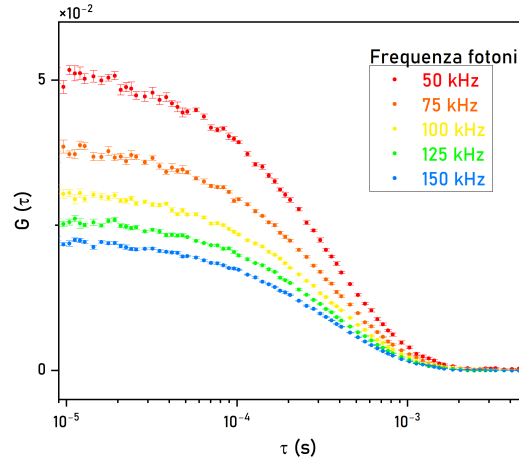


Figura 8. Funzioni di autocorrelazione e apertura dell'iride: si è studiato l'andamento delle funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ al variare della frequenza dei fotoni rivelati dal fototubo. Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di frequenza sono state acquisite 10 funzioni di autocorrelazione, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza. La scala sull'asse delle ascisse è logaritmica.

I segnali a partire dai quali sono state costruite le funzioni di autocorrelazione sono riportati nella figura [9]. L'intensità del segnale è maggiore in corrispondenza di valori di frequenza maggiori: variare l'apertura dell'iride ha dunque l'effetto di aumentare o diminuire l'intensità del segnale e anche, per quanto riguarda le funzioni di autocorrelazione, di alzare o abbassare l'intercetta con l'asse verticale (vedi Fig.8).

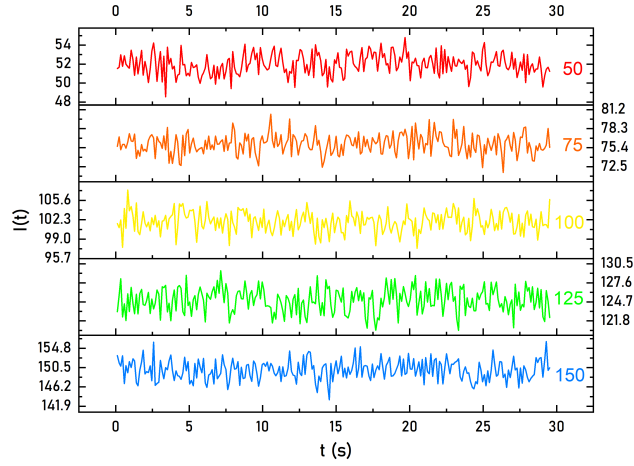


Figura 9. Segnali di intensità e apertura dell'iride: per ogni frequenza di fotoni considerata e per una durata complessiva di 30s, si è acquisita l'intensità del segnale diffuso, rivelato dal tubo fotomoltiplicatore. In tempo reale, il correlatore digitale ALV-7002 a disposizione in laboratorio ha autocorrelato tali segnali (vedi Fig.8).

Ciascuna funzione di autocorrelazione è stata interpolata con il suo andamento atteso [5]. Si sono sempre trascurate le incertezze sui tempi di ritardo, mentre a ogni valore di G è stata attribuita come incertezza la relativa deviazione standard della media. Il risultato è riportato nel grafico che segue.

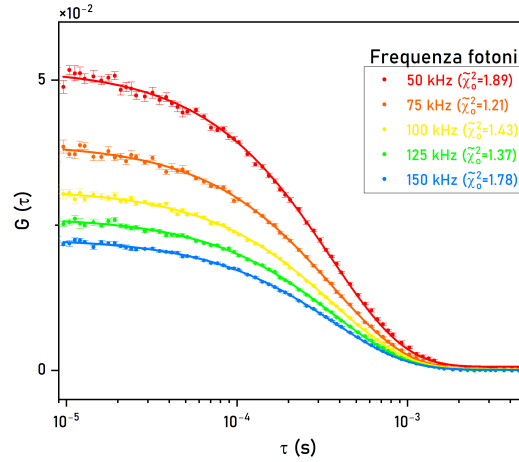


Figura 10. Fit delle funzioni di autocorrelazione: le funzioni di autocorrelazione medie sono state interpolate con il loro andamento atteso [5], mostrando un buon accordo.

I valori dei parametri restituiti dal fit sono riportati nella tabella che segue, assieme ai relativi errori standard.

a	σ_a	$\gamma(1/s)$	$\sigma_\gamma(1/s)$	b	σ_b
0.0513	0.0002	2670	20	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
0.0387	0.0001	2670	10	$-8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$
0.03087	0.00008	2660	10	$-1.2 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$
0.02613	0.00006	2680	9	$-5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
0.02252	0.00005	2680	9	$-3 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-7}$

Tabella 2. *Parametri restituiti dal fit delle funzioni di autocorrelazione acquisite al variare dell'apertura dell'iride.*

Partendo dalle relazioni [3] e [6] è possibile esprimere R in funzione di γ , tramite la formula:

$$R = \frac{16KT}{3\pi\eta\gamma} \left(\frac{\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \right)^2$$

Per ciascun γ è stato quindi calcolato il raggio delle nanoparticelle in soluzione e, a partire dalla media dei risultati ottenuti, si è ricavata la seguente stima:

$$R_2 = (56.0 \pm 0.1) \text{ nm} \quad (8)$$

Confronto tra i raggi misurati

Entrambe le procedure sperimentali, quella in cui le funzioni di autocorrelazione sono acquisite al variare dell'angolo di rivelazione e quella in cui si varia l'apertura dell'iride, portano a stime molto precise del raggio delle nanoparticelle.

Per stabilire se i due valori ottenuti siano compatibili, è stato eseguito un test di compatibilità:

$$t = \frac{|R_1 - R_2|}{\sqrt{\sigma_{R_1}^2 + \sigma_{R_2}^2}} \approx 2.38$$

La probabilità di trovare un valore di $\Delta = R_1 - R_2$ che disti da 0 più di t deviazioni standard vale allora

$$\alpha = 1 - \int_{-t}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz \approx 1.72\% < 5\%,$$

dunque non c'è compatibilità. Infatti, nonostante l'ordine di grandezza sia lo stesso per entrambe le stime, la loro precisione - in particolare di quella ottenuta variando l'apertura dell'iride - fa sì che i due risultati siano incompatibili tra loro¹⁰.

3.2 Proteine

Tramite misure di scattering dinamico, è possibile stimare anche il cosiddetto *raggio idrodinamico* di una proteina¹¹. Esso tiene conto delle molecole di solvente che la proteina, a causa del proprio ingombro sterico, si porta dietro nel suo moto termico all'interno del campione. Le dimensioni caratteristiche di una proteina sono infatti $\sim 1 \text{ nm}$, inferiori quindi a quelle delle nanoparticelle ($\sim 10^2 \text{ nm}$, come stimato).

La misura del raggio idrodinamico di una proteina è più delicata, se paragonata a quella delle nanoparticelle. Come già accennato, infatti, le piccole dimensioni delle proteine rendono più rapide

¹⁰Si noti tuttavia che se si fosse scelta una probabilità di soglia meno rigida, ad esempio 0.3%, le due misure del raggio delle nanoparticelle sarebbero state compatibili tra loro.

¹¹In laboratorio si è preparata una soluzione di proteina BSA (*Bovine Serum Albumine*) e tampone fosfato (PBS).

le fluttuazioni del segnale diffuso, obbligando a utilizzare una frequenza di acquisizione maggiore (750 kHz): il risultato è un segnale più debole, dunque più rumoroso, che si riflette in un minore rapporto segnale-rumore nelle funzioni di autocorrelazione.

Per aggirare questo problema, fissato l'angolo di rivelazione a 90° e modificata l'apertura dell'iride in modo da massimizzare la frequenza di fotoni rivelati, sono state mediate 34 funzioni di autocorrelazione, ottenute a partire da un segnale misurato per 60 s.

L'andamento temporale dell'intensità del segnale diffuso è riportato nell'immagine che segue.

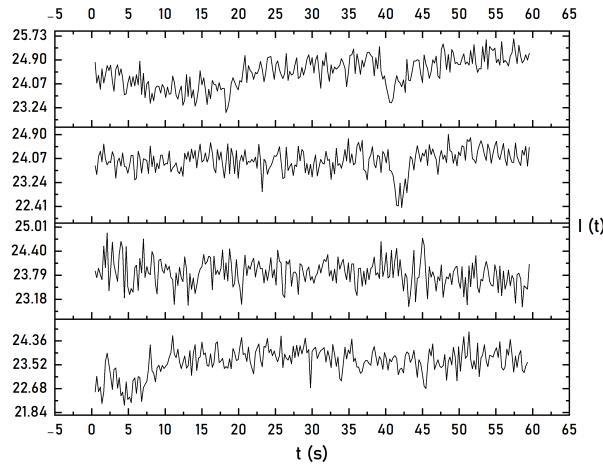


Figura 11. *Intensità del segnale diffuso dalla proteina BSA.*

Come atteso, il valore medio attorno a cui fluttua il segnale è sempre inferiore a quelli osservati quando in soluzione c'erano nanoparticelle. Inoltre, le oscillazioni del segnale appaiono decisamente meno regolari - fatto che si riflette nell'andamento delle funzioni di autocorrelazione ottenute.

Seguendo il procedimento già descritto per le nanoparticelle, la media delle 34 funzioni di autocorrelazione è stata interpolata con il suo andamento teorico, ottenendo il seguente risultato¹².

¹²In realtà, non tutte le funzioni di autocorrelazione sono state considerate nel calcolo della media. L'andamento di alcune, infatti, era a tal punto distante da quello atteso e da quello delle altre funzioni di autocorrelazione acquisite, da renderle inutilizzabili.

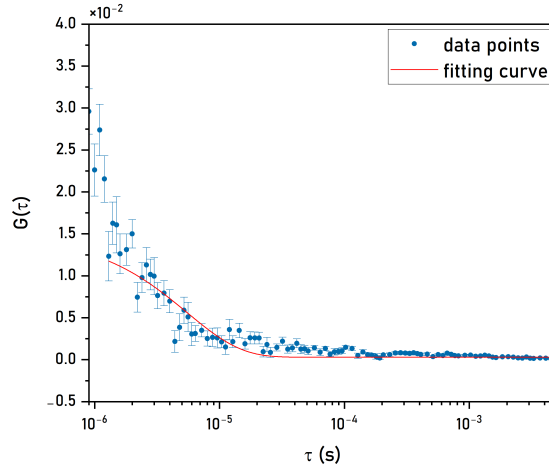


Figura 12. Andamento sperimentale e teorico: la media delle funzioni di autocorrelazione acquisite è stata interpolata con il suo andamento atteso [5], ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 4.8$.

Come si vede, nei dati sperimentali non è ben riconoscibile il caratteristico andamento esponenziale. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$. Nonostante questo, si è comunque utilizzato il valore di γ restituito dal fit per avere, tramite la relazione di Stokes-Einstein, una prima stima del raggio idrodinamico della BSA:

$$R = (0.82 \pm 0.16) \text{ nm}. \quad (9)$$

Una seconda stima è stata fatta utilizzando i dati degli anni passati. La funzione di autocorrelazione media e il suo adattamento al modello sono rappresentati nel grafico seguente.

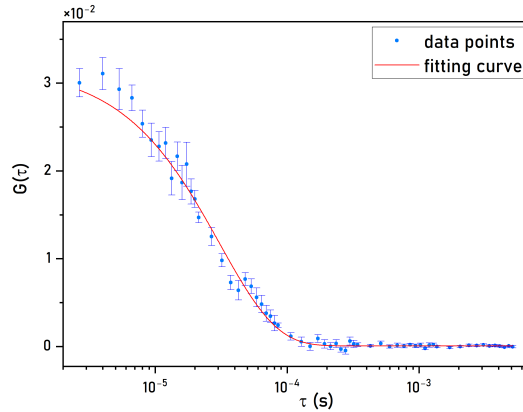


Figura 13. Andamento sperimentale e teorico, dati degli anni passati: la media delle funzioni di autocorrelazione acquisite è stata interpolata con il suo andamento atteso [5], ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 1.1$.

In questo caso, nei dati sperimentali è ben ravvisabile l'andamento esponenziale. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 29\% > 5\%$. Dal parametro γ restituito dal fit è quindi possibile risalire a una stima più accurata¹³ del raggio idrodinamico della BSA:

$$R' = (4.59 \pm 0.13) \text{ nm}. \quad (10)$$

Commento: Nonostante, se si effettua un test di compatibilità, i due valori trovati R ed R' non risultano compatibili tra loro, l'ordine di grandezza è il medesimo, ovvero 1 nm. I dati raccolti in laboratorio, benché decisamente più rumorosi rispetto a quelli degli anni passati, consentono ugualmente di stimare il raggio della proteina BSA, anche se meno accuratamente e meno precisamente.

¹³In condizioni standard, il raggio idrodinamico della BSA è generalmente considerato essere circa 3.5-4.0 nm.