

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA  
SOSTENIBILITÀ**



**BIOCHIMICA APPLICATA  
(6 CFU)**

**LEZIONE 6**

**Prof. Paola Di Donato**

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie**

**Stanza 520, V piano lato NORD**

**Tel. 081 547 6625**

**E-mail: [paola.didonato@uniparthenope.it](mailto:paola.didonato@uniparthenope.it)**

# Dosaggi con Bioluminescenza e Chemiluminescenza

# Metodi saggio

- Spettrofotometrico  $10^{-5} - 10^{-6} M$
- Spettrofluorimetrico  $10^{-8} M$
- Bioluminescenza  $10^{-6} - 10^{-12} M$
- Chemiluminescenza  $10^{-8} - 10^{-12} M$

# Luminometria

Tecnica usata per misurare la chemiluminescenza.

La **chemiluminescenza** è il fenomeno per il quale una reazione chimica è accompagnata dall'emissione di luce: due specie chimiche reagiscono e formano un prodotto eccitato, cioè con dell'energia in eccesso.

Questo prodotto, generalmente una molecola o un composto, rilascia l'energia in più sotto forma di luce.

Nel caso in cui tali reazioni avvengano in organismi viventi si parla di **bioluminescenza**.

# Luminometria

**Bioluminescenza:** processo biochimico, ovvero emissione di luce in seguito ad una reazione catalizzata da un enzima (**fotoproteine**). La lunghezza d'onda emessa dipende dalla fonte enzimatica e varia da 560 nm (giallo verde) a 620 nm (rosso).

**Chemoluminescenza:** processo chimico, ovvero emissione di luce come risultato di una reazione chimica (ad es. luminolo reagisce con ossigeno e produce chemoluminescenza).

# Bioluminescenza

- Processo biochimico, ovvero emissione di luce in seguito ad una reazione catalizzata da un enzima (**fotoproteine**).
- La lunghezza d'onda emessa dipende dalla fonte enzimatica e varia da 560 nm (giallo verde) a 620 nm (rosso).
- Si presenta in vari tipi di organismo: insetti, organismi marini, batteri o protozoi, et cetera



Una lucciola  
(*Photinus pyralis*)



Una medusa



Un batterio  
(*Vibrio fischeri*)

# Le FOTOPROTEINE: le LUCIFERASI

Gruppo di **deidrogenasi** che hanno affinità diverse per le diverse **luciferine**:

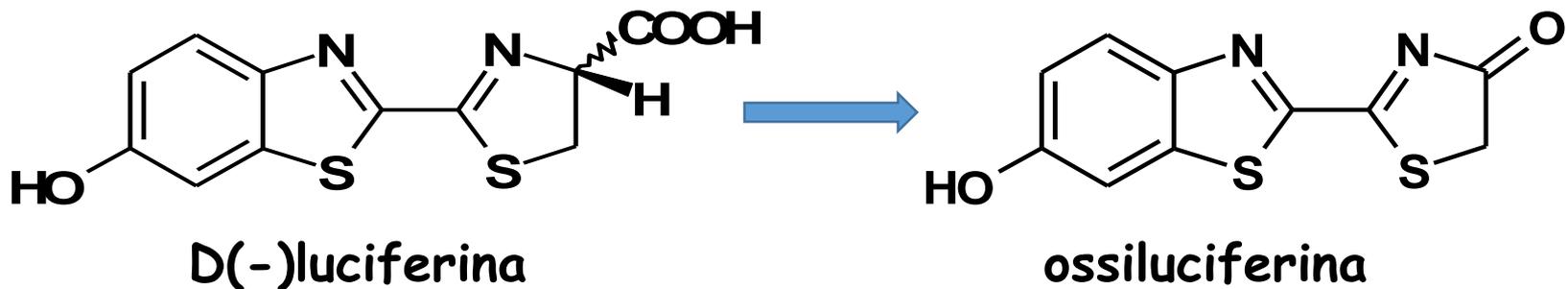
- EC 1.13.12.5: Renilla-luciferina 2-monoossigenasi; Renilla-type luciferasi; Aequorina; Obelina; Luciferase (Renilla luciferina)
- EC 1.13.12.6: Cipridina-luciferina 2-monoossigenasi; Cipridina-type luciferasi; Luciferasi (Cipridina luciferina); Cipridina luciferasi
- EC 1.13.12.7: Fotinus-luciferina 4-monoossigenasi (ATP-asi); Luciferasi delle lucciole; *Photinus pyralis* luciferasi
- EC 1.13.12.8: Watasenia-luciferina 2-monoossigenasi; Watasenia-type luciferasi
- EC 1.13.12.13: Oploforus-luciferin 2-monoossigenasi; Oploforus luciferasi
- EC 1.14.99.21: Latia-luciferina monoossigenasi (demetilante); Luciferasi (Latia luciferina)

# LE LUCIFERINE

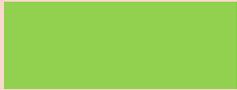
Molecole responsabili dell'emissione di luce che si sviluppa in seguito alla loro ossidazione da parte delle relative fotoproteine, le luciferasi.

Gruppi prostetici delle fotoproteine: molecole di diversa natura chimica a seconda dell'organismo in cui sono presenti, vengono spesso tutte indicate con il termine *luciferina*

Esempio: luciferina da lucciola



# LE LUCIFERINE

Luciferina	Luminescenza massima	Colore approssimativo	
Luciferina delle lucciole	560nm (pH = 7.1)	Verde	
	615nm (pH=5.4)	Arancio	
Luciferina batterica	490nm	Turchese	

# LUMINOMETRIA: APPLICAZIONI

- Determinazione di substrati
- Determinazione di enzimi
- Determinazione di biomassa microbica (ATP)
  - ambiente
  - microbiologia medica ed industriale
- Sistema di marcatura per immunorivelazione

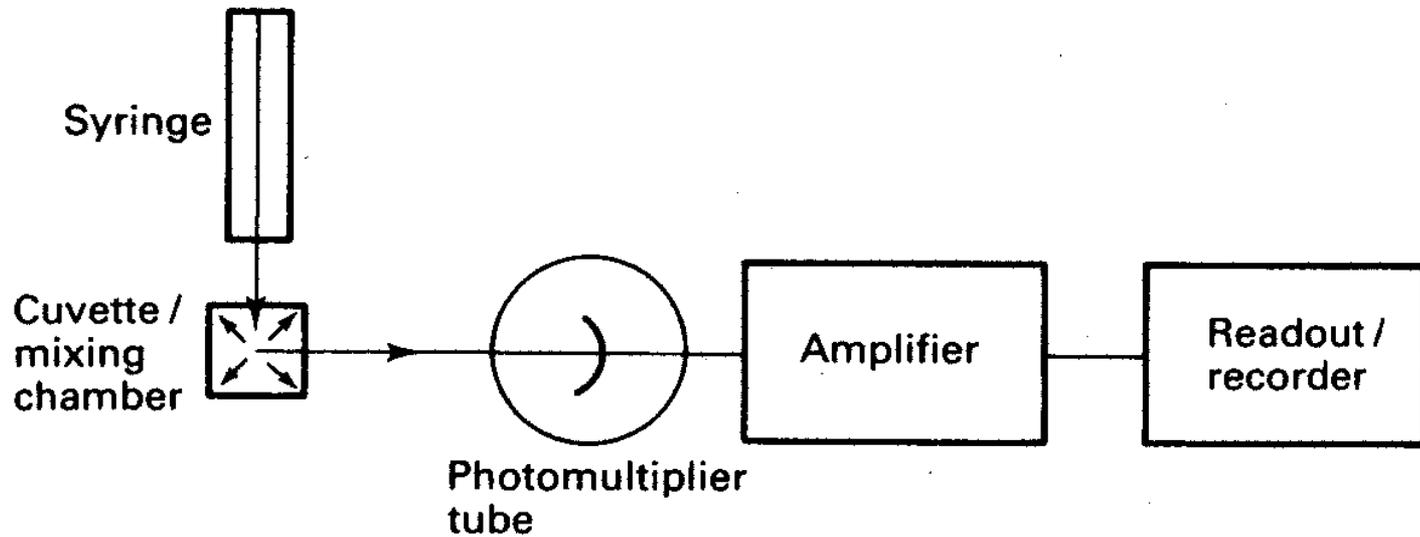
# LUMINOMETRIA: APPLICAZIONI

- Dosaggi enzimatici
- Dosaggi di substrati
- Determinazione di biomassa microbica (ATP)
  - ambiente
  - microbiologia medica ed industriale
- Sistema di marcatura per immunorivelazione

# Vantaggi delle misure in luminescenza

- Sensibilità (bassi limiti di rivelabilità)
- Apparecchiature più semplici di un fluorimetro. Non c'è necessità di un monocromatore.
- Bisogna amplificare il segnale prima di registrarlo, viene infatti raccolto da un fotomoltiplicatore collegato ad un amplificatore di corrente.
- Controllare la T.
- Procedure analitiche semplici
- Possibilità di automazione (misure in serie)

# Componenti di un luminometro



# Sistemi di uso comune in luminometria

- Luciferasi di lucciola
- ATP
- Luciferasi batterica
- FMNH, NADH
- Luminolo/perossidasi
- $H_2O_2$

# Dosaggi con Bioluminescenza

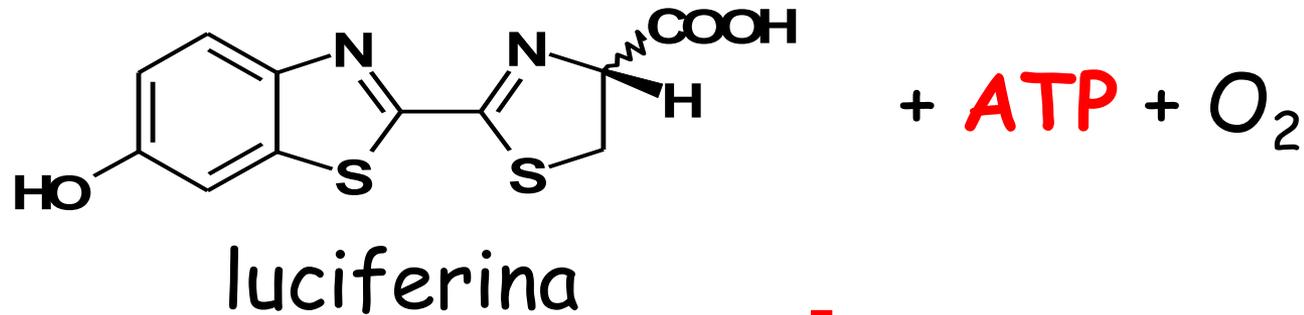
- Luciferasi di lucciola



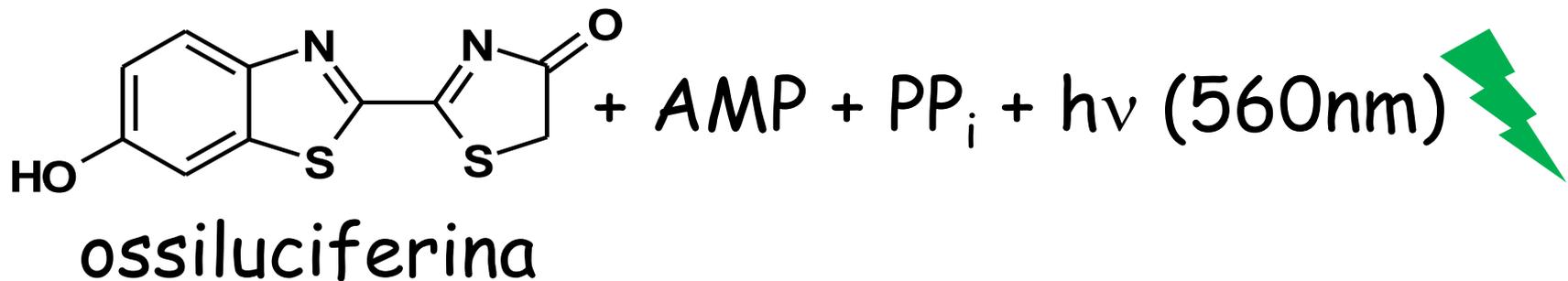
- Luciferasi batterica



# La luciferasi da lucciola



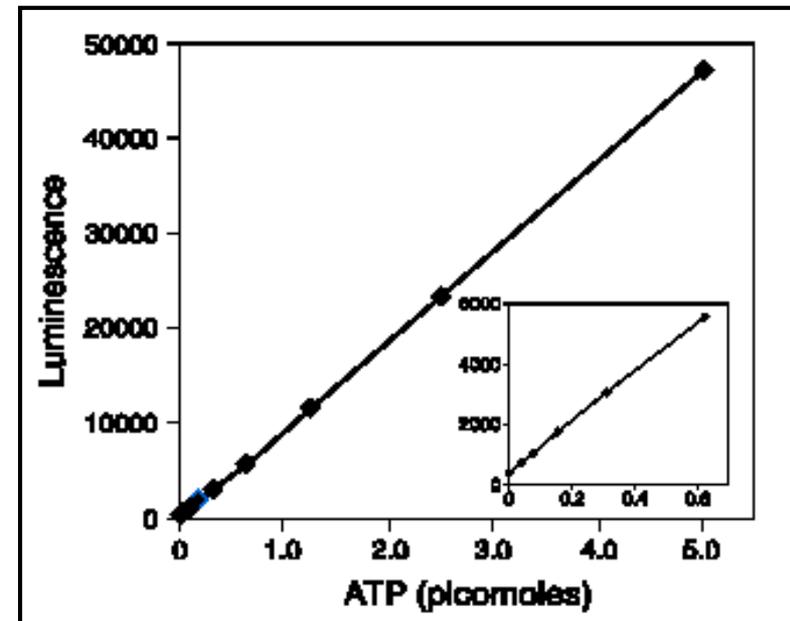
*luciferasi*



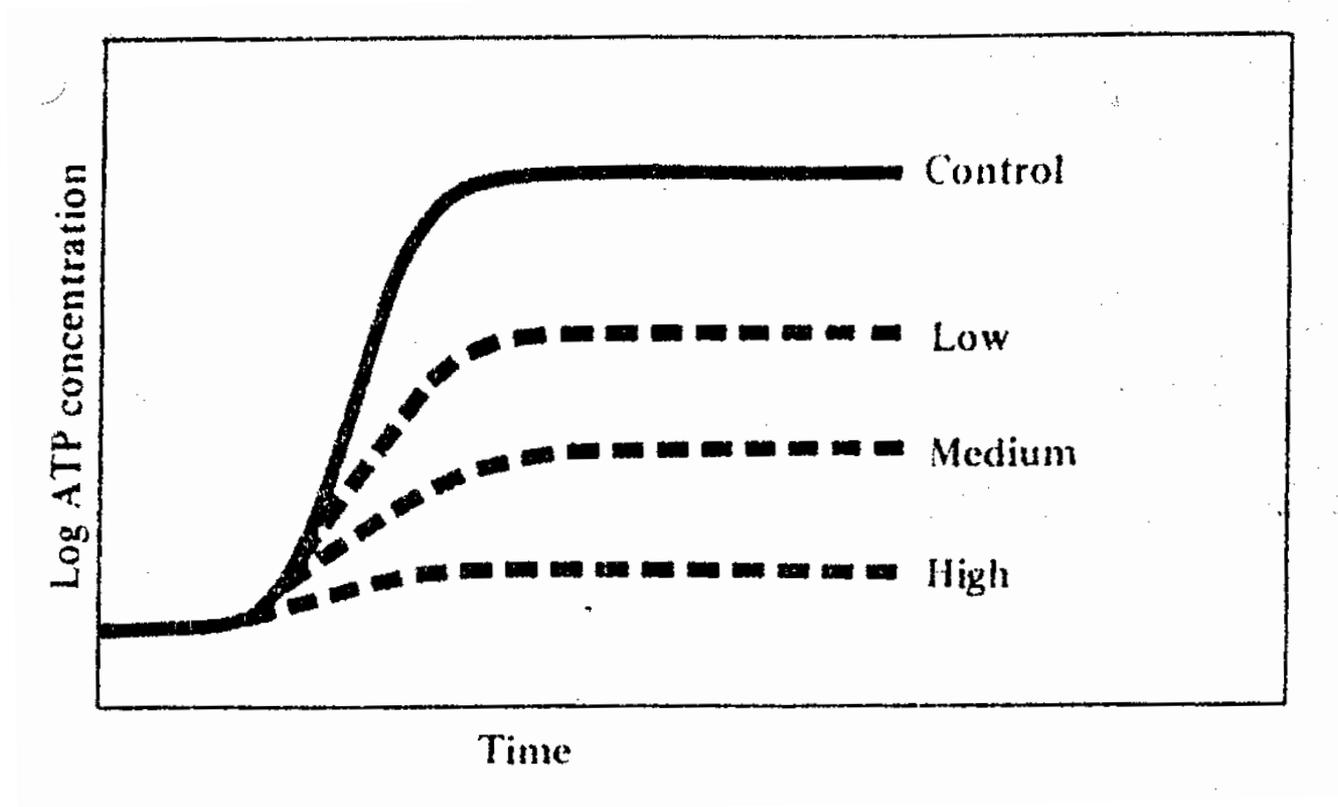
# La luciferasi da lucciola



- La luciferasi da lucciola è ATP dipendente pertanto può essere usata come bioindicatore di "energia"
- Saggio molto sensibile: 0.1 pmol di ATP
- Utile per identificare contaminazione batterica anche in tracce
- Metodo per lo studio delle proprietà antibiotiche delle sostanze
- Metodo per lo studio delle proprietà antitumorali: consente di distinguere gli effetti citostatici e citotossici



# Effetto di antibiotici



La concentrazione di ATP è correlata alla crescita batterica

# La luciferasi batterica



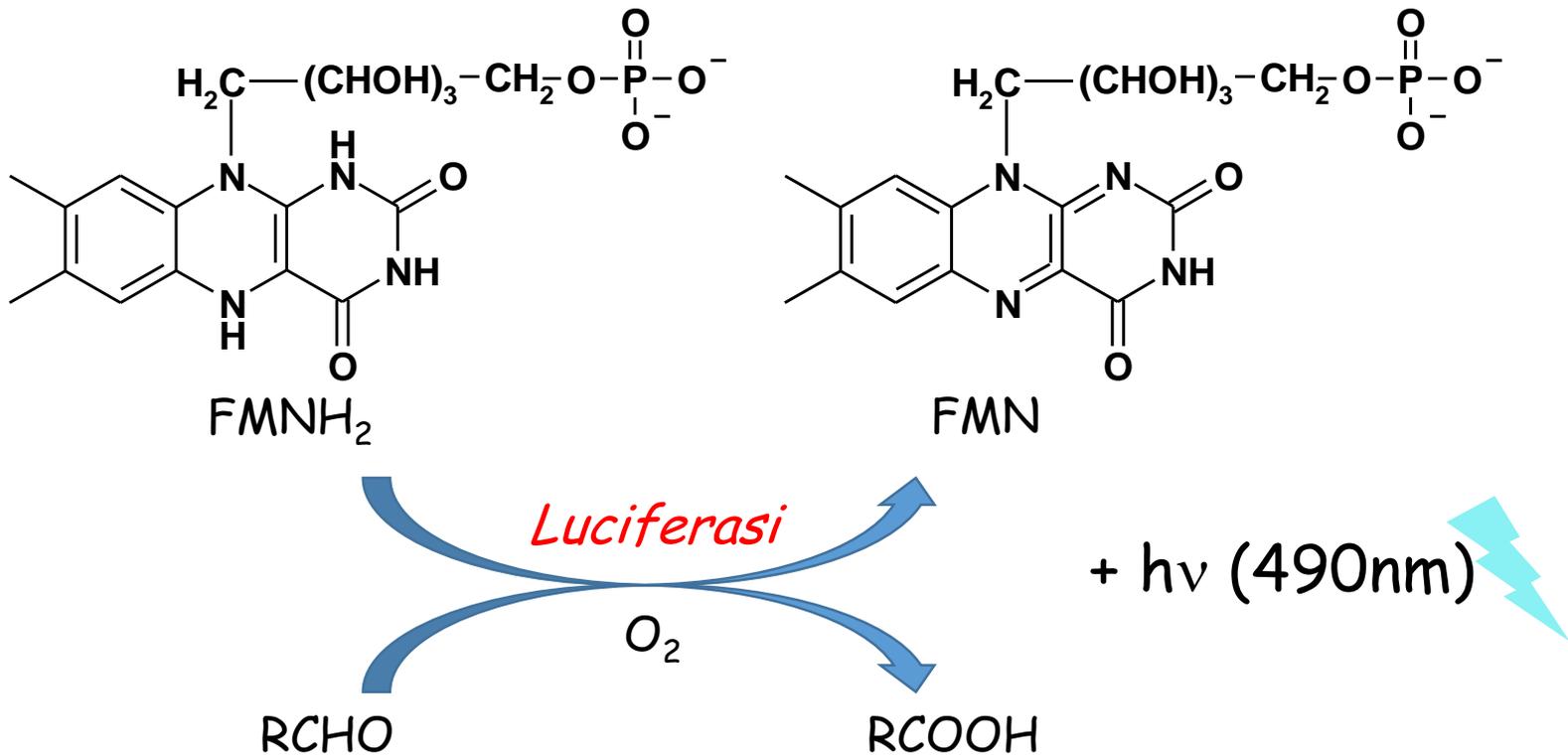
- Prodotta dal batterio Gram-negativo di origine marina *Vibrio fischeri*
- *V. fischeri* è un simbiote del calamaro *Euprymna scolopes* ma si trova anche libero nelle acque marine.
- Quando si trova nell'organo luminoso del calamaro *V. fischeri* emette luce, mentre non ne emette quando vive libero



# La luciferasi batterica



Luciferina: riboflavina monofosfato ridotta (FMNH<sub>2</sub>) che si ossida in associazione ad aldeidi a lunga catena e ossigeno



# La luciferasi batterica



- La reazione si può associare ad una ossidoreduttasi, consentendo di dosare NADH o reazioni NADH-dipendenti:



- L'inibizione della reazione può essere usata per evidenziare e dosare la presenza di sostanze tossiche: la capacità di emettere luce è inversamente proporzionale al grado di tossicità del campione analizzato

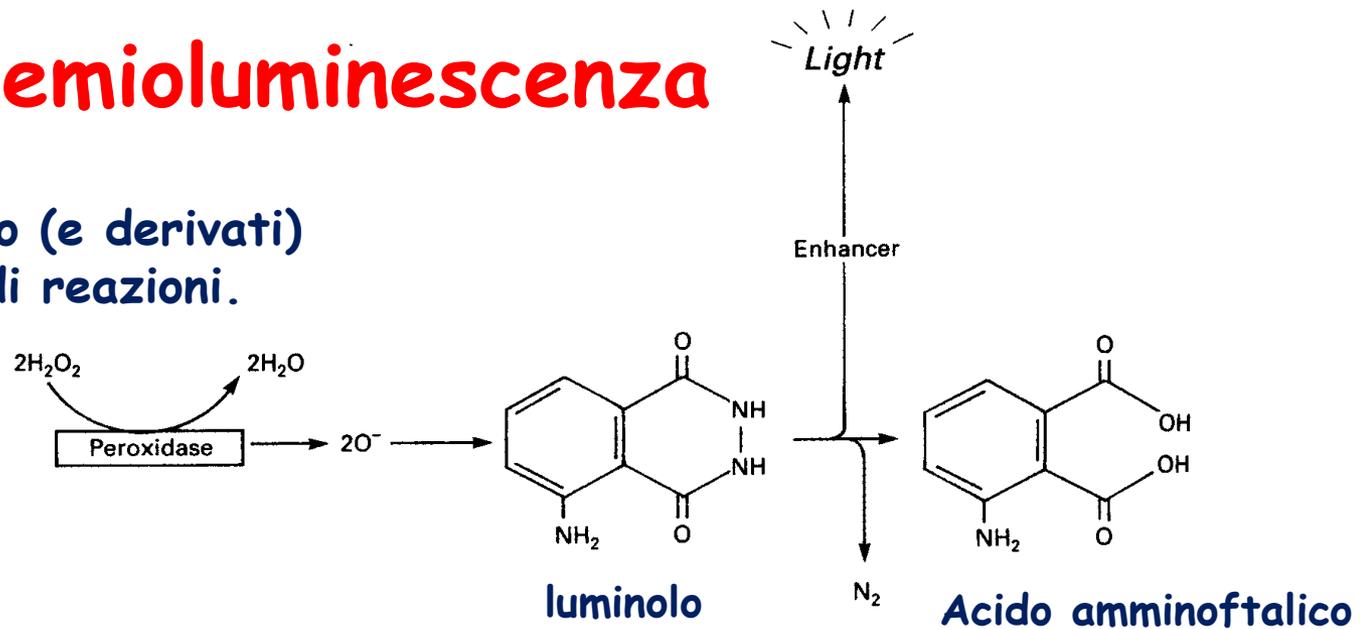
# Luminometria

**Bioluminescenza:** processo biochimico, ovvero emissione di luce in seguito ad una reazione catalizzata da un enzima (**fotoproteine**). La lunghezza d'onda emessa dipende dalla fonte enzimatica e varia da 560 nm (giallo verde) a 620 nm (rosso).

**Chemiluminescenza:** processo chimico, ovvero emissione di luce come risultato di una reazione chimica (ad es. luminolo reagisce con ossigeno e produce chemiluminescenza).

# Chemiluminescenza

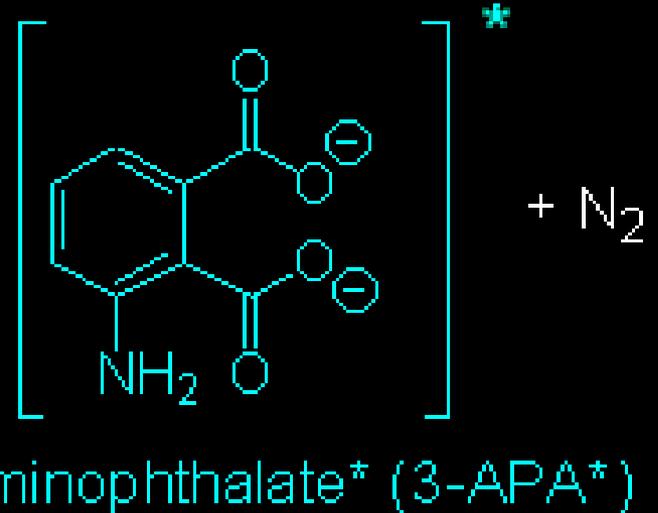
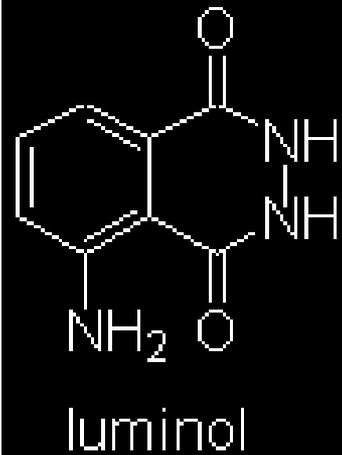
Utilizzo del luminolo (e derivati) come substrati di reazioni.



Il luminolo in associazione all'enzima microperossidasi può costituire la base del dosaggio di molti enzimi tra cui l'acetilcolinesterasi (ACE), coinvolta nella trasmissione sinaptica:



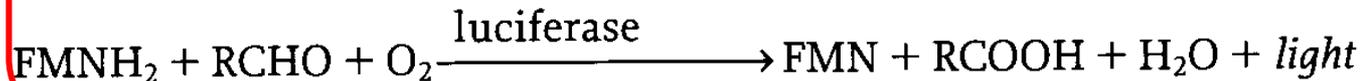
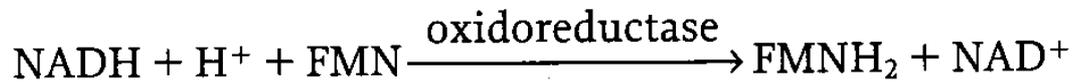
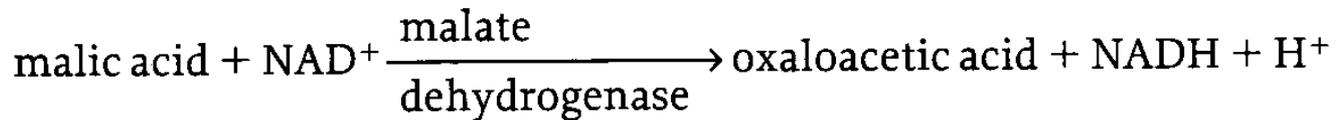
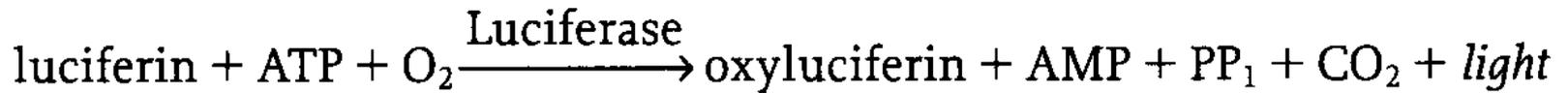
# *Detectives* biochimici: il test del luminolo



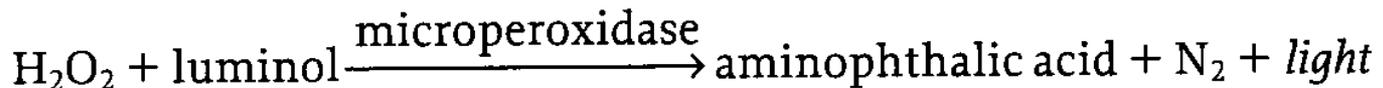
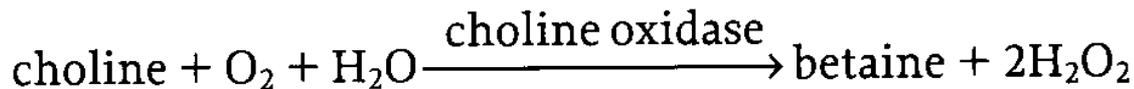
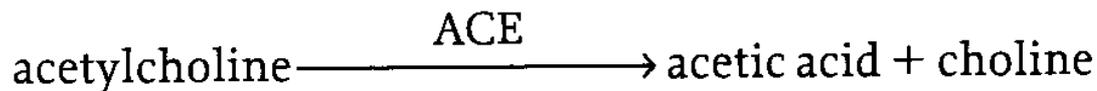
3-APA + LIGHT

La reazione è catalizzata dal ferro presente nell'emoglobina  
e/o dalla perossidasi

# Dosaggi con Bioluminescenza



## Chemiluminescenza

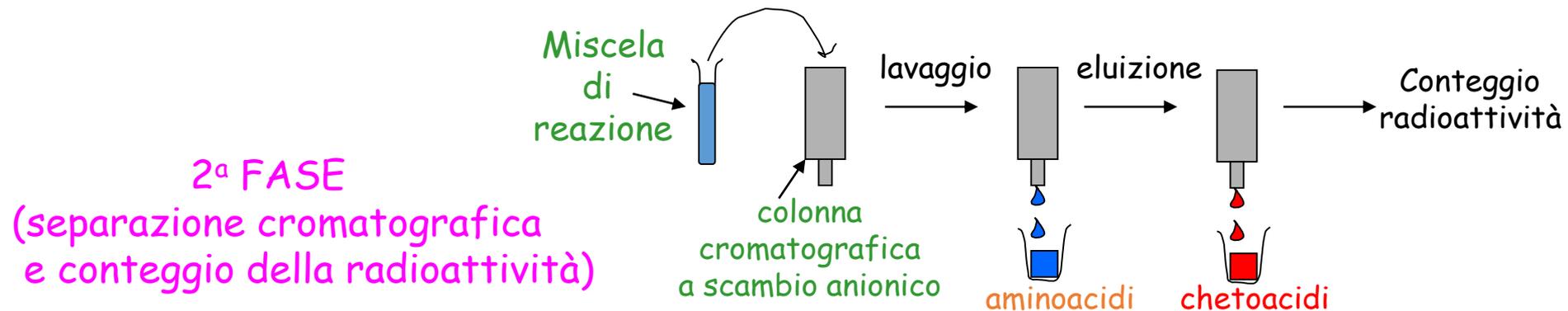
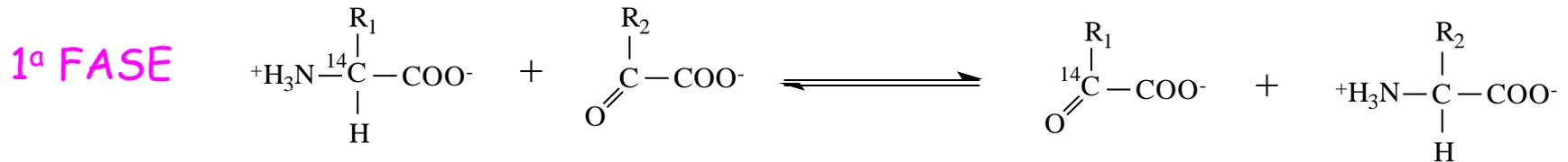


# Metodi Radioisotopici

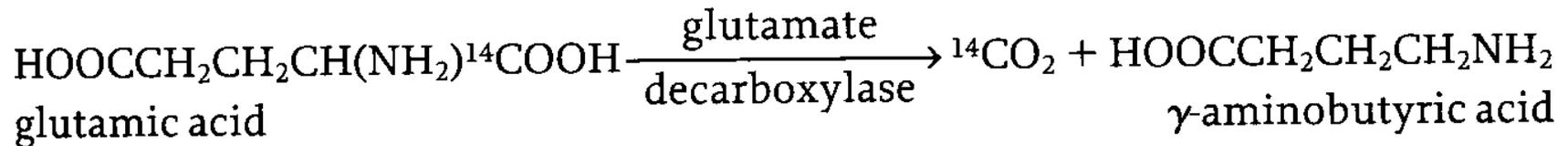
# Metodi radioisotopici

- Si basano sull'utilizzo di forme *radiomarcate* di un substrato
- Sono metodi molto sensibili ma limitati alle applicazioni in cui è possibile separare facilmente i substrati dai prodotti

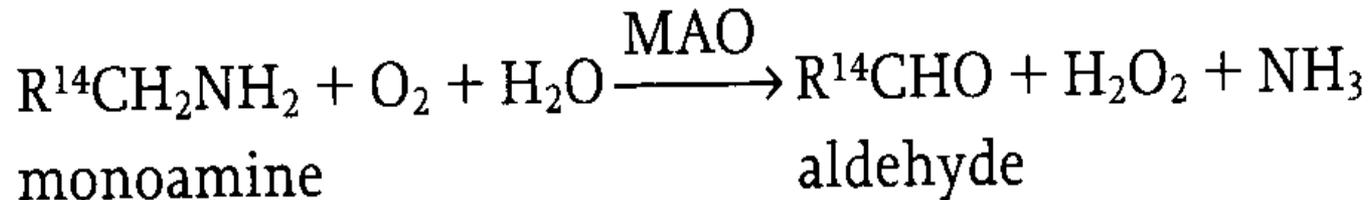
*Esempio:* misura dell'attività di una amminotrasferasi



# DOSAGGI RADIOISOTOPICI

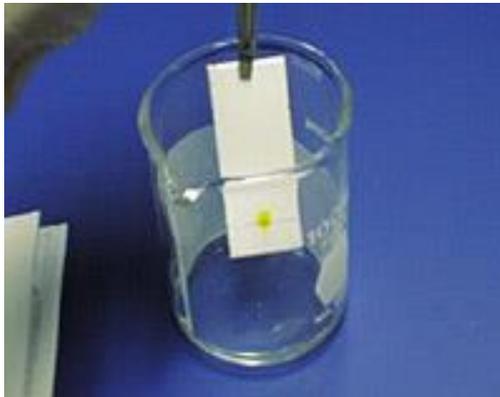


# DOSAGGI DI SUBSTRATO



# Cromatografia su strato sottile

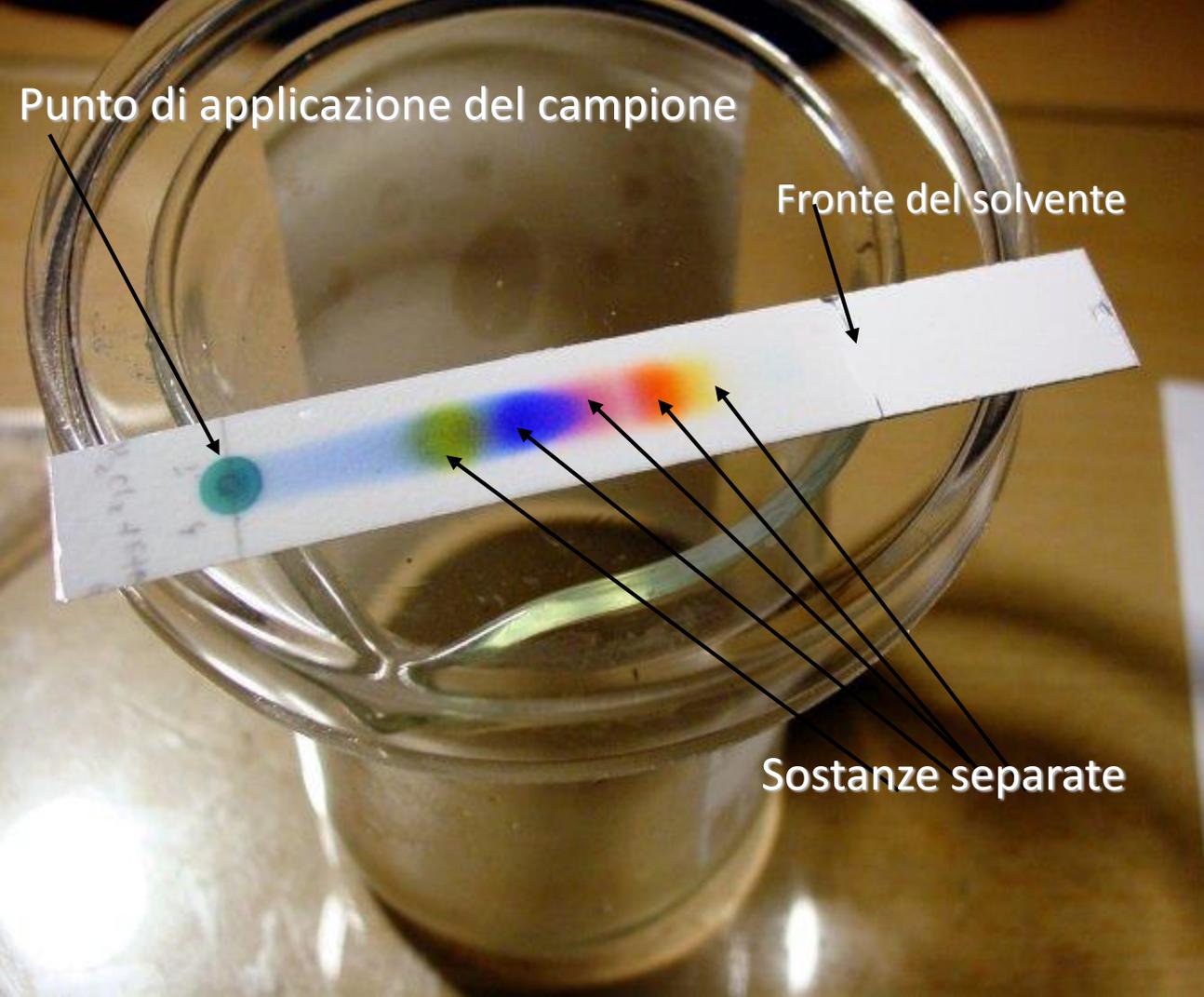
- Su strato sottile si possono eseguire cromatografie di adsorbimento, di ripartizione, ad esclusione.
- La tecnica è semplice, veloce e permette l'analisi di più campioni contemporaneamente.
- **Può essere impiegata sia a scopi analitici che preparativi.**
- È basata su un principio analogo alla cromatografia su colonna (a parità di fase stazionaria il comportamento delle sostanze è analogo).



# TLC

- La lastrina viene disposta verticalmente in un recipiente chiuso ermeticamente detto camera di eluizione (camera cromatografica), contenente dell'eluente che bagna solo la parte inferiore della lastrina (al di sotto della **linea di deposizione**).
- **La fase mobile si muove dal basso verso l'alto per capillarità.**
- Quando l'eluente raggiunge quasi l'estremità della lastrina, la si rimuove dalla camera di eluizione e la si sviluppa per evidenziare delle macchie.
- La TLC è molto utile per seguire l'andamento di una reazione, per saggiare la purezza di un composto e per identificare un prodotto noto in una miscela.
- In TLC agli analiti si associa il fattore di ritardo  $R_f$  data da:

$$R_f = \frac{\text{spostamento dell' analita}}{\text{spostamento del fronte del solvente}}$$



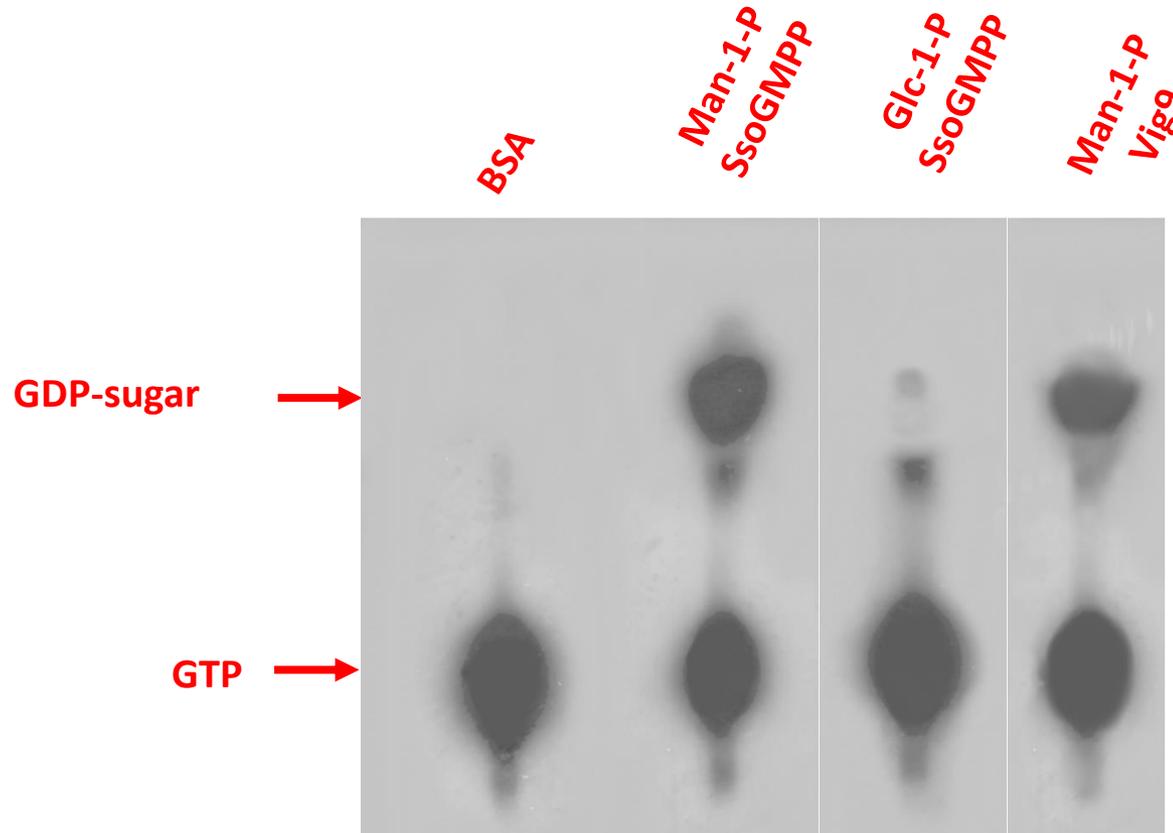
# Cromatografia su strato sottile (TLC)

**Sugar-1-P specificity assay of  
SsoGDPMannose  
Pyrophosphorylase**



**$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$**

## Sugar-1-P specificity assay of SsoGDPMannose Pyrophosphorylase



The labelled products formed in the reaction were detected by chromatography on polyetilenimine cellulose and *n*-propanol-25% ammonia (1:1 vol/vol). A: Reaction performed using bovine serum albumine on  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  and Man-1-P as a negative control reaction. B and C: GDP-Man and GDP-Glc formation. D: Reaction performed at 35°C using yeast Vig9 on  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  and Man-1-P as a positive control reaction.

# *Come si ottengono i dati cinetici*

Metodo di saggio	Sensibilità (moli/L)
Spettrofotometrico (visibile-UV, <i>substrati naturali, artificiali</i> )	$10^{-5} - 10^{-6}$
Spettrofluorimetrico ( <i>substrati naturali, sintetici</i> )	$10^{-8}$
Bioluminescenza	$10^{-8} - 10^{-13}$
Chemiluminescenza	$10^{-8} - 10^{-10}$
Radioisotopici	$10^{-8}$