



Modulo Biosensori

BioSensori

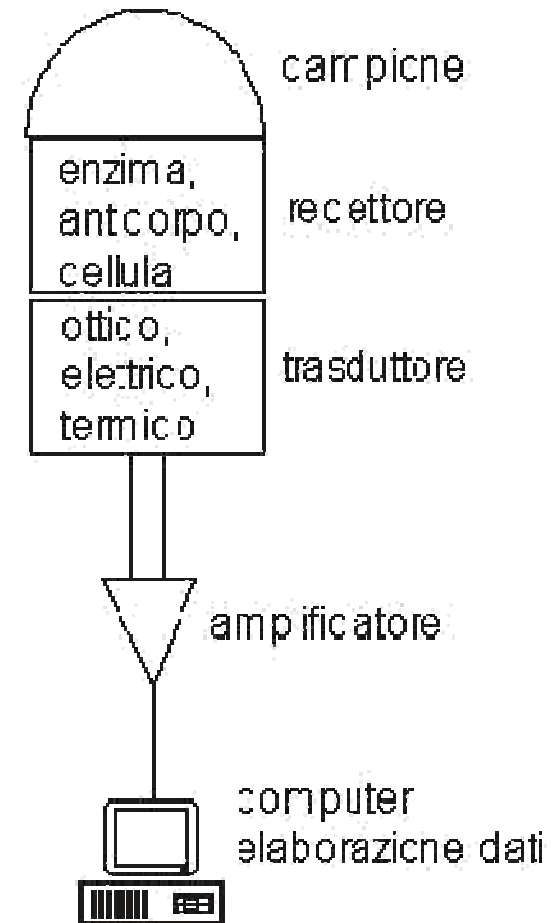
a.tognetti@centropiaggio.unipi.it

Biosensori

- Hanno un elemento sensibile di origine biologica
- L'elemento biologico è collegato o integrato su un trasduttore
 - L'interazione dell'elemento biologico con la sostanza target produrrà una variazione delle proprietà fisico/chimiche dell'interfaccia stessa
 - Produzione di ioni, luce, variazione di massa, temperatura.....
 - Metodi elettrochimici e ottici
- I recettori biologici possono essere uno o più enzimi, componenti di membrane, cellule, anticorpi o antigeni, DNA o RNA o anche frammenti di tessuto biologico. Essi sono i responsabili del riconoscimento delle specie di interesse e conferiscono **selettività** e sensibilità al dispositivo finale

Biosensori

1. Elemento sensibile di origine biologica
2. Trasduttore
3. Condizionamento del segnale
4. PC



Applicazioni biomediche

- Le applicazioni più rilevanti sono quelle legate alla diagnostica clinica
- Il primo impulso per lo sviluppo di biosensori é venuto dalla necessità di eliminare o almeno minimizzare i tempi e le laboriose procedure delle analisi cliniche.
 - I metodi usati per misurare la concentrazione di specie chimiche nei fluidi biologici constano di prelievi di grossi volumi di sangue, sottoposti a centrifugazione.
 - I campioni vengono alla fine analizzati con tecniche elettrochimiche o immunoenzimatiche, tramite elettrodi sensibili a ioni, spettrofotometri o dosatori di radioattività, con lunghi periodi di incubazione.
 - Gli esami richiedono inoltre l'intervento di personale esperto e l'uso di strumentazione complessa, costosa e generalmente ingombrante.

Molecole con rilevanza diagnostica

Specie Chimica	Esempi tipici	Tipico valore fisiologico
Ioni	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , H ⁺	0.1 M
Gas	NH ₃ , O ₂ , CO, CO ₂	0.1 M
Metaboliti	Glucosio, urea, creatinina	10 mM
Farmaci	Salicilato, acetaminofina, gentamicina	0.1 mM
Steroidi	Cortisone	1 μM
Anticorpi	IgM, IgG	100 nM
Ormoni	Insulina, prolattina, HCG	10 nM
Antigeni	Epatite, HIV, alfa-feto proteina	0.1 nM

Requisiti

Un biosensore, per offrire notevoli vantaggi rispetto ai classici sistemi per il monitoraggio delle sostanze chimiche, deve possedere alcuni requisiti:

- Segnale di uscita ripetibile e preciso, ed avere una sensibilità e risoluzione adeguata alla misura.
- Range dinamico tale da coprire la variabilità di tutti i casi clinici, sia normali che patologici (i livelli di glucosio nel sangue possono andare dal 2 mM al 20 mM, mentre le concentrazioni di ormoni sono del ordine di nanomolari).
- Il sistema di misura deve essere insensibile a variazioni termiche.
- E' essenziale che il sensore sia economico, "user-friendly" e di dimensioni contenute.
- Veloce, nell'ordine di qualche minuto.
- Il volume del campione prelevato (tipicamente sangue – ma meglio saliva, sudore o urina) deve essere piccolo – non più di alcune decine di microlitri.
- Per i sensori impiantabili, ci sono ulteriori requisiti di biocompatibilità e non-tossicità.

Situazioni cliniche in cui è richiesto l'uso di biosensori:

- Monitoraggio continuo ex-vivo
- Monitoraggio continuo in-vivo
- Monitoraggio ex-vivo e discontinuo

Monitoraggio continuo ex-vivo

- Sistemi tipicamente previsti nelle terapie di cura intensiva.
- Implicano necessariamente un sistema di monitoraggio “bed-side”, con l’uso di tecniche di prelievo, eparinizzazione, diluzione e dialisi, ed eventuale reinfusione.
- Esempio applicativo: monitoraggio dello stato immunitario di un paziente recentemente sottoposto a un trapianto d’organo.
- Per evitare eventuali problemi di rigetto e per somministrare giuste dosi di farmaci immunosoppressivi sarebbe indispensabile avere a disposizione un sistema automatizzato di prelievo e analisi ex-vivo a regolari intervalli di tempo

Monitoraggio continuo in-vivo

- Un dispositivo per monitoraggio ripetuto in-vivo richiede un piccolo sensore impiantabile o operante per via transcutanea con una lettura digitale, che dia un indicazione almeno ogni paio di minuti (esempio: glucosio).
- L'esempio più importante, in cui é previsto un monitoraggio in-vivo di tipo continuo, é il caso del diabete.
- Un controllo continuo dei livelli di glicemia é indispensabile sia per un sistema di pancreas artificiale ad anello chiuso che per un più rigoroso ed efficace monitoraggio di pazienti diabetici

Monitoraggio ex-vivo e discontinuo

- Attualmente sono gli unici sensori disponibili a livello commerciale;
- Nel senso più corretto della parola devono essere chiamati "saggi" anzichè sensori.
- Generalmente sono nella forma di uno "stick" e sono di tipo "usa e getta"
- Tra questi si possono citare anche i sensori di DNA per studi sull'espressione genica. I saggi più diffusi sono senz'altro quelli per il monitoraggio del glucosio e gli indicatori della gravidanza o fertilità.
- Tali saggi evitano le procedure di analisi di laboratorio, che possono essere laboriose e complicate, e forniscono un'unica lettura della concentrazione di analita (ad esempio glucosio o ormoni).
- Rimangono meno affidabili delle analisi di laboratorio perché l'accuratezza dipende sia dal paziente che da fattori fisiologici, ad esempio il livello di ematocrito e di idratazione.

Sviluppo di biosensori associati con l'interfaccia biologica

Aspetti dello sviluppo di biosensori associati con l'interfaccia biologica che devono essere considerati sono:

L'orientazione - una superficie sensibile dovrebbe essere altamente impacchettata ed orientata, senza spazi vuoti o eccesso di materiale che danno origine a segnali spuri. Attualmente non esiste un metodo standard e ripetibile per l'immobilizzazione in un modo ordinato.

Legami non-specifici - il legame di molecole estranee alla superficie sensibile. Questo può dare false informazioni sullo stato della superficie o contaminarla.

Stabilità - la ricopertura superficiale deve essere stabile nel tempo ed avere un ragionevole tempo di vita. Questo è uno dei più importanti fattori limitanti lo sviluppo e la commercializzazione dei biosensori, dato che nel tempo molte proteine perdono la loro attività.

Perdita o diminuzione di funzionalità - una proteina immobilizzata non avrà le stesse costanti di reazione di una proteina nel proprio ambiente naturale

Reversibilità – Problema per i sensori ad affinità che utilizzano gli anticorpi.

Esclusi i sensori di tipo uso e getta, un sensore dovrebbe poter seguire i cambiamenti di concentrazione dell'analita in esame, e quindi reversibile. Nella maggior parte dei casi la biomolecola perde parte della la sua affinità e subisce denaturazione.

Classificazione dei Biosensori

I biosensori sono classificati sia secondo la natura della molecola biologica utilizzata che secondo il metodo di trasduzione adottato per la rivelazione del segnale

Bioriconoscimento enzimatico, con

- metodo di lettura elettrochimico
- metodo di lettura optoelettronico

Bioriconoscimento immunologico, o immunosensori con

- metodi di lettura optoelettronico
- metodi di lettura gravimetrico
- metodo di lettura elettrochimico

Metodi utilizzanti DNA per il riconoscimento dei geni con

- metodi di lettura optoelettronico
- metodi di lettura gravimetrico
- metodo di lettura elettrochimico

Metodi di riconoscimento cellulare

- utilizzano composti che modificano la crescita delle popolazioni cellulari o producono in esse alterazioni del metabolismo.

Metodi tessutali.

Biosensori Catalitici e Sensori di Glucosio

Principi di funzionamento dei biosensori enzimatici

Gli enzimi sono molecole proteiche che agiscono da catalizzatori per le reazioni chimiche. La struttura tri-dimensionale della catena polipeptidica fa sì che diminuisca l'energia di attivazione della reazione tramite un'interazione a sito specifico fra enzima e substrato.

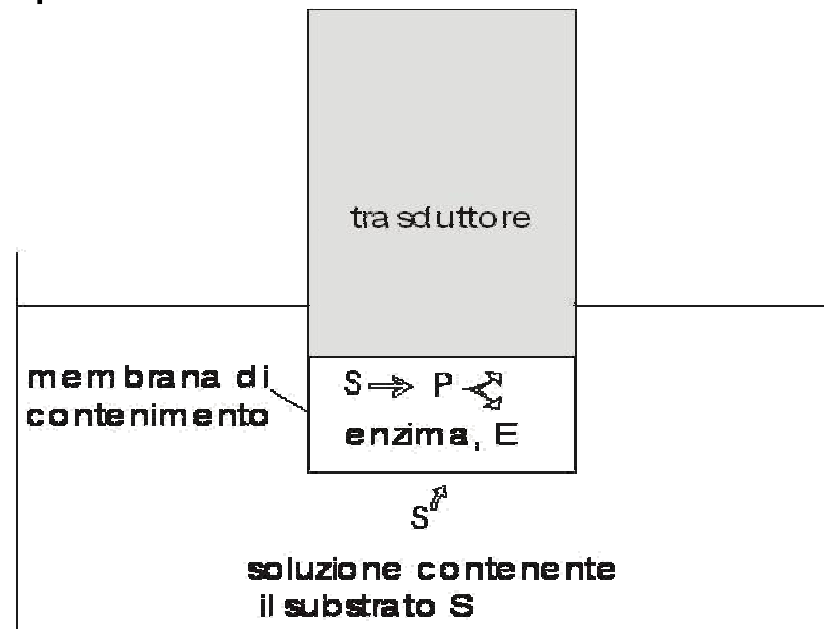
Gli enzimi più comunemente usati per la costruzione di biosensori sono riportati in tabella

Enzimi utilizzati nei biosensori enzimatici, e meccanismi di trasduzione impiegati

Analita	Enzima	Meccanismo di Trasduzione
Glucosio	Glucoso ossidasi	Pressione parziale di O ₂ , dissociazione H ₂ O ₂ , pH, ottico (es. quenching di fluorescenza), termico
Urea	Ureasi	Pressione parziale di NH ₃ , pH, ottico (es. quenching di fluorescenza), termico
Amino acidi	Amino acido ossidasi	Pressione parziale di NH ₃ , termico
Etanolo	Alcol deidrogenasi	Trasferimento di elettroni, termico
Lattato	Lattato deidrogenasi Lattato ossidasi	Trasferimento di elettroni, termico, ottico, pH
Penicillina	Penicillinasi	pH, termico
Colestorolo	Colesterolo ossidasi	Pressione parziale di O ₂ , dissociazione H ₂ O ₂

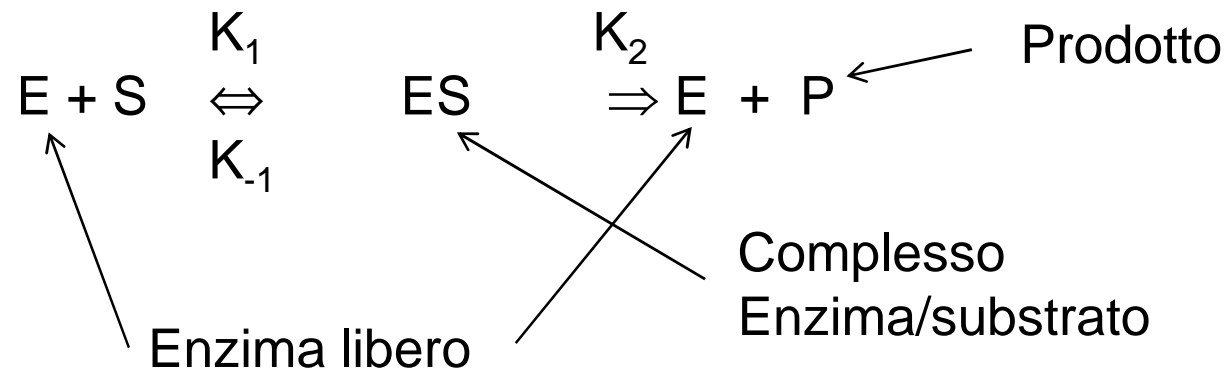
Biosensore enzimatico

La superficie del trasduttore è in contatto con uno strato enzimatico trattenuto da una membrana, ed il tutto viene immerso nella soluzione da analizzare. Il substrato diffonde attraverso la membrana e reagisce con l'enzima. I prodotti della catalisi devono a loro volta diffondere verso il trasduttore per poi essere convertiti in un segnale quantificabile.



Cinetica di Michaelis-Menten

- La cinetica di Michaelis-Menten descrive l'aumento della velocità delle reazioni catalizzate da enzimi al variare della concentrazione di substrato
 - All'aumentare di poco della concentrazione del substrato disponibile all'enzima la velocità di reazione aumenta molto fino ad arrivare ad un valore massimo V_{max}
 - Concentrazione totale dell'enzima costante
 - Saturazione: il substrato satura l'enzima in soluzione, non restano enzimi liberi



K_i : costanti di
velocità di reazione

Cinetica di Michaelis-Menten

- Effetto catalitico
 - ES è un complesso intermedio di reazione con basso valore di energia di attivazione tale da far avvenire la reazione in maniera molto favorevole
- Equilibrio termodinamico
 - **Stato stazionario** in cui la concentrazione molare di ES è costante nel tempo
 - Velocità di produzione di ES è uguale alla velocità di consumo
 - $[E]_0$ concentrazione totale

$$K_1[E][S]=K_{-1}[ES]+k_2[ES]=(K_{-1}+K_2)[ES]$$

$$[E]_0=[E]+[ES]$$

$$[ES]=\frac{K_1[E]_0[S]}{K_{-1}+K_2+K_1[S]}$$

$$V=\frac{dP}{dt}=K_2[ES]$$

Velocità di formazione
del prodotto

Cinetica di Michaelis-Menten

$$V = K_2 \frac{K_1 [E]_0 [S]}{K_{-1} + K_2 + K_1 [S]} = \frac{K_2 [E]_0 [S]}{\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} + [S]} = \frac{K_2 [E]_0 [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad \text{Costante di Michaelis-Menten}$$

In condizioni limite $[E]_0 = [ES]$ quando l'enzima è completamente saturato dal substrato abbiamo $V_{\max} = K_2 [E]_0$

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

K_m rappresenta la concentrazione di substrato per cui la velocità è la metà della massima possibile

K_m indica l'affinità di un enzima ad un certo substrato. K_m basso: con minor substrato arrivo alla metà della massima velocità di reazione

Le equazioni che descrivono una reazione fra enzima (E), ed il substrato (S) per produrre un prodotto (P), nel caso di una reazione monomolecolare irreversibile, sono:

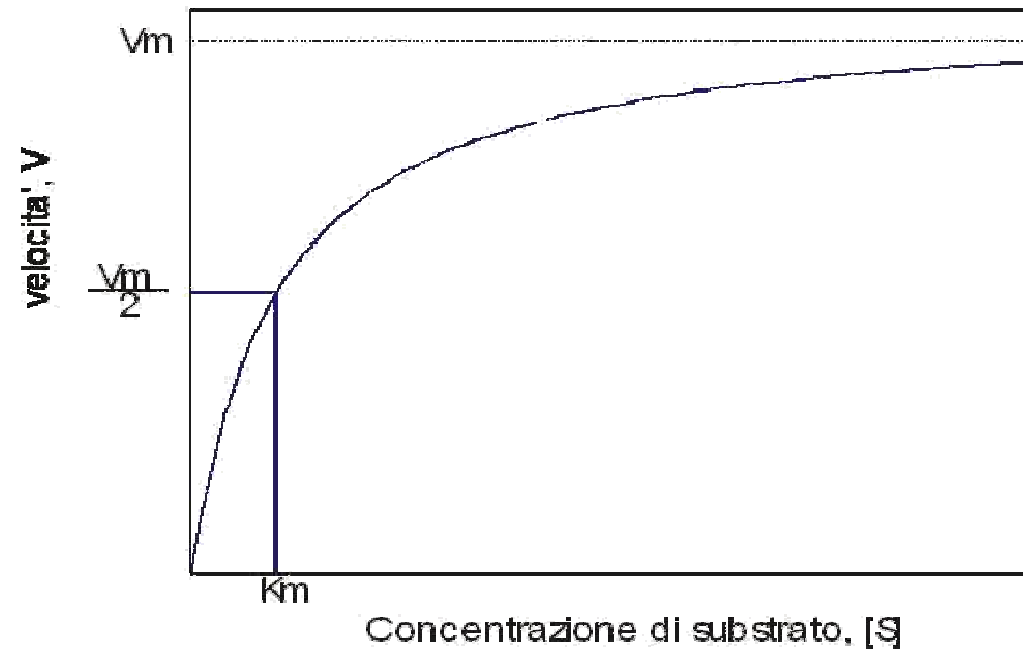


Le K sono le costanti cinetiche per le reazioni. La velocità della reazione è data dall'equazione di Michaelis e Menten.

$$V = \frac{dP}{dt} = K_2 [ES] = \frac{K_2 [E_0][S]}{K_m + [S]}$$

Dove K_m è la costante di Michaelis ($K_m = (K_{-1} + K_2) / K_{+1}$) e E_0 è la concentrazione iniziale di enzima. Quando $[S] \gg K_m$, $V = V_m$, la velocità massima della reazione, e quindi $V_m = K_2 [E_0]$.

Un curva tipica che descrive la cinetica della reazione enzimatica



Sensori enzimatici

- La maggior parte dei sensori misura l'aumento di pressione parziale di gas sviluppato durante la reazione catalitica o la variazione di pH tramite l'uso di elettrodi. Ad esempio, nel sensore per urea, utilizzando l'enzima ureasi, la sequenza delle reazioni è:

ureasi



A pH fisiologico (intorno a 7), la CO₂ e NH₃ danno le seguenti reazioni:



Quindi l'urea può essere rivelata tramite un sensore di pressione parziale di CO₂ o NH₃, o un sensore di pH.

Sensori per il glucosio

Uno degli analiti più importanti in clinica è il glucosio

Obiettivo: monitorare livelli di glucosio in tempo reale ed in continuo in pazienti affetti da diabete di tipo I o II

La disponibilità di un sensore affidabile in situ è essenziale per la realizzazione di un "pancreas artificiale" ad anello chiuso per pazienti insulino-dipendenti

La mancanza di un idoneo sensore di glucosio, che può essere considerato la cellula pancreatica β del sistema artificiale, ha finora impedito lo sviluppo di un sistema artificiale che possa regolare automaticamente il rilascio di insulina a seconda della concentrazione di glucosio nel sangue.

La maggior parte dei biosensori per il glucosio sono basati sull'ossidazione del glucosio catalizzato dall'enzima glucosio-ossidasi (GOD).

L'enzima GOD, di solito estratto da funghi, ossida il glucosio secondo la reazione seguente:

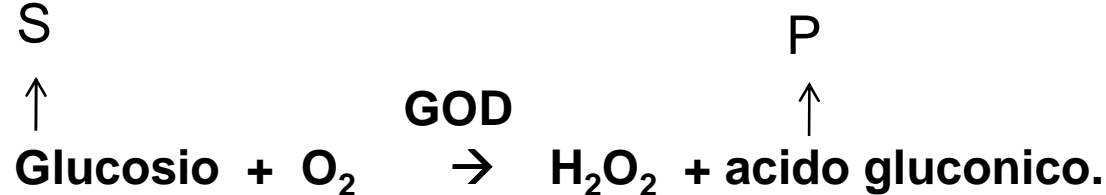


Dove FAD è una flavina che funziona da cofattore dell'enzima GOD a cui è legato.

Il GOD (FADH₂) è solitamente riossidato tramite reazione con ossigeno



La sequenza di reazioni enzimatiche può essere riassunta come:



I biosensori più studiati, anche per un eventuale uso *in vivo*, sono quelli elettrici che sfruttano la reazione di ossidoriduzione descritta sopra.

I requisiti per sensori di glucosio

I sistemi sensoristici per la misura del glucosio devono rispondere a particolari requisiti:

1. Devono essere in grado di misurare concentrazioni di glucosio nel sangue o nei tessuti interstiziali in un range da 36 a 360 mg/dl (da 2 mM a 20 mM), con risposta ben definita e ripetibile.
2. Il sensore deve essere estremamente specifico per il glucosio - questo è il caso per l'enzima glucosio-ossidasi (GOD) che è alla base di quasi tutti i sensori per il glucosio.
3. Deve avere un tempo di risposta veloce (dell'ordine di pochi minuti, tempo di risposta tipico del pancreas).
4. Deve avere una risposta che è indipendente dalla idrodinamica dei fluidi corporei (es. al flusso di sangue) e dalla concentrazione di ossigeno.
5. Deve essere stabile sia meccanicamente che chimicamente.

Caso del pancreas artificiale

Nel caso di un sensore impiantabile come si può prospettare in un pancreas artificiale, esso deve avere anche altre caratteristiche fondamentali:

- "biocompatibile", oltre ad essere sterile, non tossico, stabile, deve anche essere piccolo, portabile senza fastidi per il paziente, senza necessità di particolari attenzioni o frequenti ricalibrizioni. Purtroppo l'insieme di questi aspetti relativi alla biocompatibilità in generale impediscono l'impiego di sensori per il monitoraggio in continuo e *in vivo*.
- Inoltre, associati a quelli della biocompatibilità, bisogna anche considerare i problemi dovuti al ricondizionamento del sensore (ad esempio, nel caso di un biosensore enzimatico, esso deve essere ricaricato con l'enzima e risterilizzato).
- I metodi principali utilizzati per monitorare il glucosio nel sangue e nell'urina hanno subito una grande evoluzione: dai saggi chimici generali per zuccheri riducenti, all'approccio biochimico più specifico, fino all'uso dei biosensori.

Classificazione dei sensori per il glucosio

Tipo	Componente biologico	Commenti
Saggi colorimetrici -“lo stick”	GOD e Perossidasi	-metodo correntemente utilizzato dai pazienti diabetici
<u>Sensori ottici</u> -Sensore ottico a fluorescenza - Sensore ad infrarosso	Concanvalina A	-il glucosio compete con destrano marcato (in fase di sviluppo) -in produzione
Sensori elettrici -potenziometrici -amperometrici -a semiconduttore	GOD GOD GOD	- in uso nei laboratori di analisi - possono essere miniaturizzati per l’impianto (in fase di sperimentazione <i>in vivo</i>)
Sensore termico	GOD	-in fase di sperimentazione <i>in vivo</i>
Sensore meccano-chimico	GOD	-parzialmente invasivo (in fase di sviluppo)

Sensori Potenzimetrici

- La componente essenziale di un sensore potenziometrico consiste in un elettrodo per il pH, che presenta una membrana di vetro permeabile agli ioni H^+ e costituisce l'elettrodo di misura vero e proprio, ed un elettrodo di riferimento esterno (ad esempio di Ag/AgCl).
- La misura potenziometrica è basata sulla determinazione del potenziale fra l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo di misura.
- L'elettrodo ione-selettivo fa parte di una cella elettrochimica ed il potenziale fra i due elettrodi viene misurato con un voltmetro.
- L'elettrodo di riferimento deve quindi essere stabile e non cambiare potenziale (le fluttuazioni devono essere più piccole della risoluzione del sistema).

Il potenziale sviluppato dalla membrana, nel caso degli H⁺ è dato da un'equazione simile a quella di Nernst:

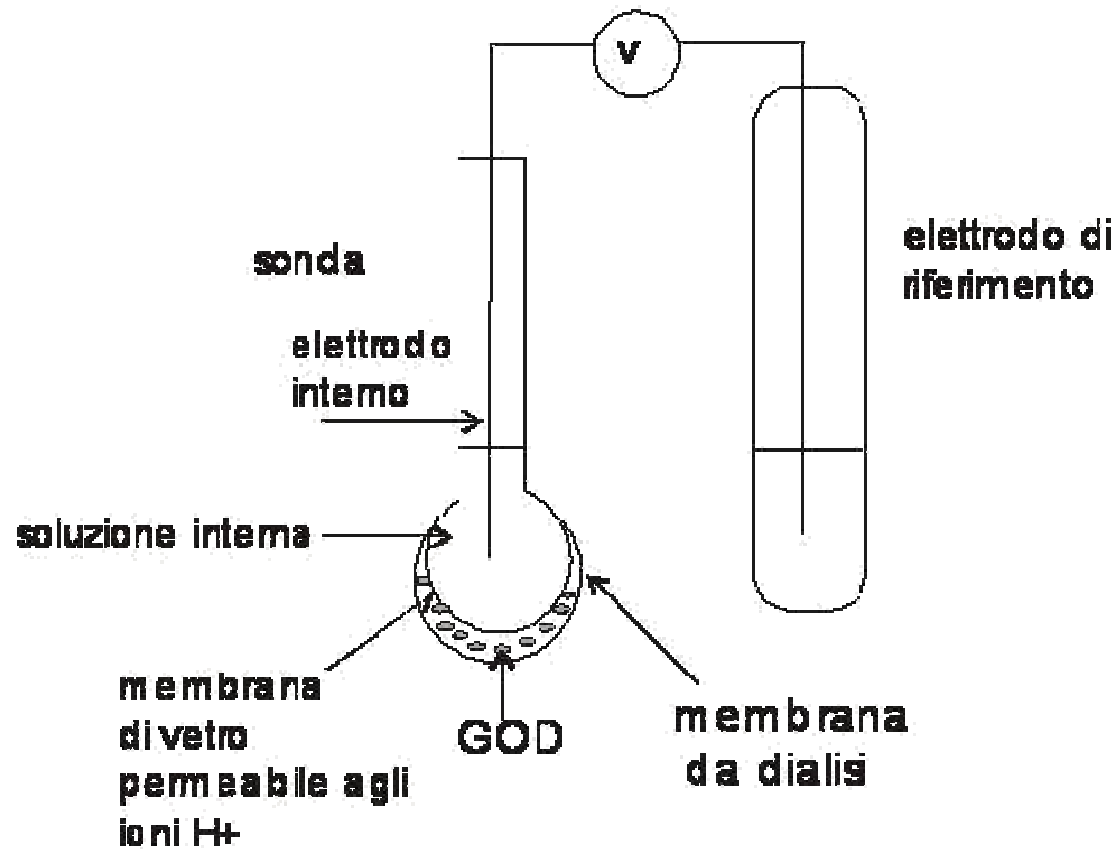
$$E = E_o + \frac{RT}{ZF} \ln a$$

Risposta elettrodi a vetro
(iono-selettivi)

dove E_o è una costante (ma non il potenziale standard!), R è la costante dei gas, T la temperatura in Kelvin, Z la valenza dello ione (H⁺ nel caso di un potenziometro per pH), a è l'attività degli H⁺ ed F è la costante di Faraday. Quindi il potenziale sviluppato è proporzionale al pH.

Nei sensori potenziometrici per il glucosio, l'elettrodo di pH viene modificato intrappolando molecole di GOD tra l'elettrodo di vetro e la soluzione da analizzare. Tale sistema misura la diminuzione del pH locale dovuta alla produzione di acido gluconico generata dall'ossidazione del glucosio.

Sensore potenziometrico per glucosio

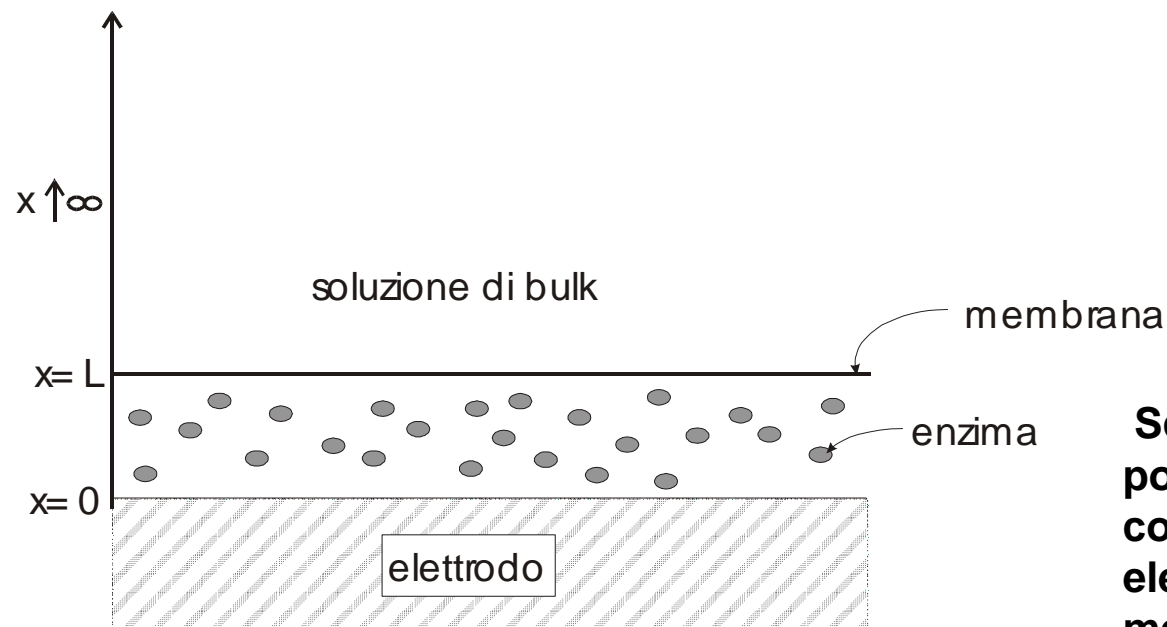


Svantaggi del sensore potenziometrico

1. Necessita di un elettrodo di riferimento molto stabile, che risulta difficilmente realizzabile in presenza di fluidi biologici come nel caso di impiego del sensore *in vivo*.
2. Lo svantaggio che riguarda tutti sensori basati sull'uso dell'enzima GOD, è quello del consumo di ossigeno. Infatti nei fluidi corporei è presente una certa concentrazione di ossigeno che però può diminuire localmente a causa della ossidazione del glucosio e questo può portare a risultati falsati.

Cinetica dell'elettrodo ad enzima potenziometrico

- La modellizzazione del comportamento di un biosensore enzimatico è un problema di carattere bioingegneristico. Ad esempio, per realizzare un sensore enzimatico, è necessario ricavare delle espressioni che aiutino a dimensionare un sensore enzimatico dal punto di vista dei tempi di risposta in funzione della concentrazione di analita da misurare. Facendo riferimento ad un biosensore potenziometrico che, a differenza dell'amperometrico, non consuma il prodotto.



Schema di un elettrodo ad enzima potenziometrico in sezione. Si considera un sistema planare, con elettrodo posto a $x=0$ e la membrana a $x=L$. La soluzione si estende fino a $x=\infty$.

▪ Un elettrodo a enzima opera un processo a 5 passi:

1. il substrato deve essere trasportato alla superficie esterna dell'elettrodo (la membrana);
2. deve diffondere attraverso la membrana;
3. deve avvenire la reazione;
4. il prodotto formato nella reazione enzimatica deve essere trasportato fino alla superficie dell'elettrodo;
5. il prodotto deve essere misurato alla superficie dell'elettrodo.

Ognuno di questi cinque passi necessita di un certo tempo e contribuisce alla cinetica in maniera più o meno rilevante. Il punto 1 è dipendente fortemente dall'agitazione della soluzione, cosicché agitando opportunamente il substrato si ottiene un trasporto rapido, non limitato dalla cinetica diffusionale. Usando una membrana sottile si può anche trascurare il punto 2). Inoltre, possiamo considerare la reazione come processo molto veloce (trascurare punto 3).

- In tal modo il sistema di equazioni che descrive le velocità di conversione del substrato S e generazione del prodotto P è:

$$\begin{cases} \frac{\partial [S]}{\partial t} = D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \\ \frac{\partial [P]}{\partial t} = D_P \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = D_P \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \end{cases}$$

Fick + Michaelis e Menten
 D_s, D_p: costanti di diffusione

- Ipotesi: $[S]_L \ll K_M$ ($[S]$ per $x = L$)
- *Caso stazionario*

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} &= \alpha \cdot [S] \\ \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} &= -\frac{D_S}{D_P} \cdot \alpha \cdot [S] \end{aligned} \quad \alpha = \frac{K_2 \cdot [E]}{K_M \cdot D_S}$$

- Condizioni al contorno

$$[S] = [S]_L \text{ per } x = L$$

$$\frac{\partial [S]}{\partial x} = 0 \text{ per } x = 0 \quad \frac{\partial [P]}{\partial x} = 0 \text{ per } x = 0$$

Substrato e prodotto non diffondono all'elettrodo

- $[P]_L = 0 [P]$ per $x=L$

$$[S] = A \cdot e^{x\sqrt{\alpha}} + B \cdot e^{-x\sqrt{\alpha}} \quad [S] = A \cdot (e^{x\sqrt{\alpha}} + e^{-x\sqrt{\alpha}}) = 2 \cdot A \cdot \cosh(x \cdot \sqrt{\alpha})$$

$$[S]_{x=L} = [S]_L = 2 \cdot A \cdot \cosh(L \cdot \sqrt{\alpha}) \quad 2 \cdot A = \frac{[S]_L}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})}$$

$$[S] = \frac{\cosh(x \cdot \sqrt{\alpha})}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})} \cdot [S]_L$$

- Per risolvere la seconda equazione che definisce il comportamento del sistema, usiamo un bilancio di massa attraverso lo strato enzimatico. Per fare ciò riscriviamo il sistema di partenza:

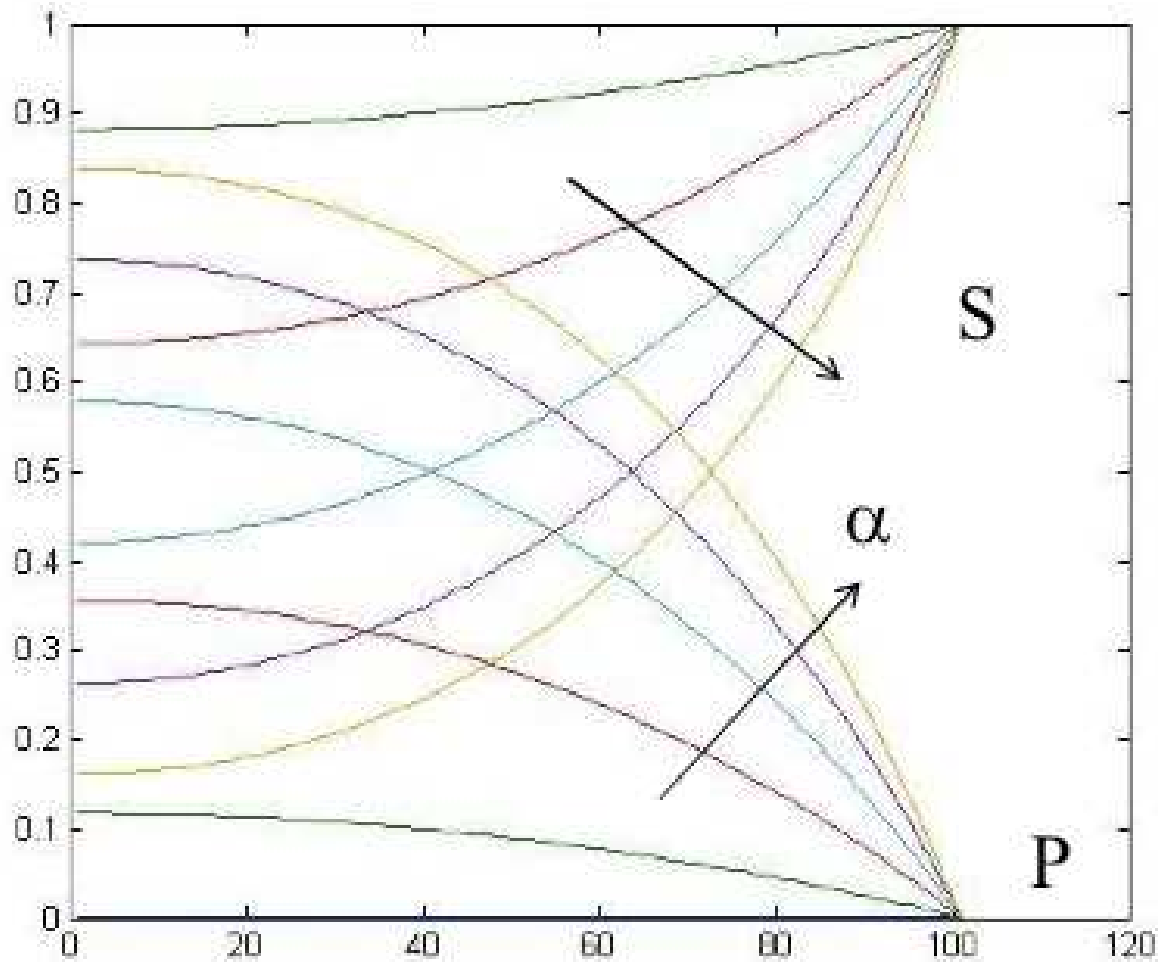
$$\begin{cases} D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = 0 & D_S \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} + D_P \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} = 0 \\ D_P \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + \frac{V \cdot [S]}{K_M + [S]} = 0 & D_S \cdot \frac{\partial [S]}{\partial x} + D_P \cdot \frac{\partial [P]}{\partial x} = \cos t = 0 \end{cases}$$

I flussi diffusivi del substrato in ingresso e del prodotto in uscita dallo strato di enzima. Poiché nello strato enzimatico niente è creato o distrutto, ma ci sono solo trasformazioni da substrato a prodotto, la somma di bilancio deve essere zero.

- Integrando ed applicando le condizioni al contorno si ottiene

$$D_S \cdot [S] + D_P [P] = \cos t1 \quad D_S \cdot [S]_L + \cancel{D_P} [P]_L = \cos t1$$

$$[P] = \frac{D_S \cdot [S]_L - D_S \cdot [S]}{D_P} = \frac{D_S}{D_P} \cdot ([S]_L - [S]) \quad [P] = \frac{D_S}{D_P} \cdot [S]_L \cdot \left(1 - \frac{\cosh(x \cdot \sqrt{\alpha})}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})} \right)$$



Andamento di $[P]/[S]_L$ e $[S]/[S]_L$ in funzione della distanza (normalizzata) nel caso che sia $[S]_L \ll K_M$. All'aumentare di α , una maggior percentuale di substrato si trasforma in prodotto sulla superficie dell'elettrodo

Esempio

- Per progettare un sensore enzimatico è importante poterlo dimensionare per ottenere la risposta desiderata. Ad esempio l'enzima GOD estratto da *Aspergillus niger* ha una K_m di 0.1 M. Quindi, nel caso di glucosio nel sangue, che può avere una concentrazione di 1 o 2 mM in condizioni di ipoglicemia, fino a 20 mM in caso di elevata ipoglicemia, siamo nelle condizioni $[S]L \ll K_m$. In un tipico sensore potenziometrico, dato che il rapporto D_s/D_p è pari ad 1, per $L=100 \mu\text{m}$, $K_2=10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $D_s=10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ed $[E]$ è del ordine del 1mg/ml (0.02 mM), risulta che $\alpha = 2 \text{ m}^{-2}$. Quindi dopo che il sistema ha raggiunto l'equilibrio, circa il 75% di glucosio è stato convertito in acido gluconico alla superficie dell'elettrodo. L'acido gluconico si dissocia in H^+ e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7^-$. La differenza di potenziale sviluppata all'interfaccia dell'elettrodo è data dall'equazione di Nernst (equazione 2), che per H^+ risulta 59 mV/decade. In pratica, la differenza di potenziale rispetto alla concentrazione di glucosio per un sensore potenziometrico è tipicamente circa 40 mV/decade, che indica che ci sono reazioni locali di tipo riduttivo che interferiscono con l'ossidazione, e inoltre l'acido gluconico non è completamente dissociato. Per diminuire il valore di α , è necessario diminuire la resistenza dello strato sensibile alla diffusione del glucosio (quindi aumentare la costante di diffusione) o ridurre la concentrazione di glucosio ossidasi.

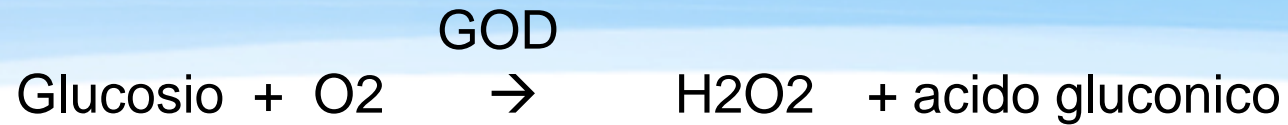
Sensori Amperometrici

Struttura simile a quella dei sensori potenziometrici

Dal punto di vista funzionale invece, i primi si differenziano dai secondi per il passaggio di corrente che si genera fra i due elettrodi componenti il sensore (elemento metallico e riferimento), tra i quali viene applicato un potenziale elettrico.

La corrente generata allo stato stazionario (in condizioni di concentrazione limite) è dovuta al trasferimento di elettroni tra il prodotto della reazione enzimatica e gli elettrodi ed è proporzionale alla concentrazione di specie elettroattive.

Il potenziale deve essere sufficiente per causare solo la reazione desiderata e per mantenerla costante, ed evitare un accumulo di cariche (attivare la reazione di interesse che avrà una sua energia caratteristica).

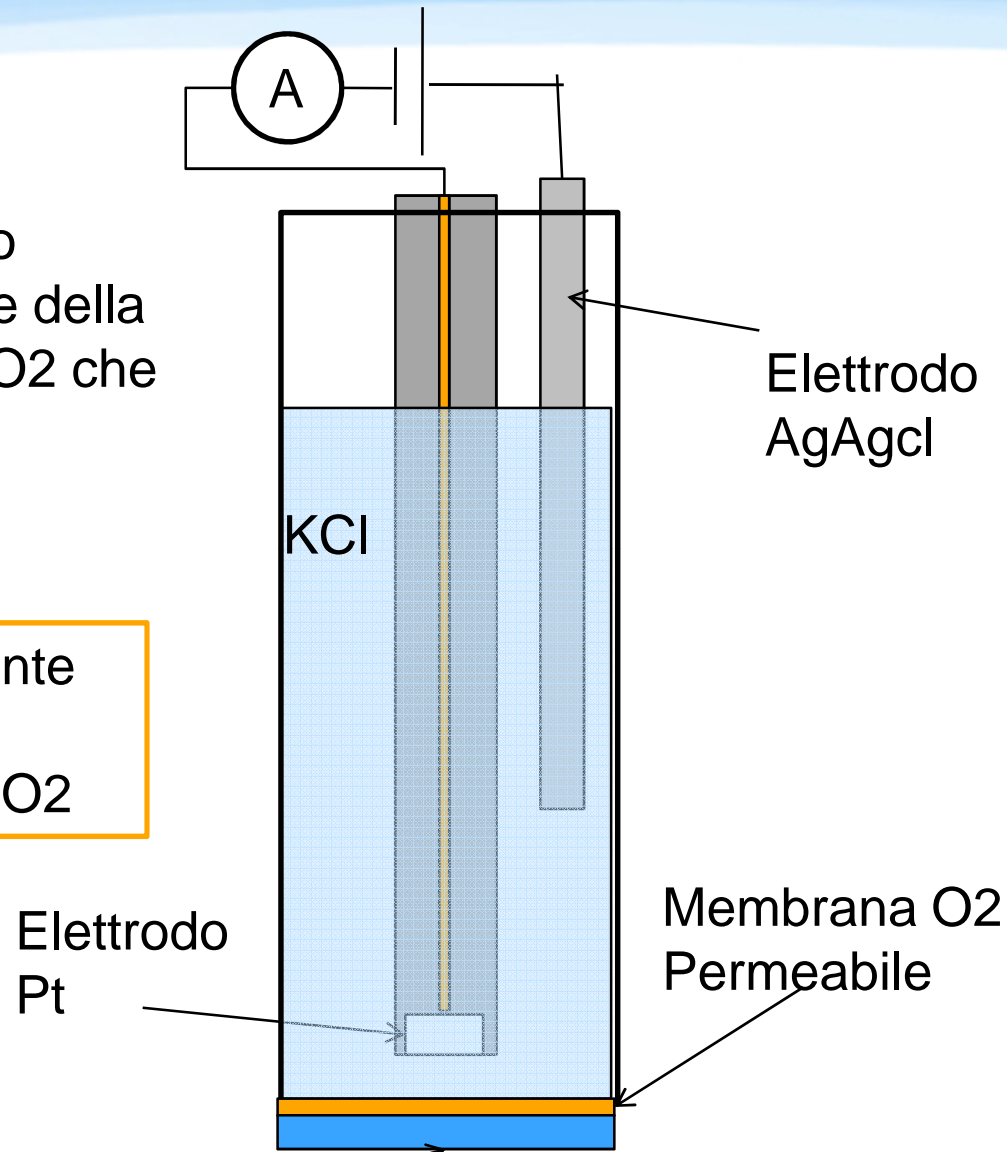


- i sensori amperometrici riescono a misurare **la variazione della pressione parziale di ossigeno** che viene consumato con la riduzione al catodo o l'ossidazione di H₂O₂ all'anodo .
- I sensori amperometrici più sviluppati per l'analisi del glucosio sono quelli in cui un anodo di platino polarizzato a circa 600mV rispetto ad un elettrodo di riferimento
 - Elettrodi di Clark modificati
- Un apparecchio basato su questo tipo di misura è prodotto e commercializzato e costituisce uno dei più diffusi sistemi per la determinazione del glucosio nei laboratori di analisi.

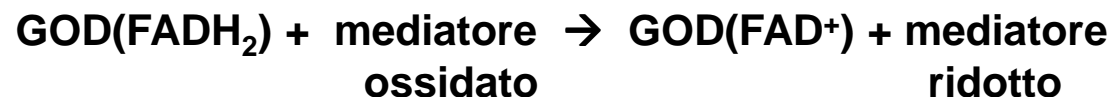
Sensori amperometrici

Reazione del glucosio provoca una riduzione della pressione parziale di O_2 che viene misurata con l'elettrodo di Clark

Elettrodo Clark: corrente proporzionale alla pressione parziale di O_2

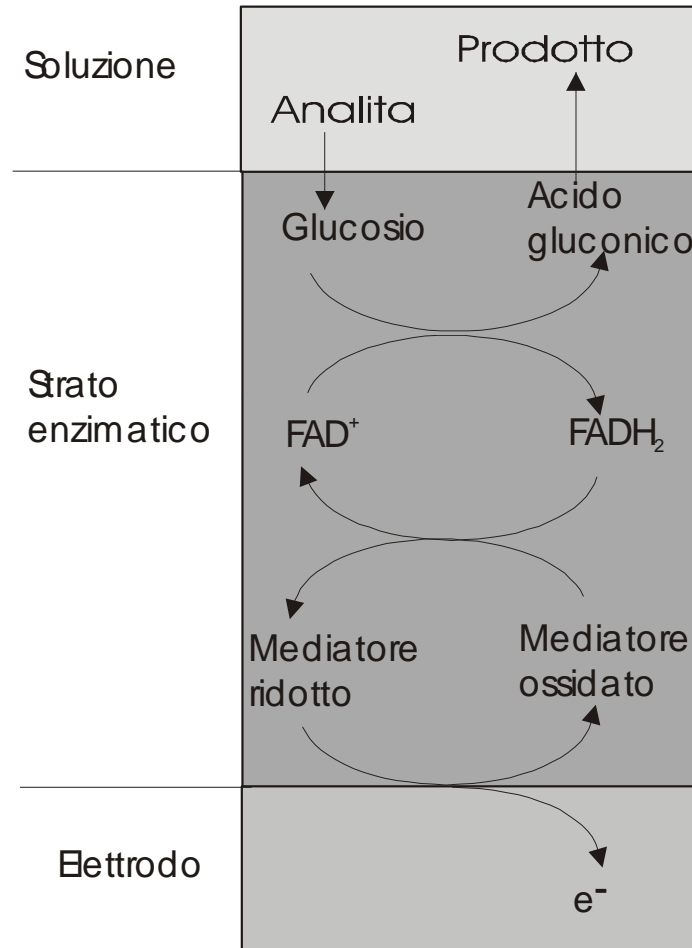


- Con l'uso di membrane specifiche questi sensori hanno un campo di misura da 5 mM a 30 mM ed un tempo di risposta minimo di 20 secondi.
- Molto sensibili ad agenti riducenti che possono ossidarsi all'anodo.
- Per evitare il problema del consumo di O₂ esistono diversi "mediatori" che "riossidano" il FADH₂ dopo la reazione.
- Il FADH₂ può essere riossidato dall'applicazione di una corrente in grado di trasferire gli elettroni dall'enzima all'elettrodo, ed il mediatore serve da "ponte" fra i due.



- I tipi di mediatore proposti sono: i chinoni (per esempio il tetracianoquinonedimetano o TCNQ) ed alcuni derivati del ferrocene, che sono i più usati.
- Il mediatore deve essere molto stabile e non subire cambiamenti anche dopo diversi cicli di ossidazione. In più deve avere una cinetica veloce, e deve poter essere immobilizzato sull'elettrodo, vicino al GOD, per poter funzionare da veicolo per gli elettroni. Per eventuali applicazioni *in vivo* non deve essere tossico.

Schematizzazione della sequenza di reazioni nel sensore amperometrico con mediatore



Conclusioni

I sensori basati sull'uso di un mediatore non sembrano adatti per l'applicazione *in vivo*, per la presenza di molecole potenzialmente tossiche, dato che la forma attiva del mediatore risulta sempre leggermente solubile in acqua, con rischio di uscita dalla membrana di contenimento.

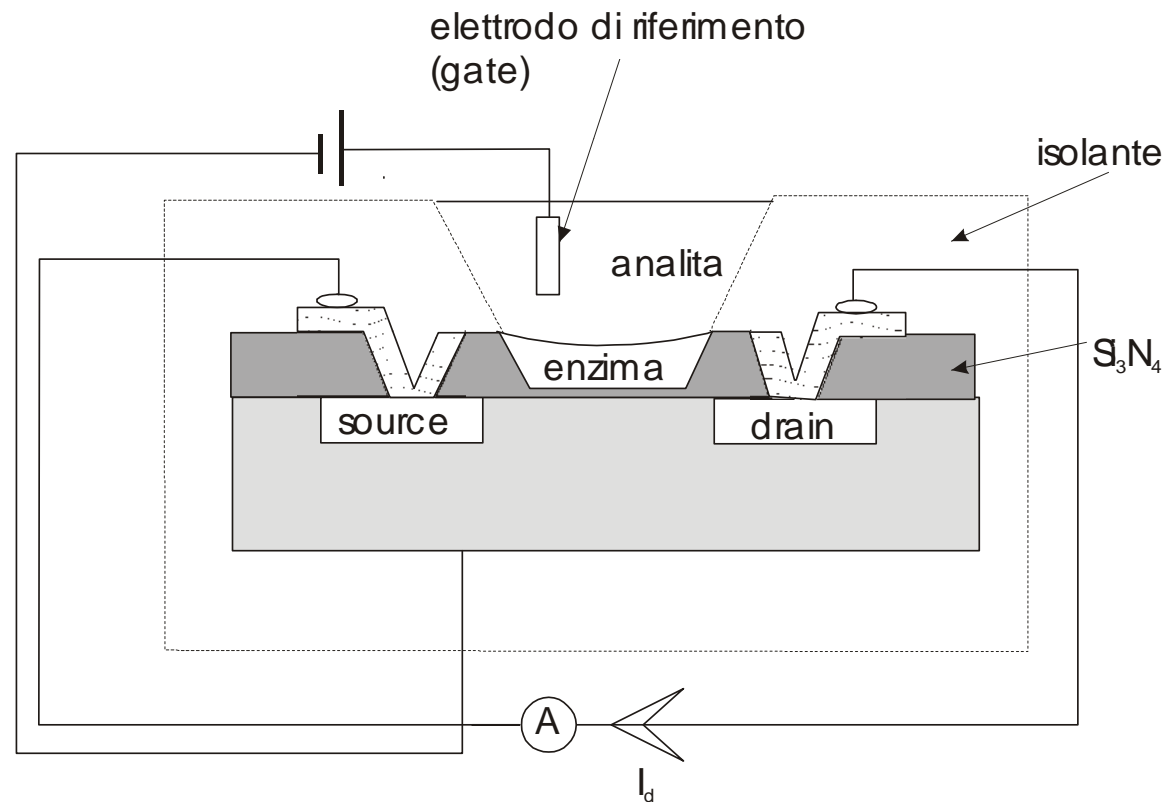
Infatti, anche se un saggio per la glicemia basato sull'impiego di un sensore amperometrico è in commercio, il suo uso principale è nei sistemi anaerobici (ad es. nei fermentatori).

Recentemente sono stati realizzati sensori amperometrici o potenziometrici per l'uso *in-vivo*. Essi sono costruiti a forma di ago o di filo sottile (diametro da 0.2 a 0.5 mm). L'elettrodo di riferimento viene impiantato insieme al sensore e può essere applicato sulla pelle.

Il tempo di vita utile di questi sensori *in vivo* è molto limitato. Dovuto essenzialmente all'adesione di molecole proteiche al sensore, con una conseguente infiammazione locale che cambia la risposta e la durata del sensore.

Schema di un ENFET

Equivalente di un sensore potenziometrico. La V di gate varia per la variazione di Ph dovuta all'enzima

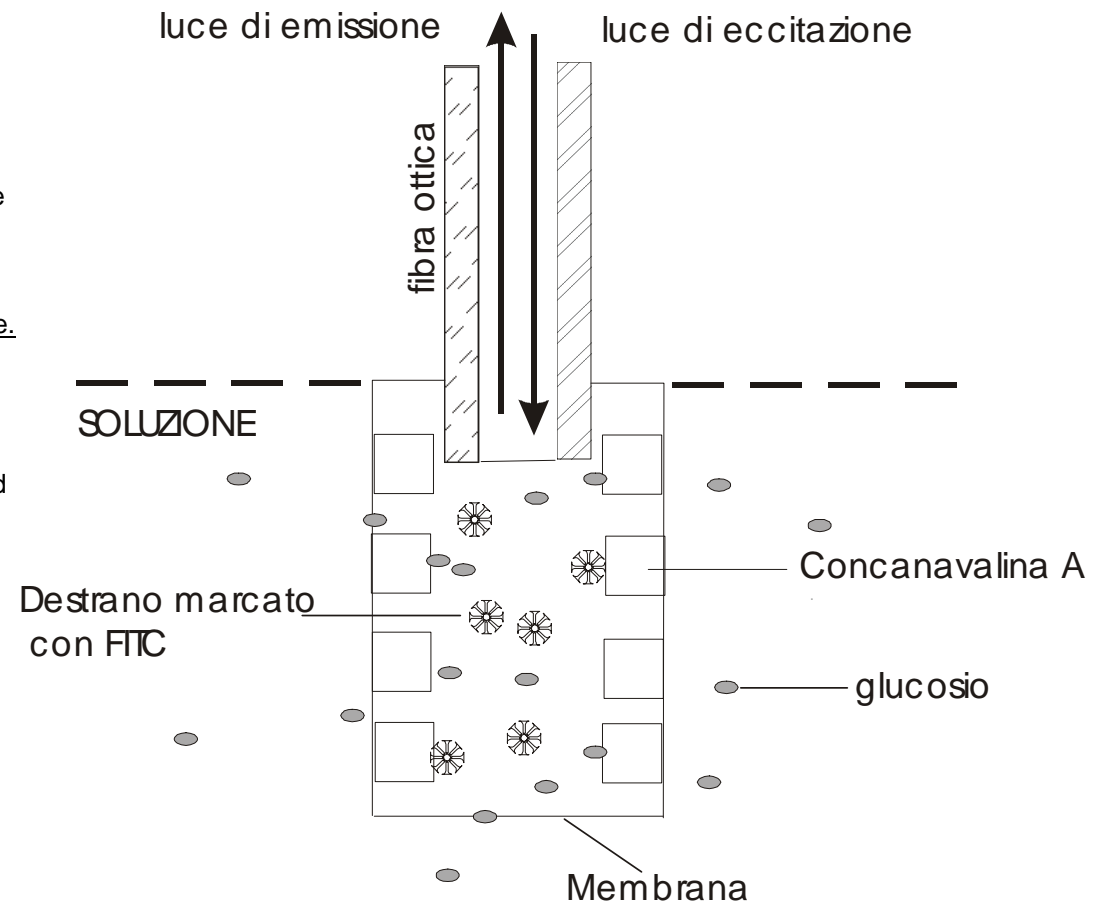


Sensore ottico per glucosio basato sull'uso della concanavalina A

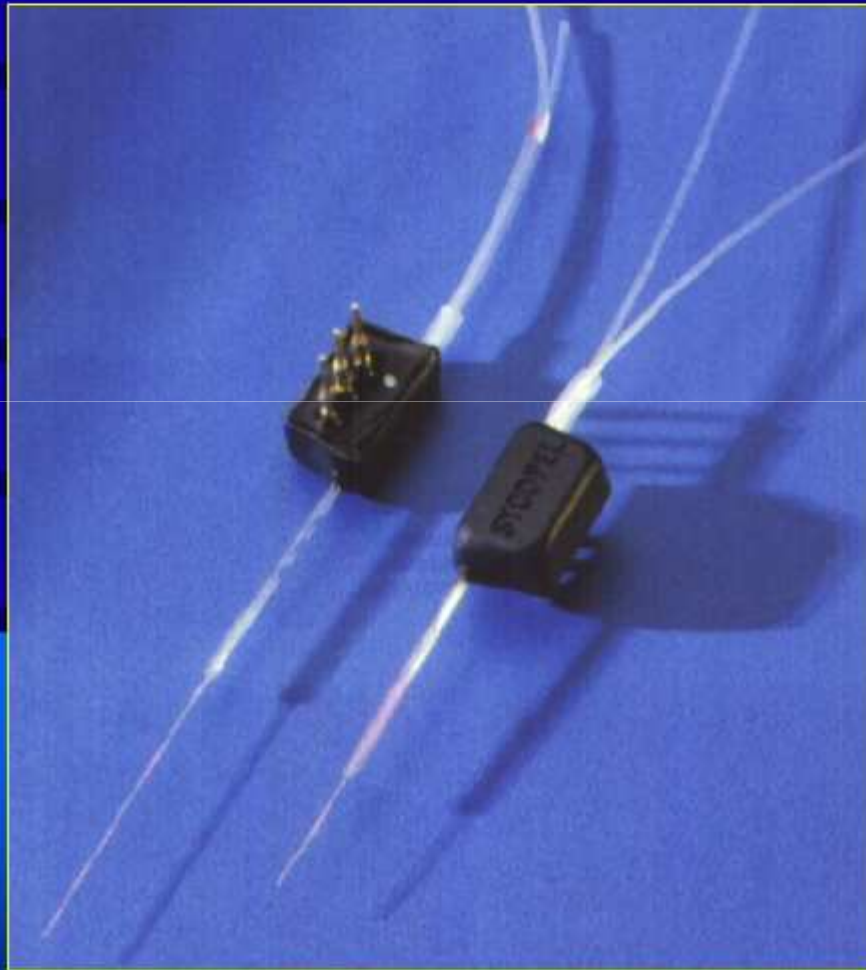
A differenza dei sensori elettrici, il sensore ottico per glucosio non sfrutta l'enzima glucosio-ossidasi, ma utilizza invece la proteina concanavalina A (con-A). Questo tipo di sensore, ancora in fase di sviluppo, è basato sulla capacità della con-A di legarsi con gli zuccheri. Come schematizzato in figura, la concanavalina A viene immobilizzata all'interno di una membrana tubolare da dialisi, montata all'estremità di una fibra ottica. Il destrano marcato con FITC (una sostanza fluorescente) rimane confinato nel tubo e compete con il glucosio libero presente nel campione per legarsi con i siti della con-A.

Con l'aumento della concentrazione di glucosio, il destrano si dissocia dalla con-A, e passa via via in soluzione. I fenomeni avvengono quindi all'interno della cella formata dalla membrana e la fluorescenza eccitata dalla luce che esce dalla fibra viene ritrasmessa indietro per retrodiffusione lungo la fibra, verso un rivelatore ottico. Il relativo aumento del segnale di fluorescenza è quindi proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione.

Un sensore di questo tipo è selettivo per il glucosio, dato che nel sangue non sono presenti significative quantità di altri zuccheri liberi. La risposta del sensore è lineare nel range da 3 a 22 mM, con un tempo di risposta di circa 5-7 minuti. Tuttavia, dati i problemi associati alla presenza nel sangue di altri interferenti (ad es. O₂ che estingue la fluorescenza), effetti di fotodegradazione della FITC, e la difficoltà nel miniaturizzare alcuni componenti ottici associati alla misura in fluorescenza (nonché il loro costo), per ora tale sensore rimane essenzialmente di interesse accademico

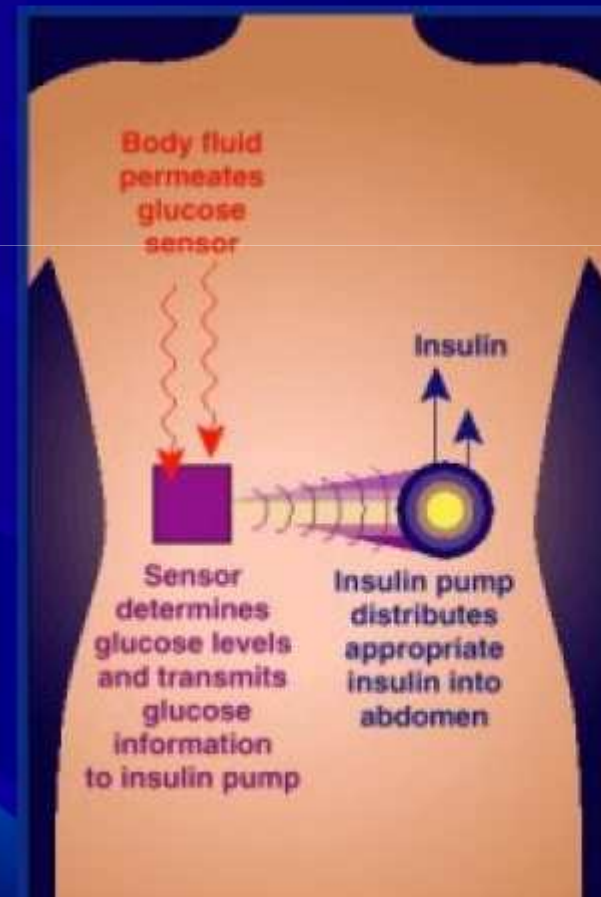
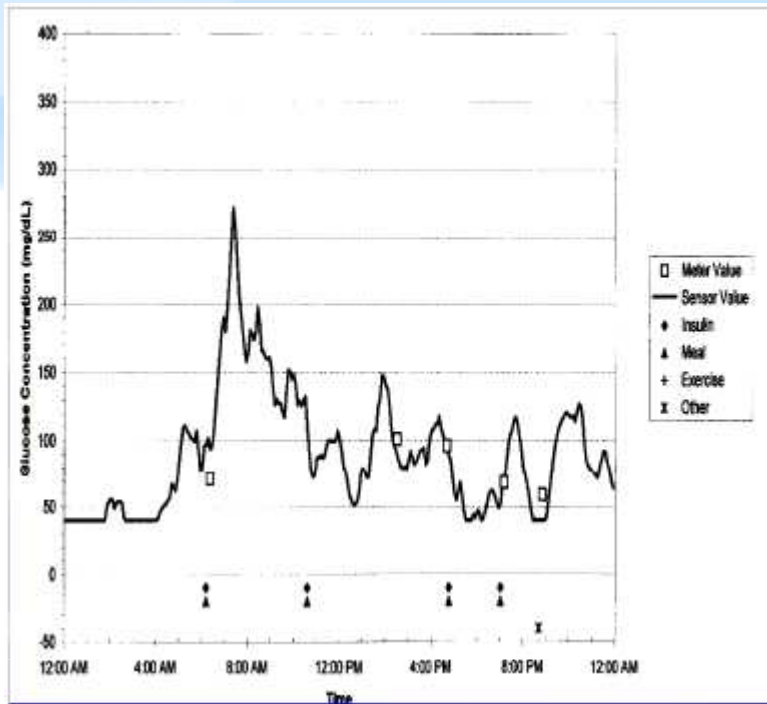


Le prospettive future dei biosensori



- **Determinazione da effettuare in vivo:**
 - **Acido glutammico**
 - **Glucosio**
 - **Acido lattico**
 - **Acido ascorbico**
 - **acetilcolina**

Il pancreas artificiale



Immunosensori

- Gli **immunosensori** sono un tipo particolare di biosensori basati sulla capacità tipica degli anticorpi di riconoscere e legare a sé antigeni.
- Gli anticorpi sono proteine globulari che giocano un ruolo fondamentale nel sistema immunologico dei organismi viventi.
- Produzione: 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 .

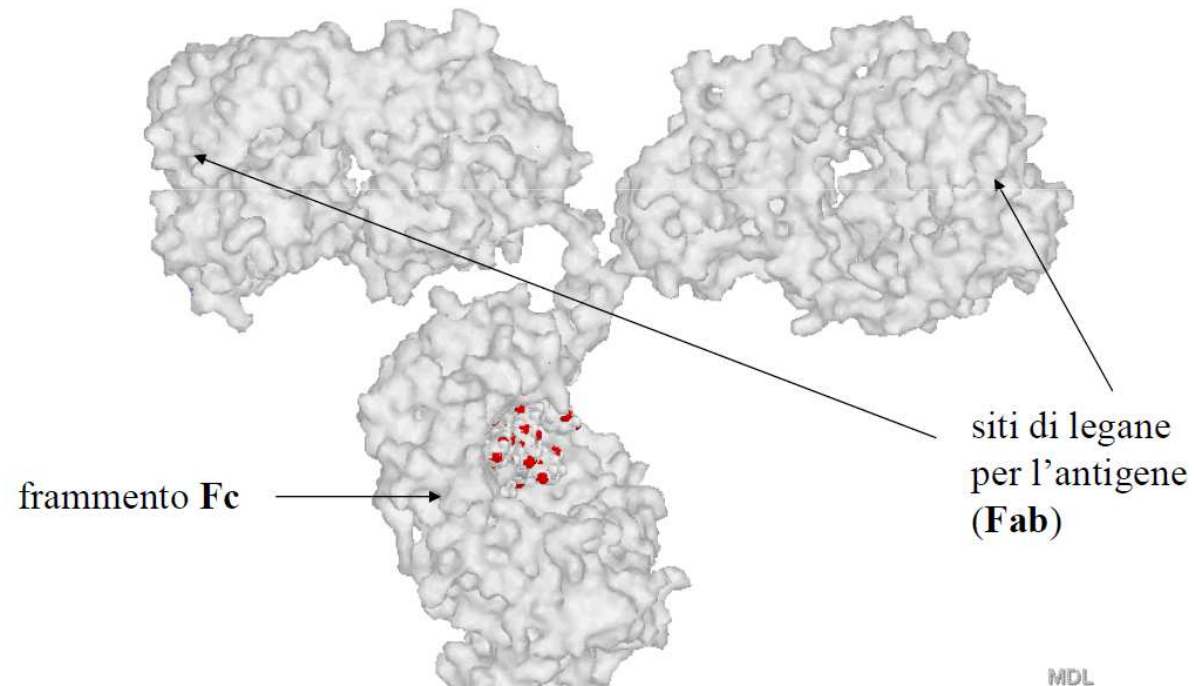


Immunosensori

- Kd ha un valore tipicamente compreso tra 10^{-4} e 10^{-12} moli/litro,
- Valori più piccoli indicano un'affinità più elevata
 - Maggiore concentrazione di anticorpi legati a parità di concentrazione iniziale
- Nella risposta immunitaria la molecola dell'antigene non è interessata in tutto, bensì solo in piccolissime aree della sua superficie, chiamate siti antigenici o epitopi. Il legame che si instaura tra anticorpo ed antigene è di tipo non covalente. Le forze che agiscono sono forze elettrostatiche, ponti di idrogeno, legami idrofobici e forze di Van der Waals.
- Negli immunosensori, l'elemento biologico viene immobilizzato su una superficie, e a differenza dei sensori enzimatici, in cui viene rivelata la presenza di un prodotto di una reazione catalitica, il legame fra anticorpo e antigene viene rivelato direttamente o indirettamente, tramite misure di variazione di massa, dimensioni, campo elettrico, ecc.

Immunosensori

Anticorpo: visualizzazione in modalità “*surface*”



Classificazione immunosensori

▪ Diretto

- L'evento di riconoscimento e la formazione del legame viene rivelato direttamente. I sensori diretti consistono in 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. Sono enumerabili fra tali sensori i potenziometrici, i piezoelettrici e quelli a risonanza plasmonica.

▪ Indiretto

- Richiedono un certo numero di passaggi in più rispetto agli altri, quali lavaggio ed aggiunta di reagenti. Hanno però il vantaggio di sfruttare metodi di trasduzione più vantaggiosi dal punto di vista dell'acquisizione del segnale
 - Immunosensore competitivo
 - Immunosensore sandwich

Immunosensore competitivo

- Nella configurazione competitiva l'anticorpo viene immobilizzato su una superficie solida.
- 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.
- Tale antigene viene intrappolato in un vano adiacente alla guida d'onda (nel caso di immunosensore ottico) grazie ad una membrana semi-permeabile che permette il passaggio all'antigene da misurare.
- L'antigene marcato compete con il campione da analizzare nell'occupazione dei siti anticorpali ed il segnale così ottenuto è inversamente proporzionale alla concentrazione incognita.
- Tipicamente, questa tecnica viene utilizzata in casi in cui l'antigene o aptene è troppo piccolo per essere rivelato con metodi diretti. La molecola marcata è una proteina coniugata con l'aptene, ad esempio albumina derivatizzata con il fluoroforo rodamina.

Immunosensore Sandwich

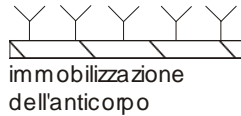
- Nel metodo sandwich, invece, una volta che l'antigene ha reagito con l'anticorpo immobilizzato, viene introdotto un secondo anticorpo marcato che si lega con l'antigene già attaccato all'anticorpo sulla superficie, creando appunto una sorta di sandwich di cui l'antigene occupa lo strato centrale.
- 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.
- Sono evidenti il maggior numero di operazioni richieste e la necessità della presenza di un operatore (o di una accresciuta complessità nel caso di ingegnerizzazione automatica della procedure).
- In compenso, però, è così possibile 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.

Configurazioni di immunosensori

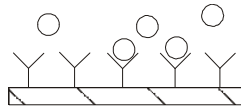
Diretto



preparazione dell'anticorpo



immobilizzazione
dell'anticorpo

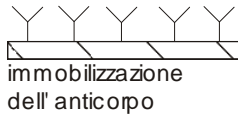


misura diretta

Competitivo



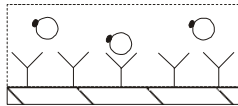
preparazione dell'anticorpo



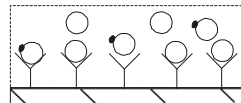
immobilizzazione
dell' anticorpo



marcatura dell'antigene



preparazione della cella
con membrana e reazione
con concentrazione nota di
antigene marcato



misura competitiva

Sandwich



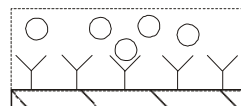
preparazione dell'anticorpo
primario e secondario



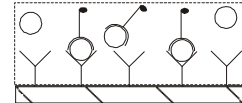
immobilizzazione
dell'anticorpo primario



marcatura dell'anticorpo
secondario



preparazione della cella
con membrana e reazione
anticorpo-antigene

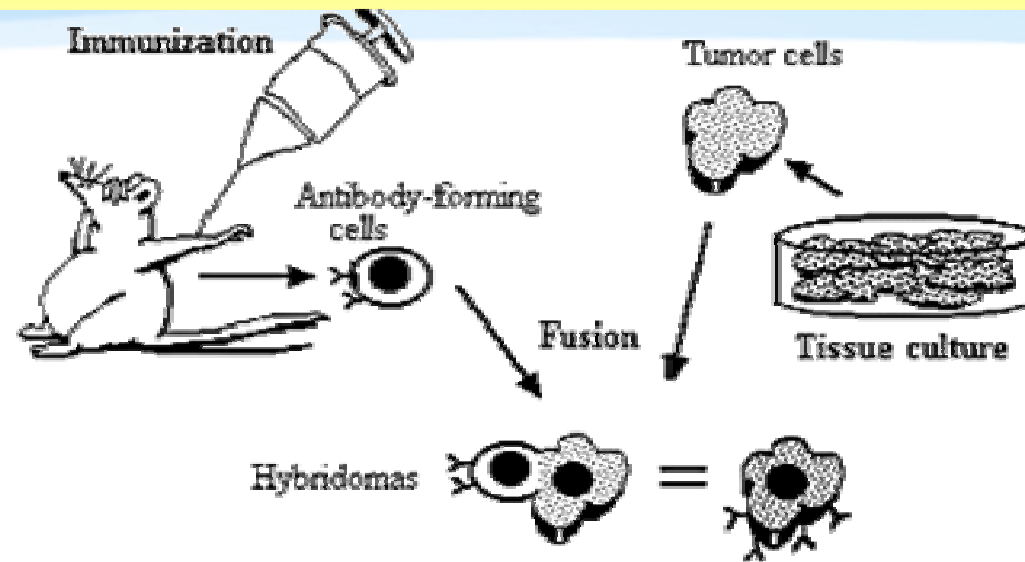


misura con sistema
sandwich

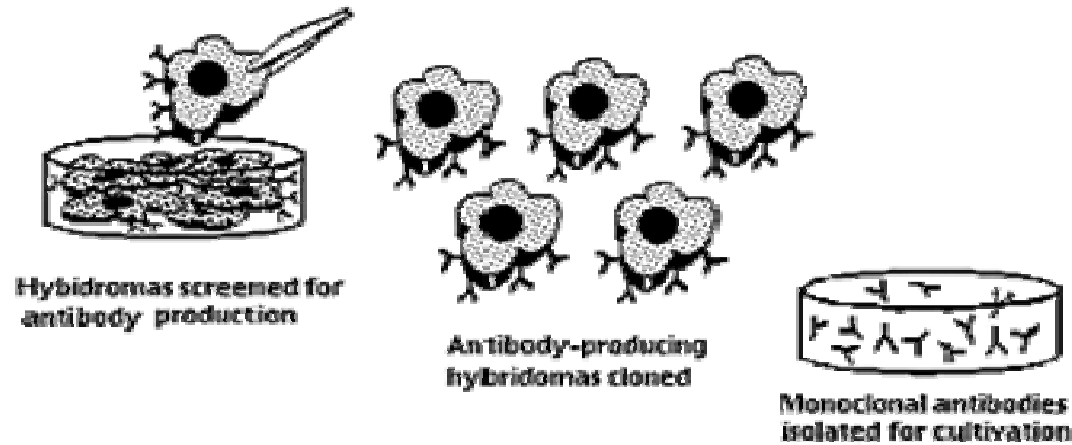
Metodi di trasduzione

- La reazione immunologica può essere rivelata con tecniche ottiche, elettriche, o gravimetriche.
- I sistemi di trasduzione elettrica (potenziometrico, amperometrico e con gli “immuno” FET) sono simili a quelli visti per i sensori enzimatici.
- I metodi più utilizzati sono quelli ottici
 - fluorescenza indotta da un onda evanescente (TIRF)
 - risonanza di plasmoni superficiali (SPR)
 - accoppiatore a reticolo
- Il complesso anticorpo-antigene può essere inoltre rivelato tramite misure di microgravimetria.

Produzione di anticorpi monoclonali



selezione su terreno HAT (Hypoxanthine, Aminopterin, Timidine)



Immunosensori ottici

Gli immunosensori ottici utilizzano una guida d'onda, che viene a contatto con la soluzione contenente l'antigene da analizzare. La parte sensibile di tali dispositivi è costituita dalla superficie su cui è immobilizzato l'anticorpo. La formazione del composto antigene-anticorpo provoca una variazione nei parametri ottici che caratterizzano il film proteico, tra cui l'indice di rifrazione complesso e lo spessore dello strato. Generalmente viene analizzata la luce riflessa dalla superficie sensibile e da tale misura si risale alla variazione delle costanti ottiche.

Immunosensore TIRF

▪ Riflessione interna

- Si genera tra due mezzi trasparenti aventi indice di rifrazione diverso
- Immunosensori TIRF
 - riflessione interna totale
 - Avviene all'interfaccia tra un mezzo più denso (indice di rifrazione n_1) e uno meno denso (indice di rifrazione n_2 , $n_1 > n_2$) quando l'onda incide con un angolo maggiore dell'angolo critico θ_c ($\sin(\theta_c) = n_2/n_1$)
 - Analizzando il fenomeno con le equazioni di Maxwell si ottiene nel mezzo meno denso un campo evanescente diretto perpendicolarmente all'interfaccia
 - L'intensità del campo evanescente decade esponenzialmente con la distanza (z) dall'interfaccia stessa

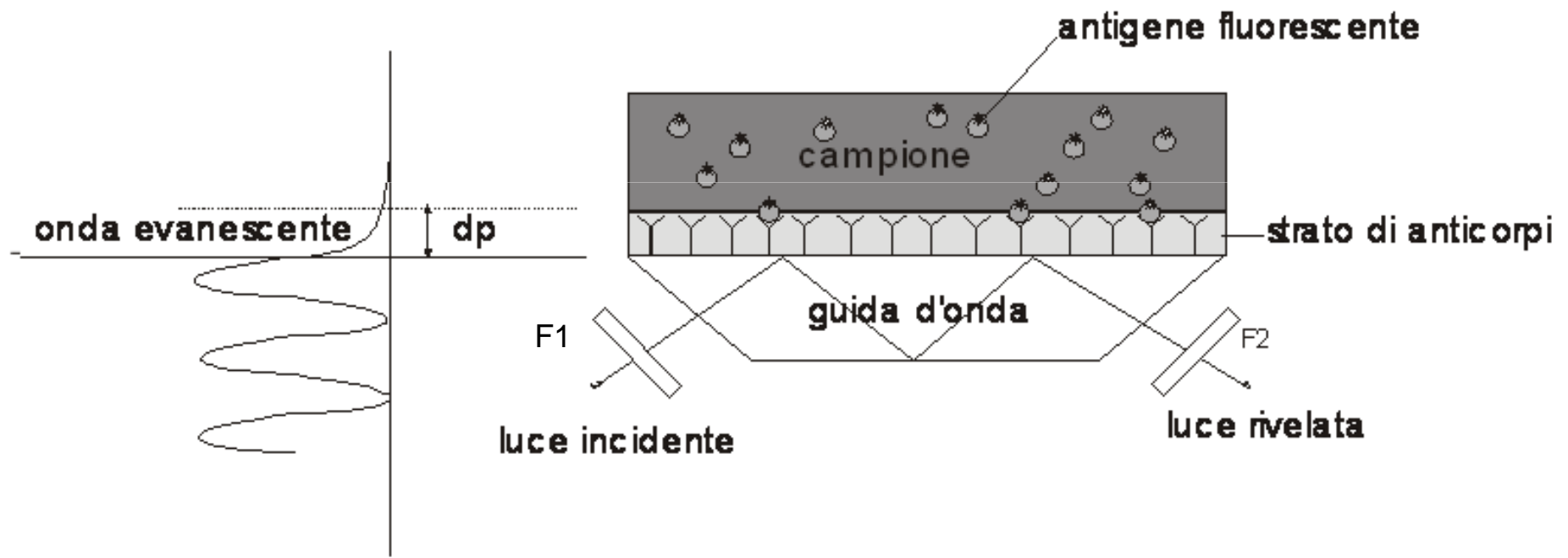
$$E = E_0 e^{-z/d_p} \qquad d_p = \frac{\lambda}{4\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

- d_p è detta profondità di penetrazione (il campo iniziale è attenuato di $1/e$) ed è funzione della lunghezza d'onda λ , degli indici di rifrazione, e dell'angolo di incidenza. La profondità di penetrazione è una frazione della lunghezza d'onda della luce incidente.
- Le caratteristiche dell'onda riflessa sono modulate dalla struttura fisica, nello strato limitato dalla profondità di penetrazione, dell'interfaccia a più basso indice di rifrazione

Immunosensore TIRF

- Guida d'onda sulla quale sono immobilizzati gli anticorpi
 - Le guide d'onda rappresentano l'elemento di riflessione interna in cui la luce incide ad un angolo superiore all'angolo critico in modo tale da avere riflessioni interne multiple
 - La reazione antigene- anticorpo avviene all'interfaccia anticorpo soluzione e il composto che si forma ha uno spessore notevolmente inferiore rispetto alla luce incidente
 - L'onda evanescente penetra nel mezzo meno denso per frazioni della lunghezza d'onda
 - Le ragioni antigene anticorpo vengono rilevate tramite parametri significativi del raggio riflesso
 - L'onda evanescente interagisce con le molecole fluorescenti, in questo modo l'onda riflessa contiene una lunghezza d'onda tipica della fluorescenza.
 - Il limite maggiore dei dispositivi a fluorescenza è la necessità di avere molecole fluorescenti e elevato segnale di sottofondo dovuto alle molecole fluorescenti presenti nel volume dove penetra l'onda evanescente.
 - Utilizzando un sistema con guide d'onda a doppio canale (uno di riferimento) per sottrarre il sottofondo, e con l'aiuto dei indicatori fluorescenti molto efficaci, è possibile rivelare concentrazioni addirittura femtomolari.

Immunosensore TIRF. I filtri F1 e F2 sono rispettivamente filtro passabanda per luce di eccitazione e filtro passabanda per luce fluorescente

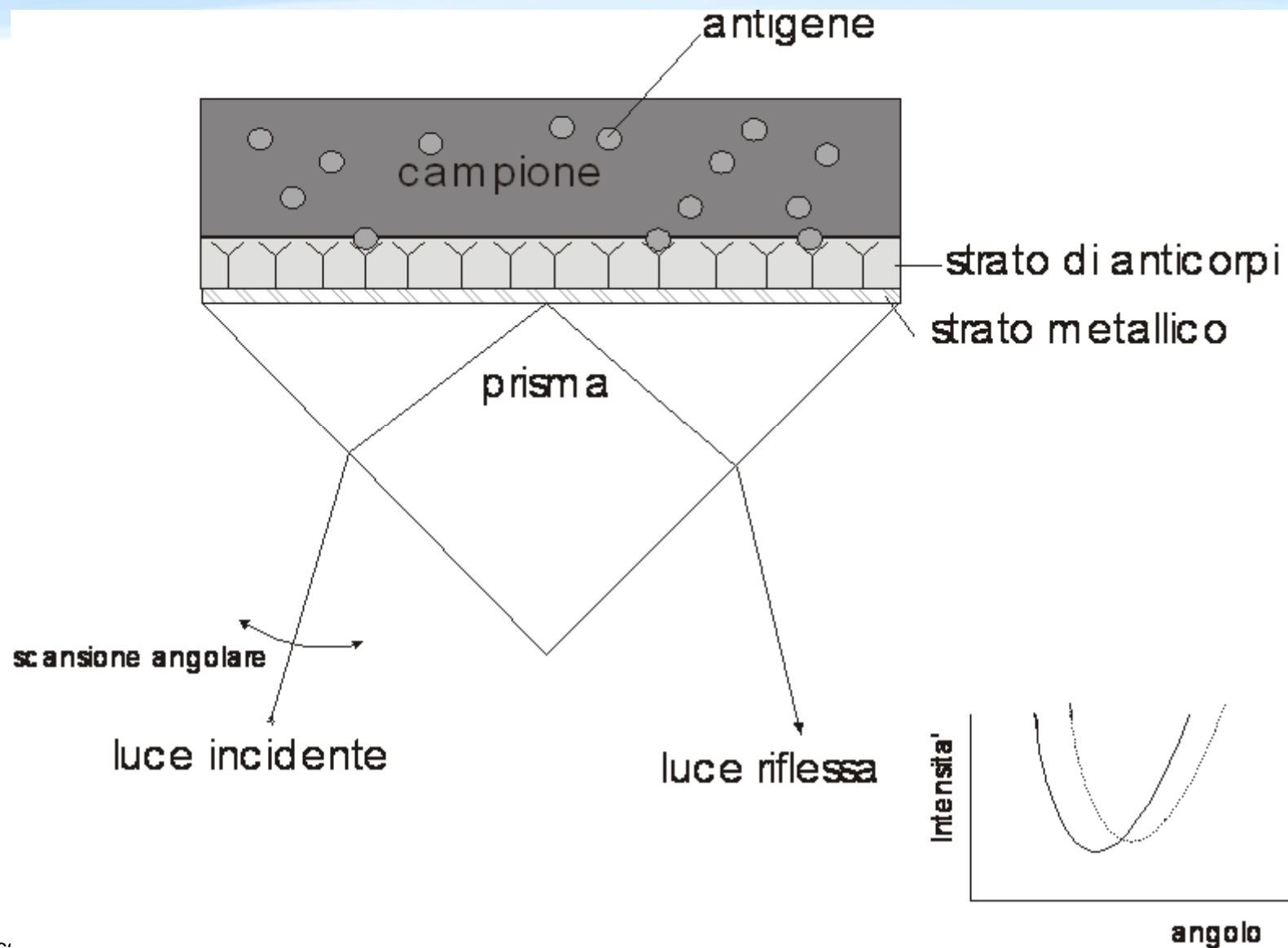


Immunosensore Competitivo

Immunosensore a risonanza plasmoni superficiali (SPR)

- I plasmoni rappresentano i quanti delle oscillazioni delle cariche superficiali, che si accoppiano con i campi elettromagnetici ad alta frequenza presenti nello spazio.
- I plasmoni superficiali sono presenti sulla superficie di un solido i cui elettroni si comportano come un gas di elettroni quasi-liberi. L'eccitazione ottica dei plasmoni superficiali è causata da onde evanescenti ed avviene se una luce incidente viene riflessa da un substrato dielettrico ricoperto con uno strato sottile di metallo.
- Generalmente si adopera una configurazione che consta di un prisma di vetro su cui è depositato uno strato metallico. Su tale strato vengono immobilizzati gli anticorpi ed il dispositivo viene messo a contatto con la soluzione da analizzare.

Sensore SPR (Risonanza di Plasmoni Superficiali)



Immunosensore a risonanza plasmoni superficiali (SPR)

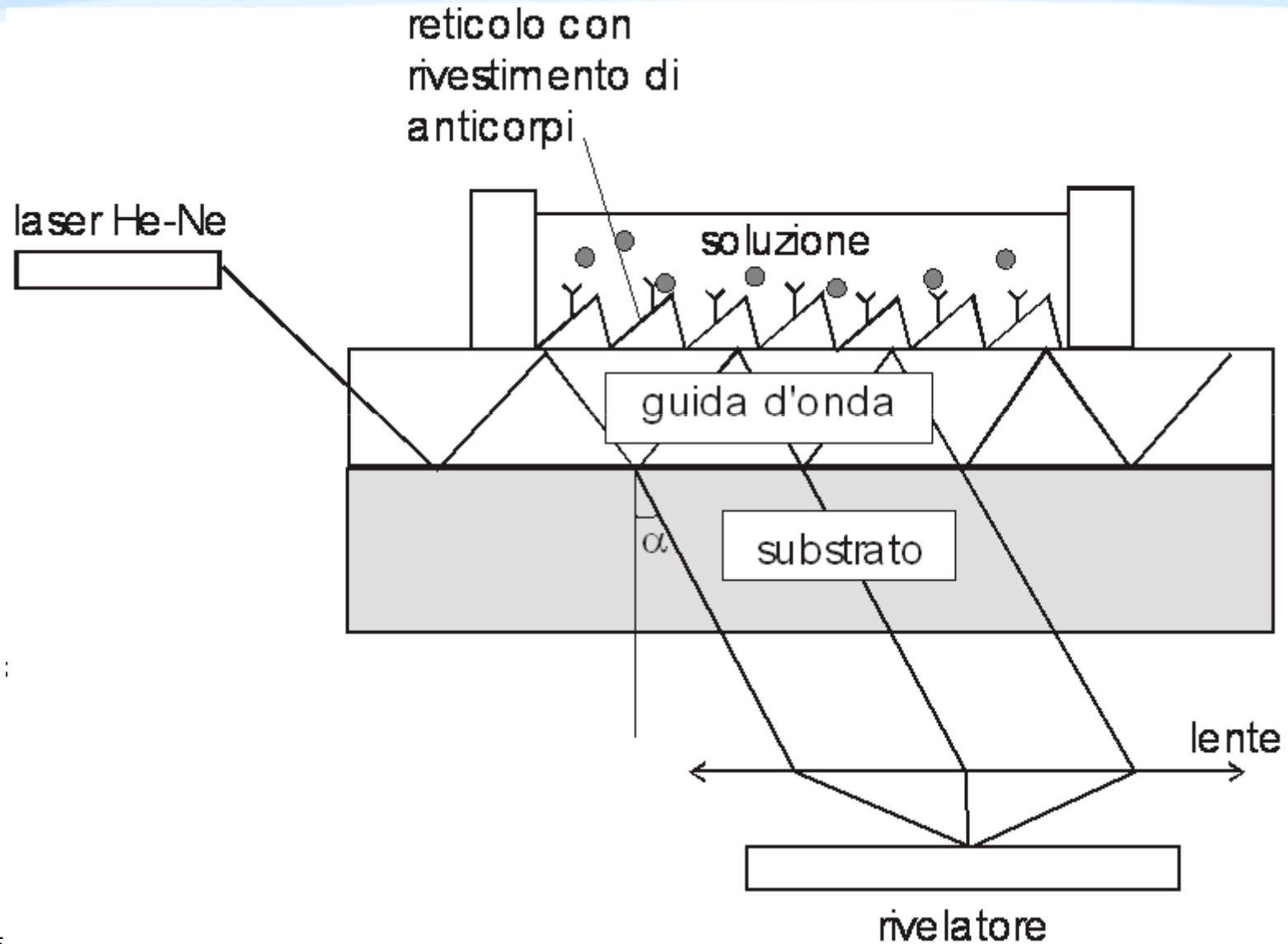
- Se la luce incidente è polarizzata e l'angolo di incidenza permette un accoppiamento tra il momento dei fotoni in superficie e quello dei plasmoni, si ha la risonanza plasmonica superficiale.
- La grandezza fisica che può essere rivelata è la riflettanza in funzione dell'angolo di incidenza.
 - La risonanza si manifesta come una brusca caduta dell'intensità luminosa riflessa.
 - Dapprima si studia il sistema in assenza del campione da analizzare. Con tale configurazione la posizione e la profondità del picco dipendono dalle caratteristiche ottiche del metallo.
 - Introducendo il campione da analizzare vengono alterate le condizioni di risonanza. La posizione angolare del minimo e la sua larghezza sono altamente sensibili alle variazioni dell'indice di rifrazione e dello spessore di uno strato sottile depositato sul metallo.
 - Tale proprietà ha consentito una vasta applicazione dei dispositivi SPR in campo biomedico ed ambientale.
 - Lo svantaggio principale di questa tecnica è che la sensibilità dipende dal peso molecolare dell'antigene, e quindi basse concentrazioni di molecole molto piccole non sono facilmente rivelabili.

Immunosensore “grating coupler”

- Sempre utilizzando il fenomeno dell'onda evanescente, l'accoppiatore a reticolo o il “grating coupler” sfrutta la sensibilità dei modi di propagazione guidata in film sottili a cambiamenti all'interfaccia tra una guida d'onda e una soluzione. Come schematizzato in figura, una luce incidente viene accoppiata in una guida sottile circa 150 nm, di solito di ossido di titanio, tramite un reticolo ottico. L'angolo a cui viene accoppiata dipende dalle condizioni superficiali, e lo shift dell'angolo viene rivelato tramite un fotodiodo montato sopra una tavola rotante. Come prestazioni, il sistema a “grating coupler” è molto simile a quello SPR, con il vantaggio che l'intera cella può essere costruita con la tecnologia del silicio, ed è quindi più economico. Un dispositivo per il monitoraggio di reazioni ad affinità è disponibile commercialmente (Artificial Sensing Instruments, Svizzera), e ha una sensibilità del ordine di qualche nanomolare.

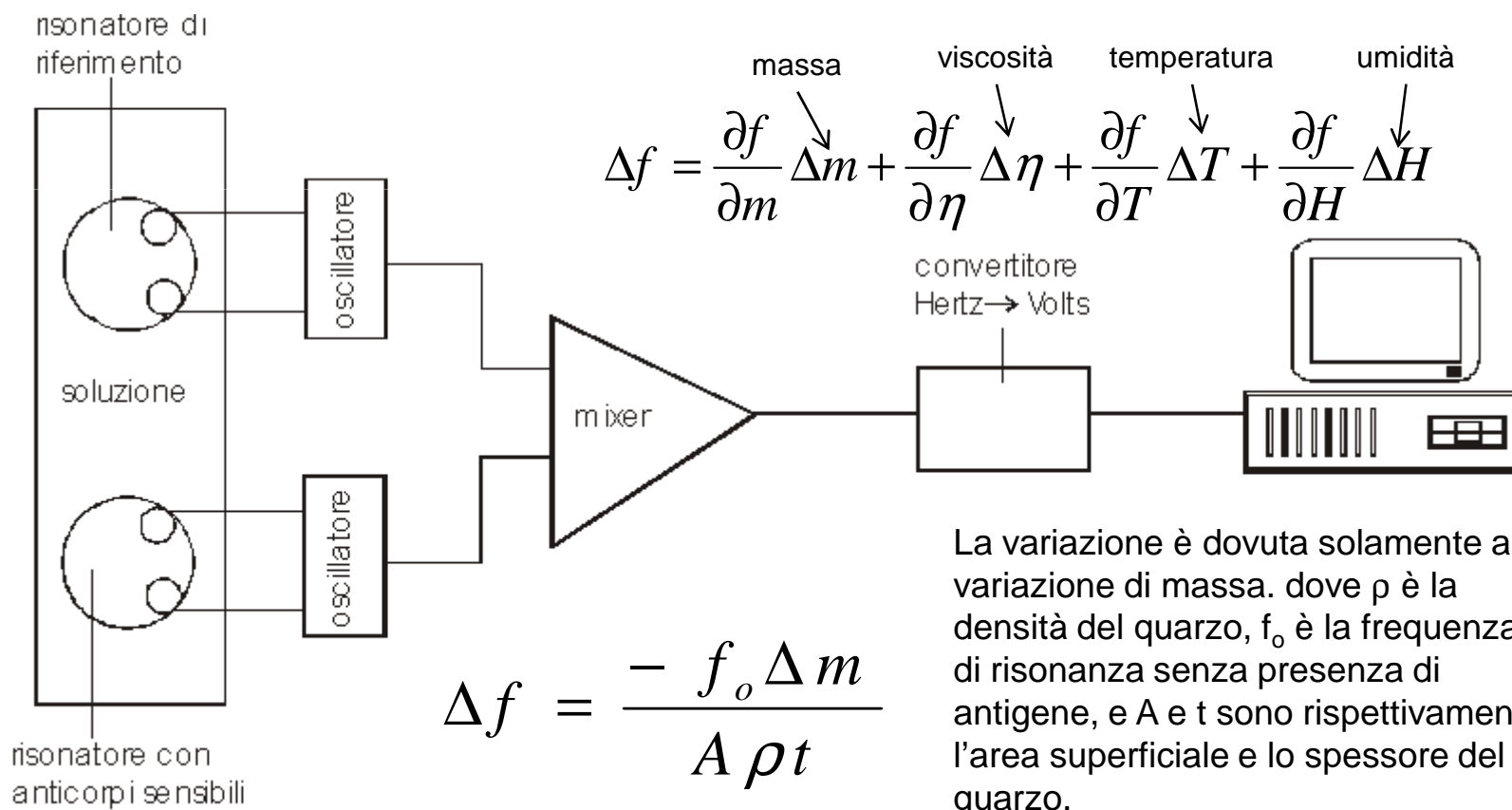
Immunosensore a “grating coupler”

L'accoppiatore a reticolo

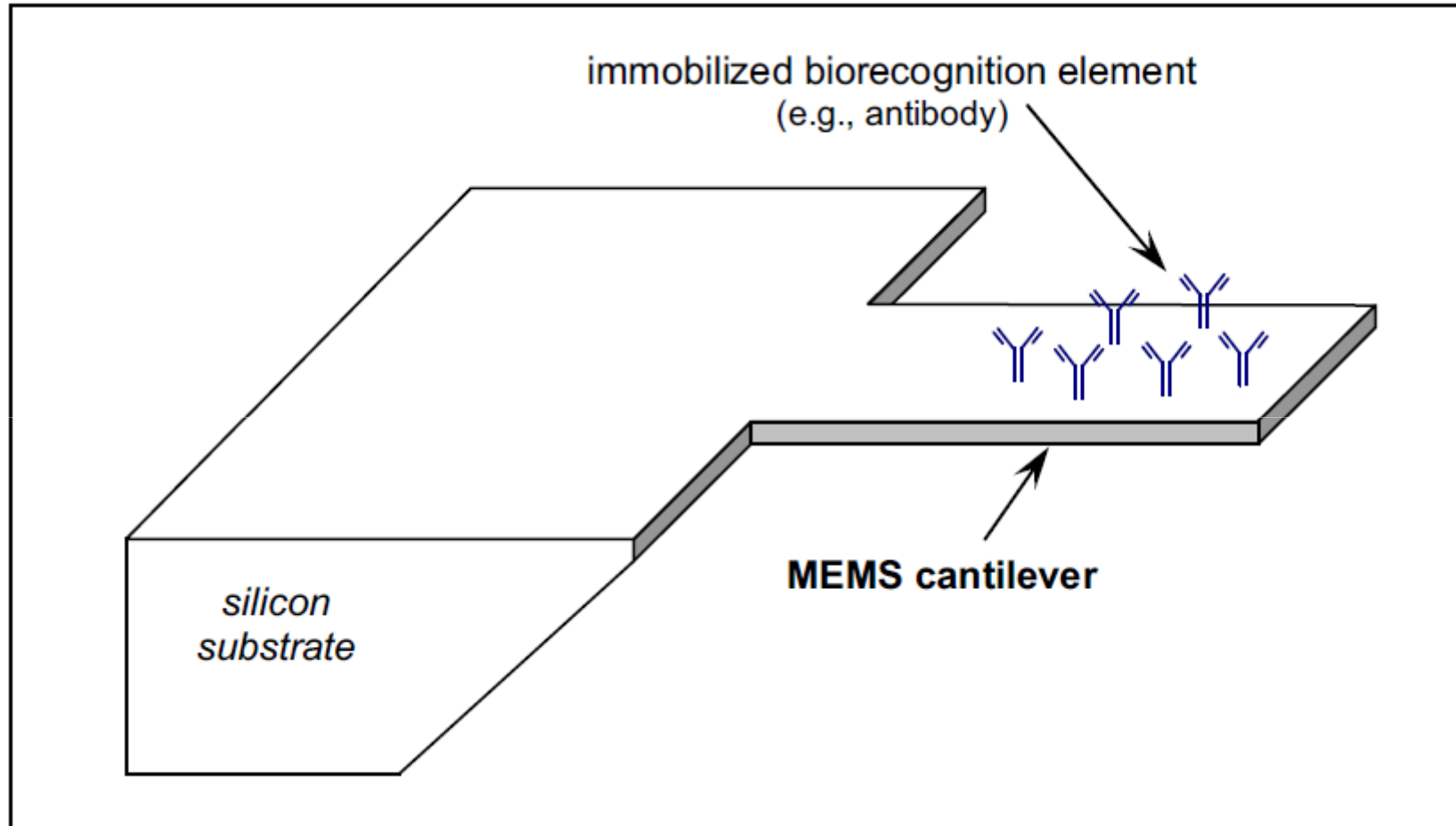


Immunosensore a quarzo risonante

- Metodo gravimetrico basato su cristalli di quarzo
- Il principio di funzionamento è basato sul cambiamento di frequenza di risonanza di un cristallo di quarzo con variazione di peso, viscosità o densità del fluido a contatto con esse. Il cristallo di quarzo viene inserito in un circuito oscillante e la frequenza di risonanza del sistema rispetto ad un quarzo di riferimento viene rivelata con un frequenzimetro.



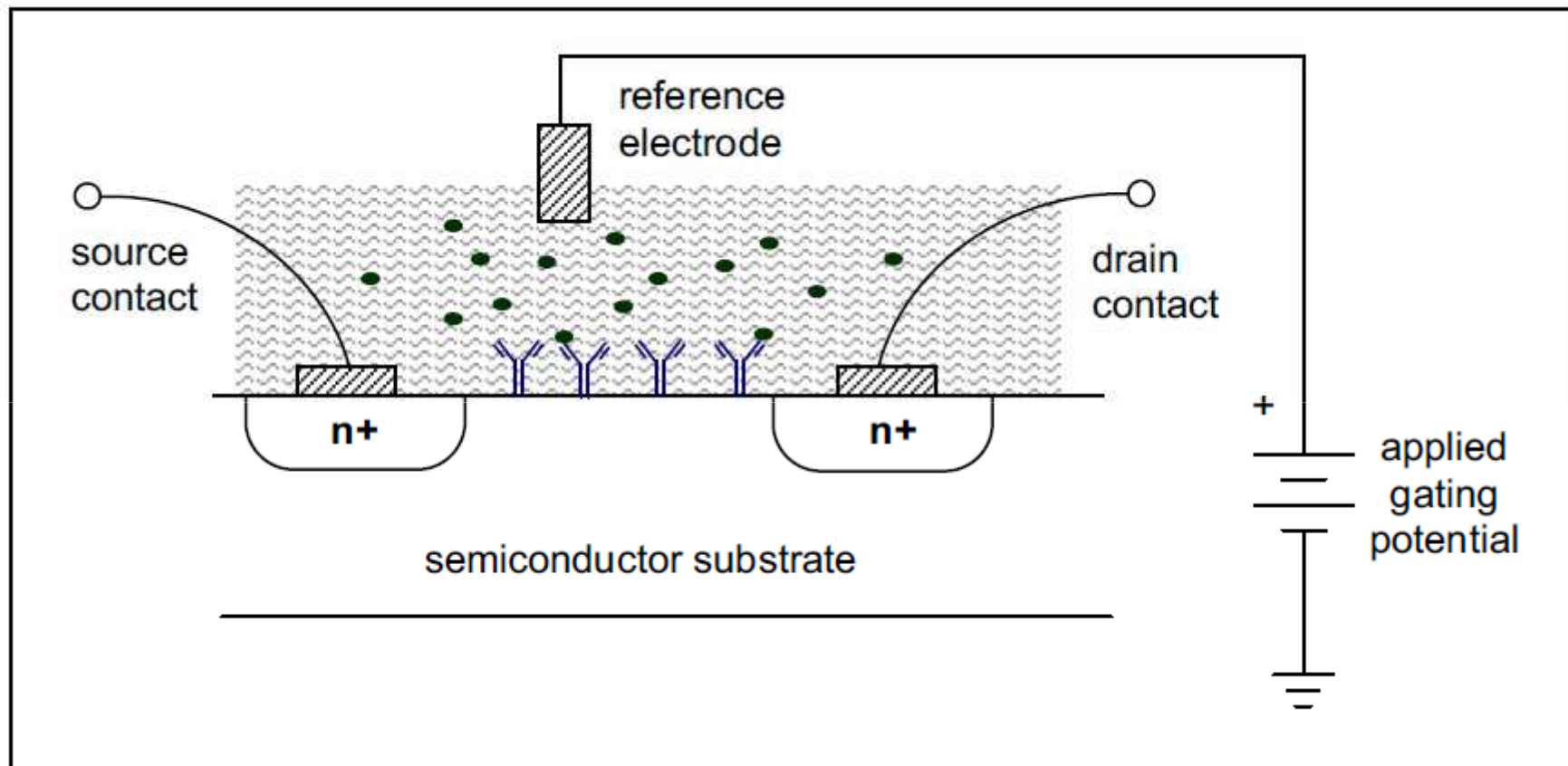
Immunosensori gravimetrici MEMS



Immunosensori elettrochimici

- Gli immunosensori elettrochimici possono essere potenziometrici, amperometrico, a semiconduttore o conduttimetrici.
- Gli immunosensori amperometrici sono molto complessi e coinvolgono enzimi e reazioni redox a cascata a seguito della reazione immunologica. In alternativa sono stati sviluppati metodi competitivi tra antigeni marcati con mediatori e l'analita. Nei sistemi potenziometrici viene rivelato il potenziale di una membrana ionoselettiva. La reazione antigene anticorpo è in grado di modulare tale potenziale ma non in maniera specifica, e quindi la misura deve essere eseguita dopo aver eliminato ioni interferenti. Sistemi potenziometrici sono stati sviluppati per analisi dell'ormone hGC (corionico gonadotropina umana) e per l'anticorpo di Wasserman (un indicatore della sifilide), con sensibilità di circa 10 nanomolare.
- I sistemi FET per il monitoraggio della reazione fra antigene e anticorpo consistono in uno strato di anticorpi immobilizzati sopra lo strato di Si_3N_4 di un ISFET. In pratica la reazione immunologica deve dar luogo ad una modulazione della carica superficiale della membrana sensibile, con un conseguente cambiamento delle cariche nella zona d'inversione.
- Infine, la reazione immunologica può essere rivelata misurando la variazione di resistenza di un substrato conduttivo su cui sono stati immobilizzati anticorpi. Nei sensori conduttimetrici, solitamente basati su polimeri conduttori, la presenza di un antigene che abbia una carica può cambiare la conducibilità del sistema. Le misure devono essere eseguite applicando correnti alternate per evitare processi faradaici e l'elaborazione dei segnali d'uscita viene effettuata tramite l'analisi delle impedenze del sistema.
- Ulteriori sviluppi richiedono comunque qualche sistema per poter identificare, dal punto di vista elettrico, in maniera specifica, la reazione tra un anticorpo (Ab) e il suo antigene (Ag).

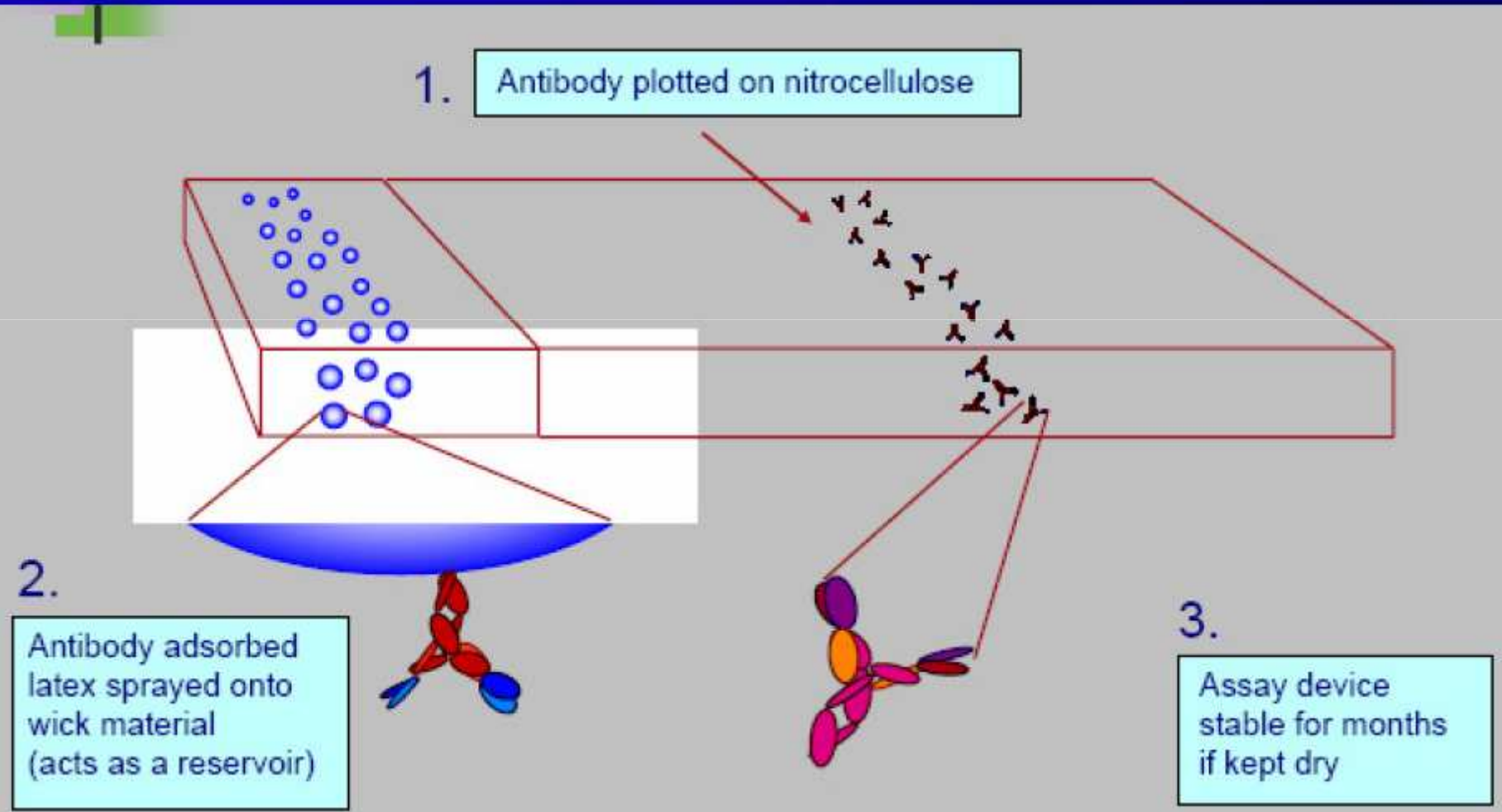
Immunosensore elettrochimico su FET



Test di gravidanza



Prima del test



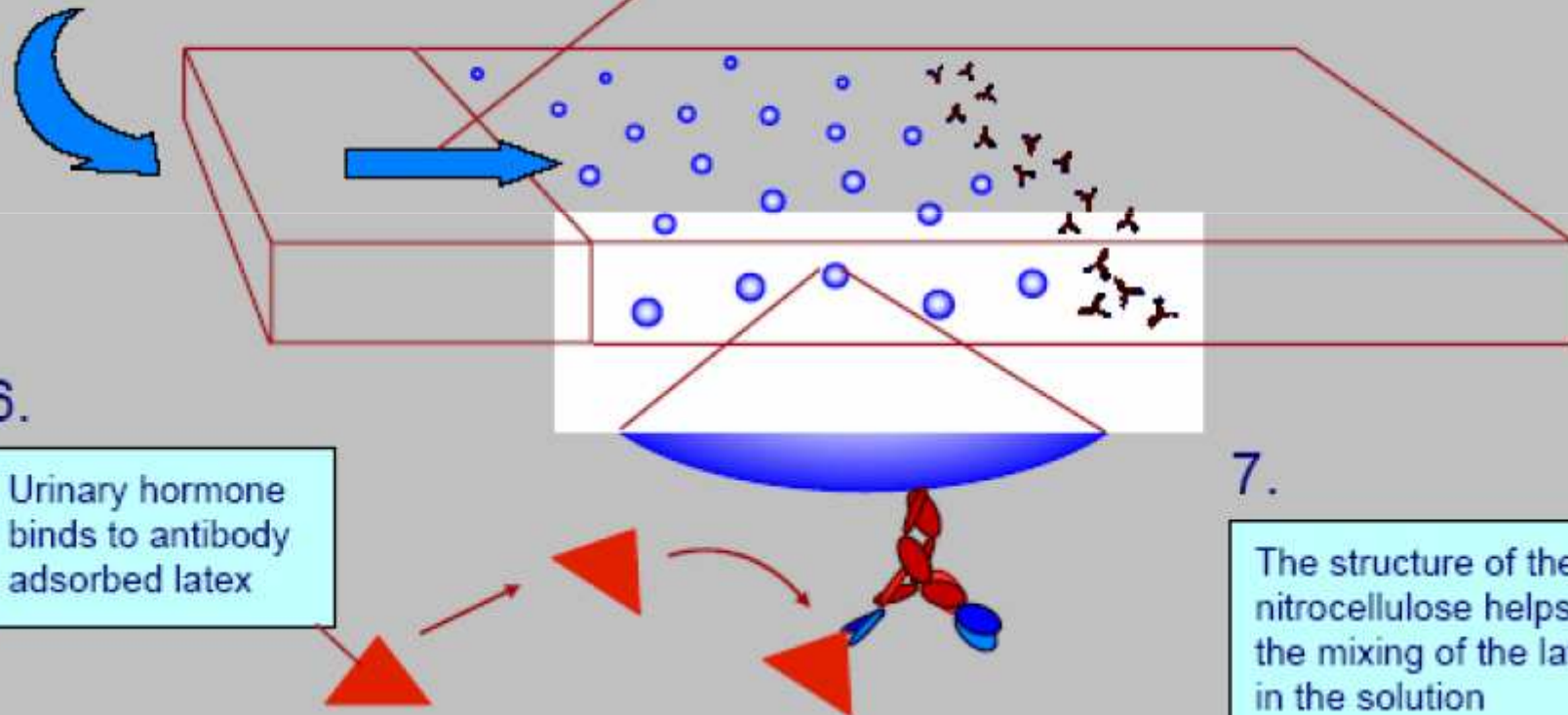
Test

4. Urine sample added containing hormone

5. Latex resuspended from wick and carried in solution into and through the nitrocellulose

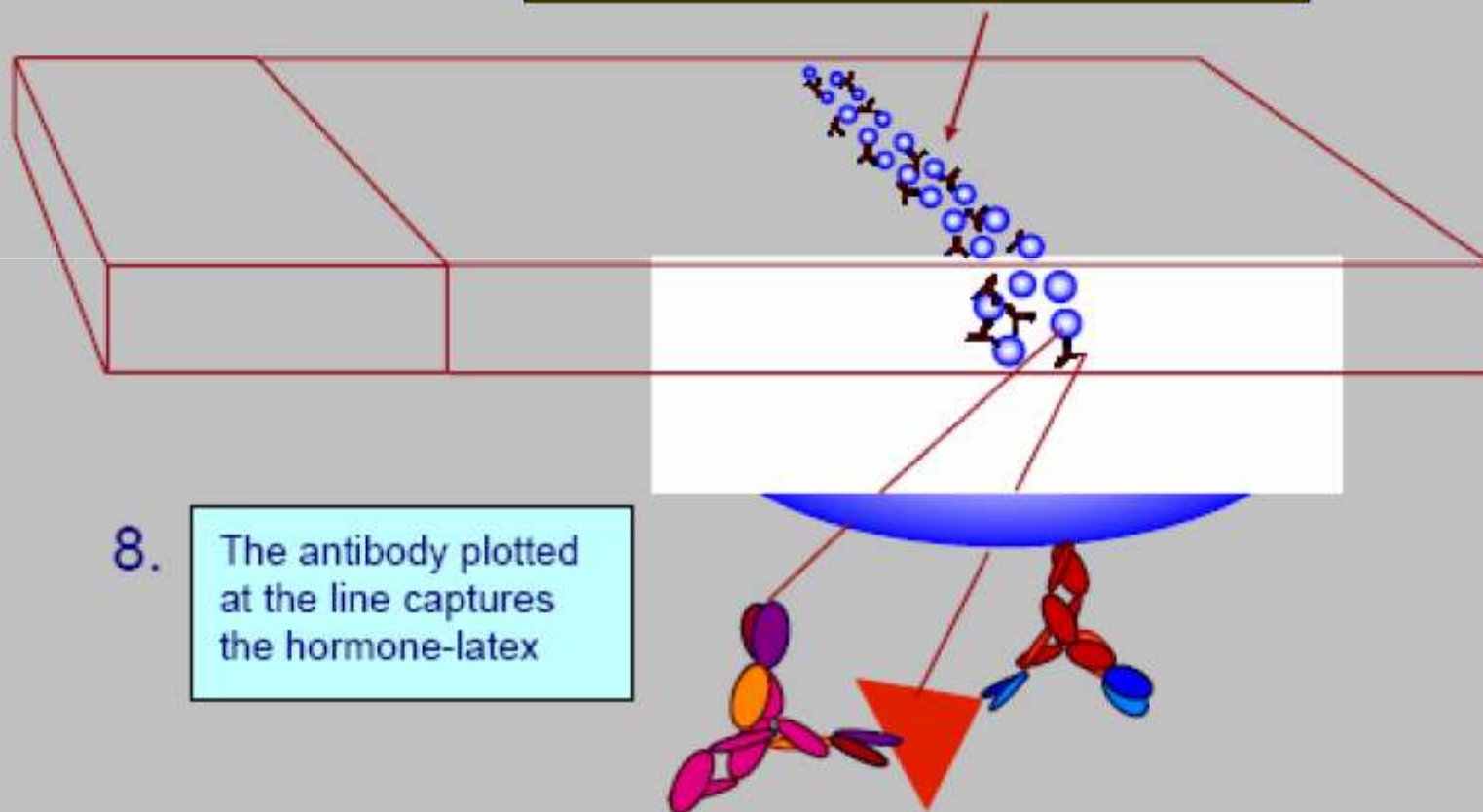
6. Urinary hormone binds to antibody adsorbed latex

7. The structure of the nitrocellulose helps the mixing of the latex in the solution

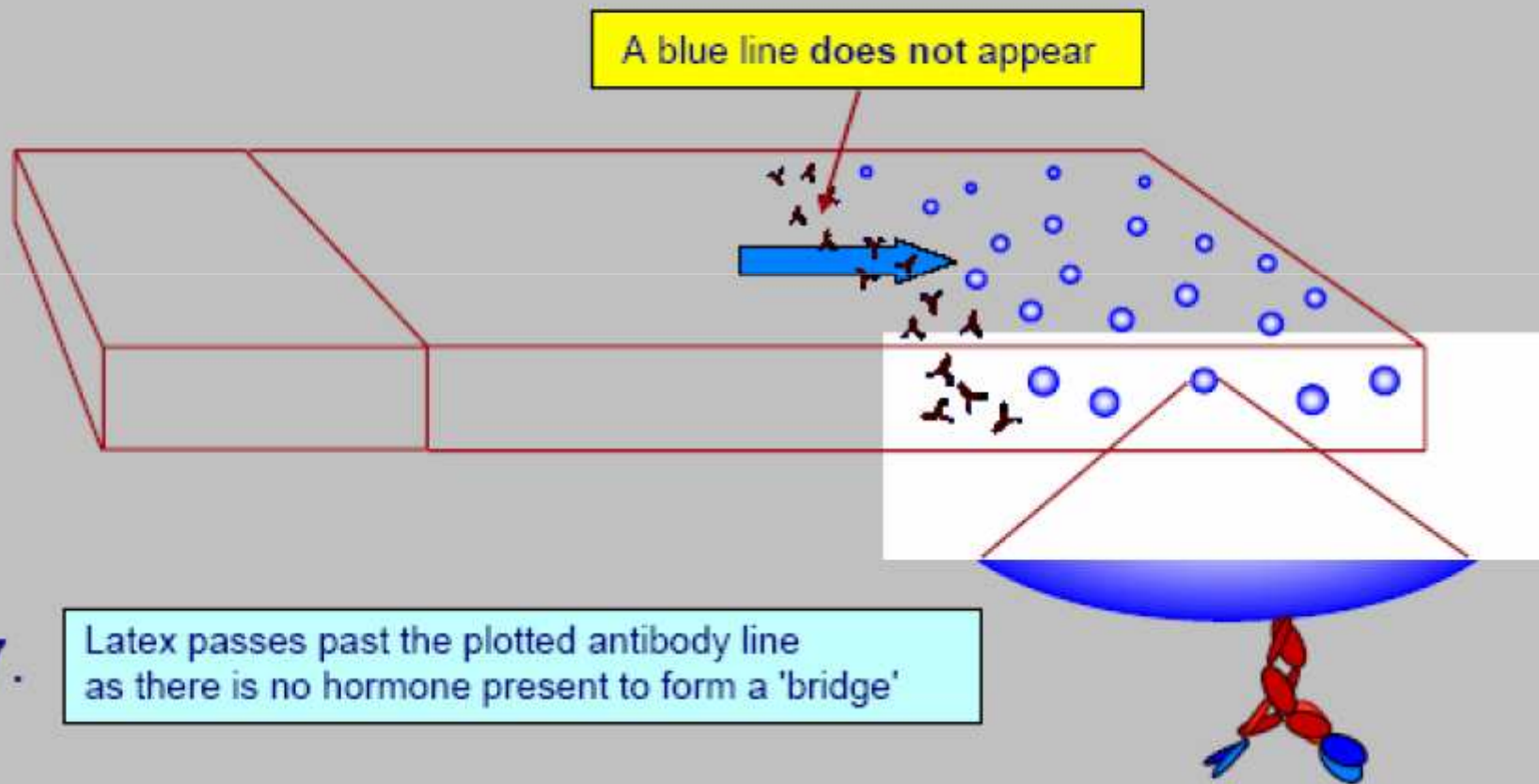


Test positivo

Formation of blue line due to hormone



Test negativo



Biosensori a DNA e RNA

- La specie selettiva è rappresentata da tratti di DNA o RNA
- La ricerca per la cura di malattie genetiche ha subito una grande rivoluzione con lo sviluppo di nuove tecniche di biologia molecolare come il PCR (la reazione a catena di polimerasi che permette la replicazione di una determinata sequenza di DNA) ed il sequenziamento di DNA.
- Ad esempio, se le mutazioni genetiche che causano una malattia sono conosciute, è possibile diagnosticare un portatore della malattia tramite sonde di oligonucleotide con una sequenza complementare alla sequenza difettosa.
- Inoltre, i sensori a DNA (o RNA, i due sono molto simili) possono essere utilizzati per la rivelazione di virus e cellule tumorali.
- I biosensori a sonda genica che usano l'ibridazione di acidi nucleici sono un'alternativa agli immunosensori per l'identificazione e l'analisi quantitative di materiali biologici.
- I metodi di trasduzione sono analoghi a quelli utilizzati per la rivelazione della reazione immunologica.

Biosensori a DNA e RNA

- **I sensori di DNA sono basati sulla capacità di catene singole di DNA o RNA di ibridizzarsi con catene che hanno una sequenza complementare.**
- È ben noto che l'accoppiamento di catene singole di DNA, che avviene con la formazione di legami idrogeno tra basi complementari (A-T e G-C per DNA e A-U e G-C per RNA) è altamente specifico.
- **I dispositivi richiedono che vengano immobilizzate delle catene singole di DNA (chiamate sonde) che possono ibridizzarsi con una catena complementare (il “target”) nella soluzione di campionamento**
- . La specificità di questi sensori dipende innanzitutto dalla selettività della sonda, che dovrebbe rispondere unicamente ad un target, anche nella presenza di catene molto simili. Utilizzando reazioni a catena di polimerasi (PCR) per replicare un singolo campione di DNA, si possono ottenere sensibilità elevate.

Il sequenziamento del DNA è un processo che serve a mettere in fila le basi (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) che costituiscono il frammento di DNA in analisi, in modo da poterlo leggere propriamente ed analizzare. La sequenza del DNA contiene tutte le informazioni genetiche ereditarie che sono alla base per lo sviluppo di tutti gli organismi viventi.

Biosensori a DNA e RNA

- A differenza degli immunosensori, i sensori a DNA non hanno problemi di rigenerazione perchè l'ibridizzazione di DNA è reversibile con temperatura.
- Tipicamente la denaturazione avviene intorno a 80°C. Infatti, la specificità delle sonde geniche può essere controllata modulando la temperatura della reazione. A temperature elevate, solo sequenze specificamente ibridizzate con un accoppiamento perfetto di basi rimangono appaiate, mentre le catene con interazioni più deboli tendono a denaturarsi prima.
- Inoltre i problemi di immobilizzazione non sono critici come nel caso delle proteine dato che il riconoscimento di una catena complementare di DNA di media/bassa lunghezza non dipende in maniera critica dalla conformazione e orientazione della molecola.
- Tutto ciò fa sì che i biosensori di DNA siano fra i più interessanti nell'ambiente della ricerca medica sia per quanto riguarda la moltitudine di possibili applicazioni, sia per la relativa facilità di manipolazione del DNA.
- Inoltre i sensori di DNA, essendo utilizzati soprattutto per l'identificazione di malattie genetiche, non hanno le esigenze di altri tipi di biosensori, ad esempio veloci tempi di risposta, uso in-vivo ecc.

Sensori di DNA Classici

- Fino ad 10 anni fa, i sensori di DNA erano molto simili agli immunosensori, in quanto veniva immobilizzato un solo tipo di DNA su una superficie solida e veniva misurata la sua interazione con una soluzione contenente la sequenza complementare da identificare.
- E' ovvio che in un sistema di questo genere **bisogna conoscere sia la sequenza di DNA in questione che il suo significato** (ad esempio per quale proteina codifica, o in quale malattia genetica viene mutata). In altre parole, la sequenza e il suo ruolo devono essere già identificati. Quindi sensori per una singola sequenza di DNA avevano poca potenzialità, tranne per indagini mirate, e con un'alta precisione quantitativa.
- I sensori di DNA comprendevano un trasduttore ed una membrana o superficie solida con immobilizzato DNA avente una specifica sequenza nucleotidica. L'ibridizzazione del DNA-sonda con il DNA da analizzare portava ad un cambiamento di massa, di carica elettrica o di proprietà ottiche della membrana che era rilevata da trasduttori gravimetrici, elettrici od ottici. Tuttavia, questi primi tipi di sensore non hanno avuto gran successo, soprattutto perché non offrivano particolari vantaggi in termini di tempi o facilità di uso.

Biochip

- Gli sviluppi più recenti nascono dalla scoperta di metodi di sequenziamento molto rapidi (da qui il famoso sequenziamento del genoma umano). Con la rivelazione del codice genetico, la necessità di poter analizzare un gran numero di sequenze in maniera rapida, ma non necessariamente quantitativa è stata evidenziata. E' questa necessità che ha indirizzato verso lo sviluppo accelerato di sistemi basati sulle matrici di poli- o oligo- nucleotidi per la rivelazione di DNA a catena singola.
- La matrice che forma il sensore di DNA è una superficie solida su cui vengono immobilizzate delle catene singole di sonde di DNA o oligonucleotidi (DNA con un numero di basi inferiore a 20) in punti discreti e in maniera ordinata. Quindi ogni punto possiede una sonda con una sequenza diversa. Il sistema, che spesso viene nominato biochip o gene-chip, forma il cuore di un sistema in grado di legarsi con un gran numero di campioni di DNA. Possiede inoltre un sistema automatizzato di lettura e elaborazione per confrontare diversi campioni di DNA o RNA.

Biochip

- preparazione della sonda.
 - Esistono due approcci generali, uno che fa utilizzo di catene di DNA corte (da 20 a 25 basi), chiamate oligonucleotidi, che è possibile sintetizzare. L'altro metodo fa uso di pezzi di DNA (500-5000 basi) isolati da un organismo e tagliati con l'aiuto di enzimi.
- Immobilizzazione della sonda.
 - Le catene di DNA vengono immobilizzate in siti specifici su una superficie, di solito un vetrino, usando sistemi automatizzati. Tipicamente i punti di DNA hanno un diametro di 50 –100 μm e la distanza tra due punti adiacenti e' circa 100 μm . La Figura illustra una tecnica innovativa di immobilizzazione, basata sulla sintesi combinatoriale di oligonucleotidi in situ.
- Preparazione e marcatura del target.
 - Il DNA/RNA target viene isolato dalle cellule, tagliato in segmenti piccoli e marcato, di solito con un fluoroforo. Il RNA messaggero è di particolare interesse, in quanto codifica per le proteine che vengono espresse dalla cellula in un dato momento. L'RNA è molto vulnerabile a degradazione enzimatica, e di solito viene trascritto inversamente in DNA complementare (cDNA) attraverso l'uso di enzimi specifici prima di essere sottoposto al saggio. La misura è sempre una di confronto, quindi è necessario preparare un target di riferimento con una molecola fluorescente che abbia uno spettro di emissione ben separato dal marcatore del DNA di interesse. In genere vengono utilizzati fluorescina, che emette nel verde, e rodamina, che emette nel rosso.

Biochip

- Ibridizzazione.

- I due campioni vengono mescolati ed esposti alla matrice di sonde. La temperatura, precedentemente mantenuta elevata per evitare l'ibridizzazione in soluzione, viene abbassata per permettere l'ibridizzazione tra i target e le sonde. Se il target ha una sequenza complementare al DNA a una sonda immobilizzato in un determinato punto, ibridizzerà in quel punto, e quindi, dopo il lavaggio per rimuovere il DNA legato aspecificamente, potrà essere rilevato con metodi ottici.

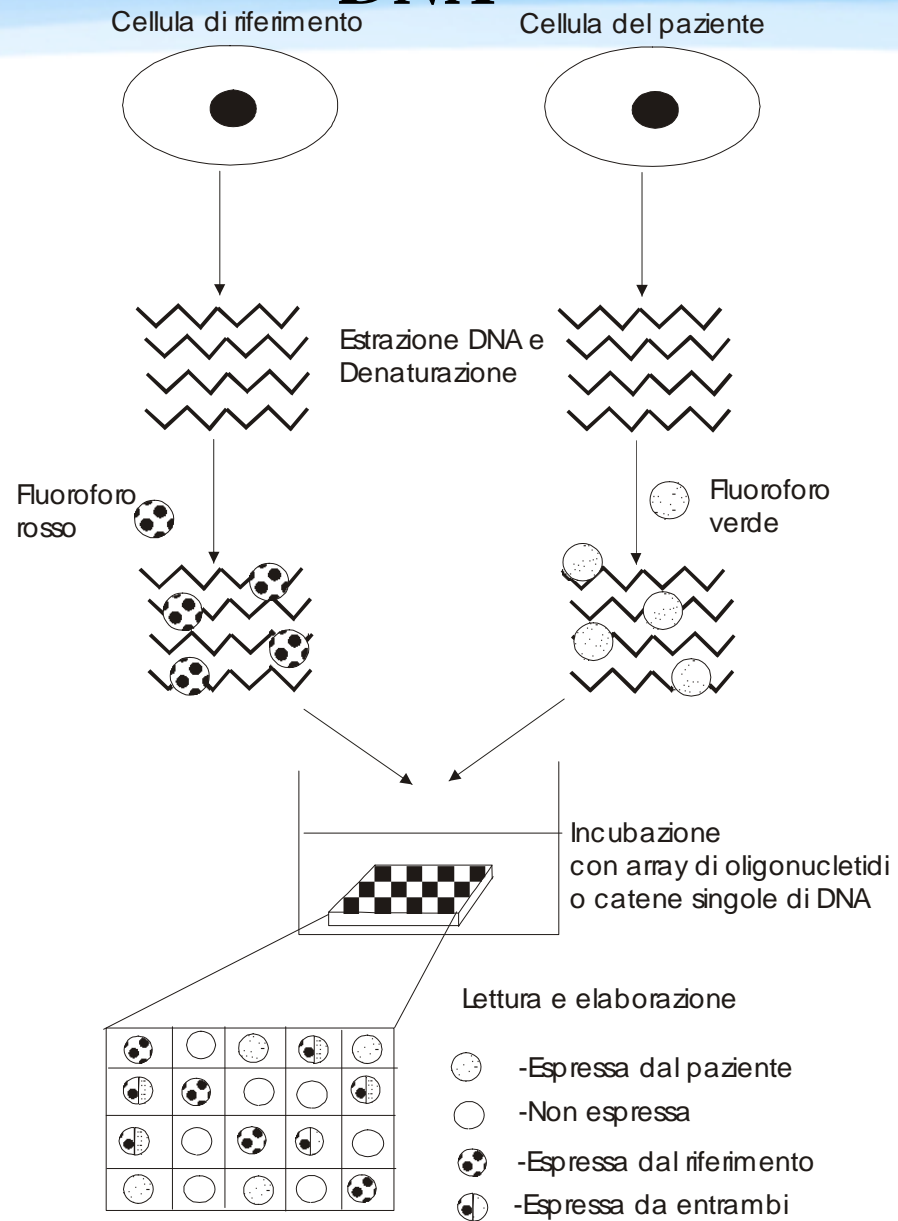
- Lettura della matrice

- Il prodotto finale del esperimento è una matrice con punti colorati. Nell'esempio riportato in figura, con un flouorforo rosso, e uno verde, ci saranno dei punti rossi, verdi, gialli o neri con determinate coordinate a secondo delle sequenze presenti nella soluzione. Il segnale ottico dal chip di DNA viene rivelato da un array di CCD o anche una semplice telecamera, a secondo della grandezza dei punti.

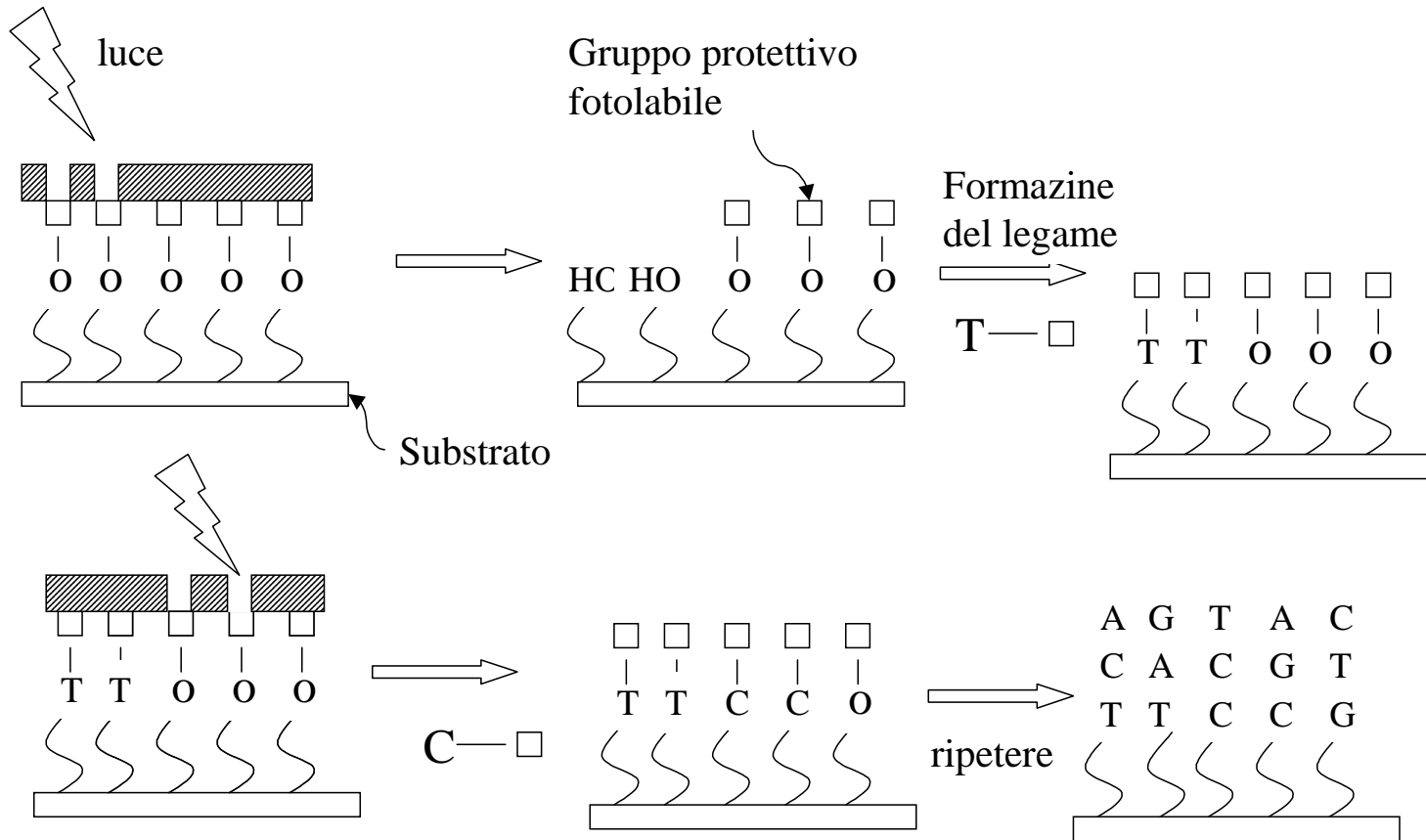
- Elaborazione del segnale

- Come schematizzato in figura, le sonde della matrice possono ibridizzarsi con segmenti di DNA che provengono dai campioni, o dal riferimento, o da entrambi. Inoltre ci saranno sonde che non ibridizzano perchè la sequenza complementare non è presente nella soluzione. Attraverso dei programmi di elaborazione delle immagini anche abbastanza semplici è possibile identificare l'impronta di una malattia genetica o dell'espressione di una determinata proteina. La più grande sfida nel futuro è comunque quella di costruire un database di librerie di DNA, ognuno caratteristico di una data malattia o risposta cellulare.

Sistema a sonda multipla per la rivelazione di catene di DNA



Tecnica di sintesi combinatoriale di oligonucleotidi con gruppi protettivi fotolabili utilizzato dalla ditta Affymetrix.



Biochip - problemi

- L'intera operazione è molto delicata e laboriosa e richiede numerosi passi preparativi (isolamento e amplificazione di DNA, marcatura, ecc). Ovviamente, dato che il RNA è una sostanza intercellulare, e il DNA si trova nel nucleo, non è possibile semplicemente prelevare una goccia di sangue ed esporlo al sensore. Il campione viene solitamente prelevato attraverso una biopsia, e le cellule devono essere soggette a vari trattamenti per isolare il DNA o RNA. RNA è particolarmente sensibile ai trattamenti perché ha una vita media abbastanza bassa ed esistono parecchi enzimi capace di degradarlo. Inoltre, dato che la quantità di DNA o RNA è molto piccola, le fonti di contaminazione sono numerosissime.
- L'interpretazione e gestione dei dati presenta ancora un enorme sfida sia dal punto di vista tecnologico che informatico. Bisogna ricordare che l'organismo umano possiede un patrimonio genetico vastissimo e per catalogare tutta l'informazione contenuta nel genoma di un individuo abbiamo bisogno di almeno 1000 biochip con circa 1000 sonde per ogni chip. In teoria, riducendo le dimensioni di ogni singolo punto a 1 micron, si può analizzare il genoma di un individuo utilizzando solo 30 matrici.
- Per ora la maggior parte dei sensori non è in grado di rivelare mutazioni in punti singoli perché il DNA è sempre in grado di accoppiarsi con una catena complementare leggermente 'sbagliata'. L'abilità di rivelare un mismatch di un solo nucleotide è richiesta ad esempio nella ricerca di predisposizioni genetiche per varie malattie, ad esempio il cancro del seno. Catene perfettamente complementari hanno una temperatura di denaturazione più elevata rispetto a catene con anche una piccola mismatch. Quindi, in principio, modulando la temperatura al momento della rivelazione, è possibile scegliere il grado di complementarità. Data l'importanza di questo tipo di analisi, un gran numero di gruppi di ricerca stanno cercando di spingere questa tecnologia per rivelare singole mutazioni.

Applicazioni

- **Espressione Comparativa**

- Il principio di funzionamento dei biochip è il confronto tra due gruppi di DNA o RNA, ad esempio da due pazienti diversi o da due ceppi cellulari. I risultati di questo saggio forniscono un'indicazione qualitativa delle differenze del contenuto di materiale genetico tra un campione e un riferimento, ad esempio da una persona sana e un paziente con una malattia genetica. E' anche possibile confrontare due tipi di cellule diverse.

- **Diagnostica**

- Per malattie genetiche in cui la mutazione è già stata identificata, i sensori di DNA permettano una diagnosi molto rapida. Possono anche essere utilizzati per diagnosticare malattie in cui vengono espressi certi geni caratteristici.

- **Screening dei Farmaci e Farmacogenica**

- I batteri mutano rapidamente per sviluppare resistenza ai farmaci. Un'analisi del DNA dei batteri esposti a vari antibiotici è un modo molto veloce per identificare farmaci efficaci. Probabilmente una delle applicazioni più interessanti è quella della individualizzazione delle terapie a seconda della risposta in termini di espressione genica nei pazienti.
- Un caso particolarmente importante è quello delle persone afflitte da AIDS. In quasi tutti i casi il virus si sviluppa in maniera diversa da individuo a individuo. Avere un profilo genetico del singolo paziente e la sua risposta genetica a farmaci o tossine può essere di grande utilità per razionalizzare e personalizzare le terapie a malattie di tipo virale o dovute ad altri agenti patogeni.

MICROORGANISMI E BIOSENSORI TESSUTALI

- sensori basati su microorganismi e su tessuti biologici presentano notevoli vantaggi rispetto ai sensori enzimatici, costituendo un metodo economico e abbastanza stabile nel tempo e possono operare per due-tre settimane, a seconda del tipo per l'analisi di componenti organici. I metodi di trasduzione sono simili a quelli adoperati per sensori enzimatici, e sono basati principalmente su fenomeni elettrochimici.
 - Sistemi basati su microorganismi
 - Biosensori basati su strutture supracellulari

Sistemi basati su microorganismi

- I sensori microbici che sono composti di microorganismi immobilizzati e di un dispositivo elettrochimico e sono adatti per il controllo "on line" di processi biochimici. Si basano sia sull'utilizzo di vie metaboliche diverse a seconda delle condizioni ambientali esterne sia sulla formazione di prodotti metabolici elettroattivi, derivanti da assimilazione di substrati da parte dei microorganismi, monitorabili tramite dispositivi elettrochimici (ad esempio con un elettrodo ad ossigeno) con cui interagiscono. A seconda delle cellule utilizzate, è possibile determinare selettivamente concentrazioni di molte sostanze organiche diverse, su un vasto range di concentrazioni.
- Questo principio di funzionamento ha trovato interesse in applicazioni di monitoraggio ambientale. Inoltre, l'esistenza di reazioni sequenziali è utilizzata per la misura di sostanze inerti, come il metano e l'ammoniaca, ed offre una nuova tecnica di microbioanalisi, ad esempio per le vitamine o per lo screening di mutageni.
- Sono in studio anche metodi alternativi per la determinazione del consumo biologico di ossigeno (BOD), uno dei test più usati per la misura di inquinanti organici, utilizzati batteri luminescenti che accrescono l'intensità di emissione in dipendenza dall'assimilazione di composti organici.
- Le possibilità derivanti da sistemi di questo genere investono molti campi, grazie anche alle accresciute capacità di integrazione derivanti dalle tecniche di microfabbricazione, che consentono di realizzare su un unico chip, ad esempio, un'intera cella di flusso comprendente il rivelatore elettrochimico.

Biosensori basati su strutture supracellulari

- Alcuni materiali tessutali provenienti da piante ed animali sono stati vantaggiosamente impiegati come componenti biocatalitici per la costruzione di biosensori. Questa classe di materiali biocatalitici mantiene l'enzima di interesse nel suo ambiente naturale, in questo modo si ottiene una considerevole stabilizzazione dell'attività enzimatica desiderata. In molti casi, i biosensori basati su tessuti hanno mostrato un tempo di vita maggiore in rapporto ai corrispondenti biosensori basati su enzimi isolati ed una attività specifica sufficientemente alta per la costruzione di particolari biosensori in cui gli enzimi isolati si erano rivelati insoddisfacenti, senza sacrificare la selettività globale.
- Fino ad oggi ne sono stati realizzati diversi, sensibili, ad esempio, all'urea, alla dopamina, alla guanina, ecc.
- Per questo tipo di sensori è importante lo studio del meccanismo di trasporto, dato che il substrato deve essere trasportato attraverso le cellule che alloggiavano l'enzima in oggetto prima di venire in contatto. Fondamentale quindi è lo sviluppo di modelli per descrivere l'interazione fra substrato ed enzima nello strato biocatalizzatore.
- Sensori di questo tipo presentano purtroppo una difficile applicazione in campo biomedico, soprattutto nei casi di sistemi di monitoraggio in-vivo, a causa dei rischi di infezione. D'altra parte, sono invece in largo uso nei sistemi per analisi ambientali.