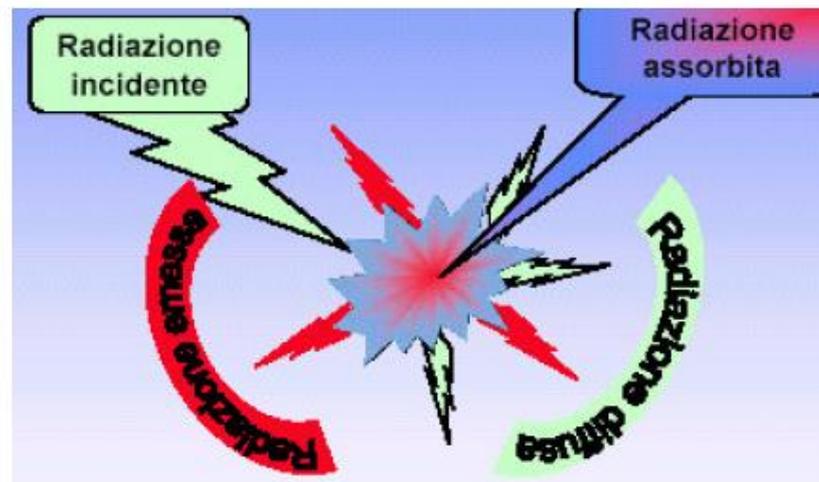


Interazione Radiazione-Materia

I principali fenomeni che intervengono sono:

- **scattering (diffusione)** processo fisico mediante il quale una particella posta sulla traiettoria di un'onda elettromagnetica, assorbe energia da essa e la riemette in tutte le direzioni
- **assorbimento** una parte dell'energia portata da una radiazione elettromagnetica viene assorbita da una particella su cui la radiazione va ad incidere



Luminescenza

Emissione di energia radiante quando un elettrone torna a un livello + basso di E da uno superiore

Eccitazione determinata da assorbimento luce:

Fluorescenza $S \longrightarrow S$

tempo decadimento: 10^{-8} sec

differenza tra max λ

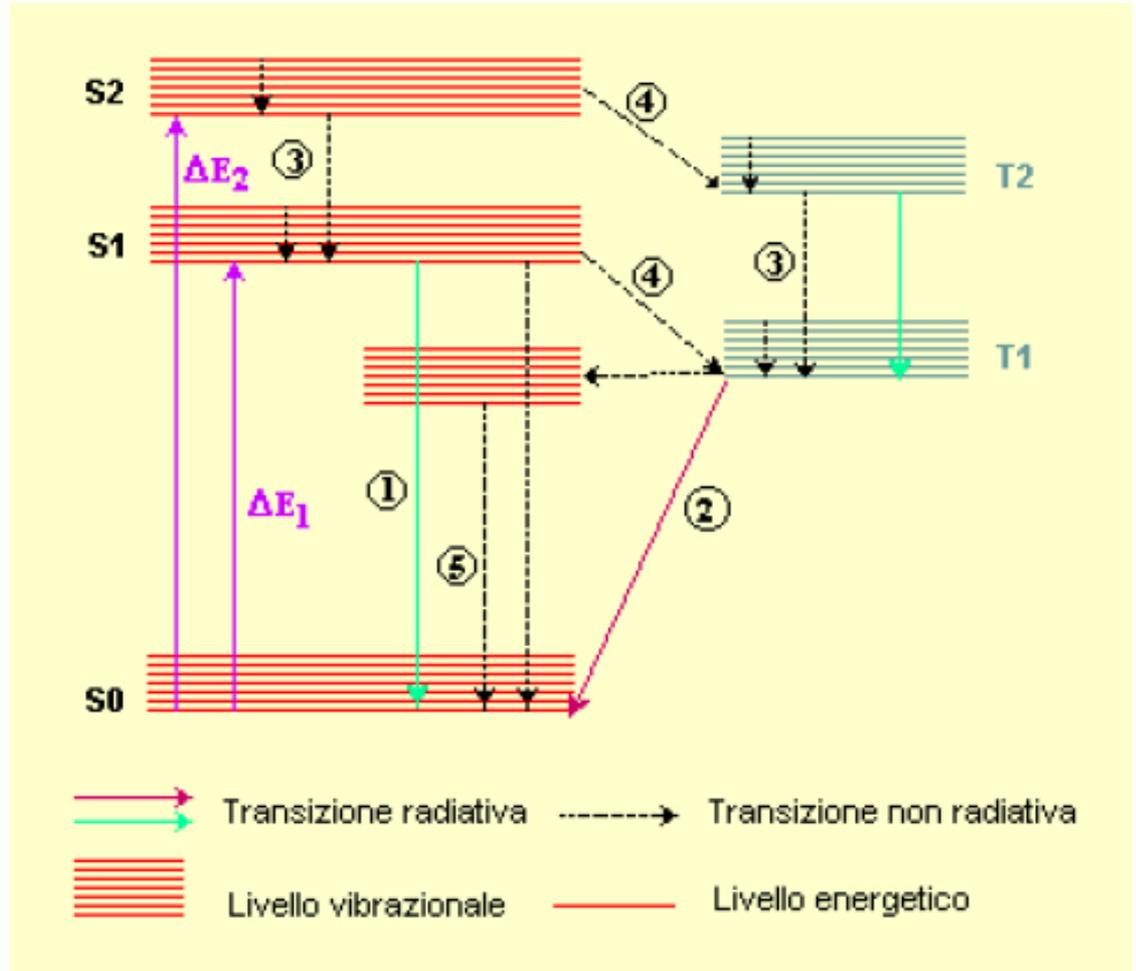
eccitazione e max λ

fluorescenza è costante (linee Stokes).

Fosforescenza $T \longrightarrow S$

tempo decadimento: 10^{-4} - 10^{-2} sec

shift luce emessa maggiore.

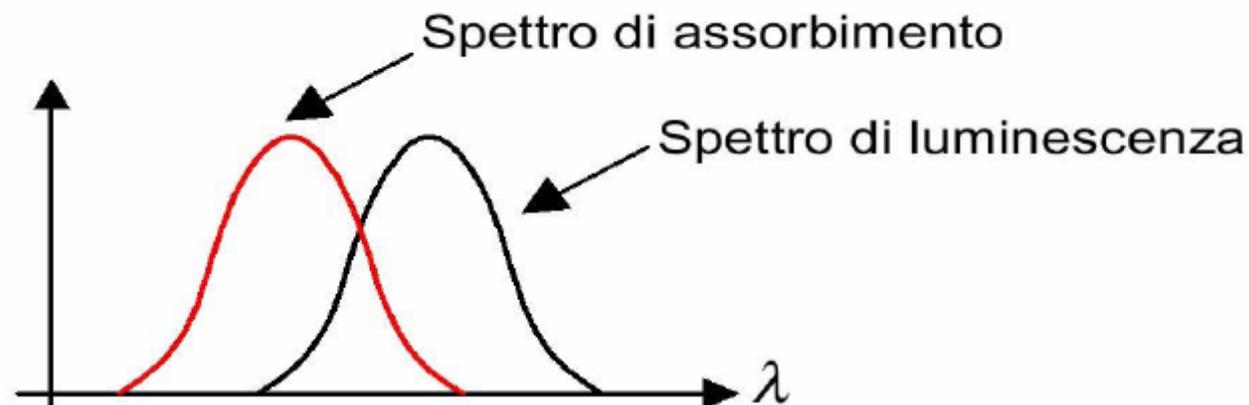


LEGGE DI STOKES

L'energia del fotone emesso appartiene ad una regione dello spettro spostata verso lunghezze d' onda maggiori rispetto alla lunghezza d' onda del fotone.

La banda di luminescenza è indipendente dalla radiazione monocromatica eccitatrice purché appartenente a una medesima banda di assorbimento (l'intera banda di emissione è presente per ogni radiazione monocromatica assorbita appartenente alla banda illuminante).

La banda di assorbimento è ottenuta come involuppo delle righe di eccitazione.



La tecnica della spettrofluorimetria è accurata a basse concentrazioni dove la spettrofotometria non lo è.

100 pg catecolamine spettrofluorimetria

100 mg catecolamine spettroscopia

Selettività spettrale

Strumentazione:
due monocromatori
controllo T

SPETTROFLUORIMETRO

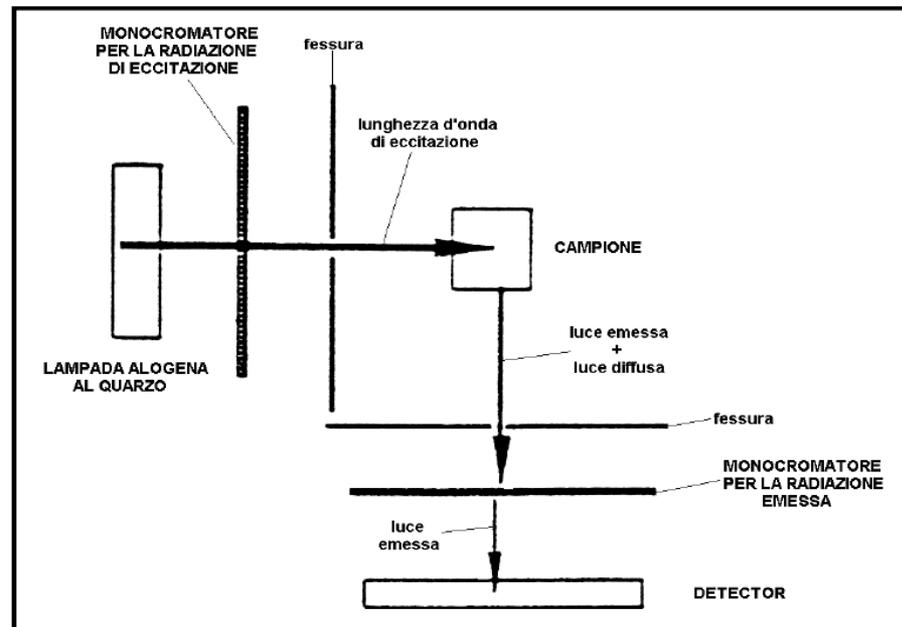


Diagramma di uno spettrofluorimetro.

E' influenzata dal pH, temperatura, polarità del solvente ma soprattutto dal "quenching" ----
-> la luce emessa viene persa per collisione con altre molecole =====> bassa concentrazione

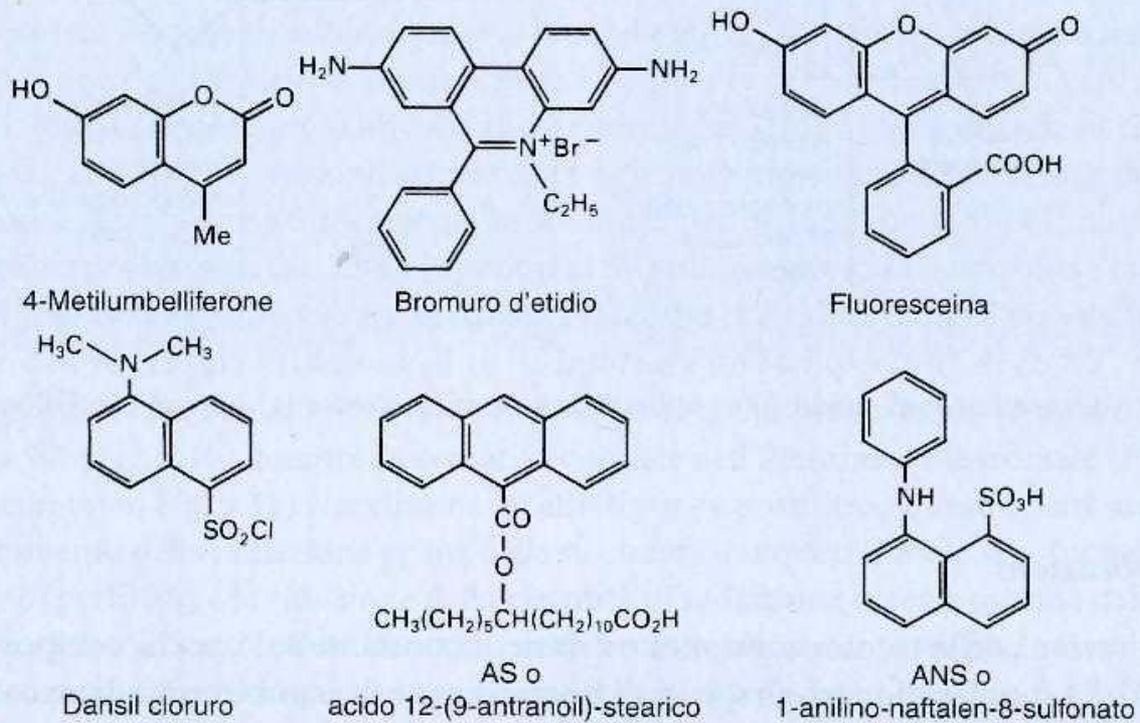
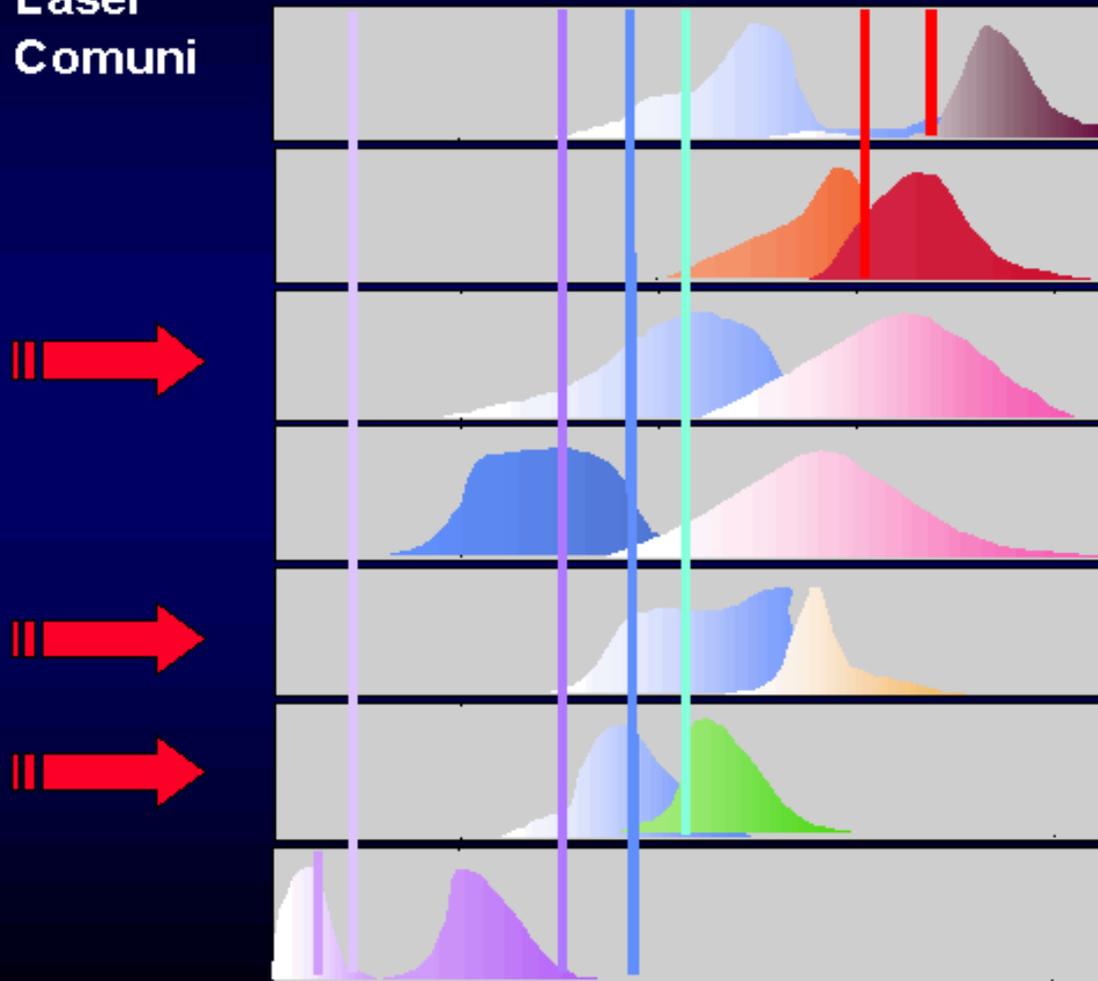


Figura 9.12 Struttura di alcune sonde fluorescenti.

Fluorocromi utilizzati più comunemente

Linee
Laser
Comuni

350 457 488 514 610 632
300 nm 400 nm 500 nm 600 nm 700 nm



Coniugato PE-TR

Texas Red

Ioduro di Propidio

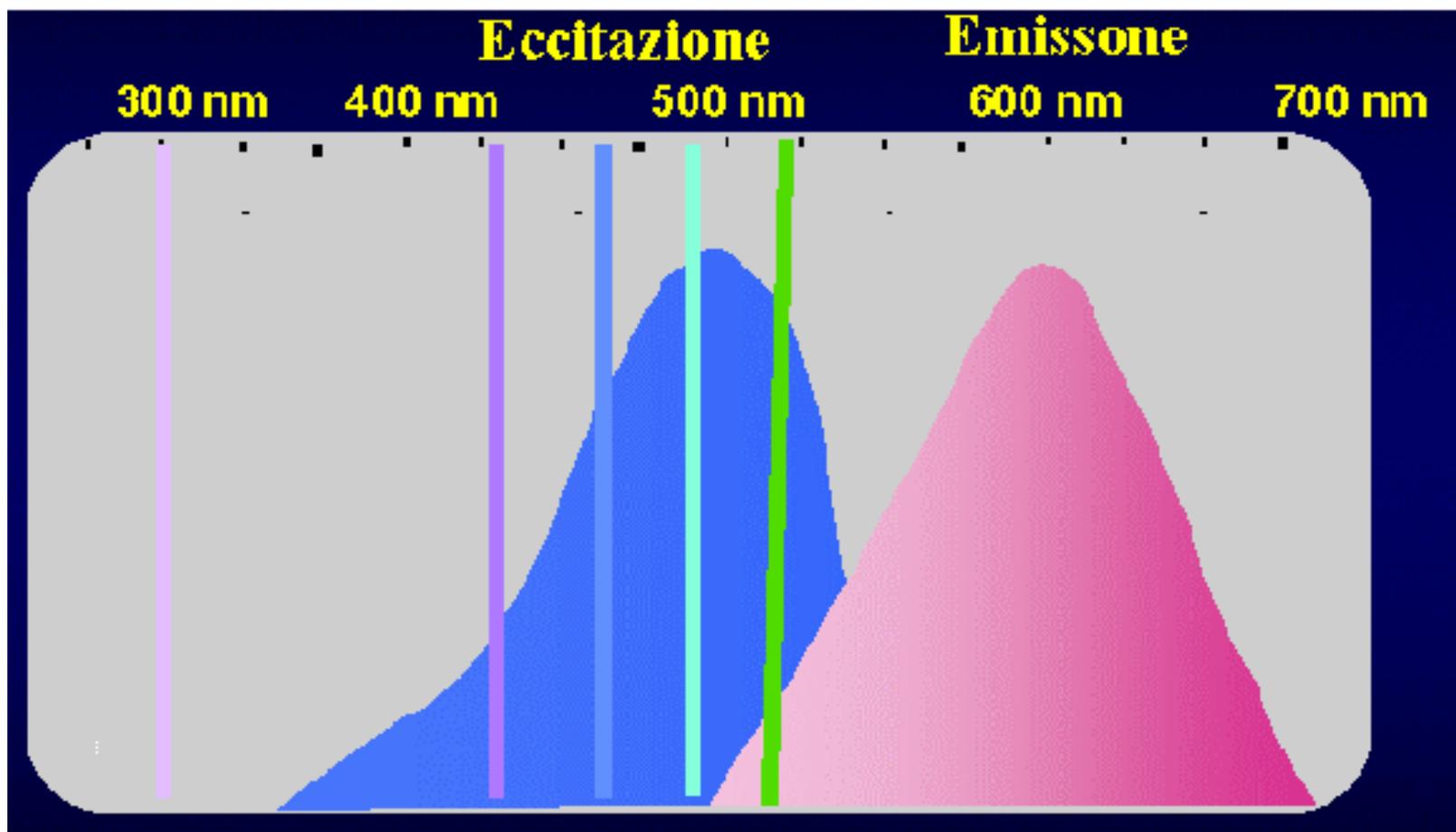
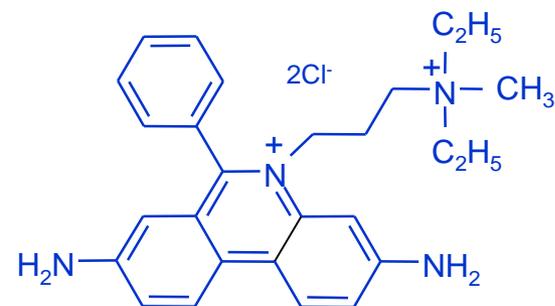
Etidio Bromuro

PE (ficoeritrina)

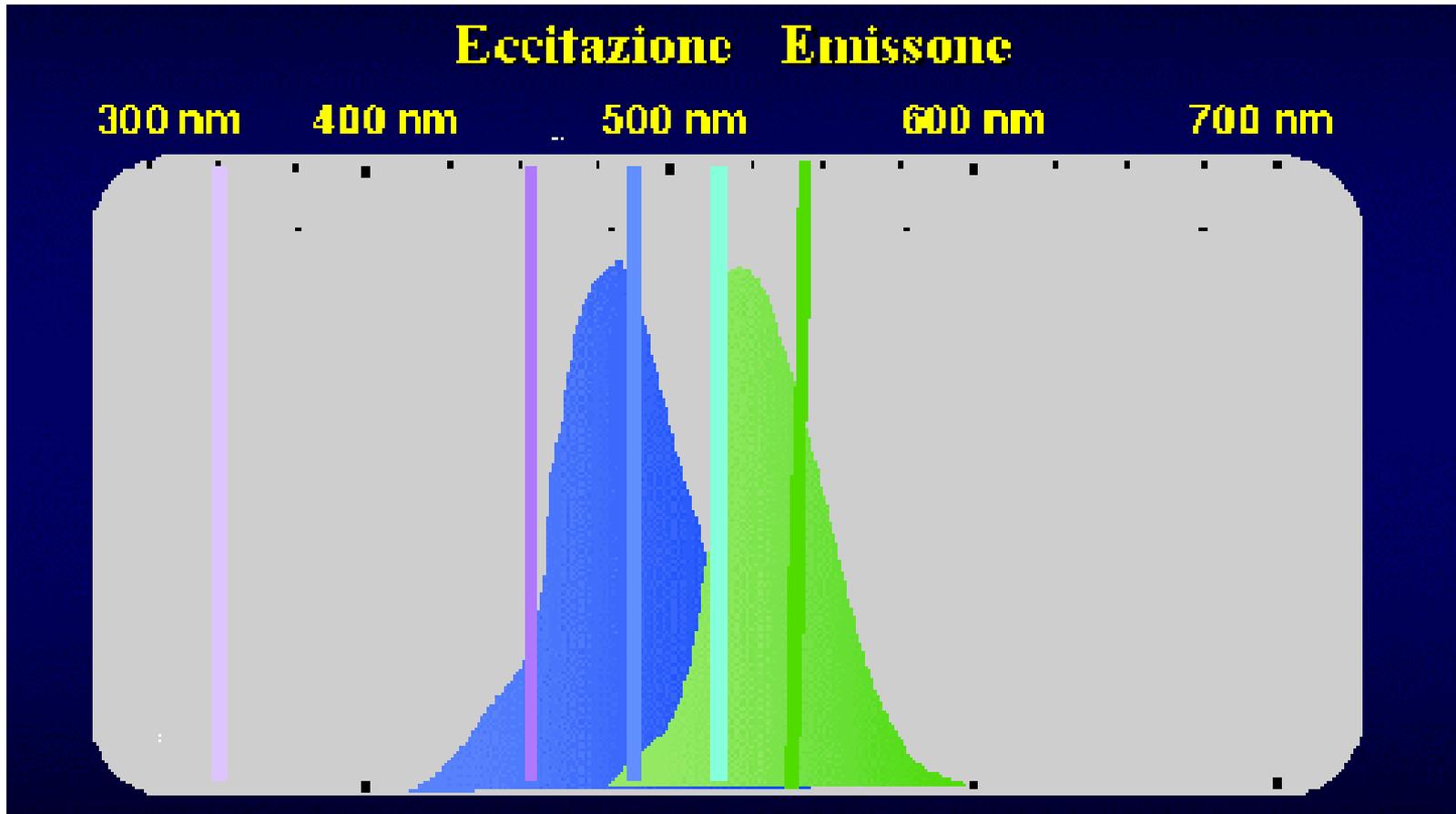
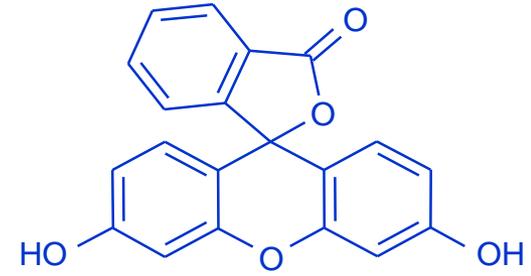
FITC (fluoresceina)

**Acido cis-
Parinarico**

Ioduro di propidio



Fluoresceina



Applicazioni

il composto nativo ha fluorescenza (fluorescenza **intrinseca**).

Se un composto non fluorescente può essere legato ad un probe fluorescente (fluorescenza **estrinseca**).

- aa legati tramite il gruppo -NH₂ a cloruro di dansile
- acridina orange dà coniugati diversi con DNA ss e ds.

L'utilizzo maggiore è la determinazione di **sostanze presenti in scarsa quantità**:
vitamina B1 nel cibo, NADH, ormoni, droghe, pesticidi, carcinogeni,.....

L'anione del 4-metilumbelliferone ha un picco di fluoresc. a 450 nm .

La sua velocità di comparsa può essere misurata quando è il prodotto dell'azione enzimatica di un derivato eterificato o esterificato della sonda fluorescente.

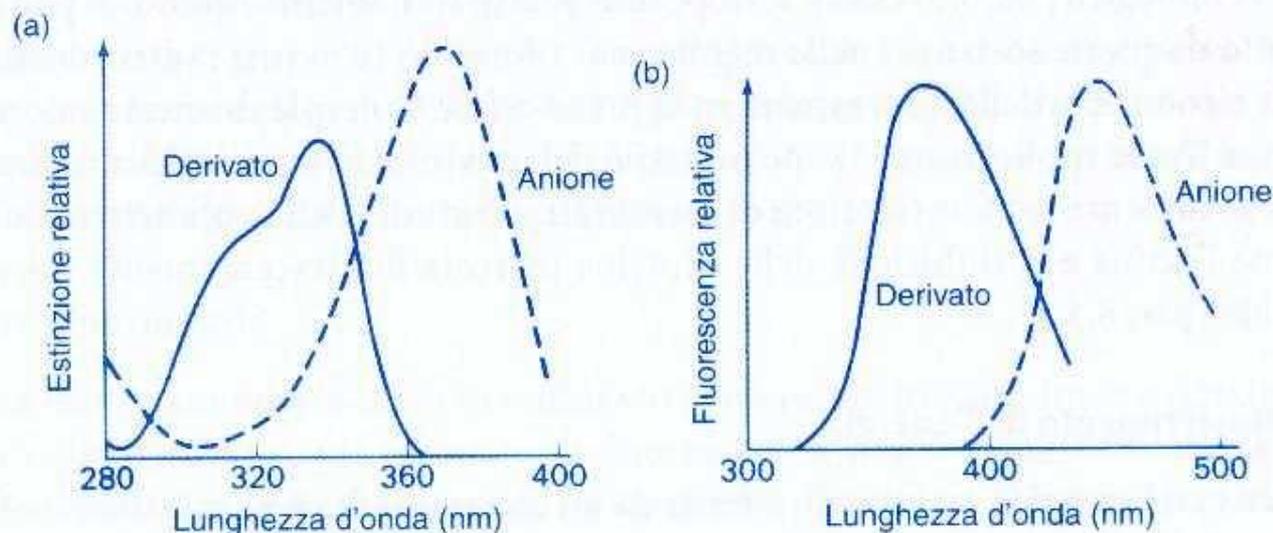


Figura 9.13 Spettri dell'anione metilumbelliferone e del derivato 4-metilumbelliferone a pH 10; (a) spettri di assorbimento; (b) spettri di fluorescenza.

Eccitazione 350-400 nm fluorescenza 450-500 nm.

Applicata anche in studi metabolici dove forme di NAD intervengono come cofattori.

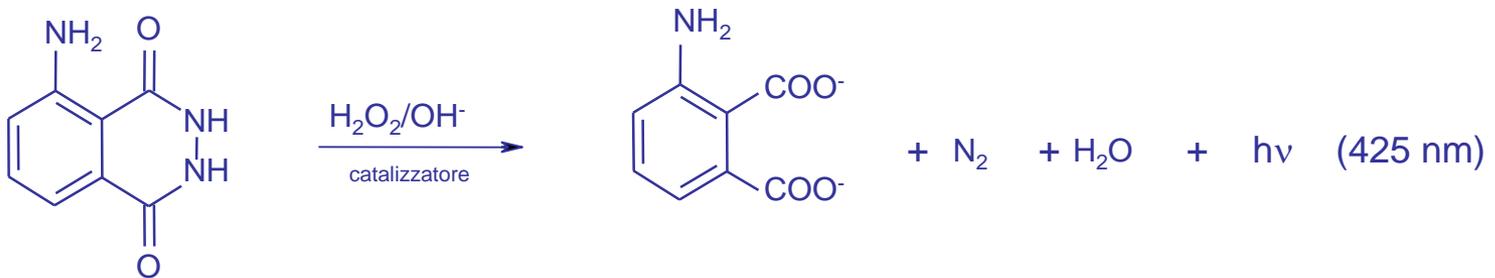
NADH e NADPH danno fluorescenza mentre le loro forme ossidate no !

Chemiluminescenza

luce emessa da prodotto eccitato di una reazione di ossidazione.

Luminolo, luciferina ox da H_2O_2 , O_2 , NaClO

La reazione di ossidazione viene effettuata in ambiente alcalino con H_2O_2 ed in presenza di catalizzatore (ferricianuro, ioni metallici ecc). Il prodotto di reazione è lo ione ftalato responsabile dell'emissione luminosa.

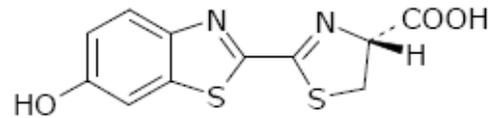


Luminolo: l'efficienza quantica è circa 1% con rivelabilità intorno a 10^{-16} moli.

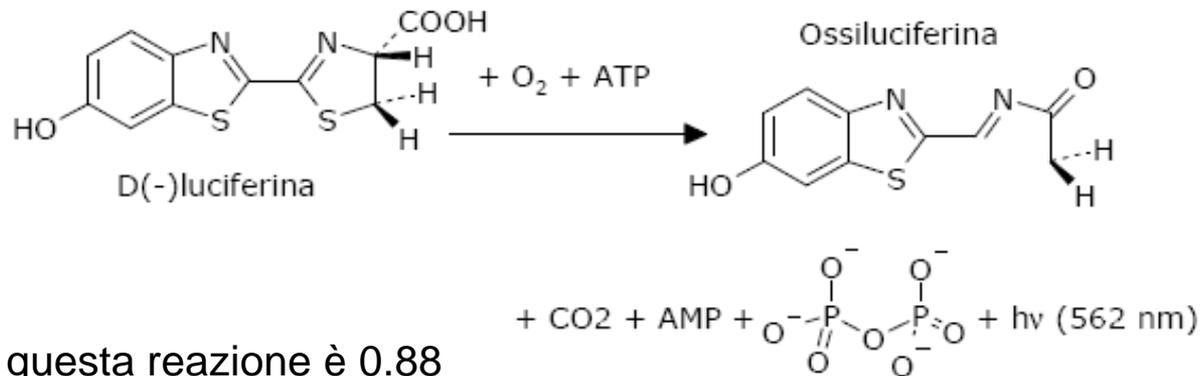
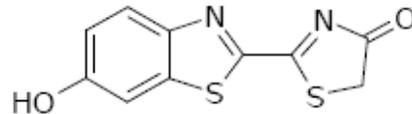
Bioluminescenza

In sistemi biologici, la reazione di ossidazione che produce chemiluminescenza è indotta da un enzima o fotoproteina

- Responsabili dell'emissione di luce sono, generalmente, proteine che permettono l'ossidazione di un gruppo prostetico.
- I gruppi prostetici sono diversi tra i vari organismi, anche se vengono spesso chiamati con lo stesso nome di **luciferina**.



D(-) Luciferina



- un substrato organico che emette la luce, chiamato "luciferina"
- un enzima catalizzatore chiamato "luciferasi". può essere ATP dipendente

La resa quantica di questa reazione è 0.88

La sensibilità del sistema Luciferina/Luciferasi consente di misurare concentrazioni di ATP 10⁻¹⁵ M con una risposta lineare fino a 10⁻⁶ M.

Impiego chemiluminescenza e bioluminescenza:

elevata sensibilità

diretto, marcatore in dosaggi immunologici

analizzatori automatici

La bioluminescenza è un metodo rapido già impiegato per la determinazione della carica microbica presente in:

- ✓ **Latte**
- ✓ **Succhi di frutta**
- ✓ **Bevande a basso tasso alcolico**
- ✓ **Monitoraggio dell'igiene delle superfici**
- ✓ **Controllo delle acque di risciacquo e/o processo**

Scattering

Le modalità con cui si manifesta lo scattering dipendono principalmente dal rapporto tra le dimensioni lineari delle particelle e la lunghezza d'onda della radiazione incidente.

scattering elastico quando la radiazione elettromagnetica diffusa dalla particella ha la stessa lunghezza d'onda della radiazione incidente (la radiazione incidente cambia solo direzione)

$$\lambda = \lambda_{inc}$$

scattering anelastico o Raman quando la radiazione elettromagnetica diffusa dalla particella ha lunghezza d'onda diversa da quella incidente

$$\lambda \neq \lambda_{inc}$$

Per lo **scattering elastico** l'energia ricevuta non è sufficiente per un salto di livello energetico

↓
livello virtuale intermedio

↓
emissione alla stessa λ

Per lo **scattering Raman** l'energia ricevuta consente un salto nei livelli traslazionali e vibrazionali

↓
riemissione dell'energia in due step

↓
emissione a diversa λ

Scattering di Rayleigh e di Mie (1)

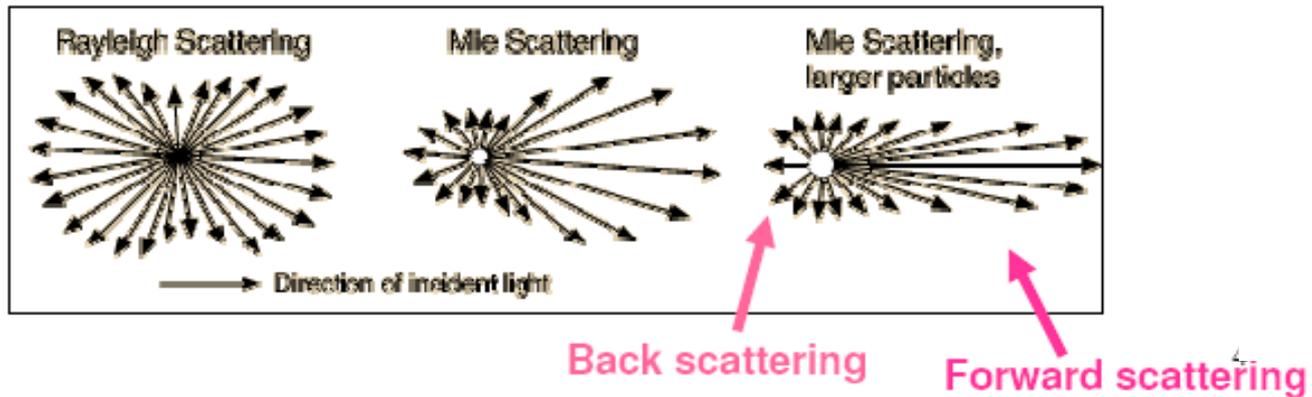
Nel campo dello scattering elastico si ha una ulteriore suddivisione a seconda delle dimensioni delle particelle interessate:

scattering Rayleigh quando le dimensioni delle particelle sono molto più piccole della lunghezza d'onda della radiazione incidente
(in atmosfera – molecole dei gas)

$$d \ll \lambda$$

scattering Mie per particelle le cui dimensioni sono confrontabili o più grandi rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione incidente
(in atmosfera – aerosol)

$$d \geq \lambda$$



Scattering di Rayleigh e di Mie (2)

Intensità radiazione diffusa

$$\sigma_s^R \propto \frac{1}{\lambda^4}$$

Rayleigh

Relativamente alle sezioni d'urto si ha:

$$\sigma_s^M \propto \frac{1}{\lambda^\alpha} \quad \alpha \in [1.3; 2]$$

Mie

Gli esponenti delle λ rivelano che lo scattering Rayleigh è molto selettivo verso le basse lunghezze d'onda rispetto al Mie

lo scattering Rayleigh interessa le molecole dei gas atmosferici diffondendo la radiazione solare prevalentemente blu (circa 5.5 volte più del rosso)



lo scattering Mie interessa le particelle grandi come aerosol, piccole gocce delle nubi

Effetto dimensione particelle

Particelle piccole ($d < \lambda/10$)

Vale Equazione Rayleigh

Onde luce diffusa in fase si rinforzano

Particelle grandi ($d > \lambda/10$)

Onde luce diffusa non in fase alcune si rinforzano, altre si annullano

Pattern di diffusione tipico di

- Dimensione
- Forma delle particelle.

Effetto angolo

Particelle piccole ($d < \lambda/10$)

Intensità luce diffusa

Massima a 0° e 180° , molto minore a 90°

Particelle progressivamente + grandi

Intensità luce diffusa progressivamente + **asimmetrica**

a 90° molto minore che a 0°

dissimmetria fondamentale per caratterizzare/differenziare particelle

Applicazioni

Particelle piccole ($d < \lambda/10$) ($d=40\text{nm}$ nel visibile)

Proteine plasmatiche: immunoglobuline, albumina

Particelle grandi ($d > \lambda/10$) ($d=40\text{nm}$ nel visibile)

Classe M immunoglobuline, complessi immunoglobulina-antigene

Globuli rossi, batteri ($d=7000\text{-}40000\text{nm}$) Vale equazione +complessa.

Determinazione lipidi e lipoproteine

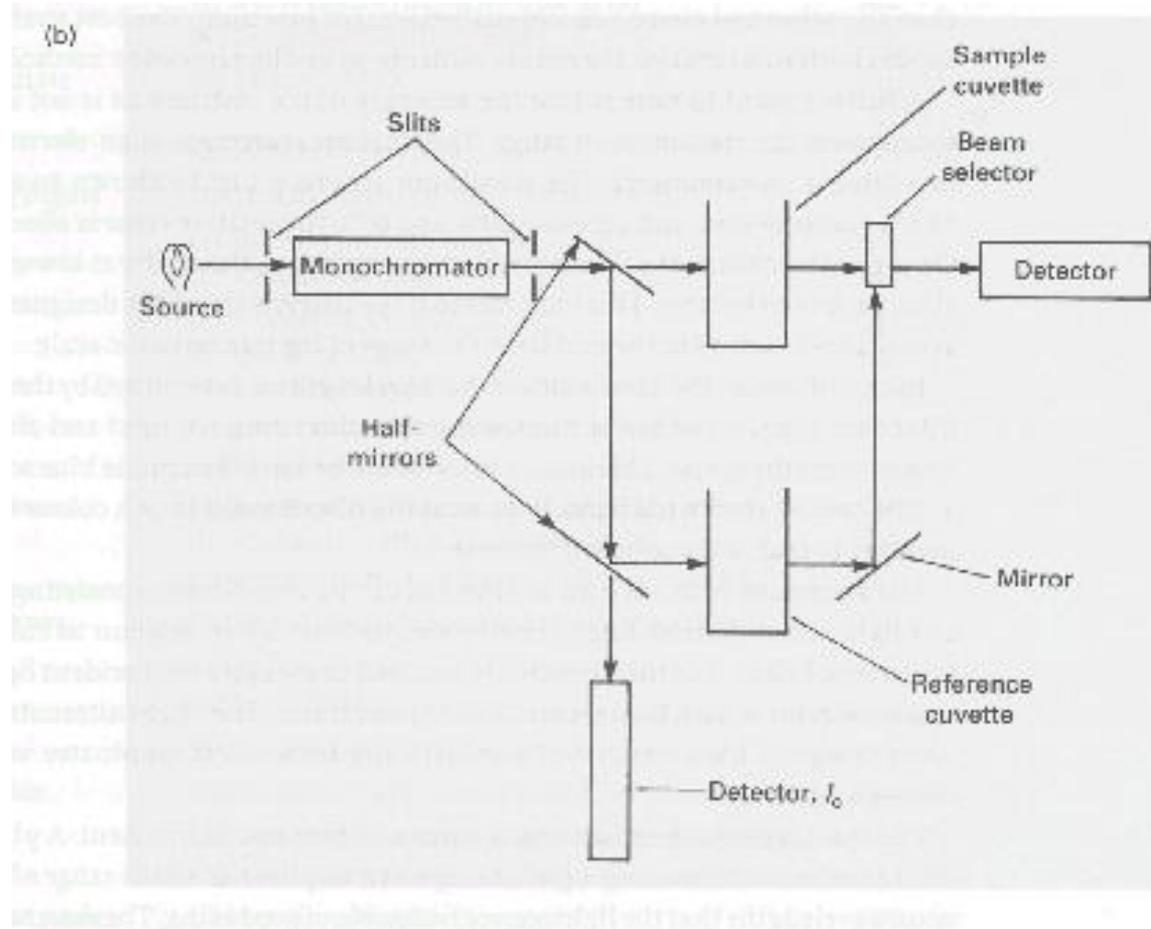
Intensità della luce è proporzionale al numero particelle presenti: quantità complesso formato

Studio di velocità di reazioni antigene-anticorpo a basse concentrazioni.

Determinazione farmaci-aptenti tramite formazione di immunocomplessi

Nefelometria

Misura dell'intensità della luce diffusa o riflessa verso il rivelatore posto in una direzione diversa da quella della luce incidente (90°).

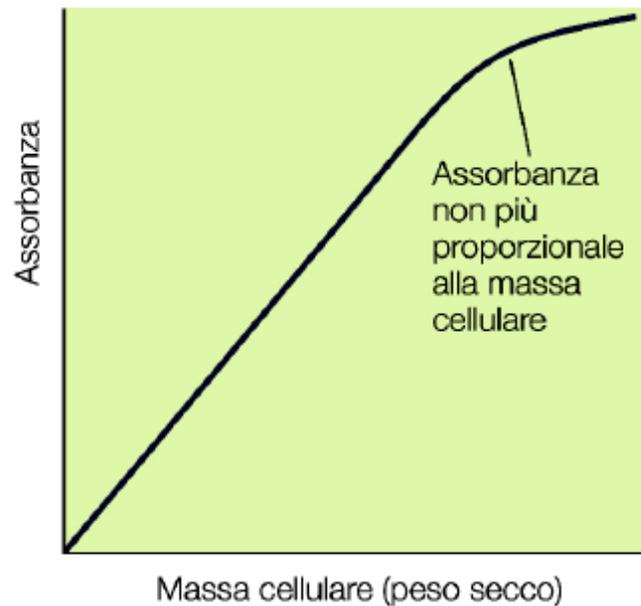


Unità di assorbanza (O.D._{600 nm}) = $\log(I_0/I)$

I_0 = intensità luce incidente

I = intensità luce trasmessa

La dispersione della luce è funzione di forma e dimensioni del microrganismo in sospensione.



Tecniche dirette per la misura quantitativa di una popolazione microbica

◆ Determinazione della densità cellulare

determinazione del N° mediante sistemi fotometrici (torbidità)

- Spettrofotometri: turbidimetri, nefelometri

Turbidimetria: intensità della luce non deviata (trasmessa)

Nefelometria: intensità della luce deviata

Relazione tra D.O. e concentrazione batterica (curve di riferimento)

Citometria

Misura contemporanea di fluorimetria e light scattering: molecole, cellule, particelle possono essere **differenziate** in base a dimensione e forma

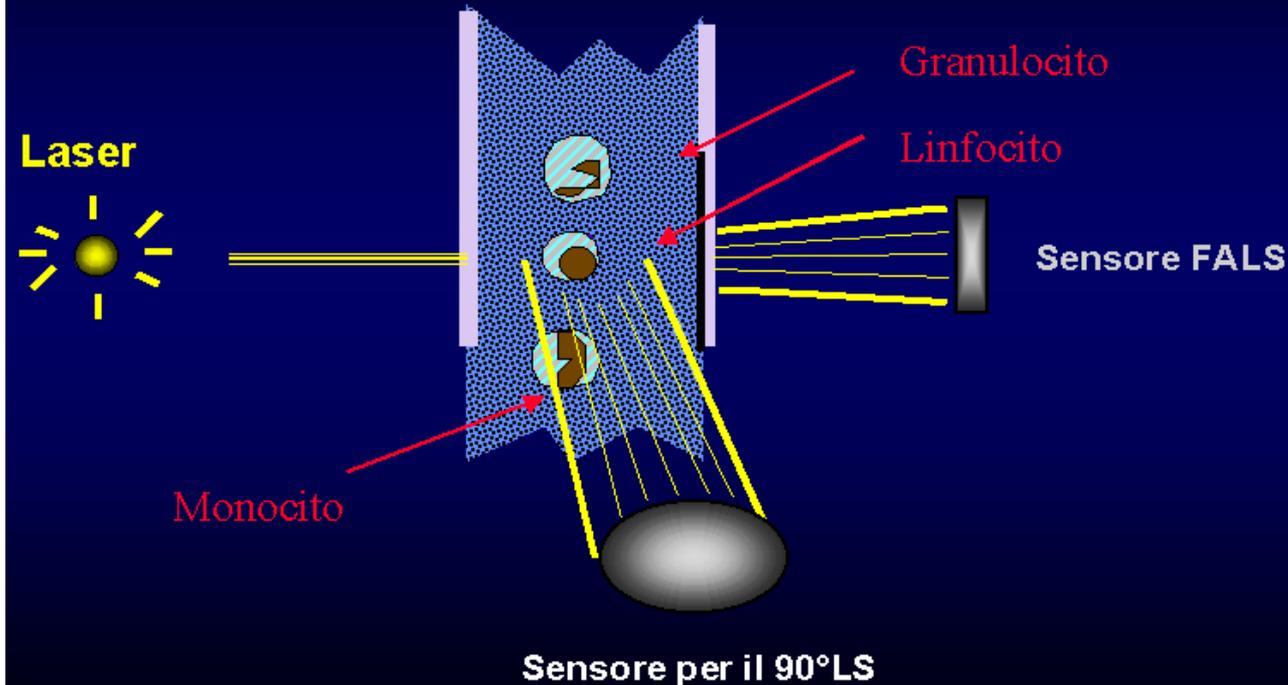
Il ***citometro a scansione*** è un analizzatore statico di immagini acquisite da vetrini di cellule con la tecnica del contrasto di fase, della fluorescenza, dello scattering o dell'impedenza.

Il ***citometro a flusso*** è uno strumento che permette l'esame delle cellule in sospensione che vengono analizzate mentre fluiscono (fino a 4000-6000 per secondo) di fronte a una sorgente di luce propriamente collimata (preferibilmente una luce laser).

I più diffusi sono:

a **fluorescenza**, per la loro sensibilità, rapidità di analisi multiparametrica
scattering (misurato da un rivelatore dell'angolo di deviazione dell'onda elettromagnetica).

Scatter laterale (90 Degree Light Scatter)



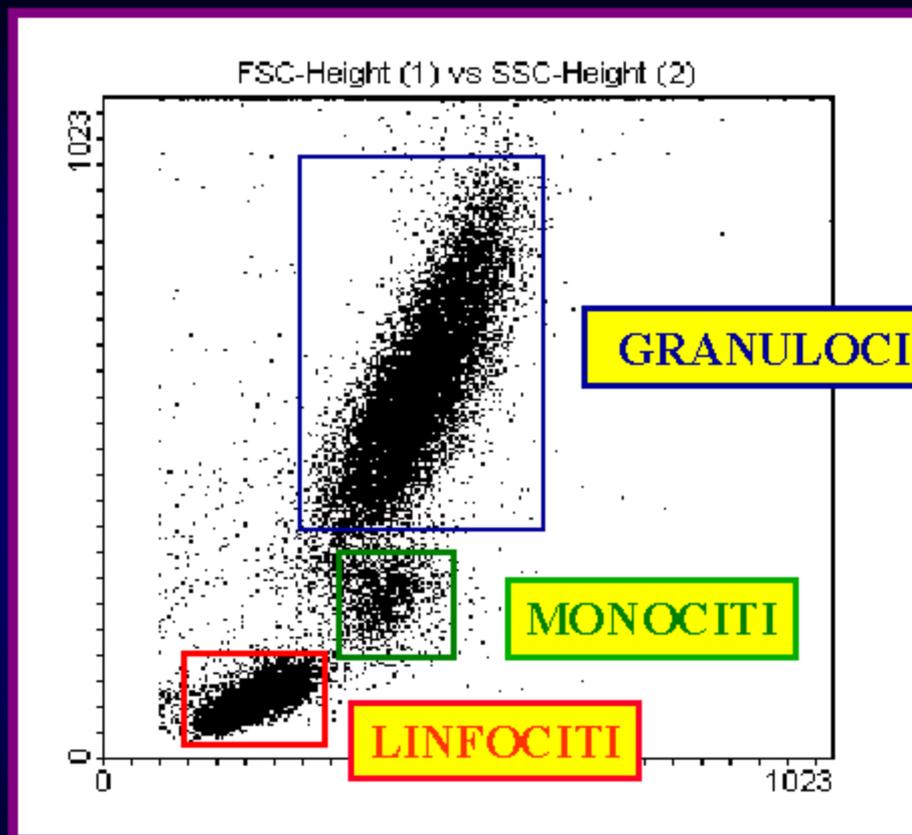
Sistema di eccitazione:

laser a ioni Argon con una potenza di 15 mW con un'emissione ottimale intorno a 488 nm: efficace misura dei parametri fisici e può eccitare contemporaneamente fino a tre diversi fluorocromi.

L'interazione del fascio di luce con la cellula dà luogo a tre fenomeni: *light scattering* - *assorbimento* - *fluorescenza*.

Esempio di analisi dei leucociti e “gating” elettronico

90 Degree Scatter



Forward Scatter

Citogramma

diagramma di dispersione che permette di caratterizzare le popolazioni cellulari in base a misure di *scattering*.

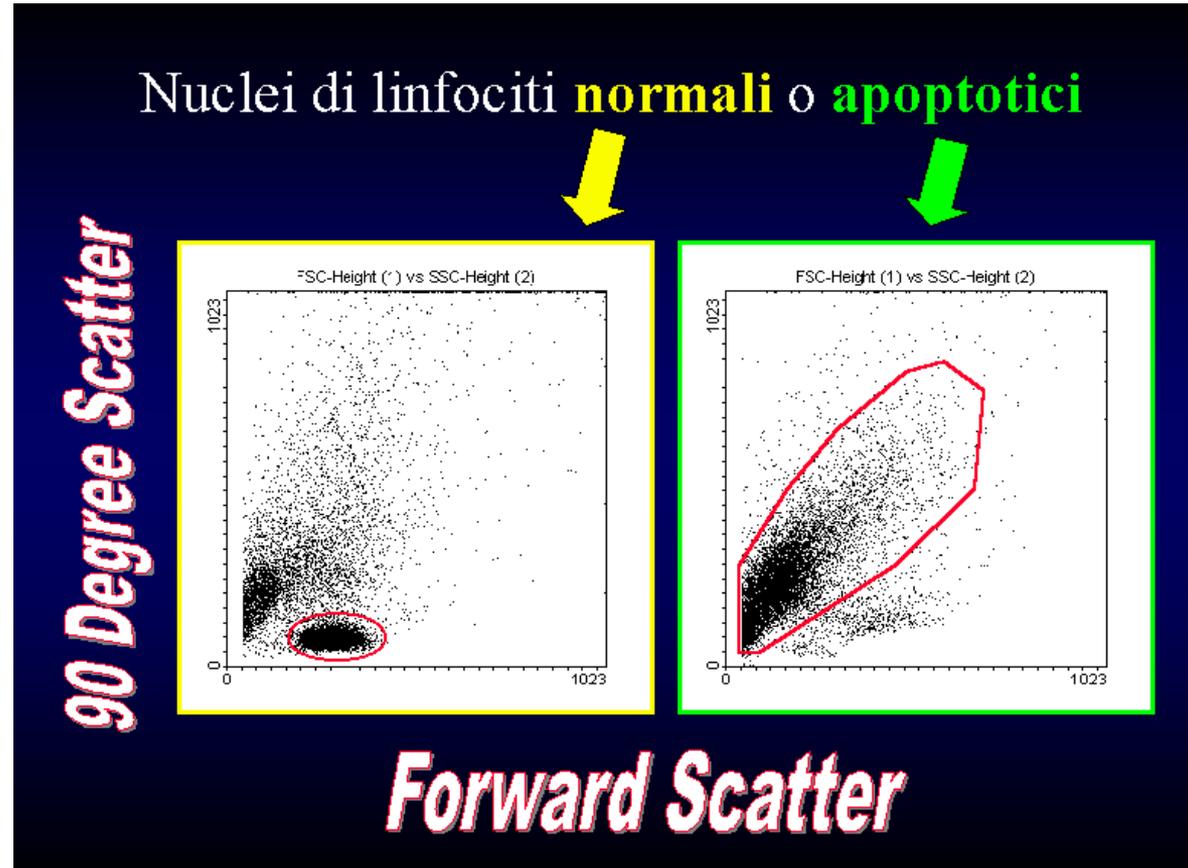
Il citogramma è dato dalla combinazione di:

- **diffusione** ("forward scatter"), in funzione del diametro cellulare
- **riflessione** e rifrazione ("side scatter" misurato ortogonalmente)

Il segnale è in funzione

- della granularità interna,
- del rapporto nucleo-citoplasma,
- della rugosità di superficie.

cellule apoptotiche, i cui nuclei sono condensati e raggrinziti



Citofluorimetria a flusso oggi

Negli ultimi anni la CFM ha raggiunto una notevole diffusione, sia in laboratori clinici che in laboratori di ricerca.

Fattori che hanno contribuito a questo notevole sviluppo:

- la possibilità di utilizzare più laser di emissione, che permette di effettuare analisi multiparametriche a 4 e più colori;
- la disponibilità di Ab marcati con un'ampia gamma di fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di Ag di membrana e/o intracellulari;
- la riduzione dei costi e della complessità nell'utilizzo dello strumento.

Applicazioni

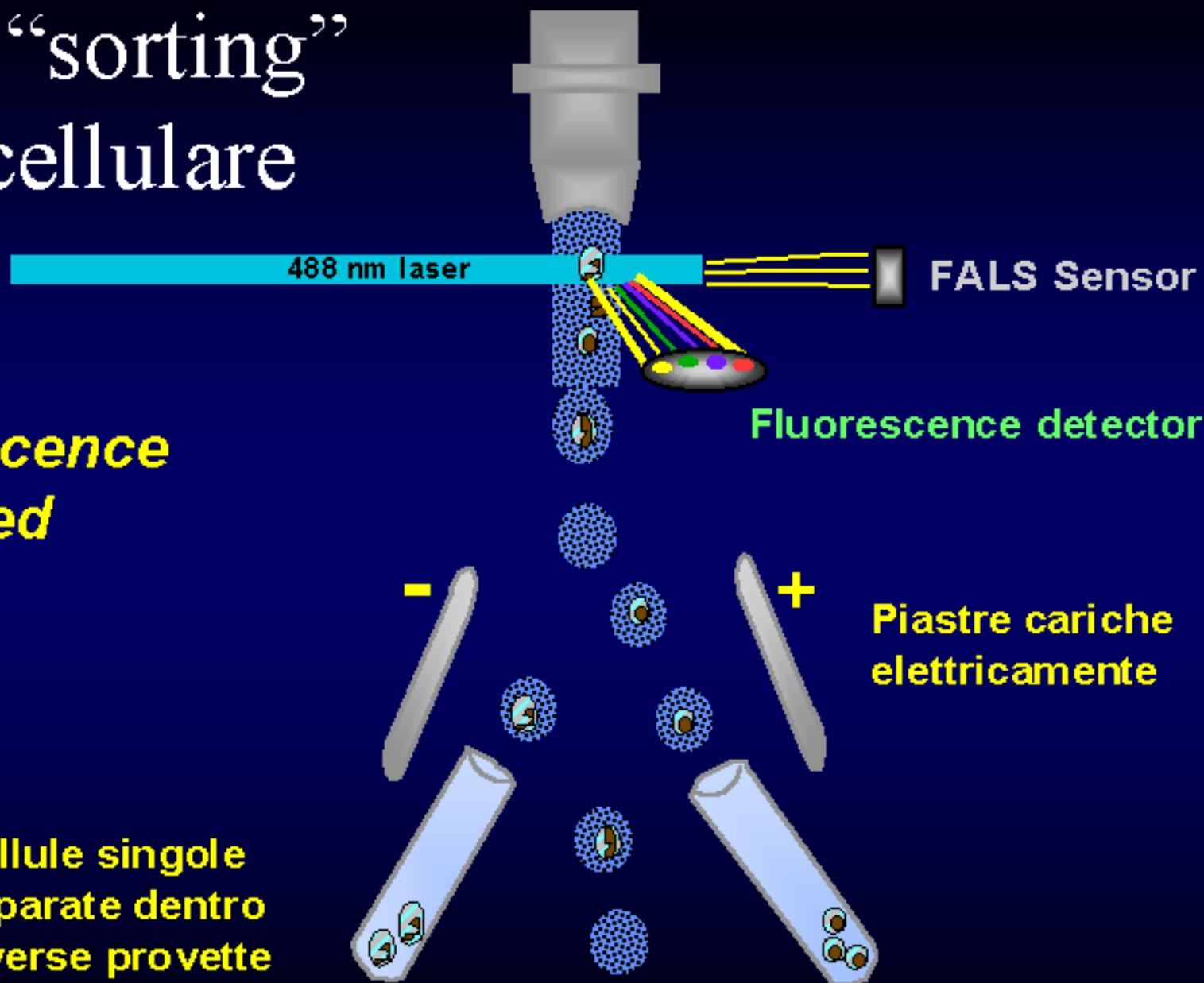
Molecole marcate con speci fluorescenti (isotiocianato fluoresceina, rodamina 6G, anticorpi)

Determinazione di:

- dimensione cellule, es. differenziazione di popolazioni di linfociti B e T,
- contenuto DNA es. studi sulla replicazione del DNA e sulla proliferazione neoplastica
- contenuto RNA
- struttura cromatina
- Antigeni
- contenuto proteine totali.
- cellule recettoriali

ES. studio del ciclo cellulare: si utilizzano come sonde coloranti che si legano al nucleo (ad esempio ioduro di propidio per il DNA). Si può evidenziare quanto colorante si è legato al DNA e di conseguenza stabilire in che fase del ciclo si trova la cellula.

Il "sorting" cellulare



FACS:
Fluorescence
Activated
Cell
Sorting

Cellule singole
separate dentro
diverse provette

Piastrre cariche
elettricamente

