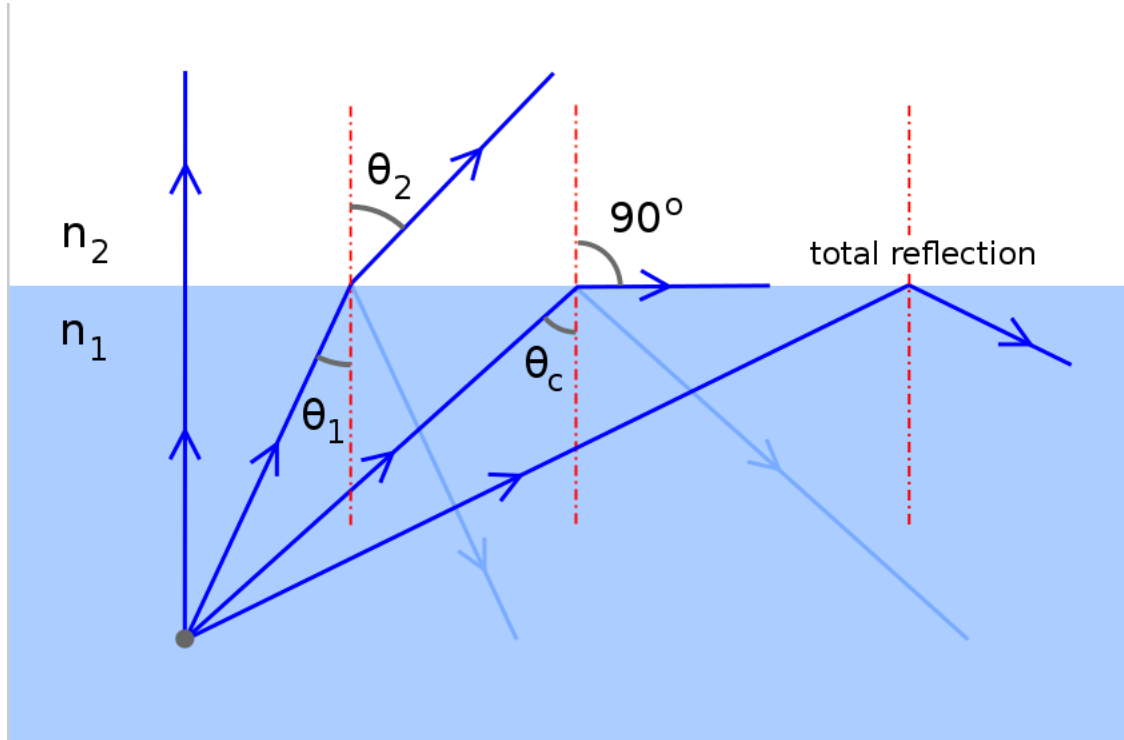


Biosensori ottici

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence



La relazione che descrive le proprietà ottiche di una interfaccia tra due mezzi a **diverso coefficiente di rifrazione** è data dalla **legge di Snell**:

$$n(1) \times \sin\theta(1) = n(2) \times \sin\theta(2)$$

$\theta(1)$: angolo (rispetto alla normale) del raggio incidente

$\theta(2)$: angolo (rispetto alla normale) del raggio rifratto

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

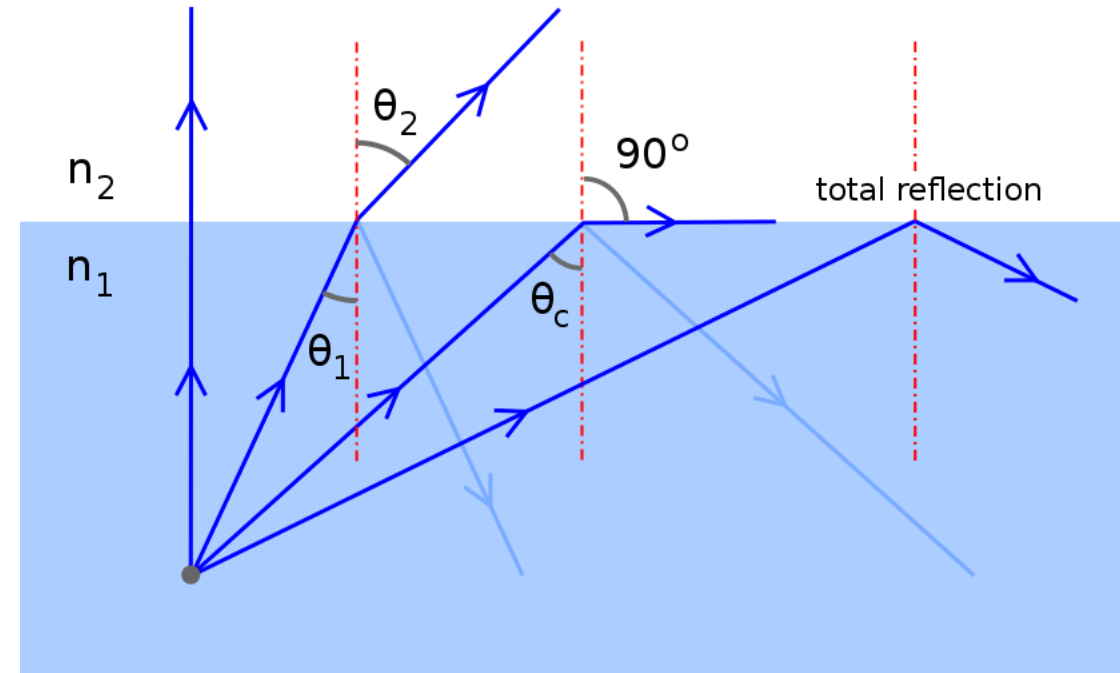
Per $\theta(1)=\theta(c)$, $\theta(2)=90$ gradi, dunque $\sin\theta(2) = 1$

Con $\theta(c)$ = angolo critico (angolo in cui abbiamo **riflessione totale**)

$$n(1) \times \sin\theta(c) = n(2)$$

$$\sin\theta(c) = n(2)/n(1)$$

$$\theta(c) = \sin^{-1}(n(2)/n(1))$$



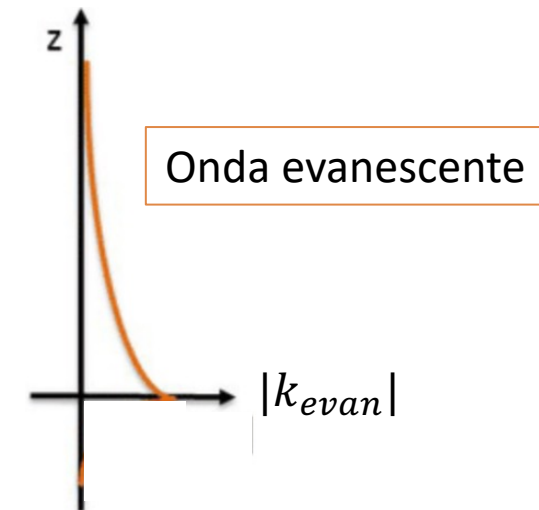
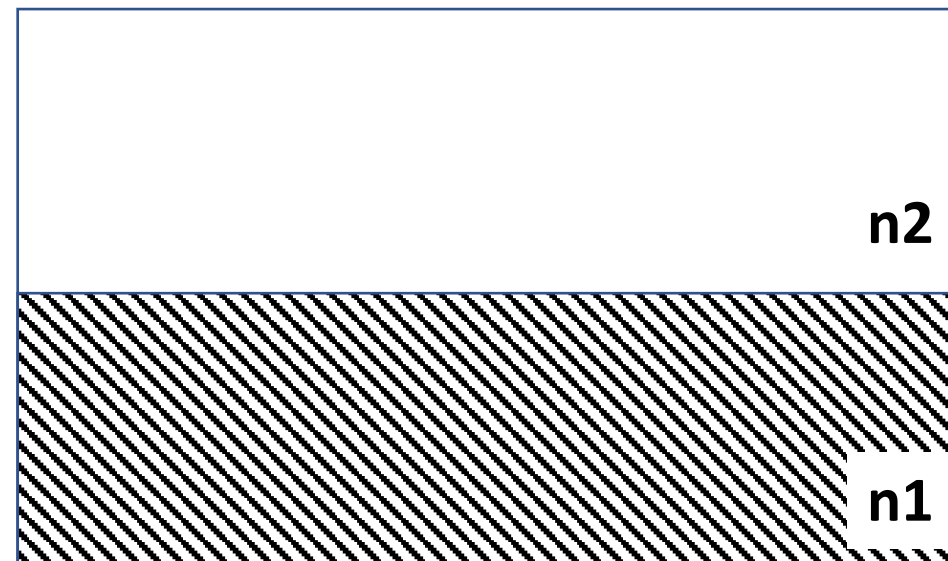
Dunque l'angolo critico dipende dalle proprietà ottiche dei due mezzi

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

In generale (cioè quando abbiamo due mezzi generici a diverso indice di rifrazione), assistiamo alla formazione di **un'onda evanescente**:

$$k_{evan} = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 \sin(\theta)$$

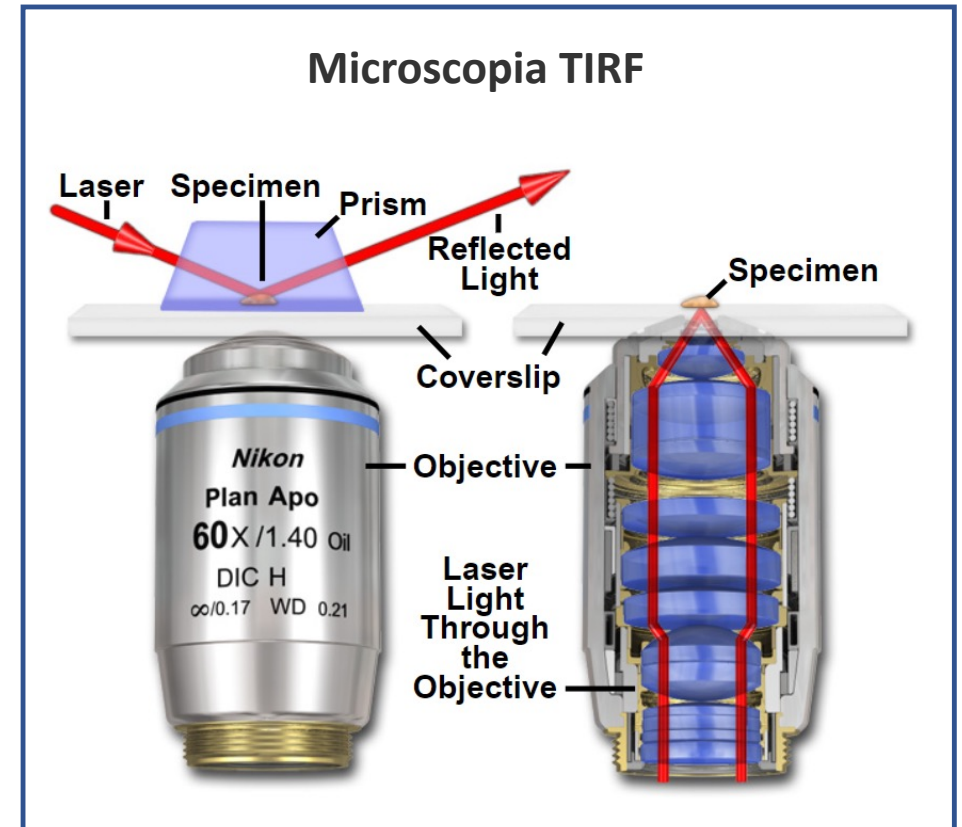
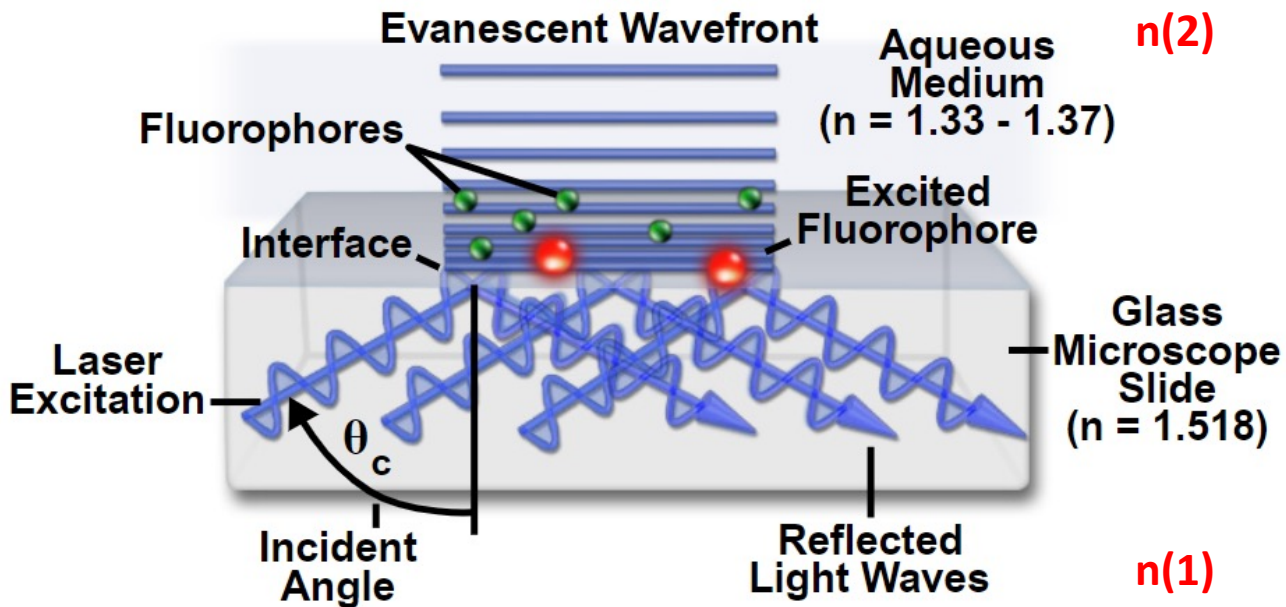
Con n_1 indice di rifrazione del mezzo a più alto indice di rifrazione, λ lunghezza d'onda della radiazione incidente e θ angolo di incidenza. L'ampiezza di quest'onda **decade esponenzialmente con la distanza dalla superficie**.



TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

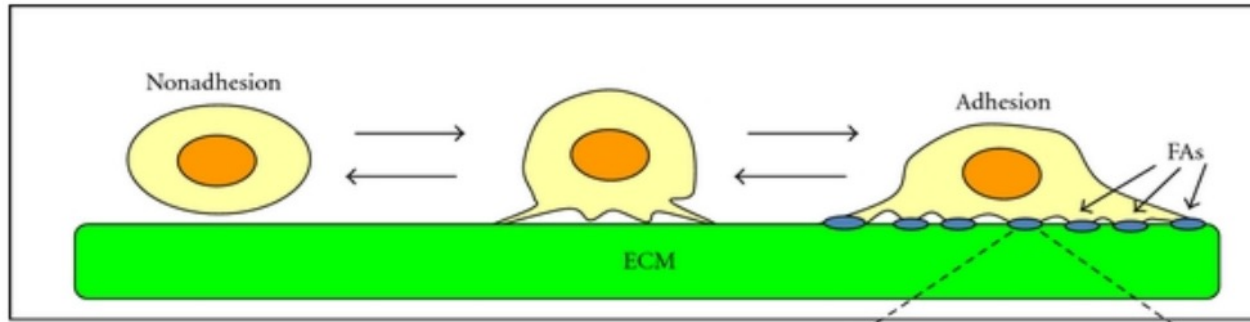
Per ottenere la riflessione totale interna devono essere dunque soddisfatte le seguenti condizioni:

- **l'indice di rifrazione del mezzo n_1 deve essere maggiore di quello del mezzo n_2** (dove viene immobilizzato il layer di bioriconoscimento).
- Deve essere prodotta un'onda evanescente: dunque l'angolo incidente $\theta(1)$ deve essere maggiore dell'angolo critico $\theta(c)$.

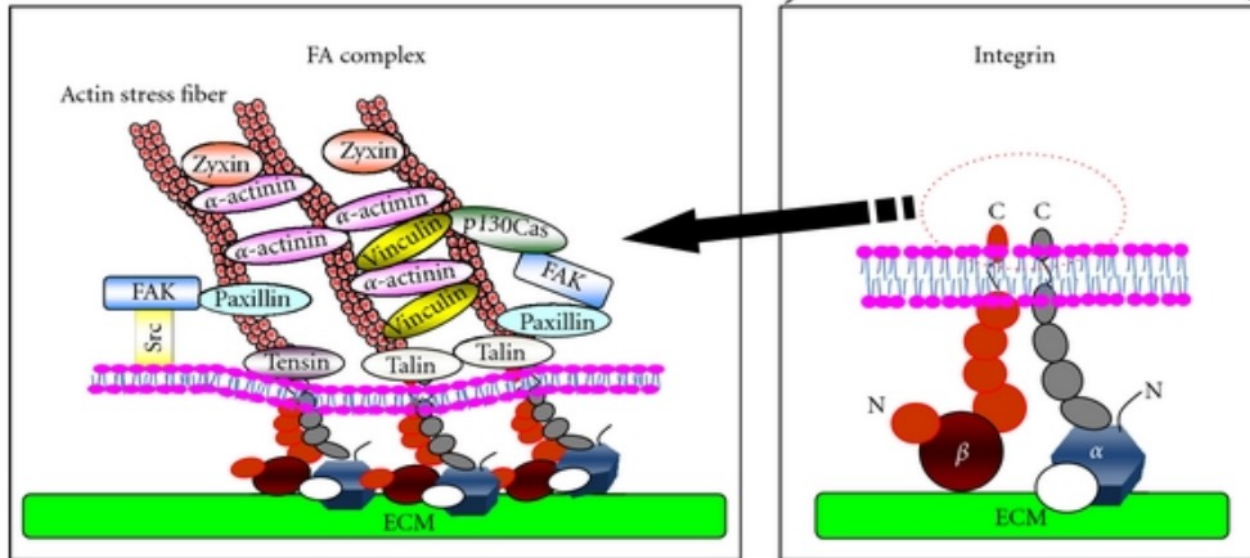


TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

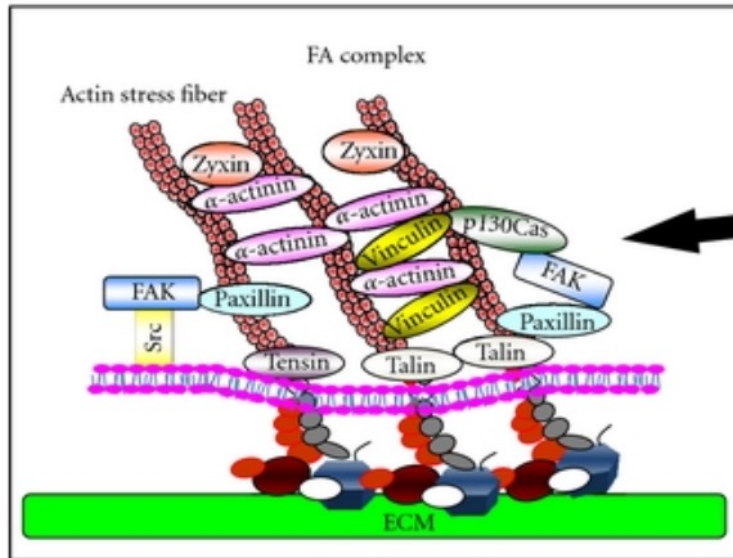
Utilizzo della microscopia TIRF: Analisi dei punti di adesione focale e migrazione cellulare



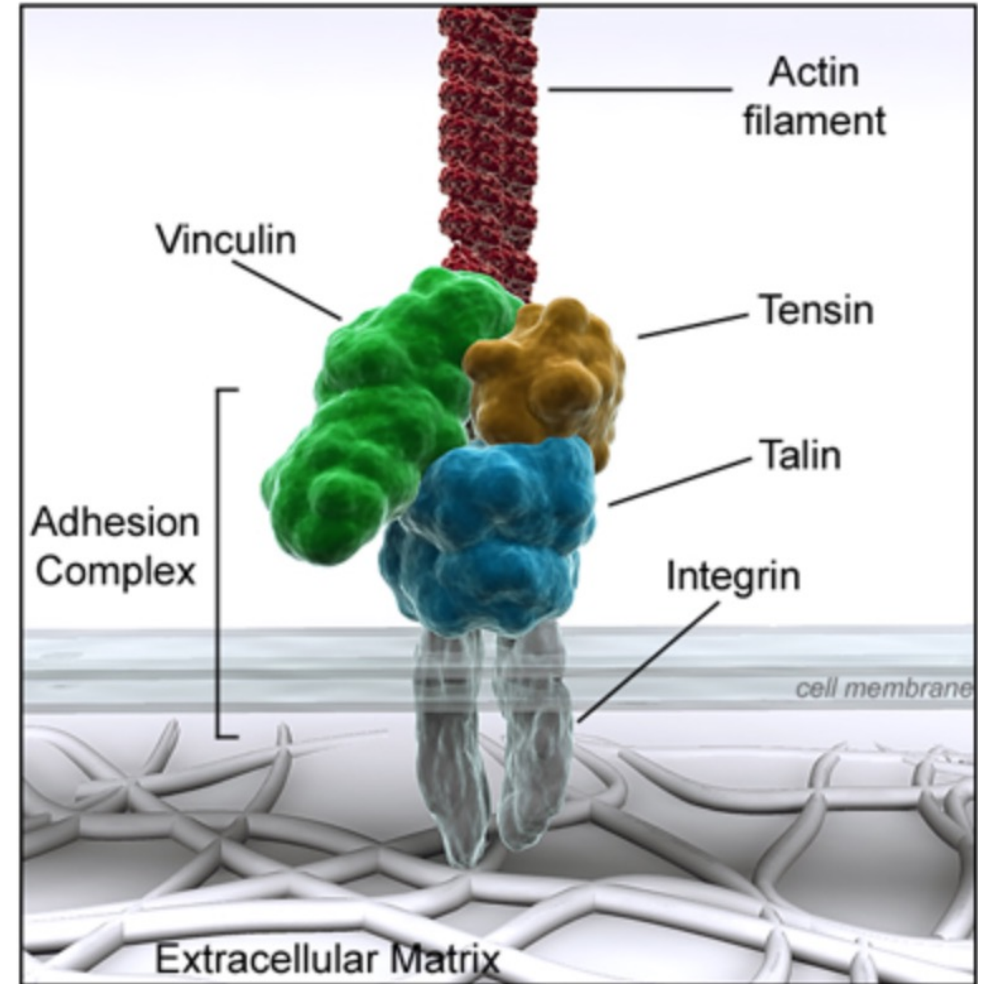
(a)



(b)



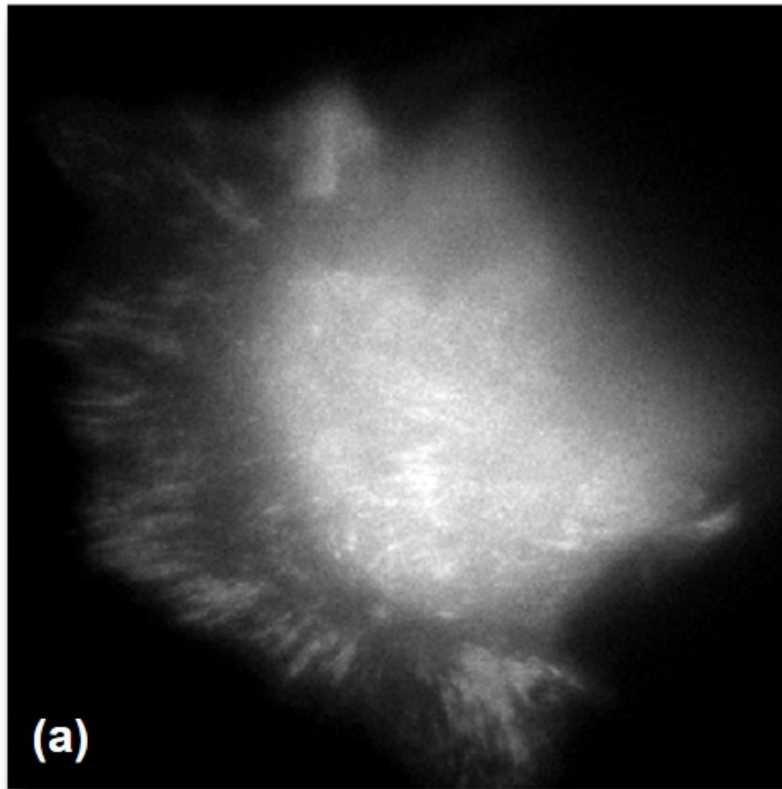
(c)



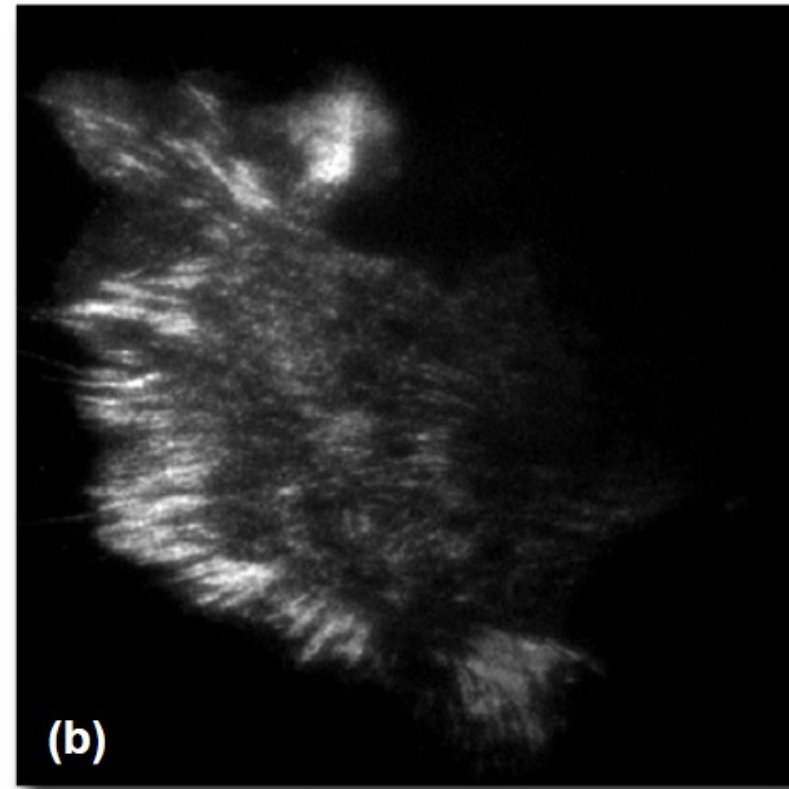
TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

Possibile utilizzo della microscopia TIRF: **Analisi dei punti di adesione focale e migrazione cellulare**

Fluorescenza standard

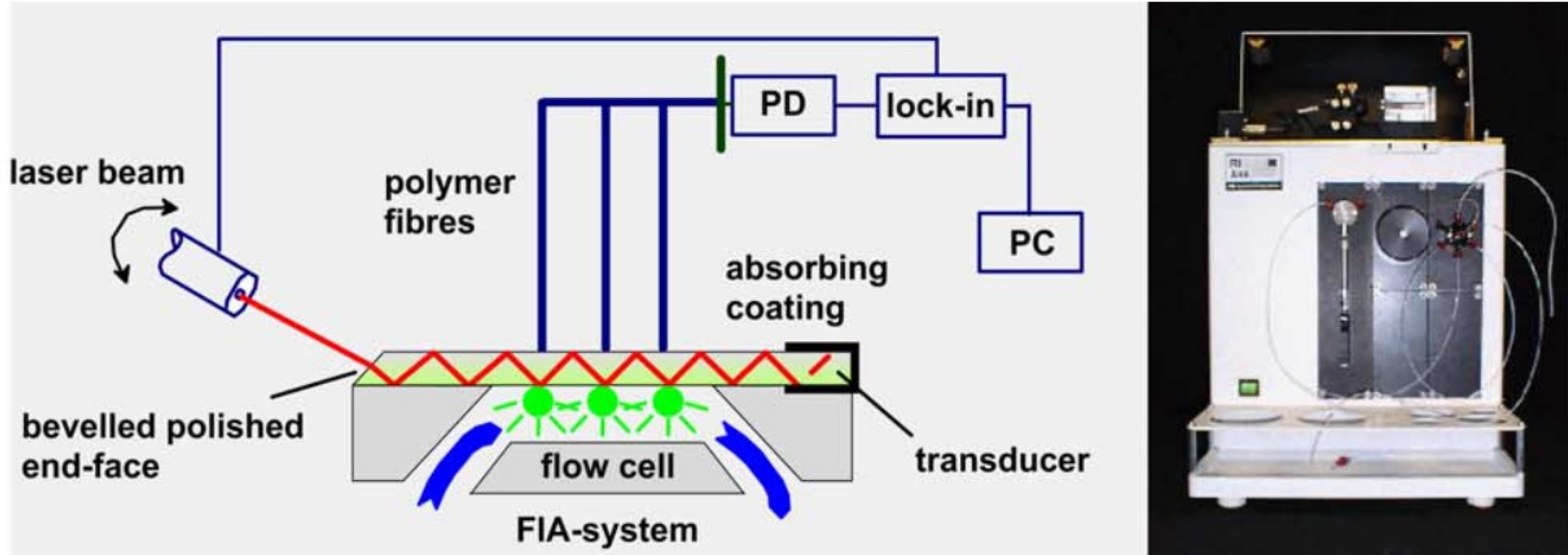


TIRF



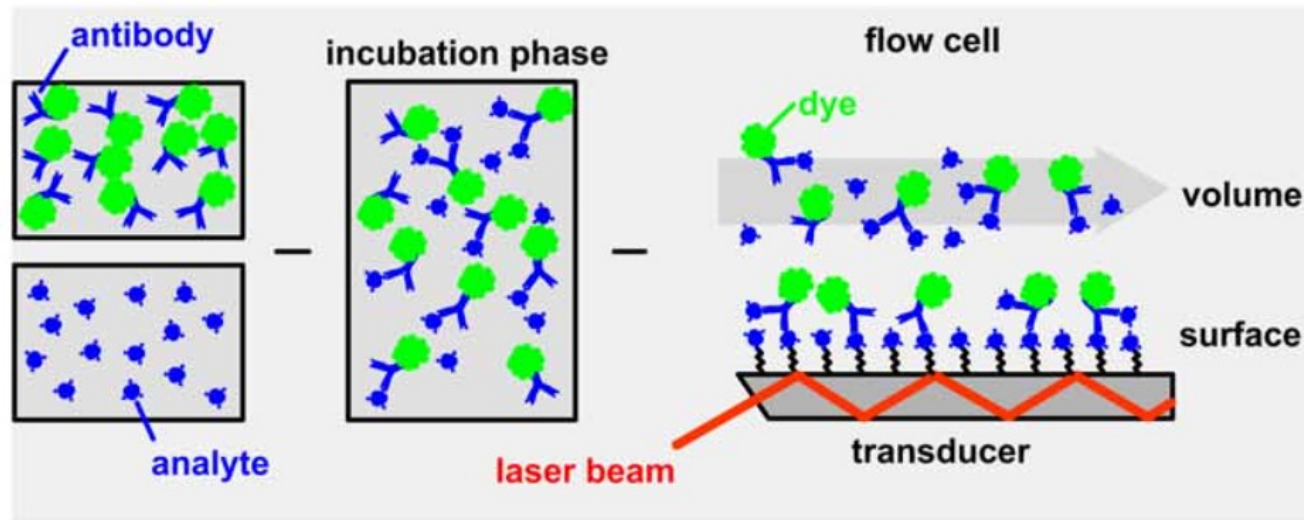
TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

TIRF per biosensing



TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

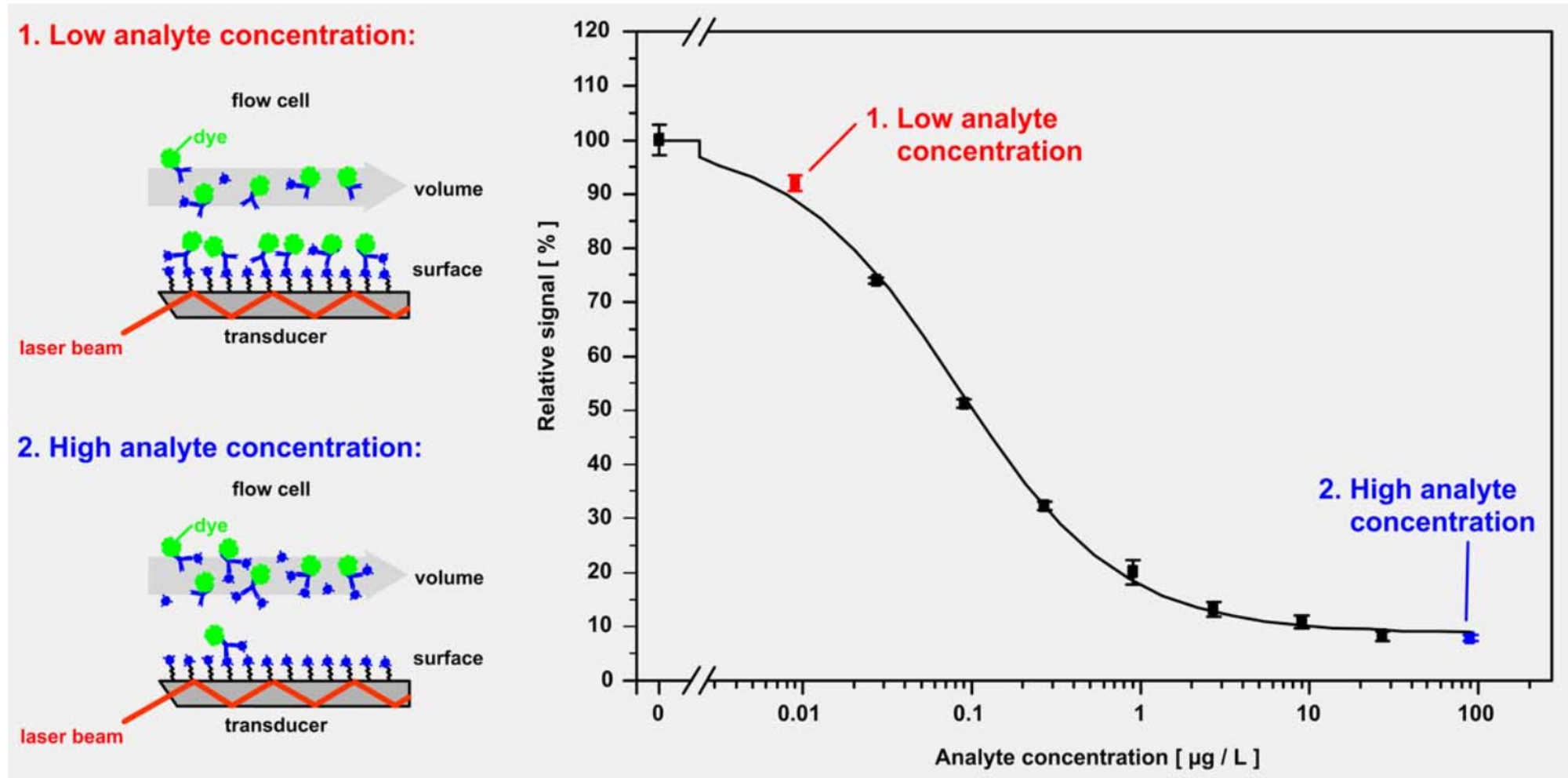
TIRF per biosensing



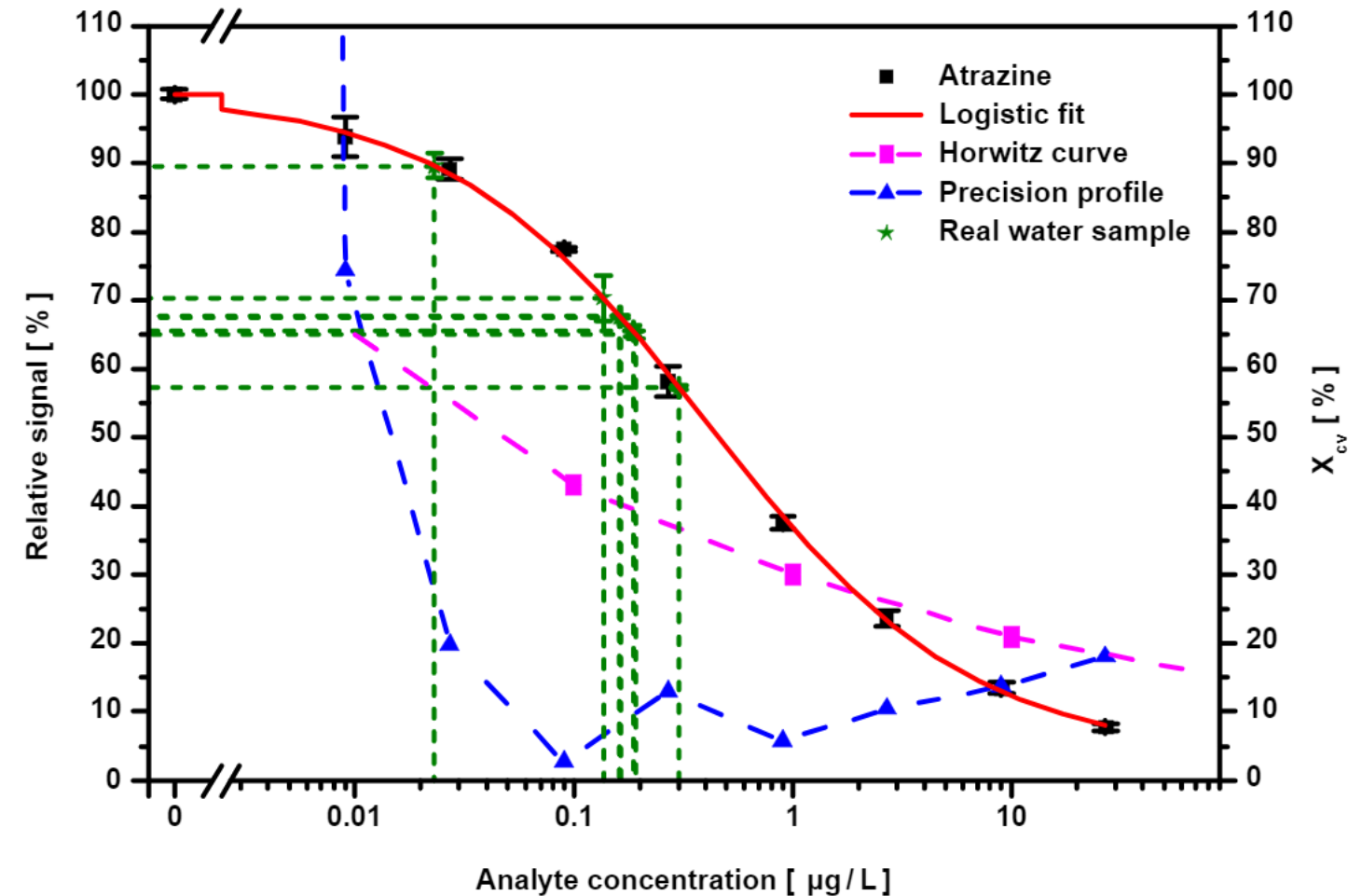
Superficie funzionalizzata con molecole di analita modificate

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence

TIRF per biosensing



TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence



TIRF per biosensing: rilevazione di Atrazina (erbicida) nell'acqua.

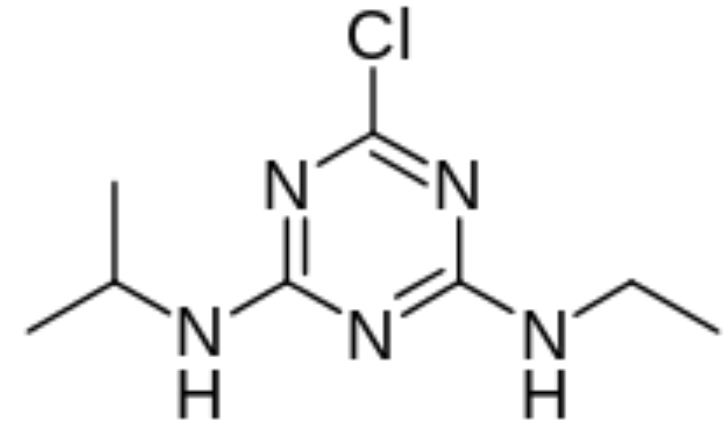
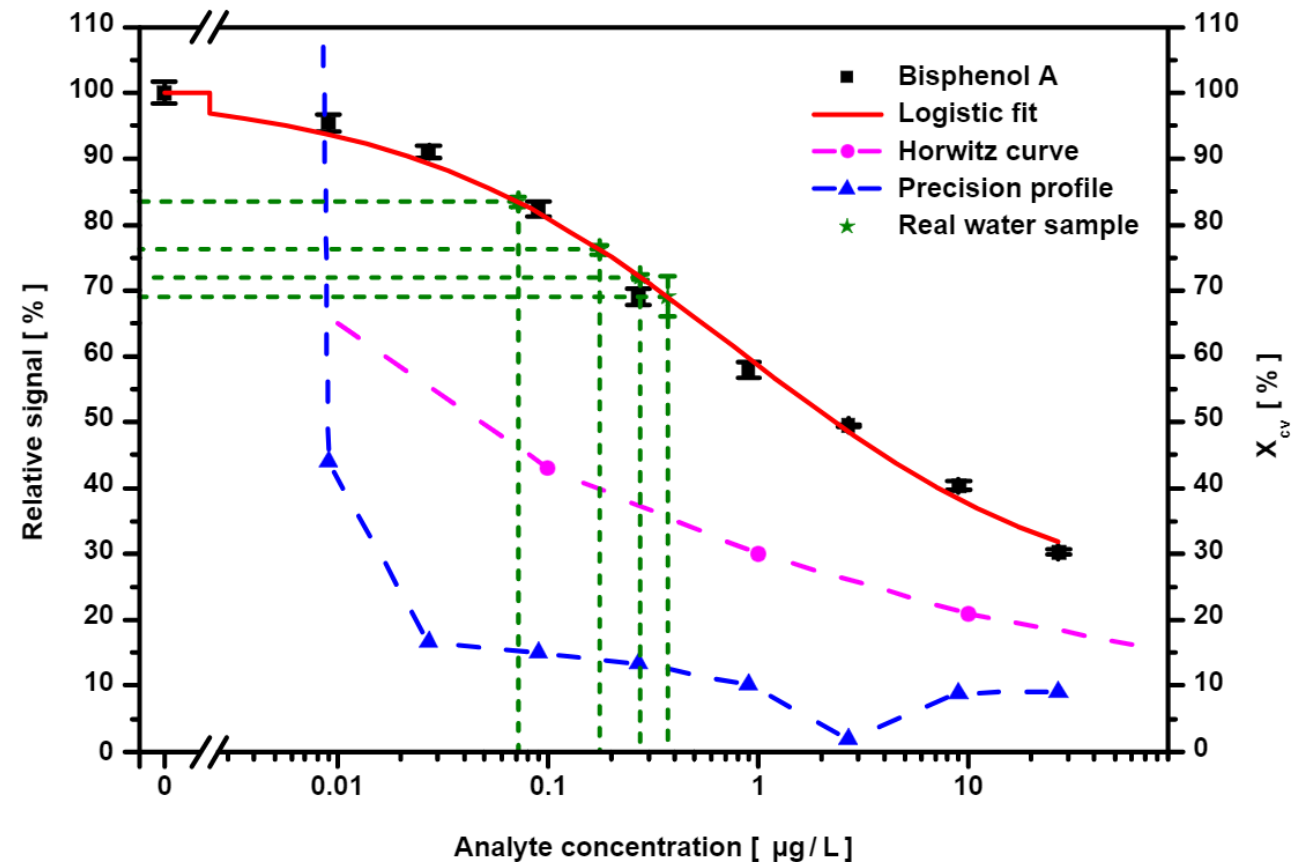


Fig. 2. Calibration for atrazine in the multi-analyte mode from 0 to 27 $\mu\text{g L}^{-1}$. The antibody (a-Z) concentration was 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the OVA concentration 1.00 mg mL^{-1} in each sample. Experimental design: nine independent blank (Milli-Q water) measurements and eight concentration steps each measured as three replica. For all concentrations the standard deviation (S.D.) for the replica is shown as error bar.

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence



TIRF per biosensing: **rilevazione di Bisfenolo A (BPA)** nell'acqua. Il **BPA mima alcuni estrogeni**, interferendo con il **sistema endocrino**. Dal 2008, molti stati hanno imposto il ritiro dal commercio di imballaggi/manufatti in plastica contenenti BPA.

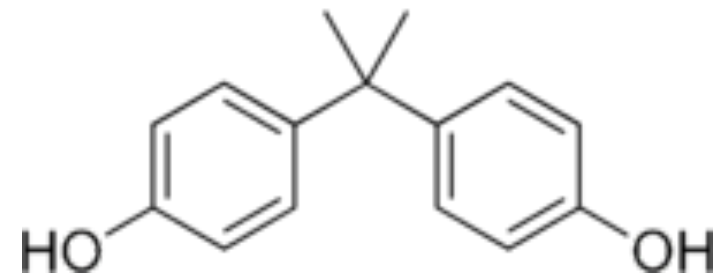
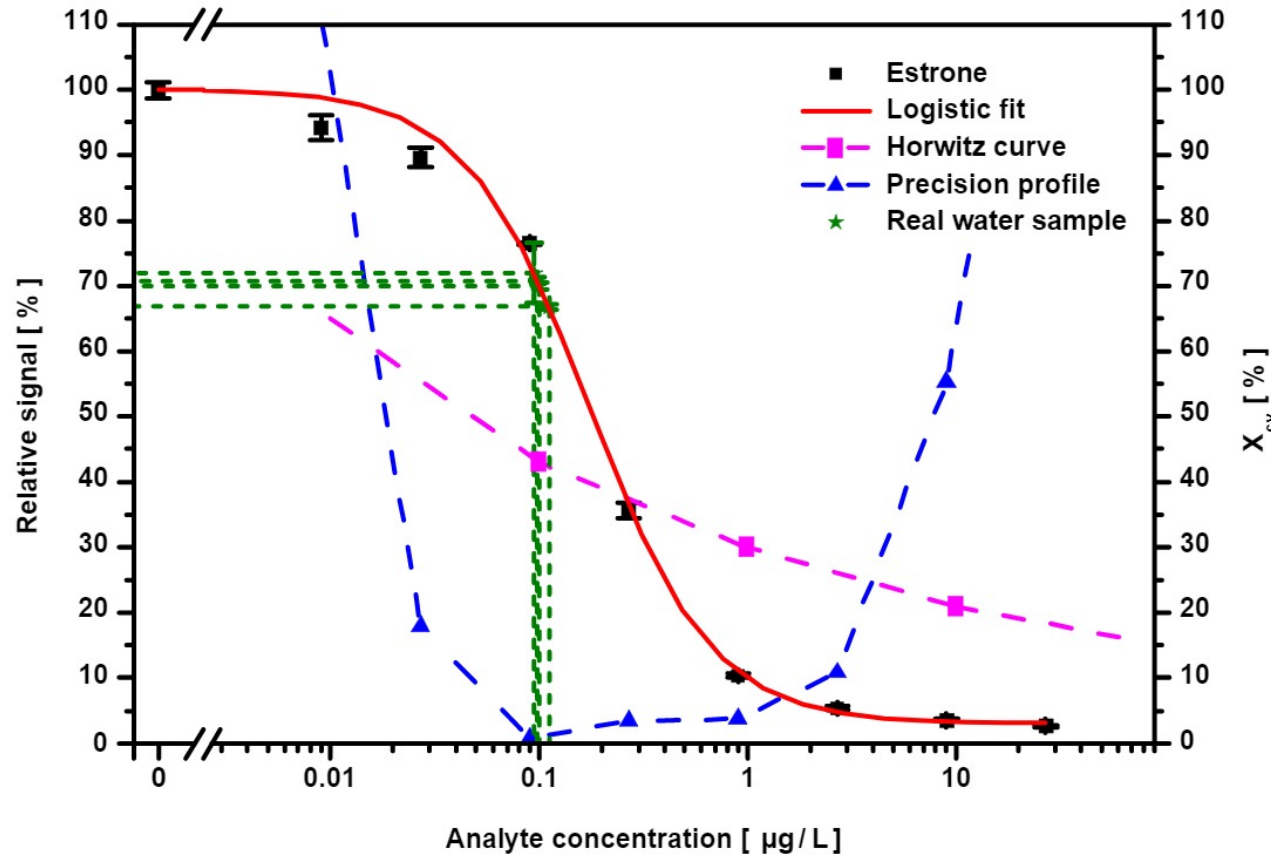


Fig. 3. Calibration for bisphenol A in the multi-analyte mode from 0 to 27 $\mu\text{g L}^{-1}$. The antibody (a-BPA) concentration was 0.33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the OVA concentration 1.00 mg mL^{-1} in each sample. Experimental design: nine independent blank (Milli-Q water) measurements and eight concentration steps each measured as three replica. For all concentrations the standard deviation (S.D.) for the replica is shown as error bar.

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence



TIRF per biosensing: **rilevazione di estrone nell'acqua.** L'estrone è utilizzato in alcune terapie ormonali e la sua presenza nelle acque potabili è da tenere sotto controllo.

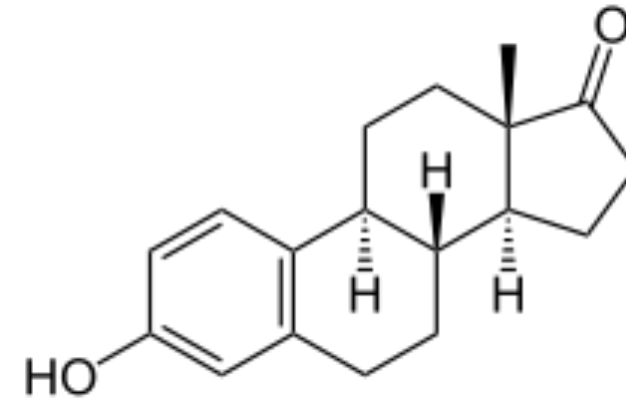
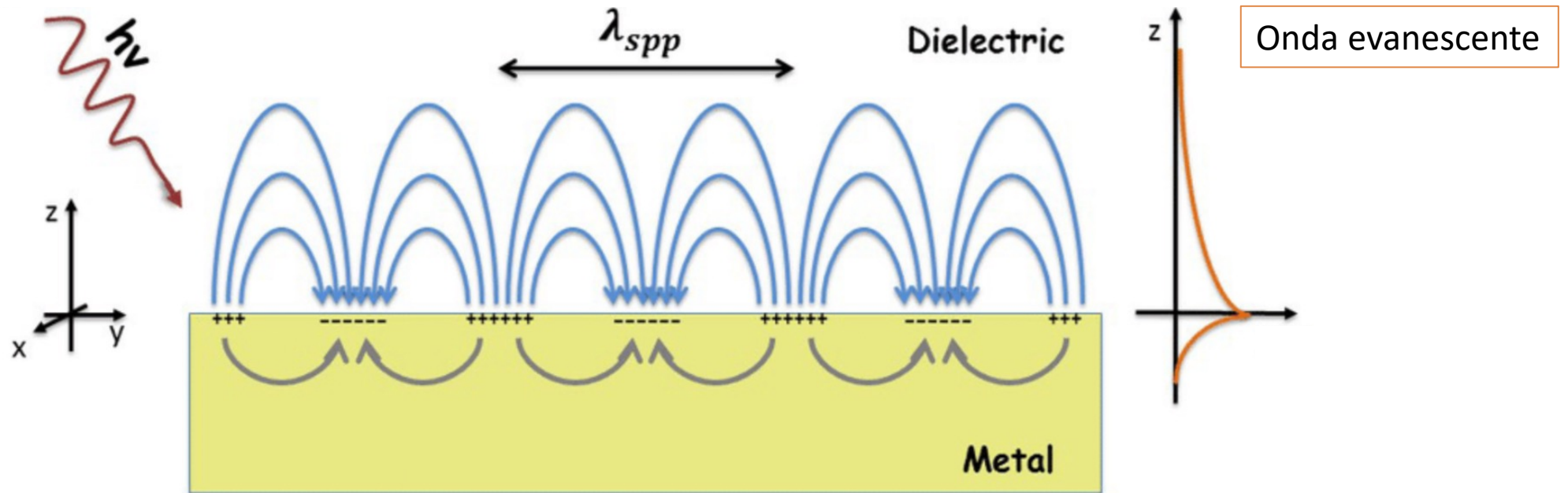


Fig. 4. Calibration for estrone in the multi-analyte mode from 0 to 27 μg L⁻¹. The antibody (α-ES) concentration was 0.08 μg mL⁻¹, the OVA concentration 1.00 mg mL⁻¹ in each sample. Experimental design: nine independent blank (Milli-Q water) measurements and eight concentration steps each measured as three replica. For all concentrations the standard deviation (S.D.) for the replica is shown as error bar.

Biosensori ottici SPR (Surface Plasmon Resonance)

SPR - Surface Plasmon Resonance

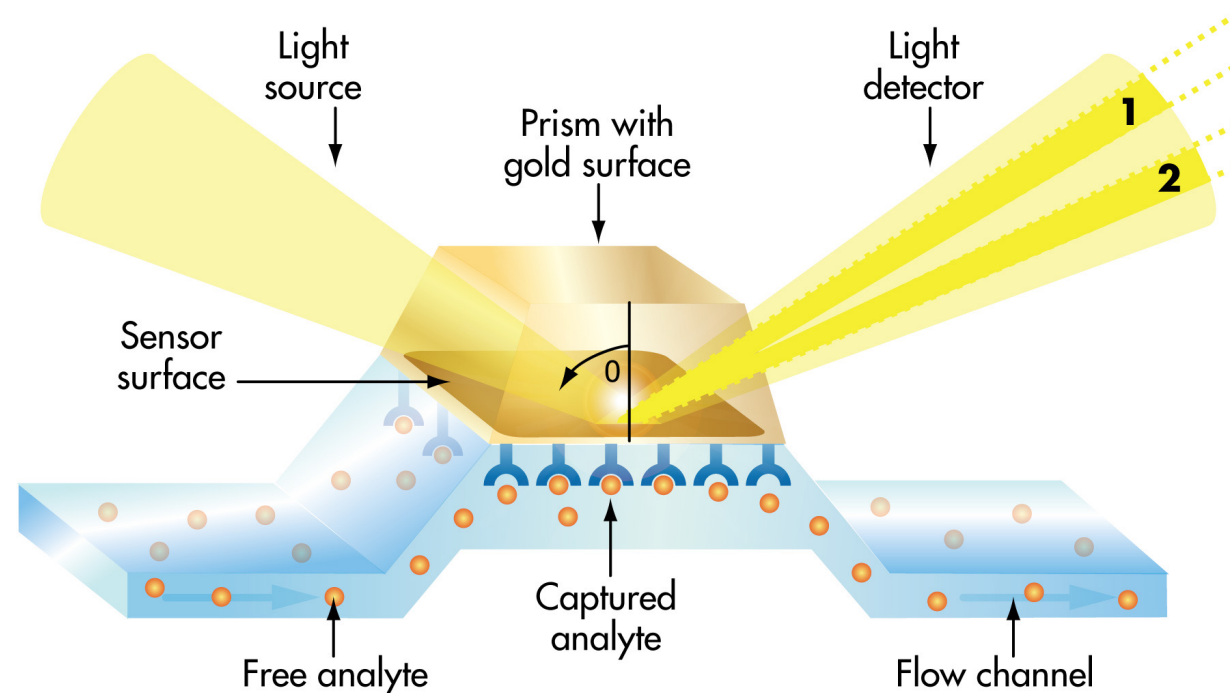
Il fenomeno dei “plasmoni superficiali” è legato alle **oscillazioni delle cariche libere superficiali (elettroni)** indotte all’interfaccia tra un metallo e un materiale dielettrico da una **eccitazione di tipo ottico**. **Parte dell’energia della radiazione incidente rimane “legata” agli elettroni liberi** determinando l’insorgenza di un’onda evanescente.



SPR - Surface Plasmon Resonance

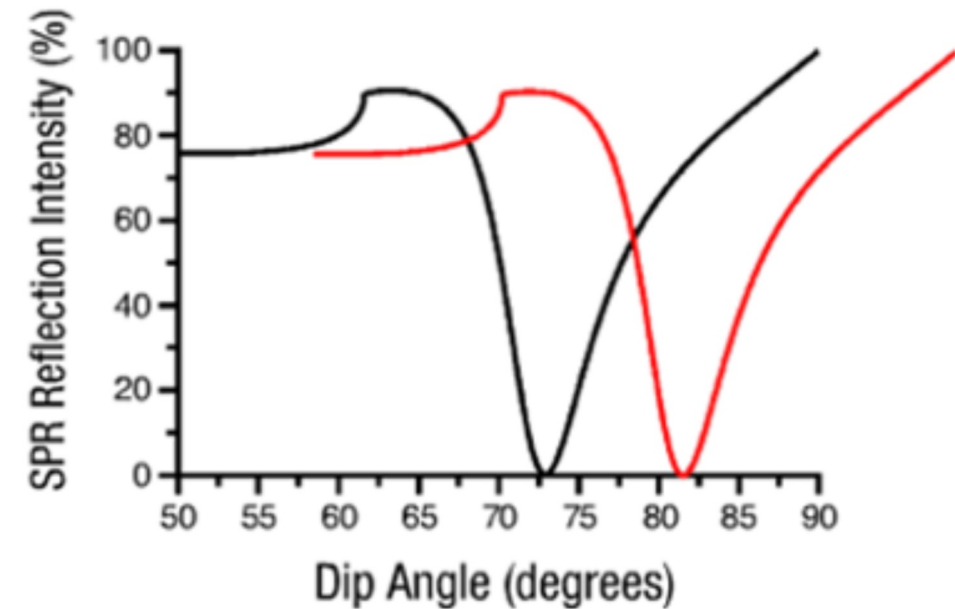
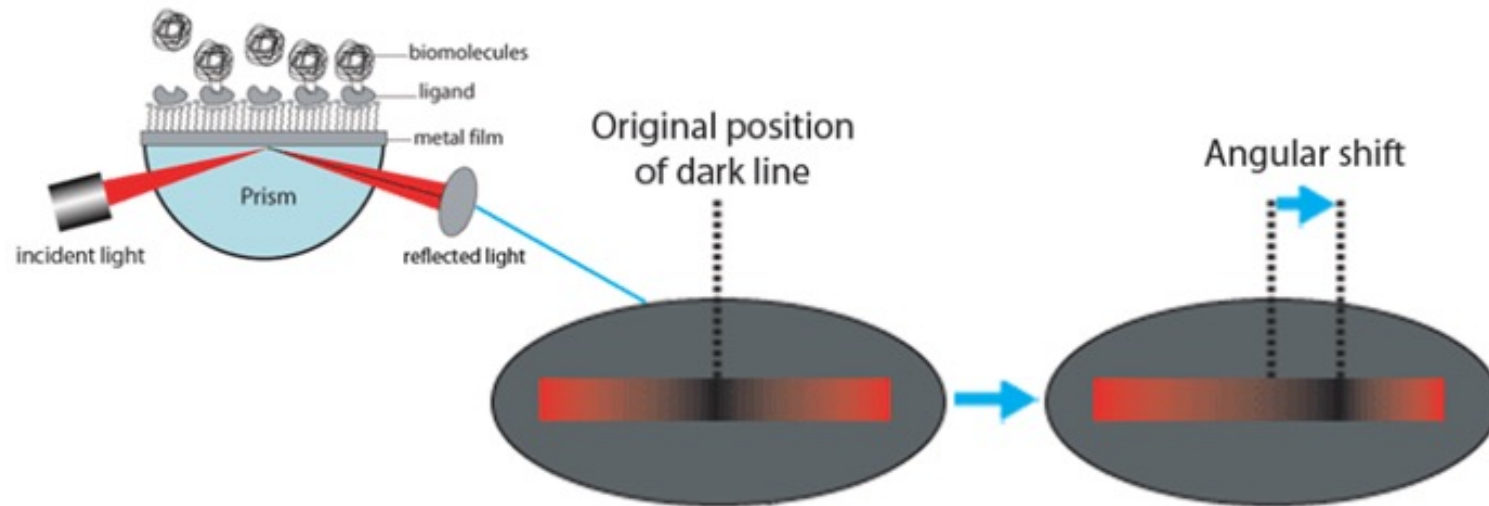
L'intensità della luce riflessa dipende dall'angolo di incidenza della radiazione eccitante: quando **l'intensità della luce riflessa raggiunge il suo minimo**, siamo in presenza di un fenomeno chiamato **risonanza dei plasmoni superficiali**.

L'**angolo di eccitazione** per cui si raggiunge la risonanza dà informazioni su ciò che accade sulla superficie.



SPR - Surface Plasmon Resonance

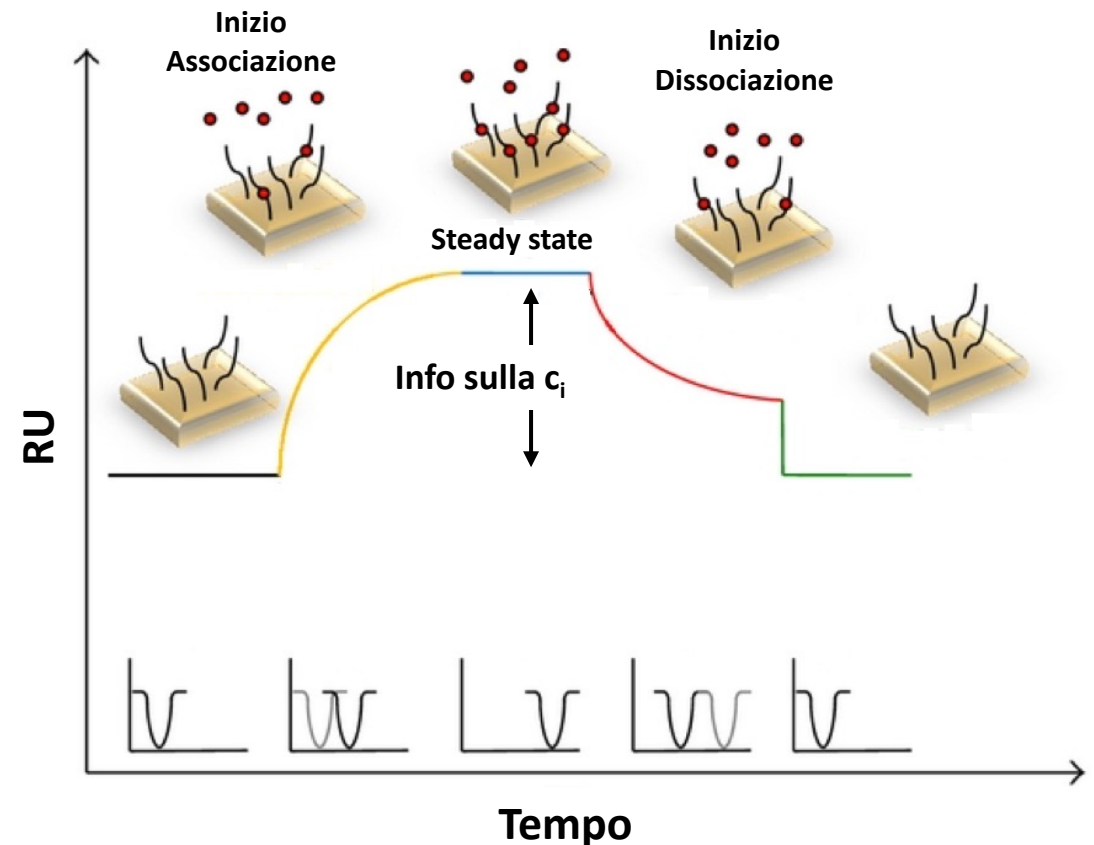
Caratteristica di un sensore SPR. Nell'asse delle X viene posto l'angolo di eccitazione (cioè l'angolo tra il laser e la superficie). Nell'asse delle Y c'è invece l'intensità della luce riflessa dalla superficie. Il minimo della curva (cioè l'angolo per cui la riflessione è minima) indica l'angolo per cui avviene l'eccitazione dei plasmoni superficiali e prende il nome di **angolo critico**.



SPR - Surface Plasmon Resonance

Sensogramma. L'angolo per cui abbiamo l'eccitazione dei plasmoni varia a seconda di ciò che accade sulla superficie del sensore (per esempio un evento di binding). Se plottiamo la variazione nel tempo dell'angolo di eccitazione otteniamo il **sensogramma**, una curva caratteristica dei sensori SPR che dà informazioni sulla cinetica della reazione che avviene sulla superficie.

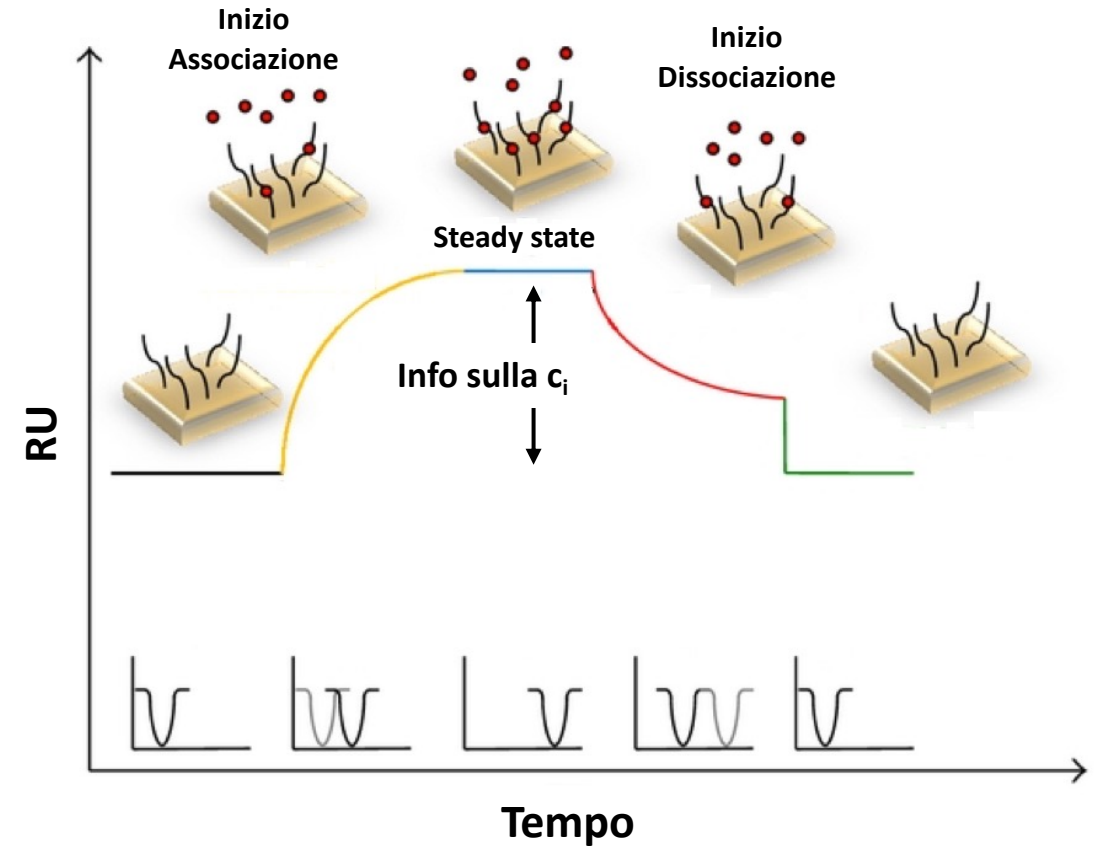
Sull'asse delle Y ci sono le **Resonance Units (RU)** le quali sono usate per descrivere l'evoluzione del segnale. 1 RU è indicato come una variazione dell'angolo critico pari a 10^{-4} deg.



SPR - Surface Plasmon Resonance

L'aumento della risposta durante la fase di associazione rappresenta la formazione del complesso (Ag-Ac, ssDNA-ssDNAc, avidina-biotina, etc) in tempo reale.

Lo **steady state** è rappresentativa di una situazione in cui il rate di associazione e quello di dissociazione sono uguali. In alcuni casi può indicare **l'occupazione di tutti i siti di legame**.

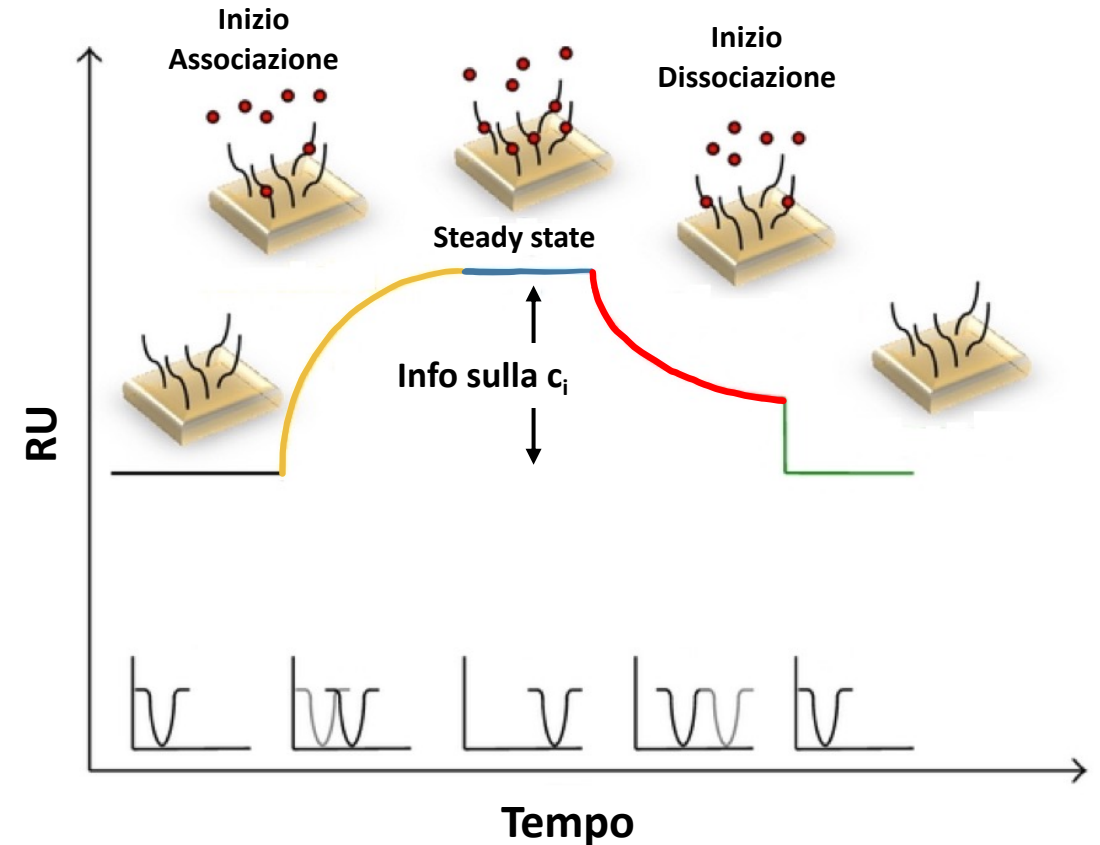


SPR - Surface Plasmon Resonance

La dinamica di associazione può essere studiata dalla parte ascendente della curva, dalla quale dunque si può ricavare k_a .

Il valore RU massimo viene utilizzato per stimare la quantità di analita legato (c_i).

La superficie può essere sciacquata e la conseguente variazione di RU dà info sui fenomeni di dissociazione (e dunque sulla k_d).

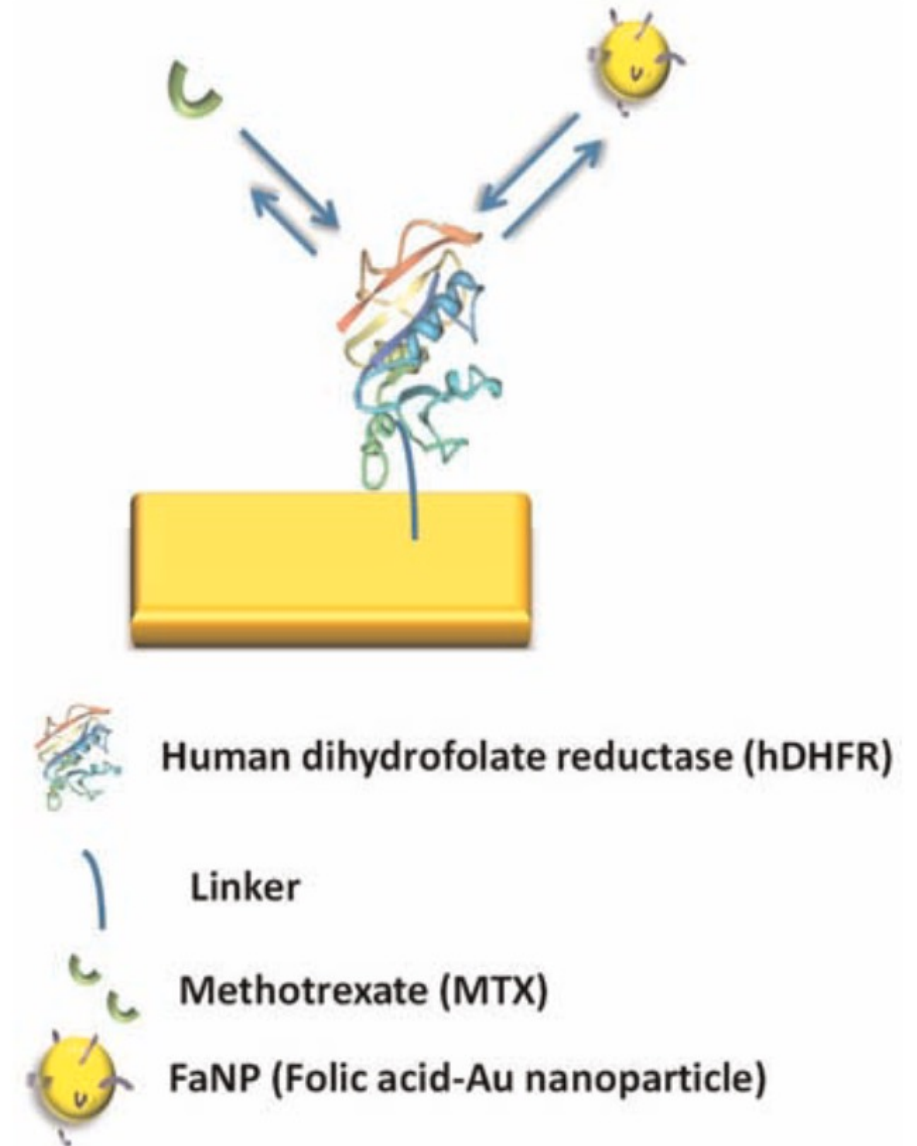


SPR - Surface Plasmon Resonance

Monitoraggio dell'attività del farmaco antitumorale

Methotrexate (4-amino-10-methylpteroylglutamic acid - **MTX**).

L'MTX è un **analogo dell'acido folico**, il quale è un **inibitore dell'enzima hDHFR**. L'hDHFR svolge un ruolo fondamentale nella replicazione del DNA durante la divisione cellulare. Il trattamento con MTX determina dunque una **riduzione della proliferazione delle cellule cancerose**.



SPR- Surface Plasmon Resonance

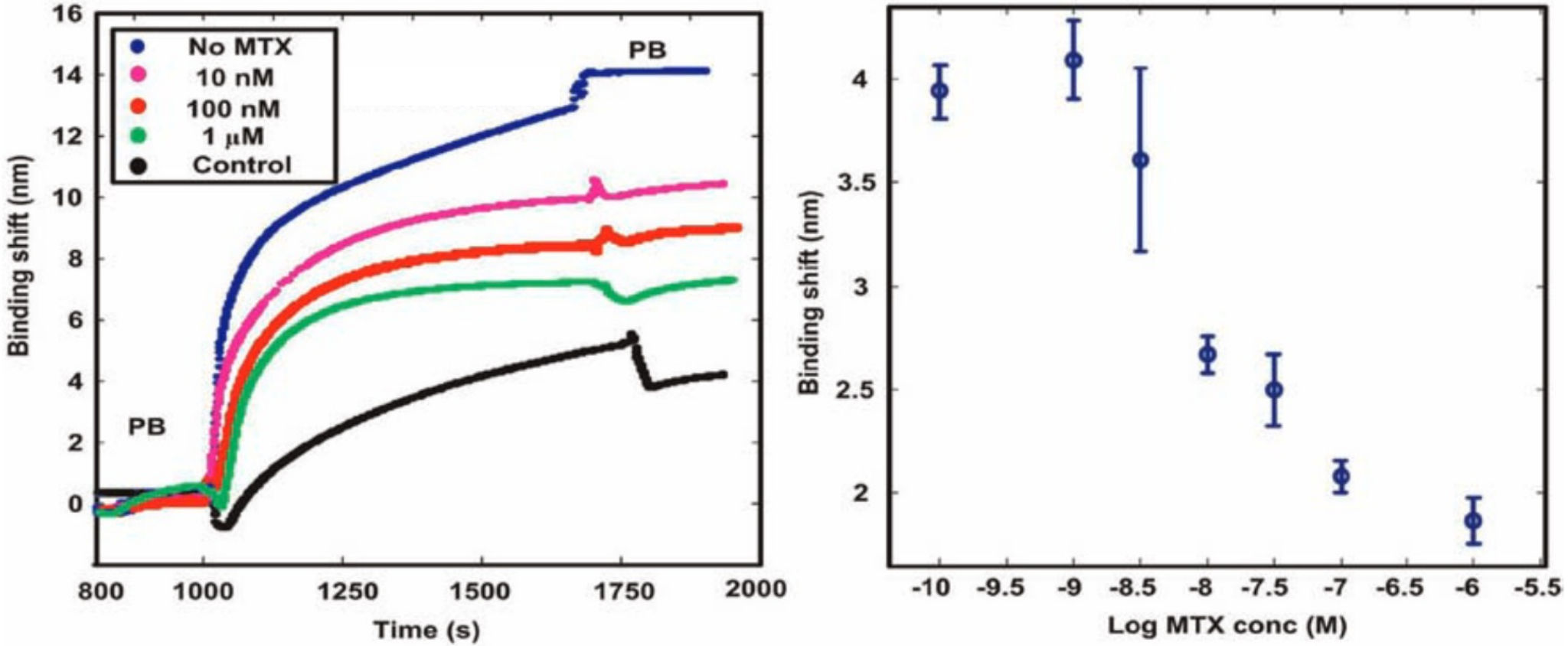


Fig. 2. (Left) MTX sensor response in PB, pH 8 with 0.04 mg/mL hDHFR, 2 nM FA-AuNP and varying concentrations of MTX. hDHFR was immobilized on the SPR sensor during the first 800 s. (Right) Competitive binding curve using 0.04 mg/mL hDHFR with 1 nM of FA-AuNP and varying concentrations of MTX. Error bars represent the standard deviation of a triplicate measurement.

SPR - Surface Plasmon Resonance

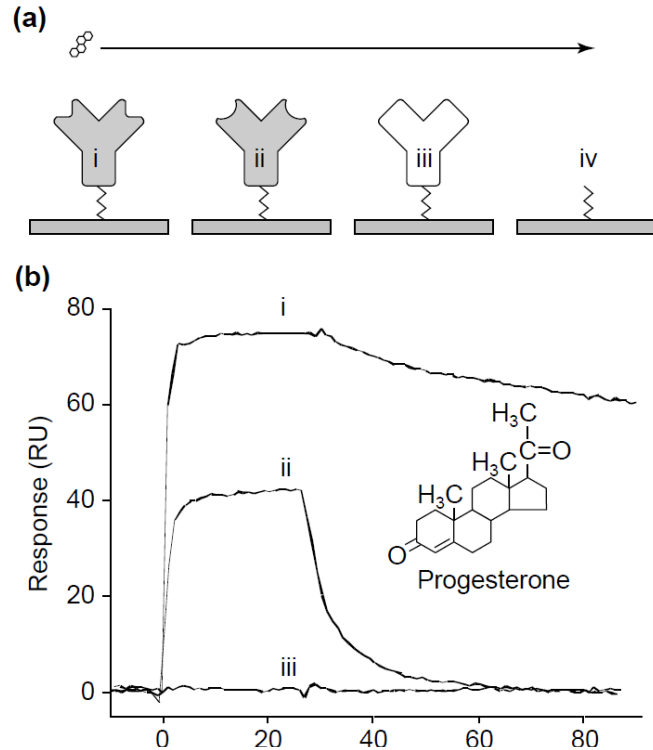


Figure 2. Example of small-molecule analysis using a surface plasmon resonance biosensor. (a) Schematic of antibody–antigen assay: (i) anti-progesterone, (ii) anti-testosterone, and (iii) anti-mouse Fc, (from Pierce, Rockford, IL, USA) were immobilized on flow cells 1, 2 and 3 of a BIACORE 2000 sensor chip; flow cell 4 was left blank to serve as a reference. (b) Response data collected for progesterone ($2 \mu\text{M}$) (from Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) injected over the antibody surfaces (running buffer contained 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3% DMSO, pH 7.4, at 25°C and flowed at $100 \mu\text{l min}^{-1}$). The kinetic rate and affinity constants determined from fitting the sensorgrams to a simple $A+B=AB$ reaction model are: (i) for anti-progesterone: $k_s = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_d = 3.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 17 \text{ nM}$, and (ii) for anti-testosterone: $k_s = 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_d = 1.4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, $K_D = 1400 \text{ nM}$. Abbreviation: RU, resonance unit.

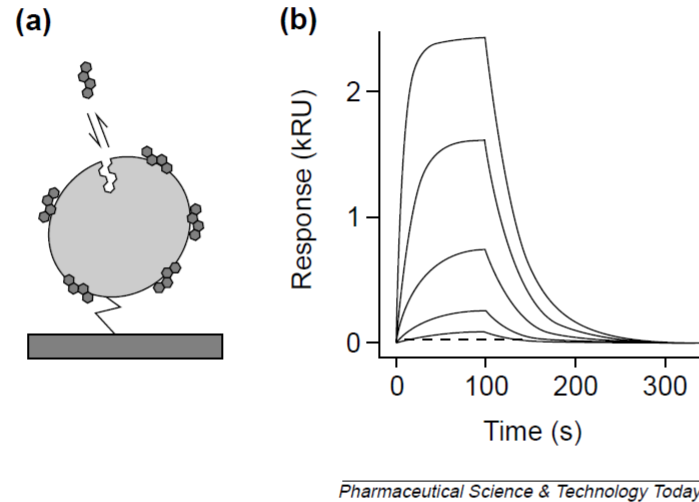


Figure 3. Non-specific binding to target proteins. (a) Schematic depiction of a compound binding non-specifically to multiple sites on an enzyme. (b) Response data from an enzyme–inhibitor interaction in which non-specific binding was observed. The compound was injected at 10, 3.3, 1.1, 0.37, and $0.12 \mu\text{M}$ at a rate of $100 \mu\text{l min}^{-1}$. Given the mass of the compound and target protein, the expected maximal response for a single-site interaction would be ~ 20 resonance units (RU), which is indicated by the dotted line. The much larger than expected binding responses and inability to saturate the surface suggest that the compound is binding non-specifically to the target protein.

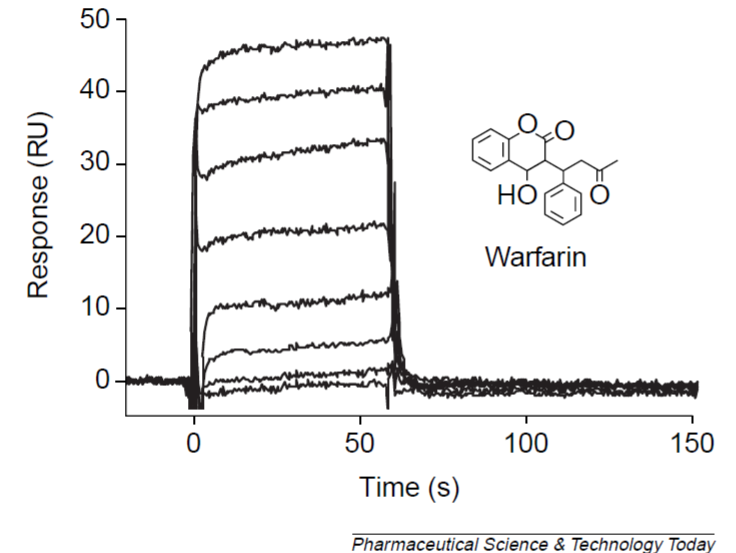
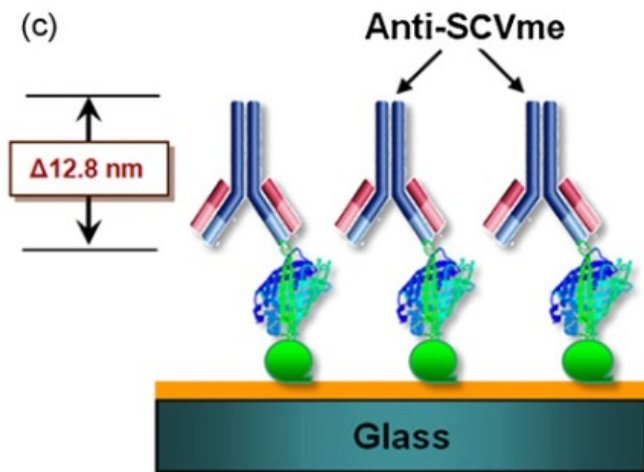
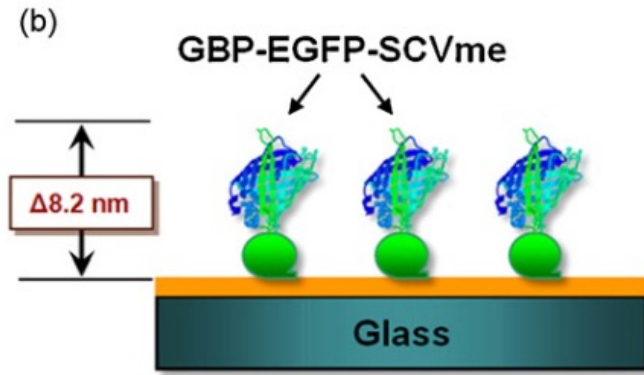


Figure 4. Warfarin binding to human serum albumin. Warfarin (308 Da) at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.1 and $0 \mu\text{M}$ were injected at a flow rate of $100 \mu\text{l min}^{-1}$ over a surface containing 6000 resonance units (RU) of immobilized HSA in 20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 3% DMSO, pH 7.4 at 25°C .

SPR - Surface Plasmon Resonance

Diagnosi di SARS (severe acute respiratory syndrome)

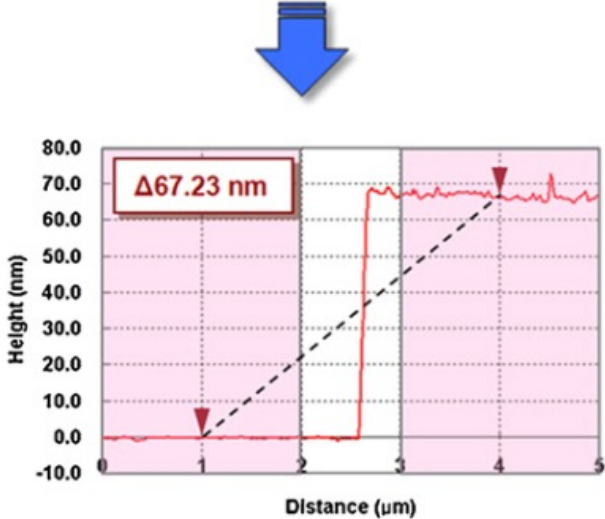
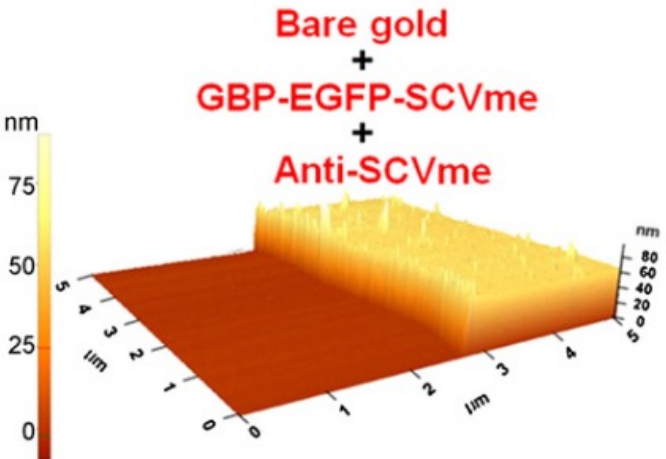
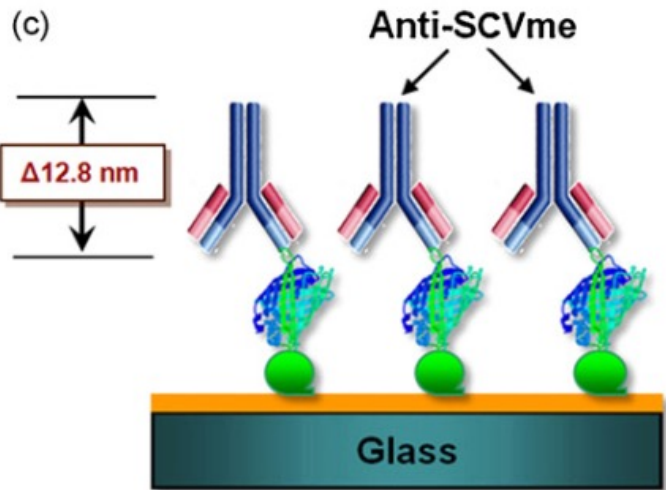
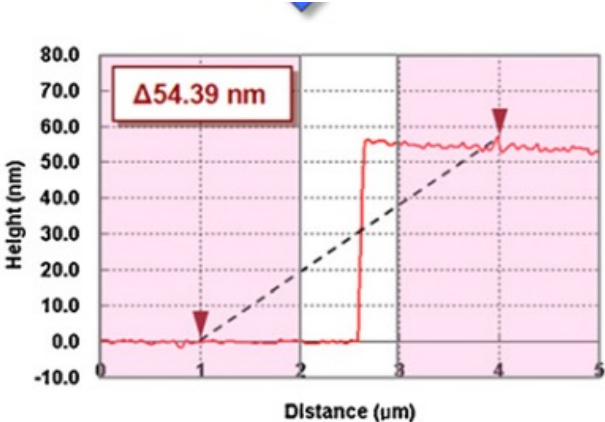
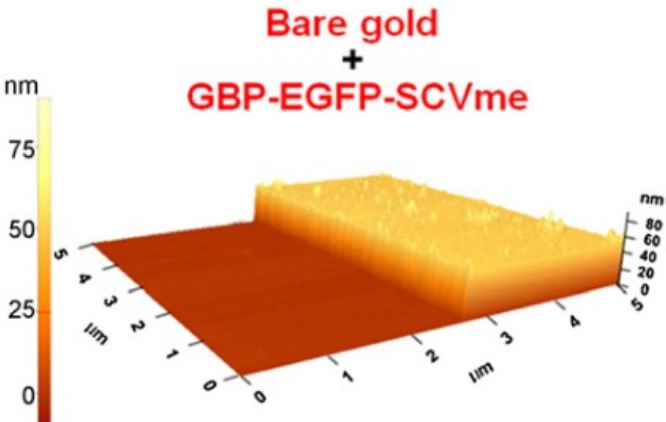
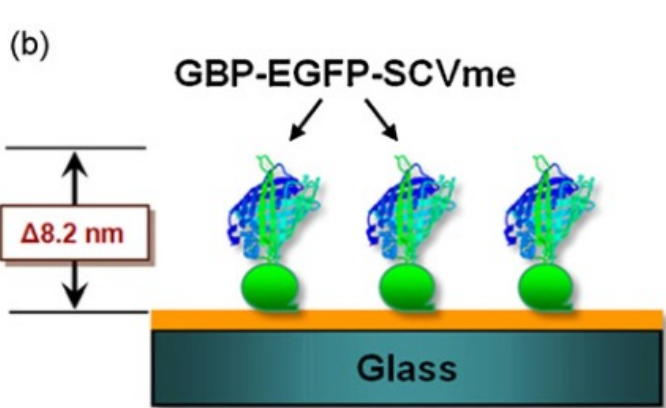


Layer di bioriconoscimento: specifiche molecole geneticamente ingegnerizzate chiamate "gold-binding polypeptides(GBPs)", legate a molecole specifiche presenti nella corona del virus responsabile della SARS ("coronaviral surface antigen" - SCVme).

Le SCVme fungono dunque da **elemento di riconoscimento per l'anticorpo anti-SCVme**, il quale costituisce la **molecola target**.

SPR- Surface Plasmon Resonance

Diagnosi di SARS (severe acute respiratory syndrome)



Park, Tae Jung, et al. "A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome." *Talanta* 79.2 (2009): 295-301.

SPR - Surface Plasmon Resonance

Diagnosi di SARS (severe acute respiratory syndrome)

LOD: 200 ng/mL

Tempo di risposta: 10 min

Alta selettività: bassa risposta a IgG non specifiche.

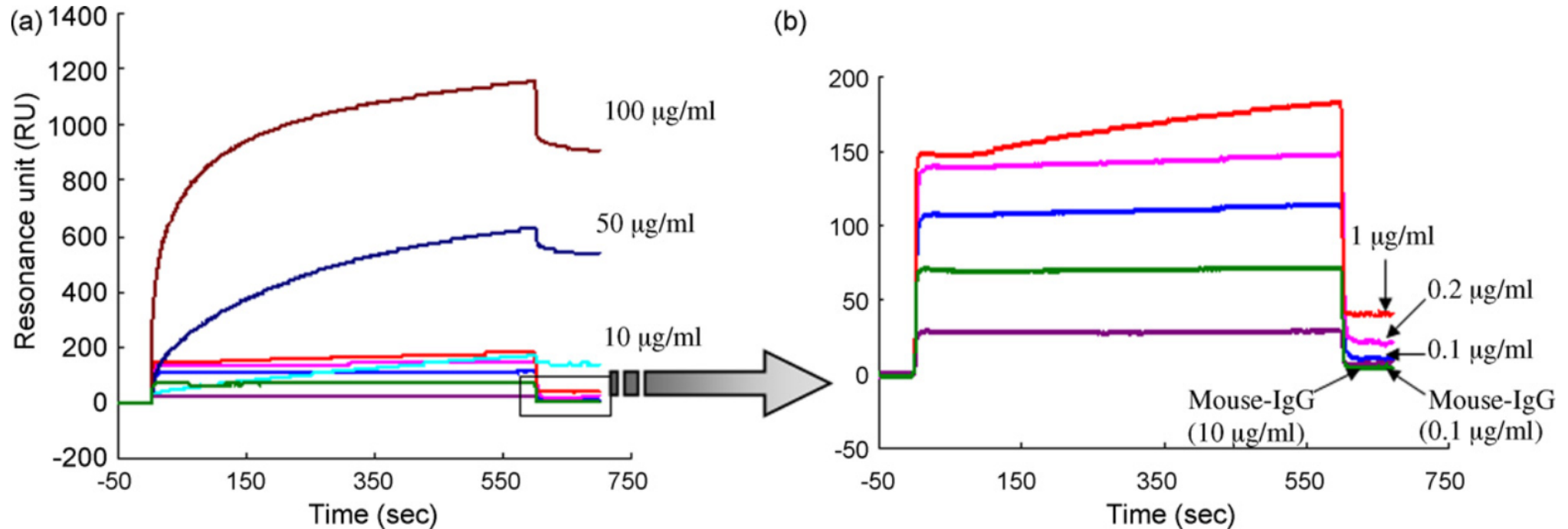


Fig. 5. SPR sensorgrams for (a) sensitive and (b) selective detection of anti-SCVme using the GBP-E-SCVme immobilized gold sensor chip at various concentrations (0.1, 1, 10, 50, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of anti-SCVme and (1 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of mouse IgG as negative controls.

Immunosensori

Oltre alla trasduzione gravimetrica, ottica e colorimetrica, esistono anche altri possibili approcci.

Nei **sistemi potenziometrici** viene rivelato il potenziale di una membrana ionoselettiva. **La reazione antigene anticorpo è in grado di modulare tale potenziale.** Spesso poco specifici (la misura deve essere eseguita dopo aver eliminato ioni interferenti).

Gli **immunosensori amperometrici** coinvolgono **enzimi e reazioni redox a cascata** a seguito della reazione immunologica.

I **sistemi FET** per il monitoraggio della reazione fra antigene e anticorpo consistono in uno **strato di anticorpi immobilizzati sull'ossido di gate di un ISFET**. La reazione immunologica darà luogo ad una modulazione della carica superficiale della membrana sensibile, con un conseguente cambiamento delle cariche nella zona d'inversione.