

Biosensori

“A biosensor is a compact analytical device incorporating a biologically derived sensing element either integrated within or intimately associated with a physicochemical transducer. The usual aim of a biosensor is to produce either discrete or continuous digital electronic signals which are proportional to a single analyte or a related group of analytes.” A. Turner, Editor in chief della rivista scientifica Biosensors and Bioelectronics.

“Un biosensore è un **dispositivo analitico** compatto che incorpora **un elemento sensibile di origine biologica**, il quale può essere sia integrato o **accoppiato ad un trasduttore fisico-chimico**. L'obiettivo di un biosensore è quello di produrre segnali elettronici discreti o continui **proporzionali ad un singolo analita o ad un gruppo di analiti tra loro in relazione**” A. Turner, Editor in chief della rivista scientifica Biosensors and Bioelectronics.

Biosensori- Applicazioni



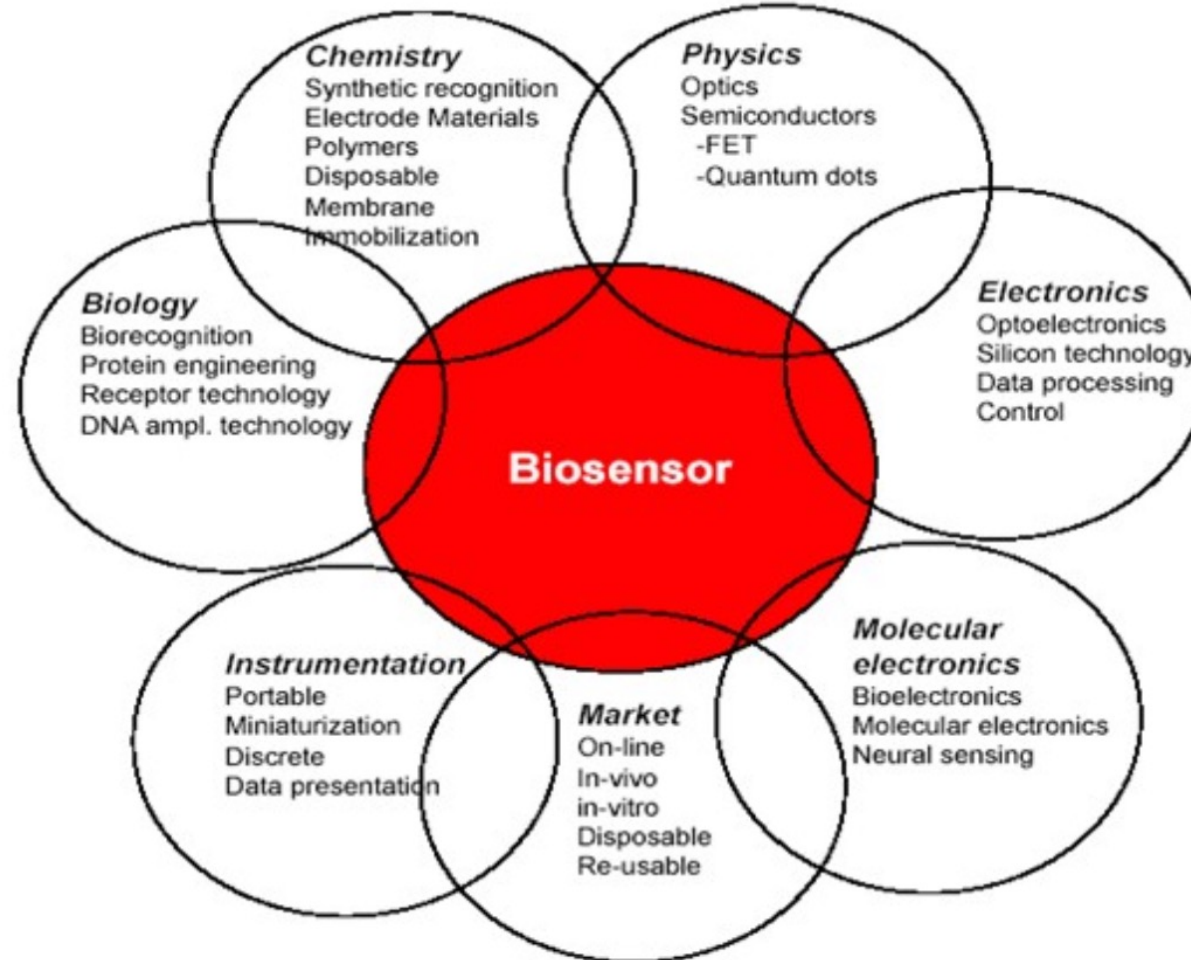
I biosensori trovano applicazione in diversi campi tra cui il **monitoraggio ambientale** (rilevazione di agenti inquinanti o patogeni nell'aria e nelle acque), il controllo della qualità dei cibi (esempio: aflatossina, micotossina potenzialmente cancerogena) e la ricerca farmacologica.

Una delle applicazioni di maggior interesse è certamente quella relativa all'uso di biosensori per la **rilevazione di biomolecole legate all'evoluzione di qualche patologia** (come alcuni marker tumorali per esempio).

Diversi tipi di sensori possono essere sviluppati sia per applicazioni usa e getta (particolarmente importanti in ambito biomedicale) che per il monitoraggio continuo su scale temporali di giorni-settimane (monitoraggio ambientale).

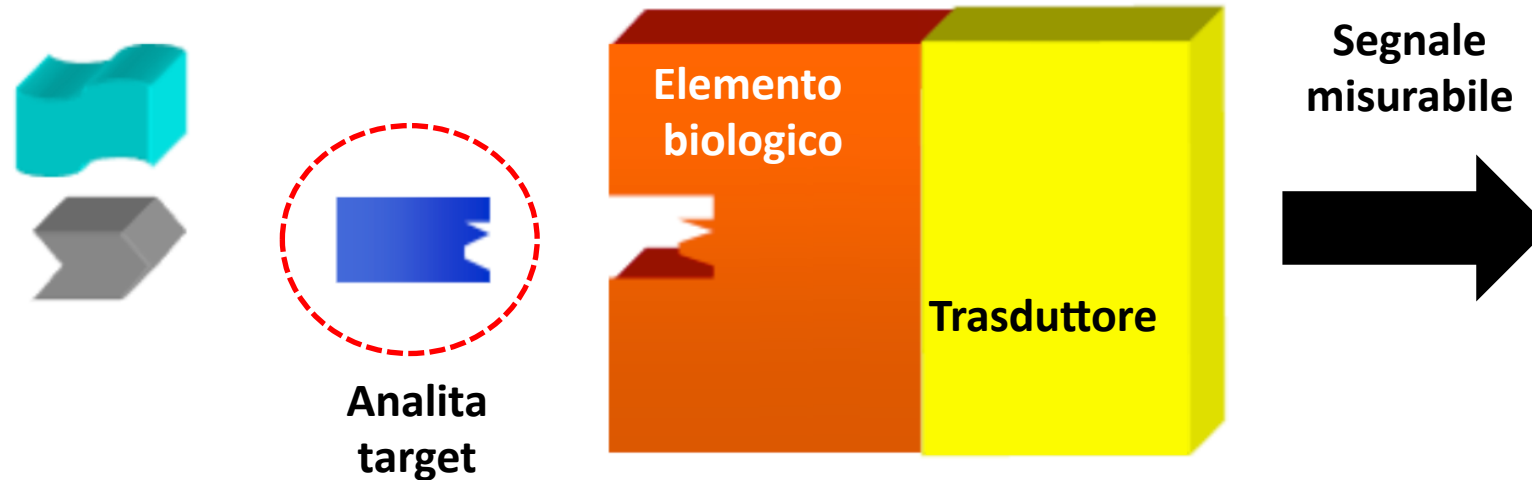
Biosensori- Applicazioni

Intrinseca multidisciplinarietà



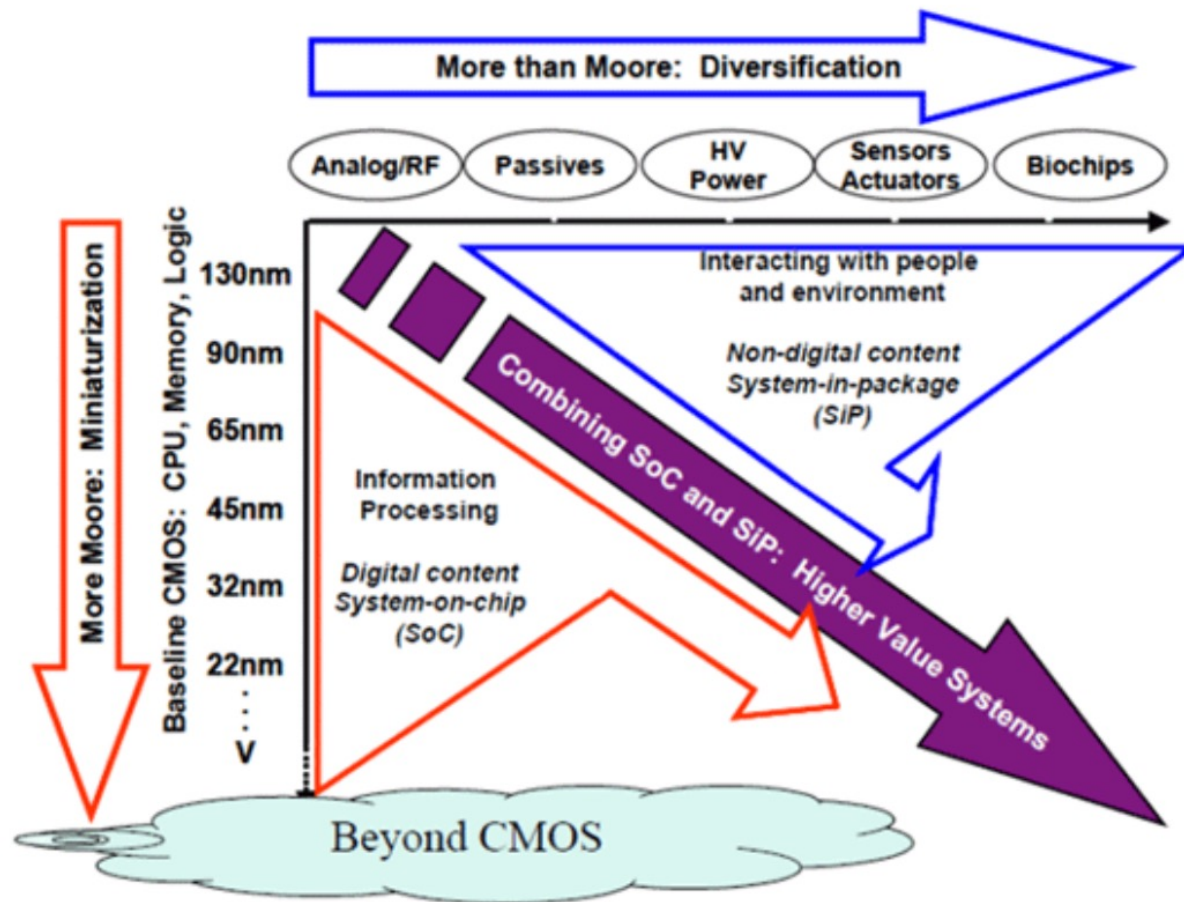
Biosensori

Un'altra definizione può essere la seguente: un biosensore è un dispositivo analitico costituito da un sistema biologico in grado di **interagire con l'analita di interesse**. Il sistema biologico dev'essere in **intimo contatto** con un trasduttore il quale converte ciò che avviene a livello dell'interazione analita/bioelemento in un segnale misurabile.



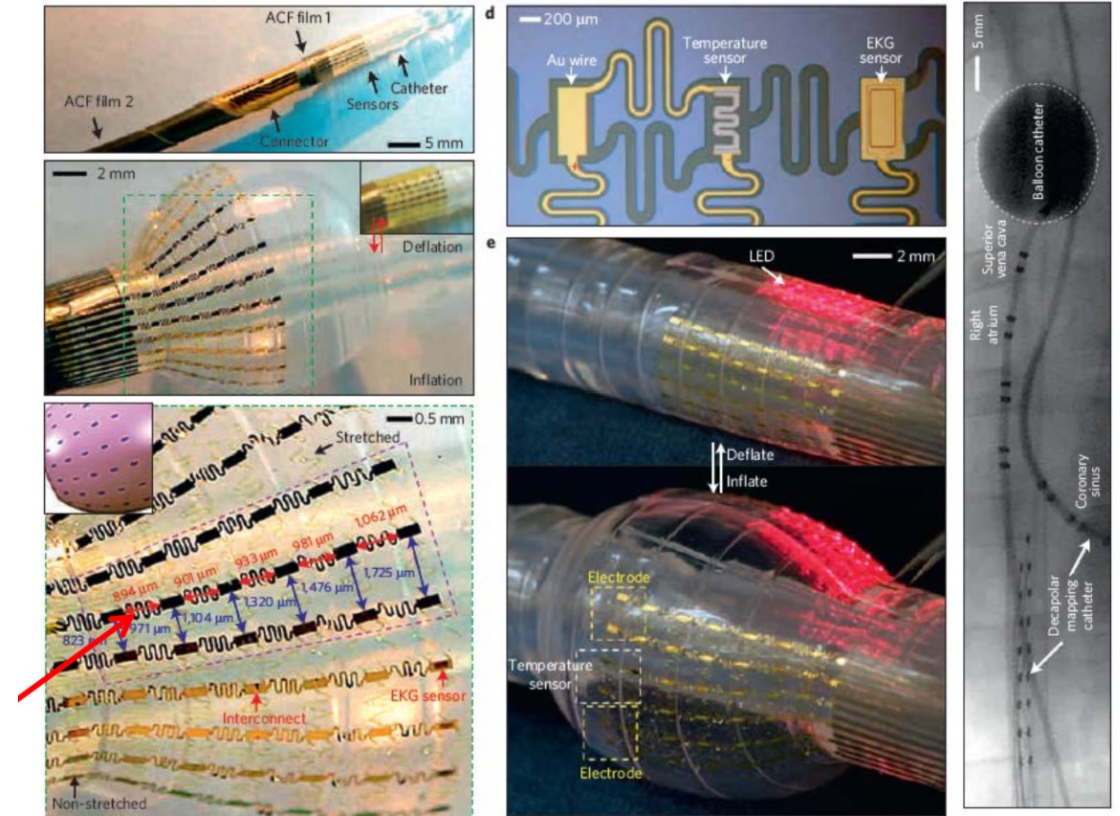
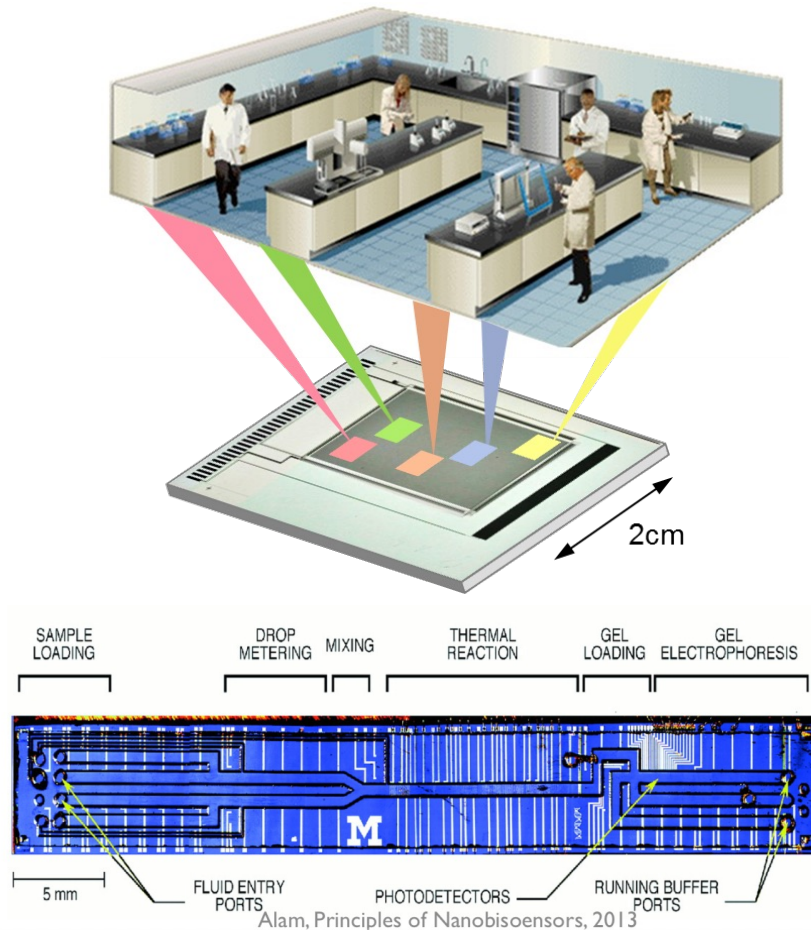
Biosensori- Applicazioni

Sensori e biosensori di nuova generazione: **miniaturizzazione** (legge di Moore), **diversificazione** (integrazione di diversi tipi di sensori e trasduttori in un singolo device), **integrazione con dispositivi mobili**.



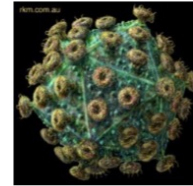
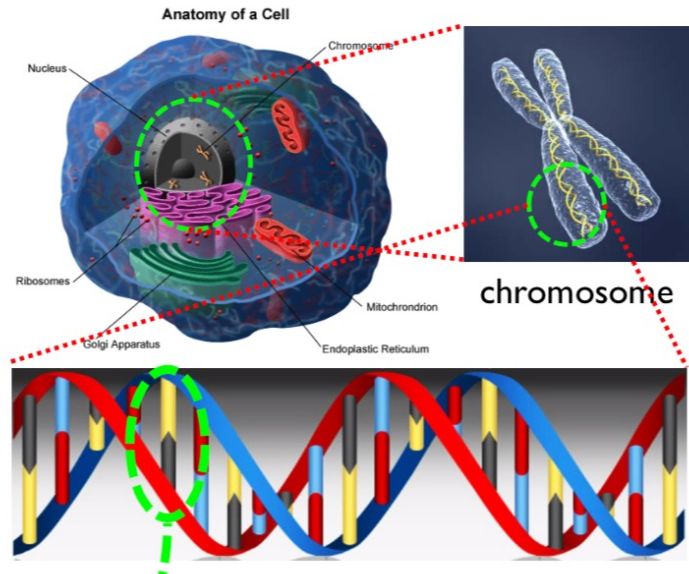
Biosensori- Applicazioni

Sensori e biosensori di nuova generazione: **lab on a chip** e **sensoristica conformabile**.



Biosensori- Applicazioni

Sensori e biosensori di nuova generazione: **medicina personalizzata**.



Lunghezza del genoma

~9,700 (HIV)



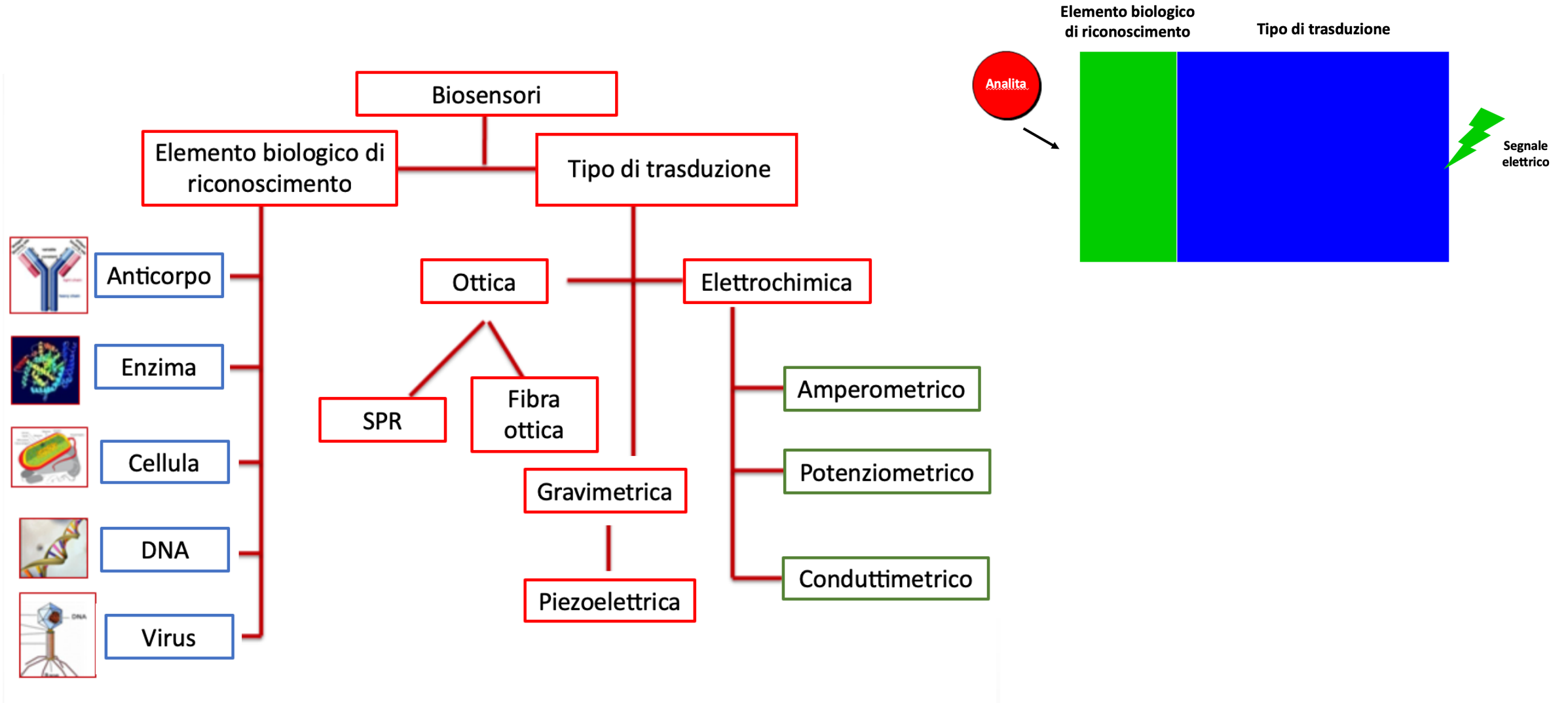
~4,600,000 (E. Coli)



~3,200,000,000 (Umano)



Biosensori- classificazione



Elemento biologico di riconoscimento molecolare

Enzimi (biosensore catalitico): trasformazione dell'analita in un prodotto misurabile

- inibizione dell'enzima da parte dell'analita
- modifiche dell'enzima indotte dall'analita

Sistema antigene-anticorpo

- legame ad alta affinità con un marcatore che produce il segnale o direttamente reazione Ab-Ag senza tracciante

DNA:

- reazioni di ibridazione ad alta affinità

Biosensori cellulari: inibizione della vitalità cellulare, modifiche metaboliche o elettriche...

- proteine di trasporto di membrana
- cellule (neuroni per esempio, ma anche batteri, lieviti...) geneticamente modificate in maniera tale da esprimere particolari proteine (**optogenetica**, sonogenetica...)

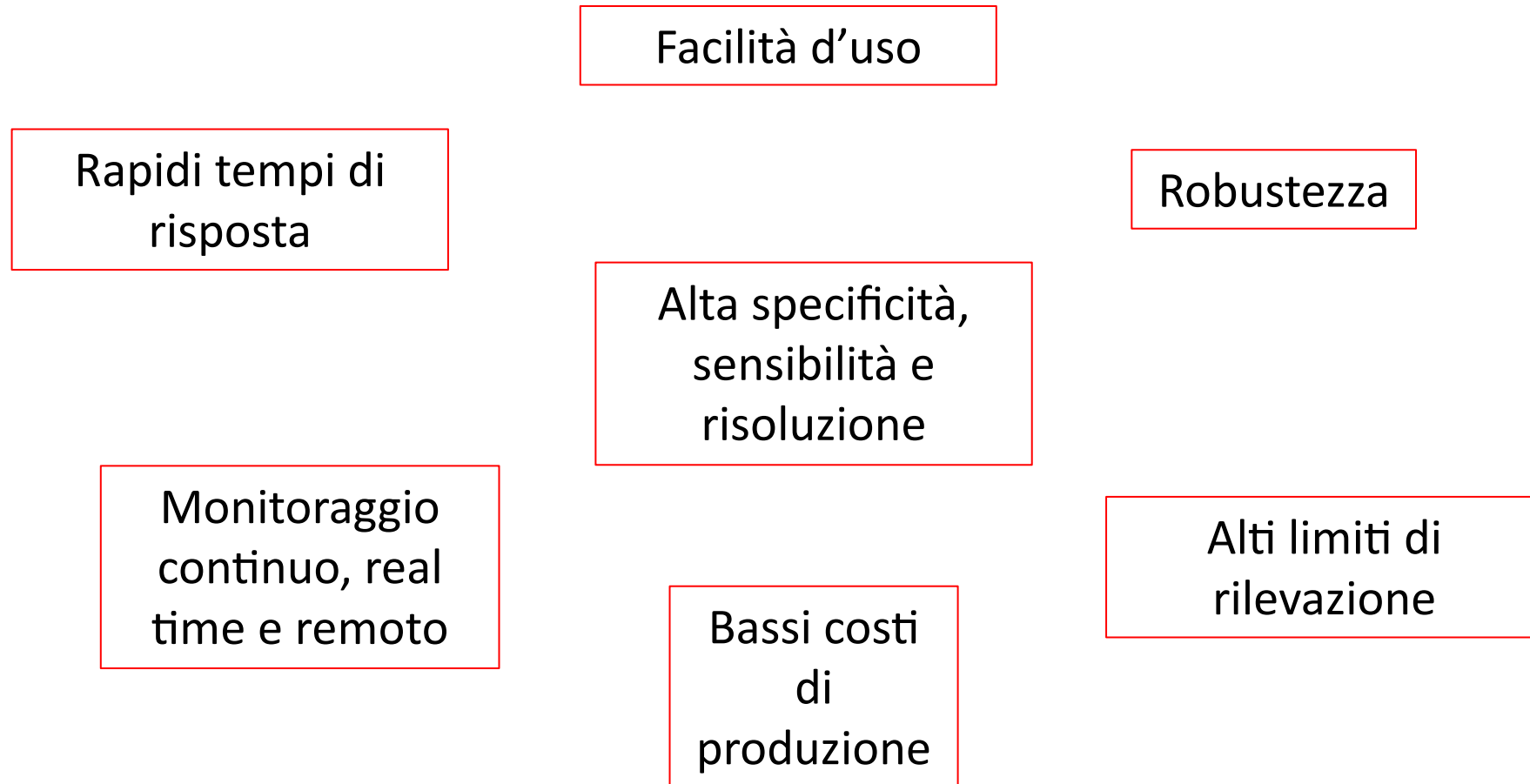
Biosensori - metodi di trasduzione

L'interazione tra l'analita e l'elemento biologico presente nel biosensore genera un **segnale che può essere di diversa natura** (differenza di potenziale, variazione di corrente elettrica etc.). I principali metodi di trasduzione sono i seguenti:

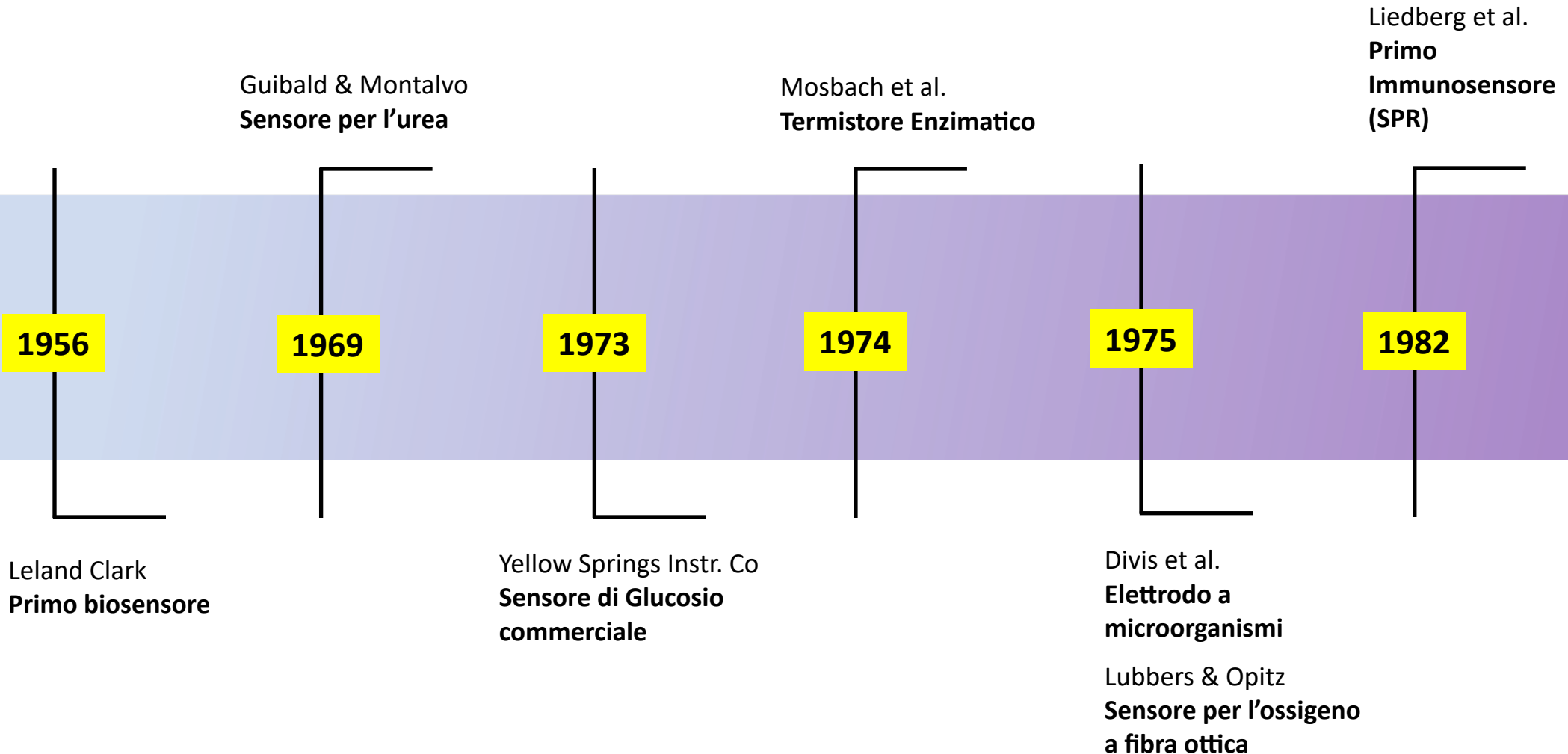
- **Potenzimetrico:** variazione del potenziale di una cella elettrochimica, modifica nella distribuzione delle cariche superficiali (come nel bioFET)...
- **Amperometrico:** movimento di cariche in una **cella elettrochimica** legato a reazioni di ossidoriduzione
- **Ottico:** assorbimento, emissione, rifrazione della luce in seguito alla reazione chimica, variazioni di colore
- **Gravimetrico:** variazioni di massa del sistema dovute al legame analita/sensore. Esempio: misura delle variazioni di massa tramite trasduttore piezoelettrico (microbilancia al quarzo)
- **Calorimetrico:** produzione o assorbimento di calore dovuto alla reazione chimica

Biosensori

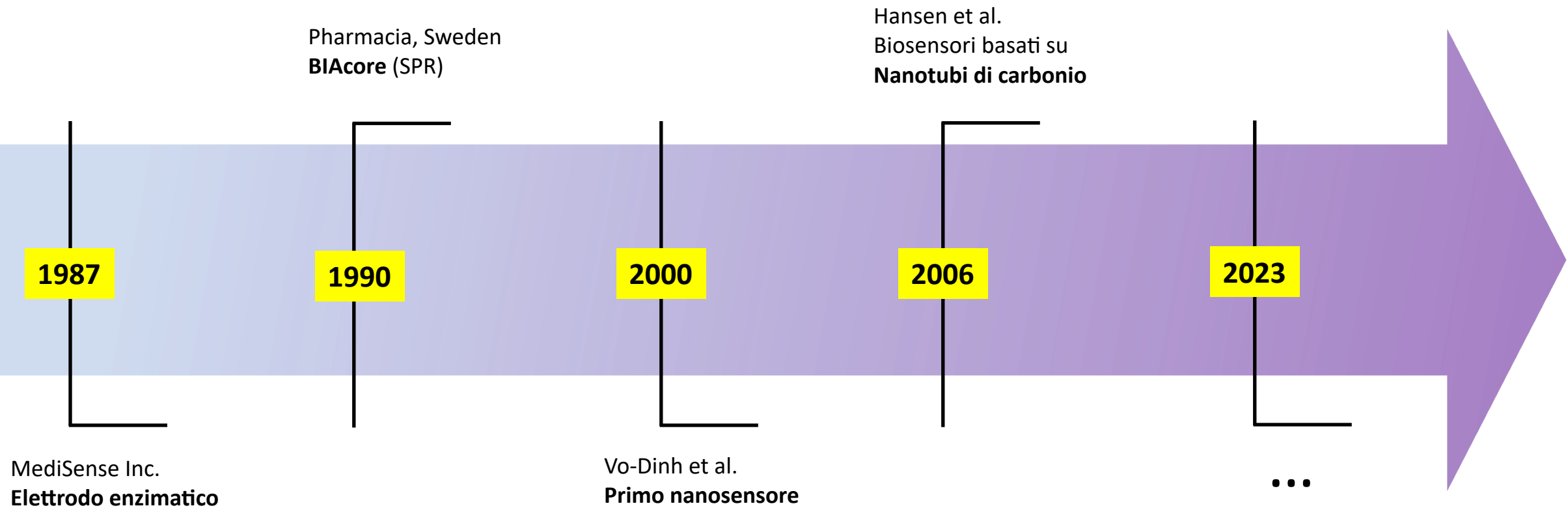
A prescindere dal bioelemento utilizzato e dal metodo di trasduzione, i **requisiti che deve soddisfare un biosensore** sono i seguenti:



Biosensori – Timeline essenziale



Biosensori – Timeline essenziale



Applicazioni Biosensori

Sensore Elettrochimico	Enzima	Metabolita	Range di misura mmol/l
vetro, pH	ureasi	urea	0.05 - 5
	glucosioossidasi	glucosio	0.1 - 1
	penicillinasi	penicillina	0.01 - 3
	acetilcolina		
antimonio, pH ISFET, pH	esterasi	acetilcolina	0.01 - 10
	ureasi	urea	0.1 - 10
	ureasi	urea	1 - 1000
	glucosioossidasi	glucosio	1 - 50
sensore NH ₃	penicillinasi	penicillina	1 - 20
	ureasi	urea	0.05 - 50
	glutaminasi	glutamina	0.05 - 5
	fenilalanina		
	ammonia liasi	fenilalanina	0.05 - 1
	asparaginasi	asparagina	0.1 - 10
	AMP deaminasi	5'-AMP	0.1 - 10
	fosfodiesterasi		
	+ AMP deaminasi	3',5'-AMP ciclico	0.01 - 10
	creatinina diimino		
sensore CO ₂	idrolasi	creatinina	0.1 - 10
	ureasi	urea	0.1 - 10
	uricasi	acido urico	0.1 - 2.5
	enzimi		
	decarbossilasi	tirosina	0.1 - 2.5
		asparagina	0.1 - 10
		lisina	0.1 - 30
ammonio ISE (basato su scambiatore neutro)		glutammato	0.5 - 5
	ureasi	urea	0.01 - 10
	creatininasi	creatinina	0.01 - 5
	asparaginasi	asparagina	0.01 - 1
ioduro ISE redox	aminoacidoossidasi	amminoacidi	0.01 - 10
	lattato		
cianuro ISE	deidrogenasi	lattato	0.1 - 1
	β-glucosidasi	amigdalina	0.1 - 100

Glucosio: 100 μM...

Con i sensori standard si riesce ad arrivare a concentrazione nell'ordine del μM...

Urea: 10 μM

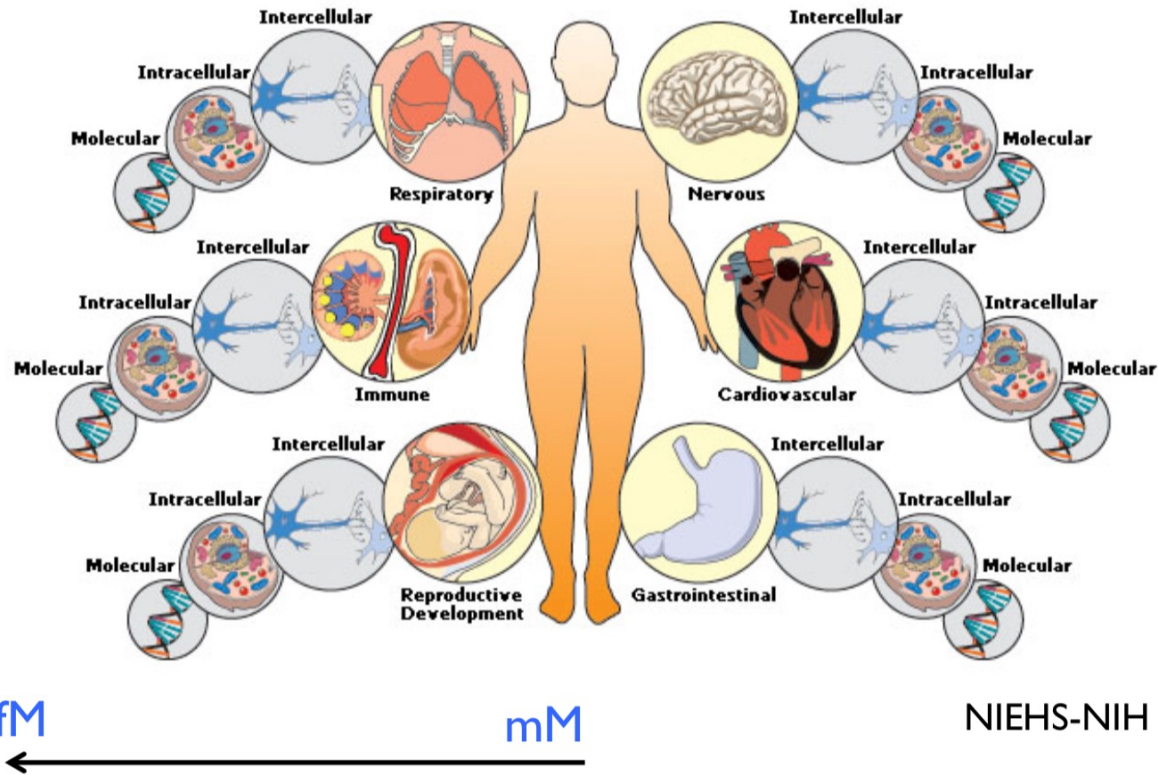
Creatinina: 10 μM

Lattato: 100 μM...

Biosensori in ambito biomedico

Utilizzo dei biosensori in ambito biomedico: dal macro al nano.

Il nostro organismo è organizzato gerarchicamente. **Alterazioni a livello molecolare** possono influenzare il funzionamento della singola cellula o l'equilibrio locale di un gruppo di cellule fino ad interessare interi tessuti, organi o gruppi di organi. Uno dei principali obiettivi dei moderni biosensori è quello di **riuscire a rilevare variazioni molto piccole dell'analita** in modo da accorgersi tempestivamente di questi fenomeni e intervenire tempestivamente. Questo si può fare solo **lavorando a concentrazioni molto basse**.



Biosensori

Ma cosa è considerata una piccola concentrazione? A livello biologico, una concentrazione mM è considerata un'alta concentrazione.

Esempio: calcolo della concentrazione di paracetamolo nel sangue

- Formula chimica del Paracetamolo: $C_8H_9NO_2$
- Peso molecolare: 151.16 g
- Dose: 1 mg (dunque circa $4 \cdot 10^{21}$ molecole)

- Litri di sangue (valore medio): 5 litri
- # molecole di Paracetamolo per litro di sangue: $8 \cdot 10^{20}$
- La concentrazione equivalente sarà:

$$\frac{\# \text{ molecole}}{\# \text{ Avogadro}} = \frac{8 \cdot 10^{20}}{6 \cdot 10^{23}} = 1.32 \text{ mM}$$

Alta concentrazione (tempo di azione: minuti).

Unità di concentrazione

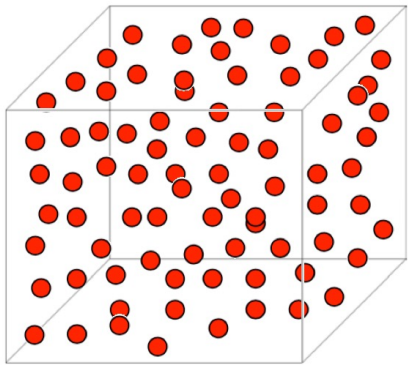
Quali sono le concentrazioni rilevabili con i classici metodi analitici? Esempio delle analisi del sangue: andiamo a rilevare tipicamente analiti con concentrazioni dell'ordine del mM.

• Sodium	139	mM/L
• Potassium	4.3	mM/L
• Chloride	103	mM/L
• CO ₂	24	mM/L
• Glucose	89	mg/dL
• Creatinine	17	mg/dL
• pH	7.5	
• WBC	9.2	k/cumm
• RBC	4.3	million/cumm

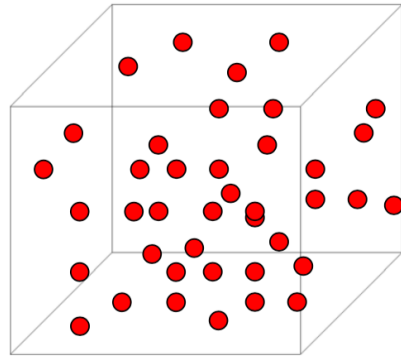
Biosensori

La tendenza dei moderni biosensori è quella di andare verso il fM. Ma è possibile? Cosa esattamente significa rilevare la presenza di qualche analita presente in concentrazione di 1 fM?

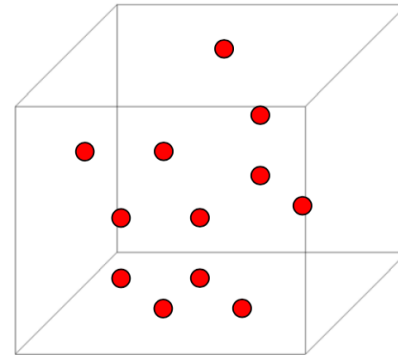
Prendiamo un cubo di $100\ \mu\text{m}$ di lato ($10^{-9}\ \text{L}$). Una mole contiene 6×10^{23} molecole, dunque il nostro box conterrà, per una concentrazione 1 M, circa 10^{15} molecole (6×10^{14}). Quante molecole conterrà il box per diverse concentrazioni?



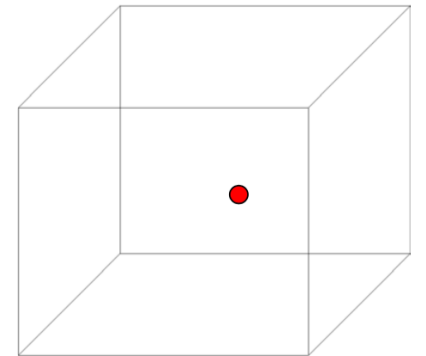
1 mM $\sim 10^{12}$ molecole



1 uM $\sim 10^9$ molecole



1 pM $\sim 10^3$ molecole



1 fM ~ 1 molecola

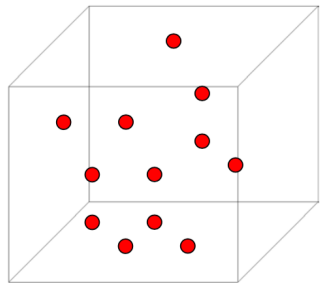
Biosensori

Un cucchiaino di sale ~ 5-6 grammi, pari a circa 0.1 moli (P.M. NaCl=58.44 g/mol)

Volume piscina olimpionica ~ 2500 m³, pari a circa 2.5*10⁶ litri

Concentrazione relativa a 1 cucchiaino NaCl in una piscina olimpionica:

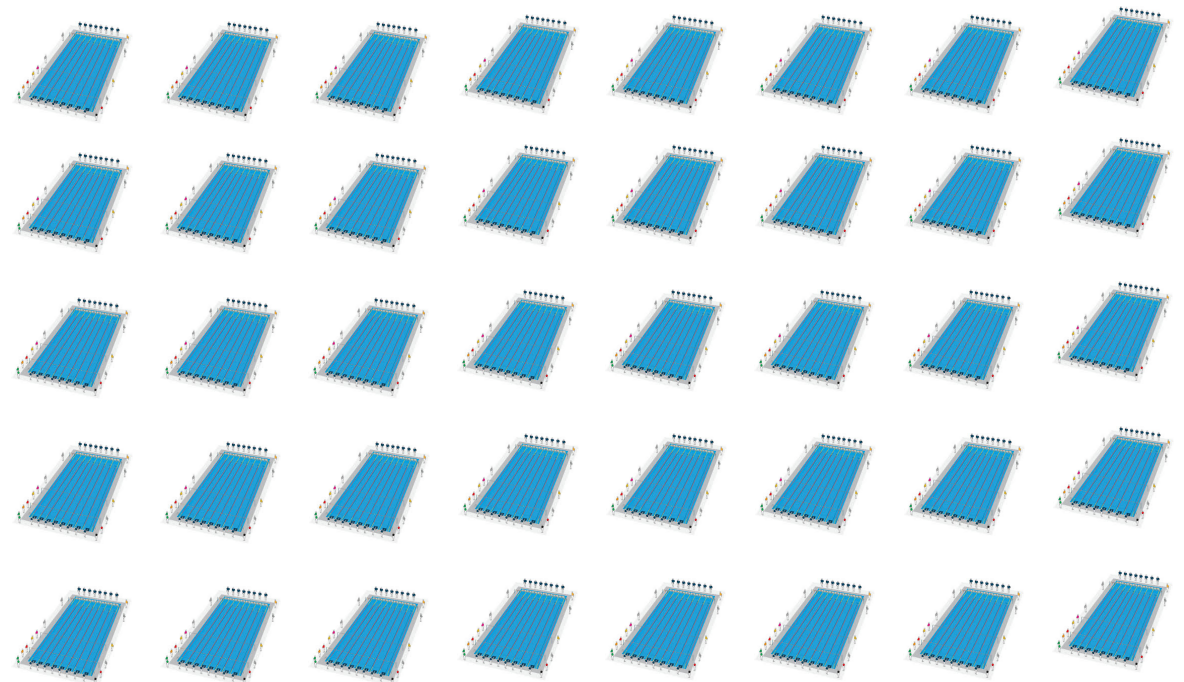
$$0.1 \text{ mol} / 2.5 * 10^6 \text{ litri} = 4 * 10^{-8} \text{ M (}=40 \text{ pM)}$$



1 pM ~ 10³ molecole



+



Biosensori

Esempio: omeopatia. I seguaci dell'omeopatia predicano (tra le altre cose) che più una sostanza è diluita più il suo effetto è efficace. Un "farmaco" omeopatico con una "potenza" indicata con 20X equivale per esempio, ad una singola pillola di aspirina disciolta in un quantitativo di liquido di volume pari a quello dell'oceano Atlantico...

Biosensori

Significato fisico del concetto di rilevazione di un certo analita in soluzione.

Esempio: **lesione tumorale**

- Supponiamo che una lesione tumorale abbia immesso, ad un certo stadio del suo sviluppo, **10^5 cellule nel sistema circolatorio.**
- Litri di sangue (valore medio): 5 litri
- # cellule per litro: $2 \cdot 10^3$
- Estraendo **n campioni di sangue da 1 cm^3** , avrò in media **2 cellule per campione.**
- Se riduciamo il **volume del campione a 1 mm^3** , si ottiene un valore medio di **$2 \cdot 10^{-3}$...**
- Questo valore indica una **probabilità praticamente nulla di rilevare una cellula cancerosa.**

Biosensori

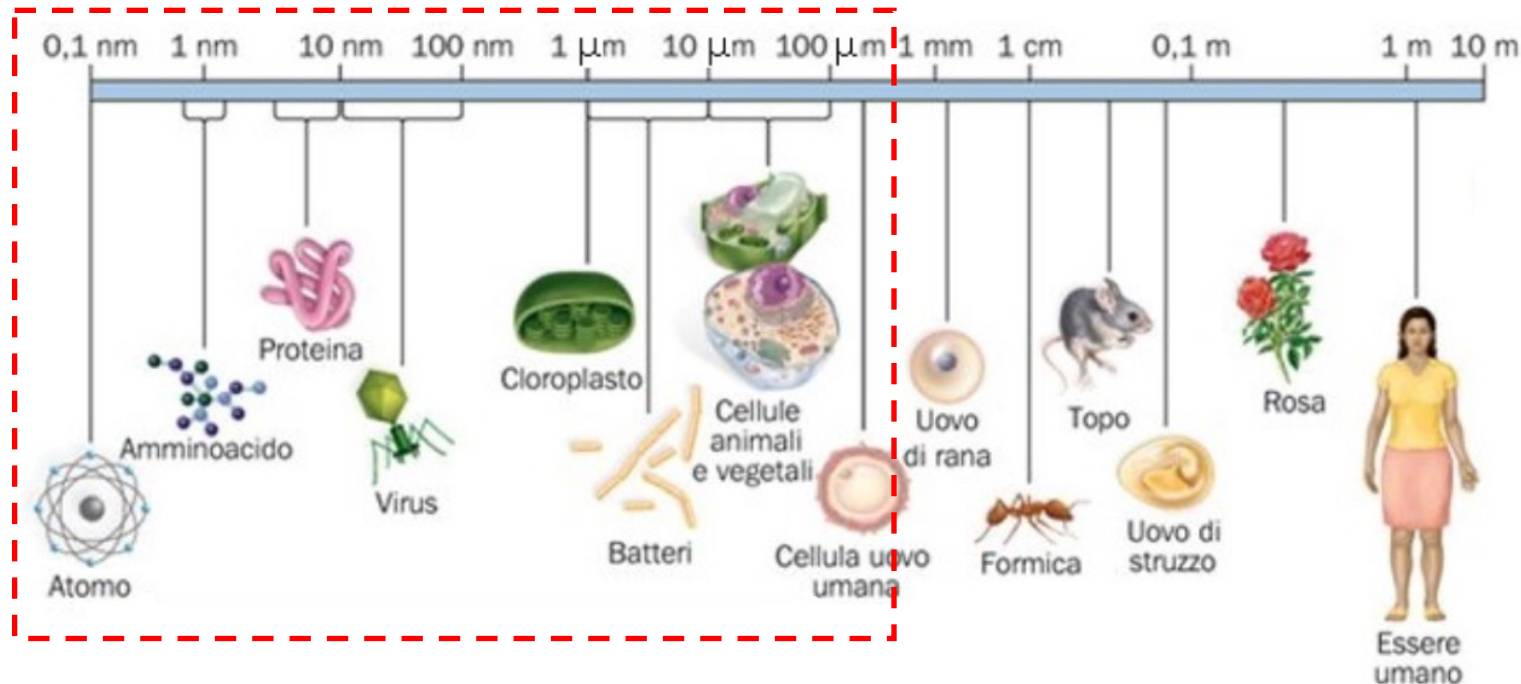
Messaggio tra le righe.

È sì importante raggiungere sensibilità sempre più alte, ma **non bisogna mai dimenticarsi del significato fisico** di quello che si sta facendo: il volume studiato deve essere sempre sufficiente per contenere statisticamente almeno una molecola/cellula/microorganismo...

In caso contrario si è davanti ad un evento miracoloso (A), ad una frode scientifica (B) o a un effetto omeopatico (A+B).

Biosensori

Il discorso sulle concentrazioni deve però anche tener conto che in ambito biomedico non parliamo solo e soltanto di ioni o molecole semplici. La complessità del nostro organismo è dovuta alla **presenza di una grande varietà di macromolecole o microorganismi** differenti **con differenti proprietà fisiche** (dimensioni, carica, massa, affinità elettronica...).



Proprietà differenti portano a diversi possibili approcci di trasduzione.

Biosensori

Nell'ottica di un'applicazione biomedica dei biosensori, possiamo attuare una classificazione di massima delle molecole d'interesse in base alle **dimensioni e proprietà fisiche** (quali carica, massa, potenziale di ossidoriduzione, indice di rifrazione etc.).

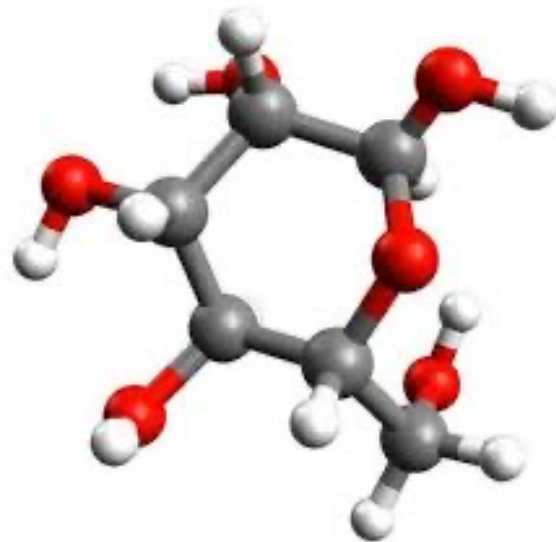
Piccole molecole semplici come il glucosio o il monossido di azoto.

Macromolecole costituite da catene di aminoacidi (**proteine**) o zuccheri contenenti basi azotate (**DNA e RNA**).

Molecole di grandi dimensioni/**microorganismi**, dunque **batteri e virus**.

Biosensori

Un esempio di piccola molecola è il **glucosio**, una molecola di estrema importanza in ambito biomedico. È utilizzata come **fonte primaria di energia** nei fenomeni di **respirazione cellulare** e il controllo della sua concentrazione a livello sistemico è essenziale per **regolare il funzionamento ad alto livello di tutti gli organi**. Correlato a patologie quali il **diabete**, lo sviluppo di sistemi per il monitoraggio del glucosio rappresenta ancora oggi la più grande fetta di mercato in ambito biosensoristico.



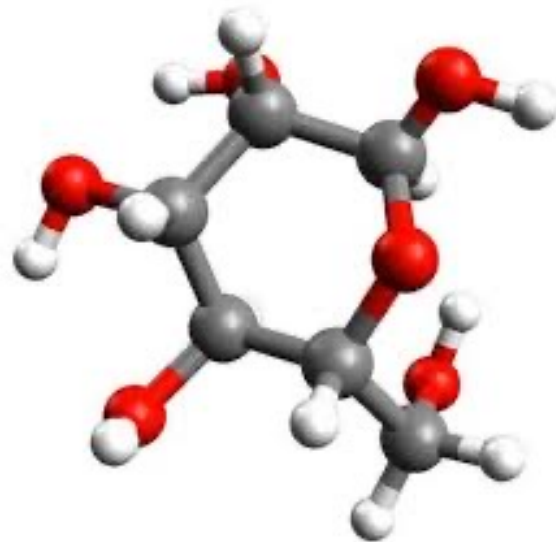
Formula chimica: $C_6H_{12}O_6$

Massa: peso molecolare 180 g/mol

Dimensioni: circa 1 nm

Biosensori

- **Dimensioni** estremamente **ridotte** (non facilmente rilevabili con approcci gravimetrici).
- **Non** possiede una **carica elettrica netta** (non facilmente rilevabili con approcci potenziometrici).
- Approccio utilizzabile: amperometrico, sfruttando particolari enzimi.



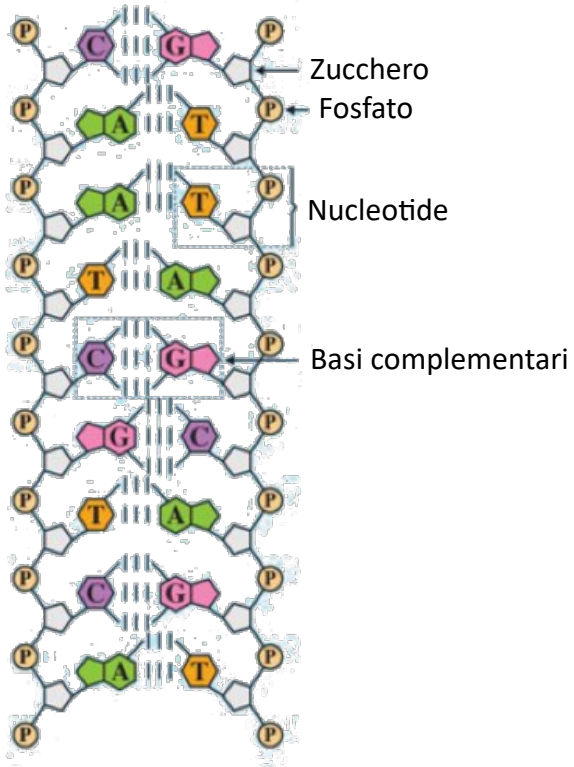
Formula chimica: $C_6H_{12}O_6$

Massa: peso molecolare 180 g/mol

Dimensioni: circa 1 nm

Biosensori

Acidi nucleici



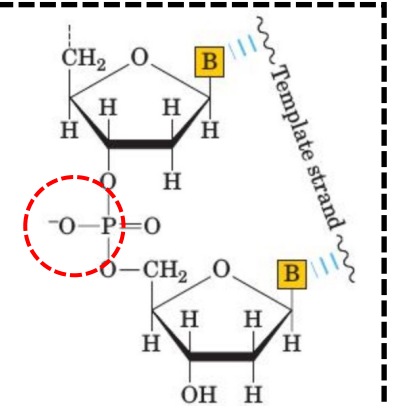
Dalton (unità di massa atomica): dodicesima parte della massa di un atomo di carbonio-12 e corrisponde a circa $1,66 \cdot 10^{-24} g$.

Molecola **carica negativamente**: ogni base ha una carica netta di 1-2 q dipendentemente dal pH. Possibile rilevarle con **approccio potenziometrico**.

Solitamente delle 4 miliardi di coppie di basi siamo interessati solo a “pezzetti” di qualche centinaio al massimo di coppie di basi.

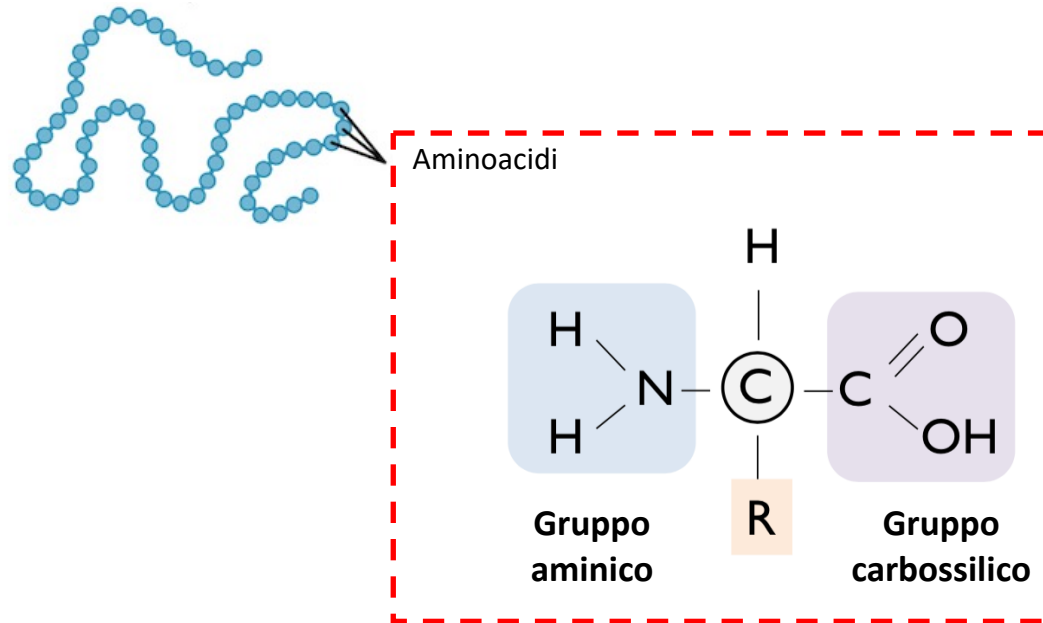
Molecole **molto massive** (300 Dalton ogni base) e dunque è possibile **rilevarle con tecniche gravimetriche**.

Carica negativa netta: presenza dei gruppi fosfato e del legame fosfodiesterico (due pentosi legati ad un fosfato).



Biosensori

Proteine



Catena di amminoacidi (20 tipi diversi di aminoacidi). Categoria vastissima di molecole (enzimi, ormoni, molecole strutturali, molecole di trasporto...)

Carica: **dipende dalla proteina e dall'ambiente in cui si trovano**. A parità di condizioni possono esserci proteine che presentano una carica netta positiva, negativa o proteine neutre.

Massa significativa (in media 125 Da per amminoacido). Catene da qualche decina a qualche migliaio di amminoacidi.

Biosensori

Proteine

Il glucagone, con i suoi $3,5 \cdot 10^3 \text{ Da}$ ($1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g} * 3,5 \cdot 10^3 = 5,8 \cdot 10^{-21}$), è una delle **proteine funzionali più piccole presenti naturalmente nel nostro organismo**. È il principale ormone catabolico del corpo umano e la sua funzione (in contrasto con quella dell'insulina) è quella di aumentare la concentrazione di glucosio nel sangue.

Proteina umana più grande: Titina. È una connectina e possiede una massa molecolare di circa $3 \cdot 10^6 \text{ Da}$ ($1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g} * 3 \cdot 10^3 = 5 \cdot 10^{-18}$). È presente nei muscoli e agisce come filamento di connessione elastica tra i filamenti di miosina e la banda Z.

	Prefix name		deci	centi	milli	micro	nano	pico	femto	atto	zepto	yocto
Fractions	Prefix symbol		d	c	m	μ	n	p	f	a	z	y
	Factor	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-6}	10^{-9}	10^{-12}	10^{-15}	10^{-18}	10^{-21}	10^{-24}

Biosensori

Carica di una proteina.

Gli amminoacidi costituenti una proteina sono **anfoteri** (possono comportarsi sia da acidi che da basi), a causa della presenza sia del **gruppo carbossilico** –COOH che del **gruppo amminico** –NH₂.

Per capire in che modo può caricarsi una proteina partiamo da lontano...l'equilibrio di dissociazione di un acido debole HA è:



ed è regolato dalla costante di equilibrio K_a . Maggiore è K_a tanto più forte è l'acido ovvero **quanto più è piccolo il valore di pK_a ($-\log K_a$) tanto più forte è l'acido**. L'espressione di K_a è:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Biosensori

Carica di una proteina.

La relazione tra pH e pK_a è data dall'equazione di Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Dunque nella situazione $pH = pK_a$, $\rightarrow [A^-] = [HA]$.

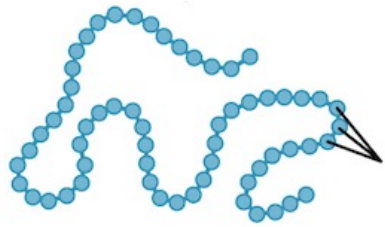
Nel caso in cui $pH < pK_a$, $[HA] > [A^-]$ dunque la forma protonata prevale su quella deprotonata.

Al contrario, nel caso in cui $pH > pK_a$, $[HA] < [A^-]$ e la forma prevalente sarà dunque quella deprotonata.

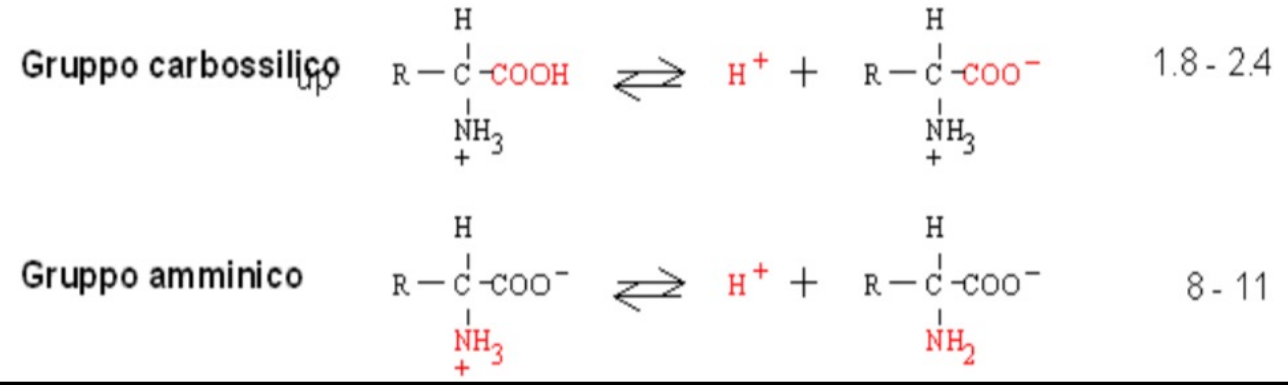
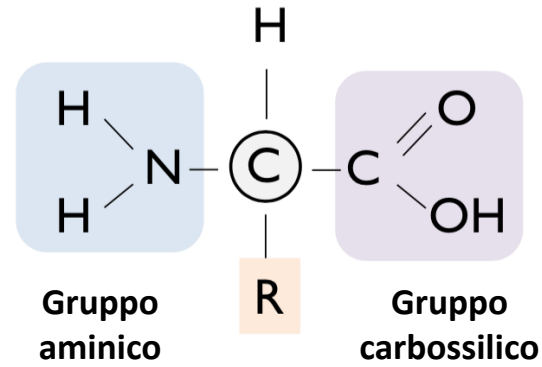
La situazione in una proteina si complica un po'...

Biosensori

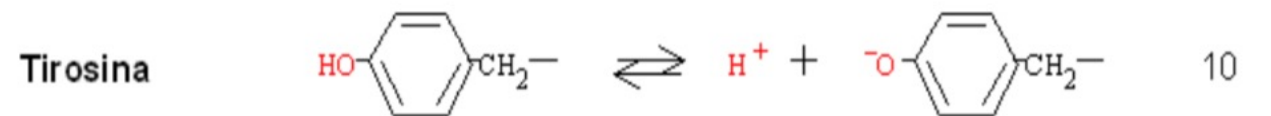
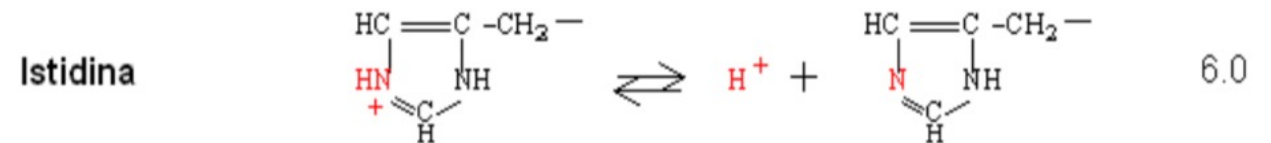
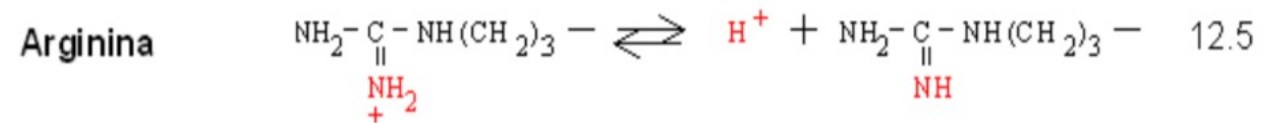
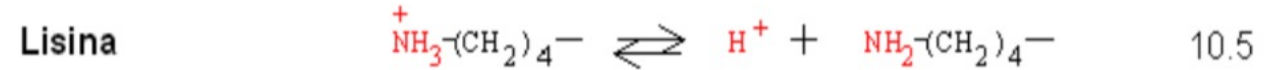
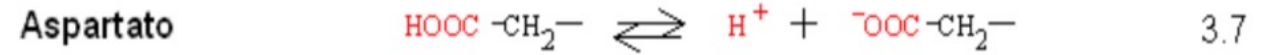
Proteine



Aminoacidi

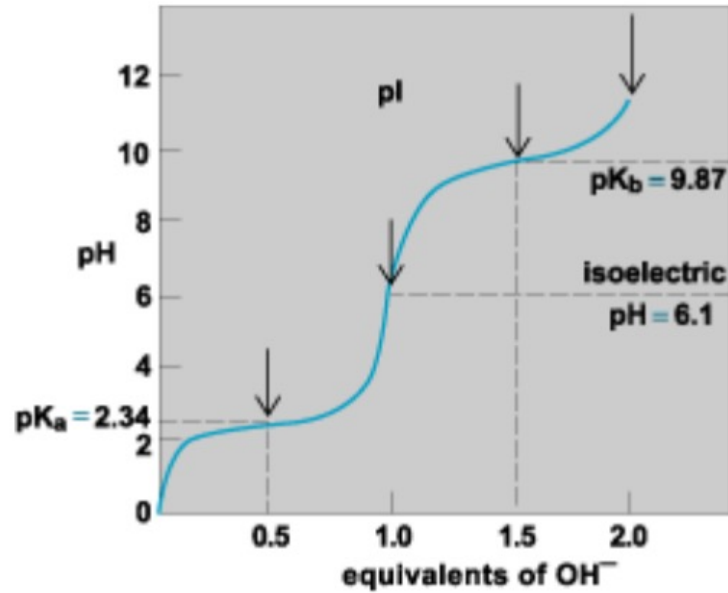


Gruppo R



Biosensori

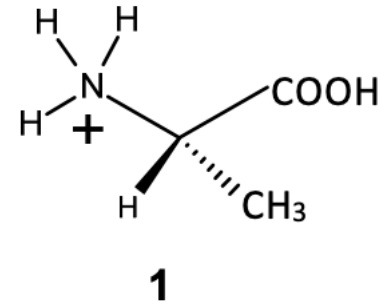
Gruppo R neutro: titolazione dell'alanina.



Punto isoelettrico di un aminoacido con un solo gruppo carbossilico e un solo gruppo aminico:

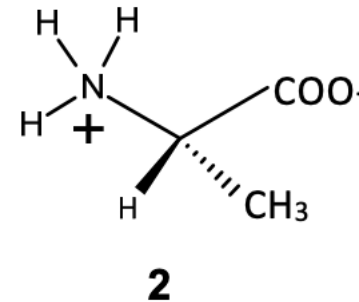
$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

L'amminoacido **non migra se immerso all'interno di un campo elettrico.**

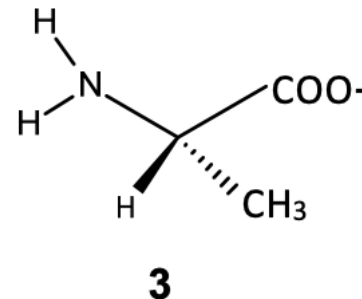


pH < 1: entrambi i gruppi sono protonati.

Forma zwitterionica



Il pK_a rappresenta il valore di pH al quale la metà di 1 si è trasformata in 2 (punto isoelettrico).

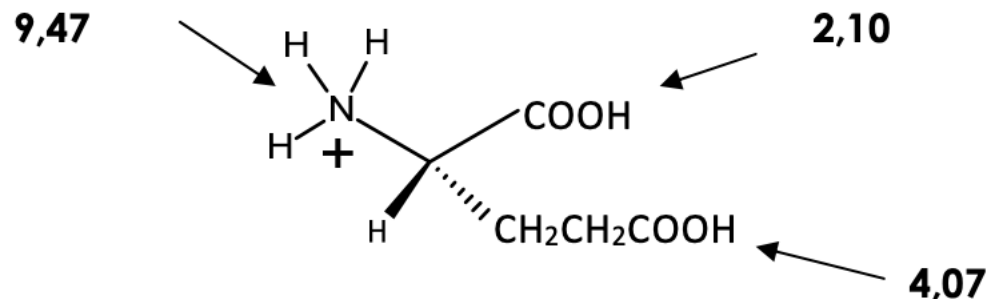


Il pK_b rappresenta il valore di pH al quale la metà di 2 si è trasformata in 3 (forma anionica).

Biosensori

Nel caso in cui sia **presente anche un gruppo R acido o basico**, occorre tener presente anche del suo contributo (considerando la sua K_a insieme a quella degli altri due gruppi). Facciamo l'esempio **dell'acido glutammico** (i valori di pK_a sono indicati in figura).

Configurazione dell'amminoacido a $pH < 2.10$.



Carica di una proteina.

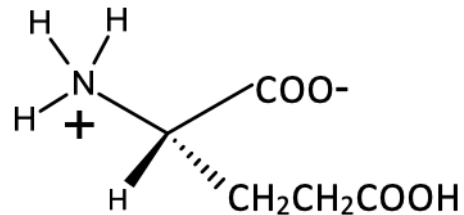
Dei 20 aminoacidi, solo 7 hanno il gruppo R con carica netta diversa da 0. In particolare:

- Aminoacidi carichi positivamente:
 - Lisina (K, $pK = 10.53$)
 - Arginina (R, $pK = 12.48$)
 - Istidina (H, $pK = 6$)
- Aminoacidi carichi negativamente:
 - Aspartato (D, $pK = 3.86$)
 - **Glutammato (E, $pK = 4.07$)**
 - Tirosina (Y, $pK = 10.07$)
 - Cisteina (C, $pK = 8.33$)

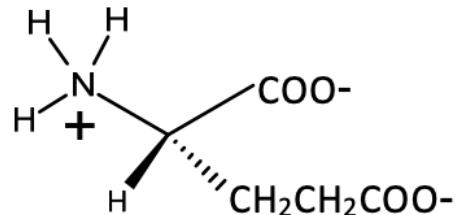
Il gruppo carbossilico terminale ha $pK = 3.1$ mentre il gruppo amminico terminale ha $pK = 8$

Biosensori

Man mano che il **pH aumenta** **l'amminoacido tenderà a perdere H^+** , cominciando dal gruppo $-COOH$ con pK_a 2.10, per poi passare al gruppo $-COOH$ del gruppo R, e infine al gruppo amminico. **A pH 7 questo amminoacido avrà una carica positiva e due cariche negative.**



Glu a pH 3,1 (isoelettrico)



Glu a pH 7 (anionico)


pH acido pH basico

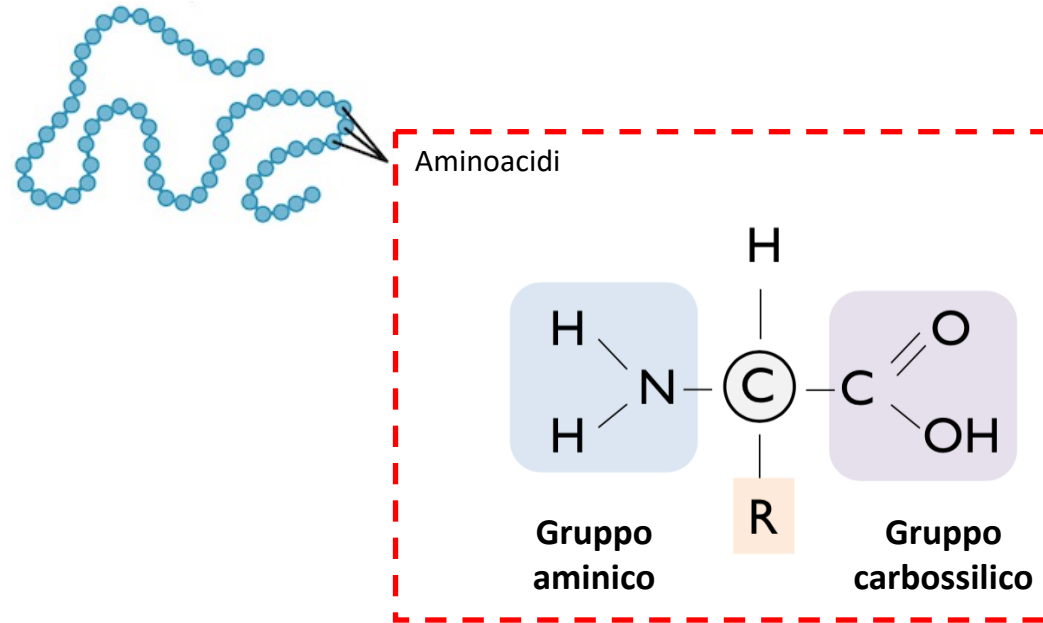
Carica di una proteina.

Dei 20 aminoacidi, solo 7 hanno il gruppo R con carica netta diversa da 0. In particolare:

- Aminoacidi carichi positivamente:
 - Lisina (K, $pK = 10.53$)
 - Arginina (R, $pK = 12.48$)
 - Istidina (H, $pK = 6$)
- Aminoacidi carichi negativamente:
 - Aspartato (D, $pK = 3.86$)
 - **Glutammato (E, $pK = 4.07$)**
 - Tirosina (Y, $pK = 10.07$)
 - Cisteina (C, $pK = 8.33$)

Il gruppo carbossilico terminale ha $pK = 3.1$ mentre il gruppo amminico terminale ha $pK = 8$

Biosensori



La carica totale di una proteina può essere espressa come:

$$Q = q(N_{term} + \alpha K + \beta R + \gamma H + \delta D + \varepsilon E + \zeta C + \eta Y + C_{term})$$

$\alpha, \beta, \gamma \dots$: sono dei termini che tengono conto del peso (cioè il contributo alla carica totale) di ogni aminoacido **dipendentemente dal pH**. N_{term} e C_{term} sono, rispettivamente, i contributi del gruppo amminico terminale e del gruppo carbossilico terminale.

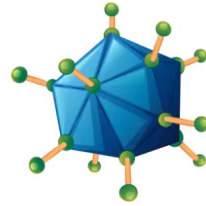
Biosensori

Alcune proteine vengono **sovraesprese in situazioni patologiche come in alcuni tumori**. Esistono diversi marcatori proteici riconosciuti e ampiamente studiati quali per esempio:

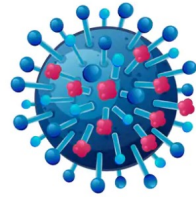
- PSA: marcatore del **tumore alla prostata**.
- Troponina cardiaca: **espressa in condizioni di sofferenza cardiaca** e in seguito ad attacco cardiaco.
- BRCA1 e BRCA2: marker dei tumori del seno e delle ovaie rispettivamente.

Riuscire a rilevare queste proteine in piccolissime quantità è dunque **essenziale nella diagnosi precoce di un tumore** e nel trattamento tempestivo di condizioni patologiche quali infarto del miocardio.

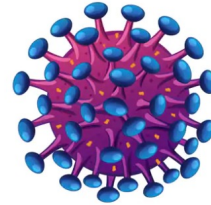
Biosensori



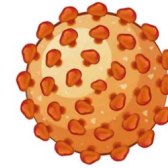
Adenovirus



Influenza



HIV



Hepatitis B

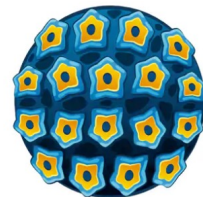


Ebola Virus

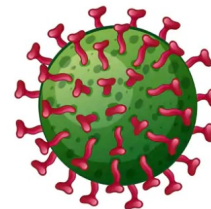
- Solitamente non sono caratterizzate da una carica netta. Relativamente grandi (>100 nm) (rilevazione gravimetrica?).
- Un altro metodo potrebbe essere sfruttare la sua carica neutra per **modulare una carica netta immobilizzata per esempio su un sensore potenziometrico.**



Rabies Virus



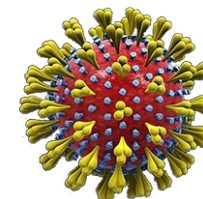
Papillomavirus



Rotavirus

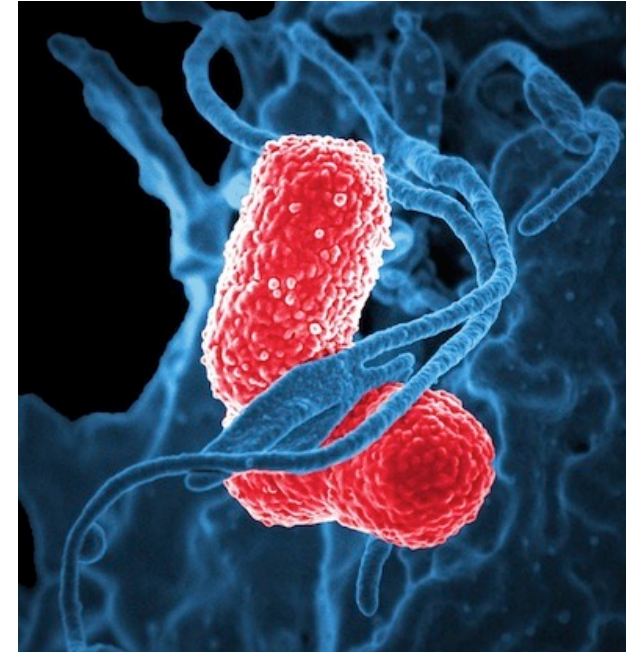
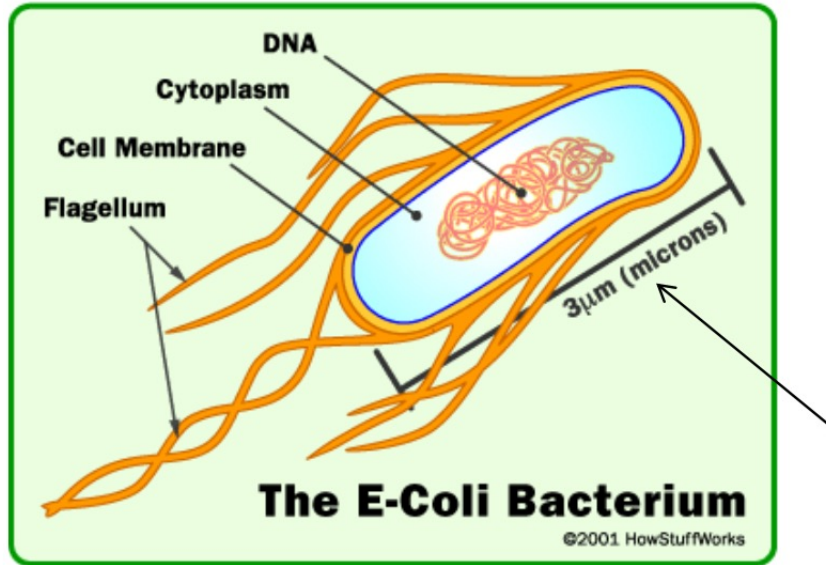


Herpes Virus



Coronavirus

Biosensori



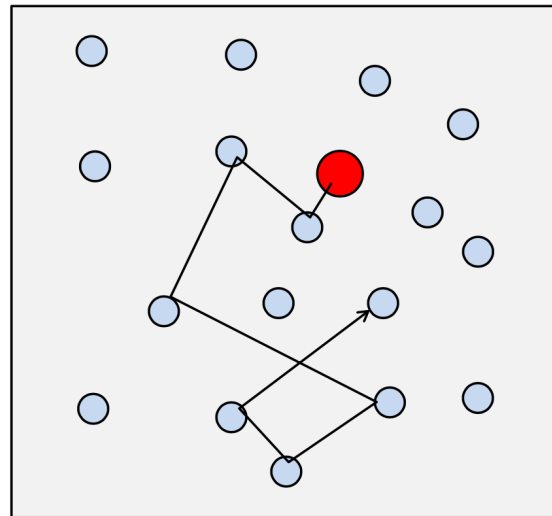
- 1 mm³ di terra contiene decine di milioni di batteri di vario tipo.
- Nel nostro organismo sono presenti miliardi e miliardi di batteri (alcune stime parlano di 30-50x10¹² cellule batteriche, a fronte di 30x10¹² cellule umane: **1.3 batteri per ogni cellula del corpo umano**). Insieme a virus, funghi e lieviti costituiscono il cosiddetto "microbioma".
- Dimensioni: fino a qualche μm. **Metodi gravimetrici.**
- Carica netta nulla.

Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura

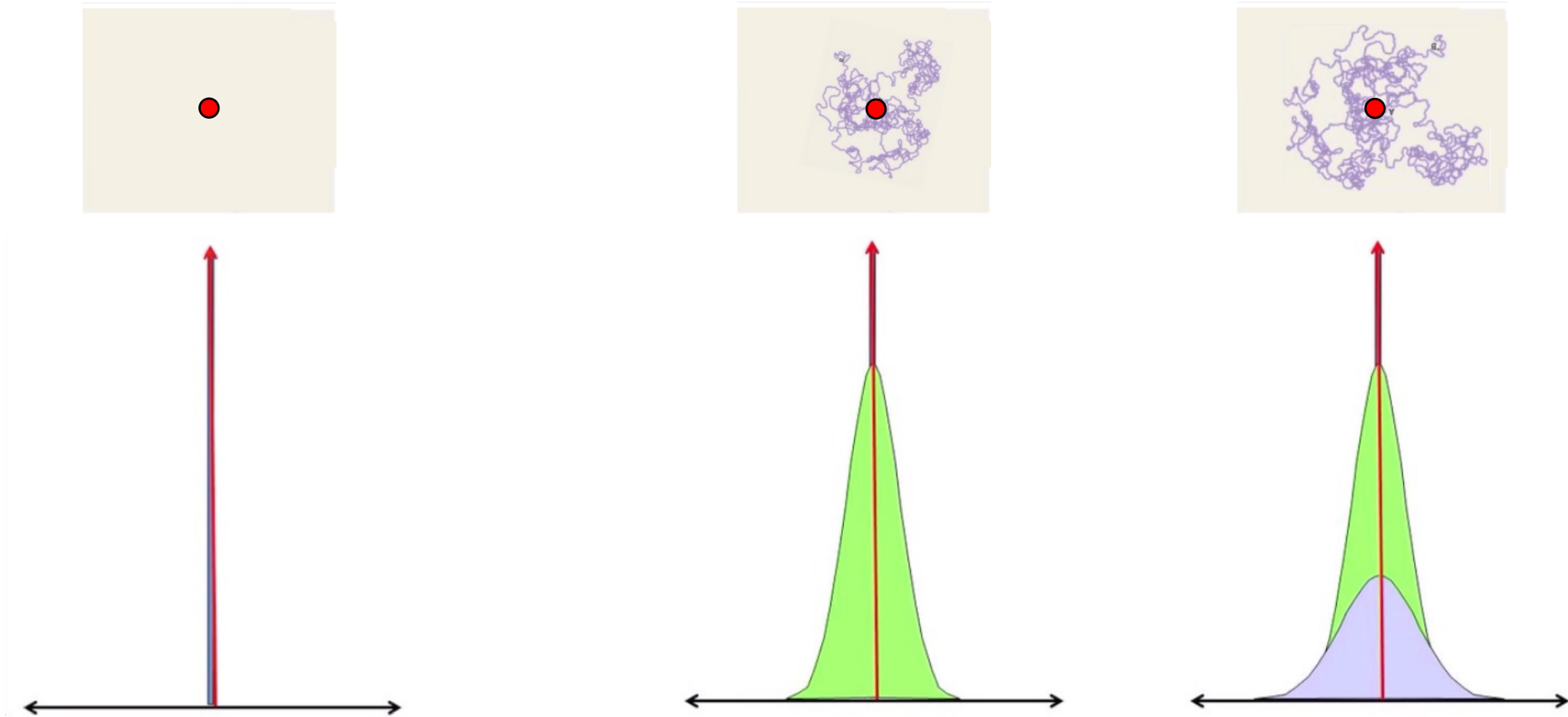
Cosa succede quando una molecola/generico analita **viene introdotto in un certo volume di liquido**? A causa delle agitazioni termiche la molecola comincerà a muoversi in maniera casuale “rimbalzando” da una molecola d’acqua e l’altra. Il moto è ovviamente quello **Browniano** e la distribuzione della sua diffusione è descritta dalla seguente equazione (seconda legge di Fick):

$$\frac{d\rho}{dt} = D\nabla^2\rho$$

Dove ρ può essere vista come la **probabilità di trovare la molecola ad una certa distanza dal punto iniziale al tempo t**.



Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura



Introduco nel volume una certa molecola al tempo $t=0$ (funzione delta):

$$\rho(x, t = 0) = \delta(x = 0)$$

Dopo un certo tempo t , la molecola si **allontanerà sempre di più dal punto di immissione** (la gaussiana che descrive la sua probabilità di trovarsi in un certo punto dello spazio si "spancia").

Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura

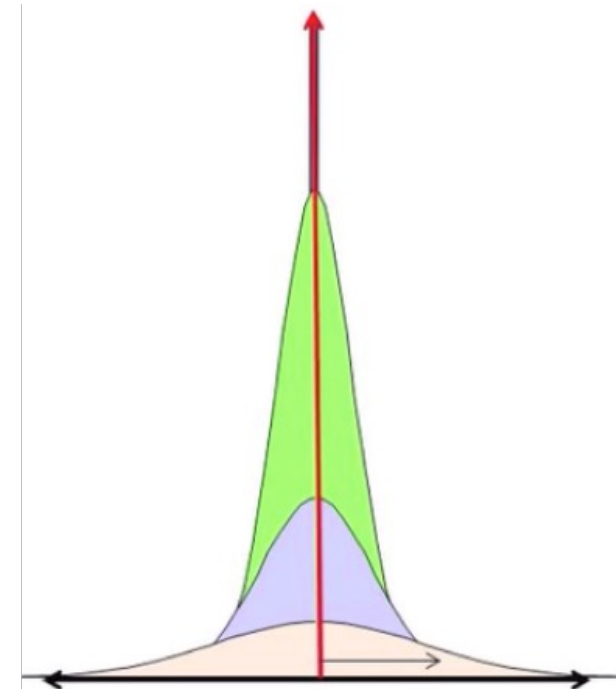
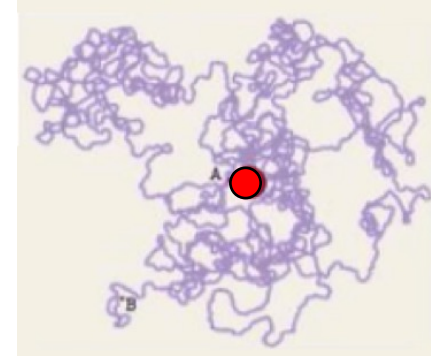
Passando a un insieme di molecole, la distribuzione della probabilità di trovarle alla distanza x dal punto di inserimento, nel caso di uno spazio monodimensionale sarà:

$$\rho(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi \cdot D \cdot t}} e^{-x^2/4Dt}$$

con **N numero di molecole**. In media dopo un certo tempo **t** la molecola si troverà ad una distanza **x** che dipenderà **dal coefficiente di diffusione**:

$$x \sim \sqrt{D \cdot t}$$

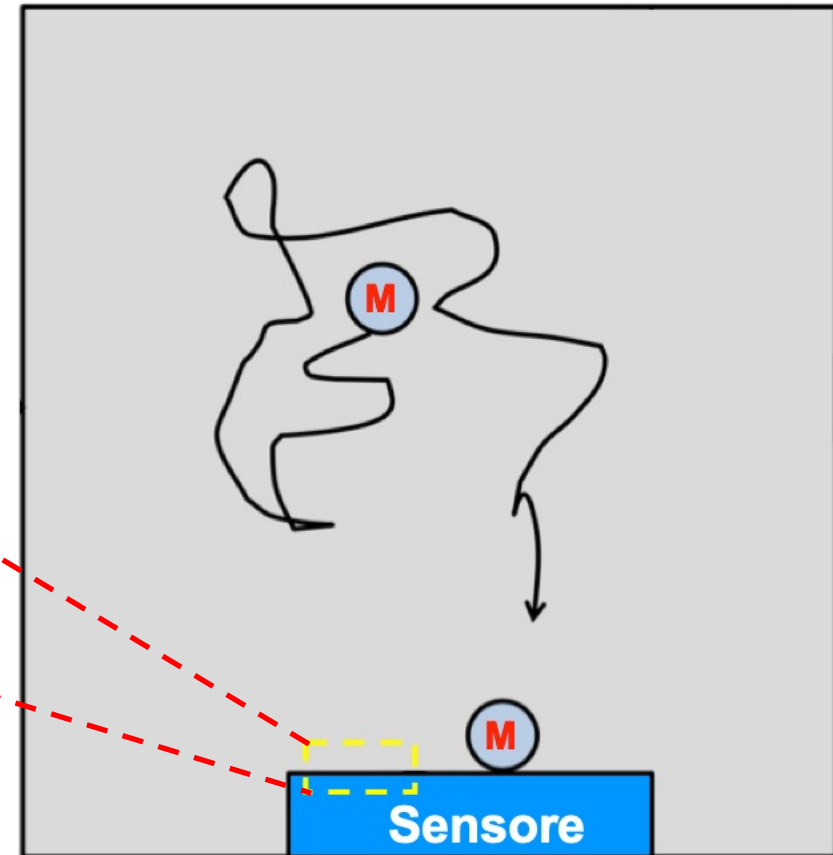
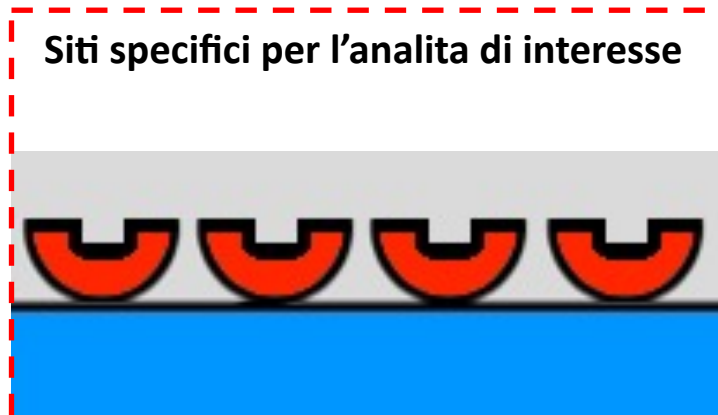
D diminuisce per particelle grandi e per soluzioni viscosse.



Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura

Processo diffusivo.

Mettiamoci ora nel caso in cui la particella/molecola **M** sia introdotta non in un generico volume di acqua ma in un sistema contenente il nostro sensore (per esempio poggiato sul fondo di un contenitore). Prima che il sensore possa rilevarne la presenza, come abbiamo visto **la molecola deve fisicamente raggiungere il sito di misura**.

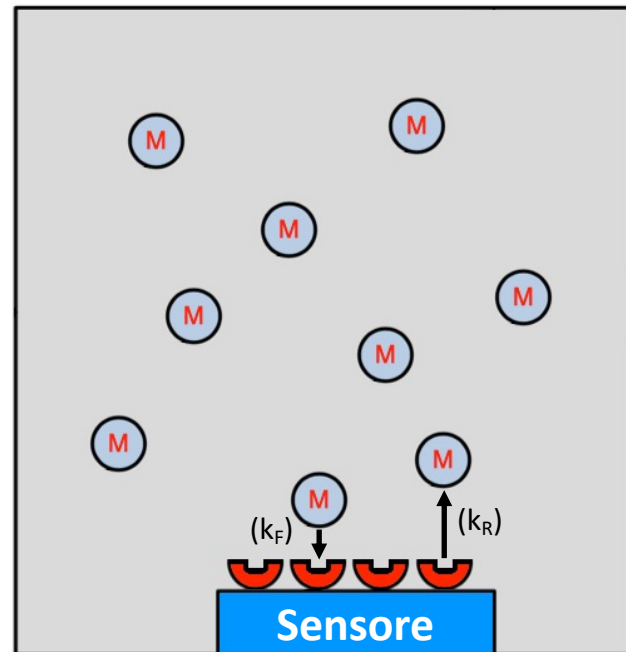


Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura

Processo di cattura dell'analita sulla superficie.

Consideriamo ora il caso di più molecole dell'analita M presenti nel volume. **Dopo un certo tempo, un certo numero di molecole raggiungeranno la superficie.** Qui, in virtù del particolare fenomeno fisico d'interfaccia, l'analita instaurerà un certo legame con la superficie:

- Adsorbimento fisico (o fisisorbimento)
- Legame covalente o simile (Es: legame Au-tiolo)
- Legami non covalenti altamente specifici (Es: legame antigene-anticorpo o ibridazione di DNA)
- Protonazione/de-protonazione di siti superficiali (Es: ISFET)



Biosensori – fenomeni diffusivi e di cattura

$$\frac{dN}{dt} = k_F(N_0 - N) \cdot \rho_S - k_R N$$

$$N(t) = N_{SS} \left(1 - e^{-(k_F \cdot \rho_S + k_R)t} \right)$$

$$N_{SS} = \frac{k_F \cdot \rho_S}{k_F \cdot \rho_S + k_R} \cdot N_0$$

N : numero di siti occupati.

N_0 : numero di siti disponibili sulla superficie.

N_{SS} : numero di siti occupati per $t \rightarrow \infty$.

ρ_S : densità dell'analita in soluzione.

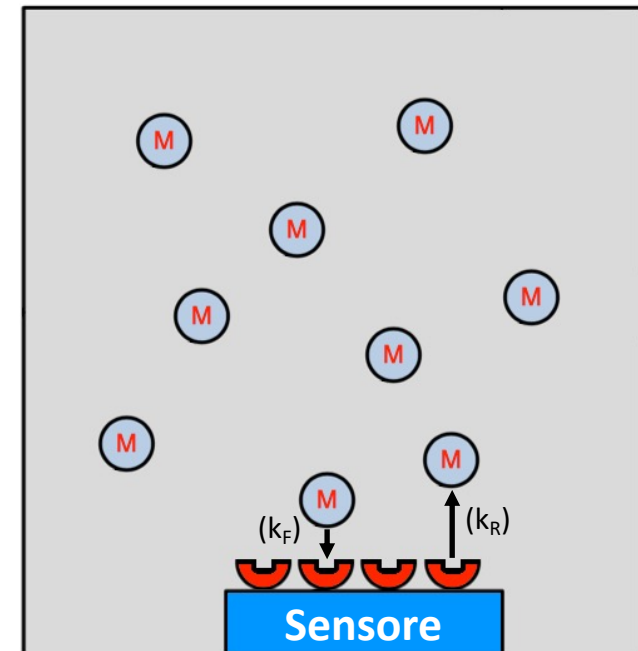
k_F : coefficiente di "stickiness". Dà una misura di quanto il sito sia capace di legare, e mantenere legato, l'analita.

k_R : coefficiente di "rilascio".

Approssimazione sulla superficie:

$$k_R \rightarrow 0, \rho_S \rightarrow 0$$

Cioè **la concentrazione superficiale è pari a 0** (a regime tutti i siti sono sempre occupati). È un altro modo per dire che il **processo è limitato dalla diffusione**.



Biosensori: labeled VS label-free

Una volta catturato l'analita, come può avvenire la trasduzione? Approcci "Labeled" vs "label-free".

Un label (marcatore) è definito come una **molecola che viene "attaccata" (stabilmente o temporaneamente) alla molecola di interesse** in modo da permettere una sua **rilevazione indiretta**. Il processo di labeling richiede passaggi aggiuntivi quali la sintesi e la purificazione di molecole altamente selettive ed è spesso un **processo lungo, costoso e a bassa resa**.

Negli approcci labeled, non stiamo più facendo affidamento a proprietà intrinseche della molecola target quanto piuttosto ad un **evento associato al suo legame con il marcatore con il quale ha interagito**.

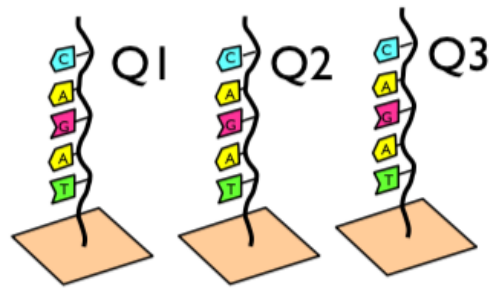
Esistono marcatori di vario tipo:

- Labeling con **marcatori fluorescenti**. È tutt'ora il metodo più utilizzato grazie al fatto che i probe fluorescenti sono stabili, facili da manipolare e permettono di raggiungere buone sensibilità.
- Labeling tramite **marcatori radioattivi**.
- Labeling con **molecole chemiluminescenti**.
- Labeling con **nanoparticelle**.

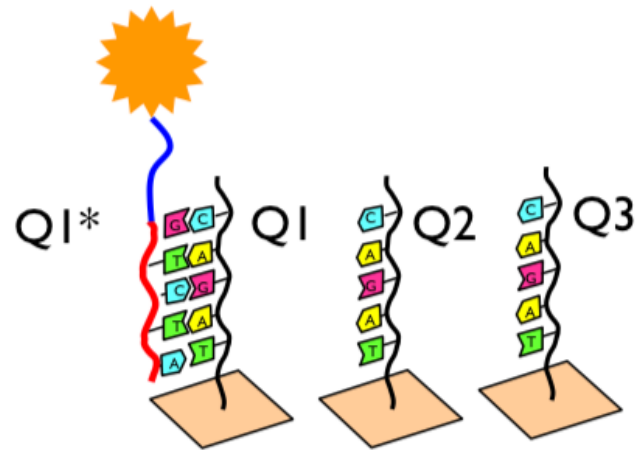
Biosensori: labeled VS label-free

Example: **DNA microarray**. These devices measures the **expression of multiple genes simultaneously**.

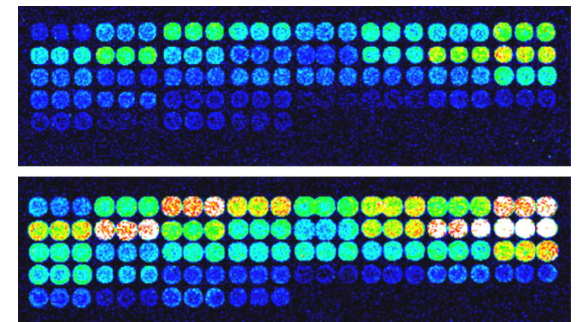
Single DNA strand specific to a specific complementary strand is immobilized on the bottom of the chip. **Different place in the chip are functionalized with different strands.**



A sample from the subject (for example a **saliva sample**) is prepared by **extracting the DNA, splitting it into different strands** specific to specific gene and **labeled with a fluorescent or chemiluminescent probe**.



The samples are exposed to a light with a certain wavelength and **we have a fluorescence only when the hybridization occurs**. The fluorescence intensity gives the info on the expression of the specific gene.



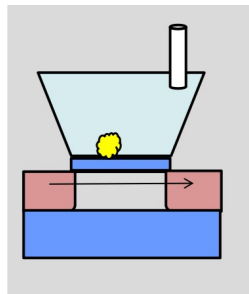
Biosensori: labelled VS label-free

I **metodi label-free** di rilevazione utilizzano invece **proprietà fisiche delle molecole da rilevare** quali per esempio:

- **peso molecolare** (metodi gravimetrici quali trasduttori a microcantilever e microbilance al quarzo).
- **indice di rifrazione** (metodi basati sulla risonanza dei plasmoni superficiali, Surface Plasmon Resonance – SPR).
- **proprietà chimiche** (metodi amperometrici).
- **carica** (metodi potenziometrici).

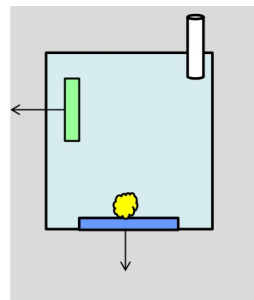
L'interazione della molecola con il sensore è direttamente tradotta in un segnale elettrico, ottico o meccanico e **non richiedono l'ausilio di marcatori**, permettendo così la rilevazione diretta e priva di "mediatori" dell'analita d'interesse.

Potenziometrico



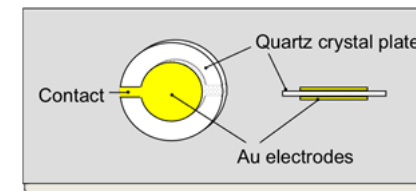
Carica → Corrente

Amperometrico



Reazione redox → Corrente

Gravimetrico



Massa → Frequenza

Biosensori: labelled VS label-free

Detection methods applicable to the development of protein microarray technology.

		Labeling/Preparation	Handling	Instrumentation Cost	Quantitative	High Throughput
Labeling	Fluorescent probe	Yes/Medium	Easy	Inexpensive	Yes/No	Yes
	Radioisotope	Yes/Difficult	Difficult	Medium	Yes	Yes/No
	Chemiluminescent probe	Yes/Medium	Easy	Inexpensive	Yes/No	Yes
	Electrochemical probe	Yes/Medium	Easy	Inexpensive	Yes	Yes/No
	Nanoparticles	Yes/Medium	Easy	Inexpensive	Yes	Yes
Non- Labeling	MS	No/Easy	Easy	Expensive	No	Yes/No
	Microcantilever	No/Difficult	Difficult	Expensive	Yes	No
	QCM	No/Medium	Easy	Inexpensive	Yes	No
	SPR	No/Medium	Easy	Expensive	Yes	Yes
	AR	No/Medium	Easy	Inexpensive	Yes	Yes

Biosensori

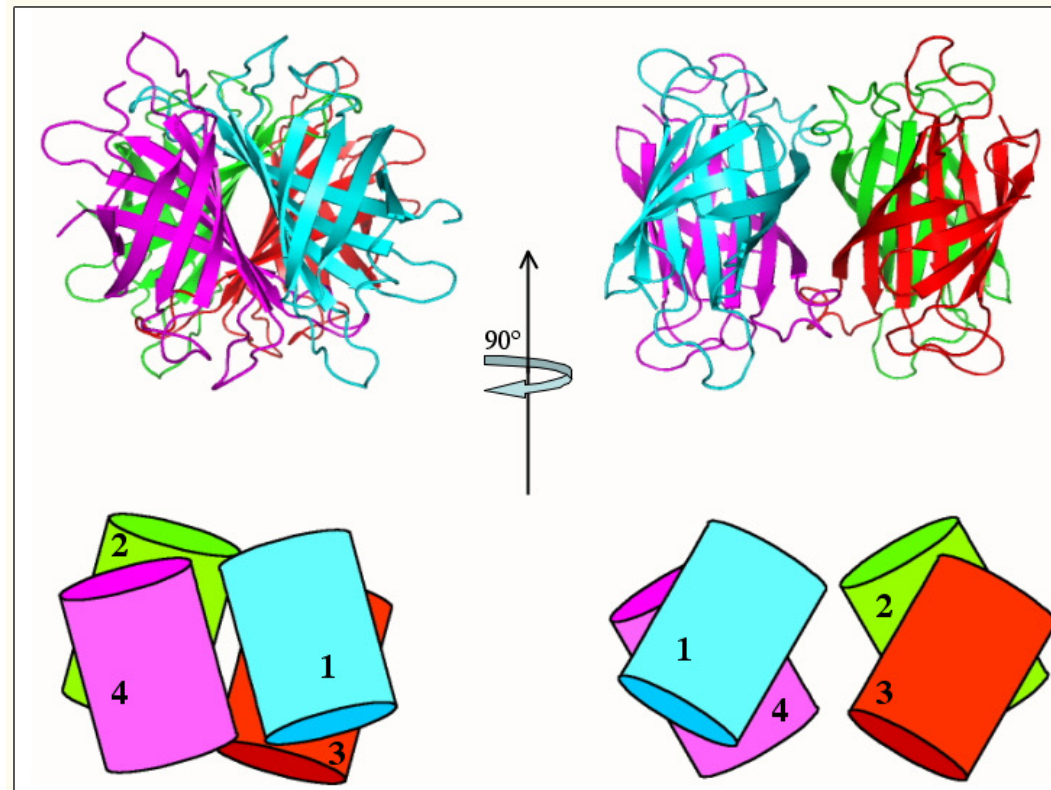
Biosensori ad affinità. Sfruttano la capacità di alcune molecole (anticorpi, recettori, acidi nucleici, proteine...) di **legarsi in maniera selettiva all'elemento di bio-riconoscimento**.

- **Immunosensori:** sfruttano il legame altamente specifico che si crea tra anticorpo (Ac) e il relativo antigene (Ag)
- Biosensori ad **acidi nucleici** (DNA/RNA): sfruttano il legame di singole catene con la rispettiva catena complementare

I biosensori catalitici. Utilizzano bio-componenti in grado di riconoscere specifiche molecole e di trasformarle in prodotti attraverso una reazione chimica.

Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

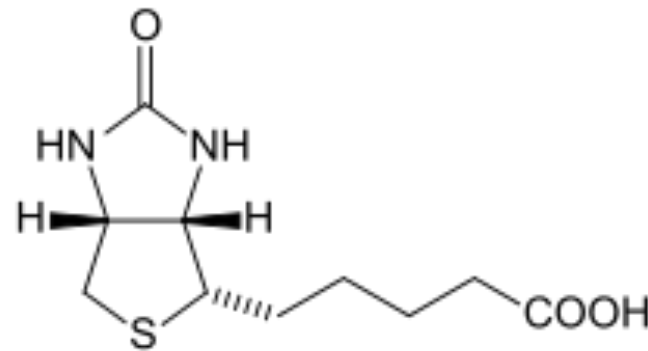
L'avidina è una **glicoproteina tetrameric**a che lega in maniera altamente specifica la biotina (è un suo chelante), la quale è presente in alimenti come uova e alcuni semi.



Circa 70 kDa

Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

La biotina (**vitamina H o vitamina B8**) venne scoperta a seguito di alcuni studi riguardanti le alterazioni cutanee e della crescita che si verificavano in animali nutriti esclusivamente con albume d'uovo crudo o proteine da esso estratte.



244 Da

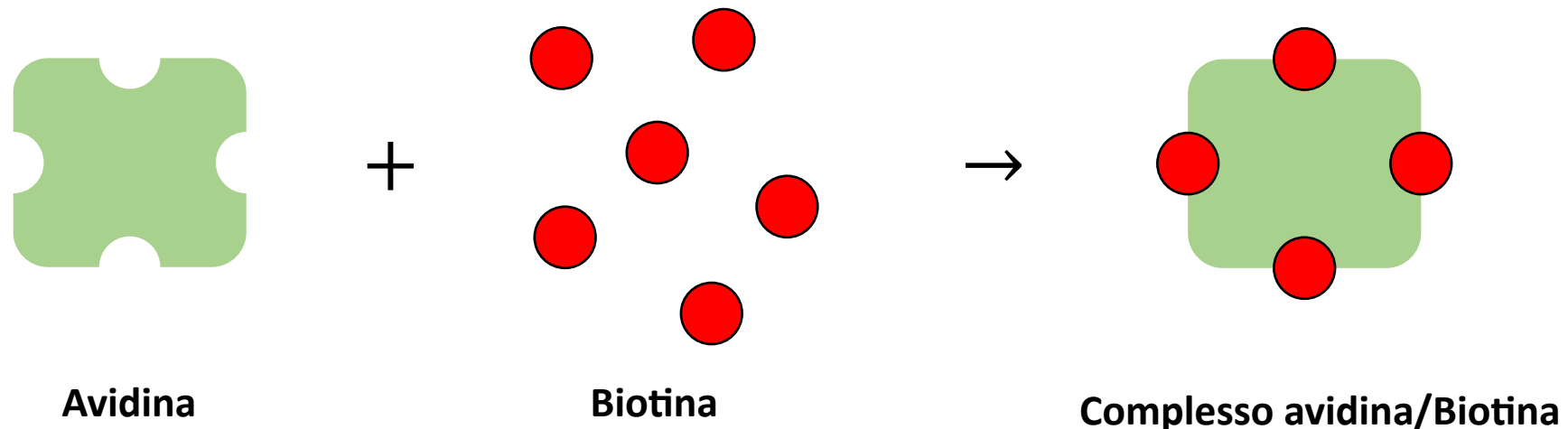
Il fattore responsabile della comparsa della "malattia da bianco d'uovo" venne individuato nel 1931. Oggi è noto il fenomeno alla base di tale patologia: il legame tra la biotina e l'avidina (una glicoproteina dell'albume d'uovo).

L'avidina è resistente all'azione proteolitica dell'apparato gastrointestinale per cui il legame con la biotina rende quest'ultima non assorbibile.

Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

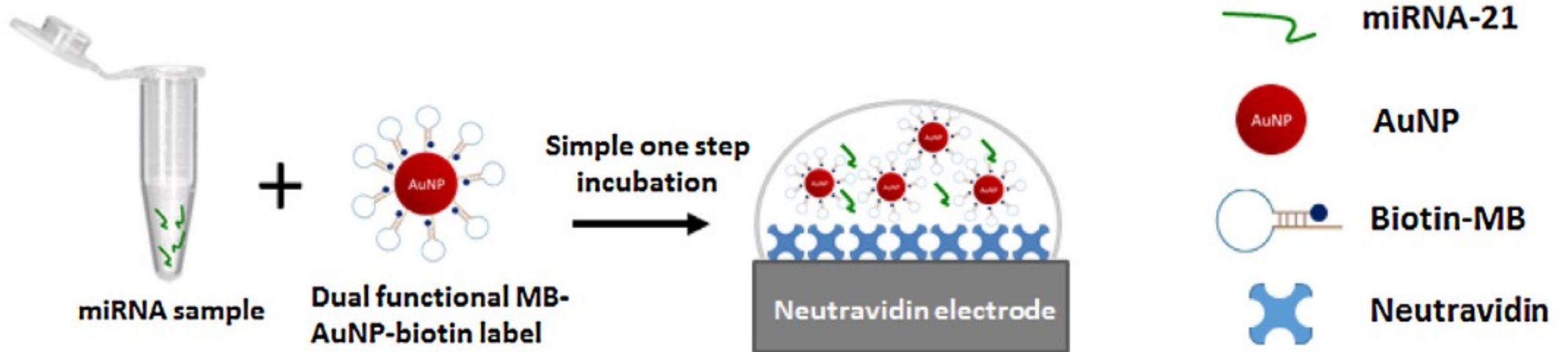
Il legame tra Avidina-Biotina è la **più forte interazione non covalente conosciuta** ($K_d = 10^{-15}$ M). Il legame che formano è rapidissimo e, una volta formato, è praticamente **insensibile a pH, temperatura, solventi organici o sostanze denaturanti** (ovviamente entro certi limiti). Questa caratteristica è presente anche in proteine simili come la Streptavidina.

Esempio. Nell'uovo crudo la biotina è chelata dall'avidina; per rompere questo legame bisogna denaturare la glicoproteina con un'azione termica (la cottura): in questo modo viene "liberata" la biotina. **L'avidina è così chiamata per l'avidità con cui tiene la biotina.**



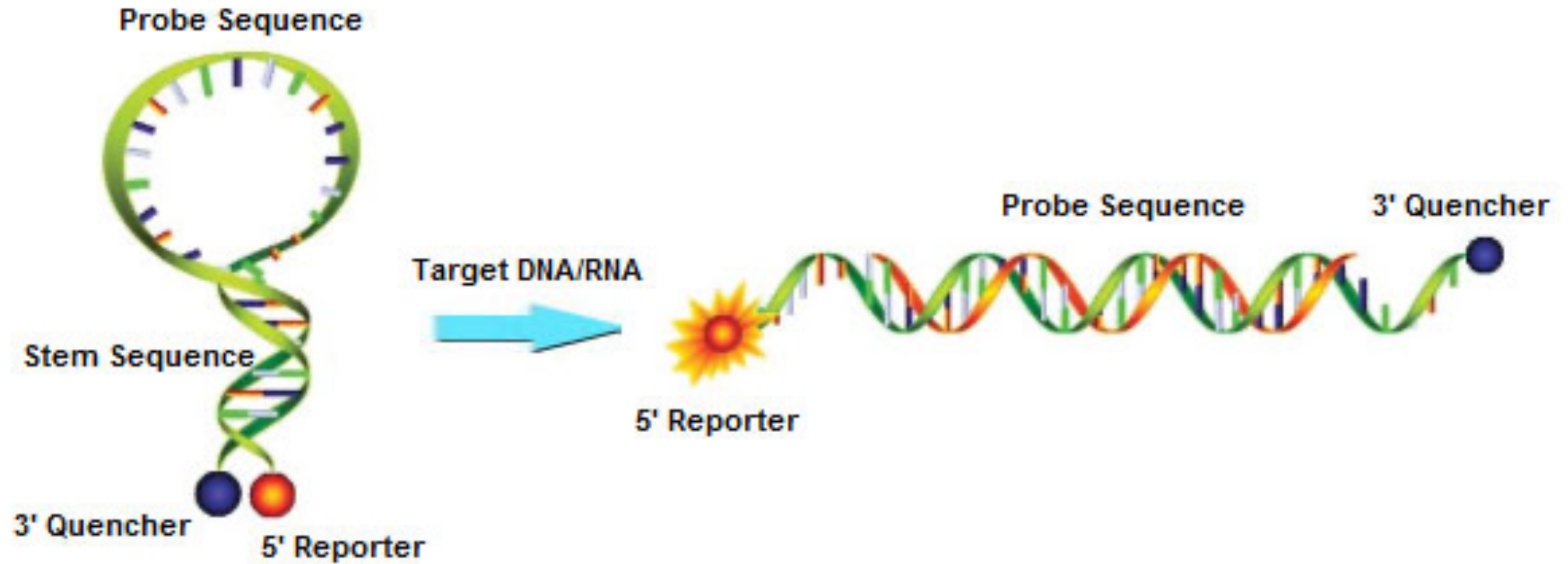
Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

ESEMPIO: Sensing di micro RNA

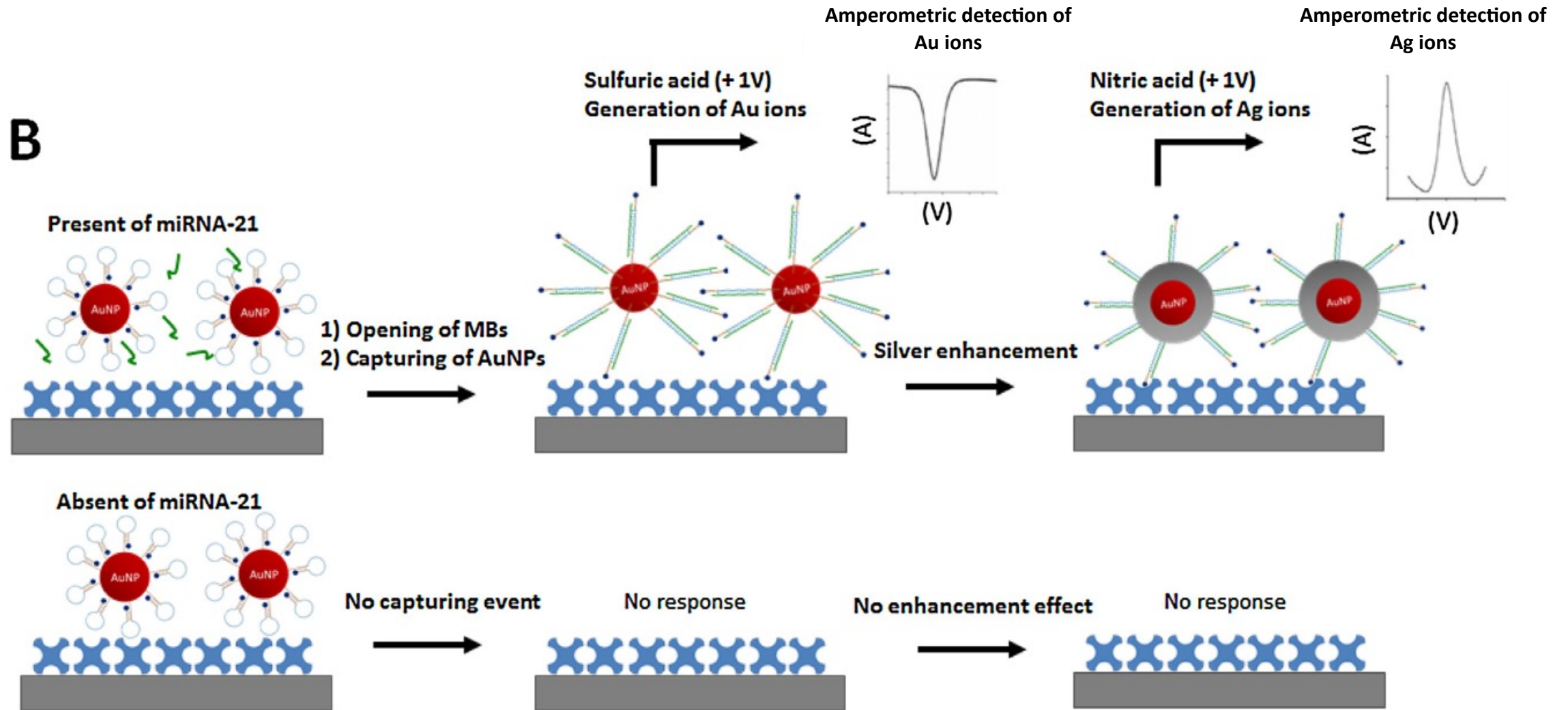


Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

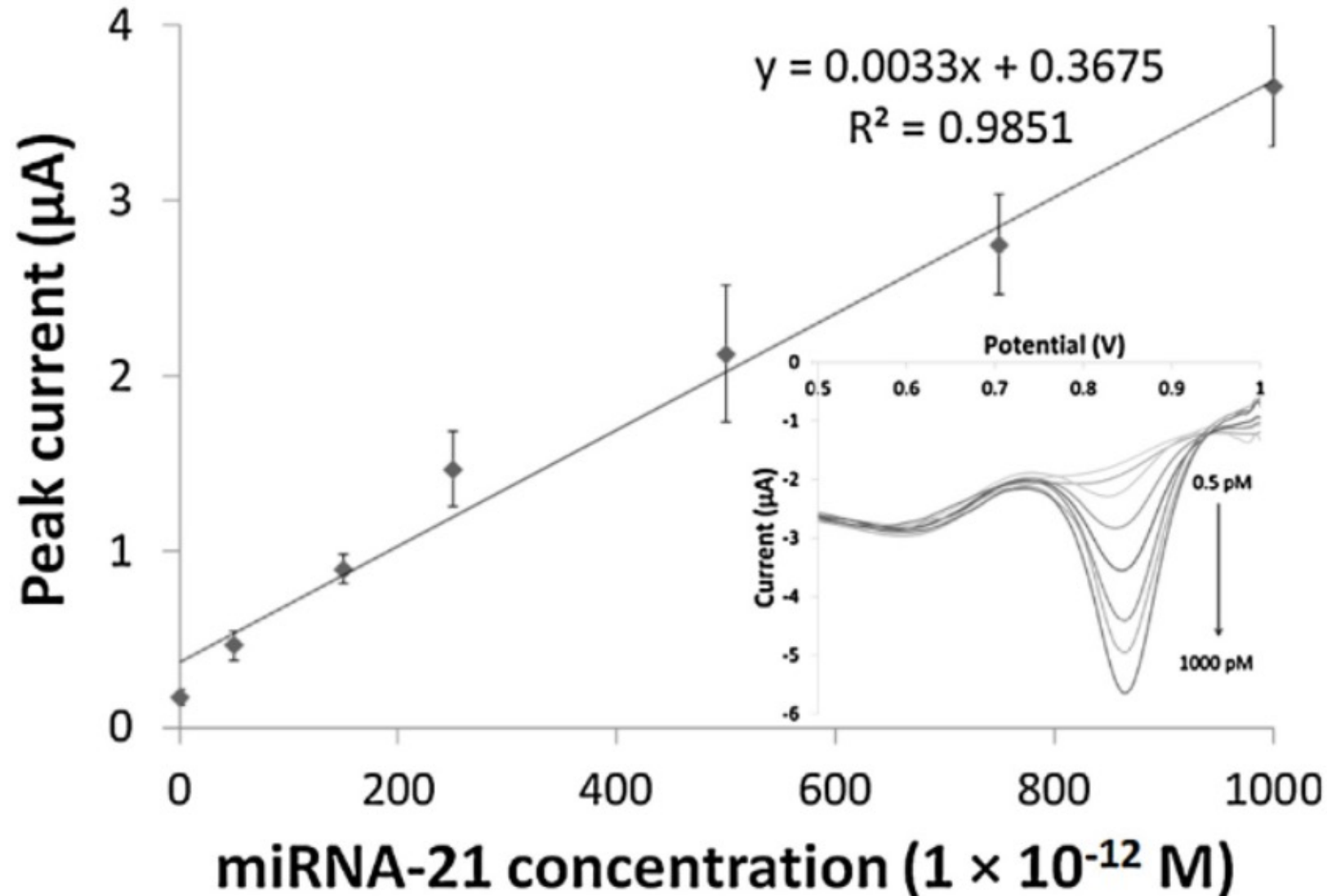
Molecular beacon



Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

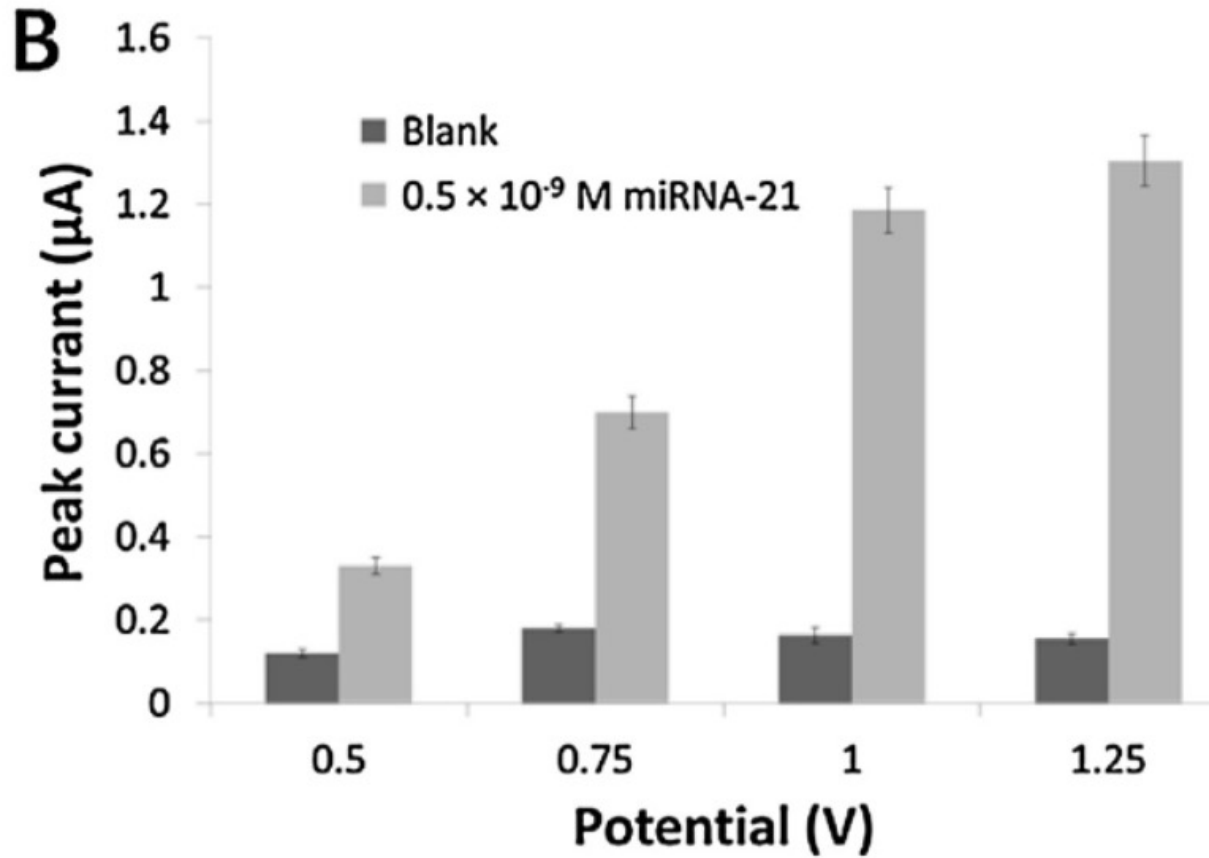


Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

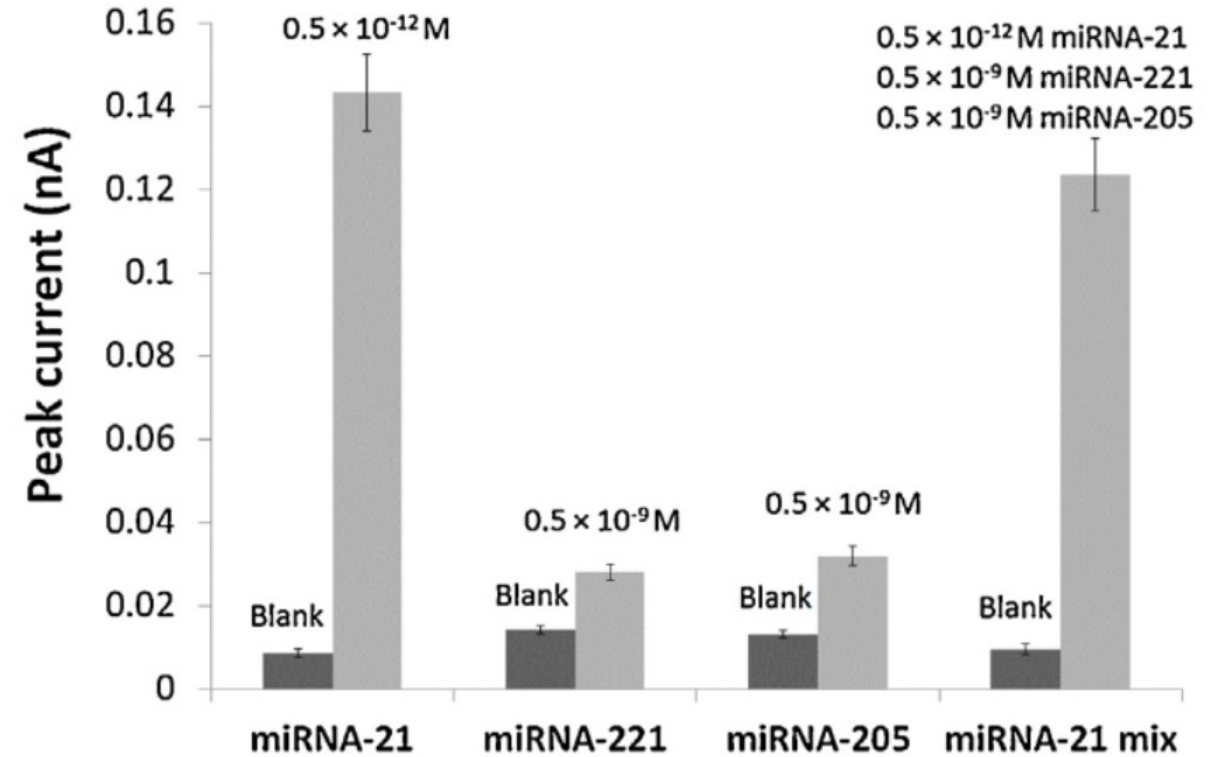


Biosensori ad affinità - Sistema avidina-biotina

Finestra di potenziale

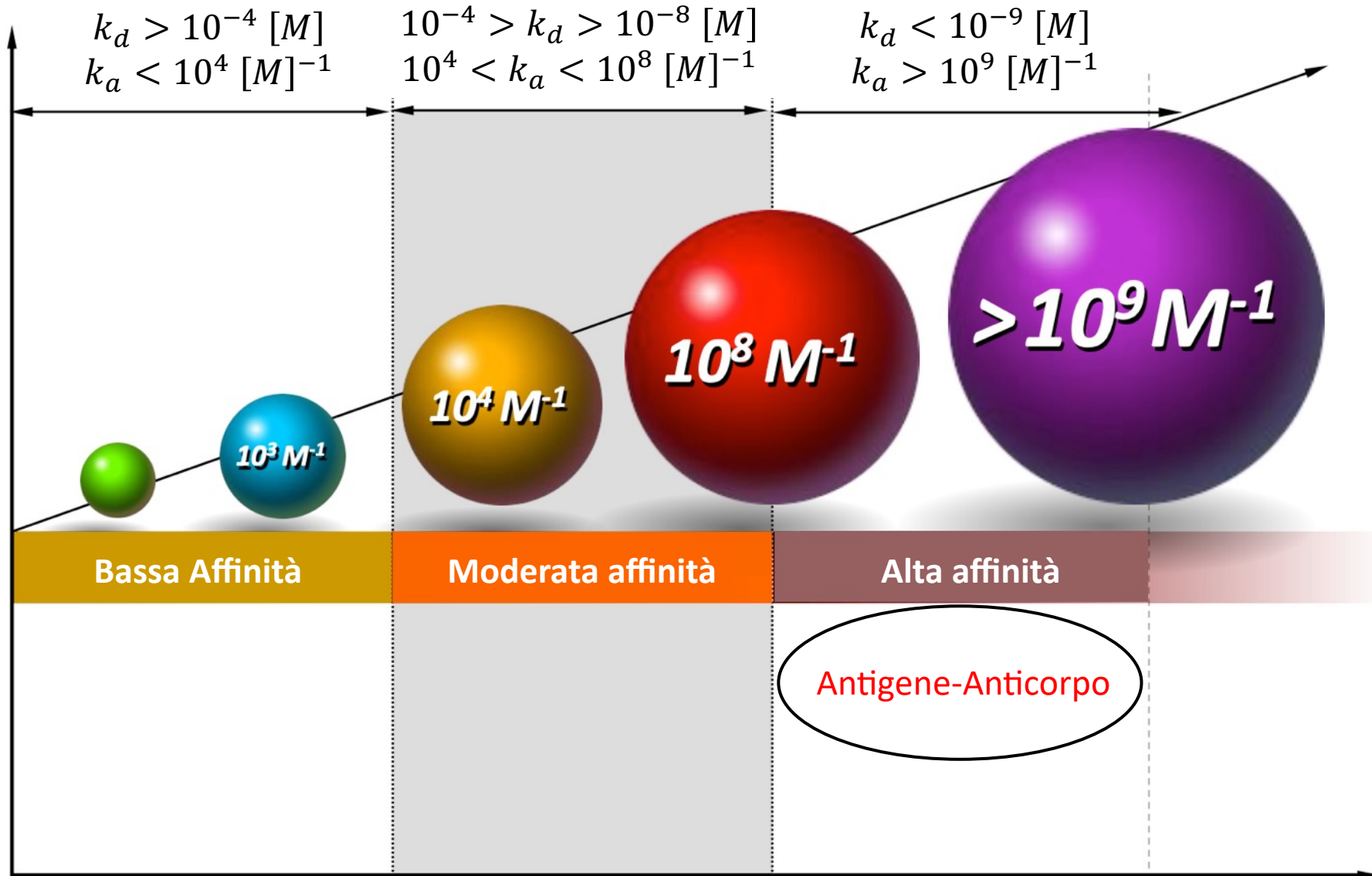


Analisi di specificità



Immuno sensori

Biosensori ad affinità - Immunosensori



Biosensori ad affinità - Immunosensori

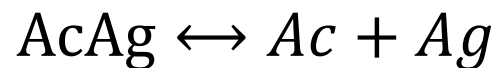
Gli **immunosensori** sono un tipo particolare di biosensori basati sulla **capacità tipica degli anticorpi** di riconoscere e legare a sé i loro antigeni.

Gli anticorpi sono **proteine globulari** che giocano un ruolo fondamentale nel sistema immunologico degli organismi viventi. Tramite tecniche di ibridizzazione e clonazione è attualmente **possibile produrre anticorpi monoclonali che riconoscono e sono capaci di legarsi praticamente a qualsiasi tipo di molecola o antigene**.

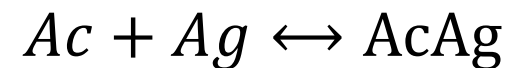
È quindi possibile realizzare immunosensori per la rivelazione di una vasta gamma di sostanze. Gli anticorpi (Ac) reagiscono in **maniera reversibile** con gli antigeni (Ag) e l'affinità fra i due è determinata dalla **costante di dissociazione k_d** .

Biosensori ad affinità - Immunosensori

- K_d ha un valore tipicamente compreso tra 10^{-4} e 10^{-12} M
- **Valori più piccoli indicano una affinità più elevata**, cioè maggiore numero di anticorpi legati in un dato momento a parità di concentrazione iniziale (equilibrio della reazione spostato verso il complesso AgAc).
- Nella risposta immunitaria la molecola dell'antigene si lega a siti ben precisi chiamati **siti antigenici o epitopi**.
- Il legame che si instaura tra Ac ed Ag è di tipo **non covalente**. Le forze che agiscono sono **forze elettrostatiche, ponti di idrogeno, legami idrofobici e forze di Van der Waals**.



$$k_d = \frac{[Ac][Ag]}{[AcAg]} [M]$$

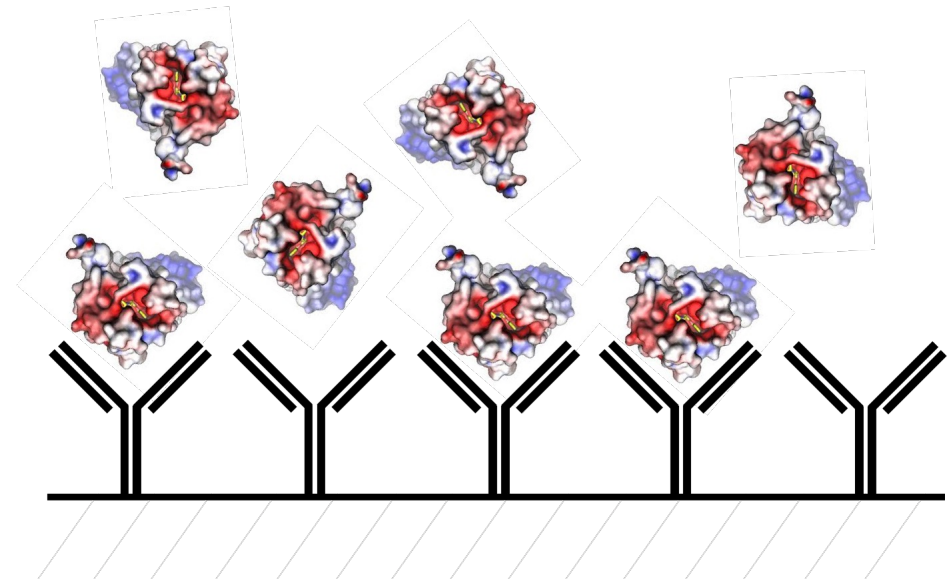
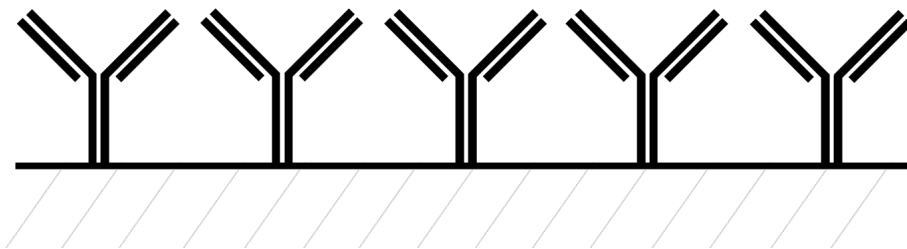


$$k_a = \frac{1}{k_d} [M]^{-1}$$

Legame reversibile di tipo non covalente (su uno specifico sito di Ac).

Biosensori ad affinità - Immunosensori

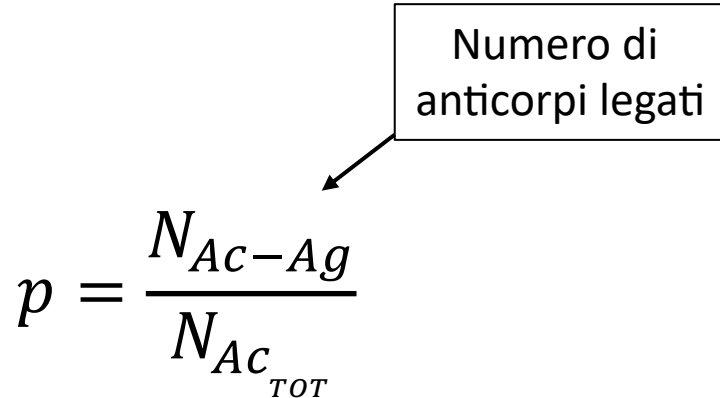
- Il **recettore (anticorpo)** viene immobilizzato su un supporto che viene posto in contatto con la soluzione contenente **l'analita (antigene)** da misurare
- L'anticorpo reagisce con gli antigeni in soluzione. Maggiore è la concentrazione di antigene, più alto sarà il numero di anticorpi legati.



Biosensori ad affinità - Immunosensori

In sintesi (i principi sono analoghi agli altri sensori ad affinità):

- **Ag** sostanza target (analita).
- Ac immobilizzato su una superficie e immerso in soluzione.
- Si forma il **complesso Ag-Ac sullo strato anticorpale**.
- La percentuale **p** di Ac legato è **funzione della concentrazione di Ag in soluzione e di k_d** .
- Necessità di un modello.

$$p = \frac{N_{Ac-Ag}}{N_{Ac_{TOT}}}$$


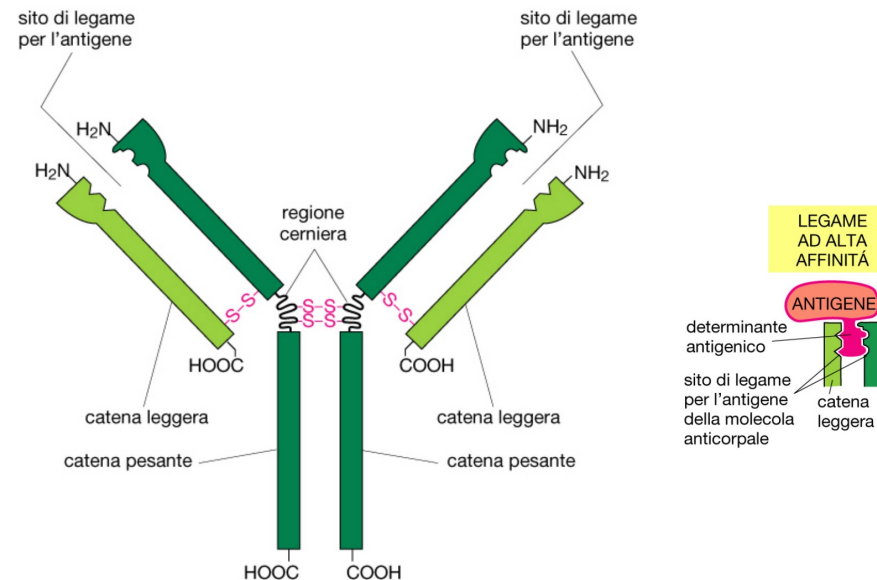
$$p = f([Ag], k_d)$$

Biosensori ad affinità - Immunosensori

La reazione tra antigene e anticorpo avviene grazie a:

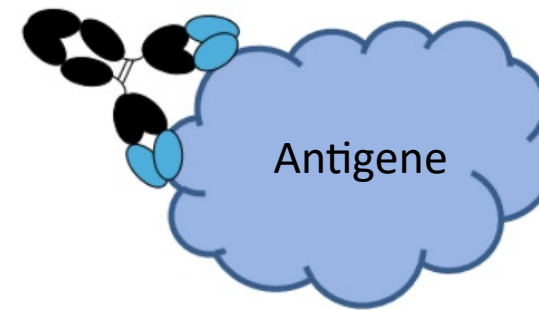
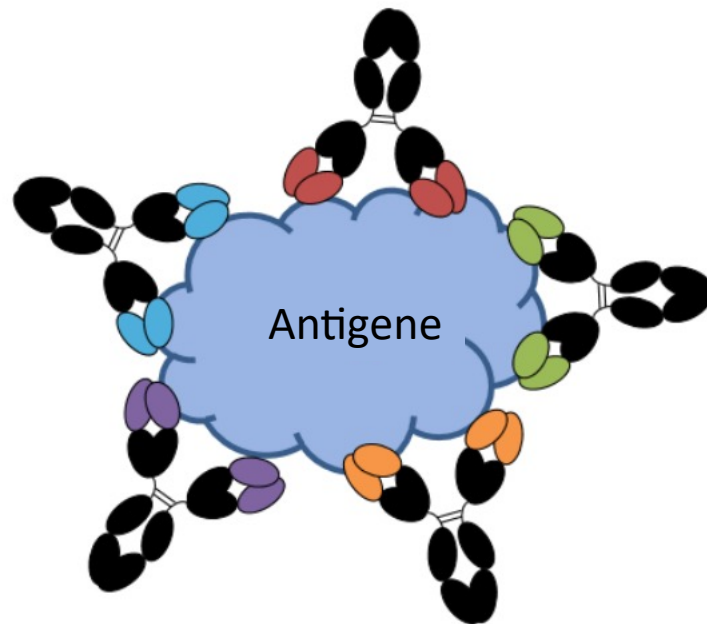
- congruenza della superficie molecolare tra i siti attivi di entrambe le molecole
- **legami di tipo debole** (ponti di idrogeno, forze di van der Waals, interazione dipolo-dipolo)

La reazione tra antigene e anticorpo è altamente specifica. Un antigene **reagisce solo con gli anticorpi prodotti in risposta ad esso e diretti contro di esso**. Un anticorpo reagisce solo con l'antigene dal quale è stato evocato e contro il quale è diretto.



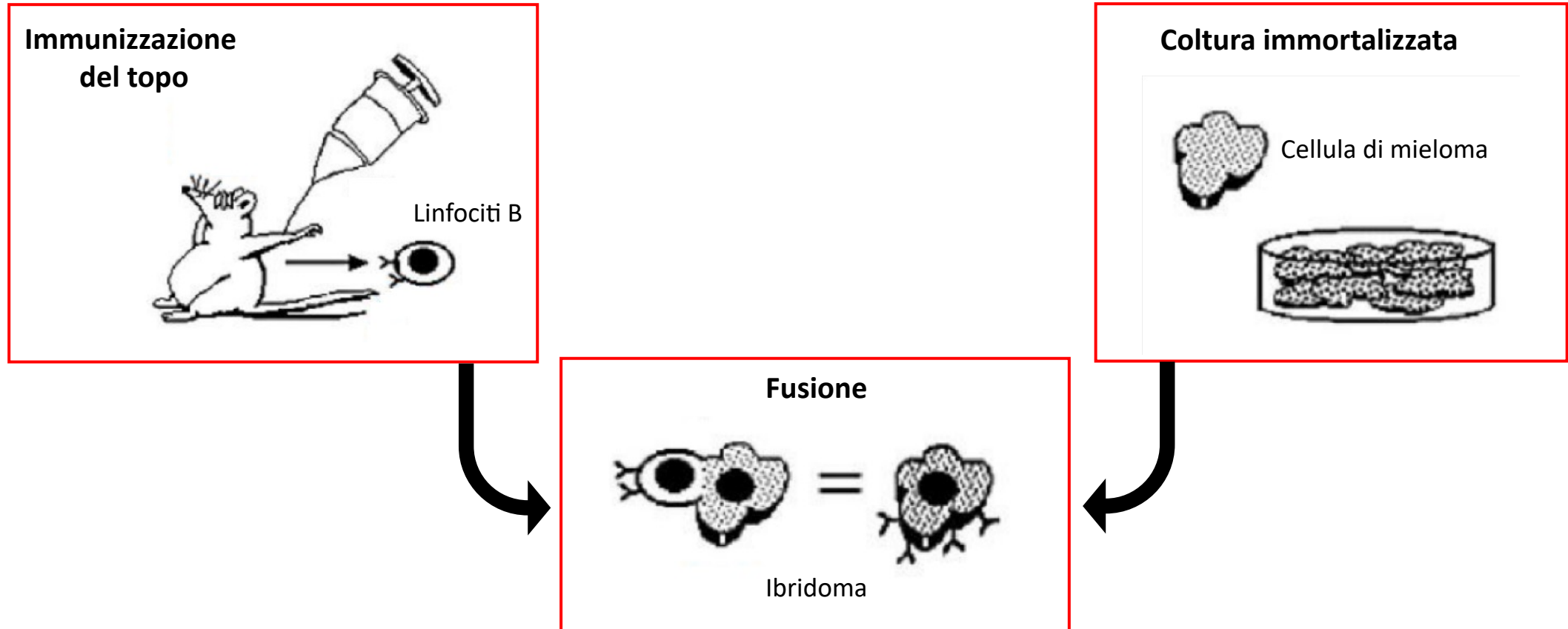
Produzione di anticorpi monoclonali – tecnica dell'ibridoma

Ogni specifico anticorpo che riconosce uno specifico epitopo (o **determinante antigenico**) è prodotto da uno specifico **linfocita B**. Ai fini delle applicazioni biosensoristiche, è necessario disporre di un **clone di linfociti B che produca grandi quantità di un anticorpo** in grado di **legarsi a un solo determinante antigenico**: un anticorpo monoclonale. Gli anticorpi monoclonali sono estremamente specifici nel legare una determinata sequenza (epitopo) presente su un antigene.



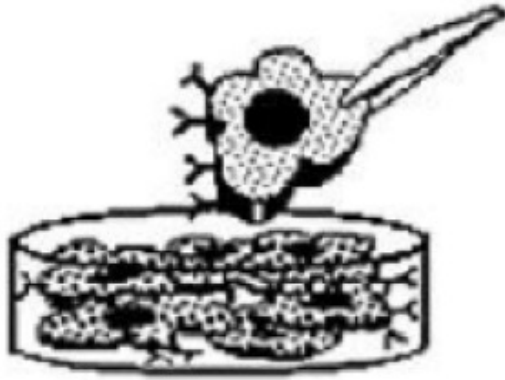
Produzione di anticorpi monoclonali – tecnica dell'ibridoma

Per produrre un anticorpo monoclonale specifico per un certo antigene è necessario immunizzare un topo (il quale funge da **vero e proprio bioreattore**) con tale antigene. **I linfociti B vengono poi isolati dalla milza** o dai linfonodi dell'animale. Si procede poi alla **fusione dei linfociti B con la linea cellulare immortalizzata adatta**. Le linee di mieloma sono quelle maggiormente utilizzate, dato che queste cellule tendono a fondersi con i linfociti B e dare origine ad **ibridi stabili**.

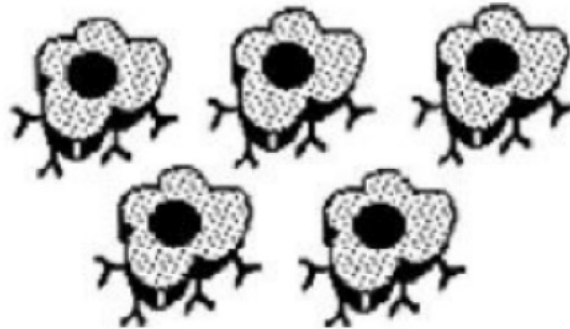


Produzione di anticorpi monoclonali – tecnica dell'ibridoma

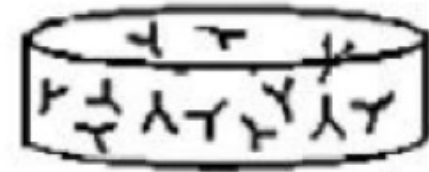
Gli **ibridi generati vengono selezionati in terreni di coltura selettivi** in cui cresceranno e sopravvivranno solo gli ibridi. Le **cellule fuse vengono** poi coltivate e una volta identificati i pozzetti contenenti l'anticorpo della specificità voluta, vengono **clonate**. Per ottenere grandi quantità di anticorpi è possibile far crescere i cloni di ibridoma che producono anticorpi della specificità voluta in colture su larga scala.



Selezione degli ibridomi
(le cellule di mieloma e le
cellule plasmatiche non fuse
muiono)



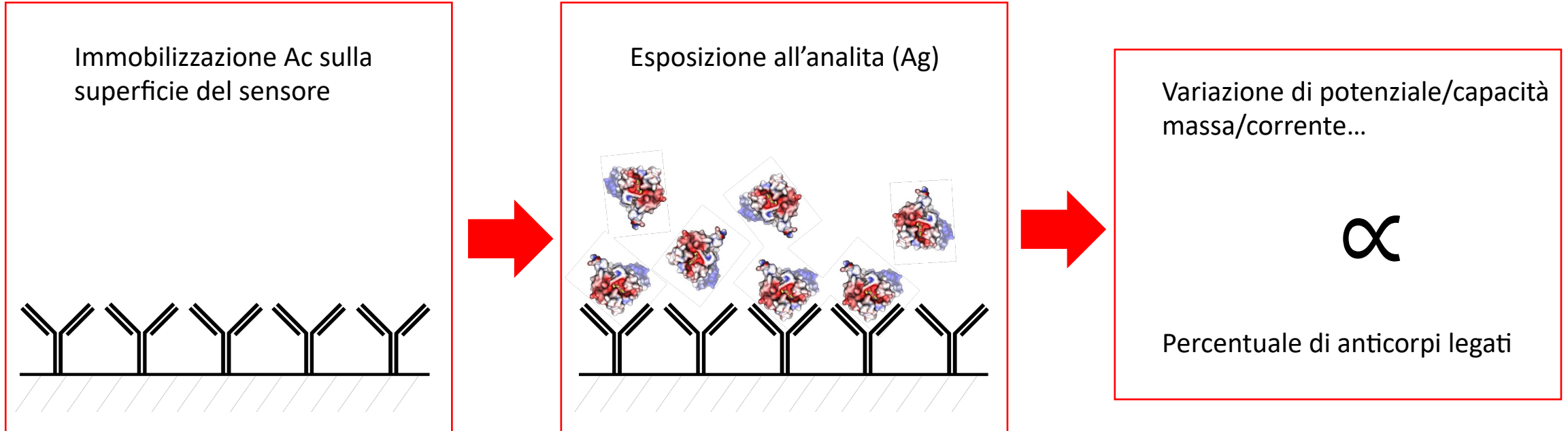
Clonazione degli ibridomi



Produzione di anticorpi su
larga scala

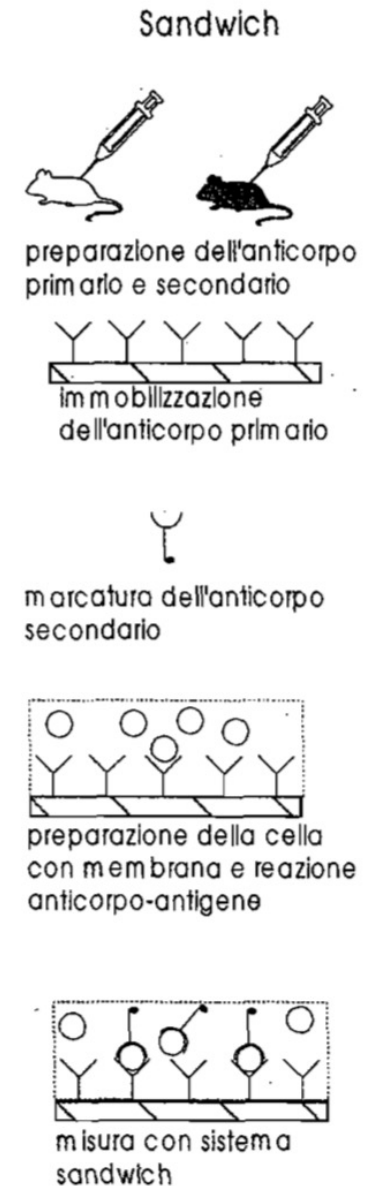
Biosensori ad affinità - Immunosensori

Immunosensori label-free. L'evento di riconoscimento e la formazione del legame viene rivelato direttamente (un **anticorpo**, o un **antigene**, immobilizzato su una **superficie solida**). Il legame fra antigene ed anticorpo provoca un cambiamento in proprietà quali **potenziale**, **capacità** o **massa**, che un trasduttore converte in un segnale misurabile.



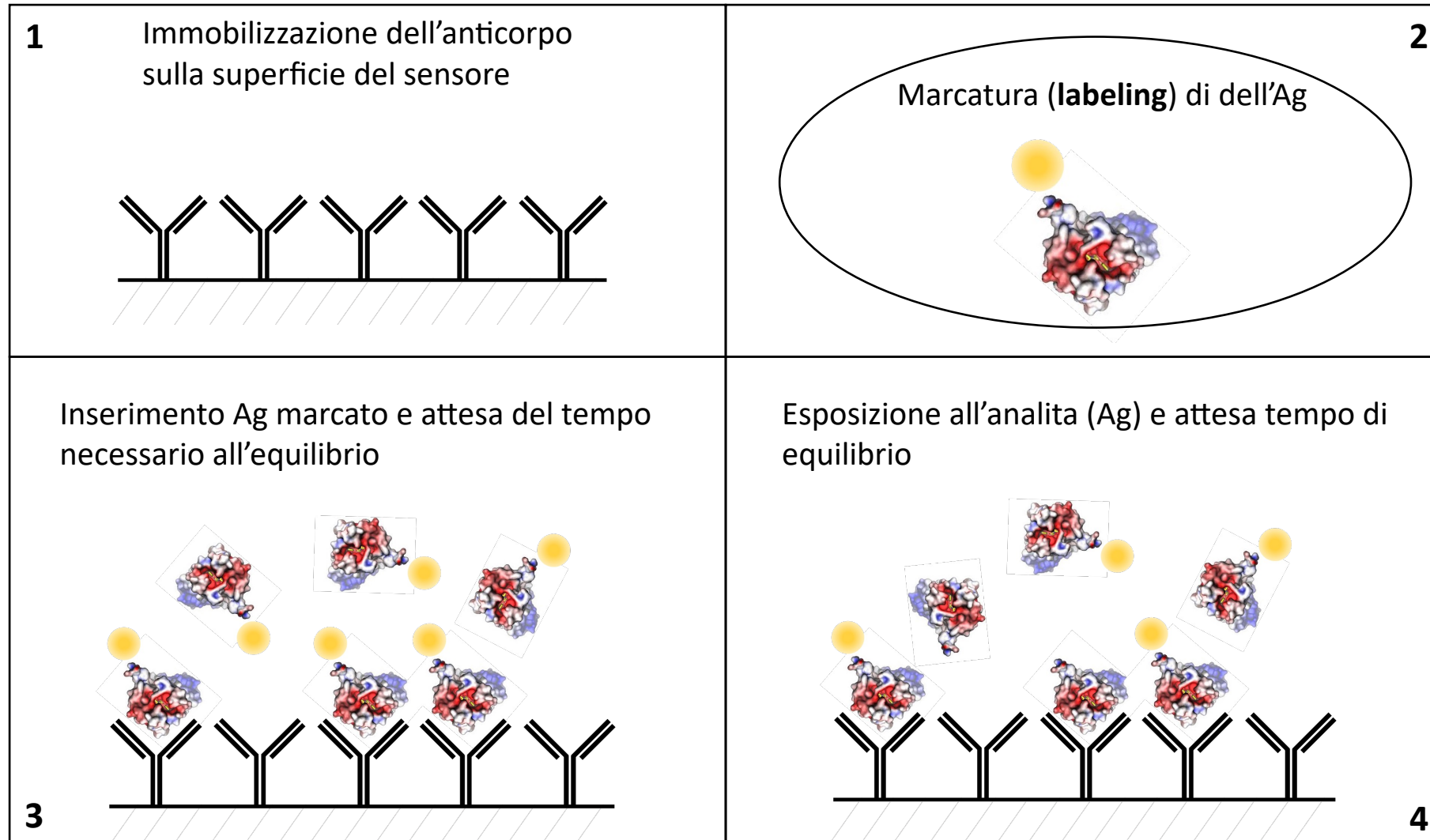
Biosensori ad affinità - Immunosensori

Immunosensori labeled: Richiedono un certo **numero di passaggi in più rispetto agli altri** (tempi di misura più lunghi). Marcatura (labeling) di Ag o Ac . Hanno però il vantaggio di sfruttare metodi di **trasduzione più vantaggiosi dal punto di vista dell'acquisizione del segnale**. I due principali tipi di immunosensori indiretti sono quelli **competitivi** e **“sandwich”**).



Biosensori ad affinità - Immunosensori

Metodo **Competitivo**: Si misurano i siti occupati dall'antigene marcato che risulta in **competizione** con Ag. **Minore legame con Ag marcato maggiore è Ag in soluzione.**



Biosensori ad affinità - Immunosensori

- Nel metodo **competitivo** l'**anticorpo viene immobilizzato sulla superficie del sensore**.
- La misura viene effettuata facendo interagire il campione (che contiene **l'antigene in concentrazione incognita**) con una **concentrazione nota** di antigene preventivamente marcato con ad esempio un fluoroforo.
- L'antigene marcato compete con il campione da analizzare nell'occupazione dei siti anticorpali.
- Una volta avvenuto il legame, il fluoroforo passa nello stato attivato ed il **segnale così ottenuto risulta essere inversamente proporzionale alla concentrazione incognita di antigene marcato**.
- Tipicamente, questa **tecnica viene utilizzata in casi in cui l'antigene è troppo piccolo per essere rivelato con metodi diretti**.
- Il **marcatore** è tipicamente una proteina (come per esempio la rodamina, un fluoroforo che assorbe a circa 550 nm - verde - e riemette a 610 – arancione/rosso) coniugata con l'antigene.

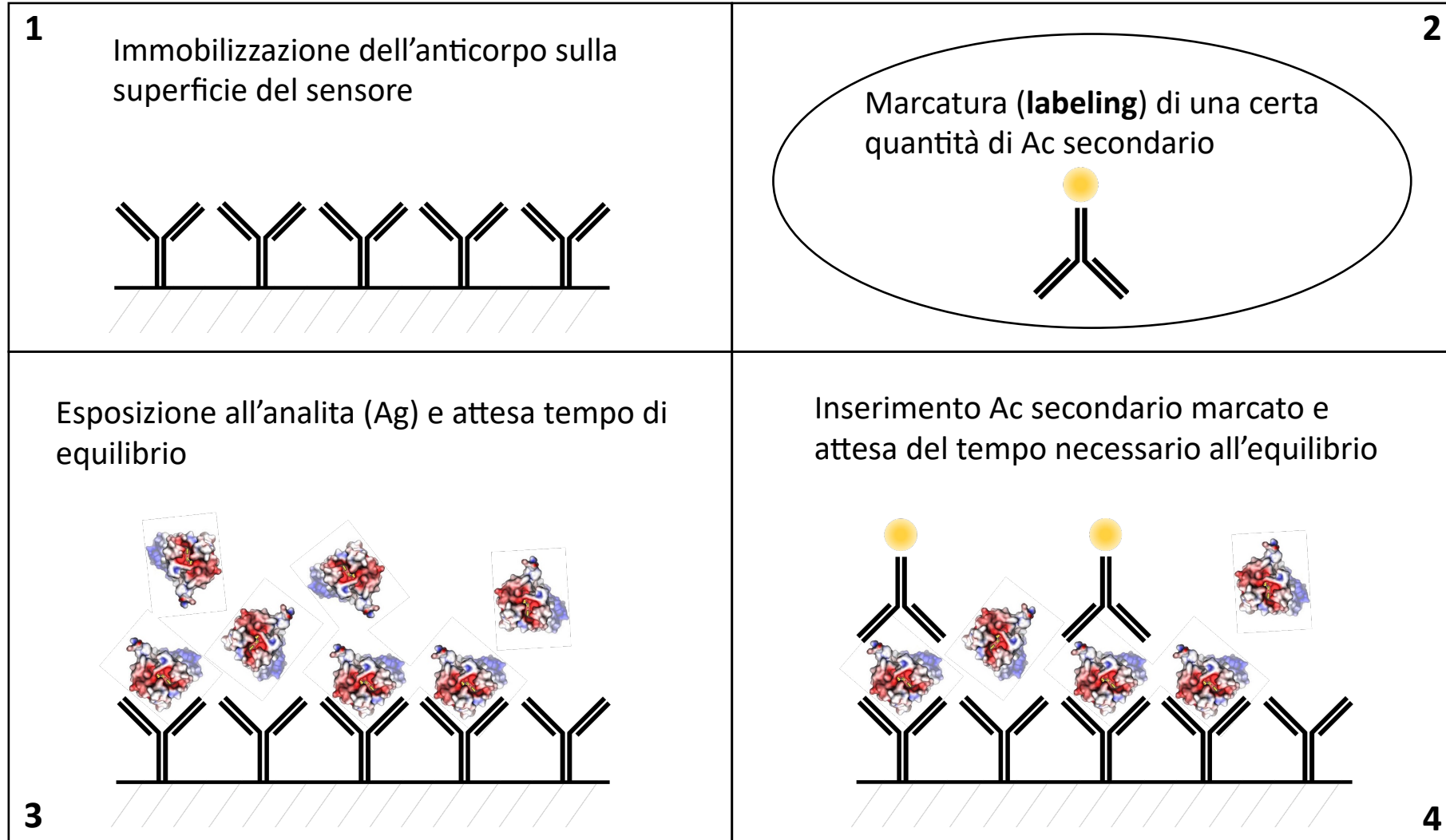
Biosensori ad affinità - Immunosensori

Nel metodo **sandwich**, invece, una volta che l'antigene ha reagito con l'anticorpo immobilizzato, viene introdotto **un secondo anticorpo marcato** che si lega con l'antigene già attaccato all'anticorpo sulla superficie, creando appunto una sorta di sandwich di cui l'antigene occupa lo strato centrale.

Il sistema a sandwich richiede **due anticorpi monoclonali** in grado di riconoscere **due epitopi su due zone diverse** del antigene. Quest'ultima configurazione può essere utilizzata solo nei casi in cui l'antigene è grande abbastanza per presentare due epitopi diversi.

Biosensori ad affinità - Immunosensori

Metodo **Sandwich**: Si misurano i siti occupati dall'anticorpo marcato. Maggiore legame con Ac marcato maggiore è Ag in soluzione.



Biosensori ad affinità - Immunosensori

Il test **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)** è comunemente utilizzato nella pratica clinica per la rilevazione di **anticorpi**, **antigeni** e **proteine**. Il test ELISA è generalmente effettuato in **piastre a 96 pozzi** (opportunamente funzionalizzate), in modo da aumentare la resa del processo. Esistono diversi kit ELISA, ognuno specifico per un particolare antigene o anticorpo.



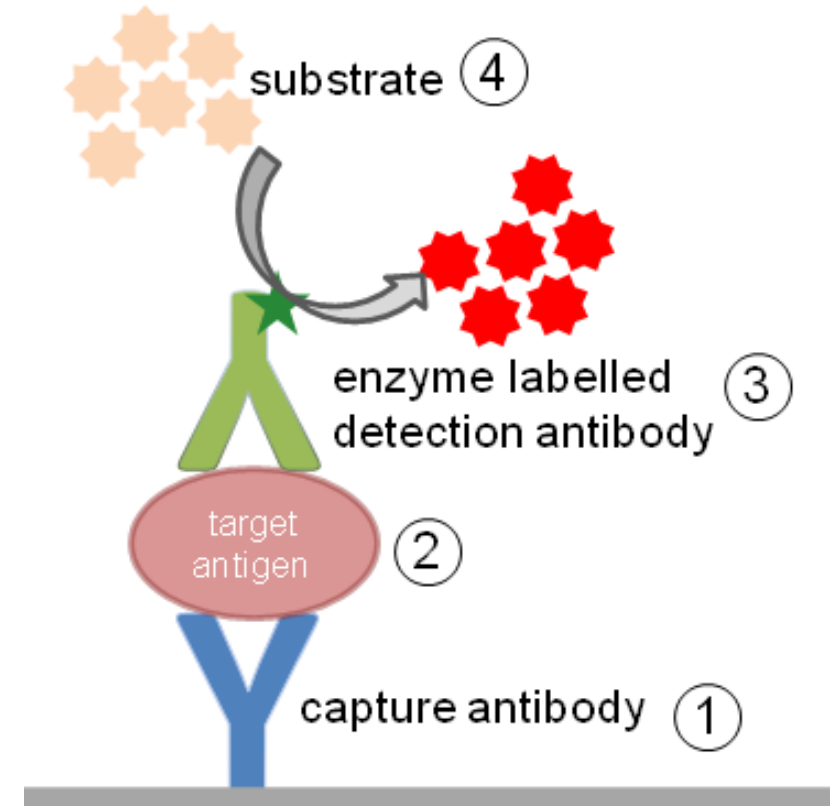
Biosensori ad affinità - Immunosensori

ELISA sandwich.

Step 1: funzionalizzazione dei pozzetti con lo specifico anticorpo che andrà a legare l'antigene d'interesse. Dopo la funzionalizzazione, ogni eccesso di anticorpo viene lavato via.

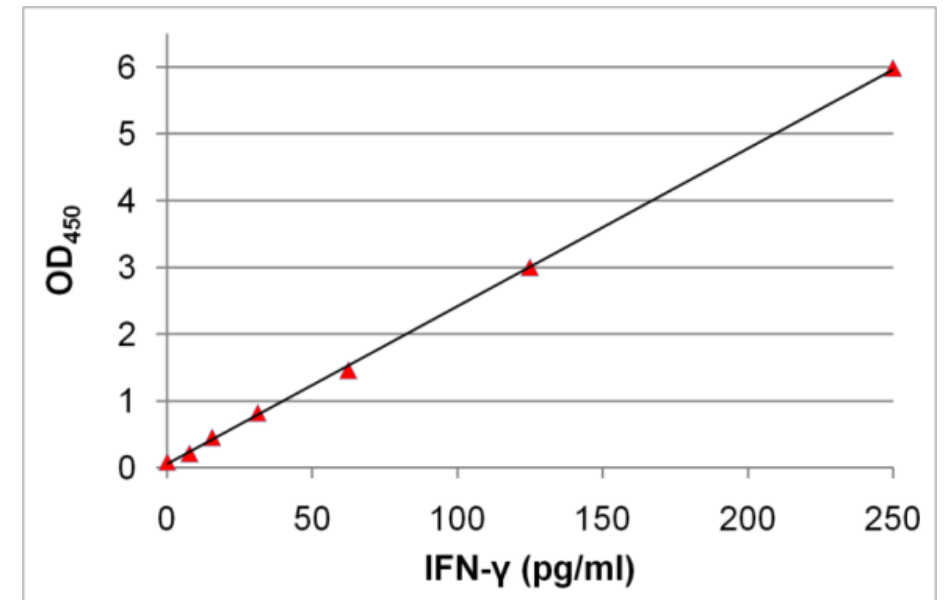
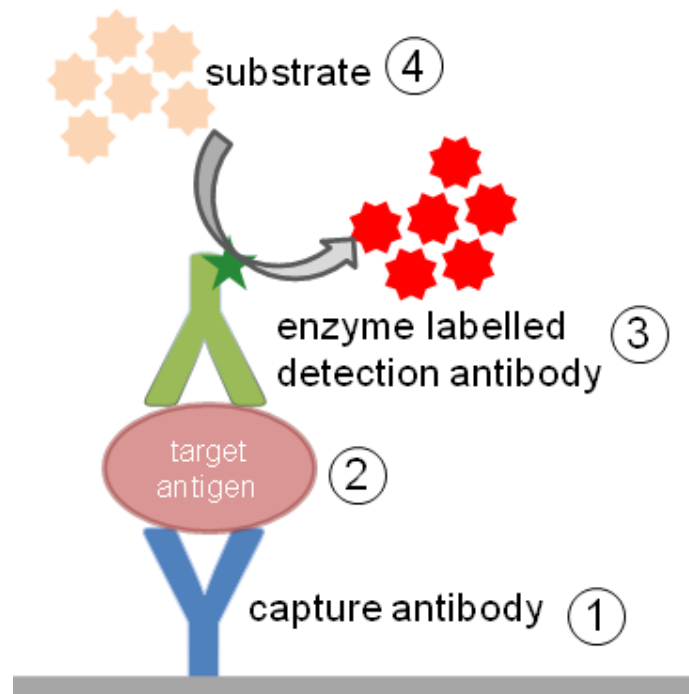
Step 2: aggiunta del campione (urina, siero, plasma...). Ogni antigene presente nel campione si legherà ad un anticorpo immobilizzato sulla superficie. Dopo un certo tempo, il campione è lavato via accuratamente dal pozzetto.

Step 3: aggiunta dell'anticorpo marcato (per esempio **particolari enzimi**), specifico per un altro epitopo dell'antigene.



Biosensori ad affinità - Immunosensori

Step 4: aggiunta del substrato. L'enzima presente nel secondario promuoverà una reazione che modifica le proprietà ottiche del substrato, per esempio 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, o **TMB** (fenomeno chiamato enhanced chemiluminescence - ECL).



OD _{λ} : Optical Density (densità ottica). λ è una specifica lunghezza d'onda.

<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay>

Biosensori ad affinità - Immunosensori

Pro: col metodo sandwich è possibile, in principio, analizzare **qualsiasi tipo di antigene con sistemi ottici**, marcando opportunamente l'anticorpo secondario mentre per sensori gravimetrici, la tecnica a sandwich può aumentare la sensibilità della misura.

Contro: necessita di un **anticorpo secondario** (maggior costo). **Maggior numero di operazioni** richieste e la necessità della **presenza di un operatore** (o di una maggiore complessità nel caso di ingegnerizzazione automatica della procedure).

Biosensori ad affinità - Metodi di trasduzione

La percentuale di Ag legati può essere rilevata anche con diverse tecniche di trasduzione:

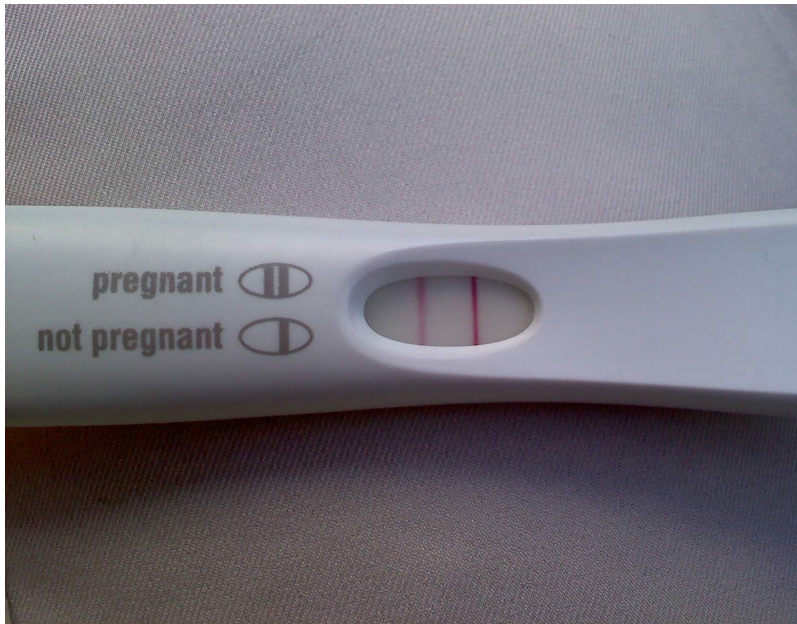
- Metodi **colorimetrici** (in questo caso tipicamente si rileva soltanto la presenza o meno dell'analita, non la sua concentrazione)
- Metodi **gravimetrici** (variazione di peso)
- Metodi ottici
 - fluorescenza indotta da un'onda evanescente (**TIRF**)
 - risonanza di plasmoni superficiali (**SPR**)
- Sistemi di **trasduzione elettrica** (potenziometrico, amperometrico)

Biosensori colorimetrici

Immunosensori colorimetrici

Immuno sensore colorimetrico: test di gravidanza.

Un esempio di immunosensore ampiamente utilizzato nell'ambito della sensoristica clinica è il test di gravidanza. In particolare, questi biosensori si basano sulla **rilevazione della gonodotropina umana (hCG)**, un ormone che viene prodotto in seguito alla fecondazione e che **può venir rilevato in campioni di sangue o urina tipicamente dal decimo giorno**. Per la sua rilevazione si sfrutta un anticorpo specifico che si lega alla sub-unità beta dell'hCG.



Il sensore è composto da una **striscia assorbente** che per capillarità convoglia il campione verso la zona dove sono immobilizzati gli anticorpi. Questo tipo di approccio prende il nome di **“lateral flow immuno assay”**.

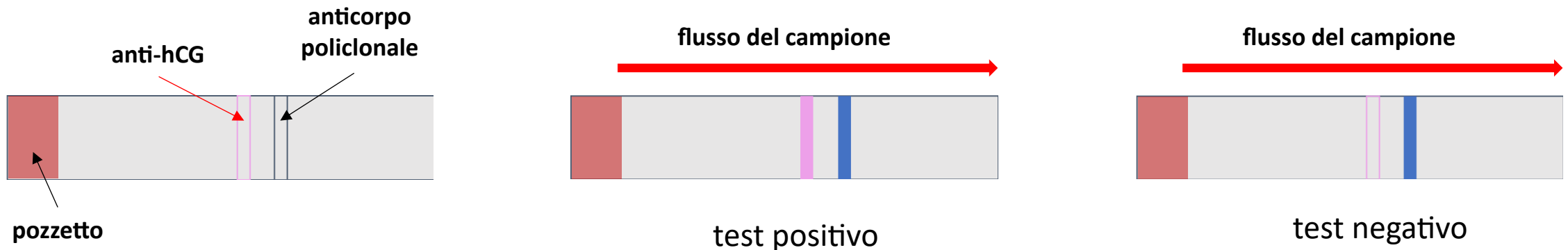
Immunosensori colorimetrici

Tra i vari approcci possibili, quelli maggiormente utilizzati sono basati **sull'utilizzo combinato di due anticorpi**. Nel **primo approccio** vengono immobilizzate due strisce di anticorpi: una striscia di **anti-hCG** e una di un anticorpo policlonale **non selettivo per l'hCG** e che funge da **controllo**.



Immunosensori colorimetrici

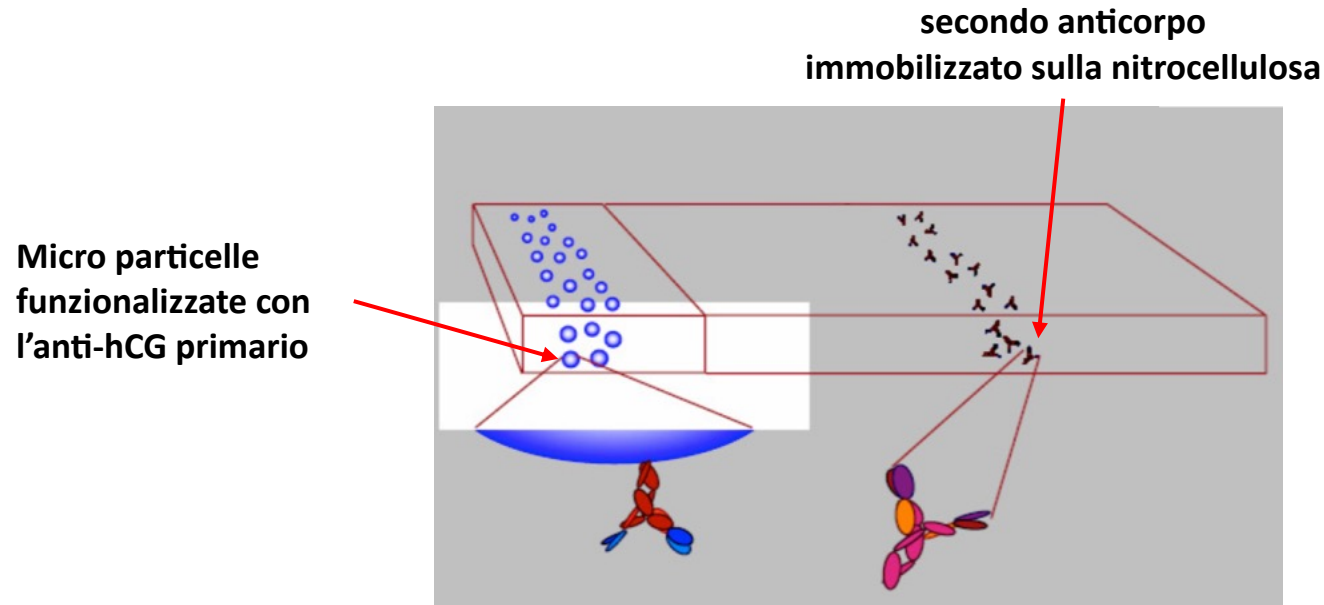
Il campione di plasma o urina viene introdotto in un opportuno pozzetto e **per capillarità viene portato nella zona dove sono immobilizzati gli anticorpi**. Se il campione contiene una concentrazione sufficiente di hCG, l'ormone si lega agli anti-hCG della prima striscia reagendo con un coniugato colorato. L'assenza di questa prima riga indica un risultato negativo. Il campione raggiungerà poi la seconda zona dove reagirà con l'anticorpo aspecifico determinando la comparsa della striscia di test. Una sua mancanza è indice di test non svolto correttamente (per esempio quantità di campione non sufficiente).



Immunosensori colorimetrici

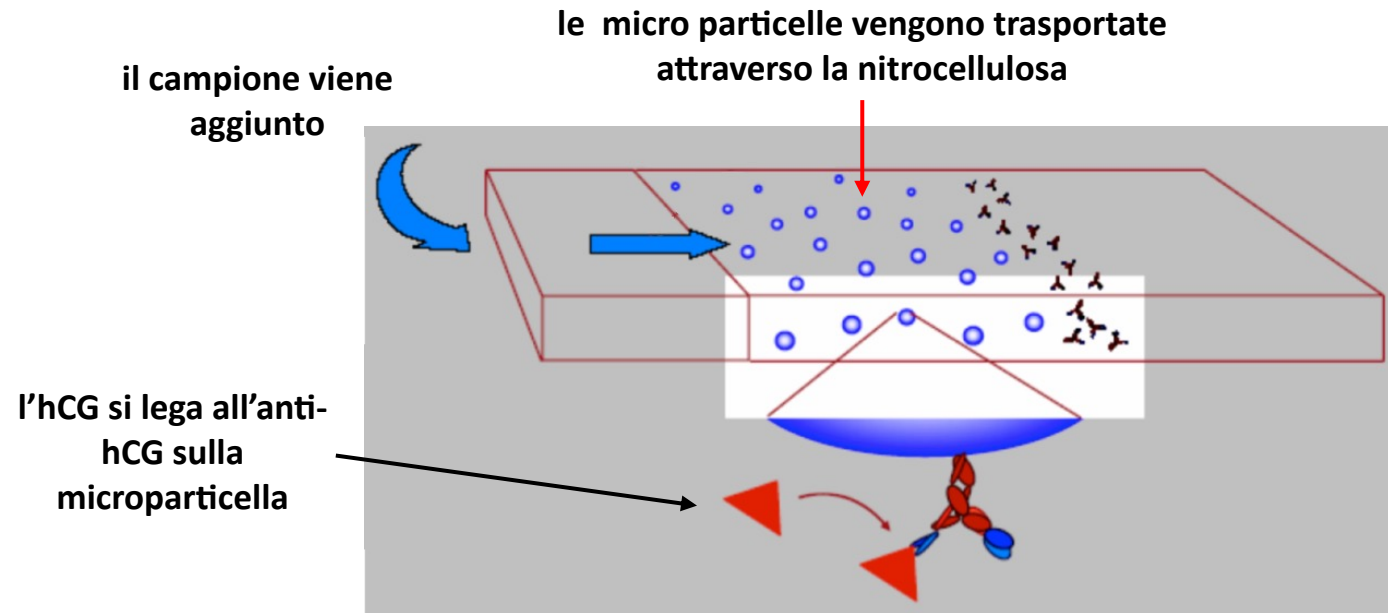
Anche nel **secondo approccio** vengono utilizzati due anticorpi. In questo caso però vengono utilizzati **due anticorpi monoclonali**: uno primario ancorato a delle microparticelle di latex e uno secondario immobilizzato su una striscia assorbente.

Prima del test, le microparticelle funzionalizzate con l'anticorpo primario vengono depositate su una zona assorbente della striscia.



Immunosensori colorimetrici

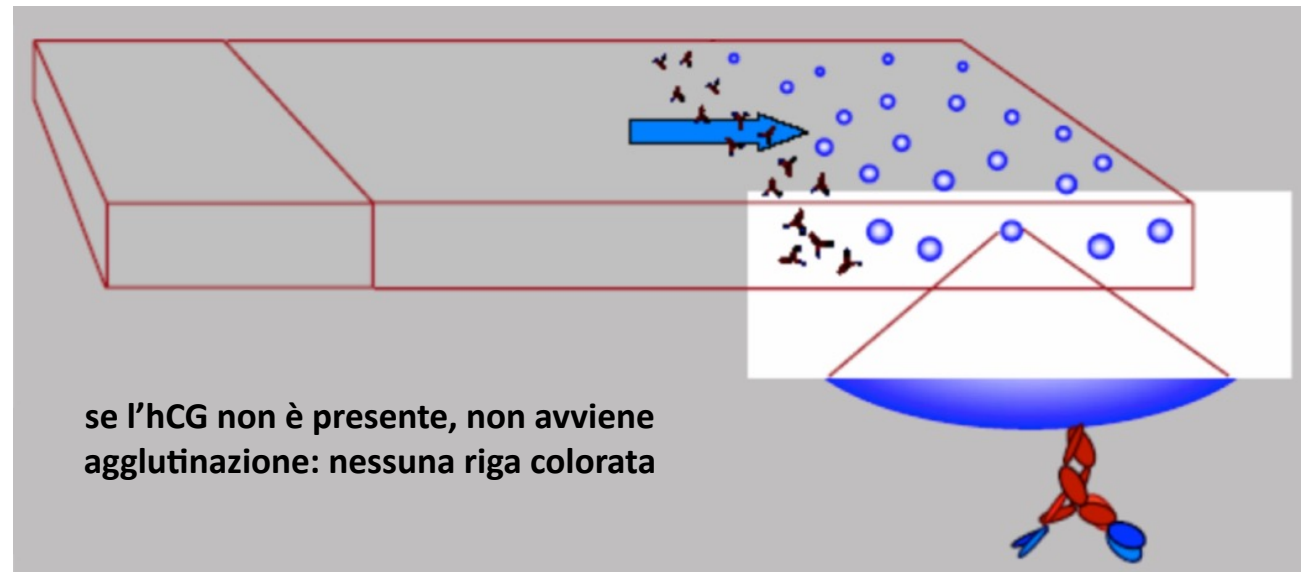
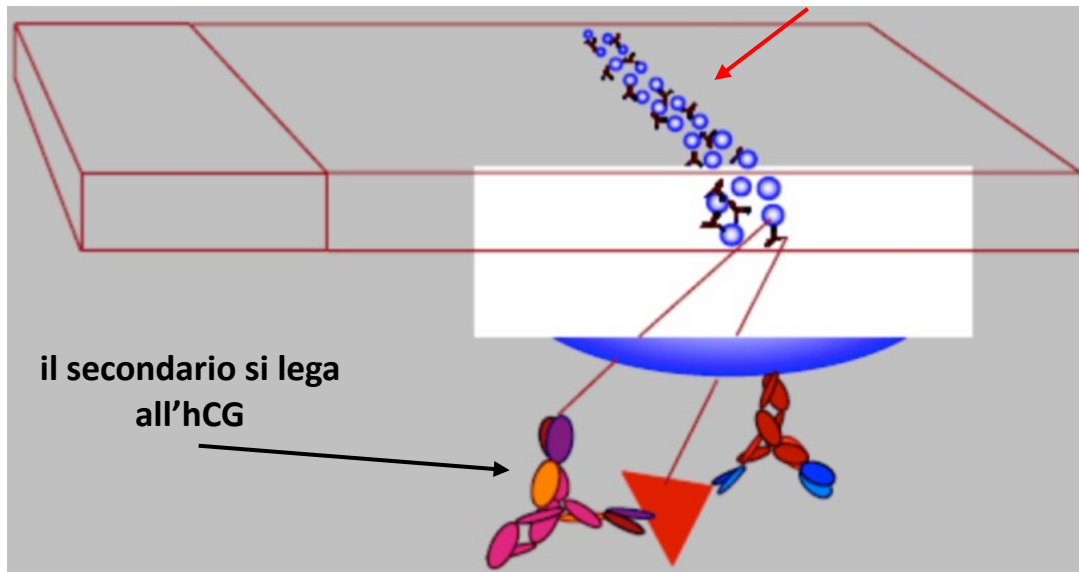
Il campione (sangue o urina) viene presentato nella zona assorbente e **trasporta le particelle funzionalizzate attraverso la nitrocellulosa**.



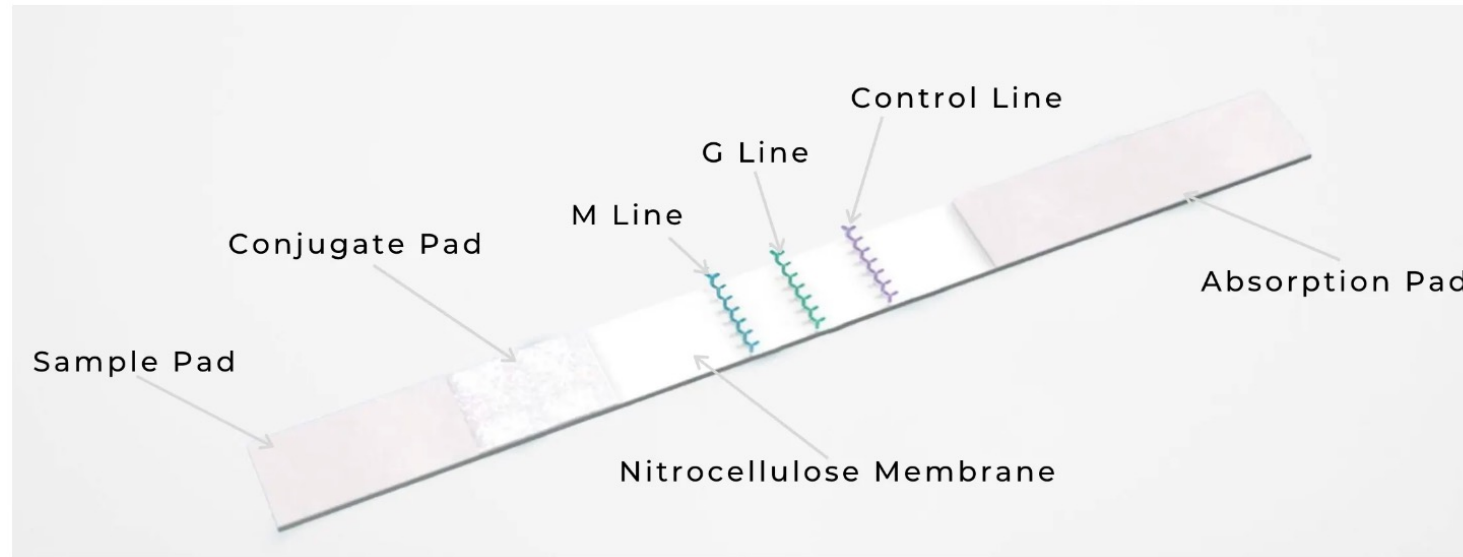
Immunosensori colorimetrici

Se l'hCG è presente, si ha interazione con l'anticorpo secondario e avviene l'agglutinazione con la formazione di una riga colorata. In caso contrario il campione passa oltre e non avviene alcuna agglutinazione.

formazione di una linea colorata dovuta all'agglutinazione



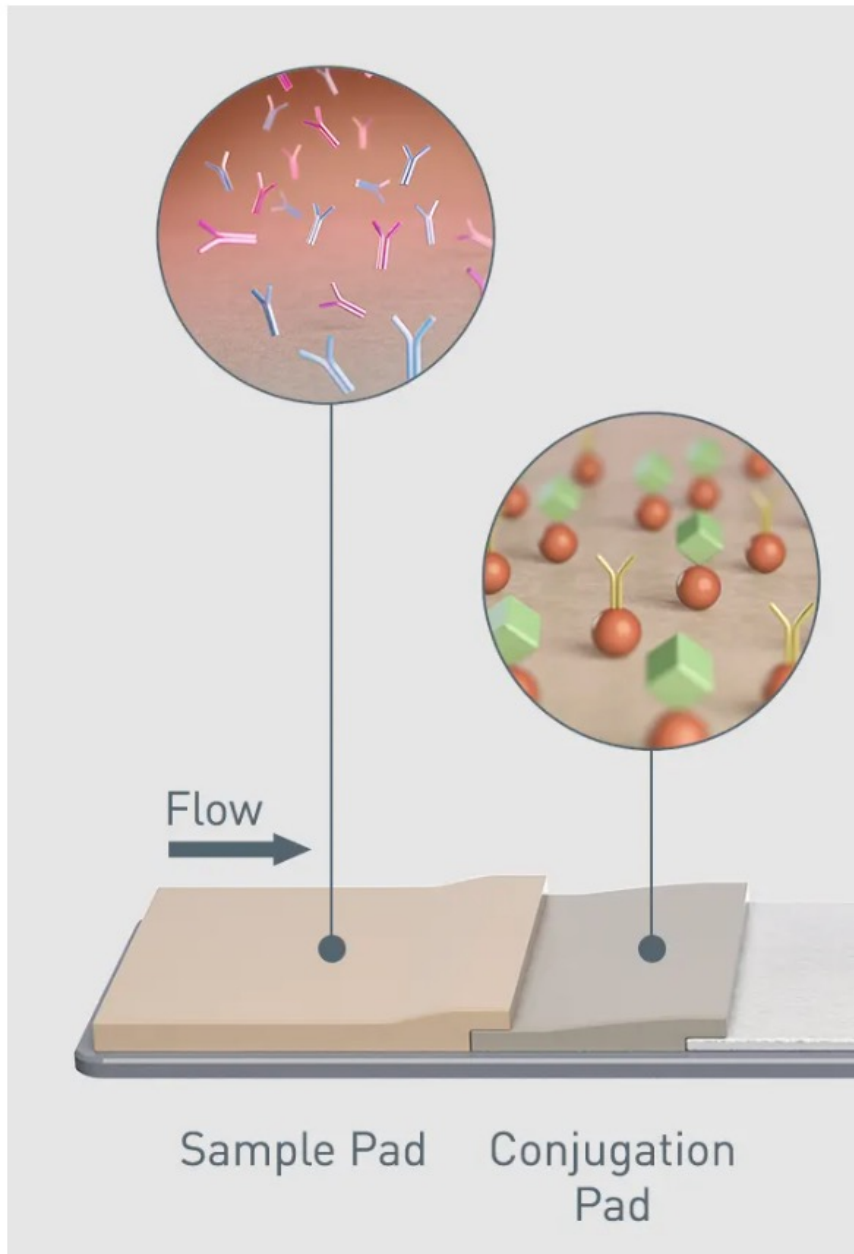
Lateral flow immuno assays



COVID 19 immuno assay. Questo test è capace di rilevare due tipi di anticorpi relativi all'infezione da COVID 19:

- **IgM:** le **IgM** sono i **primi anticorpi a essere prodotti** in seguito al contatto con un agente estraneo. Se ne trovano tracce nel sangue dopo 5-10 giorni e la loro produzione aumenta rapidamente per alcune settimane, per poi calare e interrompersi quando subentrano le IgG.
- **IgG:** anticorpi prodotti in stadi più avanzati dell'infezione. Se si entra in contatto con il microrganismo contro cui si è stati vaccinati saranno già presenti nell'organismo anticorpi specifici (IgG) e la risposta immunitaria sarà rapida ed efficace

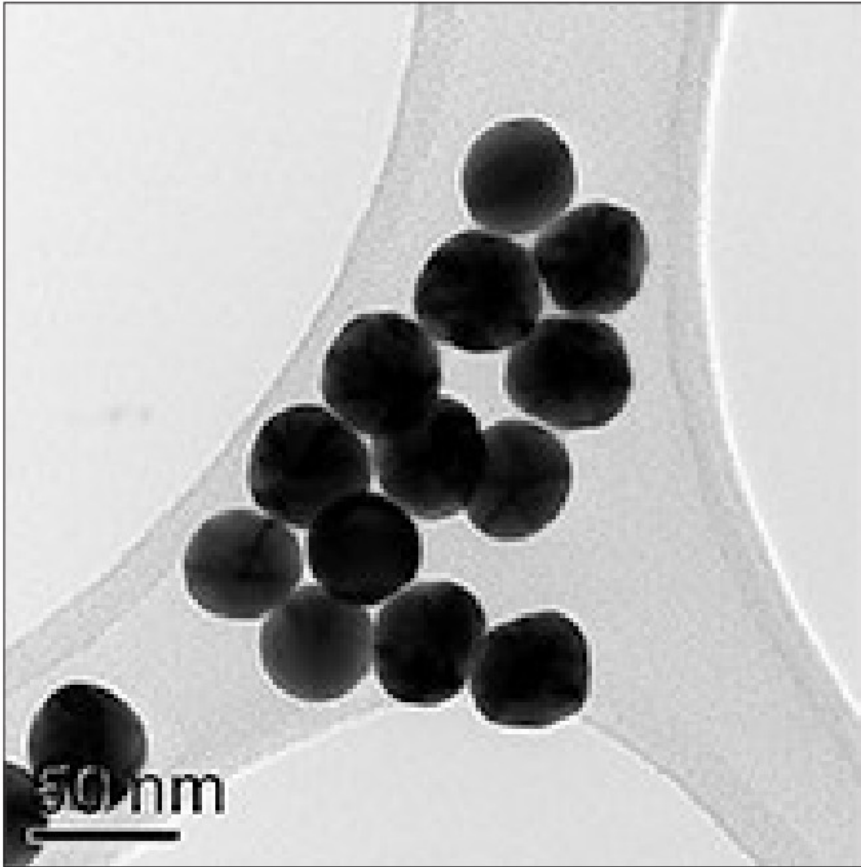
Lateral flow immuno assays



1. Il campione (sangue, siero, o plasma) è aggiunto nel punto di raccolta insieme a un buffer di diluizione.
2. Il campione si sposta per capillarità lungo la strip arrivando al "conjugation pad", nel quale si trovano immobilizzati gli antigeni per il **COVID-19 coniugati con nanoparticelle d'oro – AuNP - (40 nm)**. Durante questa fase, **qualunque anticorpo presente nel campione con specificità per l'antigene relativo al COVID-19 si legherà all'antigene coniugato con le nano particelle**. Come controllo, il conjugation pad contiene anche anticorpi aspecifici (chiamati rabbit IgG), che si sposteranno lungo tutto il test insieme al campione.



Lateral flow immuno assays



TEM image of 40nm colloidal gold, demonstrating the uniform spherical shape and narrow size distribution.

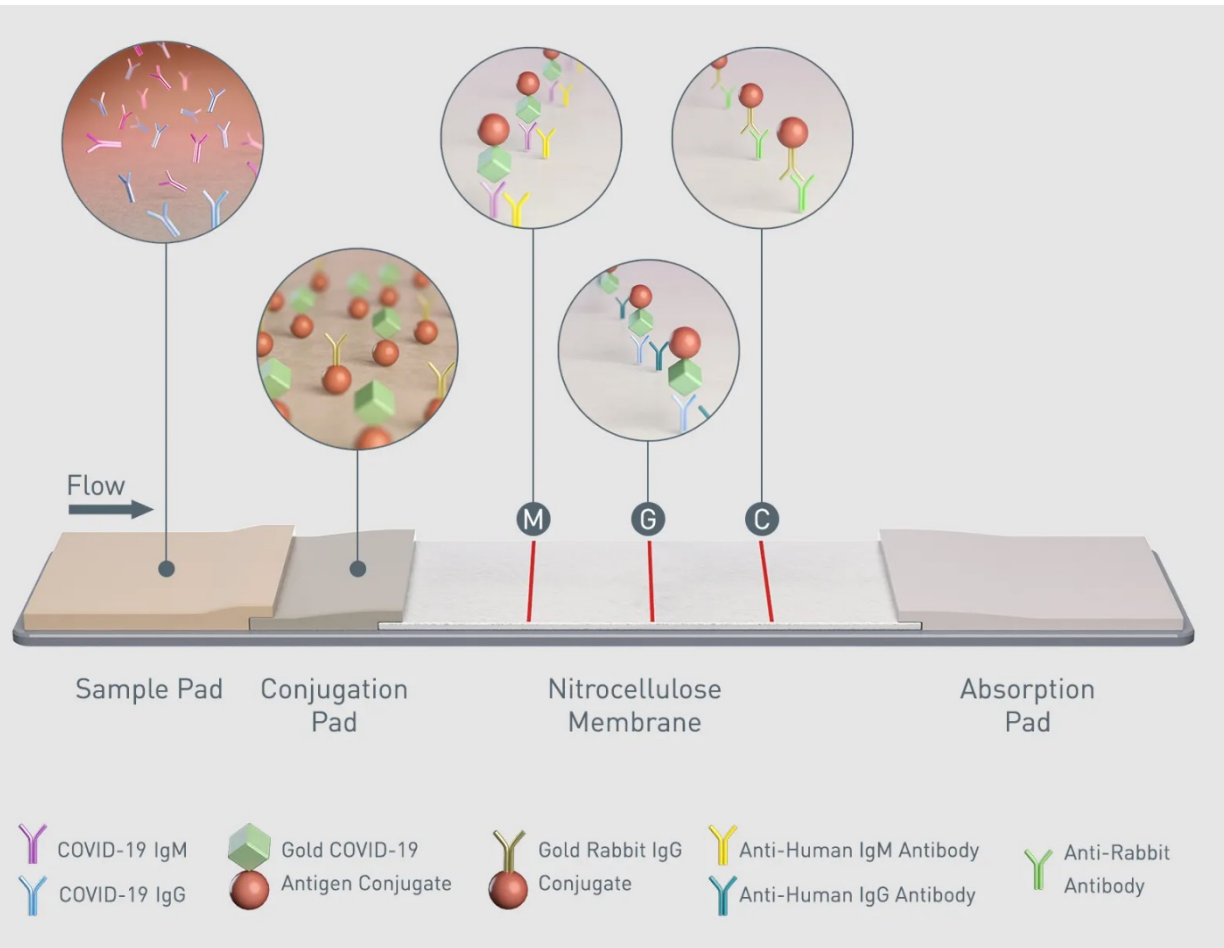
https://fnkprdata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf

1. Il campione (sangue, siero, o plasma) è aggiunto nel punto di raccolta insieme a un buffer di diluizione.
2. Il campione si sposta per capillarità lungo la strip arrivando al “conjugation pad”, nel quale si trovano immobilizzati gli antigeni per il **COVID-19 coniugati con nanoparticelle d’oro – AuNP - (40 nm)**. Durante questa fase, **qualunque anticorpo presente nel campione con specificità per l’antigene relativo al COVID-19 si legherà all’antigene coniugato con le nano particelle**. Come controllo, il conjugation pad contiene anche anticorpi aspecifici (chiamati rabbit IgG), che si sposteranno lungo tutto il test insieme al campione.



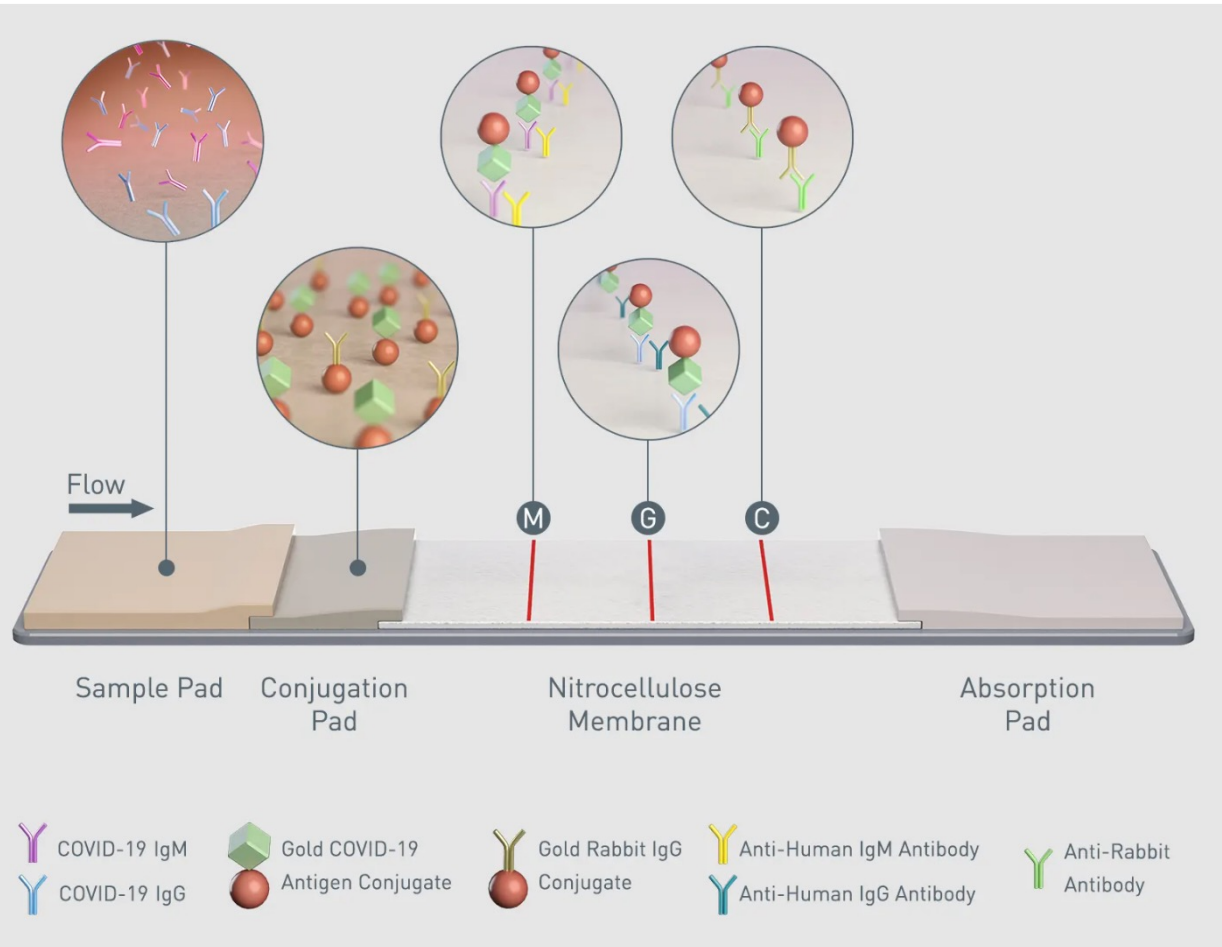
<https://www.assaygenie.com/rapid-covid19-antibody-detection-tests-principles-and-methods>

Lateral flow immuno assays



5. Il complesso campione/AuNp continua il suo percorso fino ad arrivare alle tre strisce di test.
6. La prima (M line), contiene un anticorpo specifico per le COVID-19 IgM. Solamente il complesso anti-IgM/antigene/AuNp, interagendo con l'anti IgM immobilizzato, produrrà una linea colorata visibile.
7. La prima (G line), contiene un anticorpo specifico per le COVID-19 IgG. Solamente il complesso anti-IgG/antigene/AuNp, interagendo con l'anti IgG immobilizzato, produrrà una linea colorata visibile.
8. La striscia di controllo contiene un anticorpo che che interagisce con l'IgG.
9. L'eccesso di campione arriva al pad di assorbimento e dopo un periodo (tipicamente 10-15 min) il test può essere letto.

Lateral flow immuno assays



- **IgM e IgG negative:** non c'è stata infezione o l'esposizione al patogeno è avvenuta da troppo poco tempo e non è stata ancora sviluppata una reazione immunitaria rilevabile, oppure il livello di anticorpi prodotti è troppo basso per essere rilevato dal test;
- **solo IgM positive:** l'esposizione all'antigene è molto recente;
- **IgM e IgG positive:** l'infezione è in corso ed è stata contratta da poco tempo;
- **solo IgG positive:** l'infezione c'è stata ma non è recente. Non sempre è possibile stabilire se il soggetto che si è sottoposto al test è protetto da una successiva infezione e per quanto tempo.
- A seconda dei risultati e dell'antigene indagato, il medico potrebbe aver bisogno di prescrivere altri test, come il tampone, per arrivare a una diagnosi precisa.

Lateral flow immuno assays

IgG Result

Method		PCR		Total Results
	Results	Positive	Negative	
2019-nCoV	Results			
gG/IgM	Positive	20	1	21
Rapid Test	Negative	0	49	49
Total Result		20	50	70

Fig 3. IgG Relative Sensitivity: 100% (95%CI*: 86.0%-100%).
Relative Specificity: 98.0% (95%CI*: 89.4%-99.9%). Accuracy:
98.6% (95%CI*: 92.3%-99.96%) *Confidence Interval

IgM Result

Method		PCR		Total Results
	Results	Positive	Negative	
2019-nCoV	Results			
gG/IgM	Positive	17	2	19
Rapid Test	Negative	3	48	51
Total Result		20	50	70

Fig 4. IgM Relative Sensitivity: 85.0% (95%CI*: 62.1%-96.8%).
Relative Specificity: 96.0% (95%CI*: 86.3%-99.5%). Accuracy:
92.9% (95%CI*: 84.1%-97.6%)

Lateral flow immuno assays

Advantages	Disadvantages
Low cost	Qualitative or semi-quantitative readout
Wide range of applications	Restriction on total test volume can impose a limit on sensitivity
Well-established technology, ease of manufacture	Inaccurate sample volume may reduce precision
Long shelf-life, no need for refrigeration	Test-to-test reproducibility may be problematic
Simple, user-friendly operation	Difficult to miniaturize sample volume
High sensitivity and specificity	Multiplexing can be challenging
Low sample volume required	Unclear patent situation in some instances
One-step assay, no washing steps necessary, short time to result	
Relatively short timeline for development, time to market is reduced	
High potential for commercialization	
Easily scalable	
Can be integrated with reader systems	
Possibility of multiplexing	

Figure 4. Advantages and disadvantages of lateral flow immunoassays.

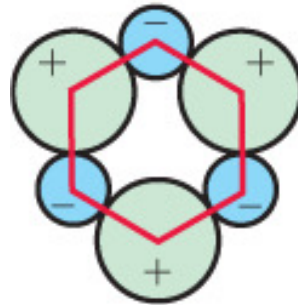
Biosensori gravimetrici

Microbilancia al quarzo

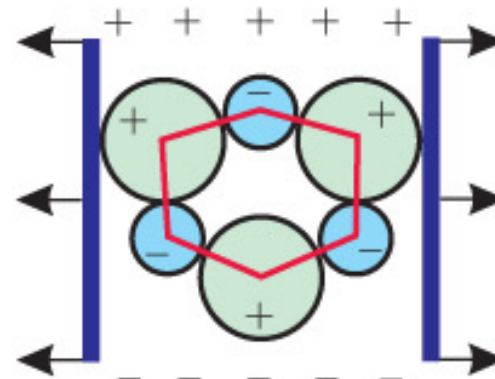
- Metodo gravimetrico basato **su cristalli di quarzo** (sfrutta la piezoelettricità del materiale)
- Il materiale utilizzato è solitamente il **cristallo ialino o di rocca** (sistema cristallino trigonale)



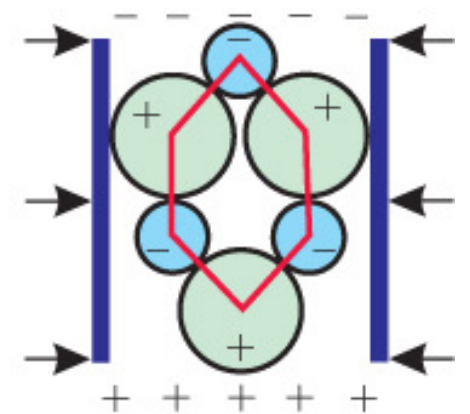
Nessuno stress



Tensione



Compressione



Atomo
di Silicio

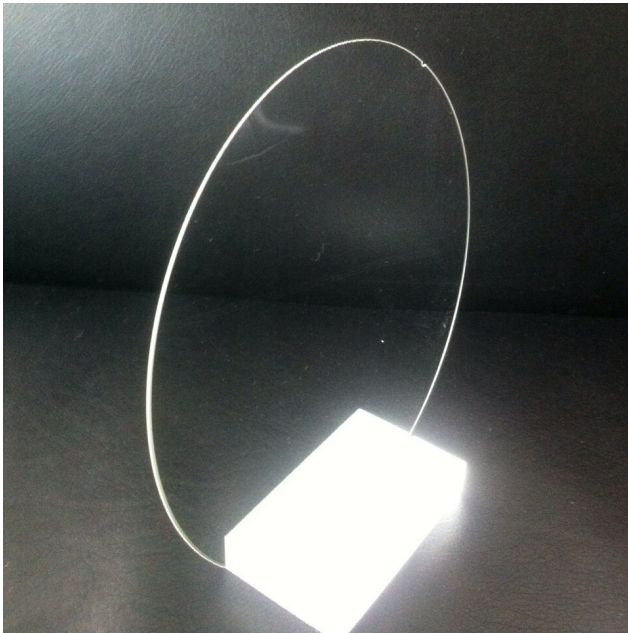


Atomo
di Ossigeno

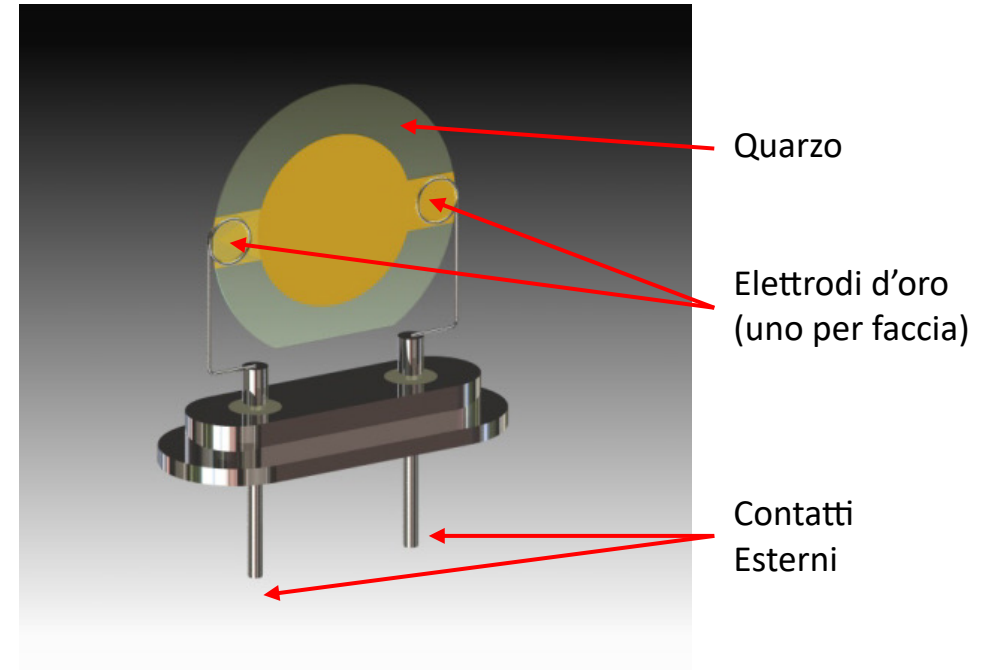
Microbilancia al quarzo

- Metodo gravimetrico basato **su oscillatori ai cristalli di quarzo** (sfrutta la piezoelettricità del materiale)
- Il materiale utilizzato è solitamente il **cristallo ialino o di rocca** (sistema cristallino trigonale)

Wafer di quarzo

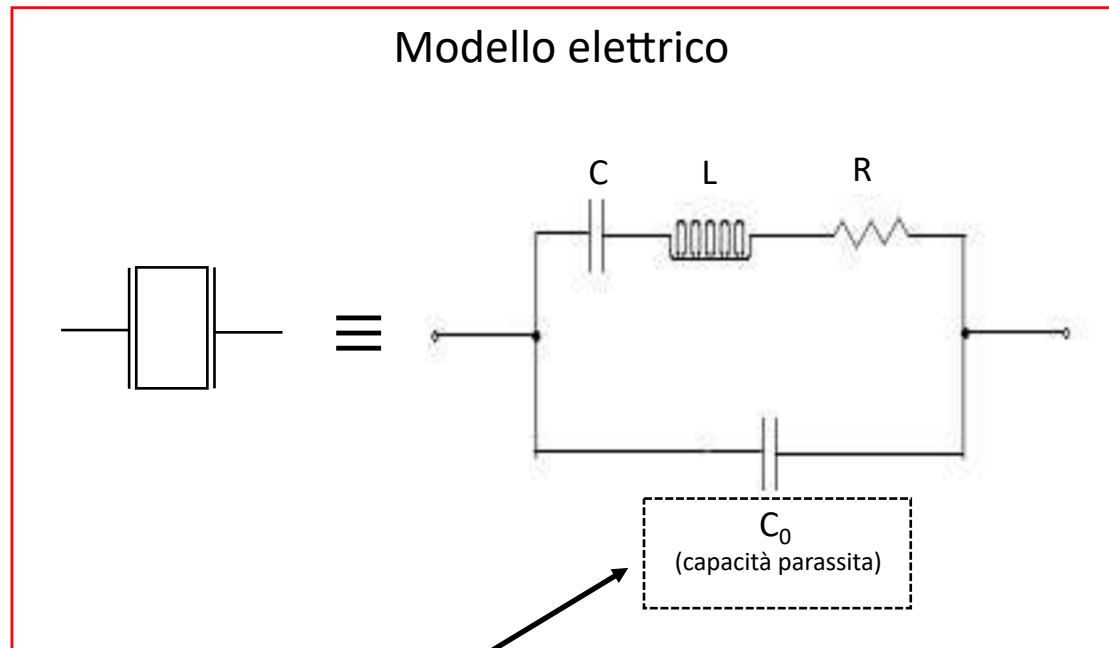


Oscillatore al quarzo



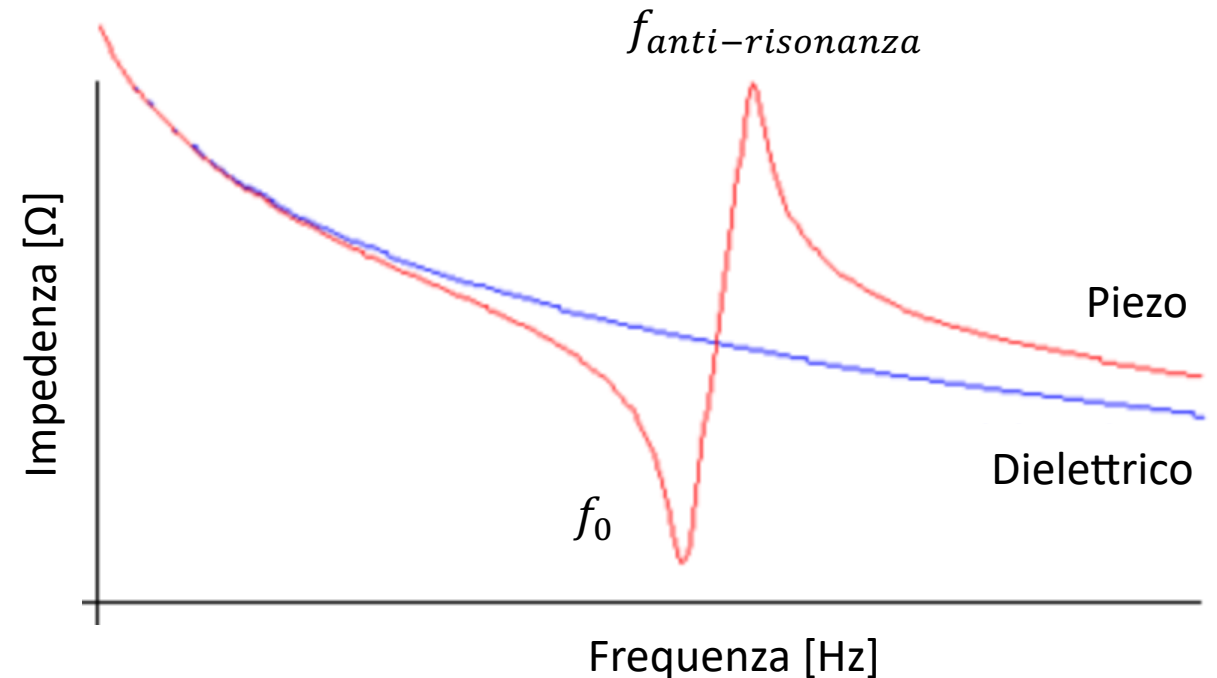
Microbilancia al quarzo

- Metodo gravimetrico basato su oscillatori ai cristalli di quarzo (sfrutta la piezoelettricità del materiale)
- Il materiale utilizzato è solitamente il **cristallo ialino o di rocca** (sistema cristallino trigonale)



Oscillazioni spurie ad alta frequenza dovute alla capacità parassita...**sfruttabili con opportuni circuiti di lettura.**

Limite pratico per un singolo risuonatore a cristallo: 30 MHz



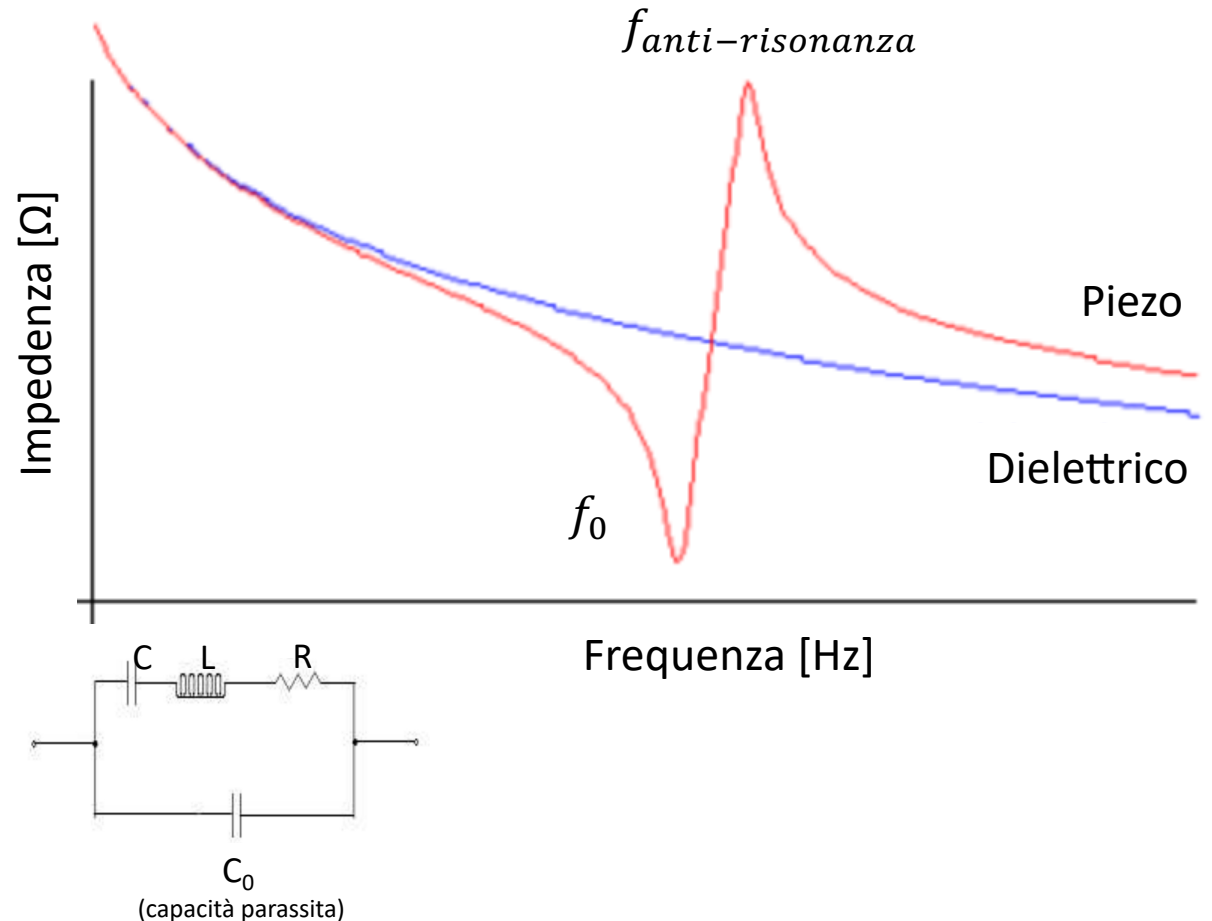
Microbilancia al quarzo

- Metodo gravimetrico basato su oscillatori ai cristalli di quarzo (sfrutta la piezoelettricità del materiale)
- Il materiale utilizzato è solitamente il **cristallo ialino o di rocca** (sistema cristallino trigonale)

Frequenza di risonanza principale

$$f_0 = \frac{1}{(2\pi * \sqrt{LC})}$$

$$f_{anti-risonanza} = \frac{1}{\left(2\pi * \sqrt{L \frac{CC_0}{C + C_0}}\right)}$$



Microbilancia al quarzo

Il principio di funzionamento è basato sul **cambiamento di frequenza di risonanza di un oscillatore a cristalli di quarzo** dovuto a **variazione di massa, o viscosità e densità del fluido a contatto con esso**. Il cristallo di quarzo viene inserito in un **circuito oscillante** e la frequenza di risonanza del sistema rispetto ad un quarzo di riferimento viene rilevata con un frequenzimetro.

Equazione di Sauerbrey

Effetto della massa

Effetto della viscosità

$$\Delta f = - \left(\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \right) \Delta m - f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L\rho_L}{\pi\rho_q\mu_q}}$$

f_0 : frequenza di risonanza [Hz]

Δf : variazione della frequenza [Hz]

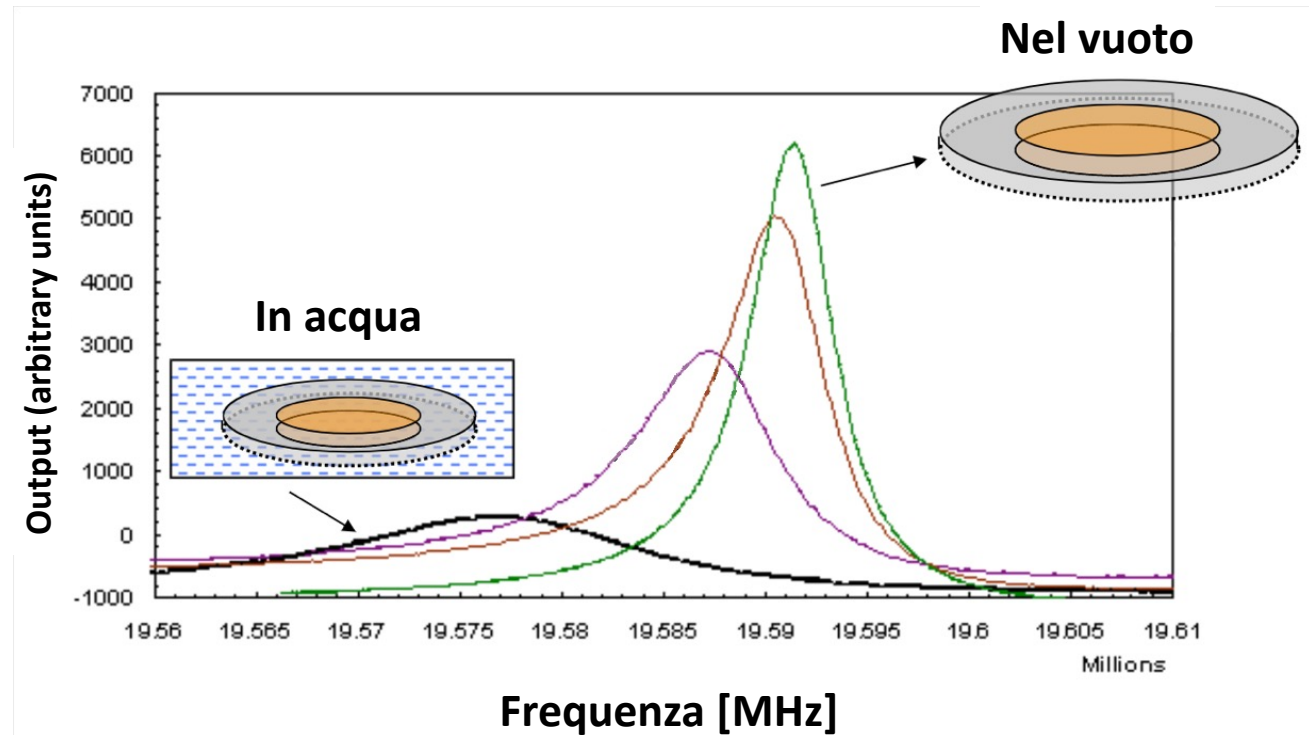
A : area degli elettrodi

ρ_q : densità del quarzo [g/cm³]

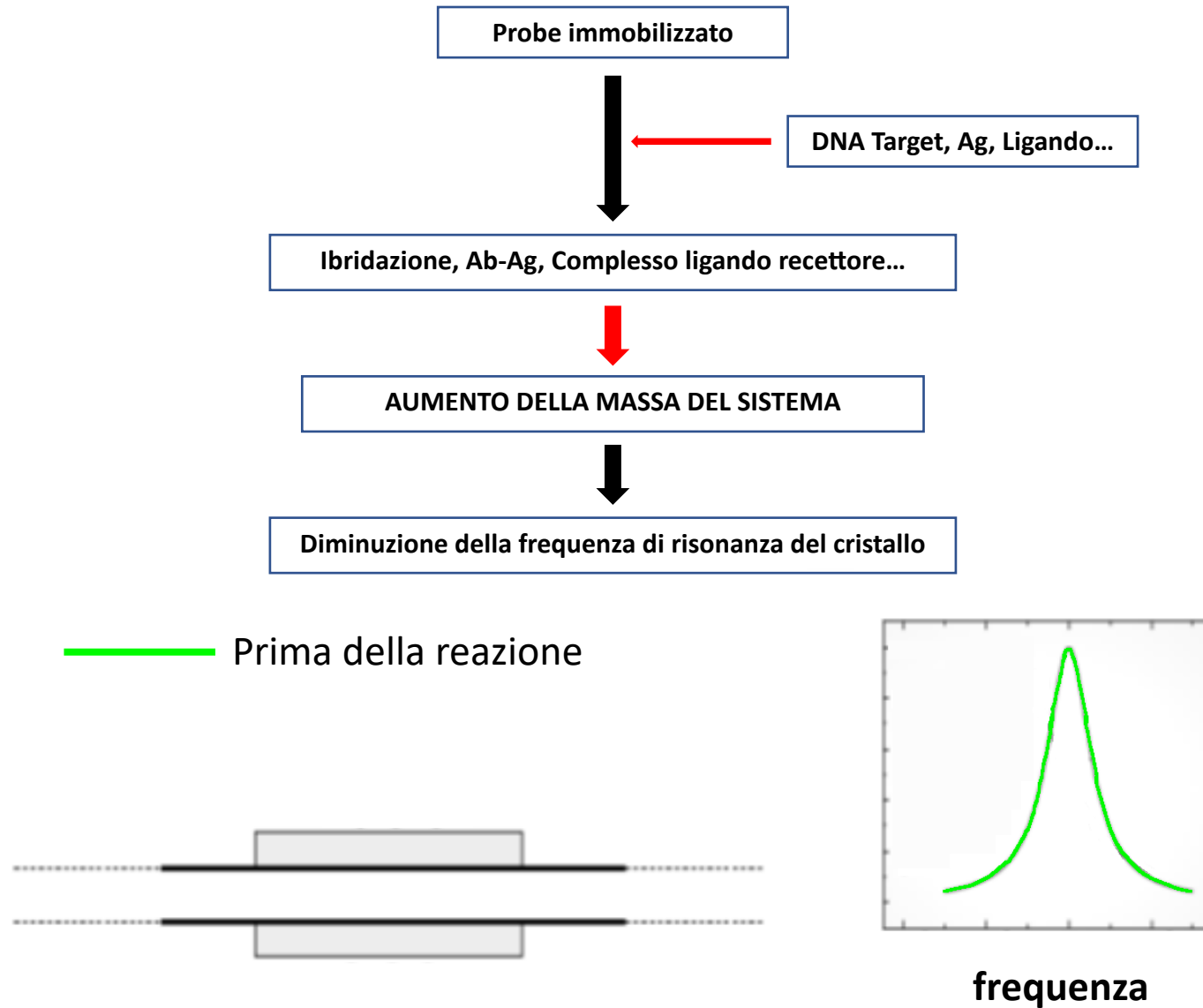
μ_q : modulo di elasticità tangenziale [g/(cm · s²)]

Δm : variazione della massa [g]

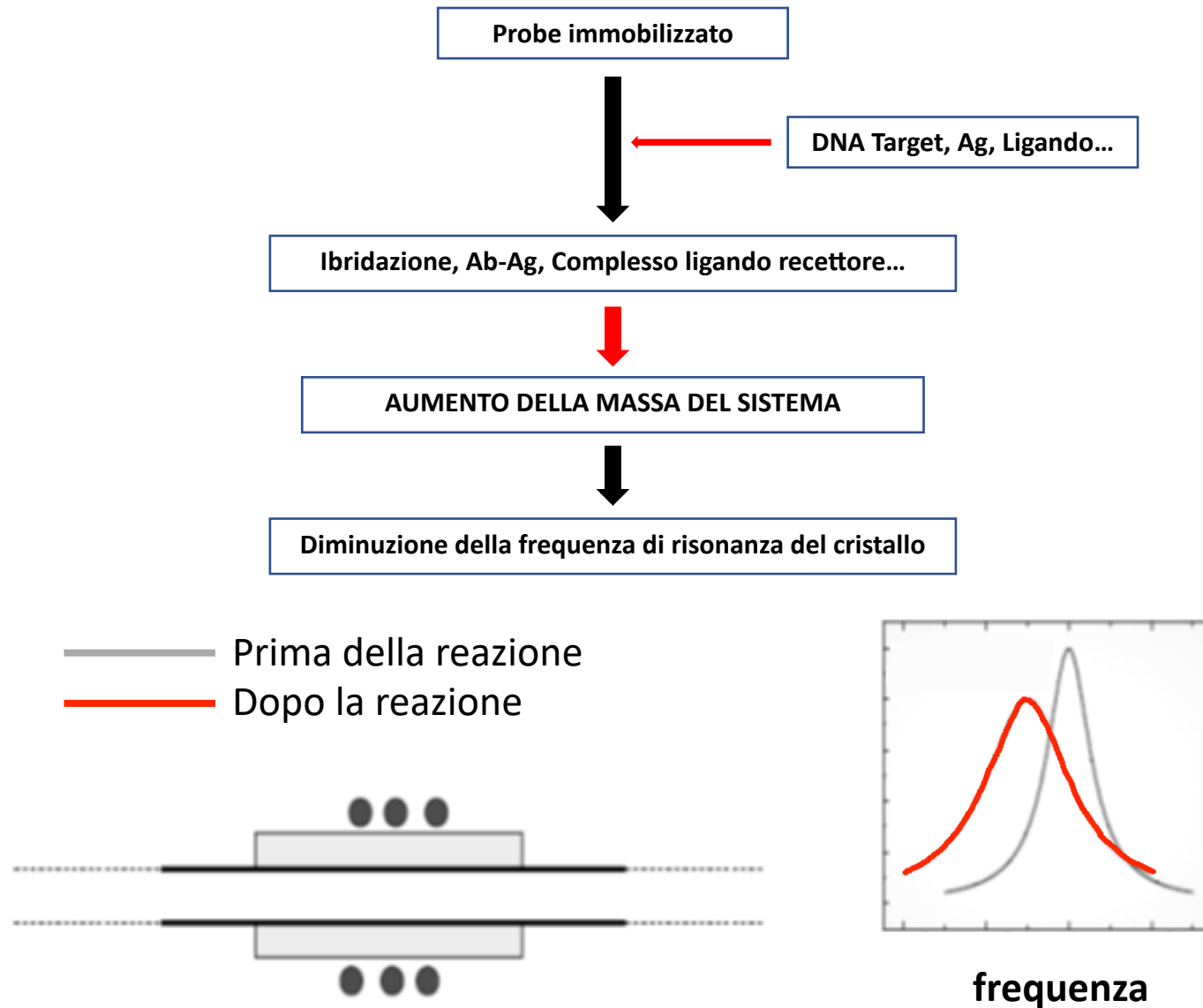
η_L e ρ_L : viscosità e densità del fluido



Microbilancia al quarzo

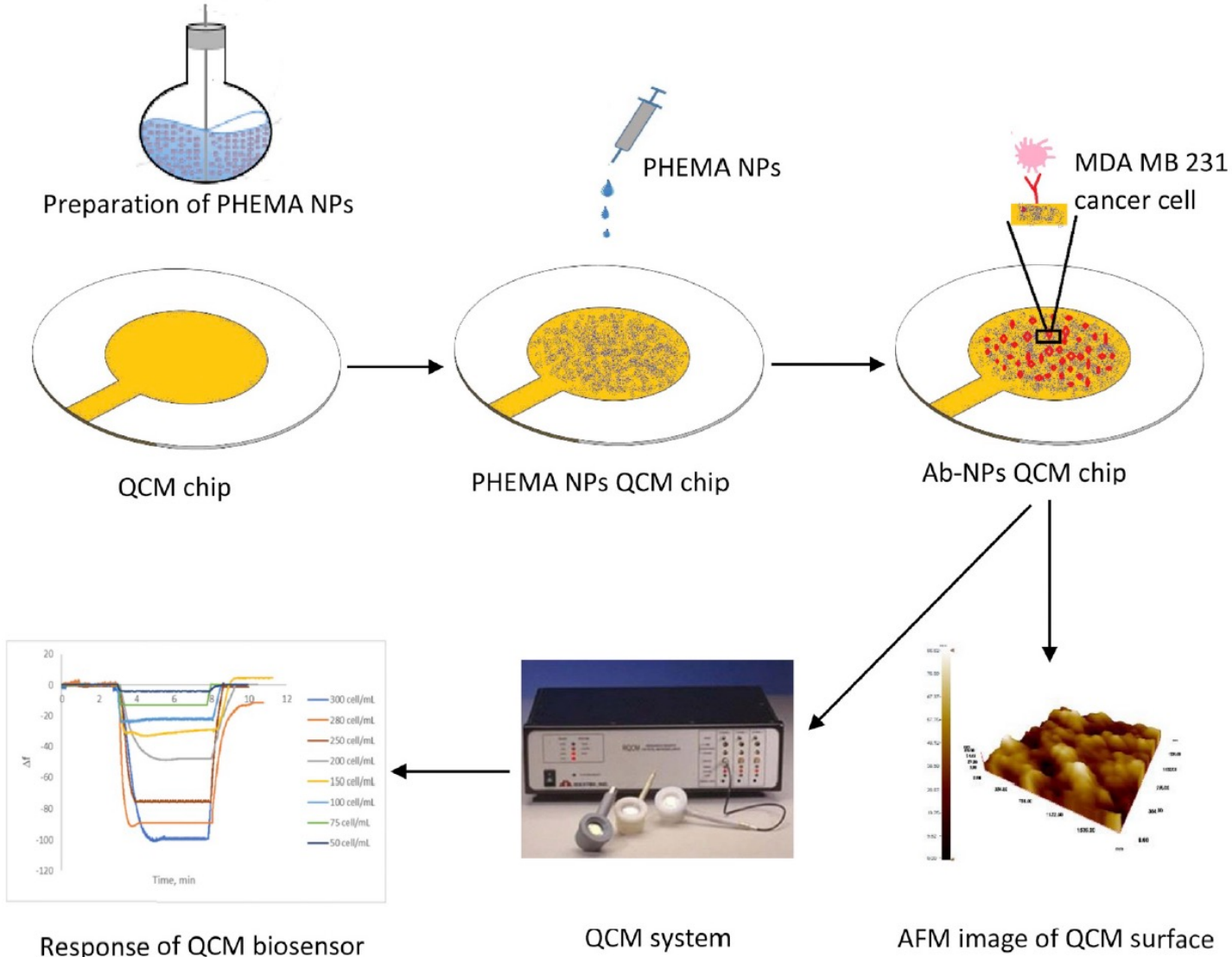


Microbilancia al quarzo



Microbilancia al quarzo

Rilevazione label-free di cellule tumorali



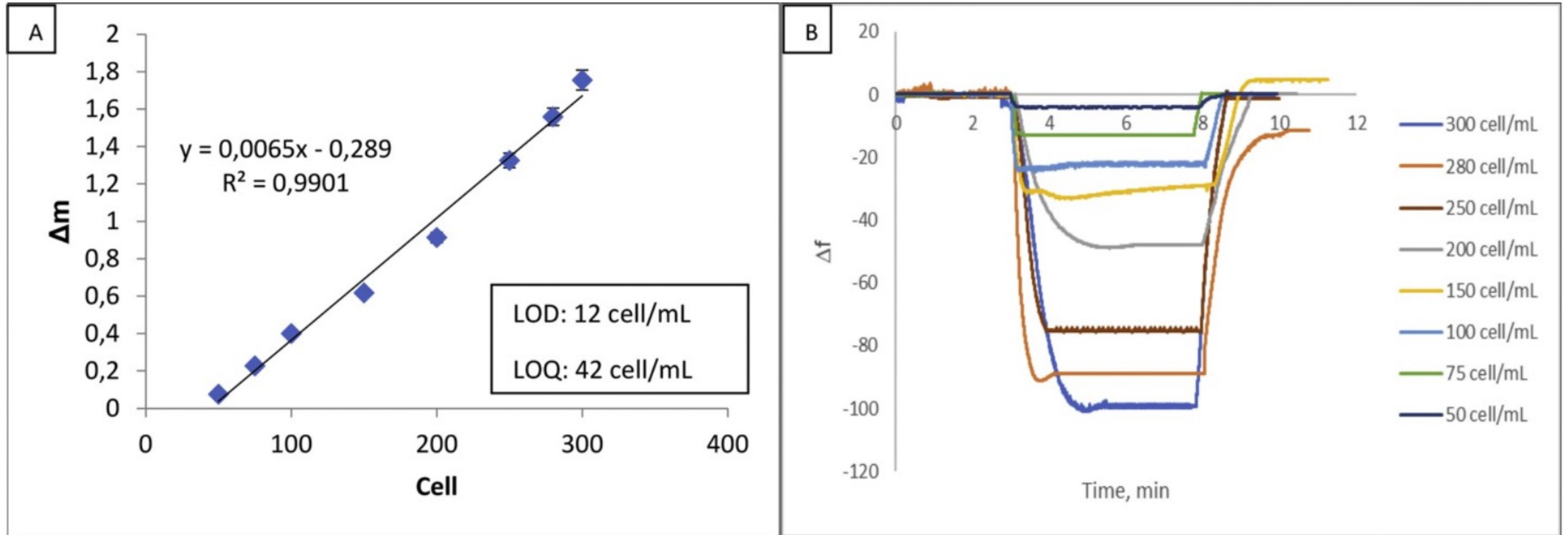
PREPARAZIONE

Target: MDA MB 231 Cellule tumorali (tumore alla mammella) con alto potere metastatico.

Prima funzionalizzazione: Nanoparticelle di Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA-NPs).
Funzione: aumento dell'area efficace e conseguente diminuzione del LOD.

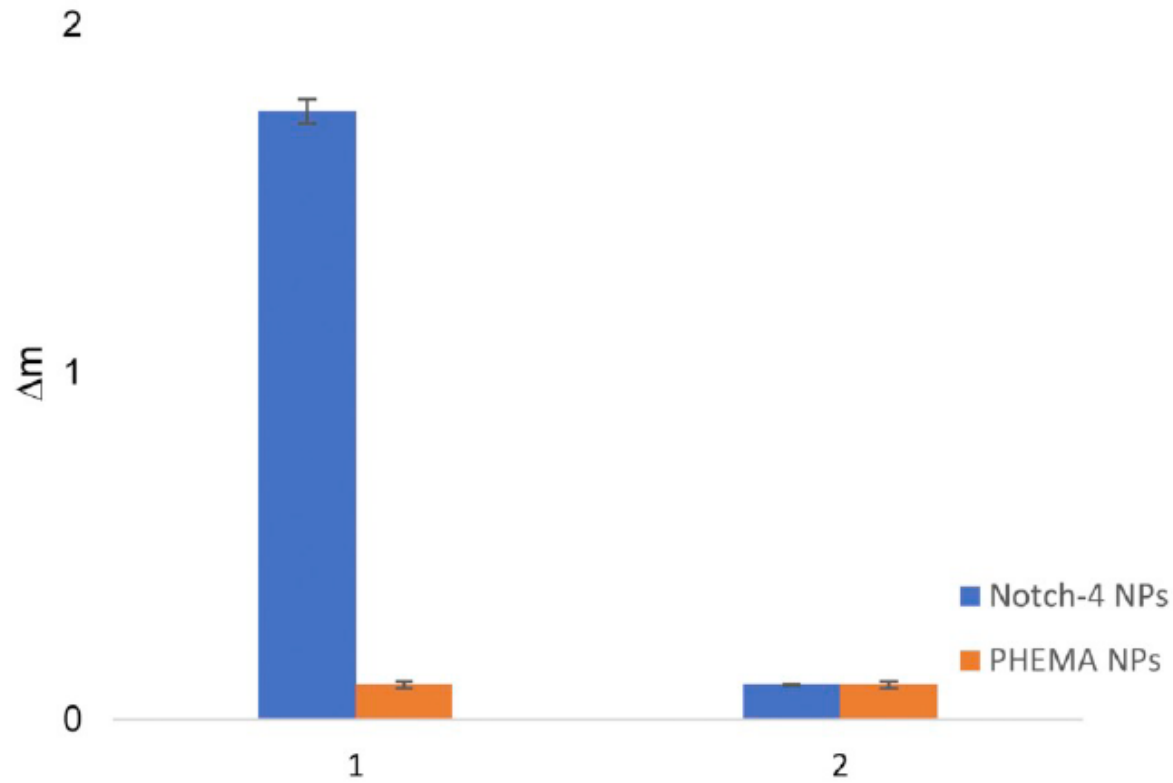
Seconda funzionalizzazione: Nanoparticelle con anticorpo specifico per il recettore "notch 4".
Perché proprio questo recettore? Alta selettività.

Microbilancia al quarzo

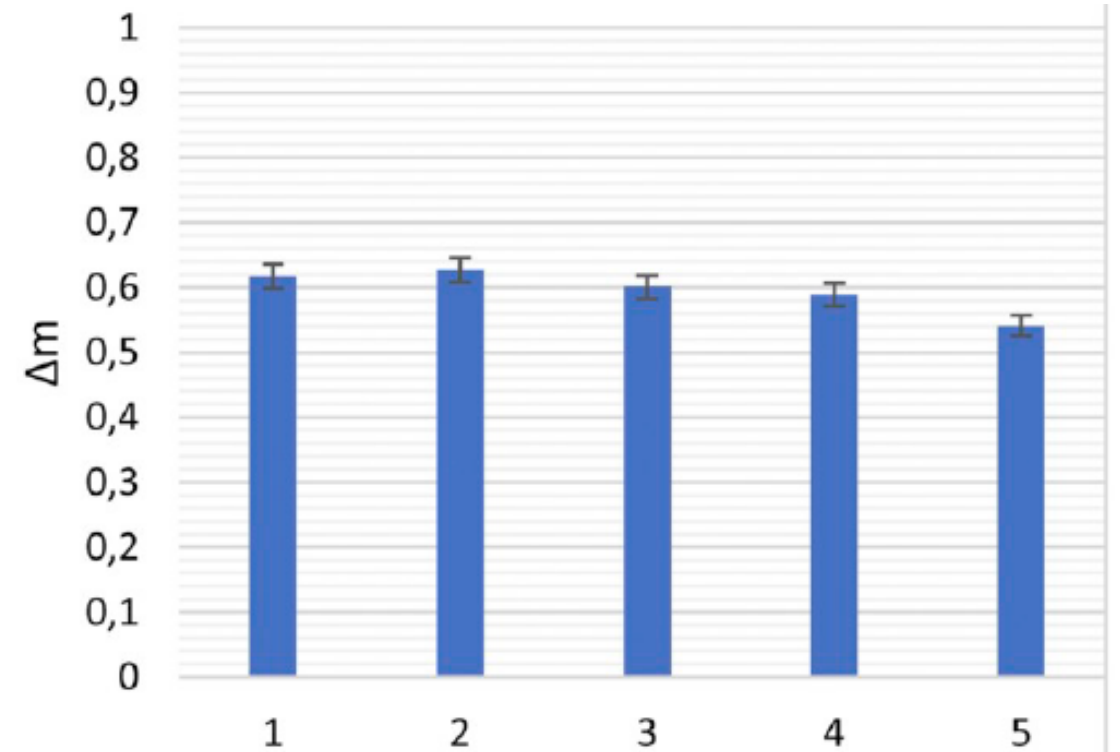


Microbilancia al quarzo

Selettività



Riusabilità



Microbilancia al quarzo

Table 1

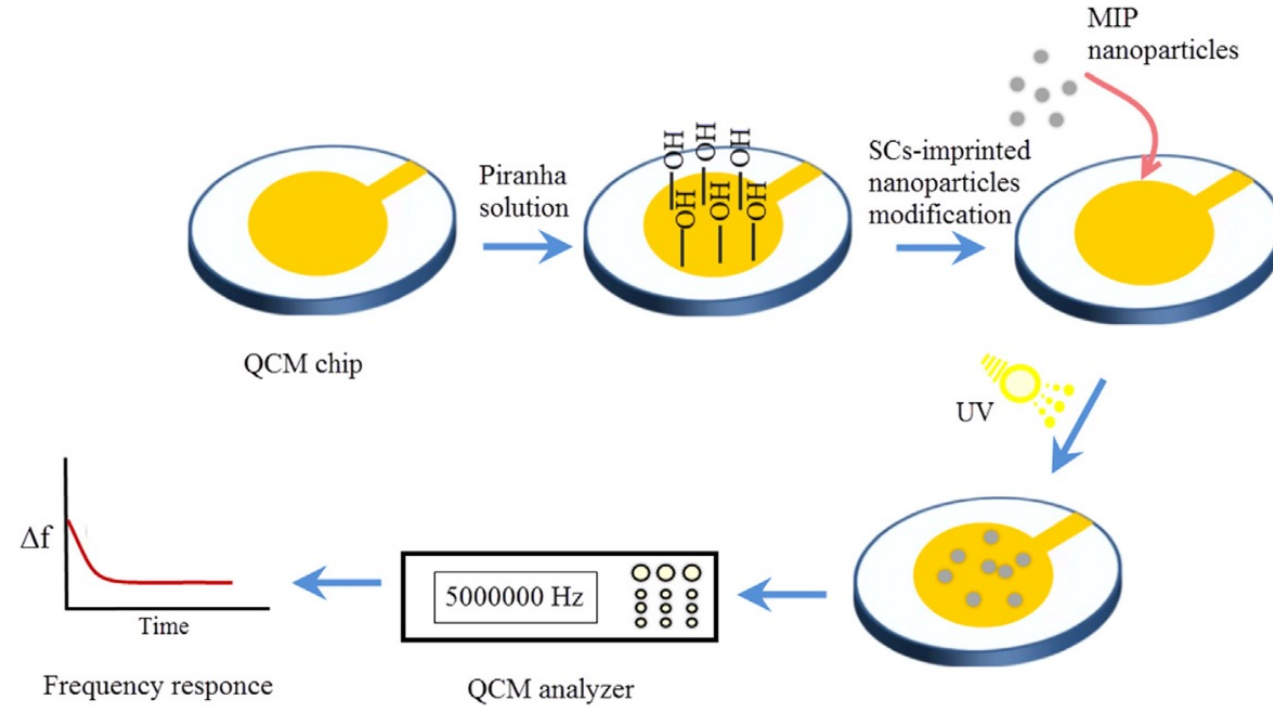
The comparison of various cells detection methods.

Detection Systems	Detection Cells	LOD (cells/mL)	Ref.
QCM biosensor	<i>human lung carcinoma</i>	100	[34]
Chitosan-based QCM biosensor	<i>breast cancer</i>	430	[35]
Aptamer based QCM biosensor	<i>leukemia</i>	1160	[36]
Leaky surface acoustic wave aptasensor array	<i>MCF-7</i>	32	[37]
QCM biosensor	<i>MDAMB 231</i>	500	[13]
Electrochemical impedance cytosensor	<i>MDAMB 231</i>	10	[38]
Electrochemical impedance spectroscopy	<i>MCF-7</i>	10	[39]
Electrochemical impedance spectroscopy	<i>SW 620</i>	79	[40]
Differential pulse voltammograms	<i>HepG2</i>	30	[41]
QCM biosensor	<i>MDAMB 231</i>	12	This study

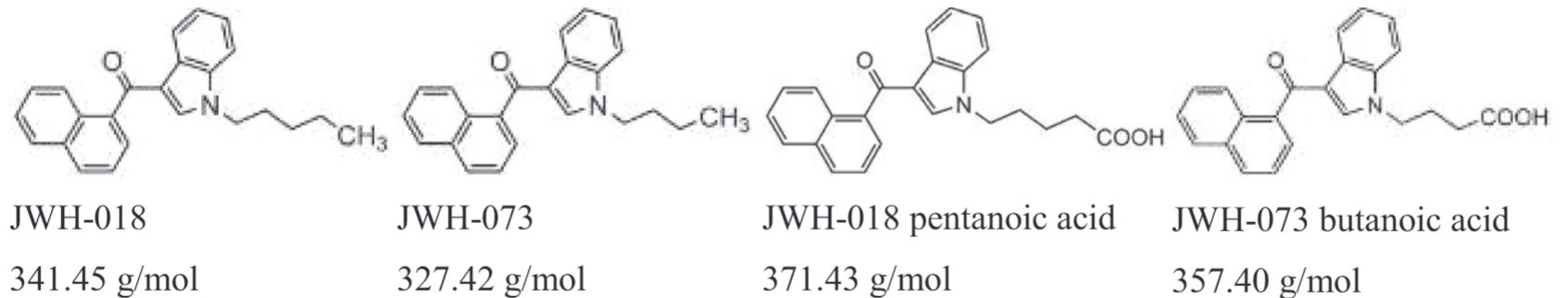
Microbilancia al quarzo

Rilevazione label-free di cannabinoidi nell'urina

Funzionalizzazione



Cannabinoidi sintetici



Microbilancia al quarzo

Studi di selettività
(soluzioni con diversi
cannabinoidi sintetici)

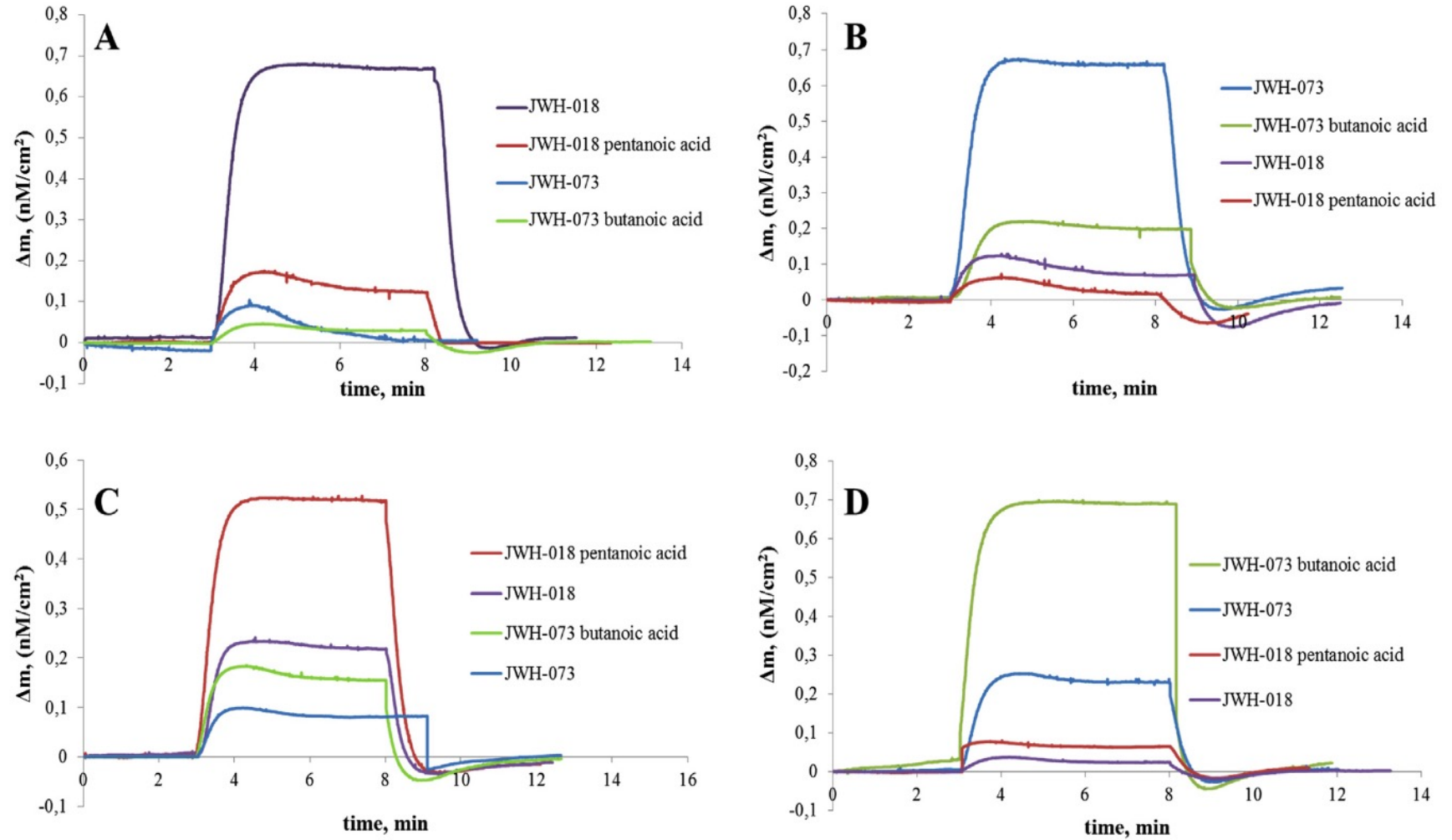


Fig. 2. Selectivity of SCs-imprinted QCM sensor; (A) JWH-018 (B) JWH-073 (C) JWH-018 pentanoic acid and (D) JWH-073 butanoic acid.

Microbilancia al quarzo

Studi di sensibilità (campioni di urina sintetica)

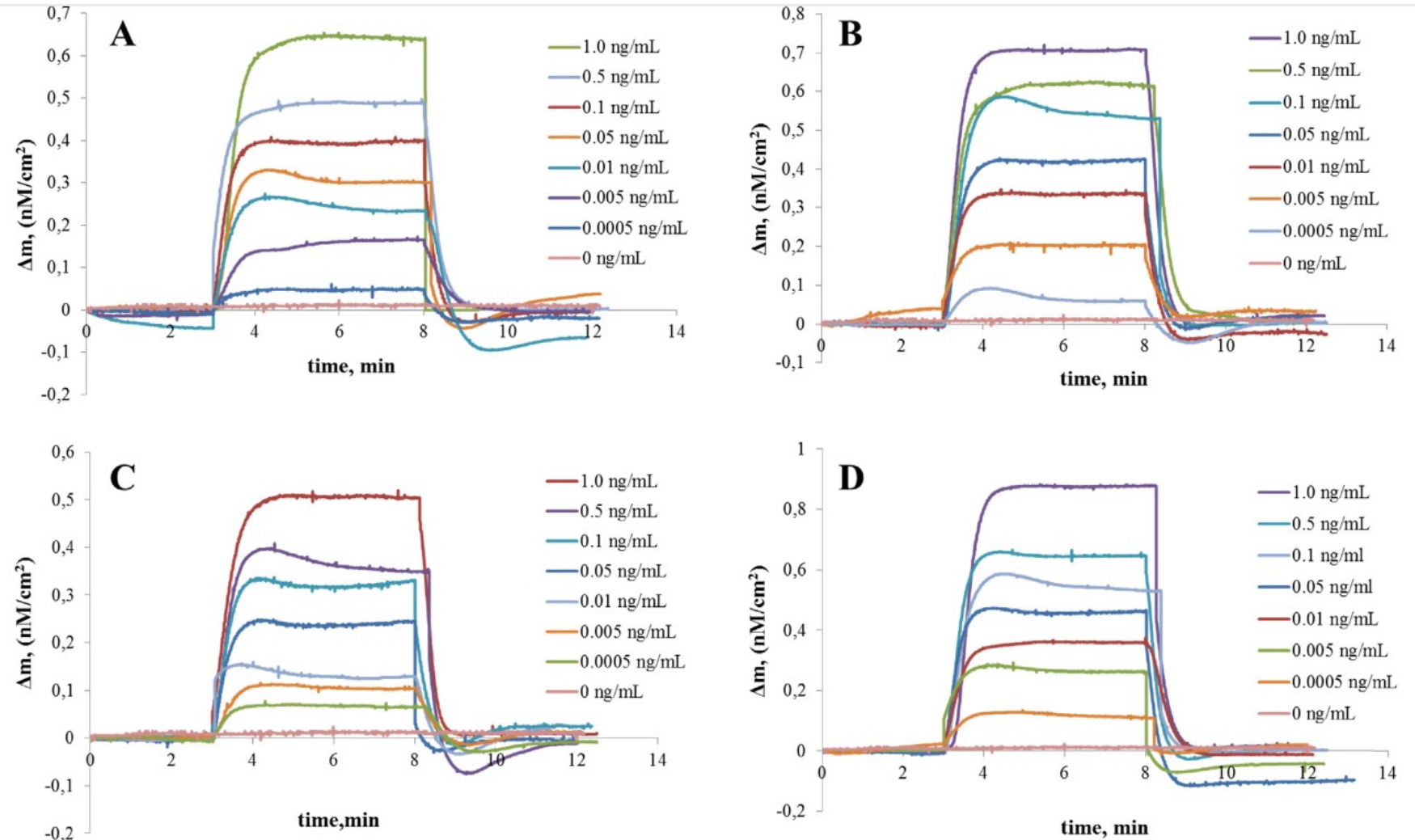
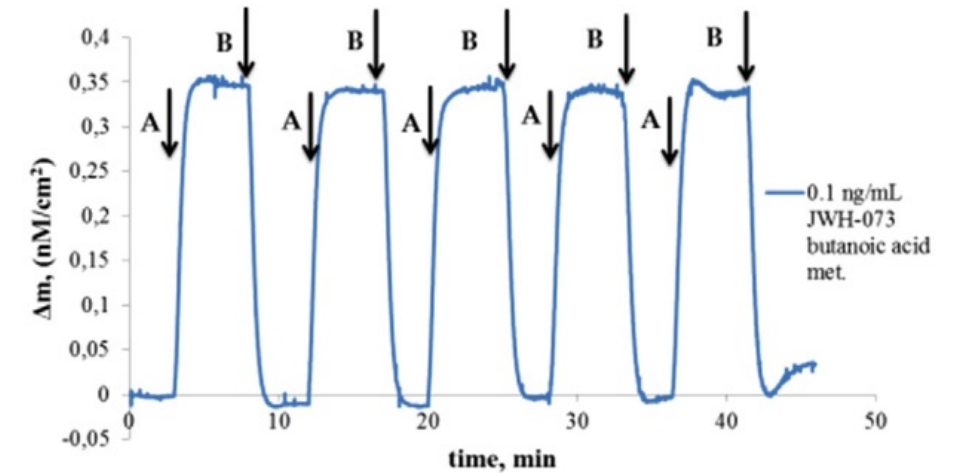
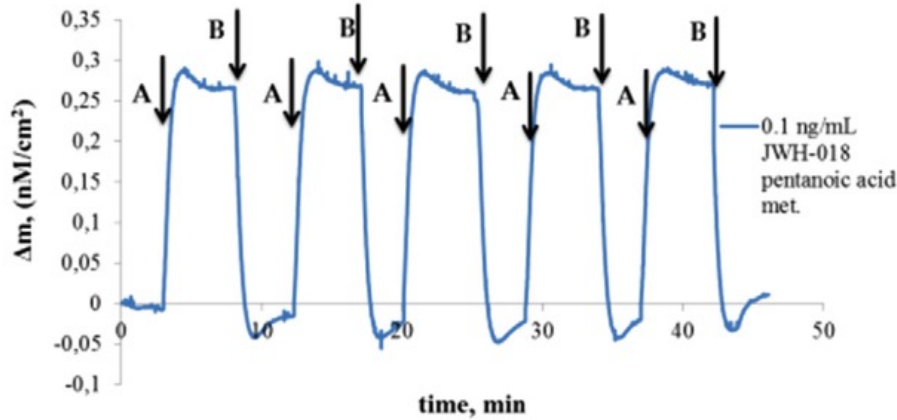
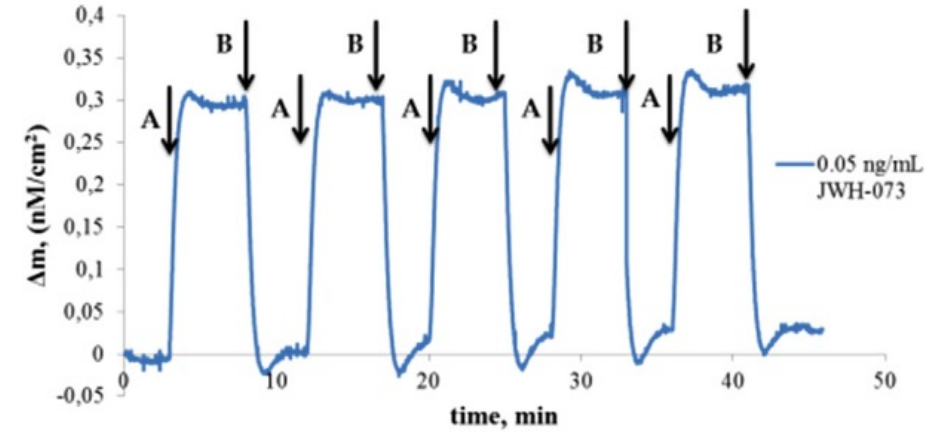
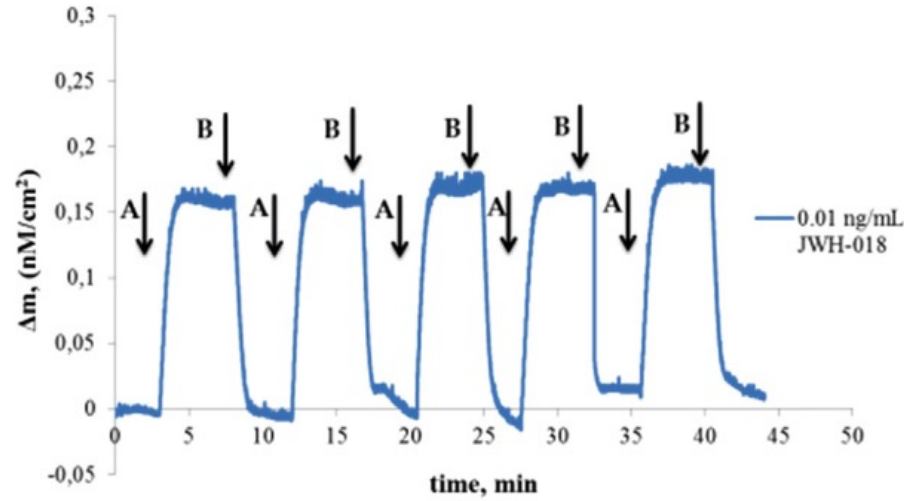


Fig. 3. Selectivity of SCs-imprinted QCM sensor; Real-time cannabinoid detection from different cannabinoid spiked synthetic urine samples; A) JWH-018; B) JWH-073; C) JWH-018 pentanoic acid and D) JWH-073 butanoic acid.

Microbilancia al quarzo

Studi di riproducibilità



Microbilancia al quarzo

Metodo gravimetrico con microbilancia al quarzo.

PRO. Sistema molto **semplice e poco costoso**. Può funzionare in ambiente liquido così come in ambiente gassoso.

CONTRO. Utilizzabile solo con molecole che presentano una massa significativa. La **massa depositata deve essere distribuita uniformemente** su tutta la superficie del quarzo (controllo molto preciso della funzionalizzazione).