

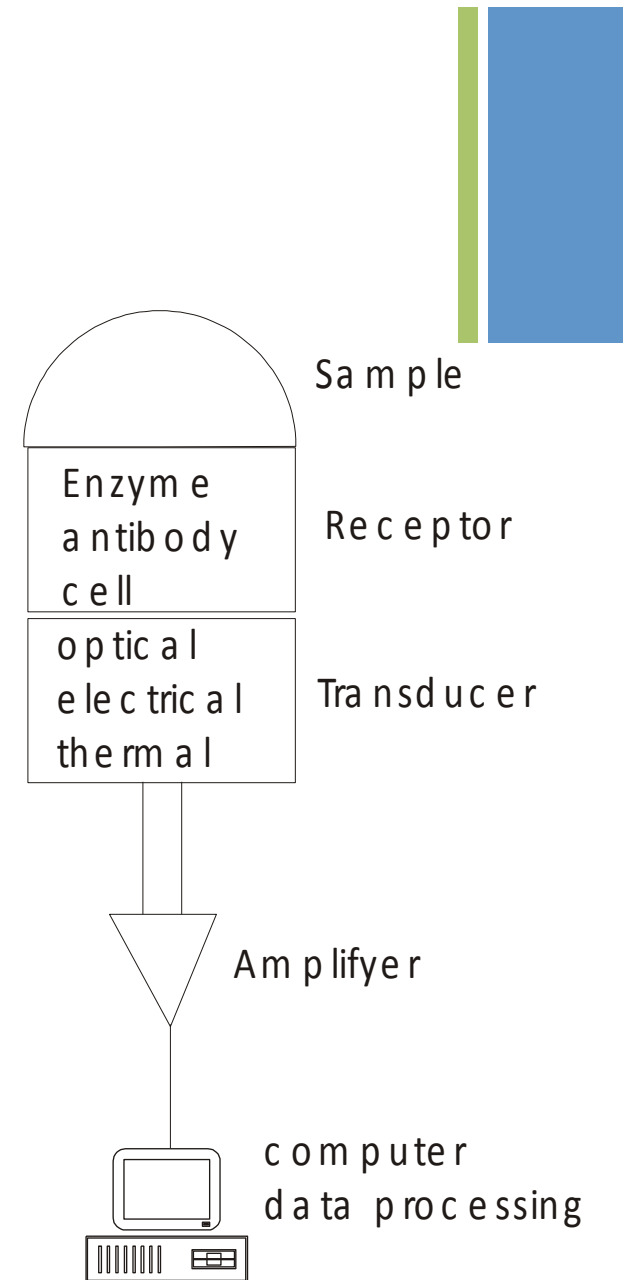
Biosensori

g.vozzi@centropiaggio.unipi.it

BIOSENSORI

Dispositivi composti da un elemento sensibile di origine biologica di solito un film sottile, in intimo contatto o integrato con un trasduttore. L'obiettivo è quello di produrre un segnale (elettronico o ottico) proporzionale alla concentrazione di una specie chimica.

Biorecettore + trasduttore.





Molecole	Example	Typical physiological values
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , H ⁺	0.1 M
Gases	NH ₃ , O ₂ , CO, CO ₂ ,	0.1 M
Metabolites	Glucose, urea, creatinine	10 mM
Drugs	Salicylate, acetaminofin, gentamicin	0.1 mM
Steroids	Cortisone	1 μ M
Antibodies	IgM, IgG	100 nM
Hormones	Insulin, prolactin, HCG	10 nM
Antigens	Hepatitis, HIV, alpha-feto protein	0.1 nM



Caratteristiche ideali del biosensore:

- 1) Segnale di uscita ripetibile e preciso
- 2) Range dinamico tale da coprire tutti i casi clinici sia fisiologici che patologici
- 3) Il sistema di misura deve essere insensibile alla temperatura, non necessitare di frequenti calibrazioni, economico, user-friendly e di dimensioni contenute
- 4) Veloce nell'acquisire la misura al massimo un minuto
- 5) Il volume sotto misura (sangue, saliva, sudore) non superiore a qualche decina di microlitri
- 6) se impiantabile deve essere biocompatibile e non tossico



Problemi che si riscontrano nello sviluppo dei biosensori legati alla natura dello strato sensibile:

- Orientazione
- Legame non specifico
- Stabilità
- Perdita di funzionalità
- Reversibilità



Tipologie di monitoraggio

- 1) Monitoraggio continuo ex-vivo (monitoraggio bed-side, con prelievo di sangue, eparinizzazione, diluizione e dialisi ed eventuale reinfusione)
- 2) Monitoraggio continuo in-vivo (monitoraggio nel caso del diabete)
- 3) Monitoraggio ex-vivo e discontinuo (indicatori di glucosio, di fertilità, etc)



I biosensori possono essere classificati in base alla molecola biologica usata come elemento sensibile che in base al principio di trasduzione adottato



1) Biosensore enzimatico

- 1) Lettura elettrochimica
- 2) Lettura optoelettronica

2) Biosensore immunologico o immunosensore

- 1) Lettura elettrochimica
- 2) Lettura optoelettronica
- 3) Lettura gravimetrica

3) Biosensore utilizzante DNA

- 1) Lettura elettrochimica
- 2) Lettura optoelettronica
- 3) Lettura gravimetrica

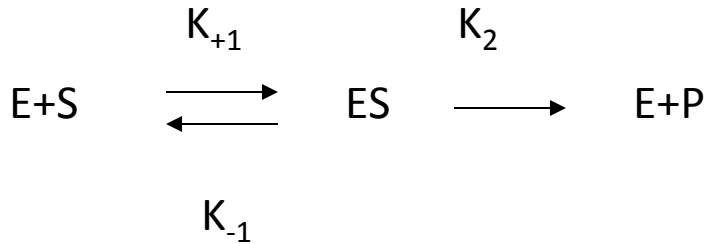
4) Metodi di riconoscimento cellulare

5) Metodi tessutali

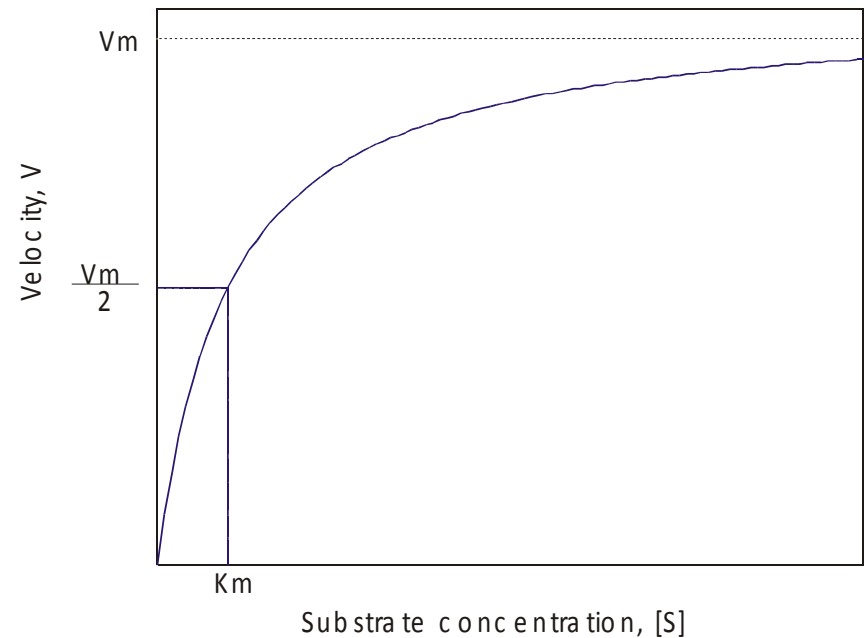


Analyte	Enzyme	Transduction mechanism
Glucose	Glucose oxidase	partial pressure O ₂ , dissociation H ₂ O ₂ , pH, optical (es. quenching), thermic
Urea	urease	partial pressure NH ₃ , pH, optical (es. quenching), thermic
Amino acids	Amino acid oxidase	partial pressure NH ₃ , thermic
Ethanol	alcohol dehydrogenase	electron transfer, thermic
Lactate	lactate dehydrogenase	electron transfer, termico
Penicillin	penicillinase	pH, thermic
Cholestrol	Cholestrol oxidase	Pressione parziale of O ₂ , dissociaton of H ₂ O ₂
Lactate	lactate dehydrogenase	Optical, pH

+ Biosensori Enzimatici



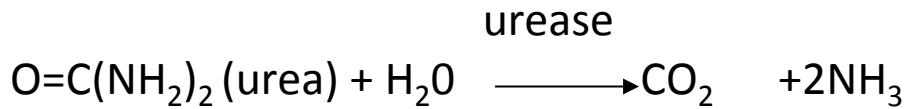
$$V = -\frac{dS}{dt} = K_2[ES] = \frac{K_2[E_0][S]}{K_m + [S]}$$



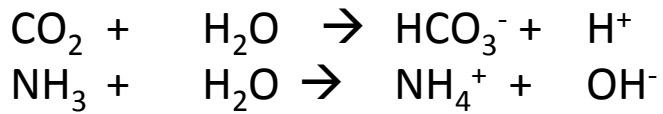
K_m è la costante di Michaelis ($K_m = (K_{-1} + K_2) / K_{+1}$) ed E_0 la concentrazione iniziale di enzima. Se $[S] \gg K_m$, $V = V_m$, la velocità di reazione massima è pari a $V_m = K_2[E_0]$.



La maggior parte dei sensori enzimatici misura l'aumento della pressione parziale di un gas generato durante la reazione catalitica o una variazione di pH attraverso l'uso di elettrodi. Ad esempio nel caso di un sensore di urea, con ureasi, le reazioni sono :



A pH fisiologico CO_2 e NH_3 dissociano:



Così l'urea può rilevata da un sensore di pressione parziale di CO_2 o NH_3 o da un sensore di pH.



La maggior parte dei biosensori di glucosio sono basati sull'ossidazione del glucosio

Catalizzato dalla glucosio-ossidasi (GOD). L'enzima GOD, usualmente estratto

dai funghi, ossida il glucosio con la seguente reazione



I biosensori più studiati ed utilizzati sono quelli elettronici per l'applicazione in vivo basati sulla reazione di ossidoriduzione precedente.



I biosensori per la misura del glucosio devono avere le seguenti caratteristiche :

- capaci di misurare le concentrazioni di glucosio nel sangue o nei fluidi interstiziali in un range che va da 36 a 360 mg / dl (2 mM a 20 mM) , con una risposta ben definita e riproducibile.
- Il sensore deve essere molto specifico per il glucosio e questo è possibile grazie all'uso di GOD.
- Deve avere una risposta veloce (pochi minuti) simile al tempo di risposta del pancreas
- La risposta dovrebbe essere indipendente da qualsiasi fluidodinamica (ad esempio il flusso di sangue) , e indipendente dalla concentrazione di ossigeno
- Dovrebbe essere meccanicamente e chimicamente stabile

Sensore potenziometrico



E' un elettrodo per pH, composto da una membrana di vetro permeabile agli ioni H⁺ che costituisce l'elettrodo di misura vero e proprio, ed un elettrodo di riferimento (ad esempio di Ag/AgCl).

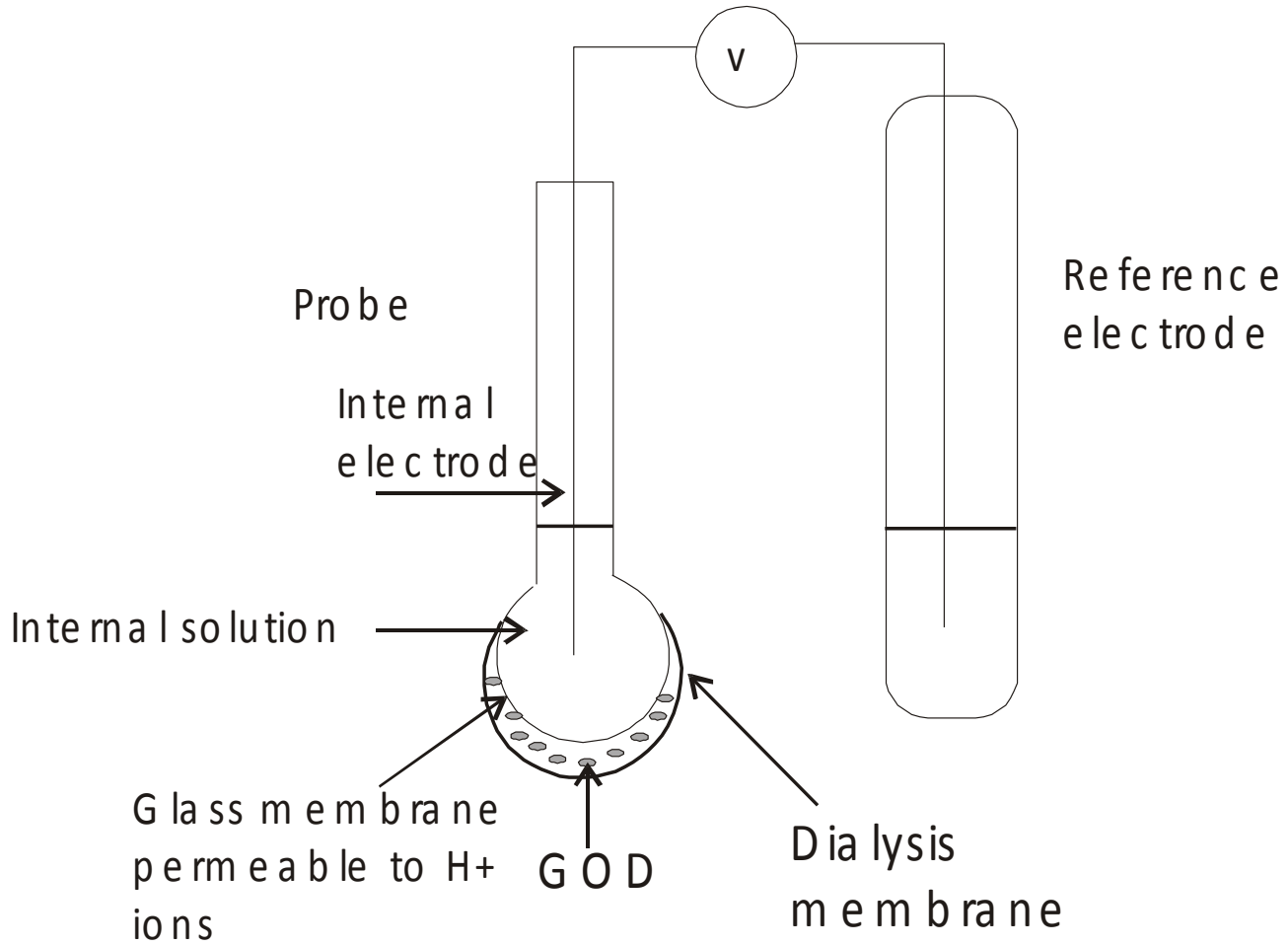
Il potenziale sviluppato dalla membrana è dato dall'equazione di Nernst:

$$\varepsilon = \varepsilon_o + \frac{RT}{ZF} \ln a$$

Dove ε_o è il potenziale standard, K è la costante dei gas, T la temperatura in Kelvin, Z la valenza dello ione (H⁺ nel caso di un potenziometro per pH), con attività a (sarebbe la concentrazione) ed F è la costante di Faraday. Quindi il potenziale sviluppato è proporzionale al pH.

Nel caso dei 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 è in grado di misurare la riduzione del pH locale dovuta alla produzione di acido gluconico generata dall'ossidazione del glucosio.



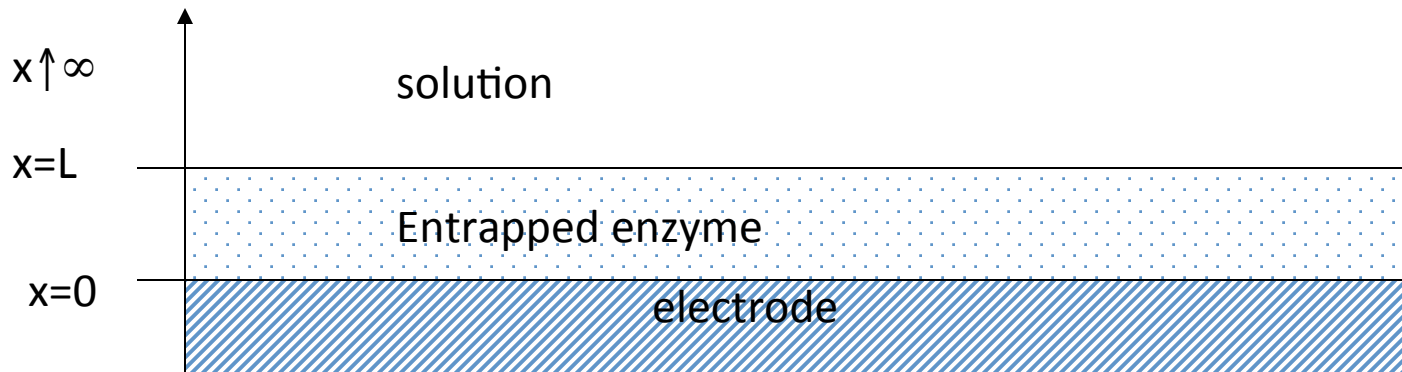




Teoria della reazione enzimatica: sensore potenziometrico

Un elettrodo a enzima opera un processo a 5 passi:

- 1)il substrato deve essere trasportato alla superficie esterna dell'elettrodo (la membrana); ($x=L$)
- 2)deve diffondere attraverso la membrana; (da $x=L$ a $X=0$)
- 3)deve avvenire la reazione;
- 4)il prodotto formato nella reazione enzimatica deve essere trasportato fino alla superficie interna dell'elettrodo; (a $x=0$)
- 5)il prodotto deve essere misurato alla superficie dell'elettrodo





Le assunzioni:

- 1) il trasferimento di massa dalla soluzione di bulk fino alla superficie esterna dell'elettrodo sia molto rapido;
- 2) la reazione enzimatica obbedisca alle cinetiche di Michaelis e Menten;
- 3) il raggio di curvatura dell'elettrodo sia infinito rispetto allo spessore dello strato enzimatico (L), così da considerare piano il sistema.

Le equazioni che descrivono le velocità di conversione del substrato S e generazione del prodotto P sono:

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

Che praticamente è l'equazione di Fick combinata con la reazione enzimatica.

D_s e D_p sono le costanti di diffusione rispettivamente del substrato e prodotto.



Consideriamo il caso limite, $[S]_L \ll K_M$, che è un caso normalmente riscontrato.

$[S]_L$ è la concentrazione del substrato a L. All'equilibrio, le velocità sono uguali a zero, quindi si ottiene:

$$\frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} = \alpha \cdot [S]$$

$$\frac{\partial^2[P]}{\partial x^2} = -\frac{D_S}{D_P} \cdot \alpha \cdot [S]$$

$$\alpha = \frac{K_2 \cdot [E]}{K_M \cdot D_S}$$





Le condizioni al contorno sono:

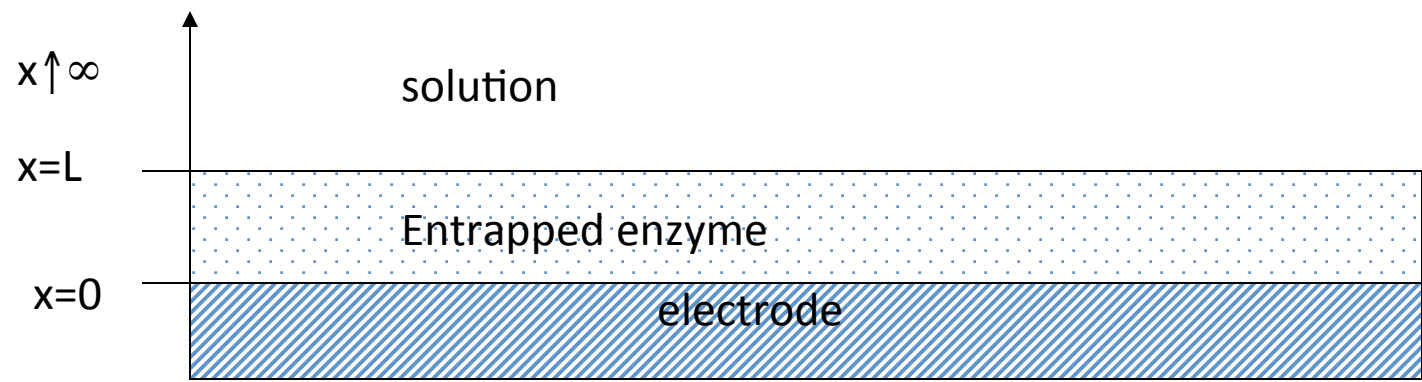
- Il substrato non passa attraverso l'elettrodo
- La concentrazione di S rimane costante da $x=\infty$ fino a $x=L$ (volume infinito)
- Il prodotto non passa attraverso l'elettrodo
- La concentrazione di P nel volume è trascurabile

$$\frac{\partial[S]}{\partial x} = 0 \text{ for } x = 0$$

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

$$\frac{\partial[P]}{\partial x} = 0 \text{ for } x = 0$$

$$[P] = 0 \text{ for } x = L$$



+

$$\frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} = \alpha \cdot [S]$$

$$\frac{\partial^2[P]}{\partial x^2} = -\frac{D_s}{D_p} \cdot \alpha \cdot [S]$$

1. $\frac{\partial[S]}{\partial x} = 0$ for $x = 0$

2. $[S] = [S]_L$ for $x = L$

3. $\frac{\partial[P]}{\partial x} = 0$ for $x = 0$

4. $[P] = 0$ for $x = L$

$$[S] = A \cdot e^{x\sqrt{\alpha}} + B \cdot e^{-x\sqrt{\alpha}}$$

Usando la 1. $A=B$

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

Usando la 2.

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

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

Quindi

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

+

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

3. $\frac{\partial [P]}{\partial x} = 0$ for $x = 0$
4. $[P] = 0$ for $x = L$

$$D_s \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} + D_p \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} = 0$$

$$\int D_s \cdot \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} + D_p \cdot \frac{\partial^2 [P]}{\partial x^2} = 0$$

$$D_s \cdot \frac{\partial [S]}{\partial x} + D_p \cdot \frac{\partial [P]}{\partial x} = \text{const}$$

A $x = L$ sono i flussi diffusi del substrato in ingresso e del prodotto in uscita dallo strato di enzima. Il sistema è conservativo quindi la somma dei due flussi deve essere zero.

+

$$\int D_S \cdot \frac{\partial [S]}{\partial x} + D_P \cdot \frac{\partial [P]}{\partial x} = 0$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 3. \frac{\partial [P]}{\partial x} = 0 \text{ for } x = 0 \\ 4. [P] = 0 \text{ for } x = L \end{array} \right.$$

$$D_S S + D_P P = K$$

Per $x=L$, $P=0$, $D_S [S]_L = K$

così

$$[P] = \frac{D_S \cdot [S]_L - D_S \cdot [S]}{D_P} = \frac{D_S}{D_P} \cdot ([S]_L - [S])$$

+

Sostituendo [S] con

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

Si ottiene

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

$$[P]_{x=0} = \frac{D_S}{D_P} \cdot [S]_L \cdot \left(1 - \frac{1}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})} \right)$$

+

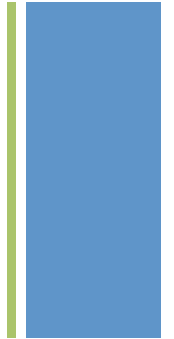
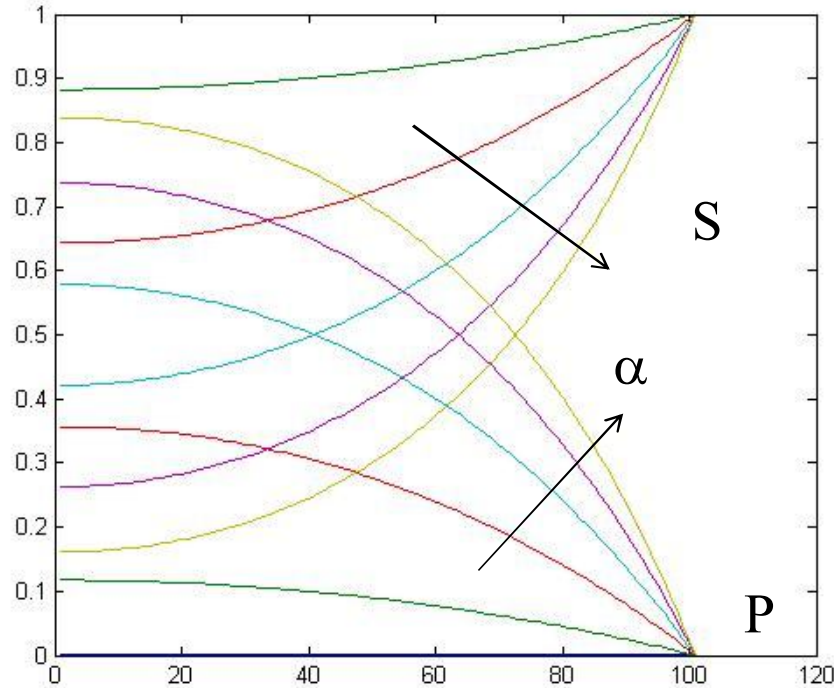
$$[P]_{x=0} = \frac{D_S}{D_P} \cdot [S]_L \cdot \left(1 - \frac{1}{\cosh(L \cdot \sqrt{\alpha})} \right)$$



Questa espressione mostra che per $[S] \ll K_M$ la concentrazione di prodotto alla superficie $x=0$ è direttamente proporzionale alla concentrazione di substrato nel bulk, quindi il segnale di tensione rilevato è a sua volta proporzionale a tale concentrazione. Il parametro adimensionale $L\sqrt{\alpha}$ incorpora tutte le variabili cinetiche importanti del sistema. Il parametro adimensionale $L^2\alpha$ rappresenta il rapporto tra il tempo di diffusione e di reazione, e si chiama il numero di Thiele (ϕ^2)

$$\alpha = \frac{K_2 \cdot [E]}{K_M \cdot D_S}$$

$$\varphi = L\sqrt{\alpha}$$



Andamento della concentrazione (normalizzata) di $[P]$ e $[S]$ in funzione della distanza (normalizzata in %) nel caso che sia $[S]_L \ll K_M$.

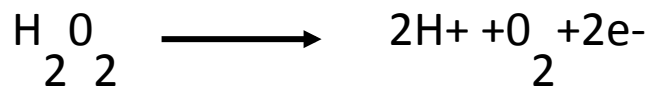
Quando α è piccolo, allora D_s è grande: il substrato è troppo mobile o non c'è abbastanza enzima per convertire S in P in modo efficiente, o K_2 è piccolo e quindi la velocità di reazione in avanti non è sufficiente per convertire P .

Sensore Amperometrico

+ La struttura dei sensori amperometrici è 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 tra cui viene applicato un potenziale elettrico. La corrente generata all'equilibrio è dovuta al trasferimento di elettroni tra la superficie enzimatica e gli elettrodi ed è proporzionale alla concentrazione di specie elettro-attive.

I sensori amperometrici riescono a misurare la riduzione della pressione parziale di ossigeno che viene consumato con la riduzione al catodo (-600 mV) o l'ossidazione di H_2O_2 all'anodo (+600 mV).

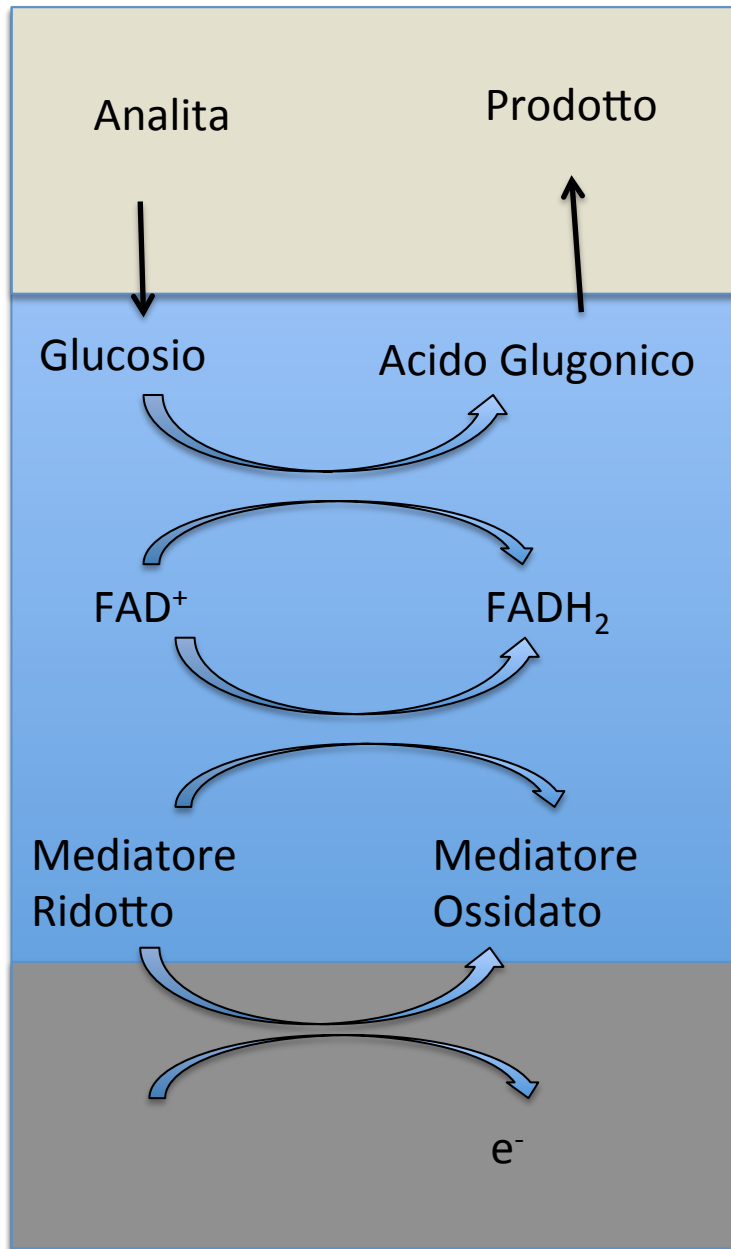
I sensori amperometrici maggiormente sviluppati per l'analisi del glucosio sono quelli in cui un anodo di platino polarizzato a circa 600mV rispetto ad un elettrodo di riferimento (di solito a calomelano), ossida elettrochimicamente l' H_2O_2



Nel caso di un sensore amperometrico, il segnale dipende dal flusso di prodotto attraverso la membrana (elettroni). La corrente generata è data da

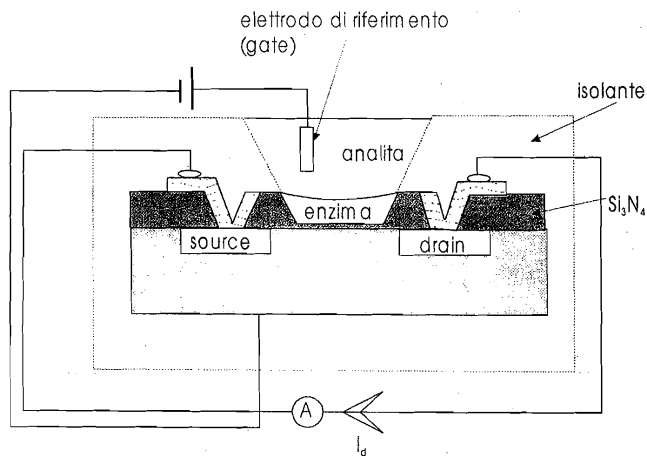
$$I = \frac{dP}{dx} * Z * F * L * A$$

+



Sensore potenziometrico MOSFET o ISFET

- Essi sono basati su un MOSFET (transistor a effetto di campo con un ossido metallico che isola il gate). Il MOSFET può essere modificato a ISFET (FET sensibile ad ioni) sostituendo il gate con un elettrodo di riferimento.
- Essenzialmente, l'ISFET, consiste in un substrato di silicio tipo p con due zone tipo n che formano drain e source rispettivamente. Sopra questo substrato viene depositato uno strato isolante di SiO_2 e Si_3N_4 , che è sensibile agli ioni H^+ . Il gate è un elettrodo metallico immerso nel campione. L'interazione fra ioni H^+ e lo strato isolante modifica il campo elettrico fra il gate ed il substrato e conseguentemente cambia il potenziale di soglia ed anche la corrente di drain, che è il parametro generalmente misurato.
- Aggiungendo all'ISFET uno strato enzimatico immobilizzato sopra lo strato isolante, o ivi contenuto da una membrana, si ottiene l'ENFET, che essenzialmente è l'analogo di un sensore potenziometrico.



$$I_D \approx I_{D0} e^{\frac{V_{GS} - V_{th}}{(1 + \frac{C_d}{C_{OX}}) V_T}}$$

dove I_{D0} è la corrente per $V_{GS} = V_{th}$
 C_d è la capacità della regione di svuotamento e
 C_{OX} la capacità dello strato di ossido.



Nel caso di un ENFET per glucosio, uno strato di GOD viene immobilizzato covalentemente o contenuto da una membrana sopra il *gate*. La presenza di glucosio aumenta la produzione di acido gluconico all'interno della membrana e di conseguenza si ha una diminuzione di pH ed un cambiamento delle condizioni nelle zone di inversione e lo strato di svuotamento. Il rapporto fra la risposta di un ENFET e la concentrazione di analita è abbastanza complicato e dipende sia dall'enzima usato e dalla diffusione di glucosio e acido gluconico che dai potenziali applicati a *gate* e *drain*.

I tempi di risposta e il range dinamico sono dello stesso ordine di quelli dei sensori potenziometrici. La differenza è che mentre l'elettrodo potenziometrico misura direttamente il potenziale sviluppato su una membrana, e quindi necessita di un voltmetro con impedenza d'ingresso molto alta, il contatto a stato solido fra il campione e il dispositivo genera un'impedenza di uscita bassa e un alto rapporto segnale/rumore. Inoltre, i sensori a semiconduttore possono essere miniaturizzati e quindi richiedono una piccolissima quantità di enzima.

L'uso principale di questi sensori è nel campo del monitoraggio di funzioni metaboliche o del pH in colture cellulari, dove le piccole dimensioni dei dispositivi si prestano bene a misure in zone localizzate

Sensori Termici

Le reazioni biologiche sono generalmente esotermiche e le reazioni enzimatiche hanno un'entalpia piuttosto elevata (20-100 KJ/mole). È quindi possibile misurare la quantità di calore prodotto da una reazione enzimatica e correlarlo alla concentrazione di substrato presente. Un sensore termico di glucosio proposto consiste in un calorimetro a flusso in cui l'enzima GOD viene immobilizzato in una piccola colonna. Lungo questa colonna, in una camera termostata, viene fatto fluire un liquido la cui temperatura viene misurata da un termistore o una termocoppia dopo aver traversato la colonna. Una seconda colonna, identica ma senza enzima, serve da riferimento.

I sensori termici non hanno suscitato grande interesse perché il calore può essere generato da qualunque reazione ed è quindi un sistema abbastanza aspecifico. Inoltre, la produzione di una quantità di calore misurabile richiede molto enzima e la strumentazione associata alla misura calorimetrica è molto ingombrante (richiede reattori, pompe, camere termostate).

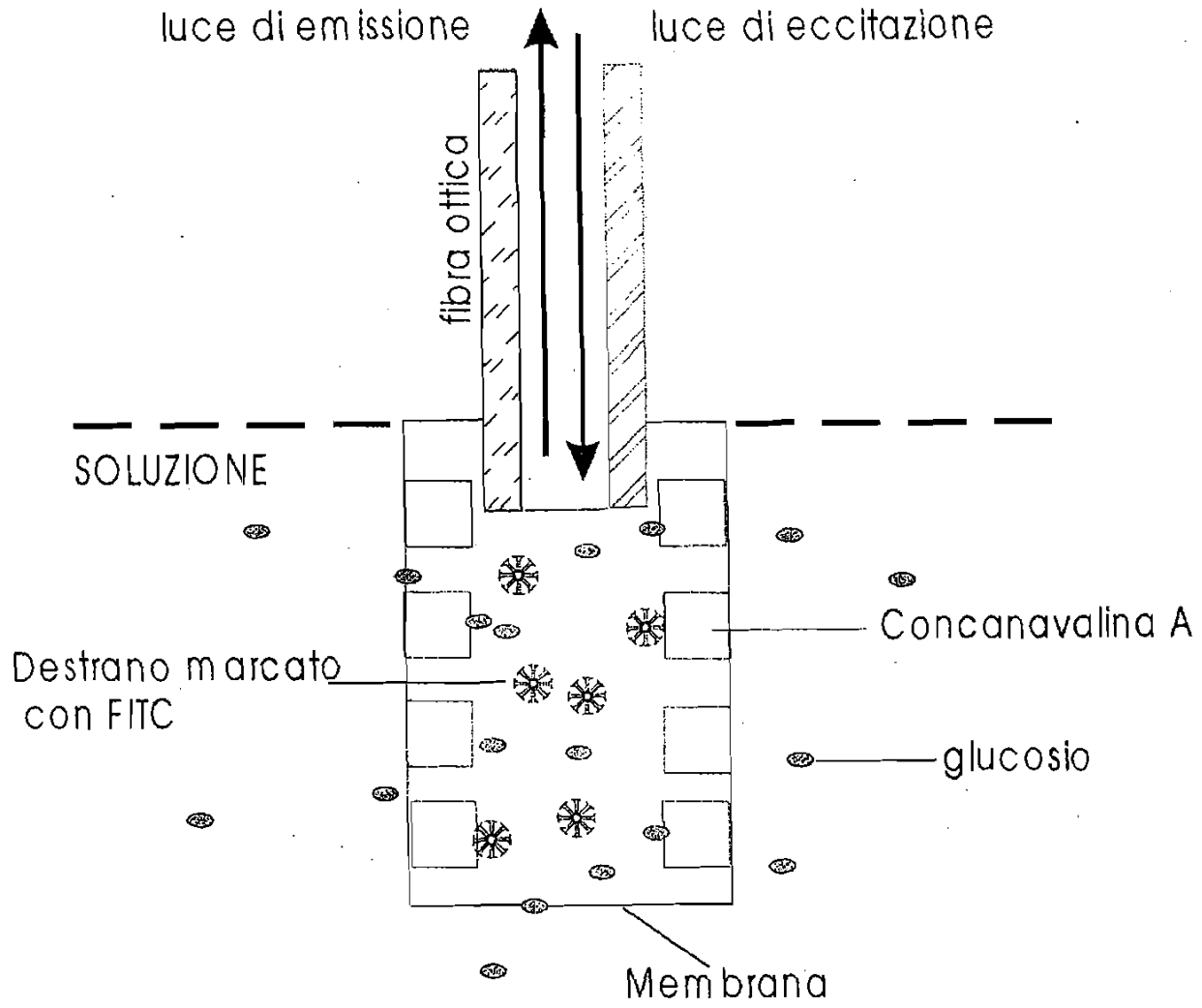
Recentemente è stato proposto un nuovo dispositivo miniaturizzato (di dimensioni 0,4 X 6 X 14 mm³) con micro pompe e micro reattori, in grado di misurare la concentrazione di glucosio nel sangue **ex-vivo**. In questo sistema GOD e catalasi vengono immobilizzati su una piccola colonna e la combinazione dei due enzimi aumenta la produzione di calore e diminuisce la dipendenza della reazione dalla concentrazione di enzima (la catalasi catalizza la produzione di ossigeno ed acqua da H₂O₂). Il sensore ha un range da 1 a 16 mM, un tempo di risposta di 60 secondi² ed una elevata sensibilità in confronto ai sensori amperometrici.

Sensori Ottici

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 è basato sulla capacità della con-A di legarsi con gli zuccheri. 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.

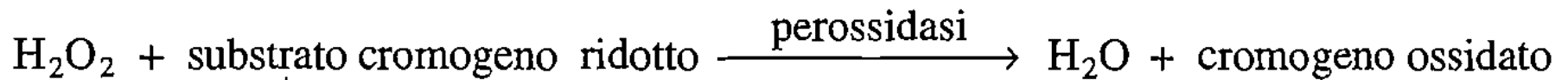
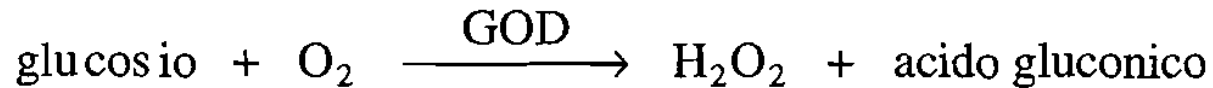
Con l'aumento della concentrazione di glucosio, il destrano si dissocia dalla con-A, e passa via via in soluzione. I fenomeni avvengono quindi all'interno della cella formata dalla membrana e la fluorescenza eccitata dalla luce che esce dalla fibra viene ritrasmessa indietro per retrodiffusione lungo 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).



Saggi colorimetrici

Al momento attuale, la tecnica maggiormente utilizzata da pazienti diabetici per la determinazione del glucosio consiste nel procurarsi una goccia di sangue (ad es. bucan- dosi la punta di un dito) da mettere in contatto con striscioline di carta che, impregnate di enzimi ed un substrato cromogeno agiscono da saggio colorimetrico. I saggi colorimetrici per la valutazione della glicemia vengono eseguiti applicando circa 3 microlitri di sangue su un foglietto impregnato con gli enzimi glucosio-ossidasi e perossidasi. Le reazioni sono così schematizzate:



il substrato ossidato produce quindi un colore caratteristico, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di H_2O_2 e quindi alla concentrazione di glucosio nel campione di sangue esaminato.

L'intensità cromatica può essere misurata raccogliendo con un fotodiode la luce di un LED e convertendo il segnale generato in una lettura digitale. Questo tipo di saggio può avere un errore di circa il 15% (è legato ai livelli di ematocrito, idratazione, flusso sanguigno, ecc.) e l'errore aumenta in casi di iper o ipoglicemia.

Nel caso di diabete, l'analisi per la determinazione della concentrazione di glucosio deve essere eseguita da 2 a 7 volte al giorno, in modo che il paziente possa avere indicazioni su come compensare il livello di glucosio facendosi più o meno iniezioni di insulina.



I problemi ancora da risolvere sono molti:

1) Biocompatibilità

2) Immobilizzazione dell'enzima

Non è ancora stato individuato un metodo ideale per l'immobilizzazione di GOD, anche se è ormai accertato che è proprio l'immobilizzazione che rende questo particolare enzima molto stabile nel sensore (può essere conservato per mesi anche a temperatura ambiente, cosa assai insolita per un enzima). Per i sistemi in vivo la perdita di enzima nel tessuto è assolutamente da evitare perché GOD è potenzialmente immunogenico.

3) Problemi di deriva

La risposta di un sensore impiantato è soggetta a derive imprevedibili che cambiano da sensore a sensore e da paziente a paziente.

4) Calo della sensibilità

In tutti casi riportati, la sensibilità del sensore in vivo è circa 20-90% minore di quella in vitro, e tende a diminuire col tempo. Questo può essere dovuto alla presenza di inibitori nel tessuto (dopo espianto i sensori solitamente recuperano la loro sensibilità originale), o una diminuita pressione parziale di O_2 , all'interno del corpo. Implica che i sensori devono essere calibrati in vivo dopo l'impianto, e forse anche durante l'impiego.





Metodi Di Prelievo ex-vivo

- 1) Ionoforesi
- 2) Microdialisi

Mentre in condizioni normali il derma non permette la fuoriuscita di glucosio dalla pelle, l'applicazione di stimoli elettrici, sostanze chimiche o del vuoto può forzare l'apertura dei pori. Il sensore a ionoforesi (o elettro-osmotico) è basato sull'applicazione di una corrente elettrica sulla pelle per estrarre sostanze ionizzate o comunque polari dal corpo. L'applicazione di una corrente attraverso la pelle forza il passaggio di ioni sia dalla pelle al tessuto che nella direzione opposta. Simultaneamente, il solvente (in questo caso il fluido fisiologico) tende a fluire nella direzione opposta al flusso dei contrioni: un fenomeno detto "elettro-osmosi". Il dispositivo consiste in due camere di prelievo con due elettrodi. Per mantenere le condizioni elettrochimiche e per sfruttare il fenomeno di elettro-osmosi, le due camere contengono un liquido elettrolitico (0.1 M NaCl). La concentrazione di glucosio estratto nella camera catodica viene misurato usando un sensore amperometrico.

La quantità di glucosio estratto non è direttamente proporzionale al livello di glicemia perché può prevenire anche dal metabolismo dei lipidi presenti nella pelle e questo varia anche da soggetto a soggetto; inoltre la quantità di glucosio estratto varia con il tempo di applicazione della corrente.

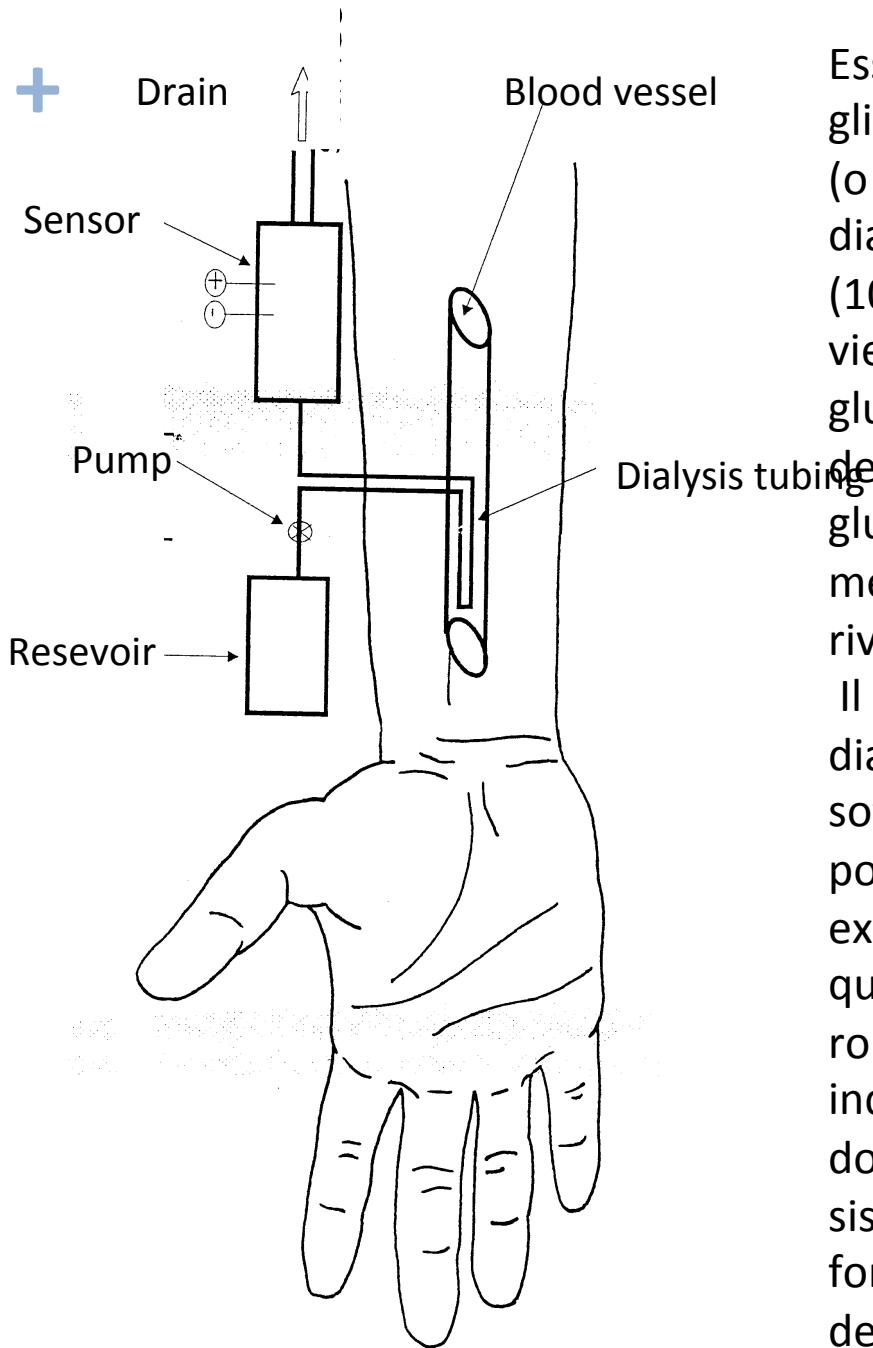




Esistono anche problemi di irritazione cutanea dovuti all'applicazione di una corrente sia in continua che alternata. Inoltre, il contatto continuo della pelle con un liquido salino in un ambiente chiuso comporta gravi problemi di infezioni batteriche e da funghi.

Questo sensore, sotto il nome di "Gluco Watch" (sebbene piuttosto grande rispetto ad un orologio), ha recentemente avuto l'approvazione della Food and Drug Administration (l'organizzazione che regola, tra l'altro, il mercato dei prodotti farmaceutici negli Stati Uniti).





Essenzialmente, nel caso di monitoraggio della glicemia, il metodo consiste nell'impianto in un vaso (o sotto cute) di una piccola membrana tubolare da dialisi, con taglio di peso molecolare piuttosto basso (10000 Dalton). In questa, per via transcutanea, viene fatto circolare un fluido isototonico, senza glucosio. Data quindi la differenza di concentrazione del glucosio fra il fluido di dialisi ed il sangue, il glucosio presente nel sangue diffonde attraverso la membrana e la sua concentrazione può essere quindi rivelata da un sensore extra corporeo.

Il sistema consiste in una sonda per microdialisi del diametro di 500 micrometri impiantata nel tessuto sotto-cutaneo addominale. Il fluido dializzato viene pompato (portata 2 microlitri/min) ad un sistema extra-corporeo dove viene mescolato con GOD e la quantità di H_2O_2 prodotta viene misurata amperometricamente. Misure eseguite su pazienti indicano che la durata della sonda è circa 72 ore, dopo di che la sensibilità ed il tempo di risposta del sistema diminuiscono notevolmente a causa della formazione di uno strato proteico sulla superficie della membrana di dialisi.



In alternativa può essere usato un sistema di circolazione extra corporeo, in cui una piccola quantità di sangue può essere prelevata e dializzata, e poi immessa nuovamente nel circolo, dopo la misura, (con l'aggiunta di eparina per mantenere aperte le linee). Quest'ultimo metodo evita il problema dell'occlusione della membrana da dialisi, perché essa può essere facilmente cambiata. È anche possibile usare membrane sottili, che sarebbero troppo delicate per l'impianto, per diminuire i tempi di risposta. In tali sistemi, la concentrazione di glucosio dializzato C può essere data da:

$$C = C_{sangue} (1 - e^{-t/VR})$$

Dove C_{sangue} è la concentrazione di glucosio nel sangue, V è il volume di fluido dentro il tubo da dialisi, t è il tempo di dialisi, e R è la resistenza alla diffusione del glucosio attraverso la membrana (essendo R uguale all'inverso del prodotto tra lo spessore della membrana e la costante di diffusione). I tempi per raggiungere l'equilibrio determinano la velocità di risposta del sistema, ed è di solito dell'ordine di qualche minuto.





IMMUNOSENSORI



- **Gli anticorpi (Ac) reagiscono in maniera reversibile con gli antigeni, (Ag) e l'affinità fra i due è determinata dalla costante di dissociazione, K' .**



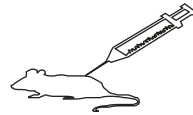
- K' ha un valore tipicamente intorno a 10^{-4} a 10^{-12} moli/litro, e valori più piccoli indicano un'affinità più elevata.



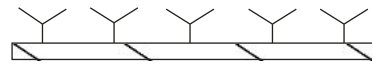
Immunosensore diretto

Nell'immunosensore 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

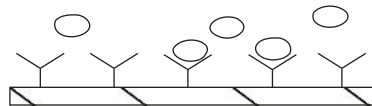
Diretto



preparazione dell'anticorpo



immobilizzazione
dell'anticorpo



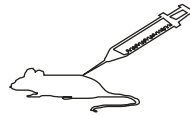
misura diretta



Immunosensore competitivo

- L'anticorpo viene immobilizzato e reagisce con una concentrazione nota di antigene preventivamente marcato. Tale antigene viene intrappolato grazie ad una membrana semi-permeabile che permette il passaggio all'antigene da misurare. L'antigene marcato compete con il campione da analizzare. Tipicamente, questa tecnica viene utilizzata in casi in cui l'antigene o aptene è troppo piccolo per essere rivelato con metodi diretti.

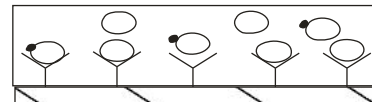
Competitivo



preparazione dell'anticorpo



marcatura dell'antigene



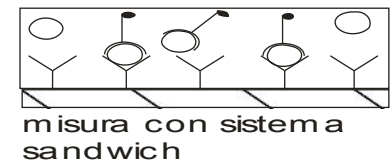


Immunosensore a sandwich

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 (vd. oltre), la tecnica a sandwich può aumentare la sensibilità della misura.



Sandwich





La reazione immunologica può essere rivelata con tecniche ottiche, elettriche, o piezoelettriche.

I sistemi di trasduzione elettrica sono potenziometrico, amperometrico e con gli Immuno FET.

A differenza dei sensori enzimatici, gli immunosensori attualmente in fase di sviluppo sono quasi tutti di tipo ottico. I metodi di trasduzione ottica generalmente utilizzati sono:

- a) fluorescenza indotta da un onda evanescente (TIRF)
- b) risonanza di plasmoni superficiali (SPR)
- C) accoppiatore a reticolo

Il complesso anticorpo-antigene può essere inoltre rivelato tramite misure di microgravimetria usando sistemi piezoelettrici.



+ 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. Le tecniche ottiche sono legate al fenomeno della riflessione interna, che si genera all'interfaccia tra due mezzi trasparenti aventi indice di rifrazione diverso. Il fenomeno della riflessione interna totale viene sfruttato negli immunosensori, in quanto accoppia alla selettività della reazione anticorpo-antigene l'effetto dovuto all'onda evanescente, che è in grado di operare un'ulteriore selezione spaziale. Il campo evanescente generato all'interfaccia ottica penetra infatti per pochi nanometri nella soluzione da analizzare, fornendo così informazioni solo sulla zona interessata dalla reazione immunologica, escludendo invece il resto del volume.

La riflessione totale interna si verifica quando l'onda luminosa incide all'interfaccia tra un mezzo più denso avente indice di rifrazione n_1 ed uno meno denso n_2 , ($n_2 < n_1$, es.: vetro 1.5, aria 1) con un angolo di incidenza θ più grande dell'angolo critico θ_c ($\sin \theta_c = n_2/n_1$).

Analizzando questo fenomeno con le equazioni di Maxwell, si ottiene un'onda stazionaria perpendicolare all'interfaccia nel mezzo meno denso.



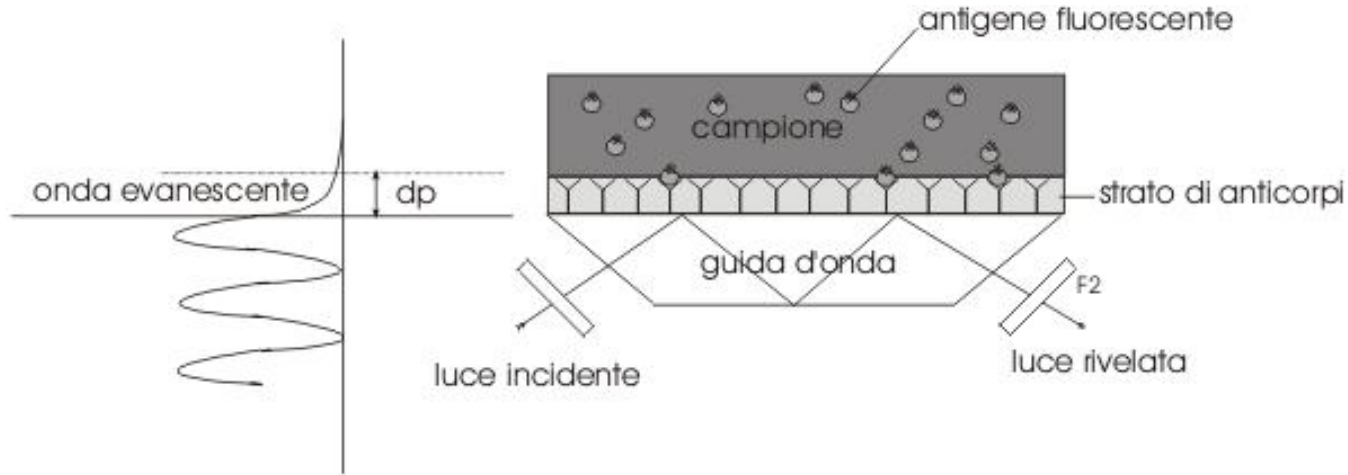
Sebbene non ci sia un flusso netto di energia nel mezzo n_2 si genera un campo evanescente. A causa delle discontinuità all'interfaccia, l'intensità di questo campo decade esponenzialmente con la distanza (z) dall'interfaccia.

$$E = E_0 e^{-z/d_p}$$

La profondità di penetrazione

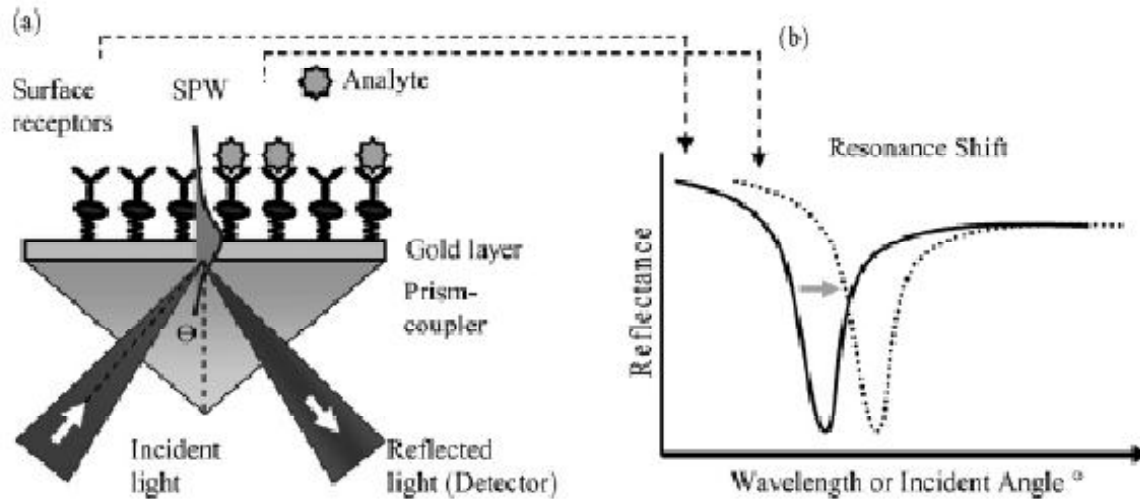
$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

Dato che l'onda evanescente penetra all'interno del mezzo meno denso per frazioni della lunghezza d'onda, ne consegue che le reazioni antigene-anticorpo possono essere rivelate come variazioni di parametri significativi del raggio riflesso.



TIRF

Il dispositivo TIRF è costituito da una guida d'onda sulla cui superficie è immobilizzato l'anticorpo. La guida d'onda viene utilizzata come parete posteriore della cella dentro cui viene iniettata la soluzione da analizzare. L'analita, o il suo competitore, deve essere fluorescente, e la grandezza rivelata nel sistema TIRF è la luce che viene riemessa per fluorescenza. Il principio di funzionamento di tale dispositivo è il seguente: l'onda piana incidente genera un'onda evanescente che eccita le molecole prossime alla superficie con una distribuzione proporzionale all'intensità del campo elettrico evanescente. Dopo un tempo di vita caratteristico dei livelli eccitati, le molecole riemettono una radiazione fluorescente con una distribuzione all'interfaccia molto simile a quella dell'onda evanescente, ma con una lunghezza d'onda propria della fluorescenza.

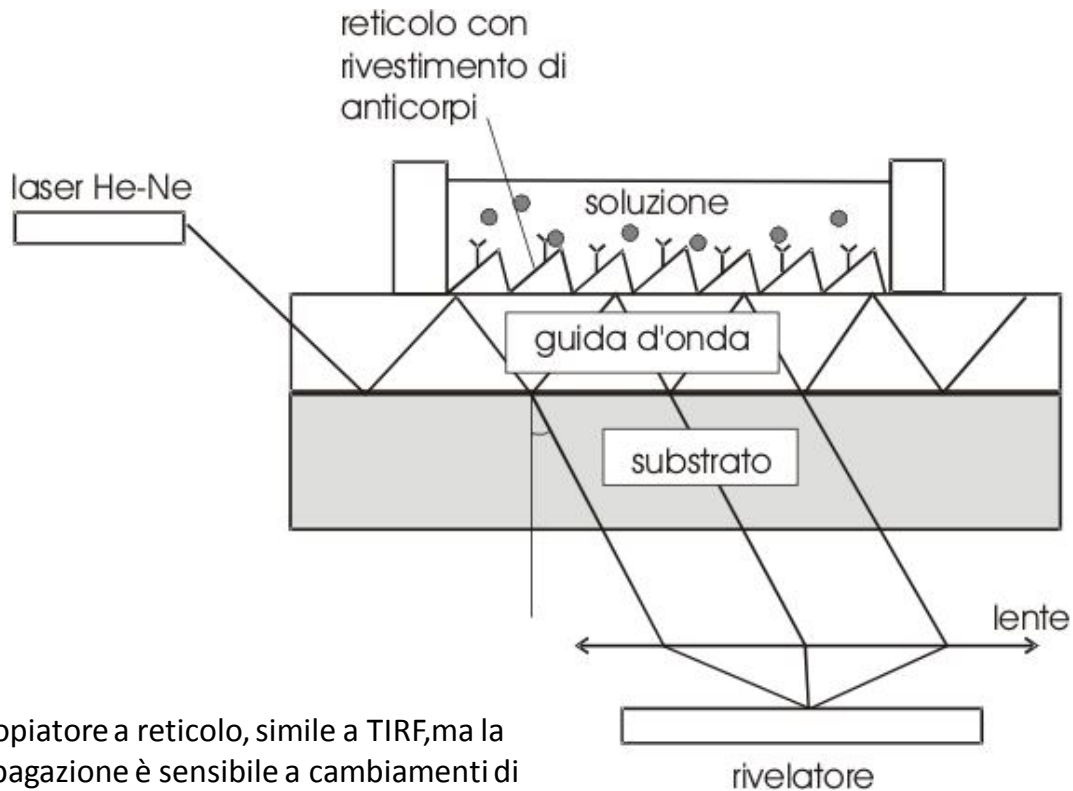


I plasmoni rappresentano i quanti delle oscillazioni delle cariche, che si accoppiano con i campi elettromagnetici ad alta frequenza presenti nello spazio. I plasmoni superficiali sono presenti sulla superficie di un solido i cui elettroni si comportano come un gas di elettroni quasi-liberi. L'eccitazione 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 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.

La grandezza fisica che può essere rivelata è la riflettanza in funzione dell'angolo di incidenza. Dapprima si fa la misura senza campione da analizzare in modo da valutare il picco e poi con la sostanza da analizzare.



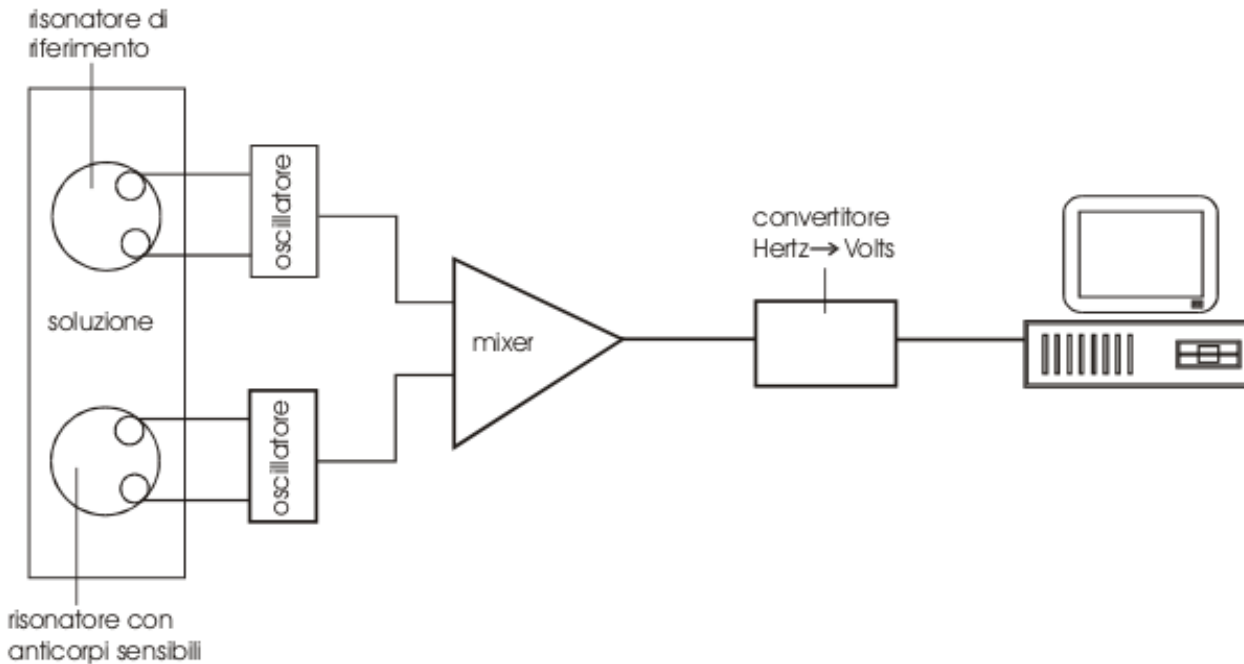
IMMUSENSORE con accoppiamento a reticolo



Accoppiatore a reticolo, simile a TIRF, ma la propagazione è sensibile a cambiamenti di indice di rifrazione vicino alla superficie



IMMUSENSORE a quarzo risonante



I sensori gravimetrici a cristalli di quarzo sono uno dei sistemi più semplici per la realizzazione di sensori ad affinità. 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

La variazione di frequenza dipende da diversi parametri, ad esempio massa (m), viscosità (μ), temperatura (T), e umidità (H).

+

$$\Delta f = \frac{\partial f}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial f}{\partial \eta} \Delta \eta + \frac{\partial f}{\partial T} \Delta T + \frac{\partial f}{\partial H} \Delta H$$

$$\Delta f = \frac{-f_0 \Delta m}{A \rho t}$$

dove ρ è la densità del quarzo, f_0 è la frequenza di risonanza senza presenza di antigene, e A e t sono rispettivamente l'area superficiale e lo spessore del quarzo.



Per modellizzare un immunosensore si può partire da considerazioni semplici. Nel caso della reazione Ab-Ag, l'adsorbimento e desorbimento vengono intesi come formazione e dissociazione del complesso Ab-Ag.

Ipotesi:

- a) tutta la superficie ha la stessa attività di adsorbimento;
- b) non vi è interazione fra le molecole adsorbite;
- c) tutto l'adsorbimento avviene secondo lo stesso meccanismo ed ogni complesso adsorbito ha la stessa struttura;
- d) la copertura superficiale tende al limite alla formazione di un monostrato molecolare compatto.

In un sistema di questo tipo si raggiungerà un equilibrio fra gli antigeni che si adsorbono e quelle che si desorbono. La velocità di adsorbimento V , (in moli per m^2 per s) sarà uguale alla concentrazione di antigeni in soluzione moltiplicata per la frazione di siti anticorpali liberi di reagire con l'anticorpo e per la costante di adsorbimento, K_a .

La superficie (che per ipotesi è al limite completamente coperta da un monostrato di anticorpi) totale del solido può essere divisa in due parti:

- 1) la frazione θ coperta;
- 2) la frazione $(1 - \theta)$ libera.



- + Poiché possono essere adsorbite sole quelle molecole che incidono sulla parte non ricoperta,

$$V_a = K_a \cdot [Ag] \cdot \Gamma_{\text{lim}} \cdot (1 - \theta)$$

e la velocità di desorbimento V_d , sarà invece proporzionale alla frazione di superficie coperta:

$$V_d = k_d \Gamma_{\text{lim}} \theta$$

dove:

- $V_a \equiv$ velocità di adsorbimento dell'antigene [$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$]
- $V_d \equiv$ velocità di desorbimento dell'antigene [$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$]
- $K_a \equiv$ costante di adsorbimento della reazione [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
- $K_d \equiv$ costante di desorbimento della reazione [s^{-1}]
- $[Ag] \equiv$ concentrazione di antigene in soluzione [M]
- $\Gamma_{\text{lim}} \equiv$ densità superficiale di siti anticorpali di legame [mol cm^{-2}]
- $\theta \equiv$ frazione di legame ricoperta
- $1 - \theta \equiv$ frazione di legami libera
- $\theta_{eq} \equiv$ frazione di legame ricoperto all'equilibrio



All'equilibrio, $V_a = V_d$ e, quindi:

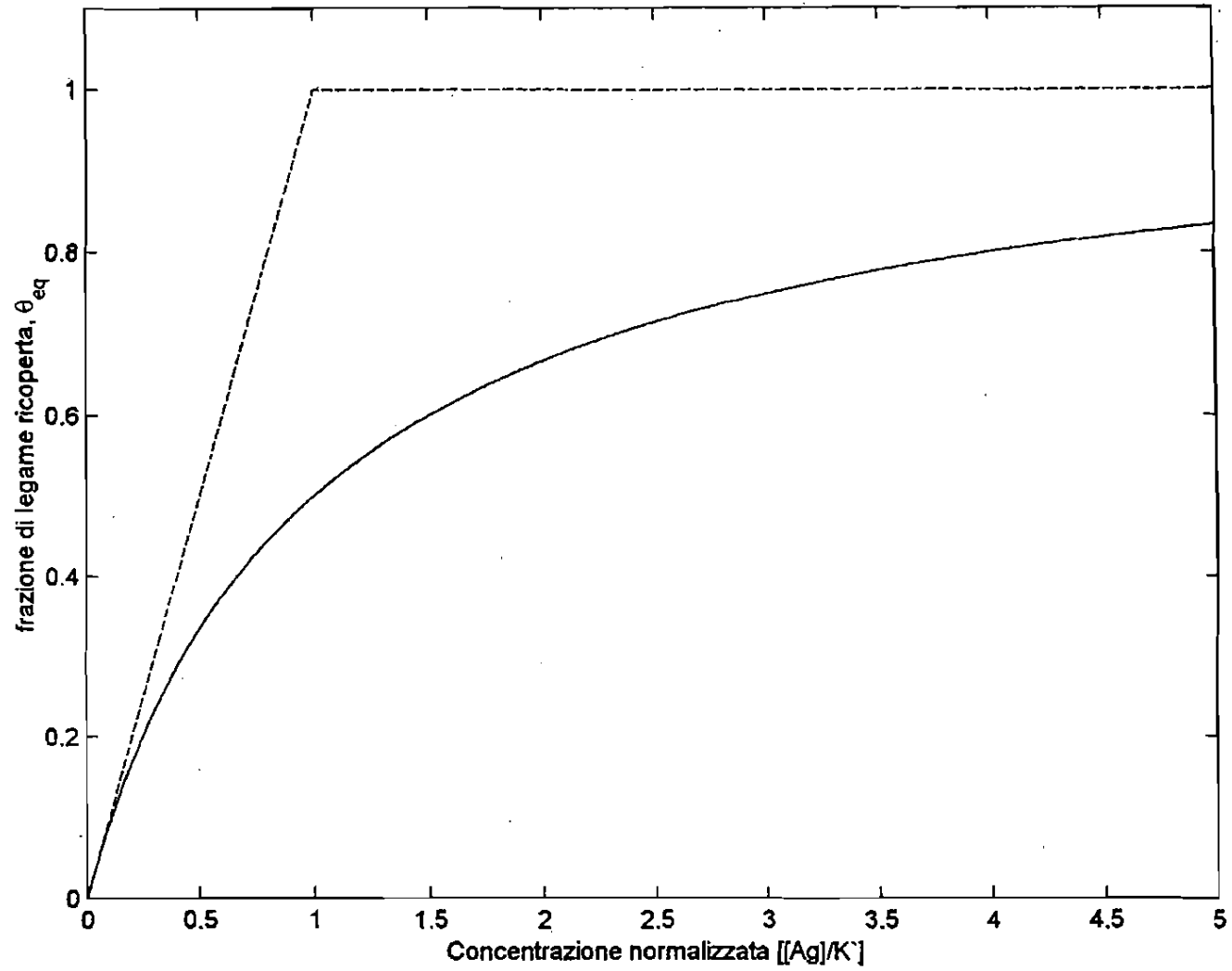
$$K_a \cdot [Ag] \cdot \Gamma_{\text{lim}} \cdot (1 - \theta_{eq}) = K_d \cdot \Gamma_{\text{lim}} \cdot \theta_{eq} \quad (20)$$

Si chiama costante di dissociazione della reazione Ab-Ag (eterogenea) immobilizzata, la quantità K' (dimensioni: [M]):

$$K' = \frac{K_d}{K_a}$$

$$\theta_{eq} = \frac{[Ag]_{eq}}{[Ag]_{eq} + K'}$$







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 (Adenina-Timina e Guanina-Citosina per DNA e Adenina-Uracile e Guanina-Citosina 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.





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 o analisi del fenotipo cellulare (espressione RNA), non hanno le esigenze di altri tipi di biosensori, ad esempio veloci tempi di risposta, uso in-vivo ecc.





Fino ad 30 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.

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, elettrico o ottici. Tuttavia, questi primi tipi di sensore non hanno avuto gran successo, soprattutto perchè rispetto a tecniche tradizionali come Western Blotting e elettroforesi non offrivano particolari vantaggi in termini di tempi o facilità di uso.



I Biochip: la nuova generazione di sensori

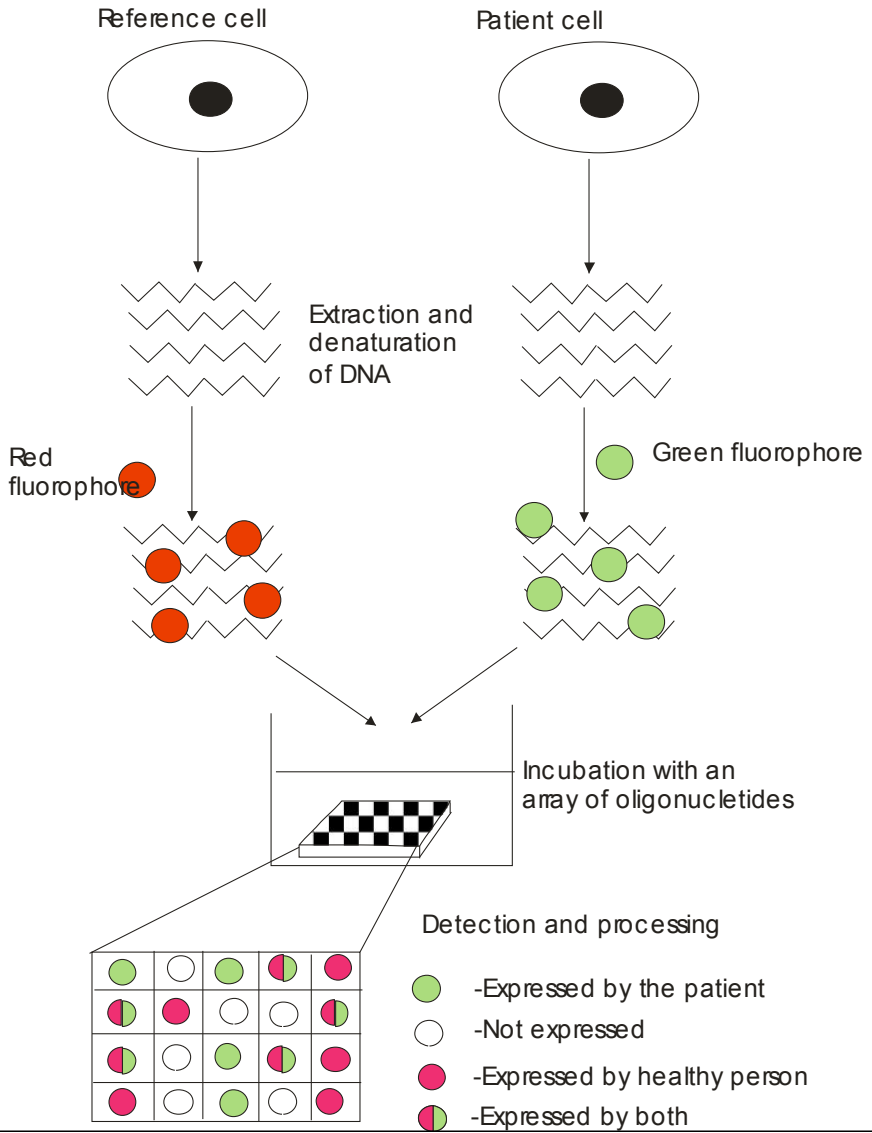
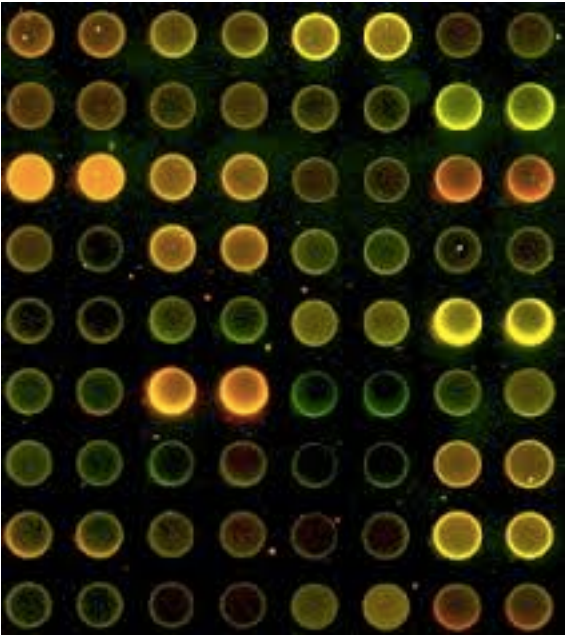
Gli sviluppi più recenti nascono dalla scoperta di metodi di sequenziamento molto rapidi, e quindi il sequenziamento del genoma umana. Con la rivelazione del codice genetico, la necessità di poter analizzare un gran numero di sequenze in maniera rapida, ma non necessariamente quantitativa è stata evidenziata.

La matrice che forma il **BIOCHIP** 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 genechip, 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.



Step necessari alla realizzazione del Biochip

- 1) Preparazione della sonda
- 2) Immobilizzazione della sonda
- 3) Preparazione e marcatura del target
- 4) Ibridizzazione
- 5) Lettura della matrice
- 6) Elaborazione del segnale



APPLICAZIONI

Espressione Comparativa

Il principio del 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 genetica 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 gran utilizzo per razionalizzare e personalizzare le terapie a malattie di tipo virale o dovute ad altri agenti patogeni.

Problemi associati con la rivelazione di acidi nucleici

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 inter cellulare, 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 perchè 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. Per amplificare la quantità di DNA viene fatta una PCR.

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 perchè 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 genetici 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 modulando la temperatura al momento della rivelazione, è possibile scegliere il grado di complementarietà.