

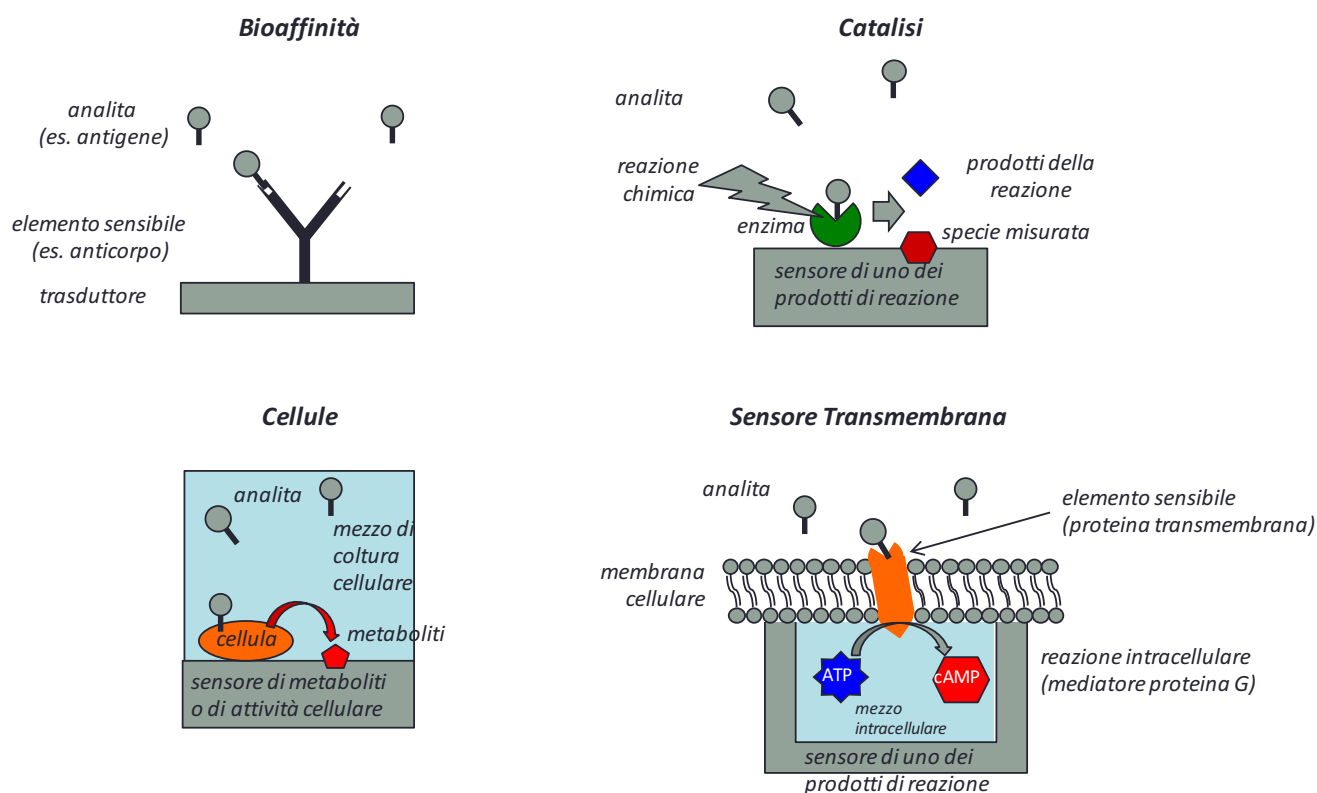
8: BIOSENSORI

- Sensori Enzimatici
- Immunosensori
- DNA chip e sensori con DNA
- Surface Plasmon Resonance
- Whole cell sensors

Definizione

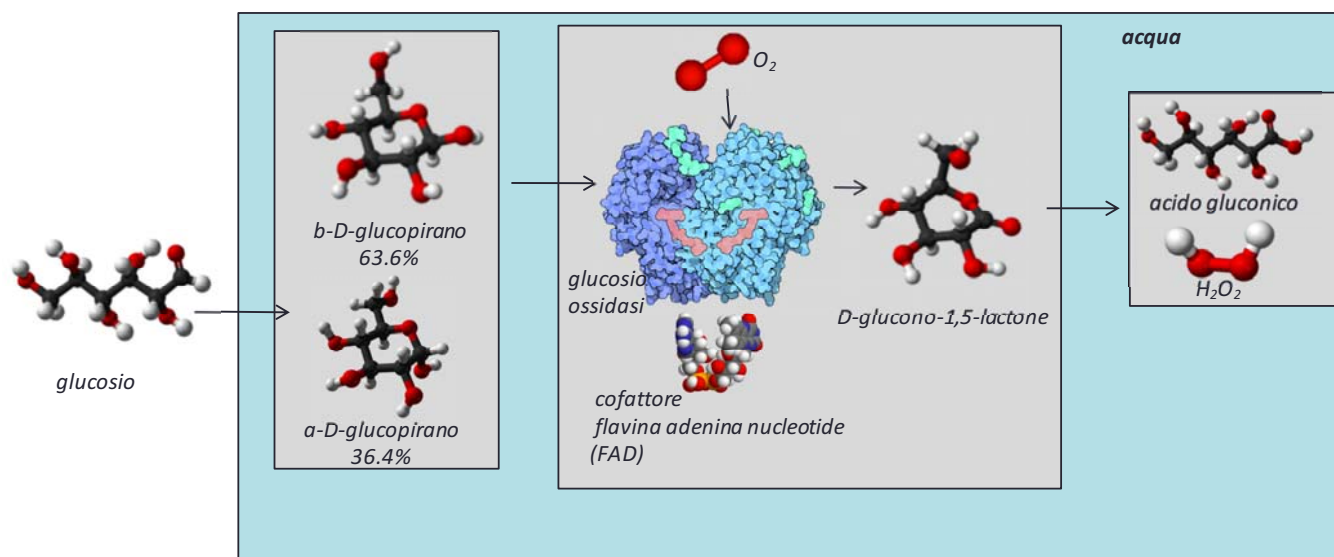
- I biosensori sono sensori chimici basati su materiali sensibili e di natura biologica
 - Enzimi
 - Anticorpi e/o antigeni
 - DNA e oligonucleotidi
 - Cellule
 - Tessuti
- La caratteristica fondamentale dei biosensori è la grande affinità con l'analita per cui i biosensori sono tra i sensori chimici di maggiore sensibilità e selettività.

Principi di funzionamento



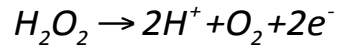
Biosensori enzimatici: esempio: Glucosio Ossidasi

- Gli enzimi ossidasi sono un'importante categoria di enzimi che producono una ossidazione dell'analita con conseguente produzione di perossido di idrogeno
- La glucosio ossidasi è una proteina che svolge una azione enzimatica nel metabolismo del glucosio.

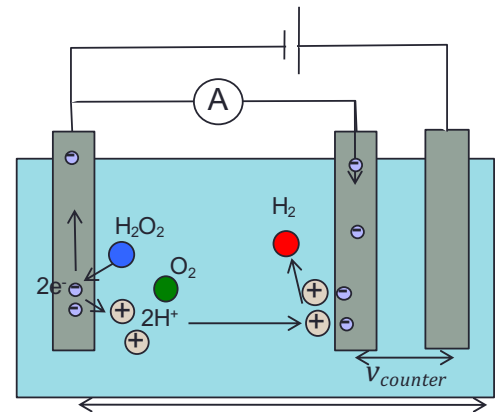
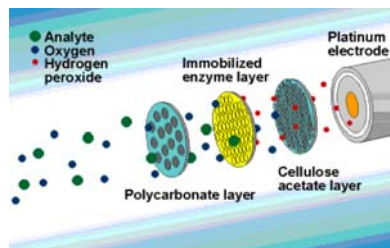
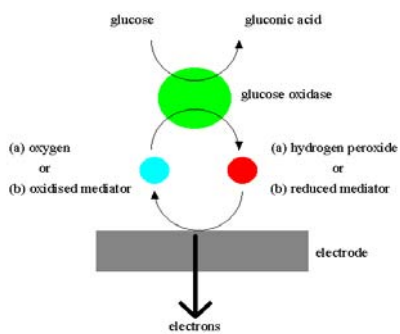


Biosensore a glucosio ossidasi trasduttore elettrochimico

- La concentrazione di glucosio può essere stimata attraverso una misura dell'ossigeno consumato.
- oppure, se nella cella di misura è presente un elettrodo metallico, l'acqua ossigenata, in corrispondenza della superficie metallica subisce un'ulteriore reazione:

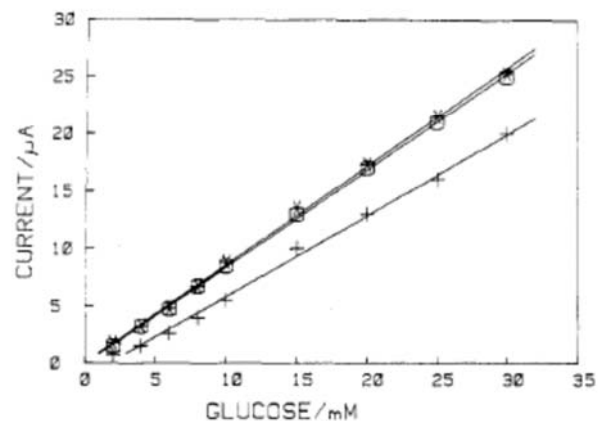
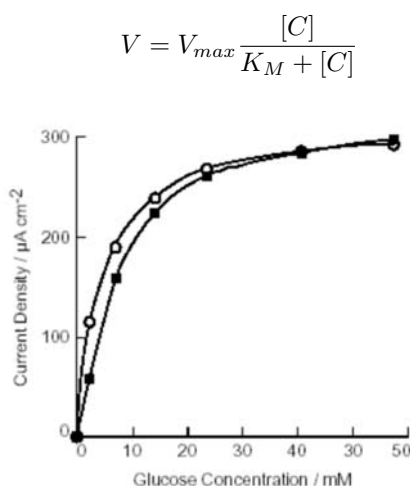


- La concentrazione di glucosio può quindi essere stimata dalla misura del pH oppure misurando la corrente prodotta dagli elettroni raccolti da un circuito esterno



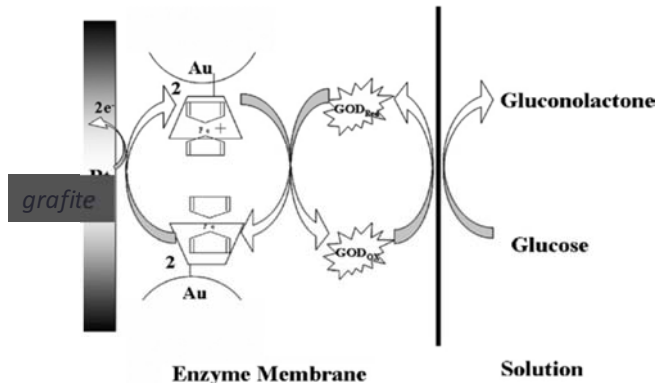
Isoterma di Michaelis-Menten

- Equivalente della isoterma di Langmuir
- La quantità di enzima è limitata e quindi il tasso della reazione diminuisce con la concentrazione dell'analita.

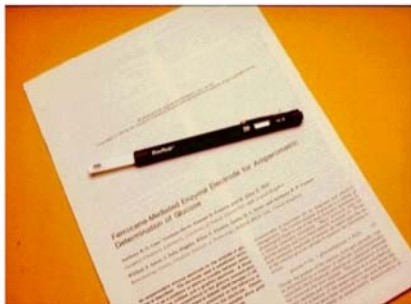


La quantità di enzima va determinata per avere una risposta lineare nel range di interesse.

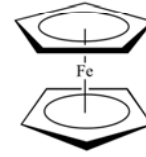
Sensore a stato solido



MediSense ExacTech™ 1987:
Ferrocene



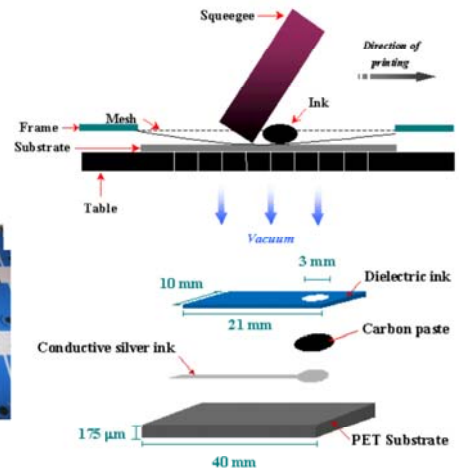
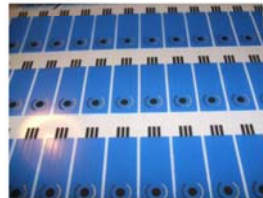
Mediatore: *ferrocene*



Sensore a stato solido

Il ferrocene e l'enzima sono immobilizzati sull'elettrodo. Con il sensore a stato solido è stata possibile la produzione in serie e la diffusione degli attuali analizzatori personali di glucosio.

Screen printing



Current Paradigm of Blood Glucose Monitoring



Load lancet into
launcher and
reassemble launcher



Prick finger or
arm



Deposit blood drop
on to test strip &
insert strip



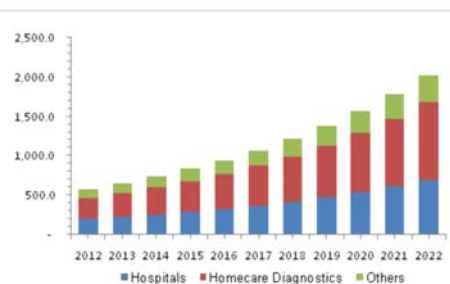
Read test strip



Dispose of materials

1-2 Minutes

China Glucose Biosensor Market, by end-use, 2015-2022, (USD Million)



Pancreas artificiale



FIGURE 18.1 A general view of the Betalike, the artificial pancreas developed and marketed by Esacontrol (Genoa, Italy).

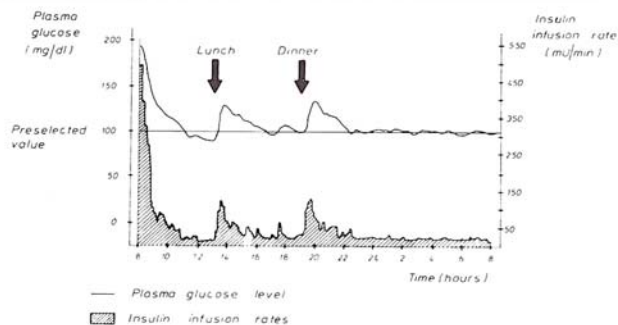
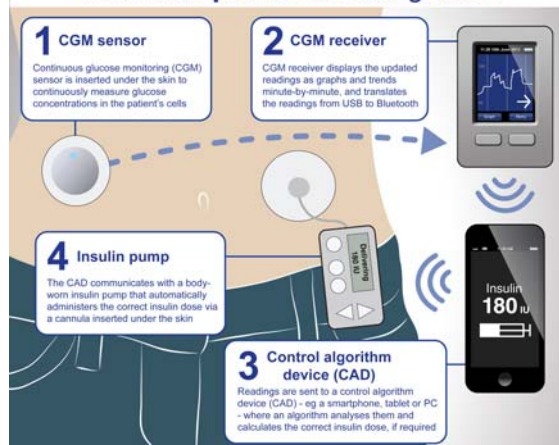


FIGURE 18.2 A typical experiment performed by clamping a "normal" value of glucose, carried out using the artificial pancreas Betalike. In this case the glucose sensor and a lactate sensor were added in series.

Artificial pancreas at a glance

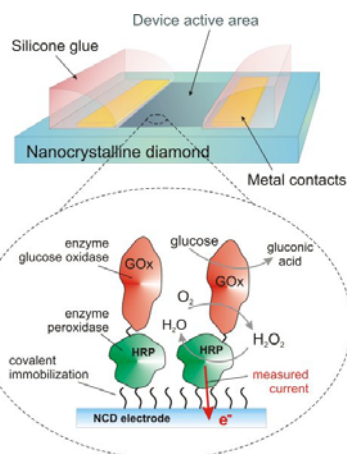


Rivelazione con doppio enzima horseradish peroxidase

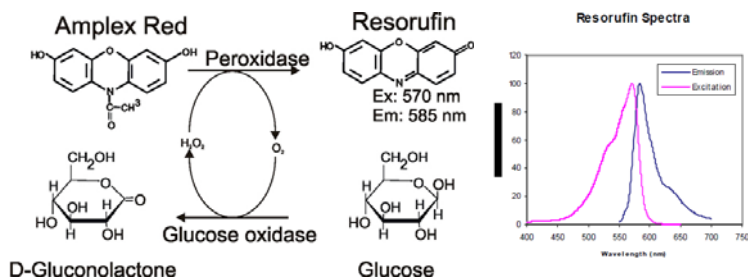
- La horseradish peroxidase converte la H_2O_2 in H_2O iniettando elettroni in un elettrodo oppure ossidando una molecola chemiluminescente



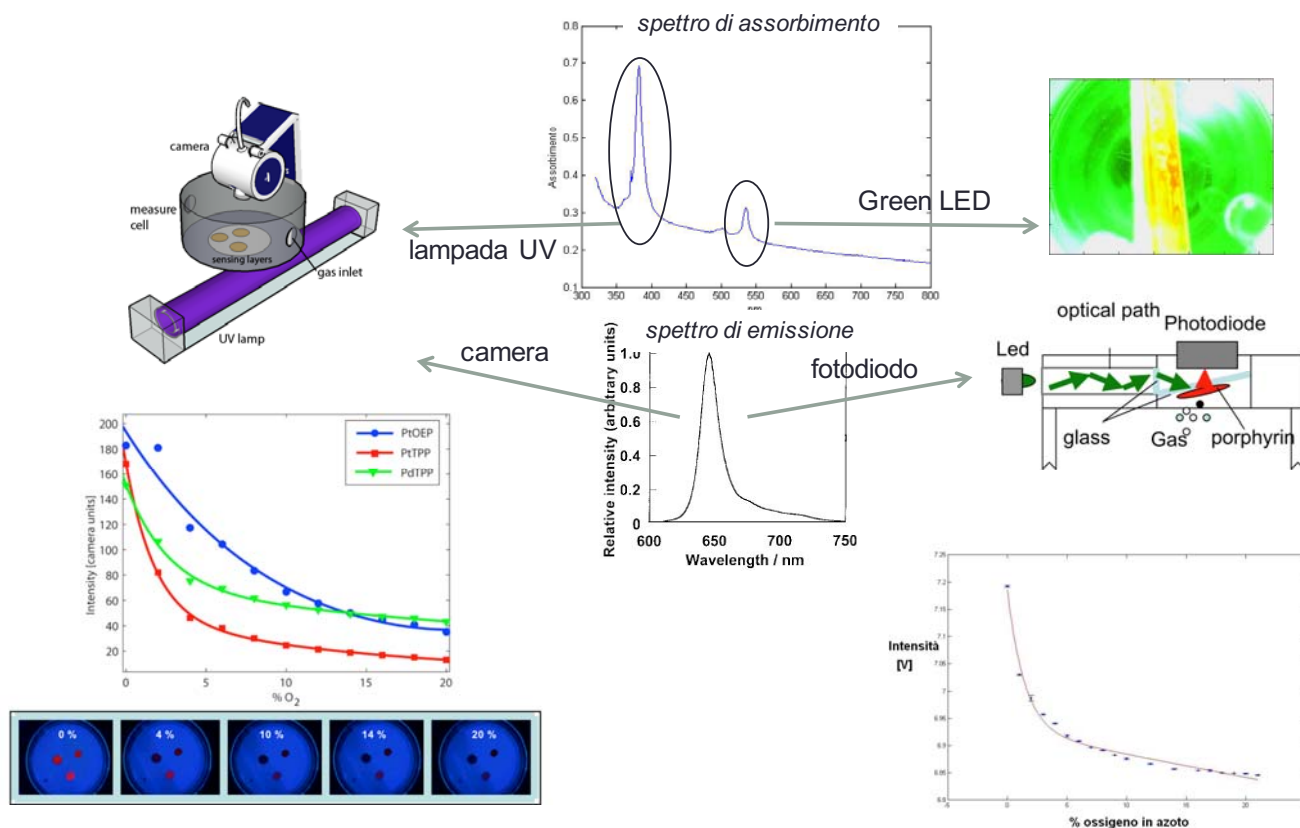
elettrochimica



ottica

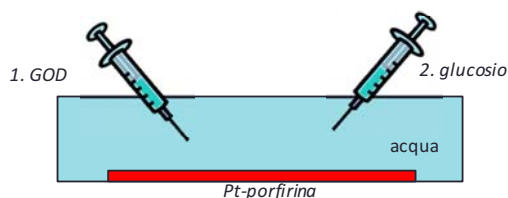
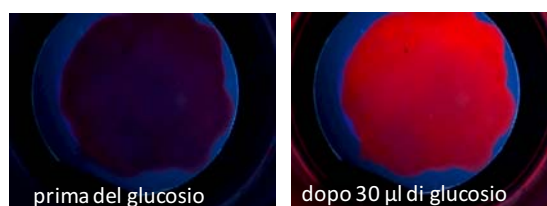
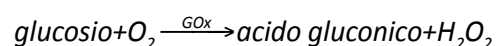


Sensore ottico di ossigeno in soluzione

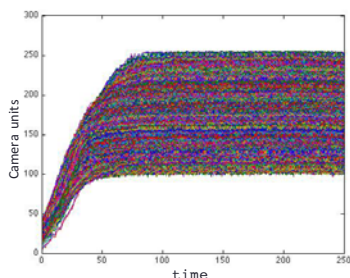


Consumo di ossigeno nelle reazioni enzimatiche

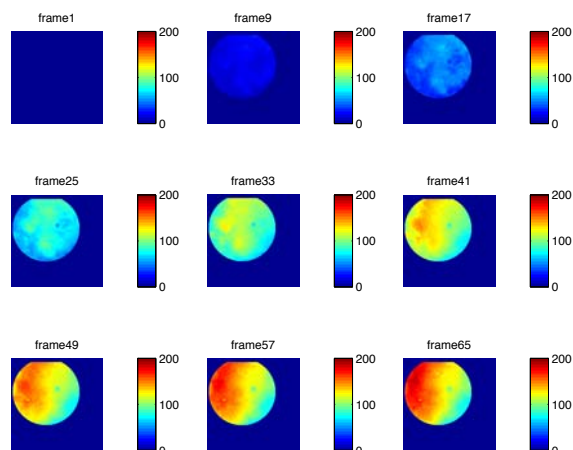
- la reazione dell'enzima ossidasi produce una sensibile diminuzione dell'ossigeno disciolto in acqua.
- la diminuzione dell'ossigeno si manifesta attraverso la "accensione" della fluorescenza delle molecole di Pt-porfirina.



intensità della camera nel canale rosso



differenza rispetto al primo frame (acqua + GOD)



Monitoraggio della fermentazione alcolica

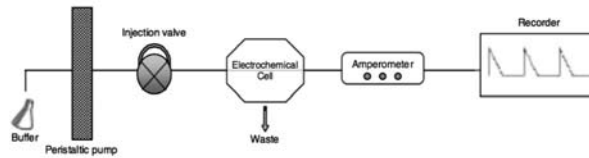


Figure 1 Flow-injection analysis system.

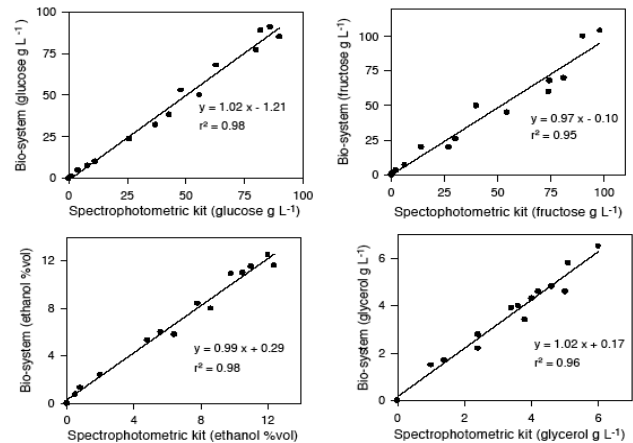
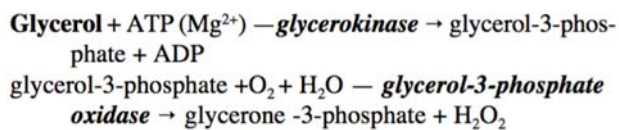
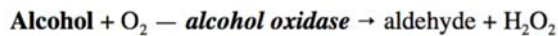
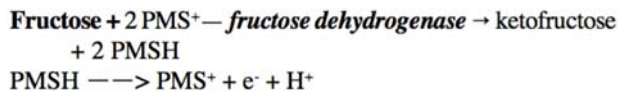
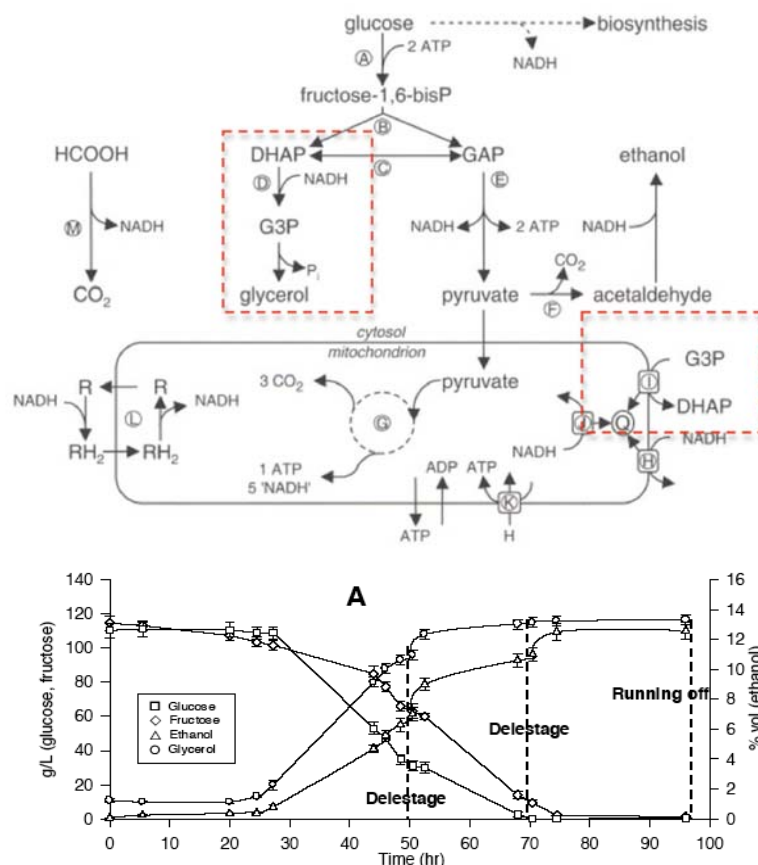


Figure 2 Correlation between analyte (glucose, fructose, ethanol, and glycerol) values in red wines and musts determined by spectrophotometric kits and biosystems.

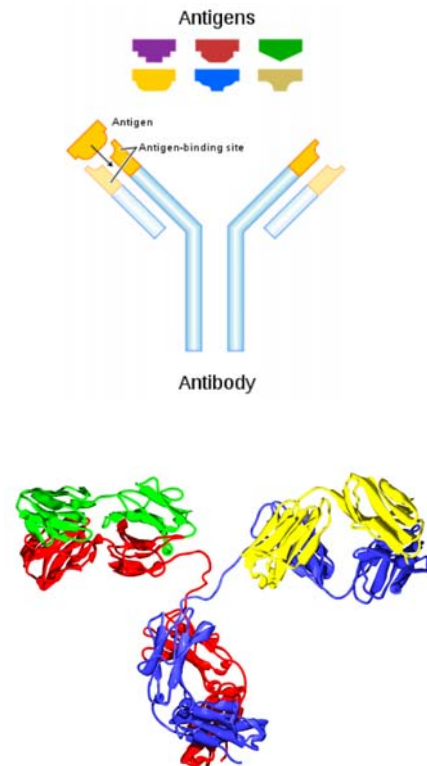
Esti et al. American Journal Enology Viticulture, 2003

Metabolismo del glucosio nel *Saccharomyces Cerevisiae*

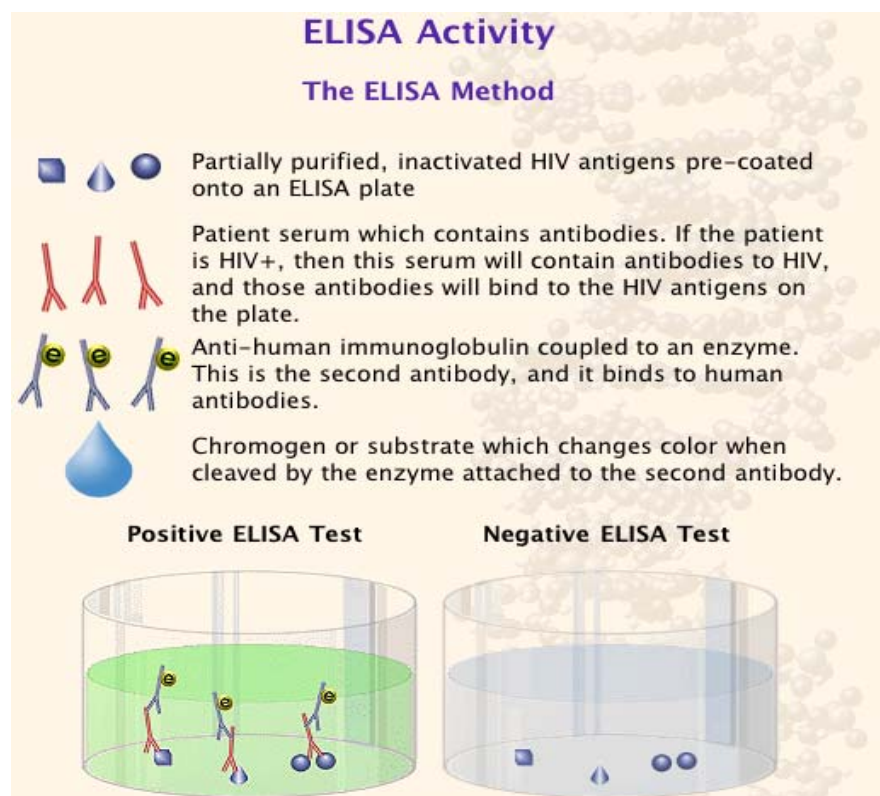


Immunosensori

- Gli anticorpi (immunoglobuline: Ig) sono proteine utilizzate dagli organismi per legare agenti esterni (es. virus, batteri,...) detti antigeni.
- Gli anticorpi hanno una tipica forma a Y. I due segmenti della Y sono terminati dal legante detto epitopo (parte dell'antigene riconoscibile dal sistema immunitario) che lega il paratopo (parte attiva dell'anticorpo).
- La reazione anticorpo-antigene è una delle più intense e, a causa della grande energia di legame, il legame è selettivo ma non reversibile.
- Le interazioni antigene-anticorpo sono utilizzate nelle analisi immunologiche. Nei sensori lo stesso principio viene accoppiato ad un trasduttore che converte l'interazione in un segnale elettrico.



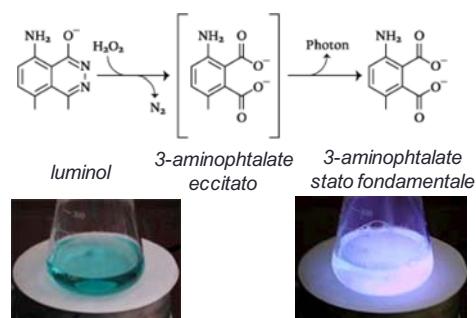
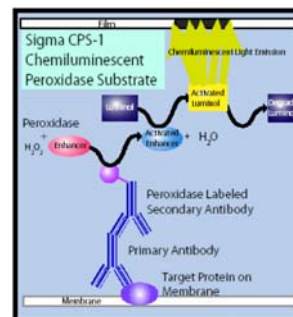
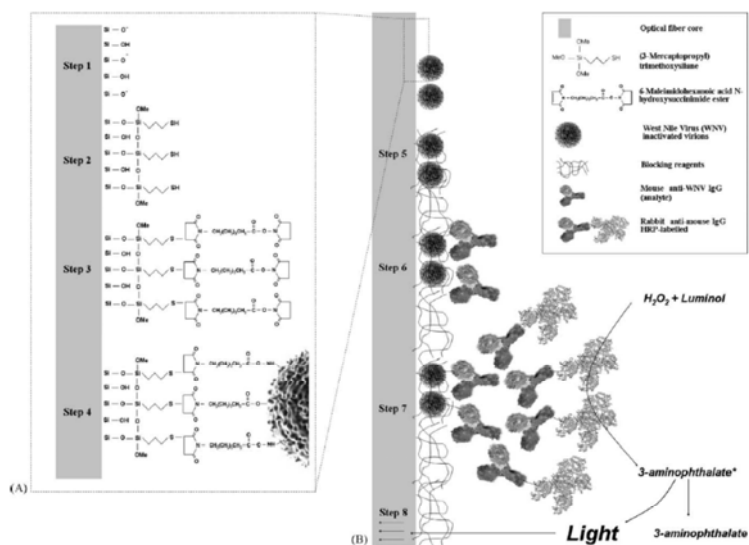
Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)



Immunosensore ottico

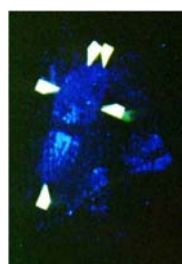
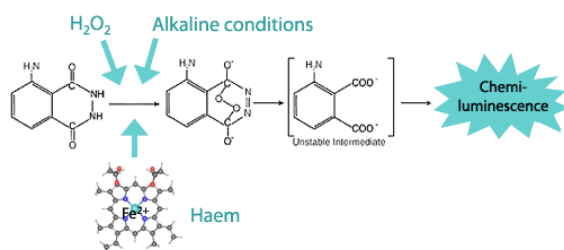
fibra ottica funzionalizzata per la rivelazione di anticorpi al west-Nile virus

la presenza degli anticorpi nel siero viene rivelata da un anti IgG etichettati con una molecola (Horseradish Peroxidase) che reagisce con il luminol e produce una emissione luminosa.



Chemiluminescenza

- reazioni chimiche che producono luce
- esempio **Luminol**



rivelatore di NO

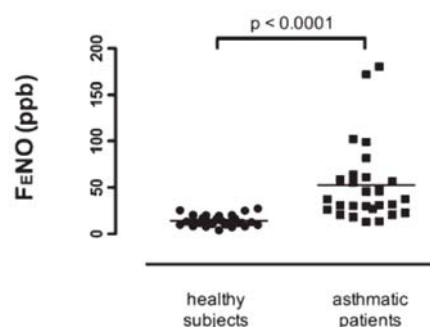
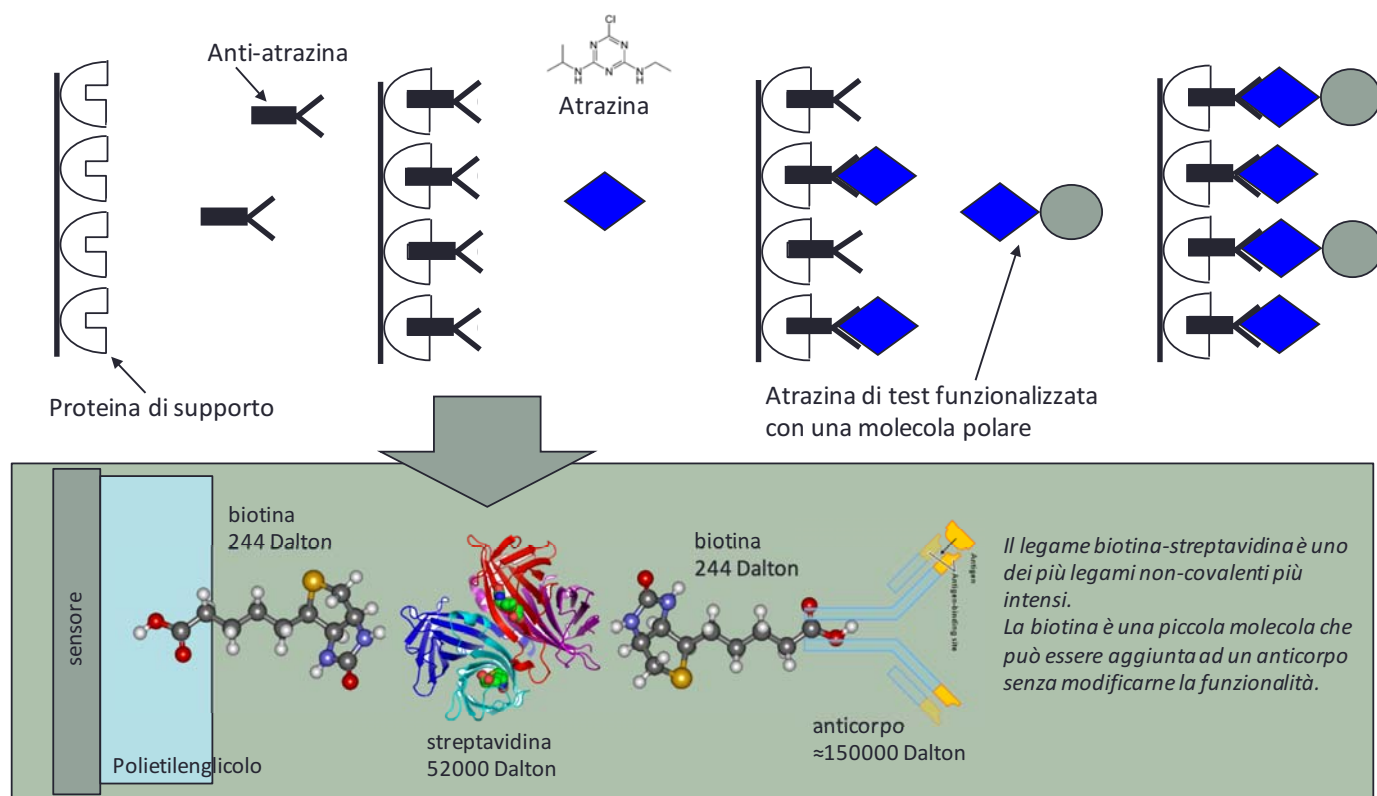
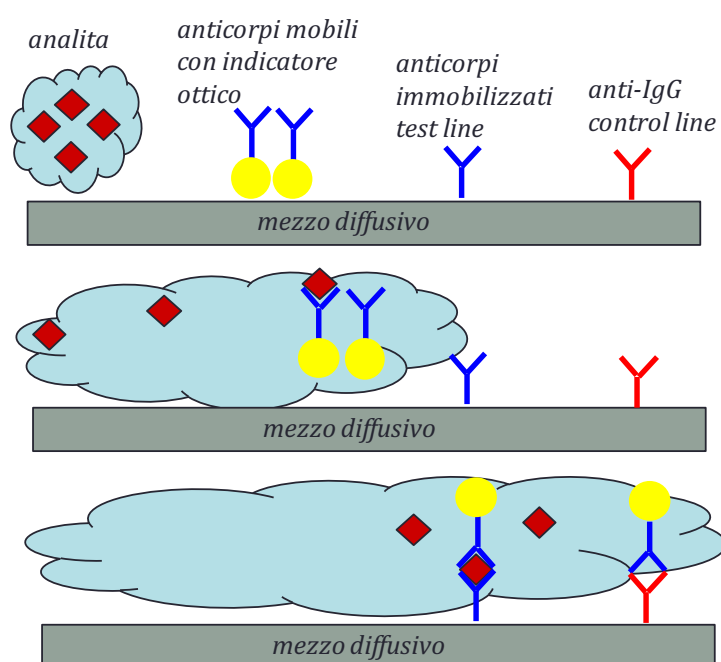


FIGURE 3. FENO concentrations in 27 patients with asthma (■) and 24 healthy subjects (●). Median values are shown with bars. FENO = fractional exhaled nitric oxide.

Test Immunologico su FET



Lateral Flow Analysis

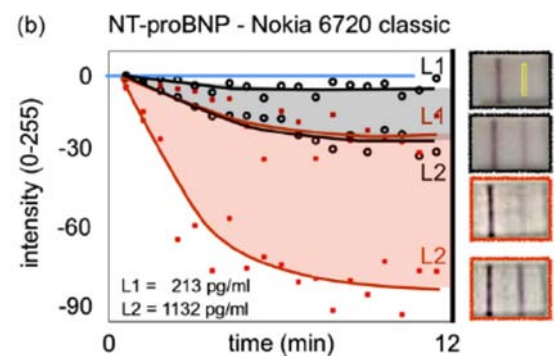
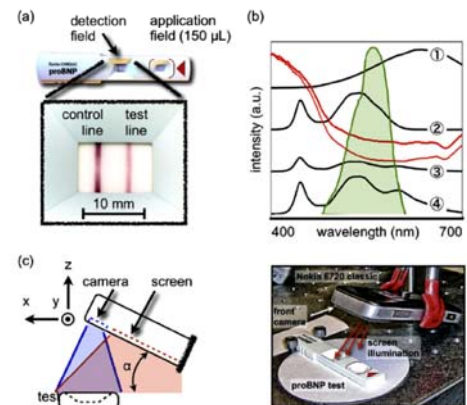


Kit colorimetrico per la BNP (basic natriuretic peptide)

- La BNP è over-espressa durante gli attacchi cardiaci



Lettura della reazione con un cellulare
Metodo High Dynamic Range per la estensione
della dinamica della immagine



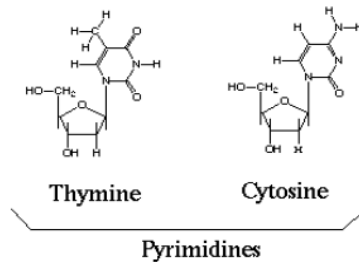
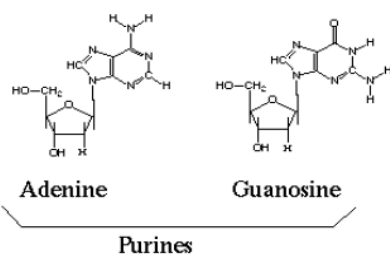
Prechaburana et al. Biosensors and Bioelectronics, 2012

Analisi del DNA

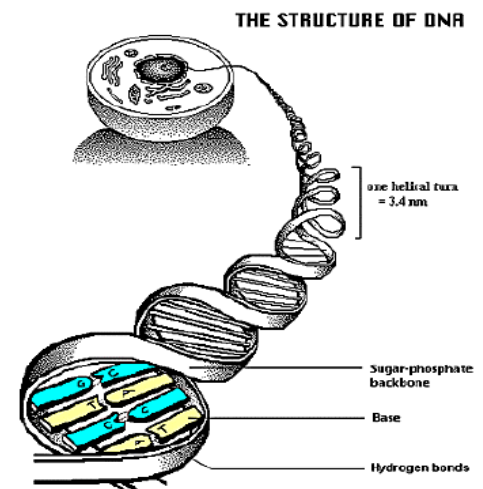
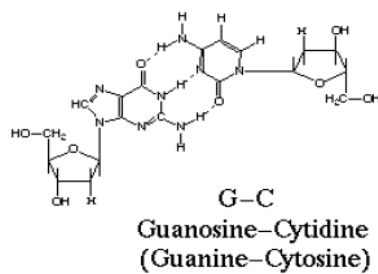
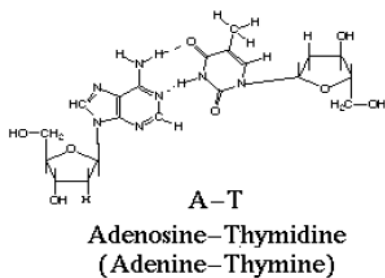
- La rivelazione di sequenze specifiche di DNA è di grande importanza in campo clinico, ambientale e nella analisi degli alimenti
- L'analisi delle sequenze dei geni e lo studio del polimorfismo sono fondamentali nella rivelazione precoce di mutazioni genetiche offrendo la possibilità di identificare una patologia molto prima della comparsa dei sintomi.
- In campo ambientale e nella analisi degli alimenti la rivelazione di sequenze specifiche può essere usata per la rivelazione di organismi geneticamente modificati o batteri patogeni

DNA

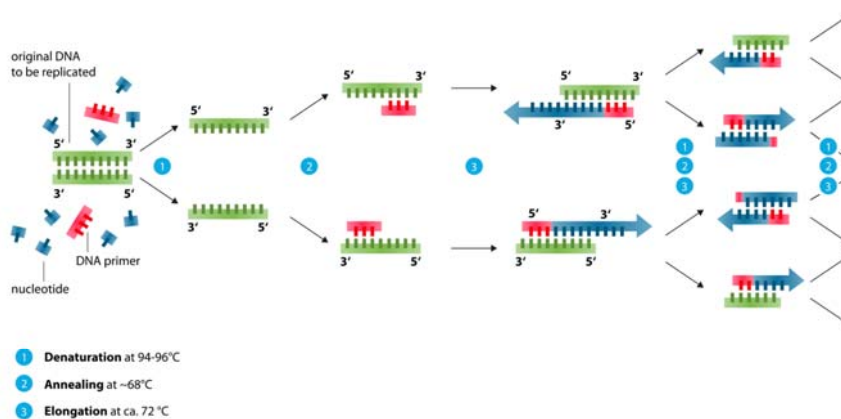
The Nucleotides of DNA



DNA Basepairs



Polimerase Chain Reaction



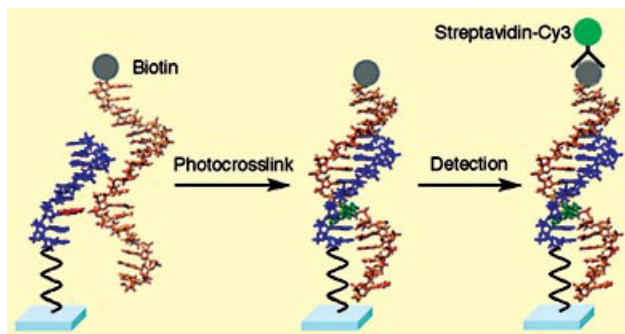
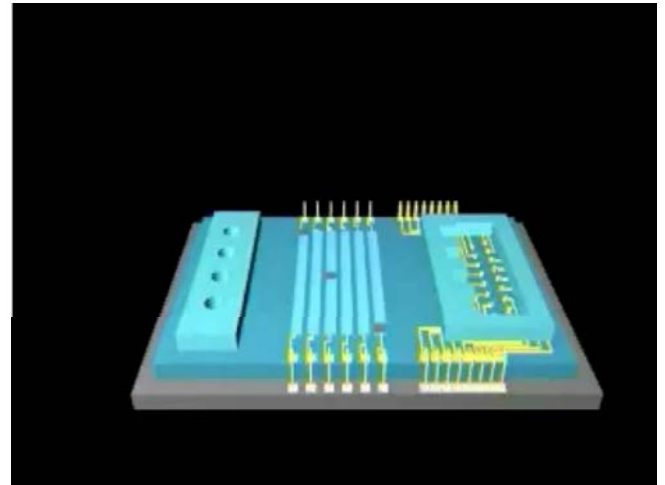
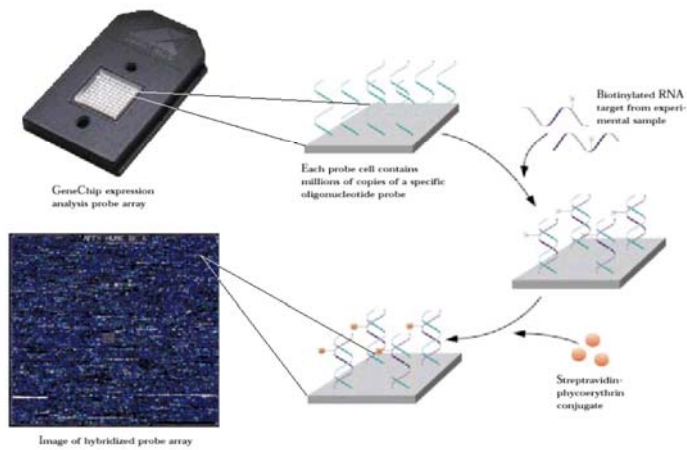
La PCR consente di duplicare in laboratorio un frammento di DNA. A tal fine sono necessari oltre al frammento campione

- nucleotidi elementari e primers che identificano la regione da amplificare
- enzima DNA-polimerasi
- controllo di temperatura, pH, e degli elementi chimici necessari per il corretto funzionamento dell'enzima (in particolare: Mg^{2+}).

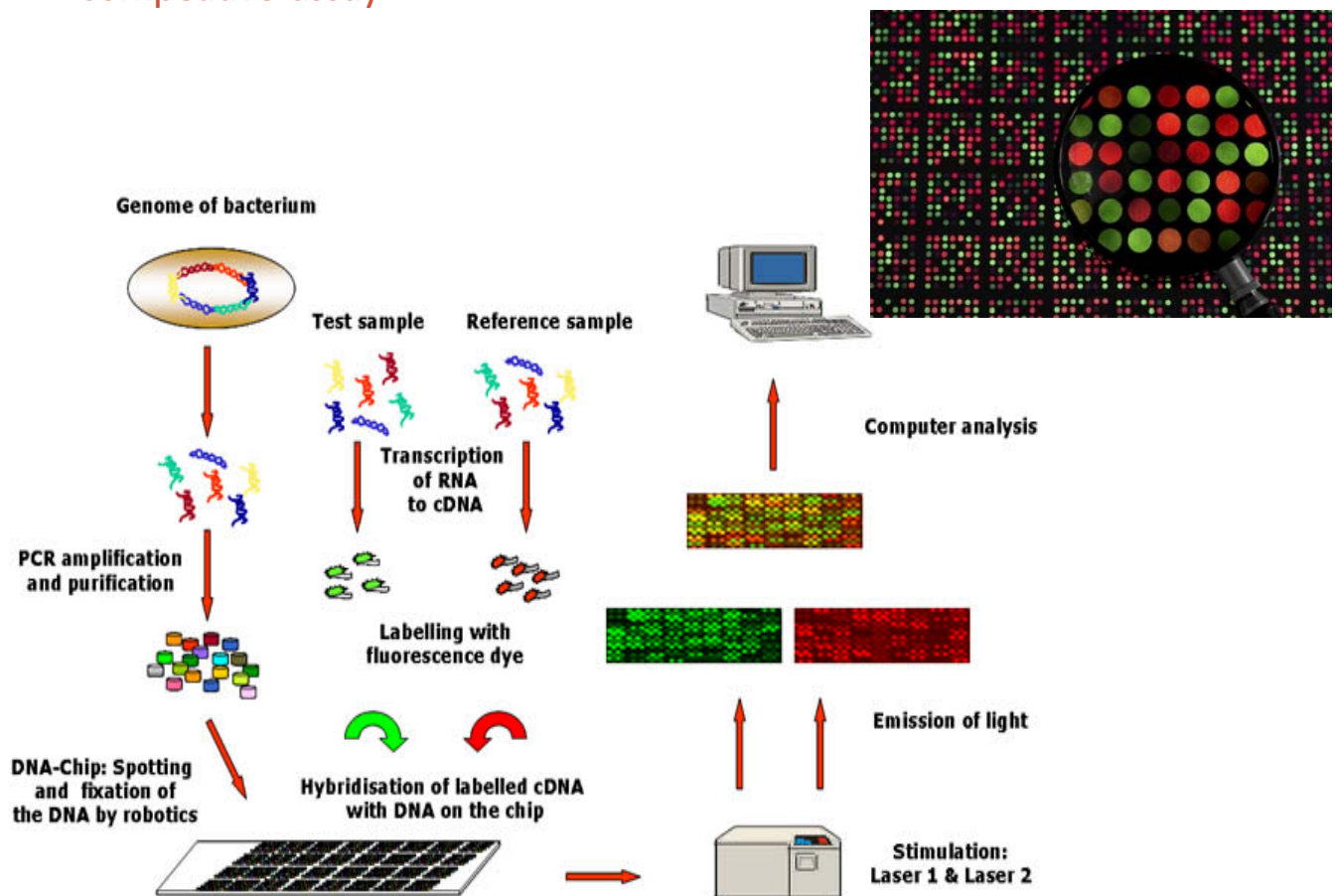
Cicli della PCR

1. $T=94^{\circ}C - 99^{\circ}C$ il segmento di DNA si denatura, cioè l'elica si scinde
 2. $T=40^{\circ}C - 55^{\circ}C$ i primers si fissano ai frammenti di DNA. I primers sono sequenze specifiche che fissano il tratto di DNA da replicare
 3. $T=65^{\circ}C - 72^{\circ}C$ l'enzima polimerasi ricostruisce, a partire dai primers il segmento complementare.
- La sequenza 1,2,3 viene ripetuta N volte ottenendo una crescita esponenziale del numero di frammenti di DNA campione.

DNA chip



Competitive assay

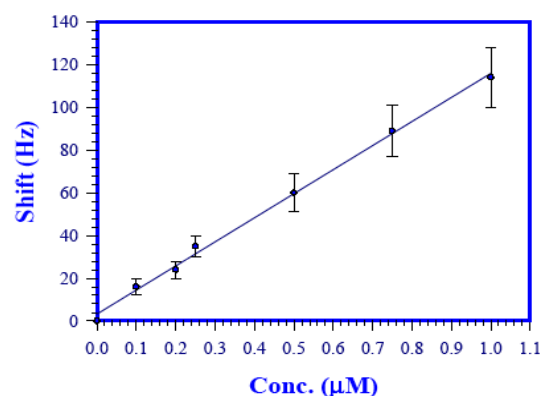
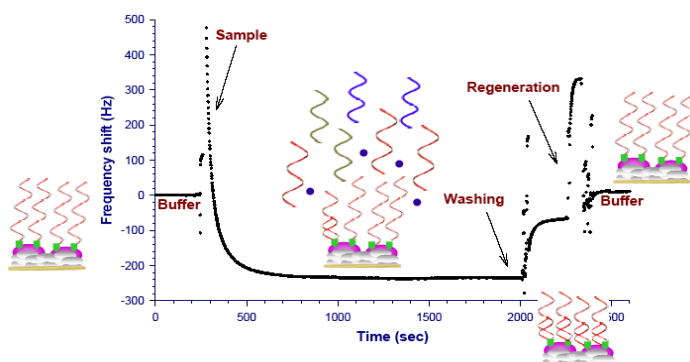
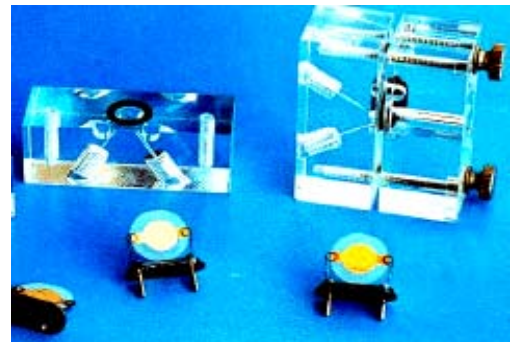


Sensori a DNA

- Possono essere usate varie tecnologie di sensori
 - QMB, elettrochimica, FET,...
 - Indipendentemente dal trasduttore ci sono alcuni passi logici
1. Isolamento (o sintesi) della sequenza di DNA da rivelare (probe)
 2. Immobilizzazione del probe sul trasduttore
 3. Estrazione del DNA dal campione reale (sangue, acqua, alimento, vegetale...)
 4. Amplificazione e denaturazione del frammento (PCR)
 5. Ibridizzazione con il probe immobilizzato
 6. Misura della grandezze fisicochimica da parte del trasduttore

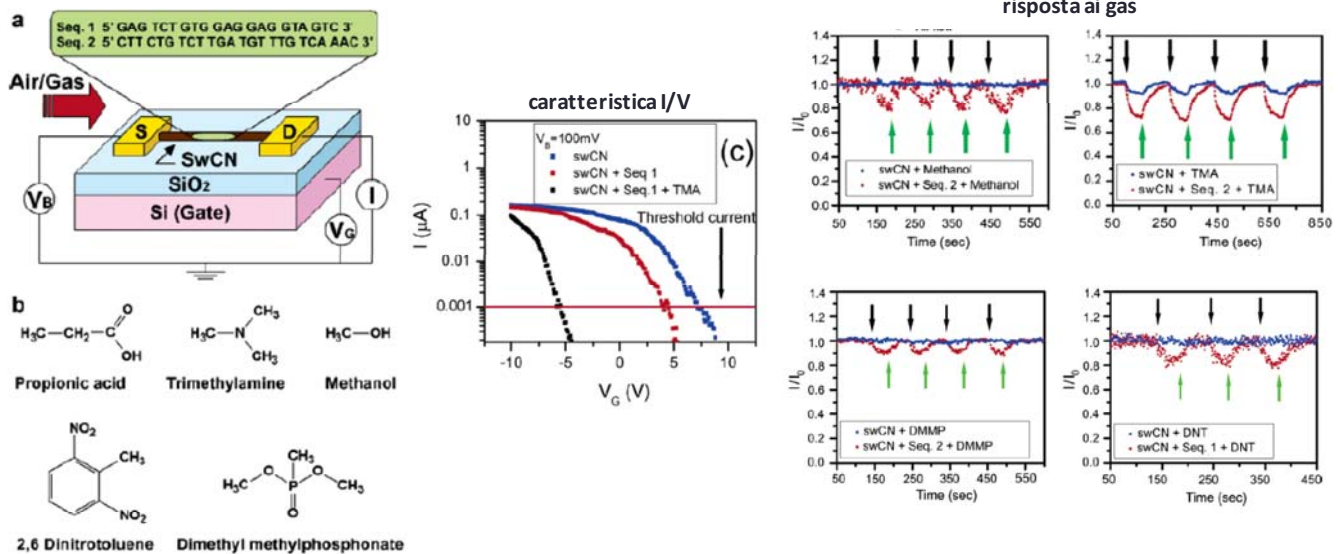
TSMR per la rivelazione del gene di aerolisina in batteri *Aeromonas*

- I batteri *Aeromonas* sono presenti nelle acque, scarichi, frutti di mare, formaggi e latte.
- Producono una varietà di tossine che producono diverse infezioni come meningiti e setticemie
- La patogenicità dipende dalla capacità di produzione di aerolisina
- La produzione di questa sostanza è legata alla presenza di un gene.
- La rivelazione del gene indica quindi la pericolosità potenziale della colonia batterica



DNA: materiale sensibile in sensori di gas

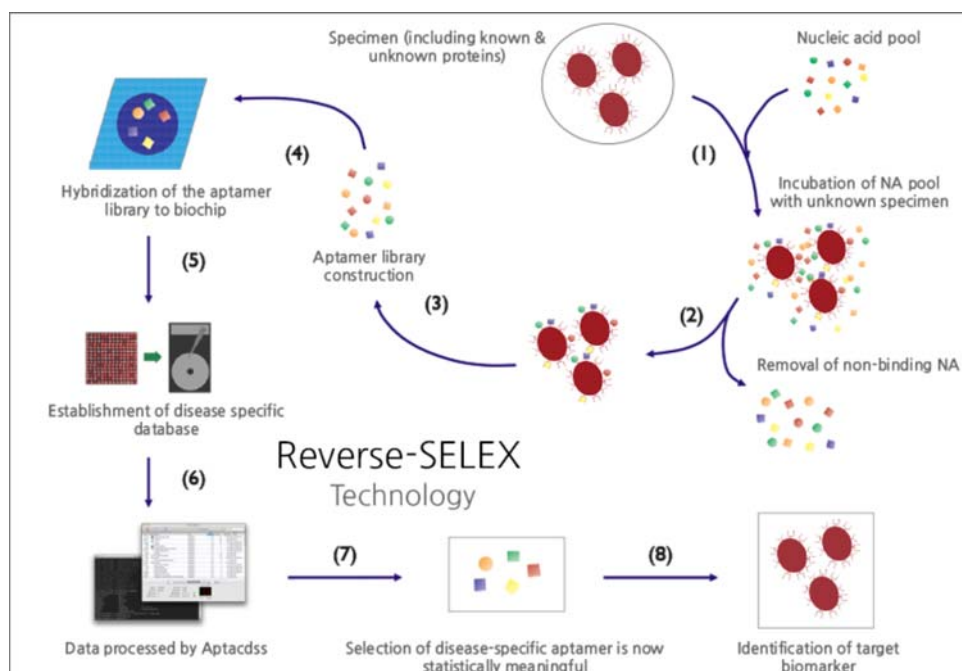
- Il DNA è una struttura chimicamente complessa dotata di un grande numero di siti di legame per molecole volatili.
- Questa proprietà può essere sfruttata per la rivelazione di molecole gassose
- Il legame con nanotubi di carbonio risulta in un sensore conduttometrico



Staii et al. Nanoletters, 2005

Aptameri

- Oligo nucleotidi artificiali ottimizzati per la identificazione di un analita biologico (es. proteina o batterio o virus)

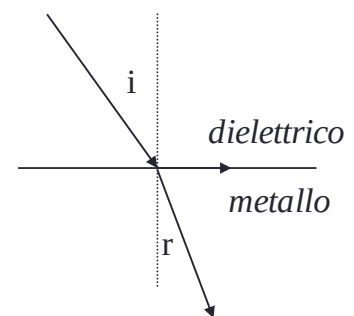


Surface Plasmon Resonance

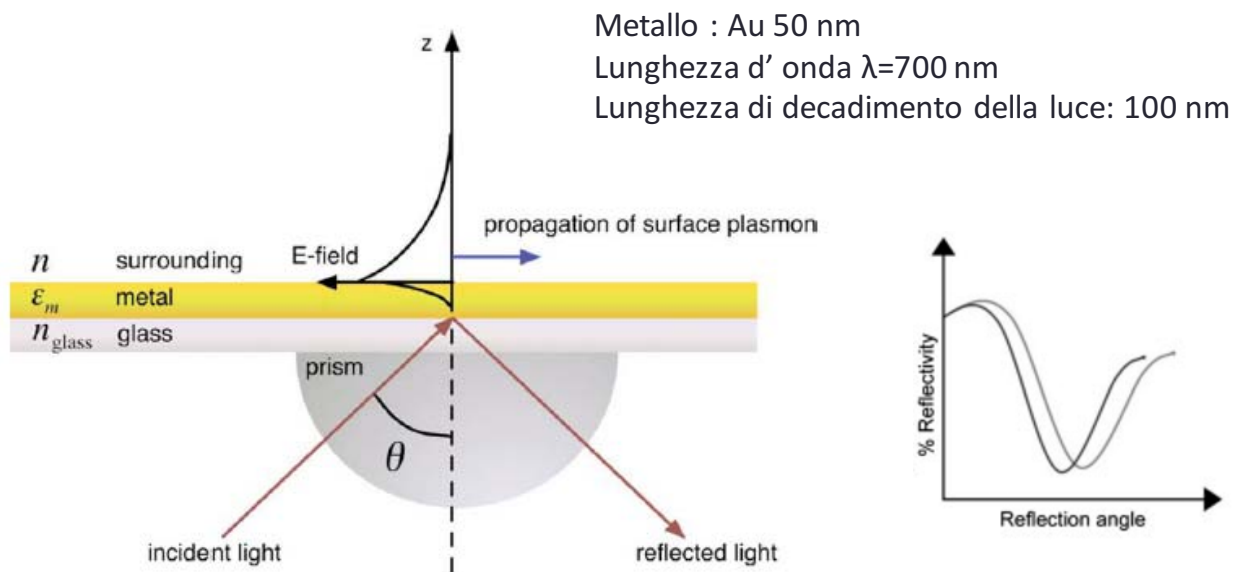
- Inviando luce polarizzata su un interfaccia dielettrico-metallo si possono eccitare gli elettroni quasi liberi del metallo (plasma) provocando la nascita di un'onda superficiale di plasma (plasmone).
- La risonanza avviene in corrispondenza di un preciso angolo di incidenza della luce.
- L'angolo di risonanza dipende dal rapporto tra $n_{\text{dielettrico}}$ ed n_{metallo} .
- La frequenza di plasma (ω_p) di un metallo definisce il comportamento in funzione della frequenza della radiazione incidente.

$$\varepsilon_{\text{metallo}}(\omega) = 1 - \left(\frac{\omega_p}{\omega} \right)^2 \quad \varepsilon = n^2$$

- Per $\omega > \omega_p$ ε reale e positiva e il metallo è trasparente
- Per $\omega < \omega_p$ ε immaginaria e il metallo è opaco

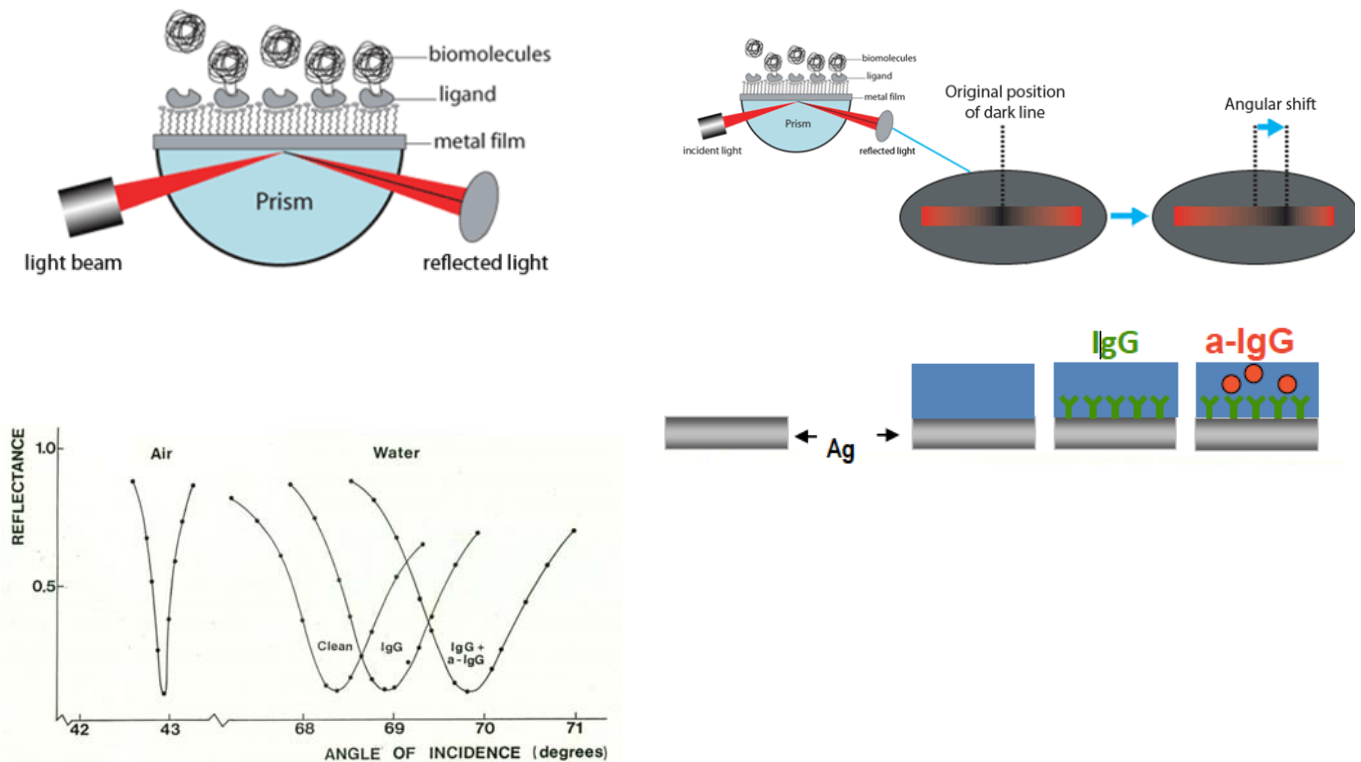


Surface Plasmon Resonance



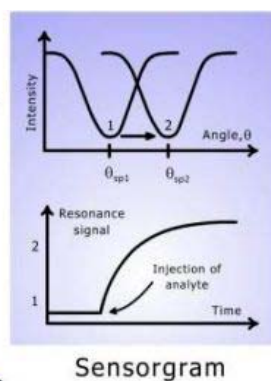
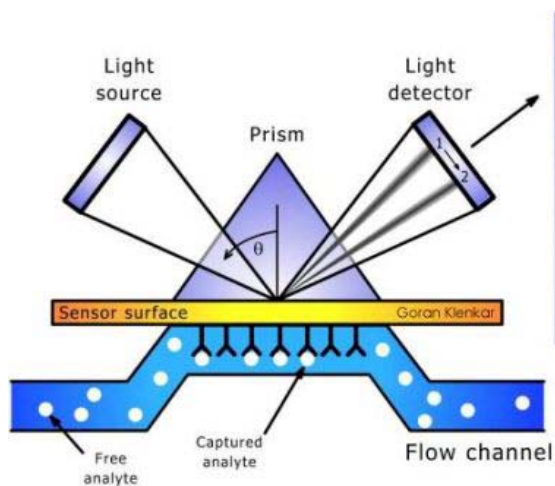
La luce riflessa è funzione dell'indice di rifrazione sulla superficie del metallo ad una distanza di circa 100 nm.
Sensore estremamente sensibile agli adsorbimenti superficiali.

SPR sensor



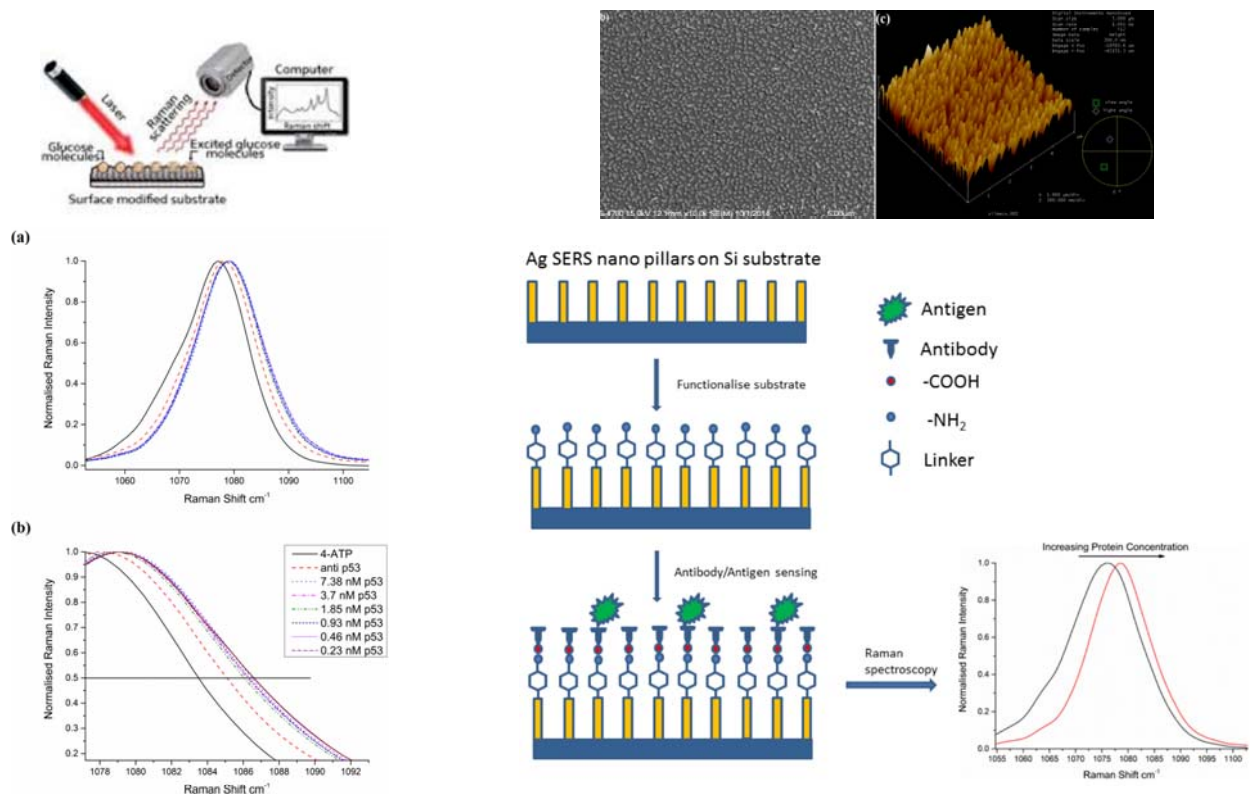
SPR sensor

- Se il film metallico è sottile (L'angolo di risonanza dipende anche dalla costante dielettrica sulla superficie opposta del film metallico dall'interfaccia opposto).
- Questo fenomeno può essere utilizzato per la realizzazione di un sensore di grande sensibilità utilizzato principalmente per analisi biologiche.



Surface Enhanced Raman Spectroscopy

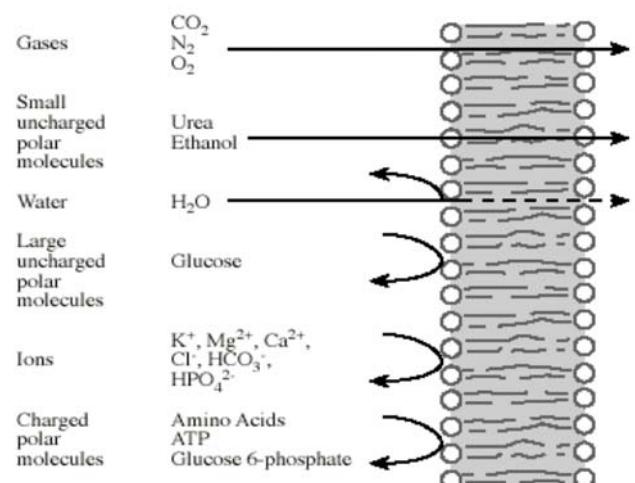
- Raman signal is strongly amplified on the surface of metallic nanoparticles



Owens et al. Biosensors, 2005

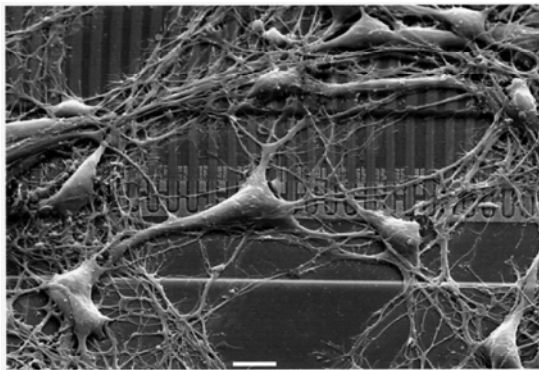
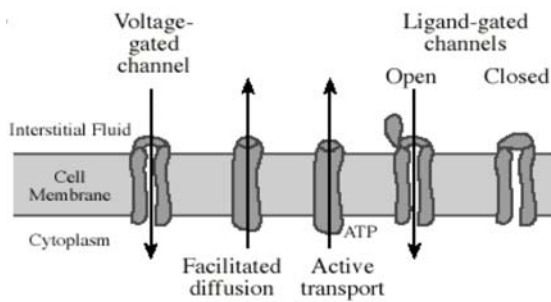
Sensori basati su cellule

- Le cellule presentano un potenziale di membrana dato dalla differenza di concentrazione delle specie ioniche attraverso la membrana cellulare
- Questo potenziale detto potenziale di azione cambia in funzione della composizione dell'ambiente circostante la cellula
- Il potenziale di azione può essere registrato con opportuni elettrodi.

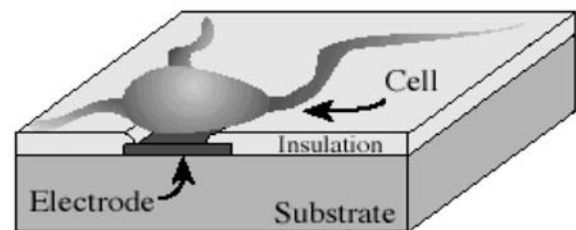
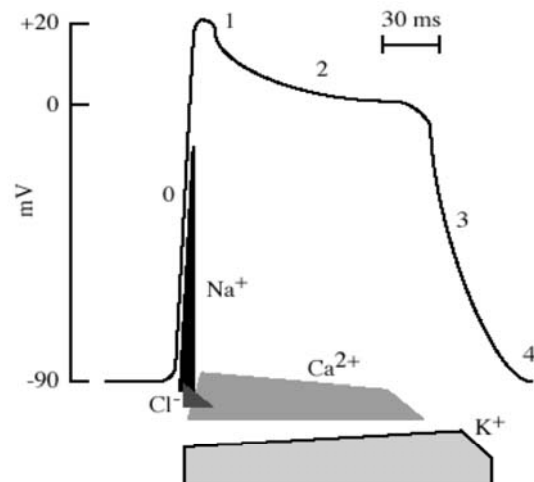


Potenziale d'azione

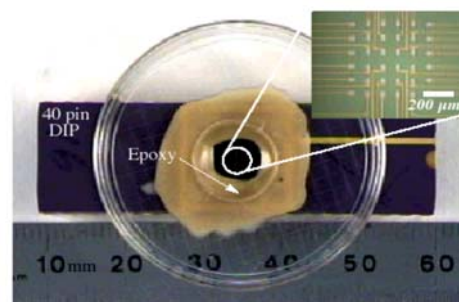
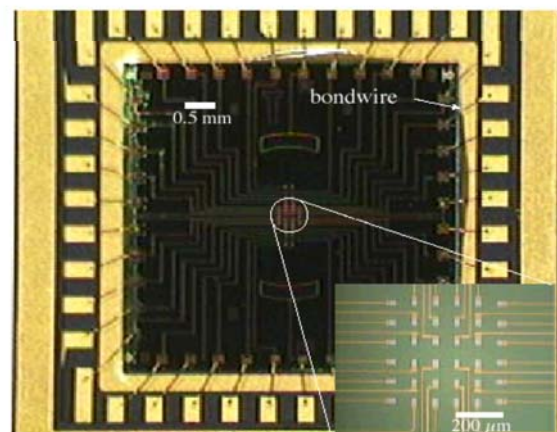
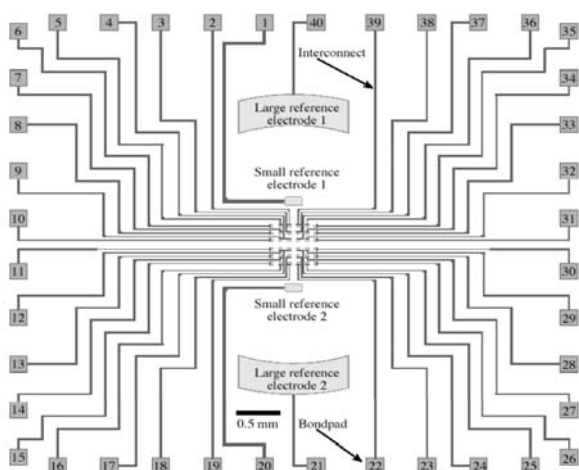
Canali proteici transmembrana



Potenziale di azione di una cellula cardiaca dove sono evidenziati 3 canali ionici.

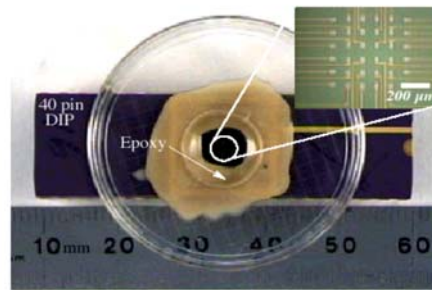
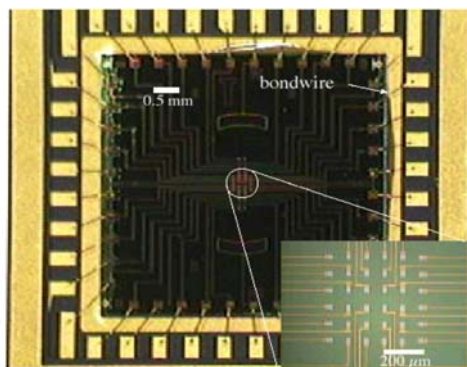
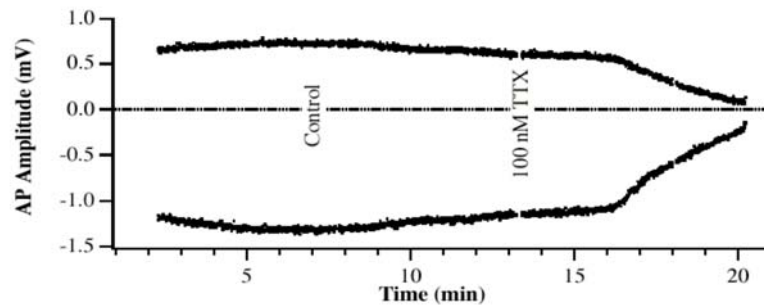
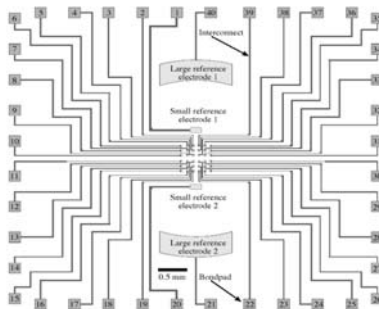


Elettrodo cellulare



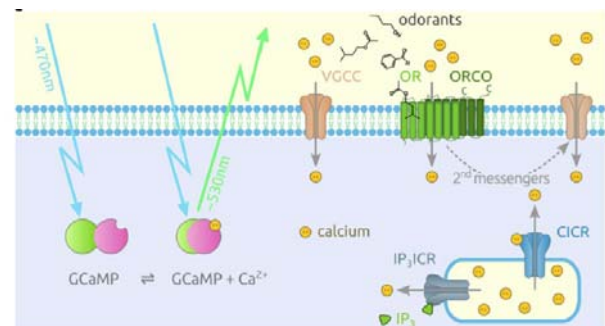
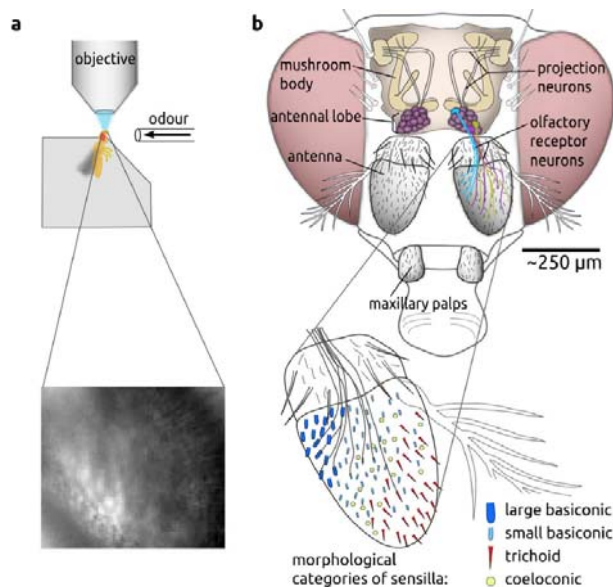
Sensibilità ad agenti tossici

- Misura dell'estensione del potenziale ad un elettrodo dopo l'aggiunta, in soluzione, di 100 nM di tetrodotossina (tossina del pesce palla)
- La tossina agisce sui canali ionici delle cellule nervose inibendone il funzionamento.

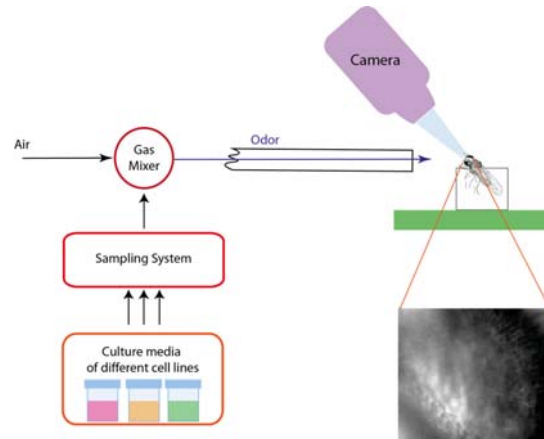
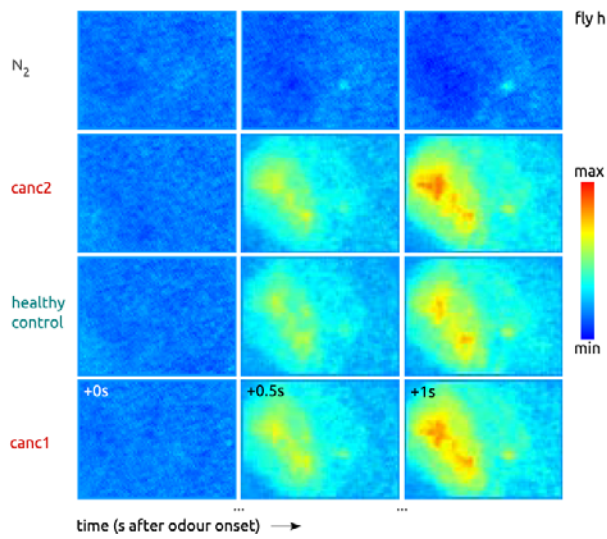


recettori olfattivi naturali

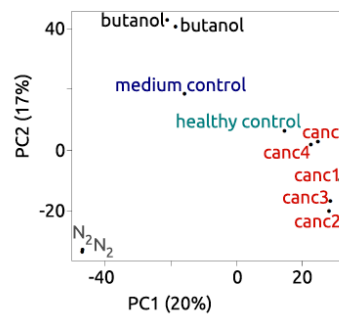
- misura della attività di un neurone olfattivo attraverso un "sensore" fluorescente di calcio.



risposta dell'antenna olfattiva ai composti volatili di colture cellulari



a fly h, PCA on all odours



b fly h, PCA on test odours

