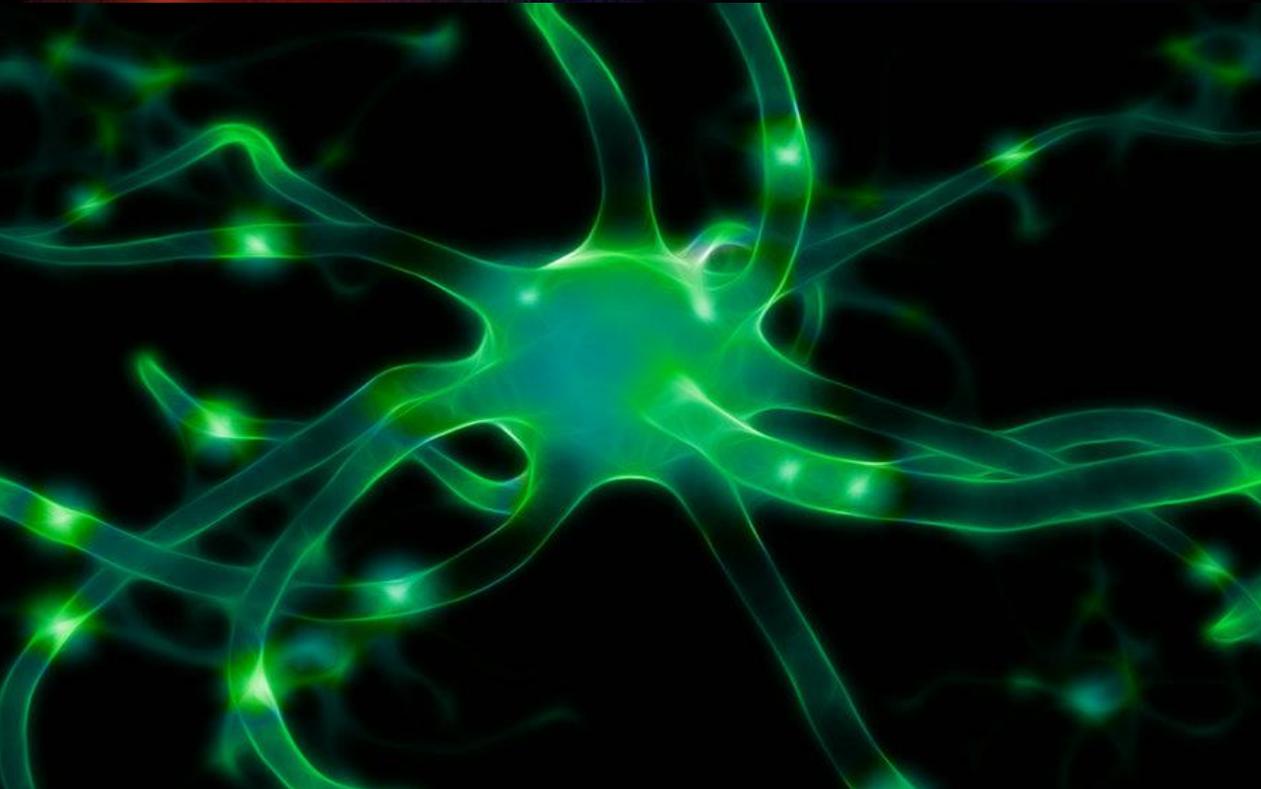


LUMINESCENZA



LUMINESCENZA

Elettroluminescenza

corrente elettrica in gas ionizzato o semiconduttore

Radioluminescenza

materiale radioattivo

Chemiluminescenza

reazione chimica

Bioluminescenza

reazione enzimatica

Termoluminescenza

temperatura

Triboluminescenza

rottura di cristalli

Sonoluminescenza

onde sonore in liquidi

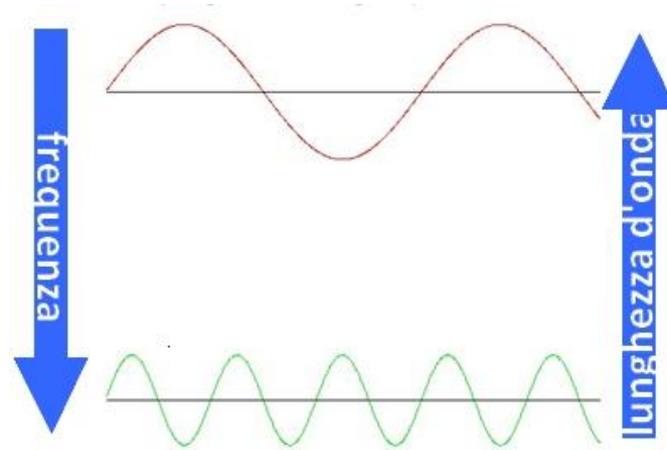
Fotoluminescenza

assorbimento di luce IR, visibile, U.V.



FLUORESCENZA

Assorbimento da parte di una **molecola** di una radiazione con **emissione** di un'altra radiazione a **lunghezza d'onda >**



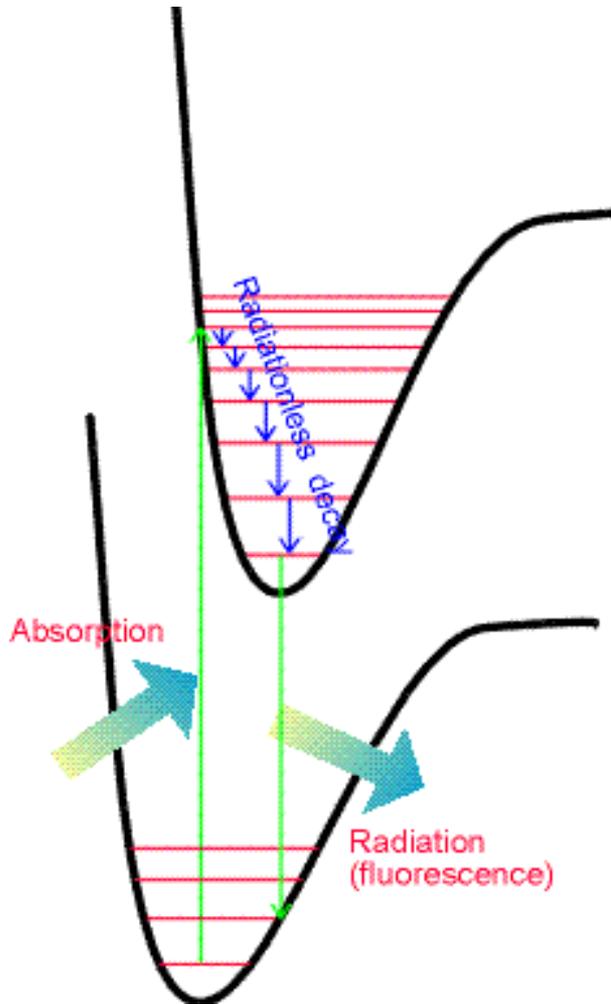
$$E = h \nu$$

$$\lambda = c/n\nu$$

E' un caso particolare di luminescenza che **cessa quando termina la causa di eccitazione.**

SPOSTAMENTO DI STOKES

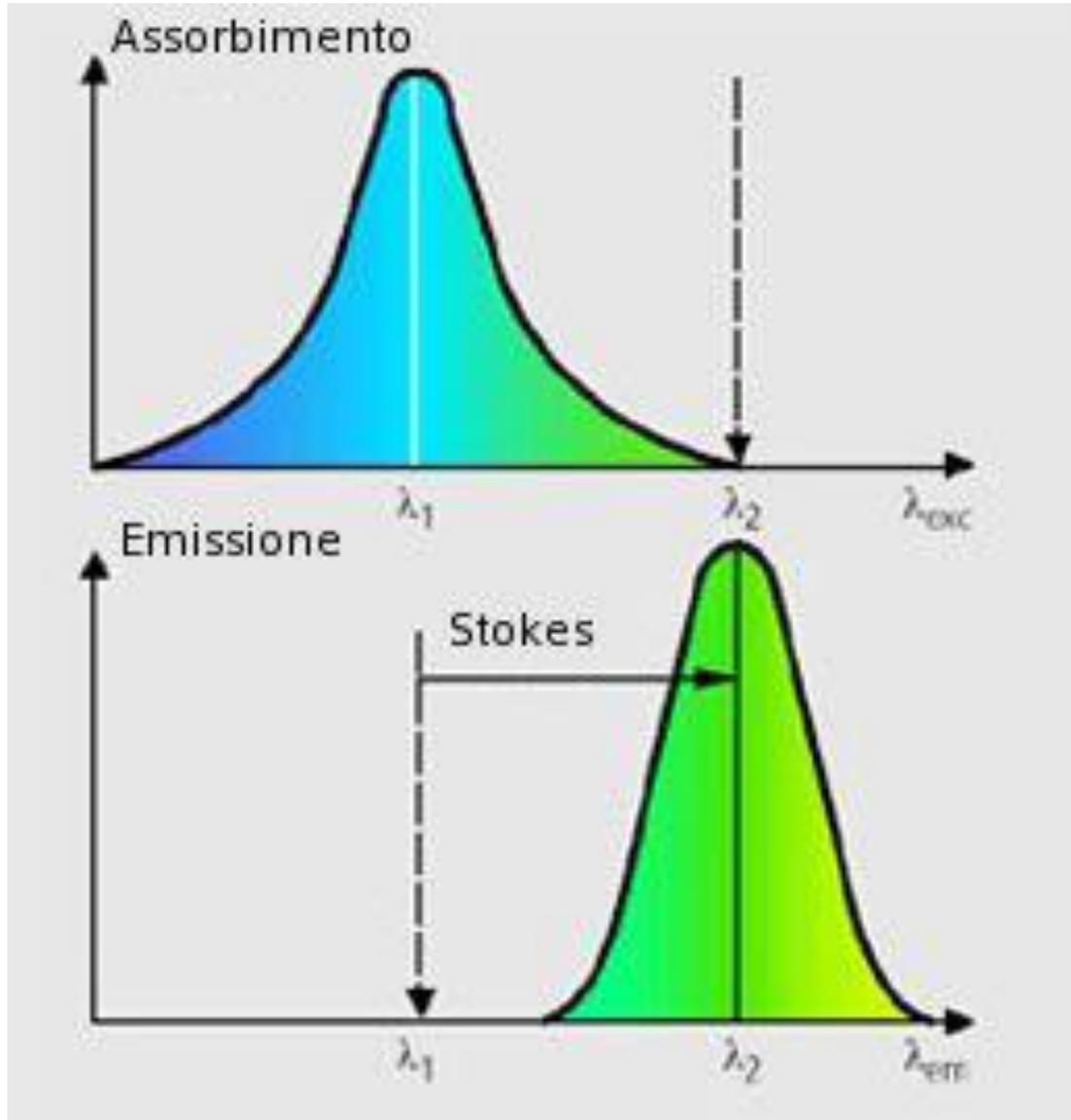
Assorbimento da parte di una **molecola** di una radiazione con **emissione** di un'altra radiazione a **lunghezza d'onda** >



Tale aumento è definito **spostamento (shift) di Stokes**.

Assorbimento di un quanto di energia ($h\nu$) che porta la molecola in uno stato eccitato da cui può tornare nello stato fondamentale con 1 o più **transizioni successive**.

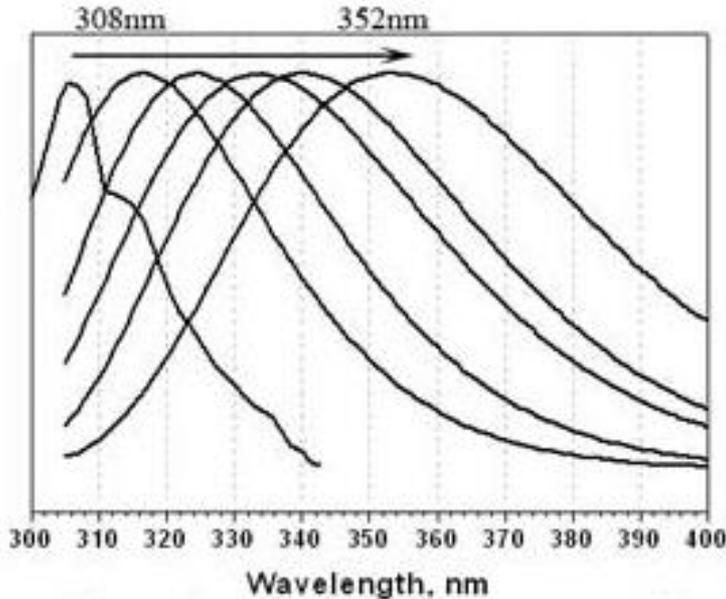
SPOSTAMENTO DI STOKES



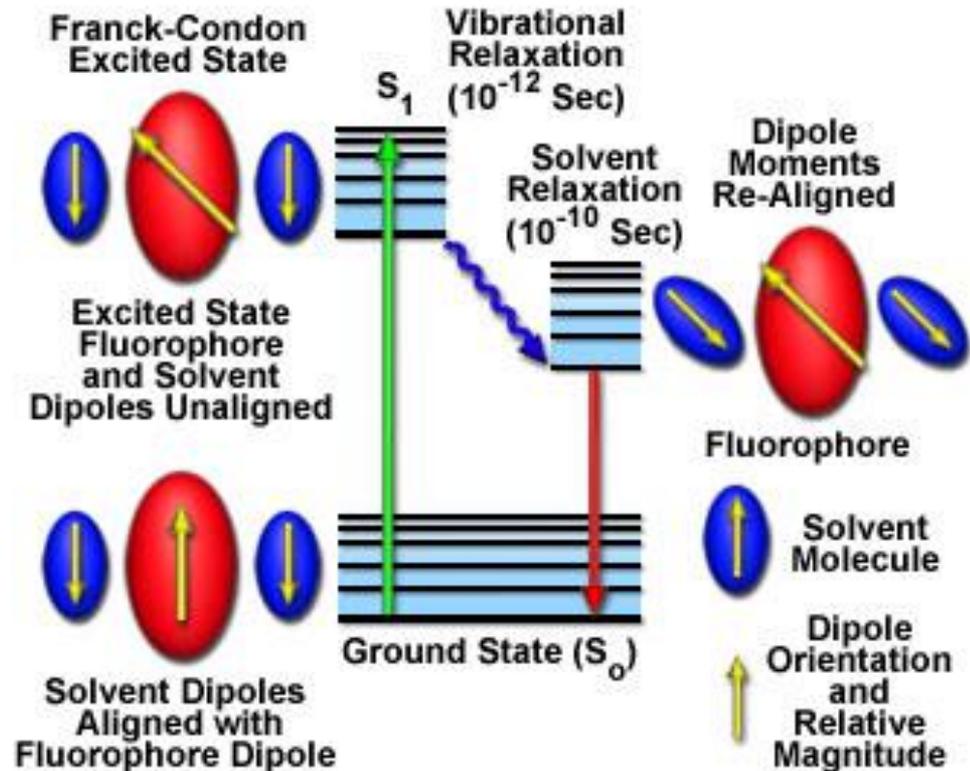
Dipende dalla
«natura
elettronica»
della sostanza.

EFFETTO DELL'AMBIENTE

Fluorescenza del triptofano di una proteina *in diversi ambienti*

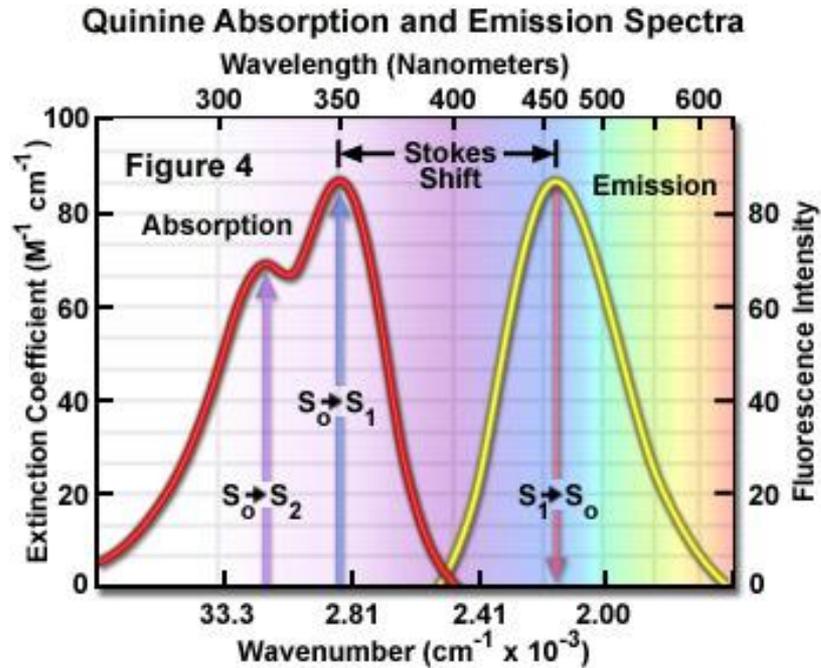


Fluorophore-Solvent Excited State Interactions



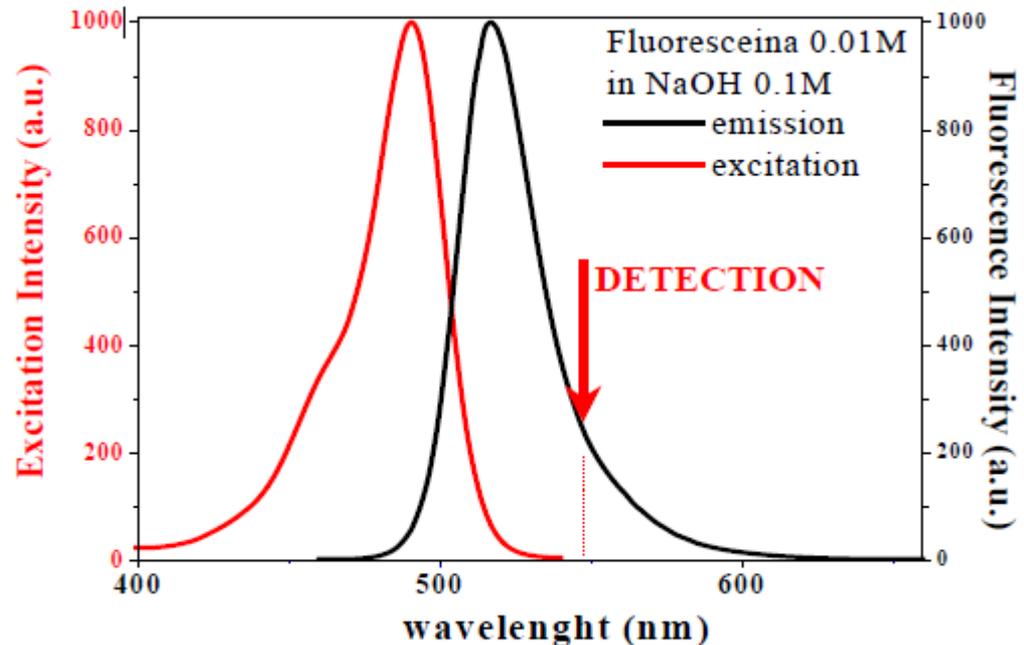
Dipende anche dall'influenza dell'**intorno chimico-fisico** del fluoroforo, sulla stabilizzazione dello stato eccitato.

MISURA DELLA FLUORESCENZA



Quando gli spettri **non** siano così **ben separati**...

...occorre misurare anche a λ diverse dal picco di massima emissione.



RIASSUMENDO:

L'assorbimento porta la molecola in uno stato elettronico eccitato.

FOSFORESCENZA

$10^{-4} - 10^4$ s

La molecola rilascia una parte dell'energia in modo **non radiativo** scendendo verso lo stato vibrazionale più basso dello stato elettronicamente eccitato.

FLUORESCENZA

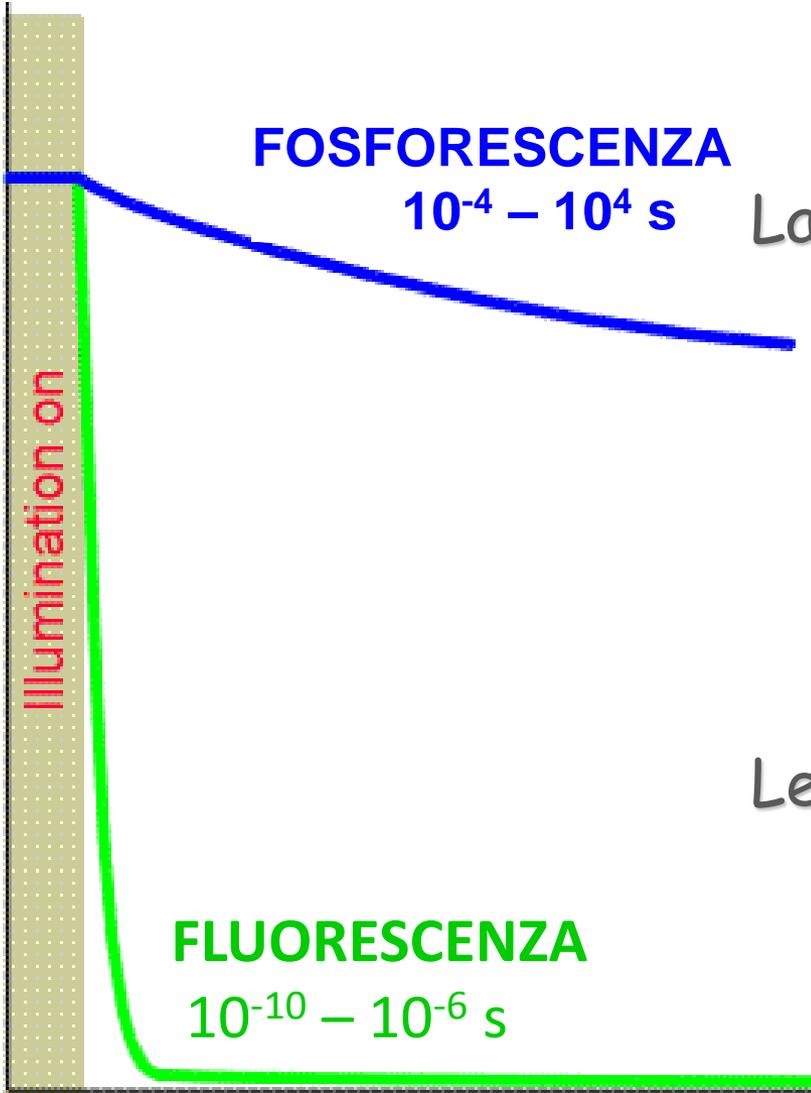
$10^{-10} - 10^{-6}$ s

Le molecole circostanti non possono accettare la grossa quantità di energia necessaria per rilassare elettronicamente la molecola ed essa **emette spontaneamente** radiazione.

Intensità luminosa

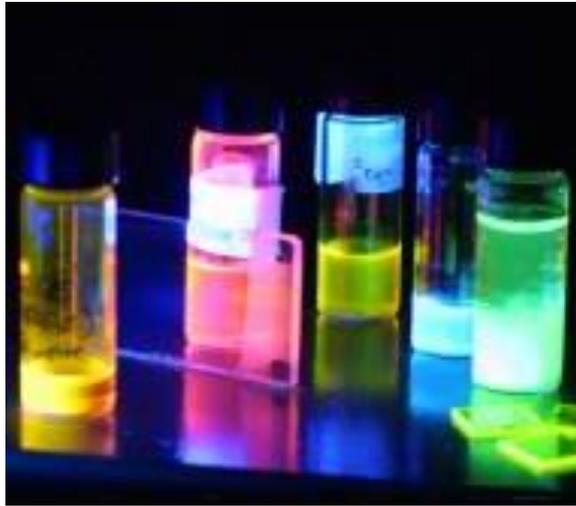
illumination on

tempo

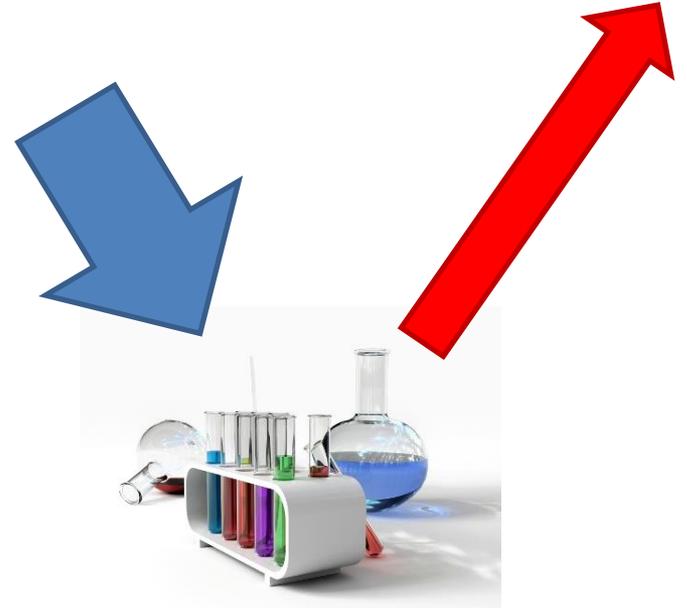


DIFFERENZE

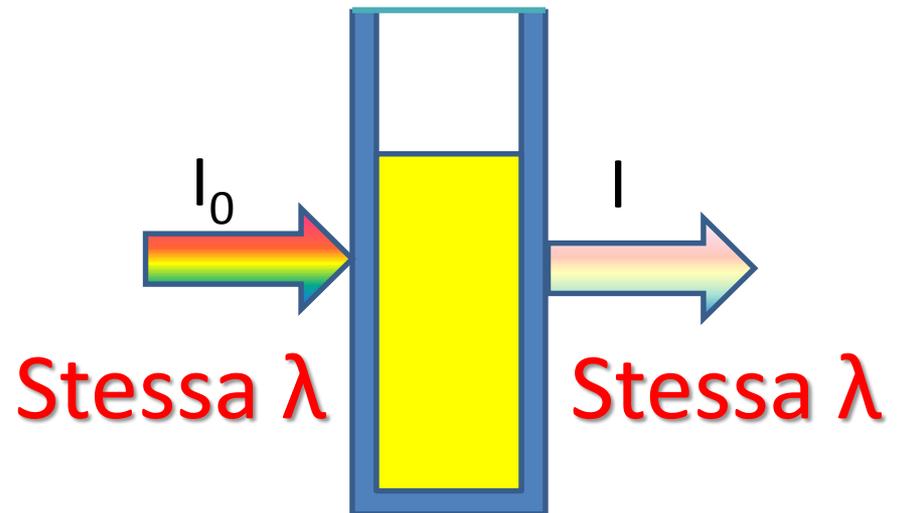
Luminescenza



Fluorescenza



Da non confondere con l'**Assorbimento**



SUBSTRATI FLUOROGENICI

Chemical Name: methylsulfonyl-D-cyclohexylalanyl-glycyl-arginine-7-amino-4-methylcoumarin.acetate

Formula: $\text{MeSO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH}$ $M_r = 679.8$

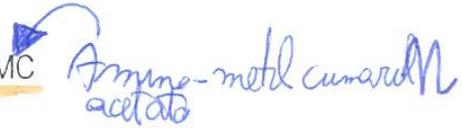
Composition: Vial contains $10 \mu\text{moles} \pm 2\%$ (see **Product Presentation**) of 100% enzymatically digestible substrate which on complete fXa hydrolysis will yield exactly $10 \mu\text{moles}$ of 4-methylcoumarin; glycine q.s.

Solubility: $> 10 \text{ mM}$ in distilled/deionized water at 25°C
 $> 1.0 \text{ mM}$ in 0.05M Tris buffer, pH 7.4 at 25°C

Stability: a) sealed vials, dry, in the dark, at $+2 - +8^\circ\text{C}$, for 5 years from date of manufacture.
b) as a solution, reconstituted with distilled/deionized water; for 1 week at room temperature (no microorganisms).
c) as a solution, reconstituted with distilled/deionized water; for 1 month at $+2 - +8^\circ\text{C}$.
d) as a solution, reconstituted with distilled/deionized water; 3 months frozen (aliquot and freeze, do not refreeze).

Optical Characteristics: Absorption Maximum Wavelength, λ_{Abs} : 360 nm
Emission Maximum Wavelength, λ_{Em} : 440 nm

Test Principle: $\text{MeSO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-AMC.AcOH}$ enzyme \rightarrow $\text{MeSO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-OH} + \text{AMC}$

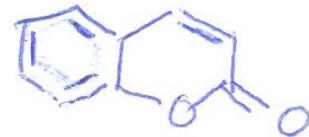


Enzyme activity is determined by measuring the increase in absorbance of the free chromophore (AMC) generated, in comparison to the original substrate, per unit time at $\lambda_{440} \text{ nm}$. At excess substrate concentration, the rate of absorbance increase due to the amount of chromophore released is linearly related to enzyme concentration. Measurement can be made either through acid quenching of the reaction (end-point method), or through use of a kinetic recording spectrophotometer (initial-rate-method).

Assay Conditions

SPECTROZYME® fXa: 0.100 mL of a 10 mM stock concentration
Buffer: 0.800 mL of 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4
Factor Xa (ADI No. 526): 0.200 mL of 12 nM solution

Incubate for 2 minutes at 25°C (room temperature).



Kinetic Data for factor Xa

$$\frac{K_m}{0.22 \text{ mM}}$$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{162 \text{ sec}^{-1}}$$

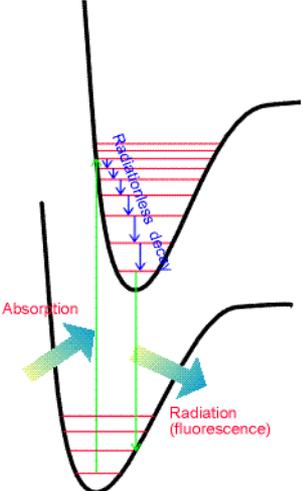
SUBSTRATI FLUOROGENICI PER LO STUDIO DI ATTIVITA'



**STUDIO DELLA
ATTIVITA'
ENZIMATICA *IN
VITRO***

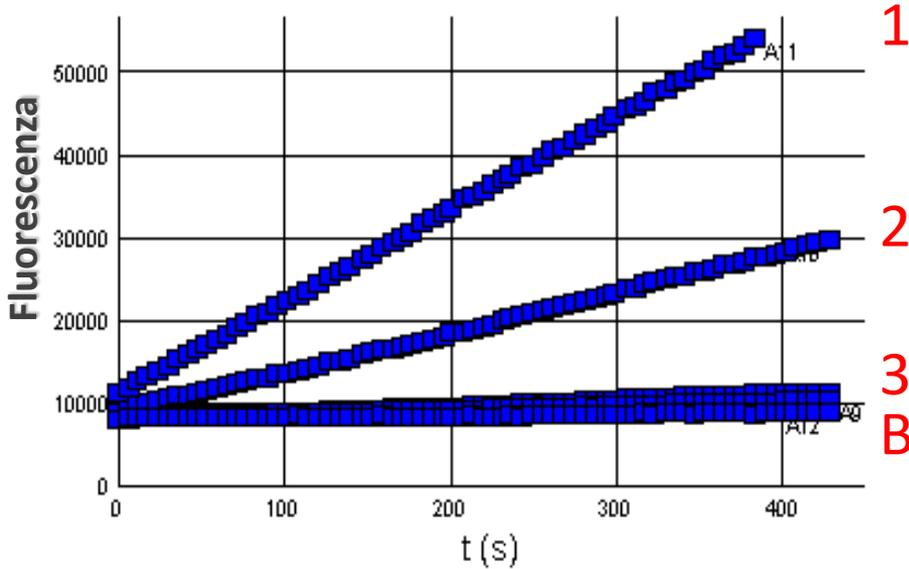
FXa

Substrato
fluorogenico
FXa



APPLICAZIONE DELLA FLUORIMETRIA

Risposta lineare



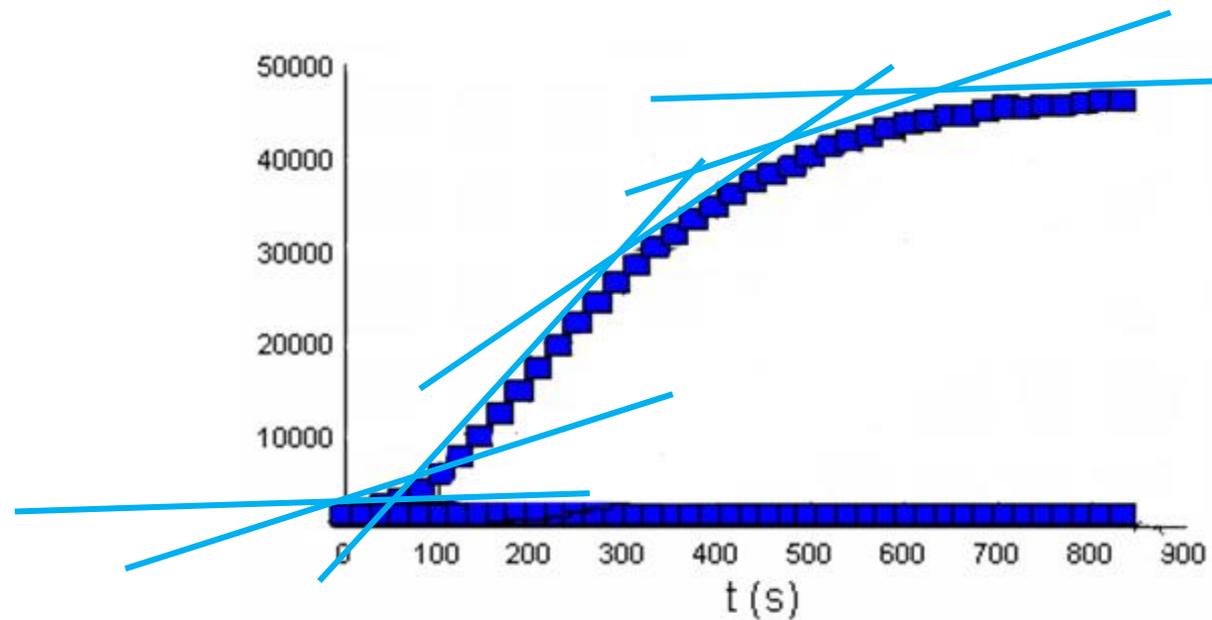
1

2

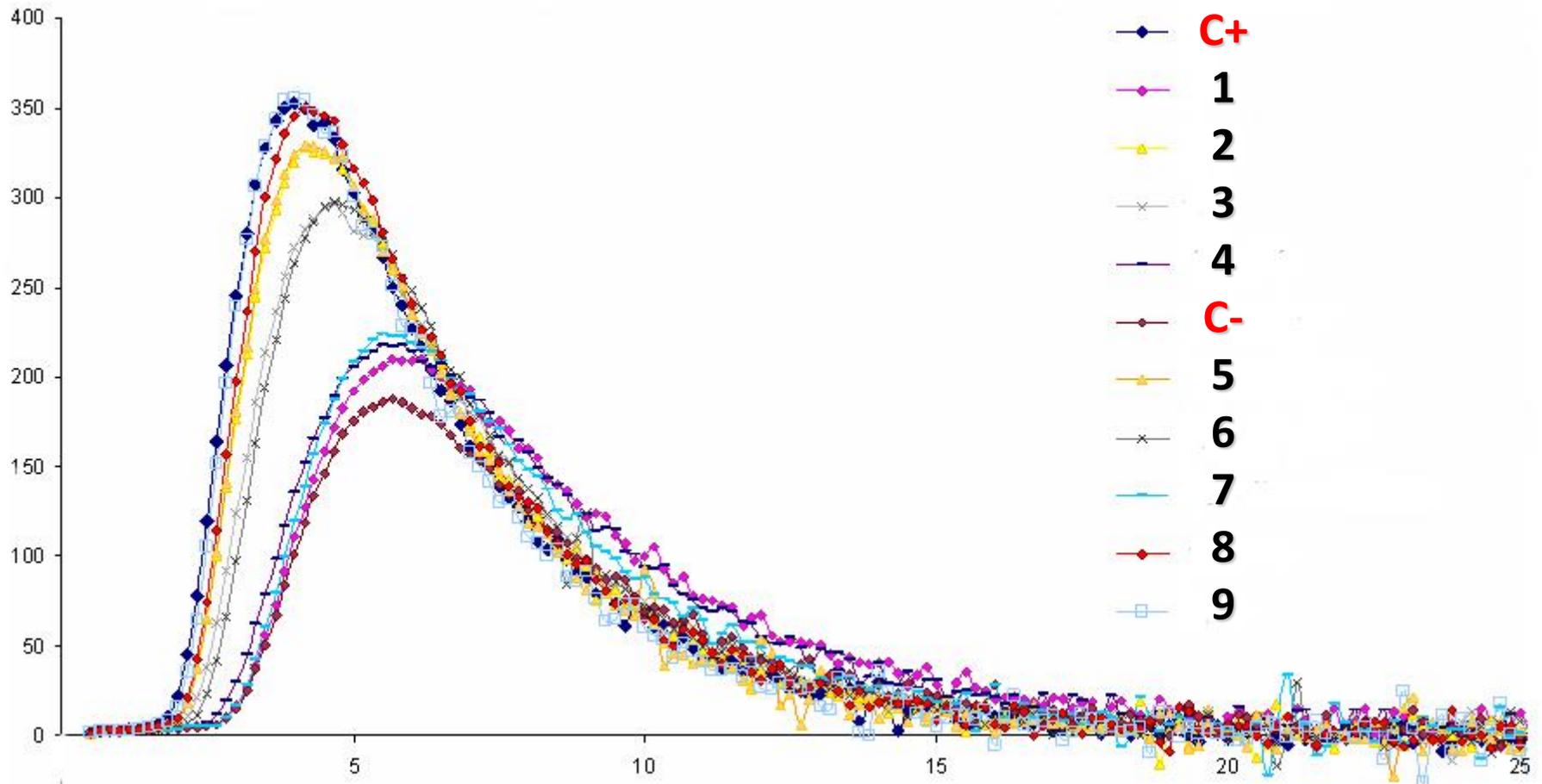
3

Bianco

Risposta sigmoideale



Si calcola la **derivata prima** per poter individuare i massimi, i minimi e l'andamento della funzione.



Conti di laboratorio più frequenti

Molarità (M) = n° moli soluto/Litro di soluzione
n° moli = massa/PM

% p/p: 10% p/p di KCl

10 g di soluto in 100 g di soluzione, ovvero 10 g di KCl + 90 g di solvente (es. H₂O).

% p/V: 10% p/V di KCl

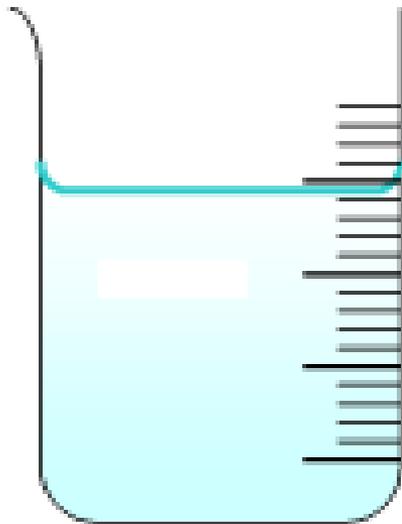
10 g di soluto in 100 mL di soluzione, cioè 10 g di sale portati a volume sino a 100 mL, con H₂O

% p/V = % p/p . d (densità)

d = Massa/Volume

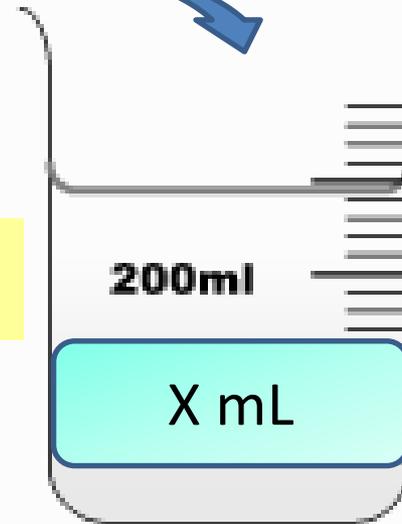
DILUIZIONI : **C1.V1 = C2.V2**

Soluzione A



X mL

Soluzione B



$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

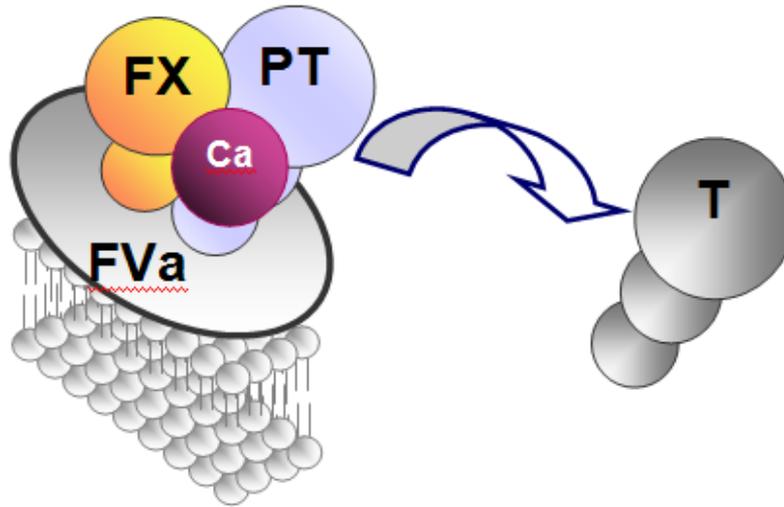
$$C1 = 4X$$

$$V1 = \dots \text{ mL}$$

$$C2 = 1X$$

$$V2 = 200 \text{ mL}$$

SAGGIO FUNZIONALE



C1

C2 V1

FX = 1 μ M (soluzione madre)

10 pM

FVa = 300 μ M (madre)

10 pM

PT = 1 μ M (madre)

500 nM

Ca²⁺ = 1 M (madre)

5mM

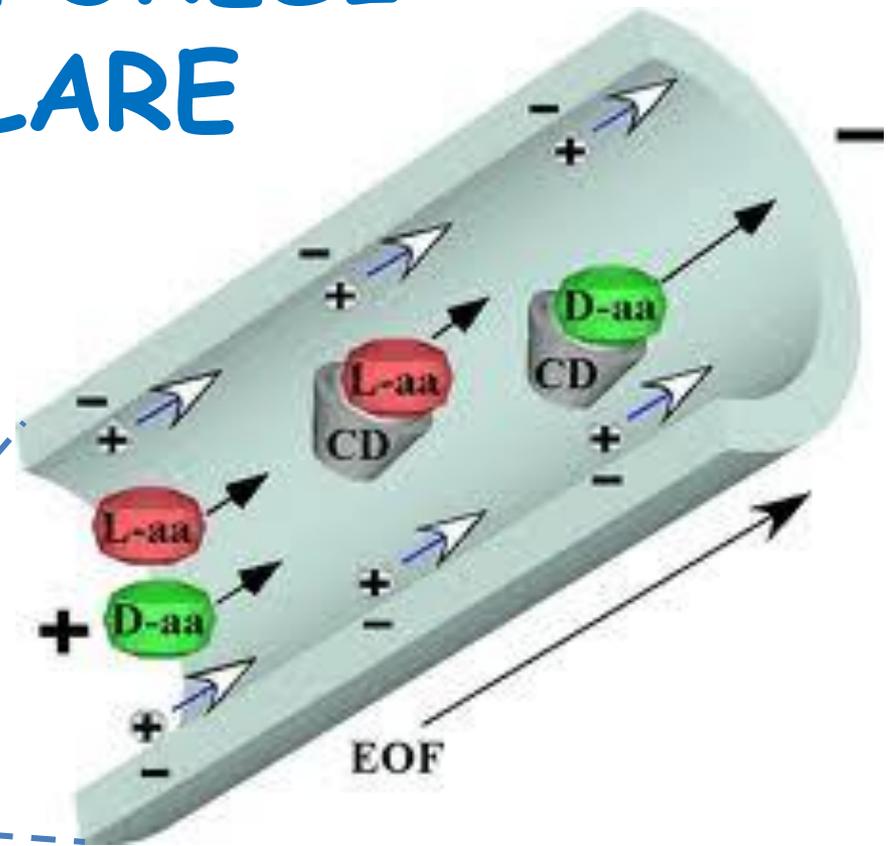
V2 = 100 μ L

Incubazione a 37°C 10', aggiunta substrato fluorogenico (SFT) specifico per T

SFT = 10 mM (madre)

250 nM

ELETTROFORESI CAPILLARE

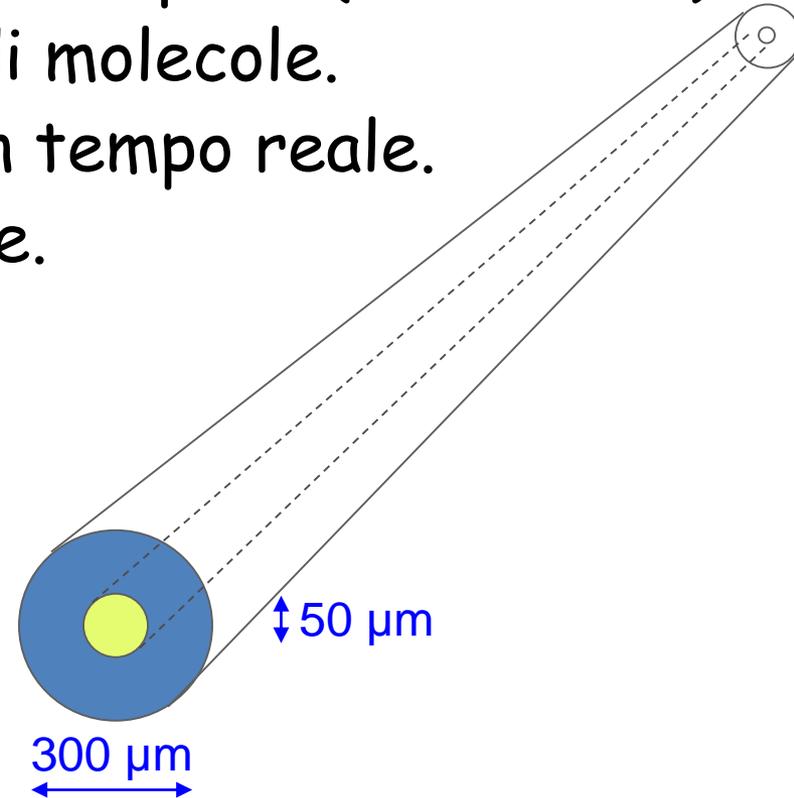


ELETTROFORESI CAPILLARE

VANTAGGI

- Uso di **quantità molto ridotte** di campioni (**fmoli** e **nL!**).
- **Applicabilità** a molte tipologie di molecole.
- **Velocità** di analisi, rilevazione in tempo reale.
- **Alto** rapporto superficie/volume.
- Migrazione in fase libera.
- Elevata **sensibilità**.

$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$

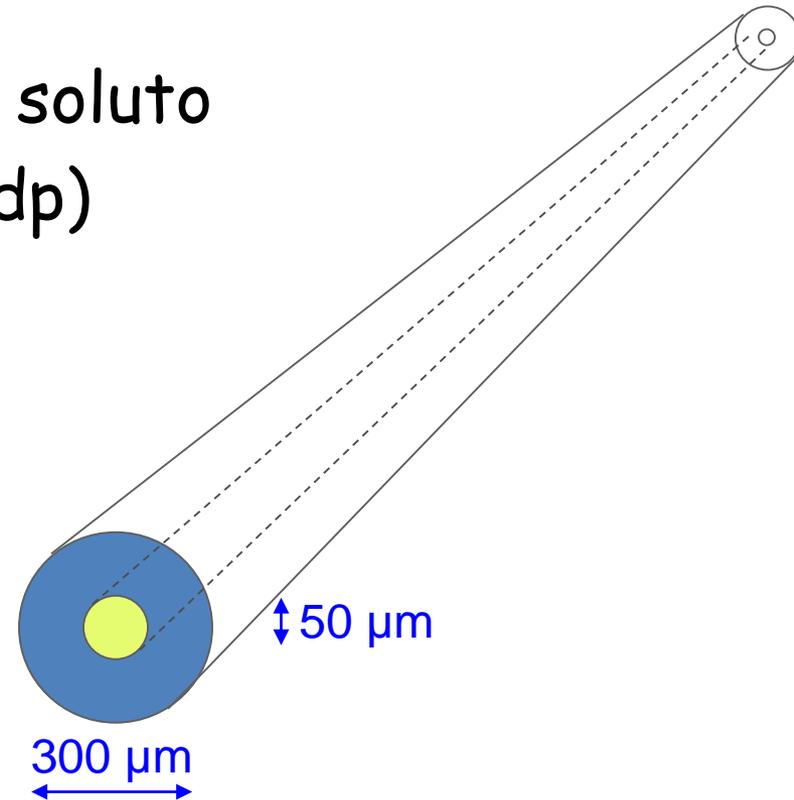


Elettroforesi condotta in tubi di \emptyset interno di pochi μm .

ELETTROFORESI CAPILLARE

- t = Tempo di permanenza del soluto nel capillare
- L = lunghezza del capillare
- μ = mobilità elettroforetica del soluto
- V = differenza di potenziale (ddp)

$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$

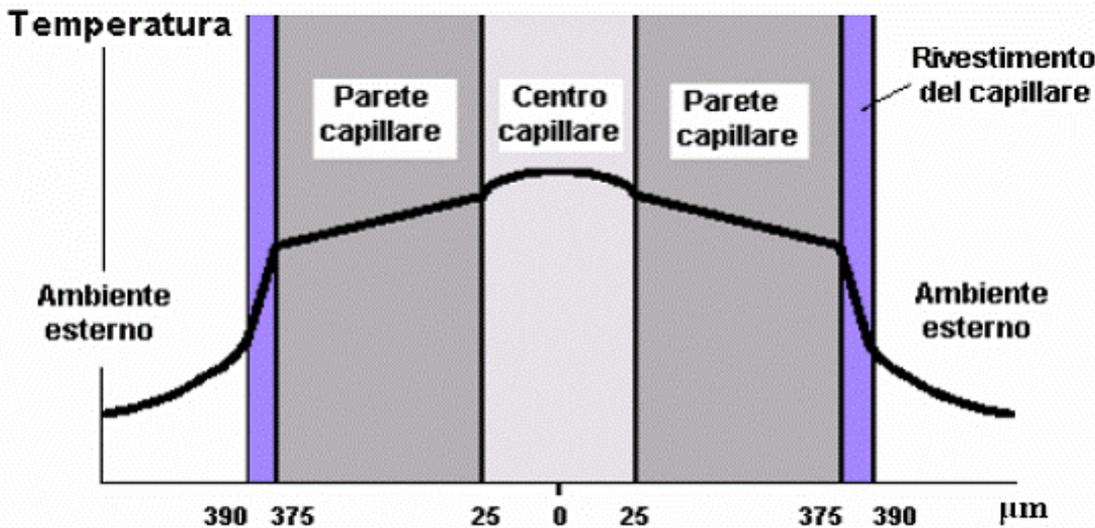


Elettroforesi condotta in tubi di \varnothing interno di pochi μm.

GRADIENTE DI TEMPERATURA IN UN CAPILLARE

SVANTAGGI E LIMITI

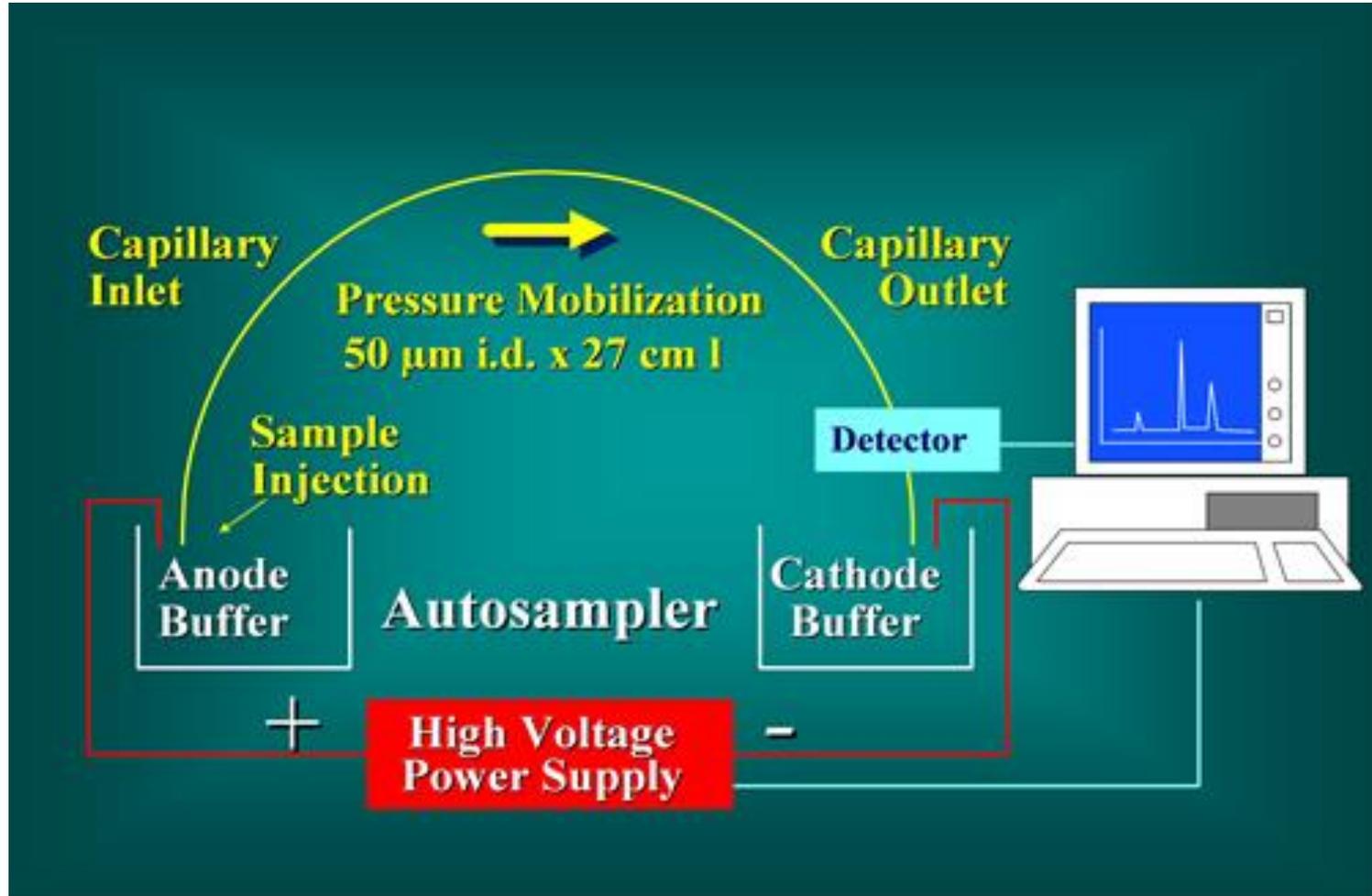
- **Elevate ddp** applicate (10000-50000 Volt).
- Per **dissipare il calore** prodotto i capillari non possono essere inferiori a 50-100 cm.



Pareti del capillare spesse facilitano una omogenea dispersione del calore.

Tali gradienti originano locali differenze di **viscosità** nel tampone e dunque una migrazione **non** uniforme.

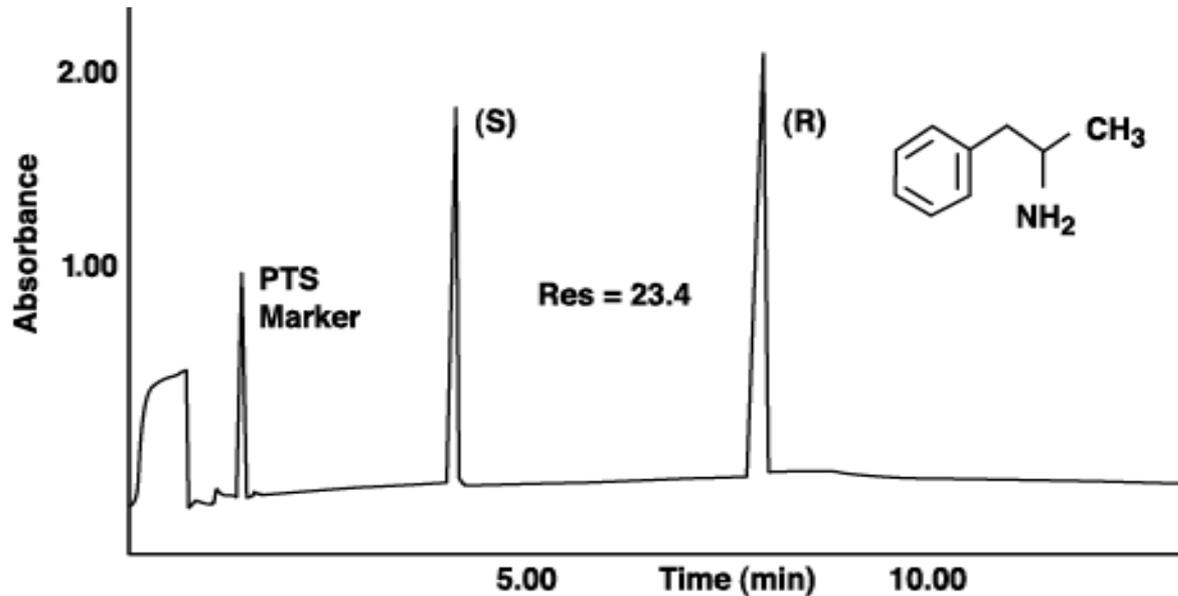
DIREZIONE DEL FLUSSO



Le sostanze si spostano
tutte da anodo verso catodo.

STRUMENTAZIONE

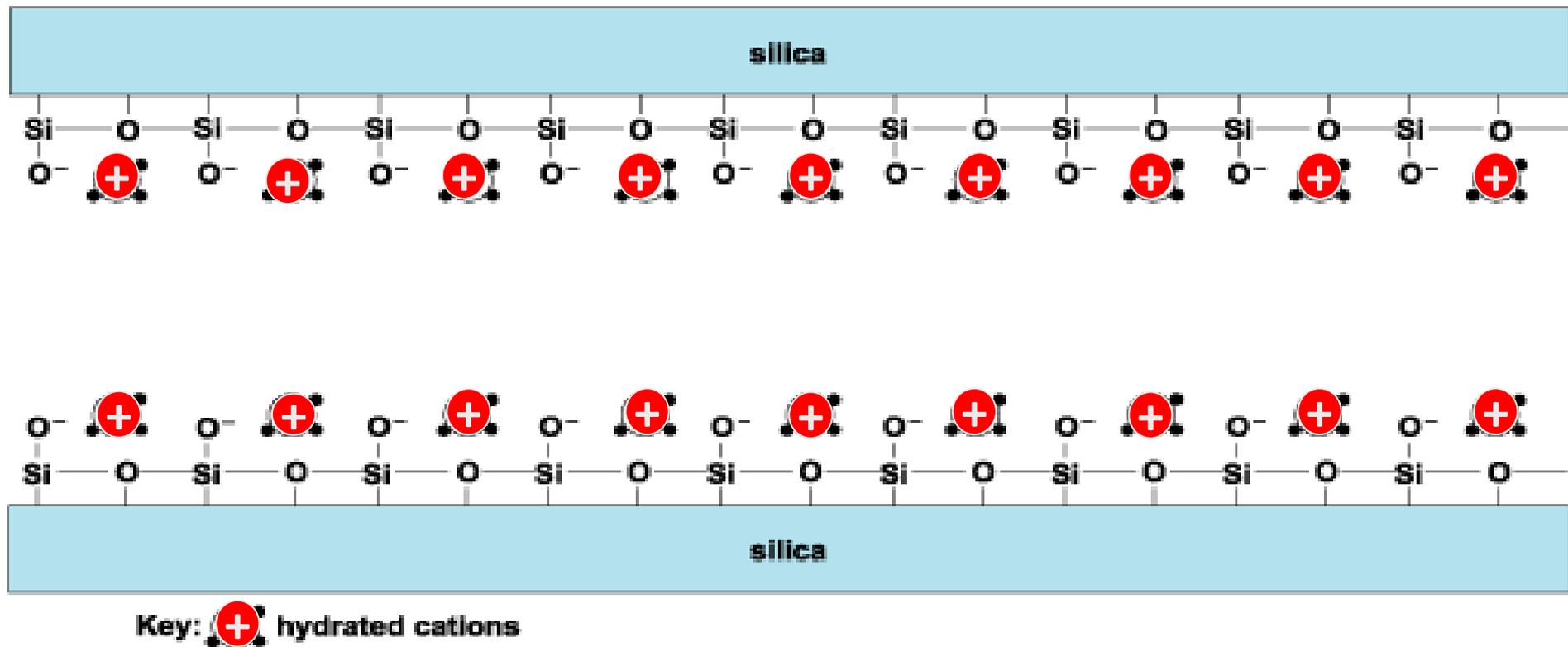
1. Serbatoi del tampone e del campione.
2. Generatore di ddp.
3. Tubo capillare.
4. Un rivelatore solo, dal catodo.



Campione
introdotta
sempre
all'estremità
anodica.

FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

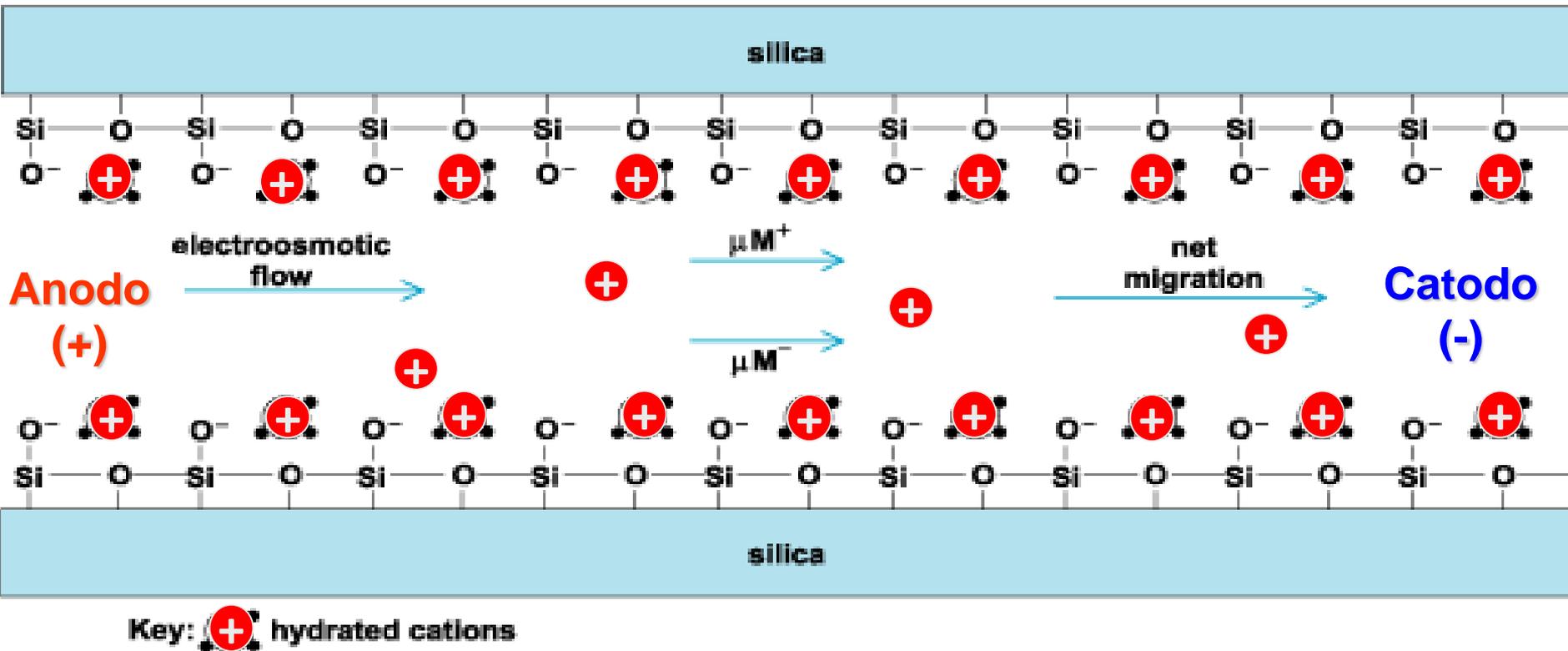
Movimento di fluido in un capillare immerso in un campo elettrico agevolato dall'applicazione di alto voltaggio.



I gruppi silanolic (-) della parete del capillare attirano uno strato di **controioni (+)** del tampone creando un **doppio strato** diffuso.

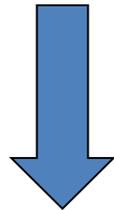
FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

All'applicazione di tensione, le cariche positive del doppio strato **migrano in direzione del catodo** trasportando molecole d'acqua.

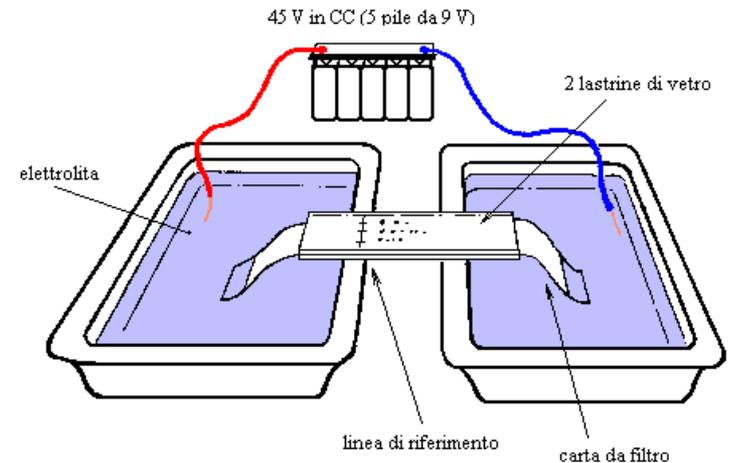


FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF)

Diffusione convettive
In soluzione libera
Correnti semplice



Carta,
Acetato di cellulosa,
Silice,
Allumina
Agar



L'uso di un tampone neutro o basico, rende il EOF più forte del campo elettrico così da **trascinare tutte le molecole (e ovviamente gli ioni) verso il catodo (-)**.

MODIFICAZIONI DEL FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO

Tensioattivi

pH

Temperatura

EOF

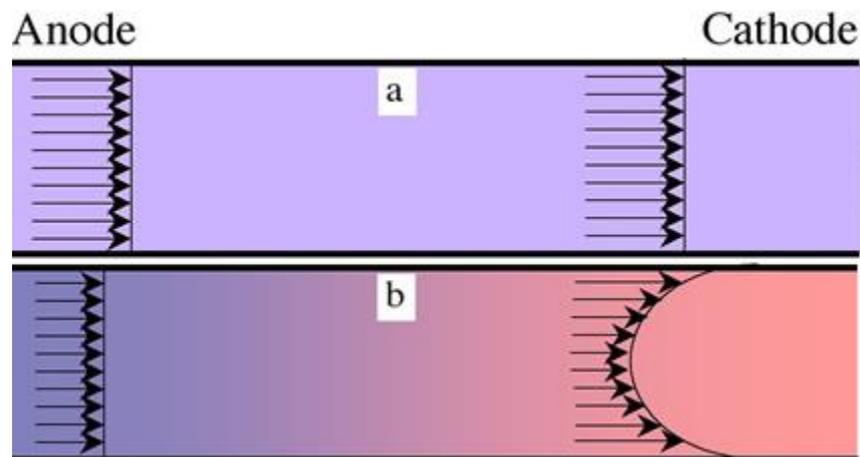
Forza Ionica

Campo elettrico

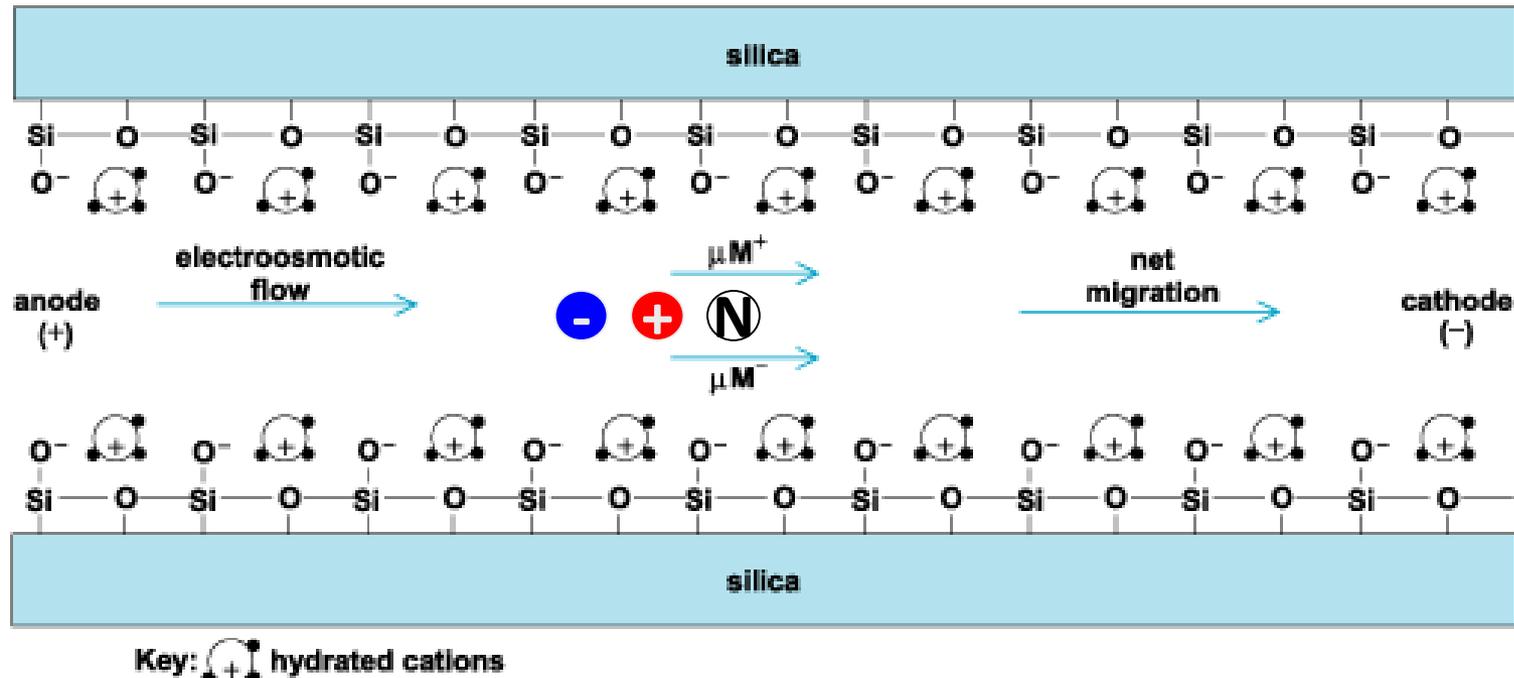
EOF

Vs

Flusso laminare



Come migrano dunque gli analiti?



ELETTROFORESI SU MICROCHIP

Miniaturizzazione dei sistemi elettroforetici capillari.

Velocità di analisi elevate

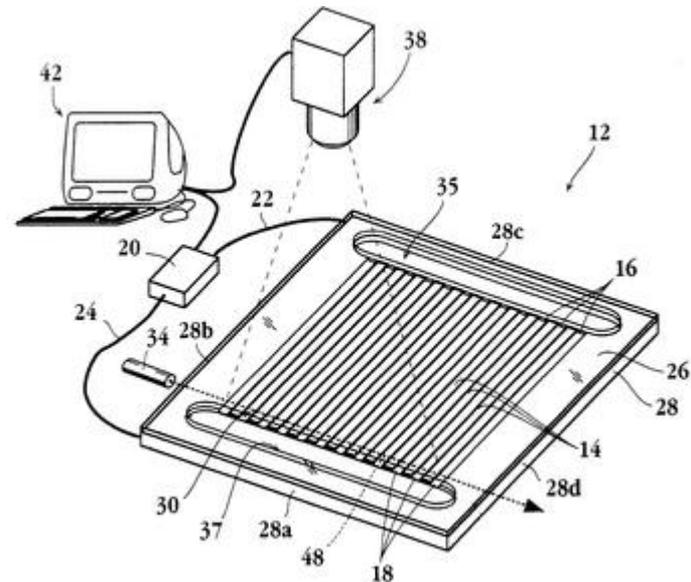
Basse ddp

Riduzione dei volumi di campione da utilizzare

Elevatissima sensibilità

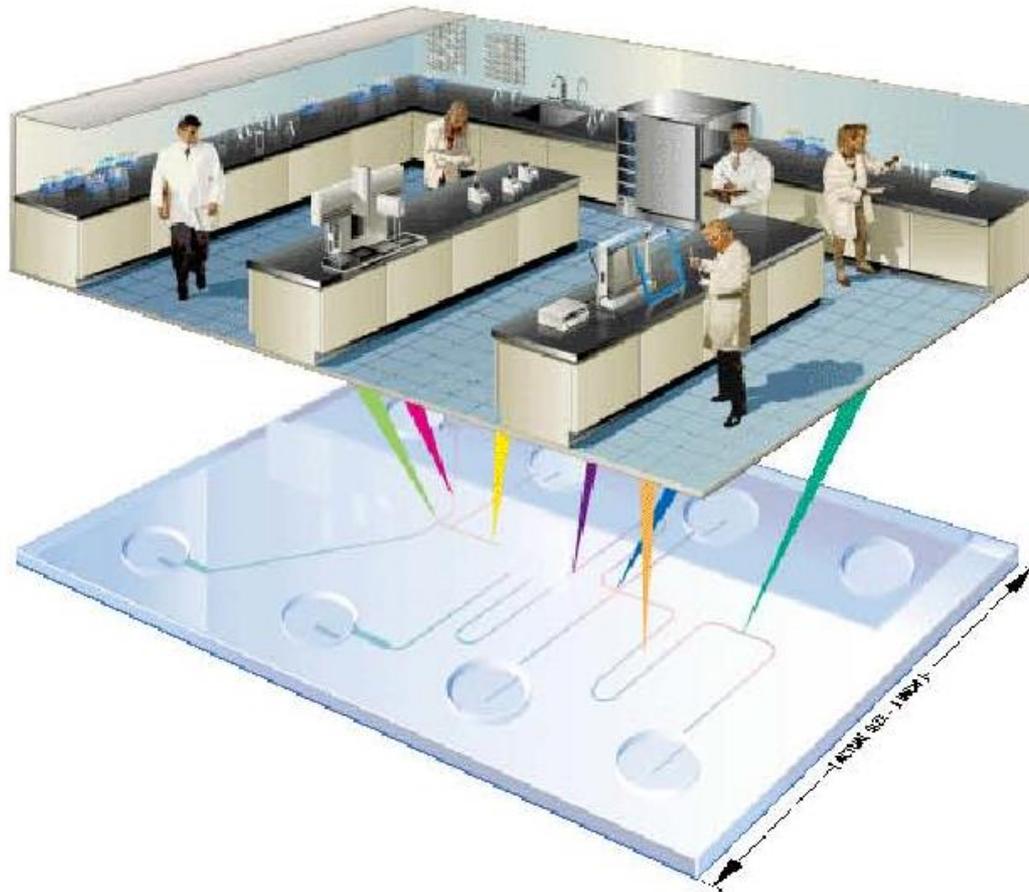


$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$

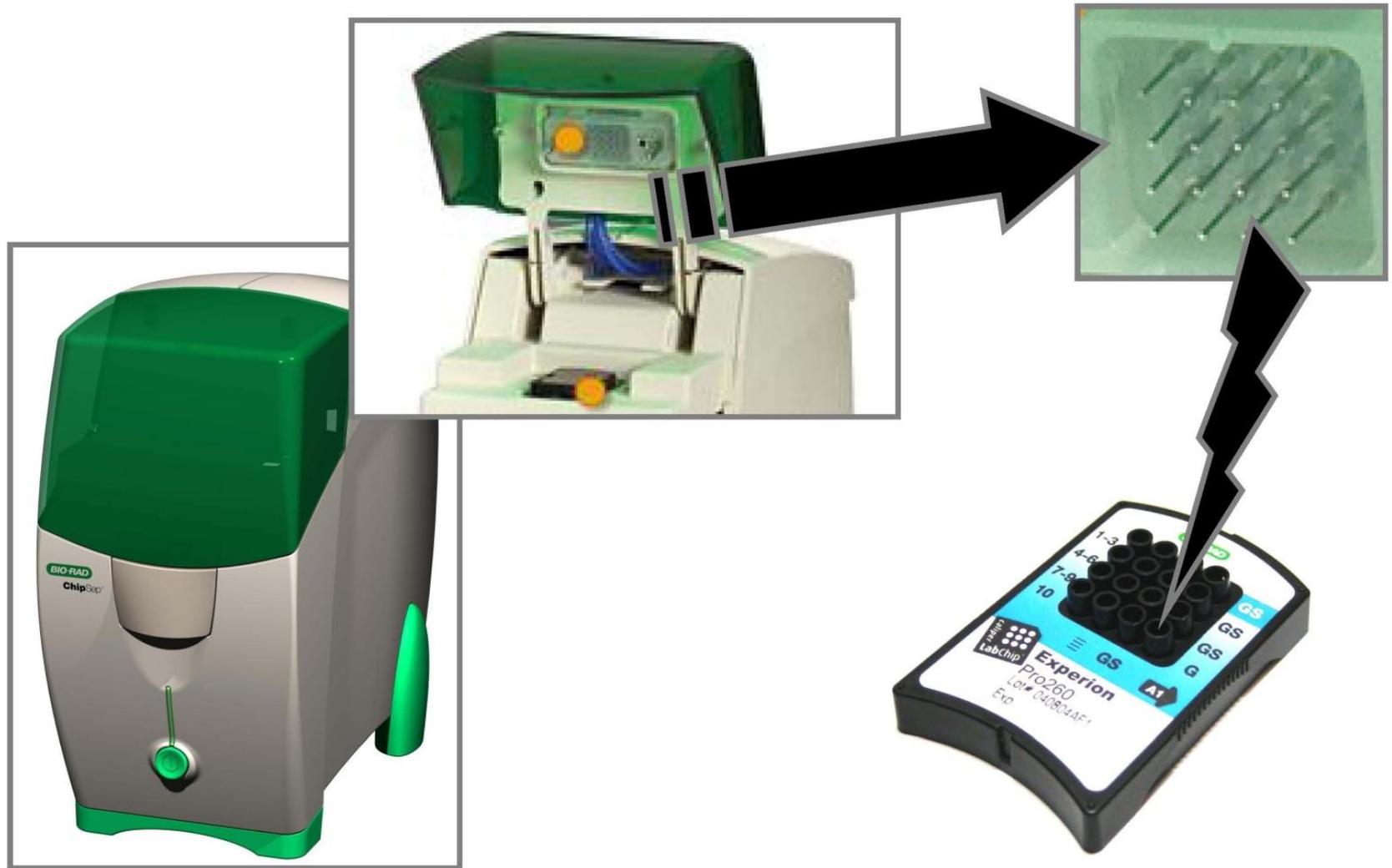


LAB ON A CHIP

Experion Automate Electrophoresis System



EXPERION



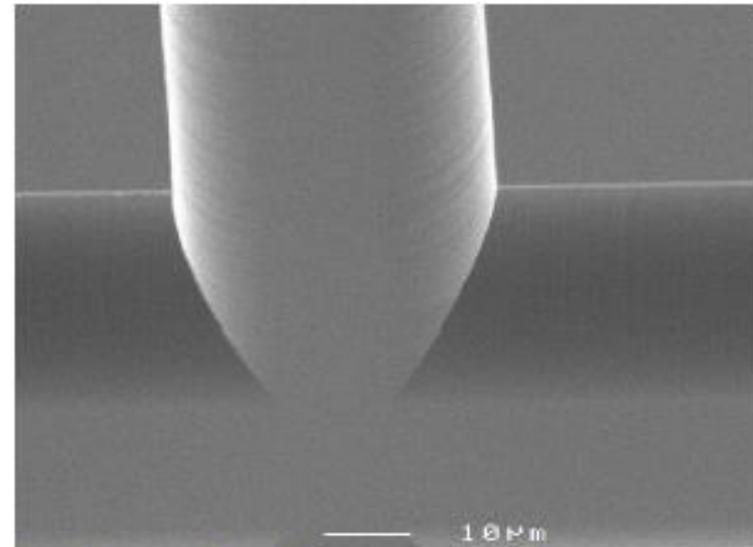
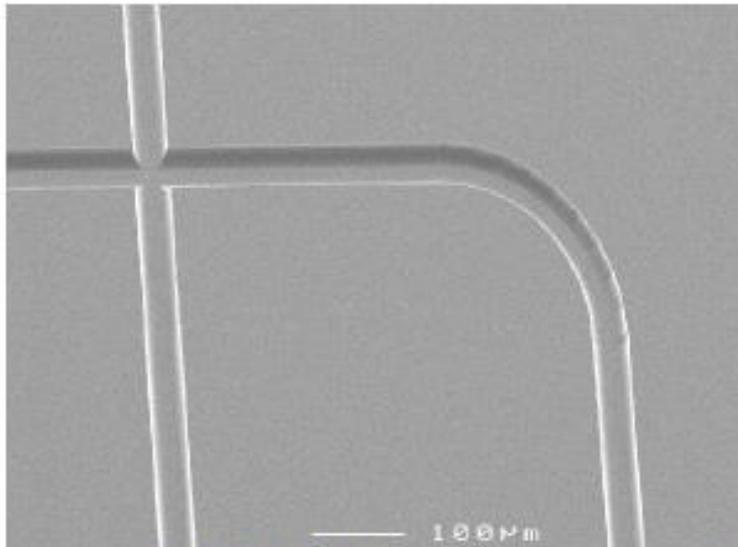
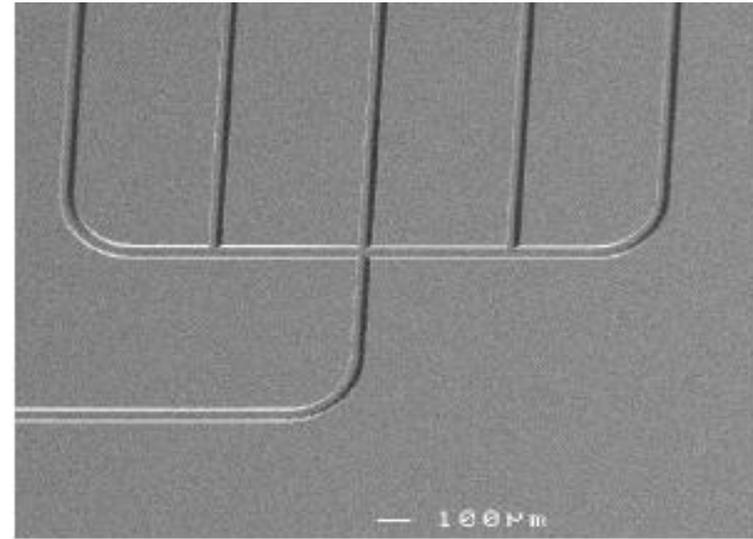
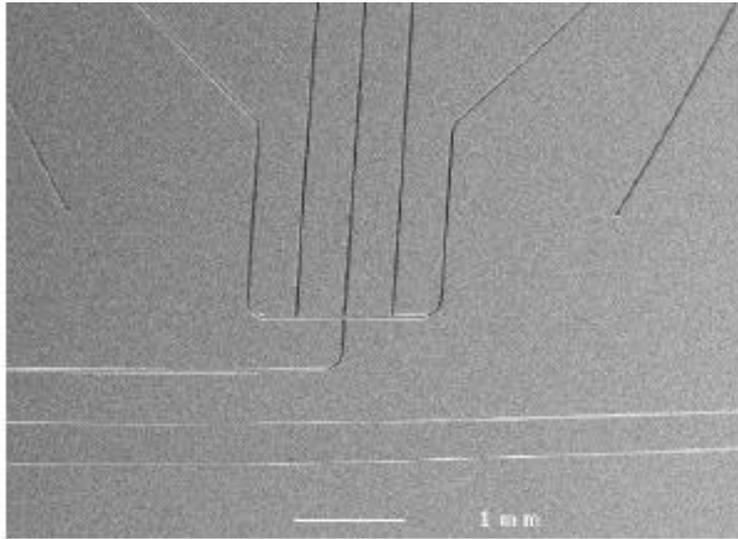
Chip Experion

Chip di **vetro** all'interno di un supporto di plastica

La plastica crea i **pozzetti** in cui caricare i campioni/reagenti

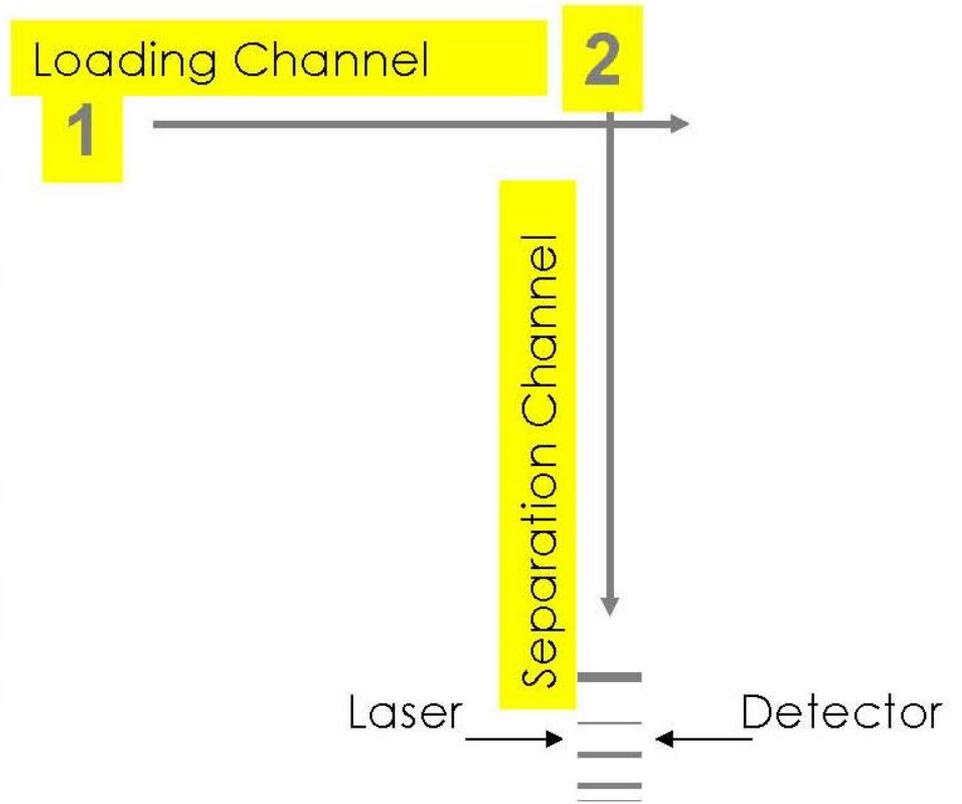
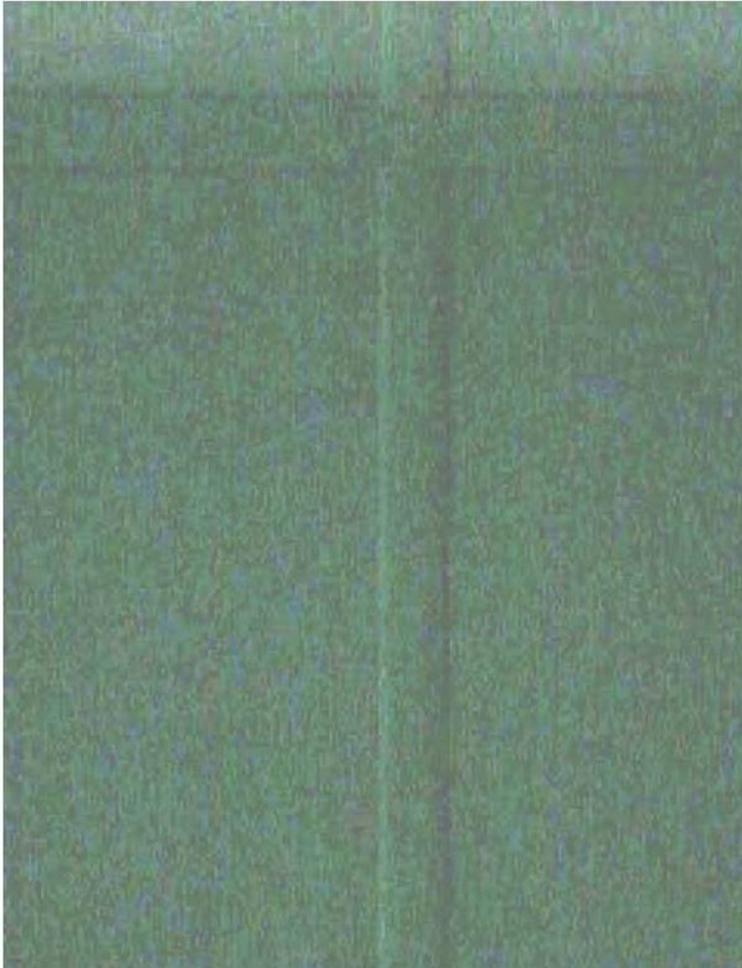


Zoom su un Chip Experion

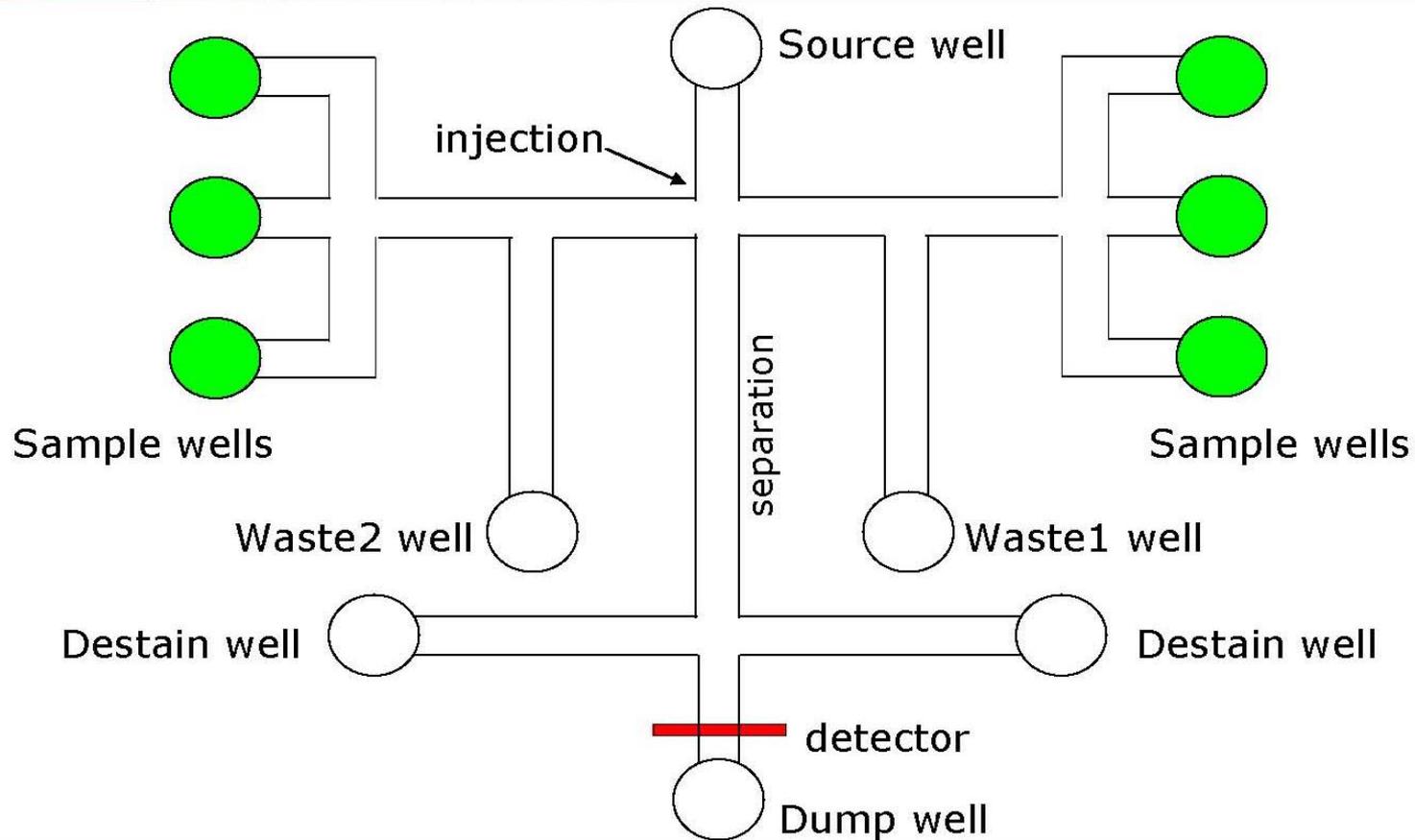


SEM images of etched channels

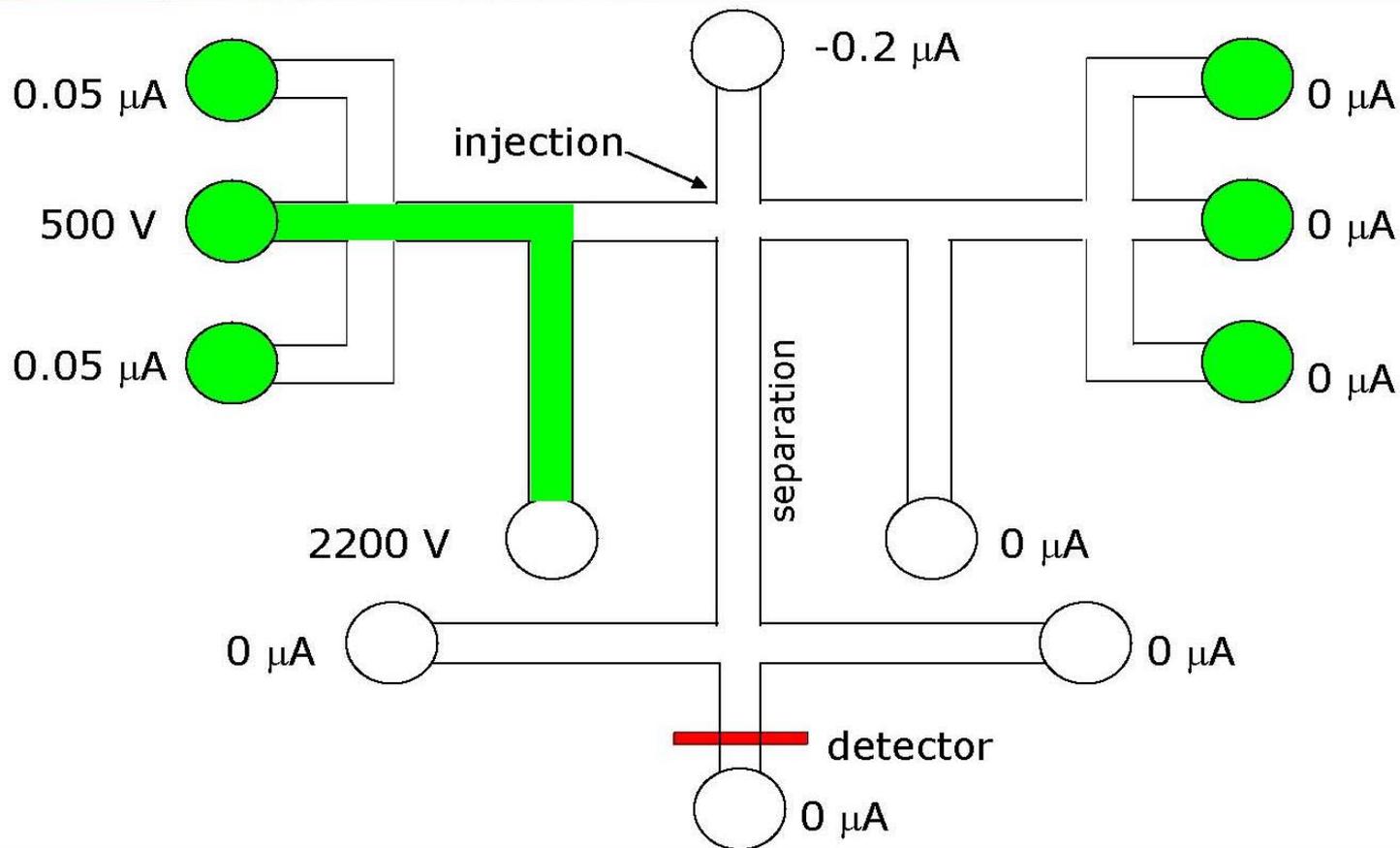
Chip Experion



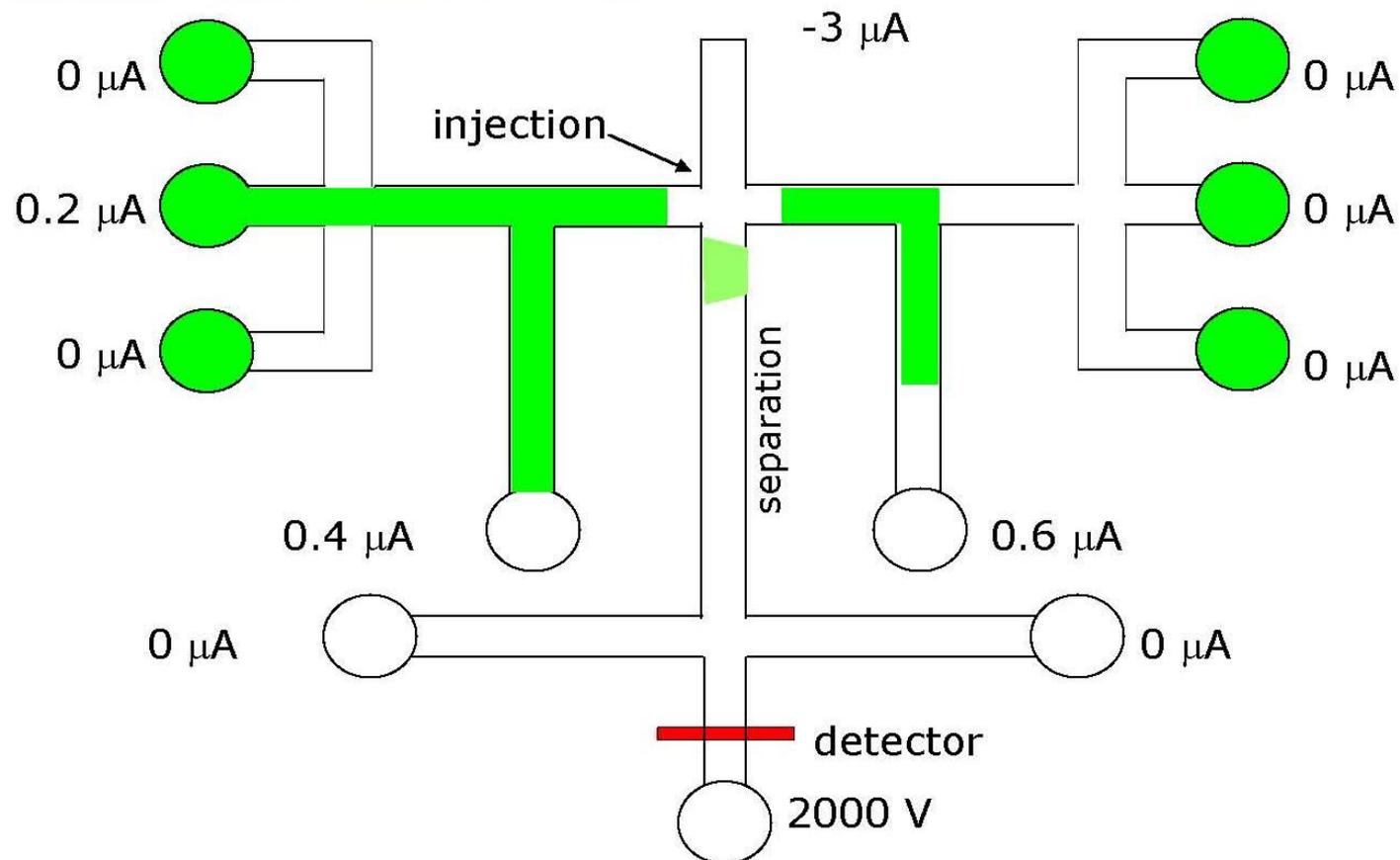
Movimento dei campioni



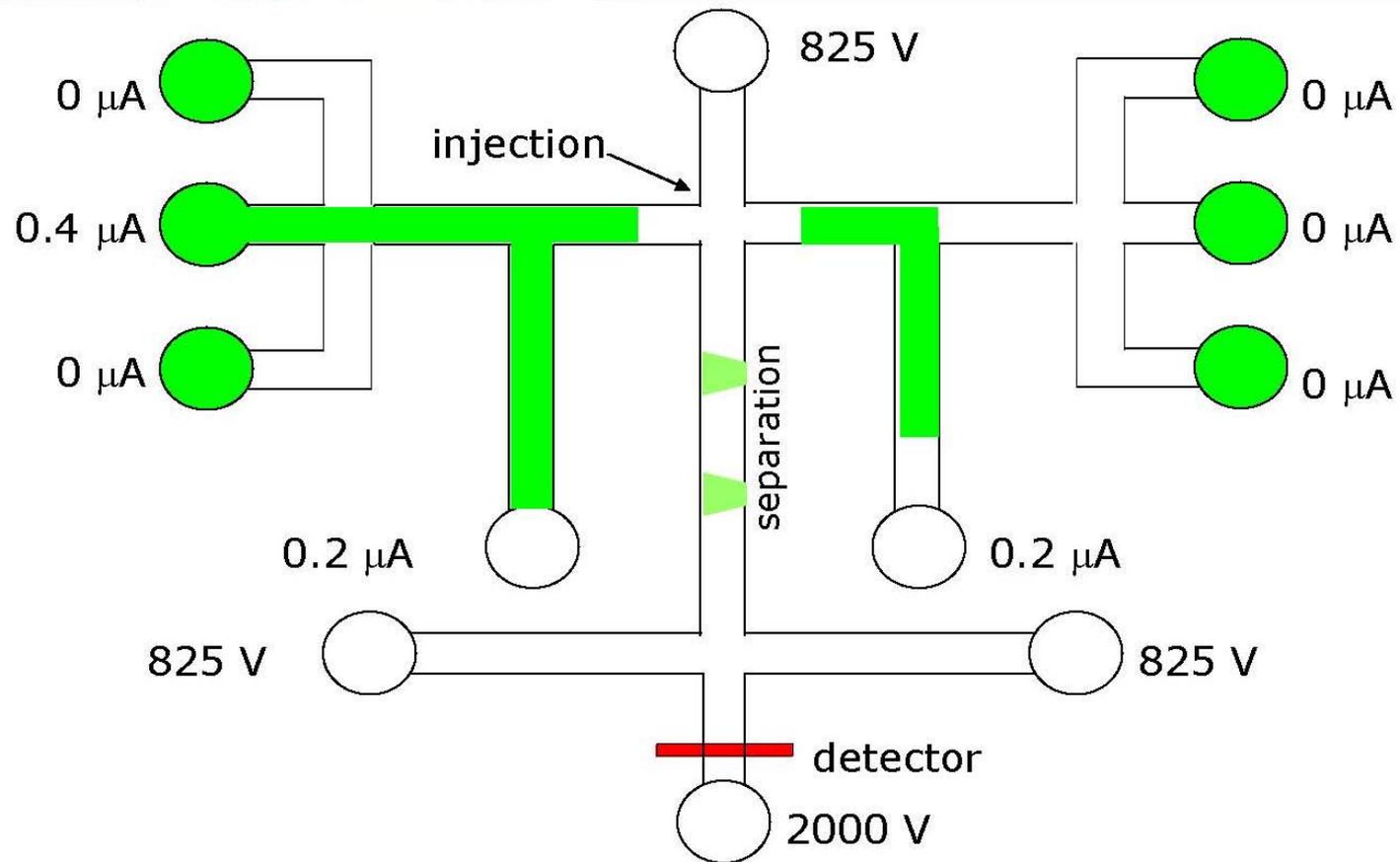
Movimento dei campioni



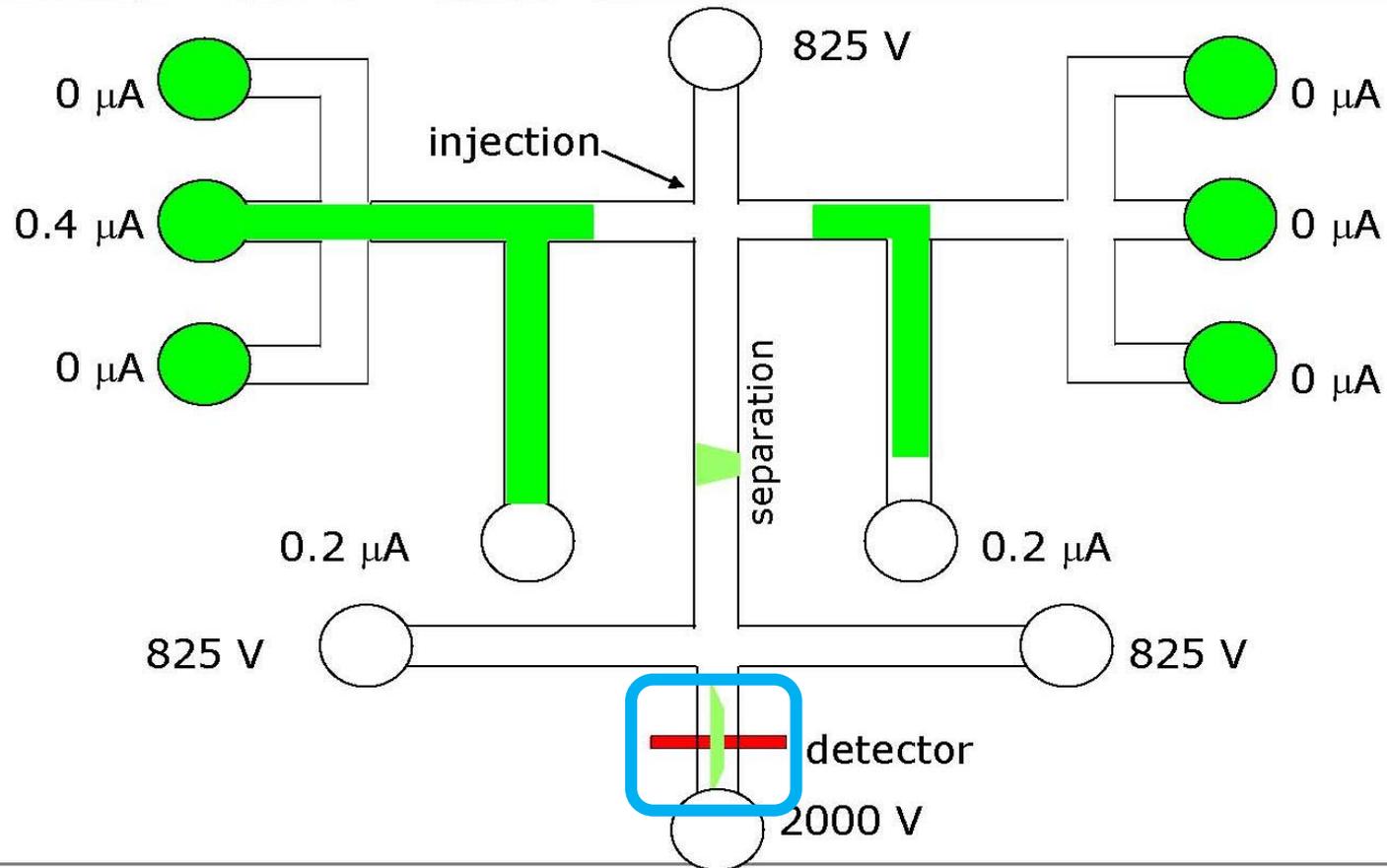
Movimento dei campioni



Movimento dei campioni

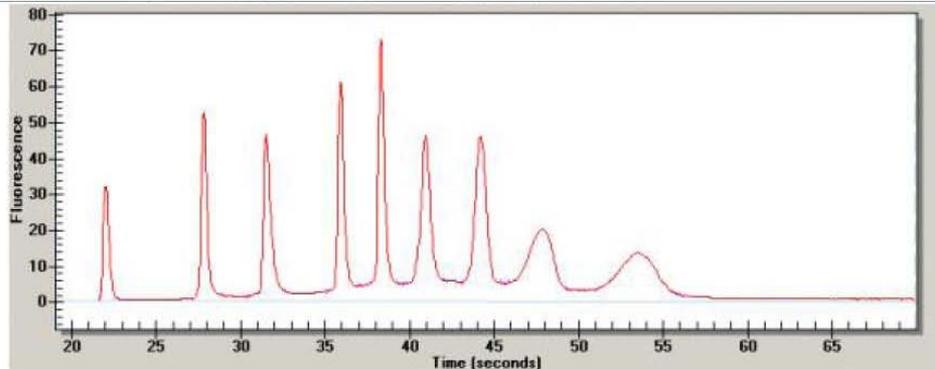


Movimento dei campioni



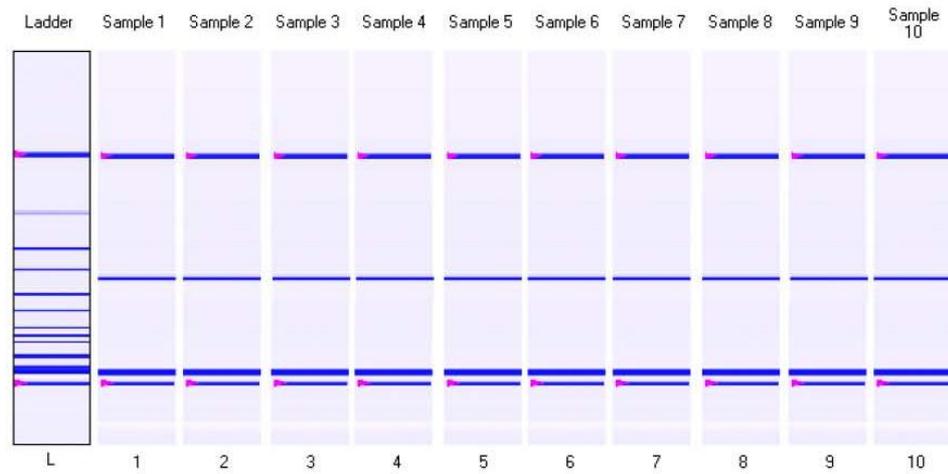
Risultato di una analisi

FLUORESCENZA

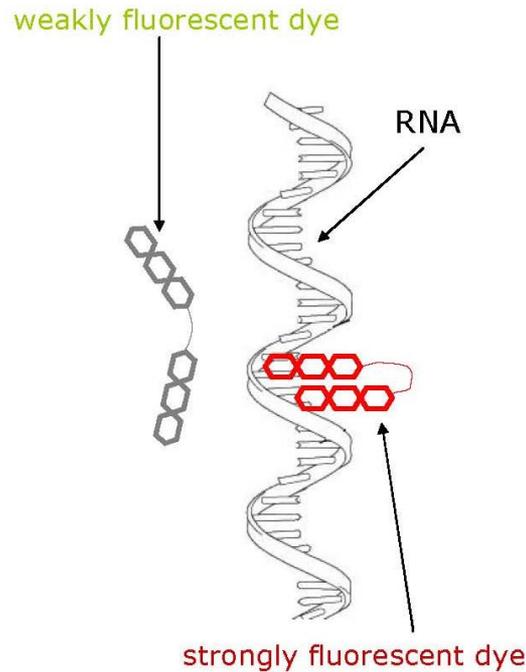


Elettroferogramma

Visualizzazione
a gel (virtuale)



- RNA Ladder: 8 Ladder Fragments
Quantitation and Sizing
- Loading Buffer: Lower Marker
Sample Alignment to Ladder
- Sensitivity Enhancer:
Only in HighSens Kit
- Gel:
Sieving Polymer Matrix
- Stain:
Dye for Sample Detection



Kit per analisi su RNA

Kit per analisi su proteine

- Protein Ladder: 8 ladder fragments &
Upper Marker (260kD)
Molecular Weight Sizing
- Sample Buffer: Lower and
Upper Marker
LM & UM – Sample Alignment
UM – Quantitation
- Gel:
Sieving Polymer Matrix
- Stain:
Dye for Sample Detection

