

1. Su un sensore di quarzo viene immobilizzato un oligonucleotide che è in grado di ibridizzare con dell'RNA messaggero che una proteina mutata, solitamente presente nei pazienti con distrofia muscolare. Questo gene è composto da 10000 basi. Se il peso molecolare medio di un monomero di DNA è 300, quante molecole di RNA ci vogliono nella soluzione per alterare la frequenza dell'oscillatore di 50 Hz?

Una cellula esprime 200 copie di questa RNA. Se una cellula ha le dimensioni  $10 \times 10 \times 2$  micron<sup>3</sup>, quale è il volume minimo di biopsia da prelevare per effettuare questa analisi di RNA? Si consideri di impiegare un quarzo di area sensibile  $38.5 \text{ mm}^2$ , spesso 350 micron, con frequenza risonante 10 MHz e densità circa  $2.65 \text{ g/cm}^3$ .

Risoluzione

$$\Delta f = \frac{-f_o \Delta m}{A \rho t}$$

Stando attenti alla conversione della unità di misura, risulta che  $\Delta m = 1.785 \times 10^{-10} \text{ kg}$ .

Questo corrisponde a  $1.79 \times 10^{10}$  molecole di RNA (dato che il peso molecolare del RNA espresso è 6000000 ( $300 \times 2 \times 10000$ ), e il numero di Avogadro è  $6.02 \times 10^{23}$ ).

Se ogni cellula esprime 200 molecole di DNA, ci vogliono  $8.96 \times 10^7$  cellule, che al minimo occuperanno  $1.79 \times 10^{-8} \text{ m}^3$ , che è il minimo volume di biopsia da prelevare. Infatti, è proprio questo il limite dei sensori di DNA nella diagnostica: la difficoltà nella rivelazione di geni con rate di espressione basso.

2. L'elettrodo ad ossido di antimonio è stato sviluppato per misura del pH in ambienti di tipo biologico, ed è particolarmente impiegato nella realizzazione di microelettrodi per misure a livello cellulare.

Si consideri dunque la reazione:  $\text{Sb}_2\text{O}_3 + 6 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- = 2 \text{Sb} + 3 \text{H}_2\text{O}$ , cosa che accade quando viene immerso in un elettrolita contenente ioni  $\text{H}^+$ .

Scrivere la legge che lega il potenziale di tale elettrodo al pH della soluzione in cui venga inserito.

Risoluzione

In base alla legge di Nernst per la reazione in oggetto si ha:

$$E = E_{(\text{Sb}^{3+}/\text{Sb}^0)_0} + \frac{RT}{6F} \ln ([\text{H}^+]^6) = E_{(\text{Sb}^{3+}/\text{Sb}^0)_0} + 2.303 \frac{RT}{6F} \log ([\text{H}^+]^6) = E_{(\text{Sb}^{3+}/\text{Sb}^0)_0} + 2.303 \frac{RT}{F} \log ([\text{H}^+])$$

da cui

$$E = E_{(\text{Sb}^{3+}/\text{Sb}^0)_0} - 2.303 \frac{RT}{F} \text{pH}$$

Si noti che essendo  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e  $\text{Sb}$  solidi, la loro concentrazione non compare nella equazione, così come non compare quella dell'acqua, essendo in sostanza assunta invariante.

Nota:  $R = 8.31 \text{ [J K}^{-1} \text{ mol]}$ ,  $F = 96485.3415 \text{ [C mol]}$  ( $R/F = 8.6127 \times 10^{-5} \text{ [J K}^{-1} \text{ C}^{-1}] = 8.6127 \times 10^{-5} \text{ [V K}^{-1}]$ ).  $(RT)/F$  vale circa  $0.0256 \text{ V}$  a  $25\text{C}^0$  ovvero  $298 \text{ K}$

### 3. Cinetica Enzimatica

Nell'analisi della cinetica della reazione enzimatica, è stato preso in considerazione il caso limite,  $[S]_L \ll K_M$ . Considerando invece il caso  $[S]_L \gg K_M$ , mostrare che la concentrazione di prodotto alla superficie del sensore enzimatico è

$$[P]_{x=L} = \frac{1}{2} \frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_p} L^2$$

e quindi indipendente dalla concentrazione del substrato.

#### Risoluzione

Nel caso  $[S]_L \ll K_M$ :

$$\begin{cases} D_s \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - K_2 \cdot [E]_0 = 0 \\ D_p \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} + K_2 \cdot [E]_0 = 0 \end{cases}$$

Le condizioni al contorno sono sempre:  $[S] = [S]_L$  per  $x = L$ ,  $\frac{\partial [S]}{\partial x} = 0$  per  $x = 0$ ,

$\frac{\partial [P]}{\partial x} = 0$  per  $x = 0$ , e  $[P] = 0$  per  $x = L$ .

Integrando si ottiene:

$$\frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} = -\frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_s}$$

$$\frac{\partial [S]}{\partial x} = -\frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_s} x + C \quad C=0 \text{ dato che } \frac{\partial [S]}{\partial x} = 0 \text{ per } x = 0$$

Integrando ancora, si ottiene

$$[S] = \frac{1}{2} \frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_s} x^2 + C_1$$

Il valore di  $C_1$  si trova mettendo  $[S] = [S]_L$  per  $x = L$ , da cui

$$[S] = [S]_L - \frac{1}{2} \frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_s} (L^2 - x^2)$$

Analogamente si ottiene:

$$[P] = \frac{1}{2} \frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_p} (L^2 - x^2)$$

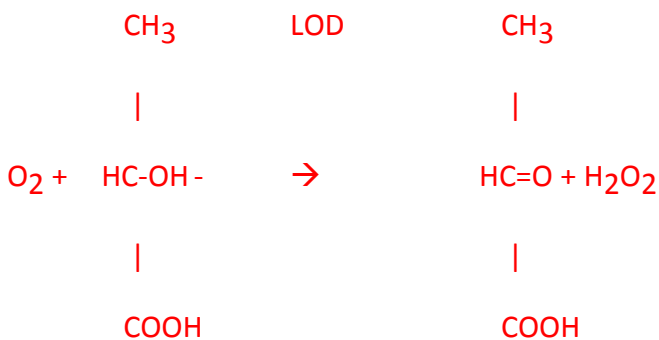
All'elettrodo, il valore di P è:

$$[P]_{x=0} = \frac{1}{2} \frac{K_2 \cdot [E]_0}{D_p} L^2$$

La concentrazione di prodotto alla superficie dell'elettrodo risulta indipendente dalla concentrazione del substrato e dipende solo dalla massima velocità della cinetica enzimatica e dal trasporto diffusivo. In queste condizioni, il sistema non può essere utilizzato come sensore enzimatico.

#### 4. Biosensore per acido lattico

I biosensori per acido lattico vengono utilizzati per monitorare la soglia anaerobica ed aerobica degli atleti. L'acido lattico è il prodotto della attivazione della via anaerobica della glicolisi e la sua concentrazione aumenta drammaticamente quando l'intensità e durata di attività fisica supera determinati valori, che dipendono dall'allenamento. La concentrazione di acido lattico può essere determinato usando vari enzimi, tra cui il più comune è il lattatoossidasi (LOD), che ossida l'acido lattico.



**Date le seguenti tabelle di dati, progettare un biosensore per l'acido lattico ed indicare come un sensore per acido lattico può essere utilizzato per stimare il livello di allenamento di una persona. Si consideri lo spessore dello strato enzimatico pari a 100  $\mu\text{m}$ . Il peso molecolare di lattato è 90 g/mol. Determinare in particolare la quantità in mM di enzima da intrappolare all'interno della membrana. Si consideri il rapporto tra  $[\text{P}]_{x=0}/[\text{S}]_{x=l}=0.5$ .**

Sport	Velocità a cui inizia la soglia aerobica (km/h)	Concentrazione massima di lattato (mg/dl)
Maratona	19.5	70
10000 m	17.0	44
Persona attiva	11.0	36
Persona sedentaria	8.5	24

$K_m$ di LOD	70 mM
$K_2$ di LOD	$10^{-1}$ s
$D_s=D_p$	$3.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
[lattato] a riposo	9 mg/dl

#### Risoluzione

Dalla tabella sembra che la concentrazione massima di lattato nel sangue sia proporzionale al livello di allenamento, anche se dipende da che tipo di attività sportiva viene eseguita. Quindi un sensore per la misura del livello di allenamento dovrebbe rilevare la massima concentrazione durante l'allenamento.

Il peso molecolare di lattato è 90 g/mol, allora:

Massimo valore misurato = 70 mg/dl = (70/9) mM (9 è il fattore di conversione)

quindi il valore di  $K_m$  è circa 10 volte quello del massimo valore misurato, ed è valida l'approssimazione  $K_m \gg [S]$ .

Per progettare il sensore, bisogna considerare la concentrazione di enzima da immobilizzare all'interno della membrana. Consideriamo la curva che parte dai valori tipici di  $[P]/[S]_L=0.5$  ed e troviamo i valori di  $[E]$  corrispondenti.

Si ha quindi che

$$\cosh(L\sqrt{\alpha}) = 2$$

$$L\sqrt{\alpha} = L\sqrt{\frac{K_2 \cdot [E]}{K_M \cdot D_S}} = a \cosh(2) = 1.317$$

Dalla quale è possibile ricavare [E].

$$[E] = \left( \frac{1.317}{L} \right)^2 \left( \frac{K_M D_S}{K_2} \right) = 0.42mM$$

### 5. Immunosensore ottico di tipo TIRF

Consideriamo un immunosensore ottico di tipo TIRF. Calcolare la profondità di penetrazione di luce di lunghezza d'onda 412 nm che incide con un angolo pari a 61 gradi, dove i mezzi rifrattivi sono acqua ( $n=1.333$ ) e quarzo ( $n=1.54$ ). Confrontare questo valore con le dimensioni di un anticorpo ( $\approx 90nm$ ), e il sistema TIRF nella la configurazioni competitiva e a sandwich.

Risoluzione

Consideriamo la formula (attenzione  $n_1 > n_2$ )

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}} = 169nm$$

La profondità di penetrazione è 169 nm.

La dimensione maggiore di un anticorpo è 90 nm. Quindi per la configurazione competitiva l'intensità di luce è sufficiente per eccitare una quantità di fluorescenza sufficiente. Nel caso di un sistema a sandwich, in cui il secondo anticorpo viene marcato, può accadere che l'onda evanescente venga "esaurita" prima di arrivare al fluoroforo. In questo caso bisogna utilizzare una luce con lunghezza d'onda maggiore.