



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
TESI DI LAUREA

UN BIOSENSORE PER L'ANALISI DELL'IBRIDAZIONE DEL DNA
IMMOBILIZZATO SU SUPERFICI D'ORO:
MISURE VOLTAMMETRICHE E DI SPETTROSCOPIA
D'IMPEDENZA

RELATORE: Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella

CORRELATORE: Dott. Alessandro De Toni

LAUREANDO: Davide Fagherazzi

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA ELETTRONICA

A. A. 2010 - 2011

Sommario

Negli ultimi anni sono stati sviluppati biosensori capaci di determinare sequenze di DNA, sfruttando la reazione di ibridazione tra una sonda immobilizzata sulla superficie del sensore e la sequenza bersaglio in soluzione. Il campione di DNA è, generalmente, un amplificato di DNA ottenuto mediante la reazione polimerasica a catena (PCR). Con questo tipo di approccio, accoppiando diversi sistemi di trasduzione (elettrochimico, ottico e piezoelettrico), sono stati realizzati vari biosensori capaci di determinare sequenze specifiche, complementari alla sonda immobilizzata, in campioni di amplificati PCR. Le applicazioni vanno dall'analisi ambientale per la presenza di microrganismi patogeni, alla diagnostica clinica per lo screening di mutazioni genetiche, all'analisi alimentare per la ricerca di organismi geneticamente modificati (OGM).

La possibilità di determinare sequenze di interesse direttamente in campioni di DNA genomico non amplificato rappresenta uno dei problemi di frontiera nel campo dei biosensori a DNA.

L'obiettivo di questa tesi è l'analisi di un nuovo tipo di dispositivo planare con elettrodi d'oro integrati per la rilevazione di eventi di ibridazione del DNA, semplice, integrato ed economico che superi i limiti imposti da altri sistemi di rilevazione più complessi e costosi.

Nel primo capitolo si troverà un'introduzione alla molecola del DNA, alla sua struttura e ai processi che ne regolano la duplicazione e la ricombinazione. Seguirà poi nel capitolo 2 una spiegazione dei fenomeni elettrochimici che stanno alla base di tutti i risultati raccolti attraverso le misure. Questa prima parte si conclude con una panoramica sullo stato dell'arte dei biosensori per l'analisi del DNA presentata nel capitolo 3.

Nei capitoli successivi si entrerà nel vivo della parte sperimentale della tesi. Nel capitolo 4 verranno elencati e descritti strumenti e materiali adoperati nelle misure poi, nella prima parte del capitolo 5 verranno esposti i risultati delle analisi compiute sul dispositivo per caratterizzarne il comportamento per concludere infine con i risultati relativi alla rilevazione degli eventi di ibridazione.

Indice

SOMMARIO.....	1
CAPITOLO 1 - DNA E IBRIDAZIONE.....	3
1.1 IL DNA	3
1.1.1 STRUTTURA DEL DNA.....	3
1.1.1.1 NUCLEOTIDI: COMPONENTI ELEMENTARI DEGLI ACIDI NUCLEICI.....	3
1.1.1.2 POLINUCLEOTIDI.....	5
1.1.1.3 STRUTTURA DEL DNA.....	6
1.1.2 PROCESSI LEGATI AL DNA.....	9
1.1.2.1 REPLICAZIONE.....	9
1.1.2.2 TRASCRIZIONE E TRADUZIONE.....	11
1.2 IBRIDAZIONE	12
1.2.1 DENATURAZIONE E RINATURAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI	14
1.2.2 CINETICHE DI RIASSOCIAZIONE	16
1.2.3 ADSORBIMENTO SU SUPERFICI D'ORO.....	18
CAPITOLO 2 – ELEMENTI DI ELETTROCHIMICA DI SUPERFICI.....	21
2.1 MODELLI DI INTERFACCIA.....	21
2.1.1 IL DOPPIO STRATO ELETTRICO.....	21
2.1.2 MODELLO DI HELMHOLTZ.....	25

2.1.3	IL MODELLO DI GOUY-CHAPMAN	25
2.1.4	MODELLO DI STERN.....	27
2.2	TECNICHE DI INDAGINE.....	29
2.2.1	SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA ELETTROCHIMICA.....	29
2.2.1.1	MODELLI INTERPRETATIVI DEI DATI EIS.....	31
2.2.1.2	MODELLI ELETTROCHIMICI NOTEVOLI.....	31
2.2.2	MISURE DI VOLTAMMETRIA.....	35
2.2.2.1	PREMESSA.....	35
2.2.2.2	TRASPORTO DI MATERIA.....	36
2.2.2.3	VOLTAMMETRIA.....	38
2.2.2.4	VOLTAMMETRIA DIFFERENZIALE AD IMPULSI.....	39
CAPITOLO 3 – BIOUSENSORI PER L’ANALISI DEL DNA.....		41
3.1	BIOUSENSORI	41
3.1.1	CARATTERISTICHE PRINCIPALI.....	41
3.1.2	FATTORI DI EFFICIENZA.....	44
3.2	SENSORI ELETTROCHIMICI DI DNA.....	44
CAPITOLO 4 – APPARATO SPERIMENTALE.....		47
4.1	IL BIOUSENSORE	47
4.1.1	CARATTERISTICHE DEL DISPOSITIVO.....	47
4.1.2	STRUTTURA E PROCESSO DI COSTRUZIONE.....	48
4.1.3	CONVENZIONI SUGLI ELETTRODI.....	49
4.2	SONDE E TARGET UTILIZZATI	50
4.3	STRUMENTAZIONE	51
4.3.1	SOLARTRON SI1260 IMPEDANCE/GAIN-PHASE ANALYZER	53

4.3.2	CH 440A ELECTROCHEMICAL ANALYZER	54
4.3.3	HP - AGILENT 3458A	55
4.3.4	ITA 11 THERMOCOUPLE MODULE	56
4.4	SOFTWARE DEDICATI	57
4.4.1	MISURE EIS	57
4.4.2	MISURE DPV	59
4.4.3	MISURE DI TEMPERATURA.....	61
	CAPITOLO 5 – MISURE EFFETTUATE.....	63
5.1	CONFRONTO CON MISURE EFFETTUATE SU DISPOSITIVO A MICROELETTRODI..	64
5.2	MISURE SUL BIOSENSORE <i>FRESH</i>	65
5.2.1	INFLUENZA DELLA GEOMETRIA DEGLI ELETTRODI SULLA DISPERSIONE DELLE MISURE	66
5.2.2	RISPOSTA CON SOLUZIONE ELETTROLITICA $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	69
5.2.3	DEGRADAZIONE DELLA SUPERFICIE D'ORO NELLE MISURE DI VOLTAMMETRIA	75
5.3	MISURE CON DEPOSIZIONE DEL PROBE.....	77
5.3.1	EFFETTI DELLA DEPOSIZIONE	77
5.3.2	DINAMICA DELLA DEPOSIZIONE	80
5.3.3	RISPOSTA A DIVERSE CONCENTRAZIONI DI DNA PROBE.....	82
5.4	MISURE DI IBRIDAZIONE.....	85
5.4.1	ANOMALIA DI COMPORTAMENTO DELL'ELETTRODO DI CONTROLLO...88	
	CONCLUSIONI.....	89
	APPENDICE – PROCEDURE DI DEPOSIZIONE E IBRIDAZIONE.....	91
A.1	DEPOSIZIONE DEL PROBE.....	91
A.2	IBRIDAZIONE DEL TARGET.....	91

BIBLIOGRAFIA..... 93

Capitolo 1

DNA e ibridazione

Tutte le misure realizzate hanno come unico scopo quello di poter realizzare un rilevatore di DNA il più possibile efficiente, sensibile e veloce. Perciò è indispensabile conoscere questa molecola fondamentale per la vita: da quali elementi è composta, com'è fatta e come si comporta in particolari casi come nella fase di duplicazione o di ricombinazione. In questo capitolo verranno presentati brevemente questi aspetti basilari e alcune procedure che permettono di modificare e utilizzare la molecola di DNA in opportuni sistemi.

1.1 IL DNA

1.1.1 STRUTTURA DEL DNA

Il DNA (acronimo per acido deossiribonucleico) è una macromolecola biologica che riveste un ruolo cruciale per la vita, dal momento che contiene le informazioni genetiche di un individuo vivente, informazioni che possono essere codificate e che sono indispensabili per la sintesi delle proteine negli organismi viventi. Il DNA è un acido nucleico, perché è localizzato essenzialmente nel nucleo delle cellule, mentre il suo corrispettivo extranucleico è detto RNA. L'RNA ha la funzione di portare le informazioni del DNA al di fuori del nucleo, ma la trattazione delle loro proprietà è analoga.

1.1.1.1 NUCLEOTIDI: COMPONENTI ELEMENTARI DEGLI ACIDI NUCLEICI

Formalmente, il DNA può essere considerato un polimero, di cui ogni monomero, detto *nucleotide*, è composto da tre parti:

- 1) uno *zucchero pentoso* (uno zucchero ciclico a cinque atomi di carbonio): il ribosio nel caso dell'RNA e il 2-deossiribosio nel caso del DNA (la differenza è che quest'ultimo in posizione 2 non ha un gruppo –OH ma un semplice –H). Gli atomi di carbonio dello zucchero vengono numerati, a partire dal C legato alla funzione dello zucchero (gruppo –OH) e indicati con un apice (per esempio C-1').
- 2) un *gruppo fosfato*
- 3) una *base azotata*. Esistono due tipi di base azotata: ad anello doppio (*purine*) o ad anello singolo (*pirimidine*). Negli acidi nucleici si trovano due purine, l'adenina e guanina, e tre tipi di pirimidine, citosina, timina (solo nel DNA) e uracile (solo nell'RNA). Queste basi sono indicate con la loro lettera iniziale maiuscola: A, G, C, T, U.

Se una molecola è composta da una base purinica o pirimidinica e da un zucchero pentoso, l'unità chimica viene indicata come *nucleoside*. Il legame avviene tra l'atomo C-1' dello zucchero e l'atomo di azoto in posizione 9 della purina, oppure, per la guanina, in posizione 1. Se viene aggiunto un gruppo fosfato al *nucleoside* (legato al C-5'), la molecola viene indicata come *nucleotide*, che prende nome dalla base azotata che contiene.

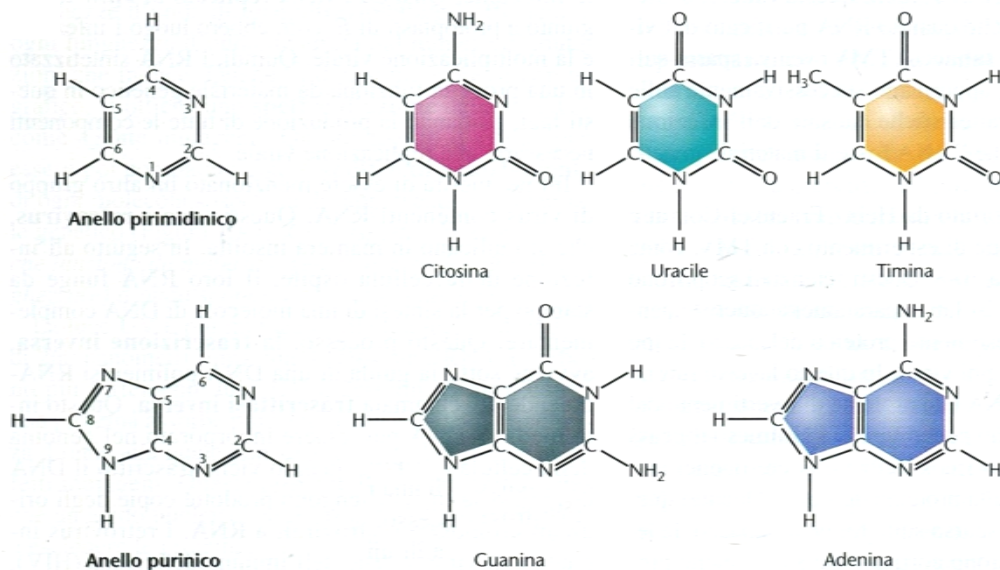


Fig.1.1 Struttura chimica delle pirimidone e purine che costituiscono le basi azotate nell'RNA e nel DNA. La nomenclatura per le numerazione degli atomi di carbonio e azoto che compongono le due basi è indicata dentro le strutture riportate a sinistra.

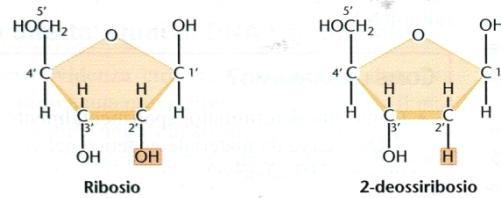


Fig.1.2 Strutture ad anello del ribosio e del 2-deossiribosio, che sono gli zuccheri pentosi, rispettivamente, presenti nell'RNA e nel DNA.

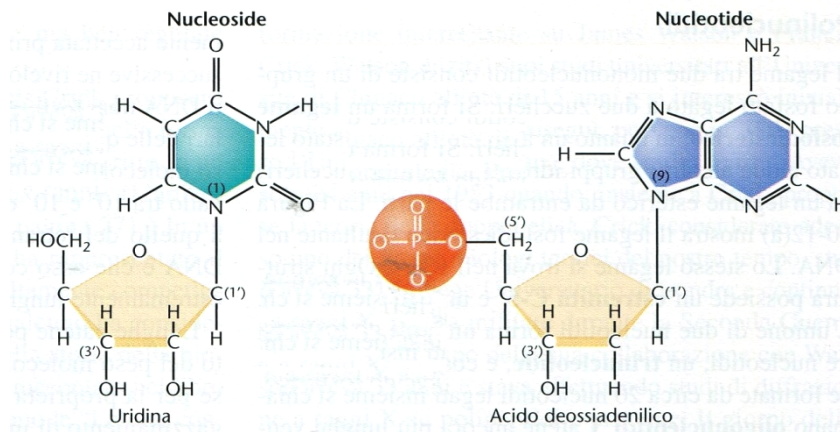


Fig.1.3 Strutture e nomi dei nucleosidi e nucleotidi di RNA e DNA

1.1.1.2 POLINUCLEOTIDI

Il legame tra due mononucleotidi consiste in un gruppo fosfato legato a due zuccheri, legame chiamato *fosfodiesterico*, attraverso le funzioni alcoliche dei due zuccheri. Ogni legame coinvolge una funzione sul C-5' e una sul C-3', pertanto è possibile individuare per ogni catena di acido nucleico un'estremità C-5' e una C-3'. A seconda del numero di mononucleotidi legati tra di loro, si può avere un di/tri/nucleotide. Brevi catene formate da 20 nucleotidi legati insieme si chiamano *oligonucleotidi*. Catene ancora più lunghe vengono indicate con il nome di *polinucleotidi*.

1.1.1.3 STRUTTURA DEL DNA

Il DNA è una molecola ad altissimo peso molecolare, dell'ordine dei 10^6 - 10^9 dalton, in quanto è composto da migliaia di nucleotidi, che possono combinarsi tra di loro a formare un numero elevato di combinazioni (precisamente, 4^N con N il numero di nucleotidi presenti). Questa incredibile varietà di strutture è la chiave del ruolo del DNA nella codifica e nella trasmissione delle informazioni genetiche, che possono essere espresse a partire da sole 4 unità di base.

Negli anni '50, pur essendo nota la composizione chimica delle basi del DNA e le loro percentuali relative (le percentuali di A e T, e di C e G erano quasi equimolari, mentre non erano equimolari le percentuali di A+T e C+G), rimaneva aperto il problema della struttura di questo polimero biologico. Nel 1953, James Watson e Francis Crick, basandosi sui dati cristallografici di Rosalind Franklin, proposero un modello di struttura del DNA che si rivelò corretto. Le caratteristiche principali del modello sono le seguenti [1]:

1. È formato da due catene polinucleotidiche avvolte intorno a un'asse centrale, formando una doppia elica destrorsa.
2. Le due catene sono antiparallele, cioè le loro orientazioni da C-5' a C-3' corrono in direzioni opposte. La natura antiparallela del DNA è resa necessaria dalla rigidità della catena, che è caratterizzata da definiti angoli e lunghezze di legame, e se le due catene corressero parallele l'accoppiamento non sarebbe così semplice.
3. Le basi delle due catene sono distanziate l'una dall'altra di 3,4 Å, e sono rivolte verso l'interno dell'elica, perpendicolarmente all'asse dell'elica e impilate una sull'altra.
4. Le basi sono accoppiate una all'altra e sono legate da ponti a idrogeno. In particolare, questi accoppiamenti sono univoci, e sono A=T (A=U nell'RNA), e G≡C, e sono garantiti dalla natura chimica delle basi azotate, in quanto A e T possono dare due legami a idrogeno, mentre le altre basi ne danno tre.
5. Ogni giro completo dell'elica è lungo 34 Å, quindi in ogni catena si trovano 10 basi per giro.
6. Il diametro della catena esterna è di 2 nm, mentre la lunghezza può raggiungere i 9 cm.

7. In ogni segmento della molecola, si rendono visibili lungo l'asse, in alternanza, un solco maggiore e uno minore.

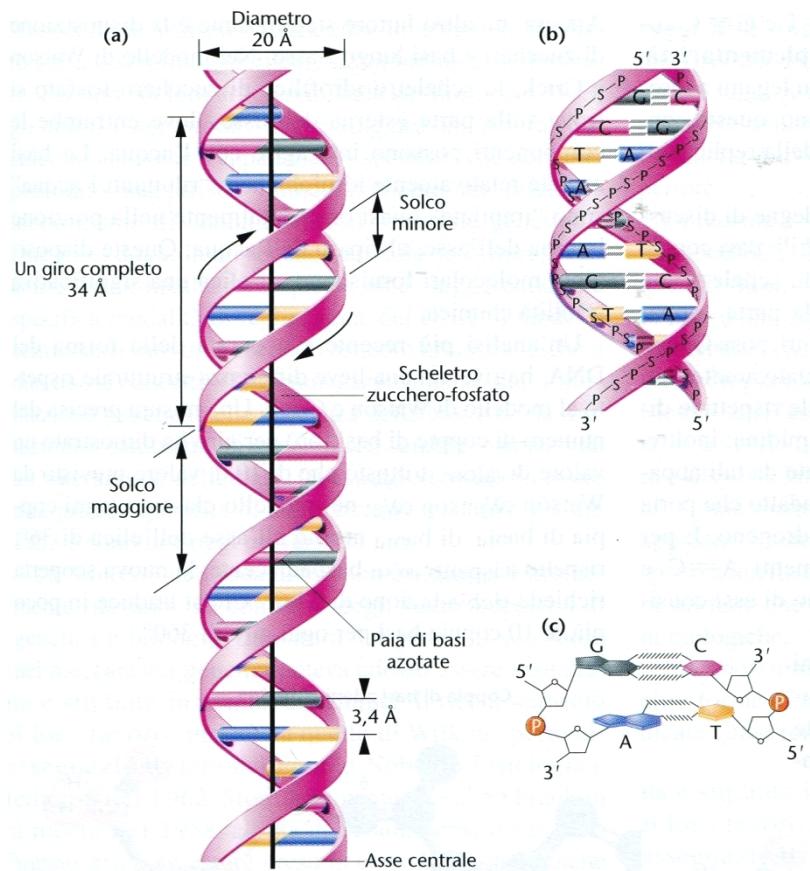


Fig.1. 4 (a) La doppia elica del DNA, come proposta da Watson e Crick. Le catene fatte a nastro costituiscono gli scheletri zucchero-fosfato, e i pioli orizzontali costituiscono le coppie di basi azotate, presenti in numero di 10 per giro completo. Sono evidenti i solchi maggiore e minore. La barra solida verticale rappresenta l'asse centrale. (b) Una visione dettagliata che descrive basi, zuccheri, fosfati e legami idrogeno dell'elica. (c) Dimostrazione della natura antiparallela dell'elica e dell'impilamento orizzontale delle basi. [1]

Oltre a questa forma, il DNA possiede altre isoforme naturali, chiamate A, B, Z, in cui cambiano alcuni parametri strutturali, come il diametro della doppia elica, oppure la distanza tra i due filamenti. La forma A è prevalente in condizioni di deidratazione o di elevata salinità, è più compatta, avendo 9 nucleotidi per giro di elica e 23 Å di diametro. Inoltre, in condizioni di laboratorio sono state scoperte altre tre forme di elica destrorsa: C, D, E.

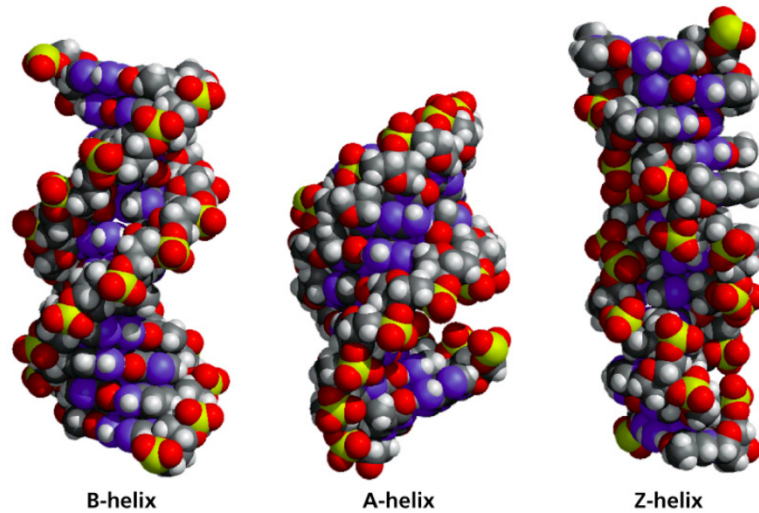


Fig.1. 5 Modelli spaziali generati al computer delle forme B, A e Z.

Infine, il DNA può legarsi anche come tripla elica.

Il DNA si organizza in *nucleosomi*, cioè si avvolge strettamente intorno a proteine basiche dette istoni. Una catena di DNA, organizzata in polinucleosomi, si organizza poi in anse su una struttura polisaccarica detta *scaffold*, che costituisce lo scheletro del cromosoma, quella parte di nucleo nella quale è possibile individuare un preciso gene. Ogni gene è responsabile di una particolare caratteristica fisica di un individuo. In questa maniera una sequenza molto lunga viene impaccata in uno spazio contenuto come quello del nucleo cellulare.

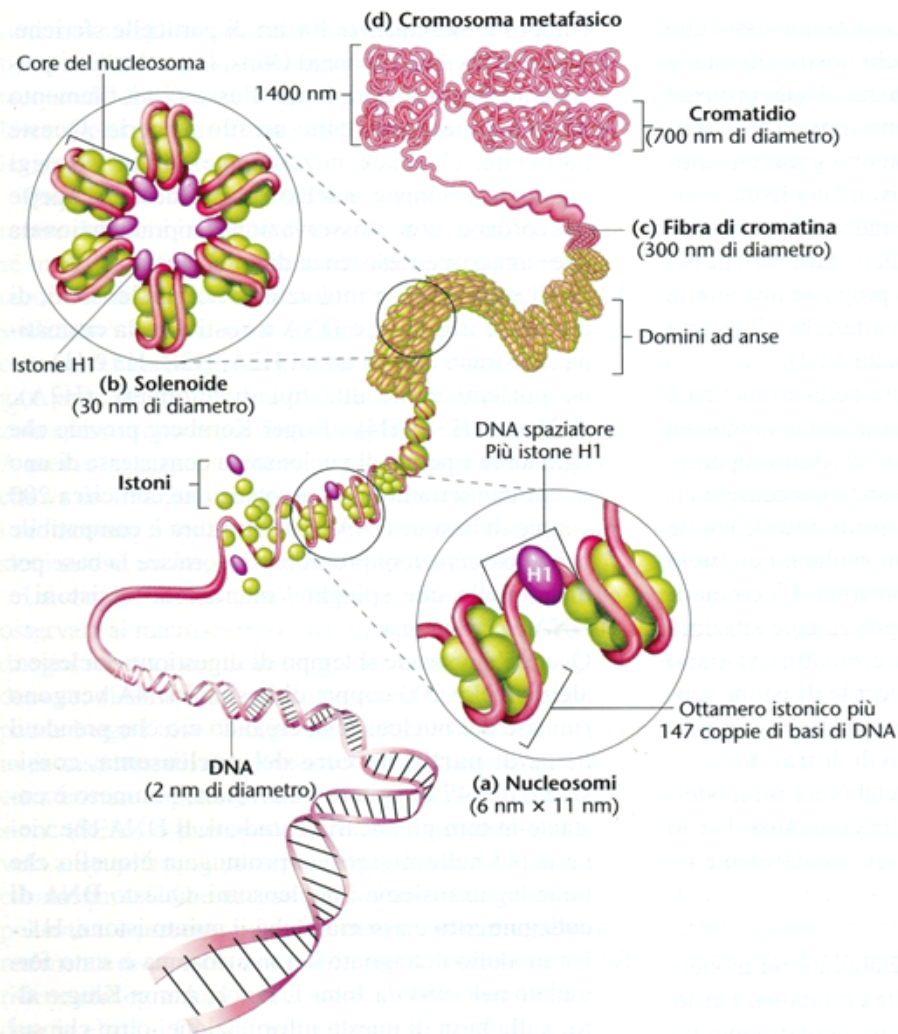


Fig.1. 6 Modello generale dell'associazione di istoni e DNA nel nucleosoma, che mostra il modo in cui la fibra di cromatina può essere avvolta in una struttura più condensata, dando luogo, infine, a un cromosoma mitotico.

1.1.2 PROCESSI LEGATI AL DNA

Verranno di seguito presentati alcuni processi legati alla molecola di DNA che aiutano a comprenderla meglio.

1.1.2.1 REPLICAZIONE

In seguito a denaturazione (si ricorda che i legami a idrogeno non sono molto forti, sono dell'ordine dei 10-40 kJ/mol), ogni filamento singolo di DNA può fungere da

template (stampo) per un altro filamento complementare, che accoppiandosi può dare a sua volta di nuovo l'elica di partenza. Il risultato sono due eliche "figlie", ognuna delle quali è un duplicato del DNA iniziale (vedi figura 1.7). Questo processo è chiamato *replicazione semiconservativa*, in quanto viene mantenuto un filamento di DNA "vecchio" e ne viene creato uno nuovo. Sono possibili altre forme di replica, come quella *conservativa*, in cui vengono creati due filamenti nuovi, ma questi ultimi si accoppiano tra di loro, lasciando i filamenti genitori liberi di riaccoppiarsi tra di loro. Un altro tipo è la conservazione dispersiva, in cui porzioni di DNA matrice vengono dispersi all'interno del filamento figlio. Questa è la via meno probabile delle tre, per la complessità del fenomeno, che richiede la scissione del frammento iniziale. All'interno della cellula, quest'operazione viene svolta da opportuni enzimi, chiamati DNA-polimerasi, in quanto il loro compito è di favorire la polimerizzazione dei mononucleotidi presenti nel citoplasma.

Molti altri enzimi (che non sono altro che proteine dalla struttura terziaria molto complessa) intervengono nel processo di duplicazione del DNA: le DNA-elicasi svolgono le eliche complementari, aprendole come una cerniera, mentre le girasi impediscono che esse si avvolgano di nuovo.

La replicazione avviene a partire dall'estremo 5' a 3'. Poiché la replicazione avviene contemporaneamente sui due filamenti che però sono antiparalleli, un filamento (detto *leading*) è sintetizzato in continuo, mentre l'altro (detto *lagging*) è sintetizzato in modo discontinuo, con la formazione dei cosiddetti frammenti di Okazaki, corte catene di DNA che servono a far procedere al contrario la DNA-polimerasi per piccoli tratti (vedi figura 1.8).

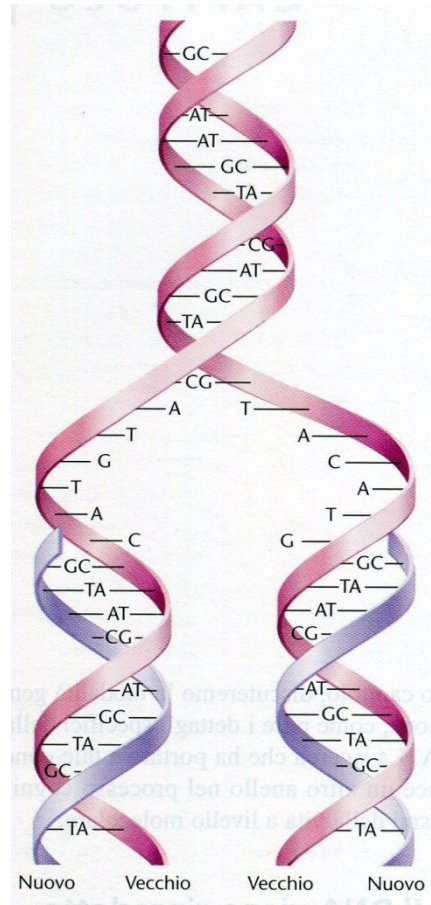


Fig.1.7 Modello generalizzato di replicazione semiconservativa del DNA. L'elica di nuova sintesi è mostrata in viola.

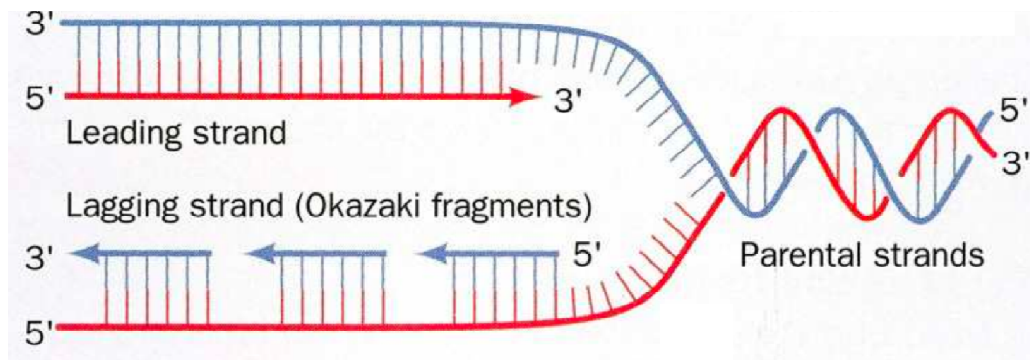


Fig.1. 8Formazione dei frammenti di Okazaki uniti tra loro dalla DNA ligasi

Il punto di partenza dal quale si apre il DNA è detto punto d'origine della duplicazione. Questa procede in entrambe le direzioni, attraverso le due forcelle di duplicazione che si spostano nelle due direzioni opposte. La duplicazione è controllata da enzimi che possono fermarla in caso di basi non correttamente appaiate.

1.1.2.2 TRASCRIZIONE E TRADUZIONE

Il passo successivo alla replicazione del DNA (che avviene durante la mitosi cellulare) è la trascrizione dell'informazione genetica, che peraltro avviene con un meccanismo analogo. Il DNA viene svolto e la doppia elica aperta, ma invece di dare origine a due nuove eliche di DNA esso viene trascritto su un filamento complementare di RNA, che rimane singolo, non forma una doppia elica. Quest'ultimo ha il compito, fuoriuscendo dal nucleo cellulare, di portare le informazioni del DNA (RNA messaggero, o mRNA). In sostanza, l'informazione contenuta nel DNA è costituita da una sequenza di tre nucleotidi. Essendo 4 i nucleotidi, in tutto si hanno 64 combinazioni possibili, ognuna delle quali è detta codone. Il codone trova una sua corrispondenza complementare in un tratto di un filamento di tRNA (RNA di trasporto), detto anticodone. Il tRNA porta con sé un aminoacido: pertanto, ad ogni codone fa corrispondere un aminoacido, e in questo modo, seguendo la precisa sequenza scritta nel DNA e trascritta fedelmente, vengono sintetizzate le proteine, che sono a loro volta biopolimeri i cui monomeri sono i 20 aminoacidi proteici. La sintesi delle proteine avviene su organelli chiamati ribosomi, costituiti da filamenti di rRNA (RNA ribosomiale) e da materiale peptidico.

Il processo di trascrizione è estremamente preciso. Considerando che nei 23 cromosomi umani ci sono 3×10^9 di coppie di basi, anche solo un errore su un milione porta a 3000 errori ad ogni ciclo riproduttivo di repliche del genoma.

1.2 IBRIDAZIONE

Caratteristica fondamentale del DNA è quella della complementarità delle sue basi. Due filamenti possono accoppiarsi e legarsi tra di loro come una cerniera solo se le basi sono esattamente complementari una all'altra. Il processo di accoppiamento è detto ibridazione. In realtà, due eliche possono dare luogo a una parziale ibridazione, non perfetta e con un contenuto energetico maggiore che la porta ad essere instabile, e facilmente deteriorabile in condizioni opportune (ad esempio, fornendo energia termica, oppure in soluzioni concentrate di elettroliti).

È possibile sfruttare questa caratteristica, che è alla base della trascrizione delle informazioni genetiche, per realizzare dei sensori biologici (come quello oggetto di questo lavoro di tesi). Un tratto di DNA *target*, che costituisce l'informazione che si intende ricavare da un campione (miscela di DNA o RNA appartenenti ad organismi diversi), si accoppia solo o preferibilmente con un tratto di DNA complementare, detto DNA *probe* (sonda). Con le moderne tecniche di ingegneria molecolare, si utilizzano filamenti di DNA clonati immobilizzati su superfici solide, fino ad arrivare ai *microarray* che permettono il riconoscimento di migliaia di sequenza in parallelo. Negli ultimi anni infine sono stati sviluppati anche sistemi alternativi che sfruttano altre caratteristiche fisiche, come la carica o la rifrangenza ottica, per individuare il *target*.

Esistono 3 tipi di sonde (probe):

- a) *sonde di DNA*, (che sono quelle utilizzate in questo esperimento), vengono isolate clonando il DNA tramite sistemi cellulari o amplificandolo tramite PCR. Nel primo caso le sonde hanno dimensioni più grandi, da 0,1 a centinaia di kilobasi, e solitamente sono in forma di doppia elica. Si ottengono così sonde della lunghezza massima di 10 Kb. Le sonde da noi utilizzate sono lunghe circa 20 paia di basi (si veda capitolo 4.2).
- b) *sonde di RNA*, vengono ottenute facilmente da DNA donato in vettori plasmidici specifici (vettori di espressione).

- c) *sonde oligonucleotidiche*, costituite da segmenti di DNA a singolo filamento lunghi da 15 a 50 basi, prodotti per sintesi chimica aggiungendo mononucleotidi uno dopo l'altro.

Nelle tecniche di ibridazione una popolazione nota di DNA *probe* è messa a contatto con una popolazione eterogenea e complessa di DNA *target*: i filamenti vengono prima denaturati e si lasciano poi riassociare.

La denaturazione del DNA a doppio filamento si ottiene scaldando una soluzione di DNA a una temperatura in grado di rompere i legami idrogeno che ne tengono uniti i due filamenti complementari. L'energia richiesta dipende da numerosi fattori tra i quali la lunghezza del filamento, la composizione in basi e l'ambiente chimico (presenza di cationi stabilizzanti la catena) [2]. Un'utile misura della stabilità della doppia elica è la *temperatura di fusione* T_m , ossia la temperatura corrispondente al punto di mezzo nella transizione che si osserva dalla forma a doppio filamento alla forma a singolo filamento (si veda anche il prossimo paragrafo). Nel nostro esperimento la T_m nel caso di *match* è circa 90°C, mentre nel caso di *mismatch* essa scende a 23°C; in tal modo alla temperatura di lavoro, attorno ai 60° C, è molto ridotta la possibilità di appaiamenti errati. La T_m può essere determinata sperimentalmente, ma più spesso viene calcolata mediante la semplice formula [3]:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T]) \text{ } ^\circ\text{C} \quad (1.1)$$

in cui $[G + C]$ è il numero di nucleotidi G e C e $[A + T]$ è il numero di nucleotidi A e T presenti nella sequenza.

La riassociazione della doppia elica di DNA avviene abbassando la temperatura in condizioni adeguate di concentrazione di ioni monovalenti come il sodio (Na⁺). La presenza di ioni positivi, infatti, permette di mascherare la carica negativa del DNA *target* eliminando, così, la forza repulsiva tra cariche di ugual segno (in questo caso cariche negative) che sarebbe altrimenti presente nei confronti del *probe* e che andrebbe a impedire la ricombinazione dei due filamenti aperti. La cinetica di riassociazione è determinata da due parametri principali: la concentrazione di partenza di DNA e la durata della reazione.

In tal modo filamenti complementari della sonda possono ricombinarsi fra loro (*omoduplex*) e lo stesso possono fare quelli del bersaglio; alcuni filamenti della sonda, però, si appaieranno con filamenti complementari del DNA bersaglio (*target*) creando

eteroduplex. Nella maggior parte dei saggi di ibridazione si utilizza un eccesso di sonda in modo da facilitare la formazione di *eteroduplex* sonda-bersaglio, dato che il bersaglio può essere molto eterogeneo [2].

Per poter esaminare gli effetti di tale combinazione è necessario che uno dei componenti (sonda o bersaglio) venga marcato in modo da poter essere identificabile.

La marcatura del DNA fu sviluppata intorno al 1980 ed è risultata molto utile in varie applicazioni come l'ibridazione *in situ* su cromosomi o su tessuti e il sequenziamento automatico di DNA. Oggi i marcatori fluorescenti vengono utilizzati per marcare direttamente gli acidi nucleici incorporando un nucleotide modificato che contiene un appropriato *fluoroforo*, cioè un gruppo chimico che emette fluorescenza se esposto a luce di una determinata lunghezza d'onda. I fluorofori comunemente usati sono la fluoresceina, un colorante verde, la rodamina, di colore rosso, e l'amminometilcumarina, di colore blu [2].

L'individuazione del fluoroforo si ottiene facendo passare un fascio di luce adeguata attraverso un appropriato filtro colorato, detto di eccitazione, che permette la trasmissione di luce alla lunghezza d'onda voluta. La luce eccita il fluoroforo che emette fluorescenza e luce alla lunghezza d'onda, detta di emissione, che viene catturata attraverso il microscopio da specifiche macchine fotografiche.

1.2.1 DENATURAZIONE E RINATURAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Quando avviene la denaturazione del DNA a doppio filamento, si rompono i legami a idrogeno, il DNA *duplex* si svolge e i filamenti si separano. La viscosità del DNA diminuisce, e sia l'assorbimento UV (*effetto ipercromico*) sia la densità di galleggiamento aumentano. La denaturazione può avvenire per calore o per trattamento chimico, nel primo caso si parla anche di fusione.

Poiché le coppie di basi G≡C hanno un legame in più rispetto alla coppia A=T, sono più stabili al calore. Ne consegue che il DNA contenente una proporzione maggiore di coppie G≡C rispetto ad A=T richiede temperature più elevate per denaturare completamente. Quando viene monitorato l'assorbimento a 260 nm (OD_{260}) ed espresso graficamente in relazione alla temperatura durante il riscaldamento, si ottiene un *profilo di fusione* del DNA. Il punto di mezzo di questo profilo, o curva, è detto *temperatura di fusione (melting) (T_m)* e rappresenta il punto al quale il 50% dei

filamenti sono svolti o denaturati (vedi figura 1.9). Quando la curva, al suo massimo di densità ottica, raggiunge un plateau, la denaturazione è completa ed esistono solo filamenti singoli [1]. L'analisi dei profili di fusione fornisce una caratterizzazione del DNA e un metodo alternativo per valutare la composizione in basi del DNA.

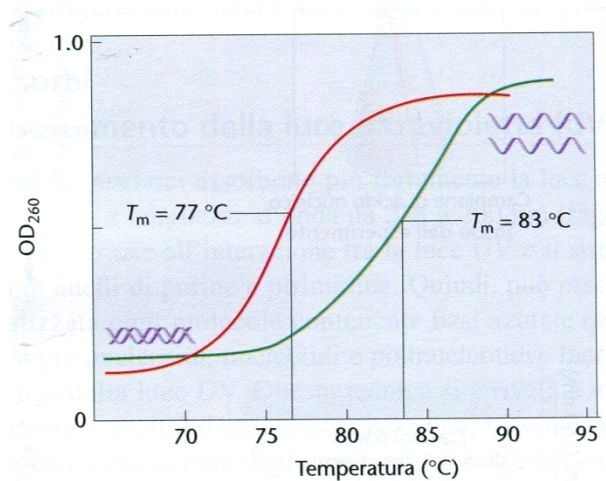


Fig.1.9 Variazione dell'aumento dell'assorbimento UV con la temperatura (effetto ipercromico) per due molecole di DNA a diverso contenuto in GC. La molecola con un punto di fusione (T_m) di 83°C ha un contenuto maggiore in GC rispetto alla molecola con una T_m di 77°C.

Il processo di denaturazione è anche reversibile, e questo processo inverso di riaccoppiamento rappresenta la base di importanti tecniche analitiche. Se il DNA è stato denaturato termicamente, viene raffreddato lentamente, in modo da diminuire l'agitazione termica dei filamenti, favorire l'incontro tra gli stessi, e portare l'energia del sistema al di sotto di quella dei legami idrogeno (che altrimenti non possono formarsi).

Poiché un filamento di DNA per ricombinarsi non necessita di trovarsi a contatto con il filamento proveniente dal *duplex* di partenza, ma è sufficiente l'identità di basi complementari, è possibile ottenere ibridi molecolari anche tra tratti di DNA provenienti da organismi molto diversi. Inoltre, è possibile che avvenga ibridazione anche quando vengono usate miscele di DNA e RNA a singolo filamento.

1.2.2 CINETICHE DI RIASSOCIAZIONE

Nel 1968, R. Britten e D. Kohne descrissero l'equazione *cot* che definisce la cinetica di riassociazione del DNA. In una delle procedure di ibridazione molecolare viene analizzata la velocità di riassociazione di singoli frammenti di DNA complementare. Il DNA viene inizialmente frammentato in piccoli pezzetti, come risultato delle forze di taglio introdotte durante in processo di isolamento del filamento. Questi frammenti hanno una dimensione media di alcune centinaia di basi. Questi frammenti poi vengono dissociati in singoli filamenti con trattamento termico. Successivamente, viene abbassata la temperatura e osservata la loro riassociazione, che procede fino a completo accoppiamento di tutti i filamenti singoli. L'andamento della concentrazione dei frammenti liberi è mostrato in figura 1.10, in funzione del prodotto C_0t , dove C_0 è la concentrazione di DNA a singolo filamento, e t il tempo in minuti. Il processo segue una cinetica del secondo grado, è quindi governato da una legge del tipo:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t} \quad (1.2)$$

con C la concentrazione del DNA rimasto dopo il tempo t .

La curva di figura 1.10 mostra come all'inizio del processo gli accoppiamenti siano più lenti, successivamente, man mano che i filamenti vengono convertiti in *duplex*, gli accoppiamenti avvengono più velocemente. Nel tratto finale della curva, i filamenti rimanenti richiedono più tempo per l'accoppiamento perché la loro probabilità d'incontro è notevolmente più bassa.

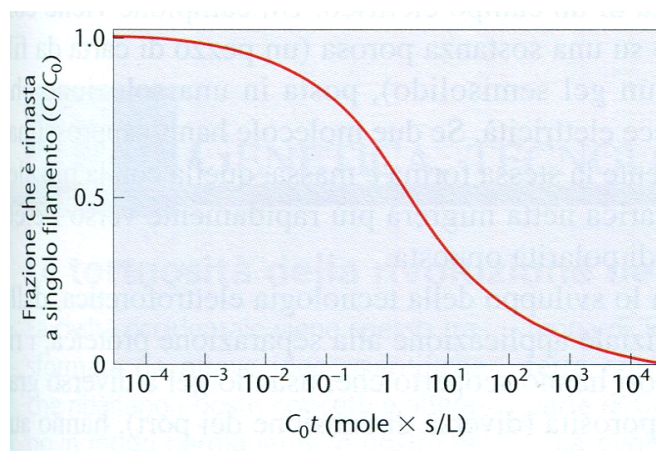


Fig.1. 10 Intervallo ideale per la riassociazione del DNA (C/C_0) quando, al tempo zero, tutto il DNA è rappresentato da frammenti a sequenza unica di filamenti complementari a singolo filamento.

Studi che confrontino la riassociazione del DNA in diversi organismi possono fornire una notevole quantità di informazioni. Ad esempio, è possibile confrontare il tempo di semireazione ($C_0t_{1/2}$), in cui metà del DNA è presente nella forma accoppiata. Ipotizzando di avere solo tratti di DNA delle dimensioni confrontabili e con sequenze nucleotidiche uniche, il tempo di semireazione varia direttamente con la complessità del DNA. La complessità rappresenta la lunghezza in coppie di nucleotidi di tutti i frammenti a sequenza unica, da estremità a estremità. Se il DNA rappresenta l'intero genoma, e se tutte le sequenze di DNA differiscono l'una dall'altra, allora X è uguale alla dimensione del genoma aploide.

Come mostrato in figura 1.11, $C_0t_{1/2}$ è direttamente proporzionale alle dimensioni del genoma. In genomi più grandi, la riassociazione avviene a velocità ridotta poiché gli appaiamenti iniziali richiedono un tempo maggiore e sono presenti quantità più elevate di frammenti a sequenza unica. Ciò è dovuto al fatto che le collisioni sono casuali: più sequenze sono presenti, più grande sarà il numero di appaiamenti errati effettuati prima di trovare tutti gli appaiamenti corretti.

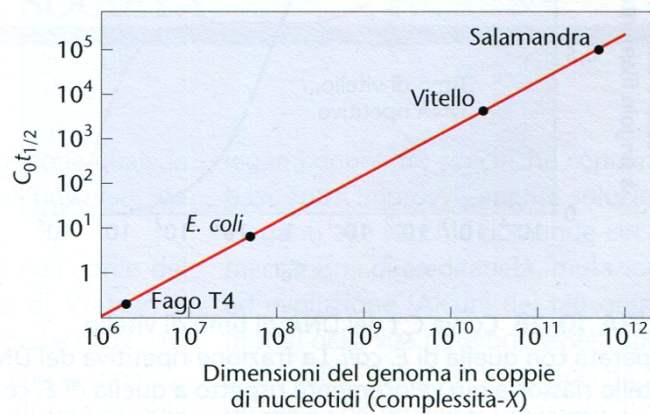


Fig.1.11 Confronto tra $C_0t_{1/2}$ e dimensioni del genoma per il fago T4, *E.coli*, vitello e salamandra

1.2.3 ADSORBIMENTO SU SUPERFICI D'ORO

Lo sviluppo di biosensori di DNA richiede un'efficiente immobilizzazione del ssDNA *probe* sulla superficie del sensore, che garantisca una distribuzione, stabilità e orientazione il più possibili controllabili.

Diversi metodi sono ad oggi disponibili per immobilizzare il DNA su superfici di substrati solidi, come l'adsorbimento chimico e fisico, il cross-linking, l'incapsulamento e l'attaccamento covalente. Per un'ottima distribuzione sulla superficie, stabilità e riproducibilità, è desiderabile attaccare le *probes* di ssDNA sulla superficie del sensore con un singolo legame covalente, preferibilmente ad uno dei due finali, 3' o 5', delle catene [4].

L'assemblamento delle catene singole di olinucleotidi (ssDNA) con il gruppo tiolo, HS, offre un metodo diretto di adsorbimento chimico delle *probes* di DNA [5]. Questo metodo si basa sulla formazione di un legame tra l'oro e il tiolo sulla superficie di un trasduttore. Lo strato d'oro, infatti, reagisce spontaneamente con lo zolfo e, attraverso una reazione di ossido riduzione, va a formare con questo un legame covalente molto forte e stabile anche in presenza di soluzione salina. Tipicamente le catene di single-stranded DNA vengono modificate con HS-(CH₂)₆ all'estremità 5' della catena come mostrato in figura 1.12. I 6 gruppi CH₂ hanno una funzione fondamentale per permettere che il DNA target vada a combinarsi con il probe: allontanano l'elica aperta dalla superficie d'oro. In questo modo le mezze eliche sono più distanti tra di loro, non sono troppo fitte, agevolando così l'ibridazione.

Per attaccare il cDNA sulla superficie degli elettrodi, quindi, è sufficiente depositare questo tipo di DNA modificato e attendere che questo si leghi spontaneamente alla superficie d'oro.

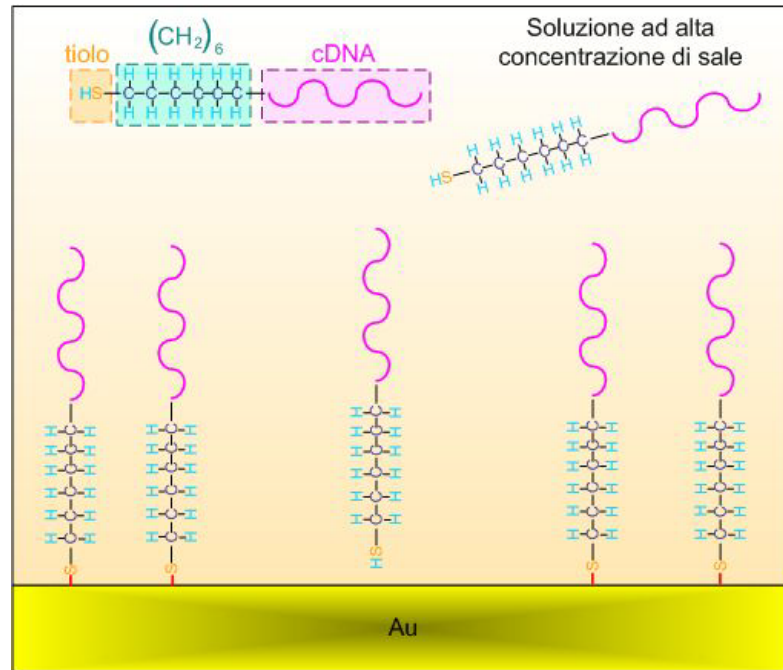


Fig.1.12 Rappresentazione schematica dei filamenti di cDNA con il gruppo tiolo legati alla superficie dell'elettrodo d'oro.

L'adsorbimento è influenzato dalla concentrazione del buffer usato: poiché le HS-ssDNA sono cariche negativamente, una soluzione con alta forza ionica (e quindi alta concentrazione di ioni positivi) permette di minimizzare la repulsione elettrostatica tra le molecole (cariche negativamente). Aumentando la concentrazione della soluzione di HS-ssDNA, quindi distanziando e tenendo separate le catene, aumenta l'adsorbimento e la copertura della superficie d'oro.

Il controllo dell'adsorbimento e della distribuzione delle HS-ssDNA è fondamentale per massimizzare l'ibridazione. E' importante, infatti, che le catene di *probe* coprano la maggior parte della superficie dell'elettrodo, e, al tempo stesso, che le catene siano sufficientemente distanziate e orientate perpendicolarmente per facilitare il legame con le catene complementari, il DNA target.

Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'adsorbimento sulla superficie d'oro delle catene nucleotidiche modificate (HS-ssDNA) avviene sia in modo "specifico" attraverso l'atomo di zolfo del gruppo tiolo, sia con un legame "non-specifico" dovuto all'azoto presente nelle basi della catena. Ciò comporta una minore copertura della superficie, poiché molte catene si trovano in una posizione orizzontale, e un cambiamento delle caratteristiche elettriche all'interfaccia elettrodo/soluzione. In particolare risulta molto limitata la capacità di ibridazione.

I legami non specifici con l'azoto possono essere rimossi con un'esposizione ad una soluzione di mercaptohexanol (MCH) [6]: questa soluzione crea uno strato misto sulla superficie d'oro, formato dalle catene *probe* ed un distanziatore con il gruppo tiolo, tenendo così separate dalla superficie dell'elettrodo le catene di *probe*, e in posizione maggiormente verticale. in questo modo, un'alta percentuale di HS-ssDNA è accessibile all'ibridazione.

Capitolo 2

Elementi di elettrochimica di superficie

Nella parte iniziale di questo capitolo si introdurranno tutti gli aspetti elettrochimici di ciò che accade all'interfaccia tra un metallo o un semiconduttore e una soluzione elettrolitica. Come si vedrà, in questa regione si crea uno spostamento di cariche che dà origine a diverse capacità elettriche che non possono essere trascurate nell'analisi del comportamento dei dispositivi per la rilevazione di molecole biologiche cariche per via esclusivamente elettronica.

Nella seconda parte, verranno presentati i due tipi di misure effettuate sul dispositivo, quelle di spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS – *electrochemical impedance spectroscopy*) e quelle di voltammetria (con particolare attenzione per la tecnica utilizzata in questo lavoro di tesi, ovvero la DPV – *differential pulse voltammetry*), descrivendone le caratteristiche principali.

2.1 MODELLI DI INTERFACCIA

2.1.1 IL DOPPIO STRATO ELETTRICO

Si consideri una superficie metallica carica a contatto con una soluzione elettrolitica, contenente cioè ioni liberi. La superficie metallica può essere carica a causa di adsorbimento di ioni (come nel caso di ossidi, che si legano all'idrogeno per dare gruppi -OH), oppure per l'applicazione di un potenziale esterno. Indipendentemente dal processo di carica della superficie, la carica verrà bilanciata da una regione di cariche di

segno opposto (controioni) presenti in soluzione, attratte dal potenziale che si sviluppa dalla superficie. L'interfaccia metallo-soluzione è detta *doppio strato elettrico*.

Un sistema del genere è costituito da due conduttori diversi, uno ionico (in cui il trasporto di corrente è determinato dalle leggi di diffusione delle cariche-specie ioniche in soluzione) e uno elettronico (il metallo, in cui la conduzione è descritta dal modello a bande).

Alla formazione del doppio strato concorrono due fenomeni: le forze elettrostatiche, che mantengono le cariche provenienti dall'elettrolita aderenti all'elettrodo, e la temperatura, che tende a rendere più omogenea possibile la situazione.

I potenziali applicati ad un sistema di elettrodi inseriti in una soluzione elettrolitica conduttiva si localizzano quindi esclusivamente nella zona di doppio strato dove il campo elettrico assume valori molto elevati.

Applicando un potenziale tra due elettrodi immersi in una soluzione, la corrente è data da due componenti:

- una componente capacitiva, dovuta alla carica e scarica della capacità di doppio strato;
- una componente che risulta dallo scambio di elettroni tra l'elettrodo e le specie libere in soluzione o immobilizzate sulla superficie.

Nel contatto metallo-soluzione, gli elettroni del metallo e gli ioni della soluzione, interagiscono sulla superficie tra le due fasi, ma non attraversano individualmente l'interfase.

Si va ora ad analizzare più nel dettaglio il potenziale all'interfaccia del doppio strato elettrico:

quest'ultimo si può formare sia per la presenza di uno strato di molecole polari o polarizzabili (in questo caso un ruolo molto importante lo esercitano le molecole d'acqua), sia quando uno ione della soluzione ha la tendenza ad essere adsorbito preferenzialmente all'interfase, cosicché gli ioni positivi e negativi della soluzione si separano localmente e si dispongono su due strati di carica opposta.

Si ipotizzi una carica positiva distribuita uniformemente su di una superficie piana, a contatto con una soluzione contenente ioni sia positivi sia negativi (elettrolita). La presenza di questa carica nella realtà può essere causata da molteplici fattori quali un potenziale esterno applicato o l'assorbimento di protoni in ossidi metallici. Il potenziale elettrico alla superficie assume il valore ψ_0 e diminuisce allontanandosi da essa verso il liquido [7].

Si consideri ora un sistema di riferimento con asse x perpendicolare al piano della superficie, origine al limite di questa e verso positivo allontanandosi dalla stessa come mostrato in figura 2.1:

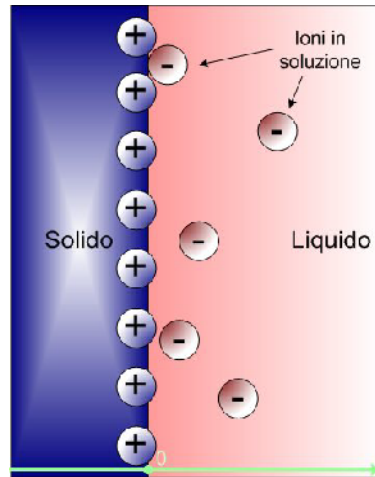


Fig.2. 1 Esempio di interfaccia solido (blu)/liquido (rosa). La superficie solida è caricata positivamente e gli ioni in soluzione vengono attratti da questa. Nella figura è anche evidenziato (verde) il sistema di riferimento adottato (asse x con origine all'interfaccia).

Il potenziale chimico di uno ione, di valenza z_i e densità numerica $\rho_i(x)$, è:

$$\mu_i = \mu_i^0 + z_i e \psi(x) + kT \log \rho_i(x) \quad (2.1)$$

dove “ e ” è la carica elementare dell’elettrone.

La distribuzione degli ioni dalla superficie, ovvero la probabilità di trovare uno ione in una determinata posizione, dipende dal potenziale puntuale seguendo la distribuzione di Boltzmann, e quindi sarà, a una distanza x :

$$\rho_i(x) = \rho_{i(\infty)} \exp\left(-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (2.2)$$

Nel caso in esame però, la situazione è complicata dalla presenza contemporanea di cariche di segno opposto con distribuzione:

$$n^- = n_0 \exp\left(\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (2.3)$$

$$n^+ = n_0 \exp\left(\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (2.4)$$

Le cariche negative presenti nell'elettrolita saranno quindi attratte dalla carica sulla superficie mentre quelle positive ne saranno respinte, questo comportamento sarà tanto più marcato quanto più vicino alla superficie ci si trova, mentre lontano dalla superficie stessa per la neutralità della carica le due distribuzioni dovranno eguagliarsi. Vicino alla superficie viene così a crearsi uno strato di carica negativa, la cui densità puntuale è espressa da:

$$\rho(x) = ze(n^+ - n^-) = -2n_0ze \sinh\left(\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (2.5)$$

Integrando tale densità su tutto lo spazio si ottiene il valore dell'eccesso totale di carica all'interfaccia superficie-elettrolita per unità di area che è pari, in modulo, alla densità di carica sulla superficie.

Si ottiene così, all'interfaccia, un doppio strato elettrico: da una parte, sulla superficie, è presente un accumulo di carica negativa, mentre dall'altra, per neutralità, in una regione di diffusione all'interno della soluzione, c'è un addensamento di cariche positive.

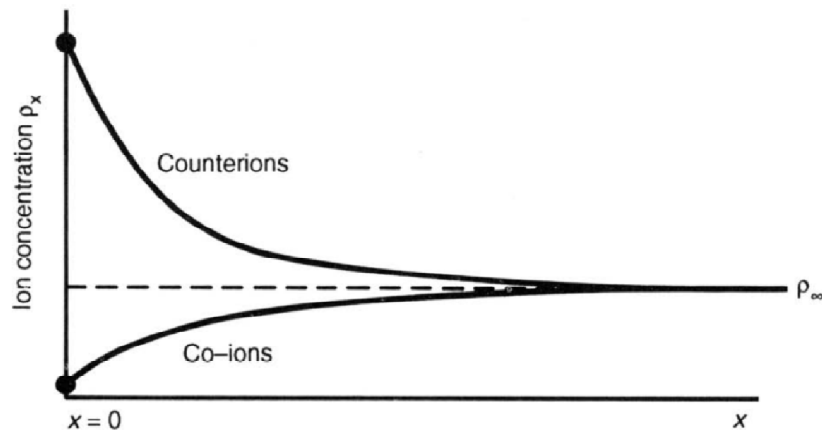


Fig.2.2 Concentrazione degli ioni in funzione della distanza dall'interfaccia (secondo la distribuzione di Boltzman). I *counterions* sono gli ioni con carica opposta a quella della superficie, mentre i *co-ions* hanno la stessa carica della superficie [8]

Al fine di valutare il raggio d'azione del doppio strato elettrico, è necessario studiare la distribuzione spaziale delle cariche nelle prossimità della superficie.

2.1.2 MODELLO DI HELMHOLTZ

Un primo modello è quello proposto nel 1879 da Helmholtz, il quale considera solo il primo strato di cariche adsorbite elettrostaticamente sulla superficie. Le cariche sono prese come puntiformi, e la superficie è vista come infinitamente piana. Questo modello porta a schematizzare il sistema come un condensatore a facce piane e parallele, in cui la costante dielettrica ε è quella della specie adsorbita all'interfase, mentre la distanza d fra le armature è pari alla distanza fra superficie metallica e il piano di carica indotto. Il potenziale che viene a svilupparsi tra le due facce è detto *differenza di potenziale galvanico*, e varia linearmente con la distanza. La capacità del sistema è quindi semplicemente:

$$C_d = \frac{\partial \sigma}{\partial V} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{d} \quad (2.6)$$

Questo modello è troppo semplificato, in quanto considera il potenziale limitato al primo strato, quando invece quest'ultimo non riesce a schermare completamente le cariche superficiali, e il potenziale decresce oltre il primo strato in maniera continua. Inoltre, ignora gli effetti termici che portano le cariche ad essere allontanate dalla superficie metallica.

2.1.3 MODELLO DI GOUY-CHAPMAN

Un modello più accurato è quello proposto da Gouy-Chapman, il quale considera il graduale cambiamento del potenziale allontanandosi dalla superficie.

Si riprende ora il sistema di riferimento introdotto nel paragrafo 2.1.1. La densità puntuale degli ioni e il potenziale ad essi associato sono legati tra loro dall'equazione di Poisson (proiettata solo lungo l'asse x poiché $\psi_{(x)}$ dipende solo dalla distanza dalla superficie):

$$\frac{d^2 \psi_{(x)}}{dx^2} = - \frac{z_i e \rho_{i(x)}}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (2.7)$$

Sostituendo in quest'ultima equazione l'espressione per $\rho(x)$ (2.5), si ha l'equazione di Poisson-Boltzmann:

$$\frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = - \frac{z_i e \rho_i(x)}{\varepsilon \varepsilon_0} = - \frac{z_i e}{\varepsilon \varepsilon_0} \rho_{i(\infty)} \exp\left(-\frac{z_i e \psi(x)}{kT}\right) \quad (2.8)$$

la quale, linearizzando secondo Debye con l'ipotesi che $\frac{z_i e \psi(o)}{kT} \ll 1$, ha come soluzione:

$$\psi(x) = \psi_0 \exp(-kx) \quad (2.9)$$

dove [8]:

$$k = \left(\sum_i \rho_{i(\infty)} \frac{e^2 z_i^2}{\varepsilon \varepsilon_0 kT}\right)^{1/2} \quad (2.10)$$

Integrando la densità su tutto lo spazio si ottiene il valore della carica in eccesso all'interfaccia metallo-elettrolita, che corrisponde in modulo alla carica presente sulla superficie del metallo.

È possibile ricavare una relazione tra potenziale e densità di carica presente sulla superficie, pari a:

$$\sigma = \varepsilon \varepsilon_0 k \psi_0 \quad (2.11)$$

Il doppio strato elettrico diffuso nelle prossimità di una superficie carica ha una lunghezza caratteristica, o spessore, nota come *lunghezza di Debye*, espressa come $1/\kappa$. L'entità della lunghezza di Debye dipende unicamente dalle proprietà della soluzione (solvente+elettroliti) e non dalla carica o dal potenziale della superficie. Essa indica la distanza alla quale il potenziale raggiunge un valore pari a $1/e$ del suo valore alla superficie e coincide con il raggio d'azione della carica superficiale stessa. Per questo il piano a distanza $1/\kappa$ viene fatto coincidere con lo spessore dell'effettivo strato di diffusione.

Questo vale se la concentrazione ionica è piuttosto bassa, per cui è possibile approssimare il potenziale. Date però le evidenti disomogeneità di concentrazioni all'interno della soluzione, di solito si preferisce misurare l'attività dinamica degli elettrodi in soluzioni elettrolitiche concentrate, per due motivi: innanzitutto, l'effetto dello ione di supporto permette di limitare effetti di migrazione ionica. Inoltre, i

coefficienti di attività delle specie sono quasi costanti perché predomina l'effetto dello ione di supporto, e quindi variazioni locali sono minime.

La capacità differenziale per l'unità d'area dipende dal potenziale di superficie secondo la formula:

$$C_g = ze \sqrt{\left(\frac{2c_0 \epsilon_0 \epsilon_r}{kT}\right)} \cosh\left(\frac{z_i e \psi_0}{2kT}\right) \quad (2.12)$$

2.1.4 MODELLO DI STERN

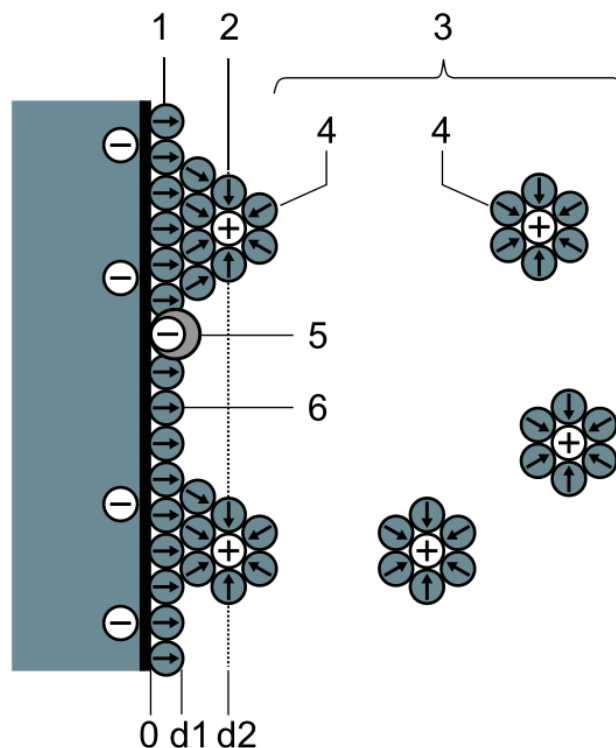


Fig.2.3 Struttura del doppio strato elettrico secondo il modello di Stern:
 (1) Strato di Helmholtz interno (2) Strato di Helmholtz esterno (3) Film diffusivo (4) Ioni solvatati (5) Ioni adsorbiti (6) Molecole di solvente.

In condizioni reali si rende necessario un modello che tenga presente le interazioni a corto raggio degli ioni. Un approccio di questo tipo è stato adottato da Stern, che combina le due teorie precedenti e divide la regione vicino alla superficie in due zone, una prima con densità di carica maggiore, e una seconda più diffusa. Alcuni ioni saranno adsorbiti sulla superficie mediante attrazione elettrostatica, formando così il cosiddetto strato di Stern (o di Helmholtz interno, IHP), che tende a neutralizzare la carica superficiale. Dopo questo primo strato, con un'alta densità di carica, sarà

presente un secondo strato di ioni di carica (anche in questo caso, opposta alla superficie) ma solvatati, con una densità minore del primo strato e che va a decrescere in modo esponenziale allontanandosi dalla superficie. Questo secondo strato viene chiamato strato esterno di Helmholtz (OHP), o strato di Gouy.

L'insieme di questi strati, e della superficie metallica, viene chiamato doppio strato elettrico.

Il modello di Stern inoltre tiene in considerazione anche il fatto che le cariche in soluzione vengono solvate dalle molecole di solvente, e che quindi possiedono un certo raggio oltre il quale non possono avvicinarsi. Queste molecole di solvatazione inoltre incidono sulla costante dielettrica del mezzo, perché orientano il proprio dipolo in modo tale da schermare le cariche. Infine, molecole di solvente sono presenti anche sulla superficie del metallo, e a loro volta concorrono a schermare la carica superficiale. Pertanto, secondo quest'ultimo modello vale nel primo strato la relazione di Helmholtz, tenendo conto però delle molecole di solvente, mentre nel secondo strato vale la relazione di Gouy-Chapman.

Se la superficie del metallo è carica negativamente, un certo numero di cationi verrà attratto e andrà a formare lo strato di Stern. Alcuni anioni, dato che la loro energia di adsorbimento è molto alta, verranno adsorbiti sulla superficie del metallo, aumentando la sua carica negativa, e richiamando ulteriori cationi in soluzione. Oltre lo strato a maggioranza cationica, è presente la soluzione con ioni solvatati e con una carica netta tale da compensare la carica della superficie.

Da questo modello deriva che la capacità risultante, C_d , all'interfaccia metallo-soluzione, può essere schematizzata come la serie di due capacità, quella di Helmholtz e quella di Gouy-Chapman, e quindi descritta dalla formula:

$$\frac{1}{C_d} = \frac{x_2}{\varepsilon\varepsilon_0} + \frac{1}{\sqrt{2\varepsilon\varepsilon_0 z^2 e^2 n_0 / kT} \cdot \cosh(ze\psi/2kT)} \quad (2.13)$$

Nello seguente figura è rappresentato uno schema che illustra il modello appena descritto:

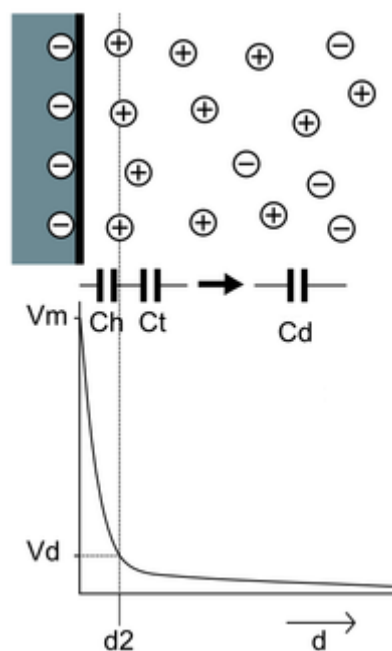


Fig.2.4 Struttura del doppio strato elettrico secondo il modello di Stern.

2.2 TECNICHE DI INDAGINE

Vengono di seguito espone le due tecniche di misura utilizzate nello studio del biosensore e delle quali si presenterà i risultati nel capitolo 5.

2.2.1 SPETTROSCOPIA DI IMPEDENZA ELETTROCHIMICA

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) è basata sul concetto di funzione di trasferimento (Transfer Function, TF). Si applica un segnale di input al sistema, che viene così perturbato rispetto alla sua condizione di equilibrio e produce un segnale di output che viene registrato. Dal punto di vista puramente teorico il segnale di input può essere di qualunque natura (a crescita lineare, a gradini, sinusoidale ...), tuttavia nella pratica gli unici segnali che vengono realmente utilizzati sono i segnali sinusoidali e questo non costituisce una perdita di generalità in quanto, come noto, tutti i segnali periodici possono essere rappresentati mediante la serie di Fourier divenendo quindi sommatorie

di segnali sinusoidali. D'ora in avanti il segnale di input verrà considerato quindi ondulatorio sinusoidale. Se il sistema è lineare, anche il segnale di output risulta essere sinusoidale e caratterizzato dalla medesima frequenza del segnale di input, ma con differente ampiezza e angolo di fase. Il rapporto fra la risposta del sistema perturbato e il segnale perturbante determina la funzione di trasferimento complessa per quella determinata frequenza.

Generalmente come segnale di input si considera una corrente e come segnale di uscita si registra una tensione, di conseguenza la funzione di trasferimento coinciderà con l'impedenza complessa Z :

$$Z(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)} \quad (2.14)$$

Per sistemi elettrochimici l'analisi consiste nella misurazione della funzione di trasferimento per un segnale di piccola intensità così da poter considerare solo la porzione lineare della risposta. Tuttavia anche con questo accorgimento, quando si verifica un processo elettrochimico possono avvenire processi di trasporto di massa e trasferimenti di energia che possono cambiare la struttura e le proprietà dell'oggetto studiato. In tali casi il sistema non risulta più lineare, non in condizioni stazionarie e caratterizzato da un effetto di memoria, tutte implicazioni che vanificano il risultato della misurazione. Al fine di evitare questo tipo di complicazioni è opportuno verificare prima e dopo l'esperimento alcune ipotesi di natura elettrochimica [9], tra cui:

- Additività (o disaccoppiamento) della corrente faradica e di quella di caricamento dei doppi strati;
- Elettroneutralità della soluzione elettrolitica;
- Mancanza di fenomeni convettivi e di migrazione: si assume che non ci siano ulteriori cambiamenti nelle concentrazioni locali se non quelli dovuti a fenomeni diffusivi e di trasferimento di carica;
- Assenza di flussi di massa o di carica in direzione laterale rispetto all'elettrodo.

Grazie alla proprietà appena descritta si può giungere alla completa descrizione dell'oggetto considerato partendo anche solo da una delle due parti (reale o immaginaria) nota.

2.2.1.1 MODELLI INTERPRETATIVI DEI DATI EIS

Il grande vantaggio dell'analisi EIS è la possibilità di poter separare le varie cinetiche dei processi che avvengono nel sistema osservato; d'altro canto è importante notare che le informazioni date dalle misure EIS devono essere interpretate. Infatti un dato di impedenza in sé non dice nulla sulla realtà fisica dei processi elettrochimici che avvengono nel sistema in esame, è solo attraverso la costruzione di un modello equivalente che si possono estrapolare le proprietà chimico-fisiche dell'oggetto in esame. Tale modello non è altro che il tentativo di rappresentare razionalmente tutti i processi osservabili nel sistema.

I dati ottenuti da un'analisi EIS sono manipolabili secondo due approcci, uno totalmente sperimentale e uno teorico. Nel primo approccio il modello è derivato direttamente dai dati e la fase di identificazione riguarda sia la struttura del modello, sia la quantificazione dei parametri. Il secondo approccio si fonda sulla presunta conoscenza dei potenziali processi osservabili, che comporta di conseguenza la costruzione a priori della struttura del modello, del quale poi si dovranno solo identificare i parametri attraverso i dati ottenuti. Inoltre l'approccio teorico segue due strade procedurali: quella classica (metodo della soluzione pienamente elettrochimica e matematica) e quella strutturale (costruzione di un modello matematico composto di elementi con soluzione grafica del comportamento dell'impedenza).

Il modello strutturale si basa sulla costruzione di un modello per l'impedenza, direttamente nel dominio delle frequenze, coincidente con una serie di elementi connessi fra loro secondo diverse leggi. Ognuno degli elementi descrive un singolo processo fisico, in modo tale che il modello totale descriva il comportamento complessivo del sistema. Nella fattispecie il modello coincide con un circuito elettrico, detto anche *circuito equivalente*, in cui i singoli elementi coincidono con i tipici componenti elettrici (resistenze, conduttanze, capacità...). Un importante vantaggio del modello strutturale è il ridotto numero di parametri, che li rende del tutto identificabili, efficienti e facili per la manipolazione.

2.2.1.2 MODELLI ELETTROCHIMICI NOTEVOLI

Una volta nota la funzione di trasferimento del sistema, questa può essere modellizzata con i classici elementi circuitali conosciuti (resistenze, capacità,

induttanze). Tuttavia si rende necessaria l'introduzione di alcuni elementi che riescano a descrivere in maniera più specifica i processi elettrochimici (come ad esempio l'*elemento di Warburg*) [9, 10]

Combinando tali elementi, si possono ottenere dei circuiti equivalenti i cui diagrammi di Nyquist ricalcano l'andamento dei dati sperimentali EIS, rendendo quindi più semplice la comprensione di tali dati tramite curve note.

Il modello di circuito equivalente che descrive in modo più completo il sistema interfaccia elettrodo/elettrolita in analisi confermando i risultati sperimentali è la "Cella di Randles".

Cella di Randles

La cella di Randles è un circuito che descrive il comportamento di un *elettrodo polarizzabile* sulla cui superficie avvenga una reazione elettrochimica che alle basse frequenze risulti limitata dalla diffusione. Dal punto di vista prettamente circuitale questo si traduce nel modello mostrato in figura 2.5:

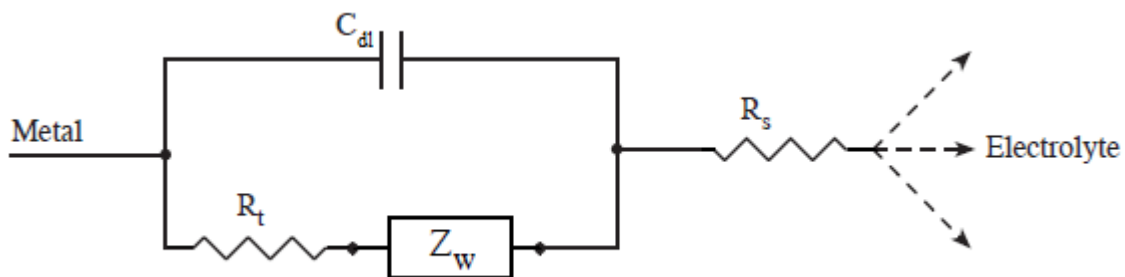


Fig 2.5 Modello circuitale dell'interfaccia metallo – elettrolita secondo il modello della "cella di Randles" [11]

in cui [9, 10]:

R_s: resistenza ohmica della soluzione elettrolitica. rappresenta le proprietà elettriche del bulk ed è un elemento imprescindibile in quanto forzosamente la corrente totale che arriva all'elettrodo deve passare per la soluzione elettrolitica. Quindi questo parametro non è in alcun modo affetto dalle trasformazioni chimiche che avvengono sulla superficie elettrodica.

R_t: resistenza legata al processo faradico di trasferimento elettronico. Dipende dalle caratteristiche dielettriche e isolanti all'interfaccia elettrodo/elettrolita. Tale resistenza

descrive il ritardo nella cinetica del trasferimento elettronico sulla superficie introdotto da strati isolanti dovuti a eventuali modifiche effettuate sulla superficie elettrodica (come per esempio la deposizione di uno strato di DNA). Se ci si pone nell'ipotesi che lo strato di modifica superficiale dell'elettrodo sia omogeneo e occupi tutta la superficie elettrodica, tale resistenza consta di due componenti serie $R_t = R_{Au} + R_{mod}$ ove R_{Au} è la componente costante di trasferimento elettronico legata all'elettrodo non modificato (la specifica rispetto all'elettrodo d'oro è stata fatta in quanto elettrodo di interesse per lo studio del biosensore) mentre R_{mod} è la componente variabile legata alle modifiche della superficie elettrodica.

C_{dl} : contributo capacitivo fondamentale legato al doppio strato elettronico. La capacità di doppio strato dipende dalla permittività dielettrica introdotta dalle molecole del doppio strato carico ϵ_{dl} , quindi la mancanza di molecole polari comporta una diminuzione di C_{dl} . Nel circuito elettronico equivalente anche C_{dl} può essere rappresentata come serie di una componente costante C_{Au} legata all'elettrodo non modificato (dipendente solo dal potenziale applicato e dal materiale dell'elettrodo, ad esempio per l'elettrodo d'oro policristallino si ha $C_{Au} \approx 40 - 60 \mu F cm^{-2}$) e una variabile dipendente dalle modifiche sulla superficie elettrodica (C_{mod}) che tende a far diminuire la capacità di doppio strato.[12]

Z_W : elemento di Warburg. Questo elemento è stato sviluppato per descrivere fenomeni diffusivi che possono avvenire quando all'elettrodo si sviluppa una reazione di ossidoriduzione. La sua impedenza è funzione della frequenza del potenziale di ingresso: ad alte frequenze il campo elettrico varia molto più velocemente di quanto le particelle cariche (ioni e/o molecole polari) possano rispondere. L'influenza della diffusione in tal caso risulta fortemente limitata; al contrario se la frequenza diminuisce le particelle cariche riescono ad orientarsi nel verso del campo elettrico e ciò facilita la diffusione. L'impedenza di Warburg per uno strato diffusivo infinito è definita come:

$$Z_W(j\omega) = \sigma(\omega)^{-1/2}(1 - j) \quad (2.15)$$

Nel caso di un *elettrodo polarizzabile*, si assume che all'interfaccia avvenga un processo di trasferimento di carica; ne consegue quindi che si dovrà aggiungere alla serie C_{dl} e R_s (che modella l'interfaccia) una componente di impedenza faradica e la si dovrà porre in parallelo con la capacità di diffusione, in quanto la corrente entrante nel

elettrodo è somma delle componenti di diffusione e di trasferimento di carica. La componente aggiuntiva è R_t , la resistenza di trasferimento elettronico. La cella di Randles integra questo modello con l'impedenza dell'elemento di Warburg, Z_w , in serie con la resistenza di trasferimento elettronico R_t .

L'impedenza finale che si ottiene è pari a:

$$Z(j\omega) = R_S + \frac{\frac{1}{j\omega C_{dl}} \left(R_t + \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}} \right)}{\frac{1}{j\omega C_{dl}} + R_t + \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}}} \quad (2.16)$$

Il suo comportamento nell'arco complesso, come si nota in figura 2.6, è scomponibile in un arco di circonferenza alle alte frequenze e una retta alle basse frequenze: da tale comportamento si nota come Z_w divenga meno significativa all'aumentare della frequenza, e l'impedenza totale venga dominata dal parallelo fra C_{dl} e R_t , ad indicare come i processi di trasferimento di carica prevalgano sui fenomeni diffusivi.

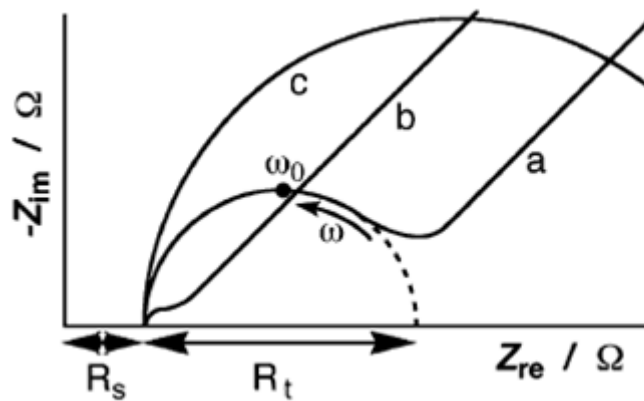


Fig 2.6 Spettro schematico di impedenza faradica rappresentato nel diagramma di Nyquist per: (a) elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da C_{dl} (basse frequenze) e da R_t (alte frequenze). (b) elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da C_{dl} . (c) elettrodo modificato in cui l'impedenza è controllata da R_t . [12]

Il diagramma di Nyquist in figura 2.6a, corrisponde ad un semicerchio di raggio $R_t/2$ e intercetta l'asse delle ascisse in due punti, uno coincidente con R_s (per $\omega \rightarrow \infty$) e uno coincidente con $R_s + R_t$ (per $\omega \rightarrow 0$). La componente immaginaria presenta un massimo di valore $R_t/2$ in ω_0 , definita come [12]:

$$\omega_o = \frac{1}{R_e C_{dl}} = \frac{1}{\tau} \quad (2.17)$$

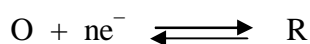
ove τ è la cosiddetta costante di tempo del sistema.

2.2.2 MISURE DI VOLTAMMETRIA

2.2.2.1 PREMESSA

Attraverso i metodi di indagine elettrochimica detti *voltammetrie* è possibile ottenere informazioni sugli analiti di interesse variando un potenziale e misurando la corrente risultante nella cella elettrochimica. Con questa tecnica si possono raccogliere informazioni sia qualitative sia quantitative sulle specie chimiche presenti in soluzione, secondo il modo con cui queste si scaricano all'elettrodo: la scansione (cioè la variazione nel tempo) del potenziale applicato all'elettrodo di lavoro fa sì che vengano raggiunte via via le condizioni per la scarica (catodica o anodica) delle diverse specie elettroattive presenti in soluzione.

Si prenda in considerazione una generica reazione di ossido-riduzione:



con O e R rispettivamente specie ossidata e specie ridotta coinvolte nella semireazione. Si prenda come ipotesi che inizialmente in soluzione sia presente solo la specie O. La specie O/R è detta *specie elettroattiva*. E' cioè una specie in grado di ridursi(acquistare elettroni)/ossidarsi(cedere elettroni) in opportune condizioni sperimentali. In questo lavoro di tesi la specie elettroattiva è $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Se all'elettrodo di lavoro viene imposto un potenziale più negativo del potenziale di riduzione della specie in questione, si realizzeranno le condizioni per far avvenire la scarica di O sulla superficie dell'elettrodo, ovvero la sua riduzione.

Nel caso in esame sono stati utilizzati tre elettrodi: un elettrodo di lavoro WE (*worker o control*) al quale avviene la reazione redox, un elettrodo di riferimento RE (*reference*) avente potenziale costante e un contro elettrodo CE (*counter*). Tra WE ed RE si misura costantemente durante l'esperimento la d.d.p. attraverso un potenziostato.

In questo modo qualsiasi variazione della d.d.p. misurata è attribuita all'elettrodo lavorante. Infatti RE non è attraversato da corrente, quindi il suo potenziale interfase è costante, mentre quello di WE è funzione della corrente i che attraversa il circuito [13]. In figura 2.7 è schematizzato il sistema in esame.

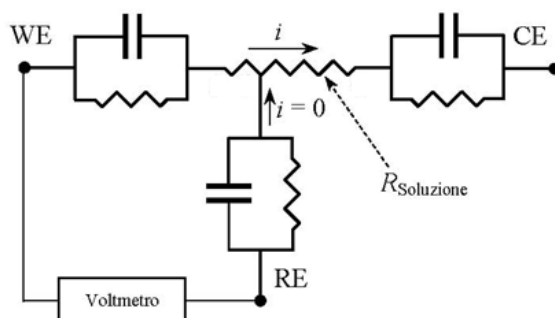


Fig.2. 7 rappresentazione schematica del sistema a tre elettrodi [13]

Il valore di d.d.p. misurato in condizioni di passaggio di corrente tuttavia comprende anche un contributo dovuto alla resistenza della soluzione elettrolitica interposta tra WE e RE. La configurazione a tre elettrodi minimizza questo contributo, ma altri accorgimenti possono essere utilizzati a questo scopo, come lavorare ad alte concentrazioni di *elettrolita di supporto* (nel caso in esame KCl) e avvicinare il più possibile gli elettrodi lavorante e di riferimento.

Applicando un potenziale tra due elettrodi immersi in una soluzione elettrolitica, la corrente che circola è data da due componenti: una *componente faradica* (che rispetta le leggi di massa di Faraday) associata al decorso delle semireazioni elettrodeiche (alla quale posso quindi associare un trasferimento elettronico), e una *componente capacitiva* (che non rispetta le leggi di massa di Faraday, similmente alla corrente di spostamento in un condensatore), dovuta all'effetto schermante del doppio strato elettrico, che agisce come un dielettrico nei confronti della carica della superficie.

La corrente capacitiva costituisce quindi un'interferenza di fondo aspecifica della corrente faradica che si cerca di minimizzare il più possibile per poter considerare unicamente la corrente dovuta al processo redox in esame.

2.2.2.2 TRASPORTO DI MATERIA

Il trasporto di materia può avvenire secondo tre diverse modalità: per diffusione, per convezione e per migrazione. In questo lavoro di tesi si focalizza l'attenzione sul

processo di diffusione in quanto la maggior parte dei sistemi elettrochimici sono caratterizzati da questo tipo di trasporto nelle vicinanze dell'elettrodo ed inoltre solo la diffusione può essere direttamente correlata alla concentrazione della specie chimica che si scarica; la velocità di diffusione, infatti, è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione.

Il fenomeno della diffusione prevede un movimento di molecole o ioni per effetto del gradiente di concentrazione (attività) [13]. Il movimento avviene sempre dalla zona a concentrazione maggiore a quella a concentrazione minore. La diffusione è ben descritta dalle leggi di Fick, che mettono in relazione il flusso J e la concentrazione C della specie con lo spazio e il tempo. Se si considera il caso più semplice di una diffusione monodimensionale semiinfinita, in cui la concentrazione della specie è la stessa in ogni punto di un piano parallelo alla superficie elettrodica, a distanza x da questa. Avremo allora che

$$C = C(x,t) \quad 0 \leq x \leq \infty$$

e le due leggi di Fick saranno espresse dalle equazioni sotto riportate:

$$J_0(x,t) = -D_0 \frac{\partial C_0(x,t)}{\partial x} \quad \frac{\partial C_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 C_0(x,t)}{\partial x^2} \quad (2.18)$$

Durante il processo di scarica la parte di soluzione a stretto contatto con l'elettrodo diventa sempre più *povera* di O, rispetto al resto della soluzione. Il gradiente di concentrazione che ne scaturisce richiama la specie elettroattiva dalla soluzione lontana verso l'elettrodo.

A causa di questi moti diffusivi, la corrente ad un certo valore di potenziale elettrodico, è quindi correlata al flusso da e verso l'elettrodo della specie elettroattiva che prende parte alla reazione redox come descritto nell'equazione sottostante.

$$-j_0(0,t) = \frac{i}{nFA} = D_0 \left[\frac{\partial C_0(x,t)}{\partial x} \right]_{x=C} \quad (2.19)$$

con D_0 = coefficiente di diffusione della specie O

i = corrente che circola in cella

A = area dell'elettrodo

Il fenomeno della diffusione è quindi correlabile alla concentrazione della specie elettroattiva che si scarica, detta anche *depolarizzante*.

Un'altra funzione dell'elettrolita di supporto è quello di schermare l'elettrodo al fine di limitare la migrazione, movimento di specie cariche dovuto all'esistenza di un gradiente di potenziale elettrico.

Tale elettrolita, aggiunto in concentrazione elevata può essere un semplice sale o un acido, o una base oppure un tampone o un complessante e il suo compito principale è quello di circondare l'elettrodo con ioni che abbiano la stessa carica del depolarizzante e di ridurre così l'attrazione elettrostatica verso quest'ultimo.

Le condizioni alle quali deve obbedire un elettrolita di supporto, nei confronti del depolarizzante, sono [13]:

- essere chimicamente inerte
- non ostacolare la diffusione e lo scambio elettronico sulla superficie dell'elettrodo
- avere un potenziale di scarica diverso (di almeno 100-200 mV)
- avere una elevata conducibilità ionica, per garantire una bassa resistenza
- al passaggio di corrente

2.2.2.3 VOLTAMMETRIA

La voltammetria è una tecnica di analisi basata sulla misura della corrente che passa attraverso un elettrodo immerso in una soluzione contenente specie chimiche elettroattive quando esso è sottoposto ad una variazione di potenziale. Grazie a questa tecnica è possibile ottenere rapidamente considerevoli informazioni sulla dinamica di processi di ossidoriduzione, sulla cinetica delle reazioni di trasferimento elettronico e su processi di adsorbimento alla superficie. In particolare offre una rapida locazione dei potenziali redox delle specie elettroattive e una conveniente valutazione degli effetti dei mediatori sul processo redox [14].

In base alla modalità di variazione del potenziale, si definiscono diverse voltammetrie: voltammetria a scansione lineare, cronoamperometria, voltammetria ciclica, voltammetria a scansione con gradini, voltammetria differenziale ad impulsi *etc.*

Variando il potenziale dell'elettrodo di lavoro con le diverse tecniche, vado a modificare la differenza tra i livelli di Fermi della molecola redox e quello dell'elettrodo creando uno scambio di elettroni all'interfaccia a cui è associato il picco di corrente che misuro in uscita in corrispondenza a un particolare potenziale applicato.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata la voltammetria differenziale ad impulsi per ottenere delle misure che potessero essere confrontabili con la grande quantità di dati già presenti in letteratura.

2.2.2.4 VOLTAMMETRIA DIFFERENZIALE AD IMPULSI

La forma d'onda del segnale di tensione di sollecitazione in ingresso è mostrata in figura 2.8 :

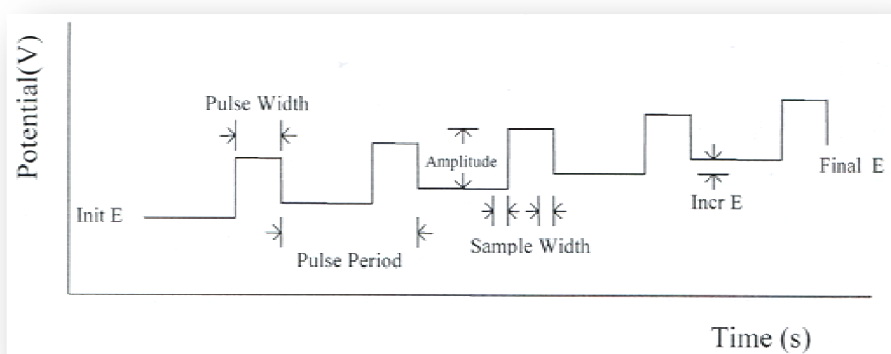


Fig.2. 8 Segnale di tensione in ingresso al sistema in una misura DPV

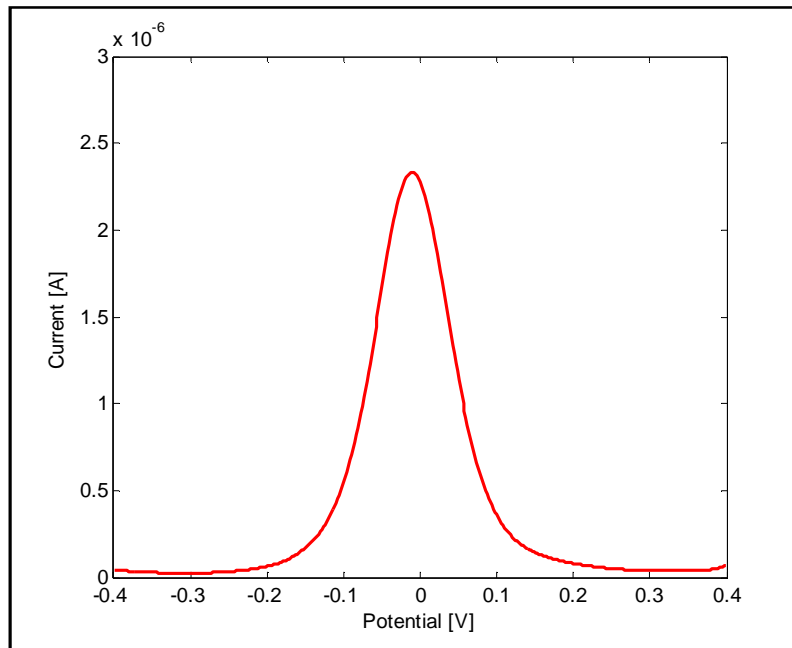


Fig.2. 9 Segnale di corrente in uscita (voltammogramma) rappresentativo del sistema fino a qui descritto che coinvolge la riduzione della specie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

La scelta di questa tecnica di voltammetria dipende dal fatto che, rispetto alle altre misure, mostra una sensibilità maggiore. Quello che fa in sostanza è togliere tutte le componenti di corrente capacitive scaricando con gli impulsi le “capacità equivalenti” associate agli strati di carica d’interfaccia. Riesco così ad eliminare il fondo di corrente capacitiva enfatizzando solamente la corrente faradica.

Capitolo 3

Biosensori per l'analisi del DNA

Sebbene la bioelettronica sia un campo relativamente maturo, essa continua a mostrarsi un'area di ricerca molto attiva. La ricognizione di eventi, processi ed elementi biologici trovano sempre maggiori ed importanti applicazioni. Da ciò la necessità di studiare e progettare biosensori che offrano migliori prestazioni in termini di sensibilità, facilità di utilizzo e costo. Negli ultimi 15 anni, si ha avuto, infatti, un significativo sviluppo nelle tecnologie di tali apparecchi.

3.1 BIOSENSORI

Con il termine *biosensore* si comprende una grande varietà di dispositivi, i quali hanno sempre principi di funzionamento ed elementi comuni. Le innovazioni tecnologiche consistono spesso in sostituzioni e sviluppi di alcuni elementi.

Un *biosensore* può essere definito come *un dispositivo analitico il quale comprende un elemento biologico sensibile connesso ad un trasduttore* [15]. Il *trasduttore* converte l'evento o la quantità rilevati in un segnale misurabile e processabile, generalmente un segnale elettrico la cui ampiezza è proporzionale alla concentrazione di un elemento chimico o alla dinamica di un processo. In questo modo vengono combinati i vantaggi della specificità dei sistemi biologici con la risposta quantitativa e veloce dei sistemi elettronici.

3.1.1 CARATTERISTICHE PRINCIPALI

Nel caso più generale un biosensore è definito da una serie di elementi quali il *substrato*, il *componente biologico*, il *metodo di immobilizzazione* di quest'ultimo, il *trasduttore* e il relativo *sistema di misura o lettura*.

Substrato. Indica quella parte del biosensore che risponde al materiale biologico da misurare con reazioni chimiche o fisiche. Non necessariamente è esso stesso di tipo biologico, ma può essere solamente un elemento chimico il quale possiede una grandezza statica o dinamica che risulti sensibile per il trasduttore. Attualmente i substrati sono così vari che è impossibile generalizzarli in categorie.

Componente biologico. L'importanza del componente biologico è data dal fatto che la sua interazione con il substrato è altamente specifica. Esso può subire una reazione o rimanere legato al substrato in modo selettivo. A volte è lo stesso elemento da cui si vuole ricavare l'informazione ed in questo caso rappresenta il *substrato*. I quattro gruppi principali sono gli *enzimi*, gli *anticorpi*, gli *acidi nucleici* e i *recettori*.

Metodo di immobilizzazione. I componenti biologici devono essere strettamente connessi al trasduttore e per far ciò sono stati sviluppati cinque metodi principali:

- Il più semplice è l'*assorbimento* sulla superficie. Tuttavia il legame è debole ed è molto suscettibile alle variazioni di pH, temperatura e forza ionica. Può essere usato per studi e di breve durata.
- *Microincapsulamento*. Questo termine indica l'intrappolamento del biomateriale tra una membrana inerte e il trasduttore. Garantisce un buon isolamento da molti elementi e fattori esterni; inoltre si adatta a molti tipi di sensori.
- *Intrappolamento*. Viene preparato un gel polimerico in una soluzione contenente il materiale biologico. Il problema principale è che le diffusioni e le reazioni sono rallentate, e così il tempo di risposta del biosensore.
- *Legame covalente*. Alcuni gruppi funzionali che non sono essenziali e non influiscono reazioni d'interesse, possono avere un legame covalente con un supporto solido (il trasduttore o una membrana). I principali gruppi usati sono NH_2 , CO_2H , OH , $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ e SH (ovvero il gruppo tiolo che viene usato nel caso del DNA, come in questo lavoro di tesi). Uno dei principali vantaggi nel creare legami covalenti con degli elettrodi è che si ottiene un buon contatto elettrico che facilita il trasferimento di carica. Questo è particolarmente importante in quei biosensori che riguardano un trasferimento diretto di elettroni senza un mediatore. Spesso, gli elettrodi vengono appositamente modificati per creare questi legami covalenti.

- Il *cross-linking* è un metodo simile al legame covalente, in cui il legame chimico con il supporto è data da un agente bifunzionale che reagisce con il materiale biologico.

Trasduttore e Sistema di lettura. Il trasduttore, in base agli elementi chimici o alle reazioni che agiscono su esso, fornisce un segnale che deve essere letto ed elaborato. L'informazione, ovvero la grandezza fisica, che può essere ricavata, dipende dal tipo di misura applicata. La maggior parte dei trasduttori sono di tipo elettrochimico. Tuttavia ne esistono molteplici tipologie, che vengono suddivise come di seguito:

- *Trasduttori elettrochimici.* Ci sono tre fondamentali processi elettrochimici, con rispettivi metodi di misura, che vengono utilizzati nei trasduttori per biosensori:
 - *Potenzimetrici.* Riguardano la misura del potenziale di una cella a corrente nulla. Il potenziale è proporzionale al logaritmo della concentrazione della sostanza da determinare.
 - *Voltammetrici (Amperometrici).* Un potenziale variabile di ossidazione (o riduzione) è applicato ad un elettrolita e viene misurata la corrente. La corrente può essere analizzata in funzione del potenziale o del tempo (cronoamperometria).
 - *Di conduzione.* Una soluzione contenente ioni conduce una corrente. Il modulo dell'impedenza dipende dalla reazione o proprietà chimiche e biochimiche dell'elemento da analizzare.

Queste tre tipologie di trasduttori e metodi di misura possono essere miniaturizzati e applicati a sistemi basati su tecnologia CMOS.

- *Trasduttori ottici.* Questi trasduttori hanno avuto un notevole sviluppo negli ultimi dieci anni. Le tecniche utilizzate comprendono la spettroscopia di assorbimento, la spettroscopia di fluorescenza, la spettroscopia di riflessione e la SPR (surface plasmon resonance).
- *Dispositivi piezoelettrici.* Tali dispositivi riguardano la generazione di una corrente elettrica dalle vibrazioni di un cristallo. La frequenza di vibrazione è dipendente dalla massa del materiale assorbito sulla superficie, che a sua volta è legata alle reazioni biochimiche.
- *Dispositivi ad onde acustiche.*
- *Trasduttori termici.* Tutti i processi chimici e biochimici implicano la produzione o l'assorbimento di calore, il quale può essere misurato con opportuni sensori.

E' da notare che, essendo la descrizione appena fatta del tutto generale, non tutte le parti discusse sono necessariamente presenti o distinguibili in ogni tipo di biosensore.

3.1.2 FATTORI DI EFFICIENZA

Selettività. E' la caratteristica più importante di un biosensore, ovvero la capacità di discriminare od escludere determinati elementi biologici, in modo tale che la lettura restituisca l'effettiva informazione cercata. Spesso gli stessi traduttori contribuiscono alla selettività.

Sensibilità. Indica la minima quantità di massa di componente biologico necessaria alla misura. Generalmente deve essere inferiore alle millimoli.

Precisione. Varia ovviamente per ogni biosensore e difficilmente può essere generalizzata: deve essere tale per cui l'informazione ottenuta sia corretta con una percentuale molto alta.

Condizioni di misura. Comprendono condizioni quali le temperature, il pH della soluzione, la forza ionica ecc., nelle quali deve essere effettuata la misura. Più tali condizioni sono particolari e difficili da ottenere, meno la misura risulta stabile e ripetibile.

Tempo. (i) Il *tempo di risposta* del biosensore deve essere più veloce delle reazioni chimiche e delle possibili variazioni delle condizioni del sistema. (ii) Il *tempo di recupero* è il tempo necessario per cui un biosensore sia pronto per un nuovo campione o una nuova misura. (iii) Il *tempo di vita* è generalmente determinato dall'instabilità del materiale biologico e indica quanto può essere utilizzato un biosensore.

3.2 SENSORI ELETTROCHIMICI DI DNA

Lo scopo principale dei biosensori per DNA è quello di riconoscere una specifica sequenza di basi, nel modo più efficace e veloce possibile; l'applicazione più importante è l'individuazione dei gene e la diagnosi di malattie genetiche.

Il principio di rivelazione del sensore si basa sul fenomeno d'ibridazione del DNA, ossia sul legame che avviene fra due ssDNA complementari¹. La prima fase riguarda l'immobilizzazione delle singole catene di DNA. Successivamente il sensore viene messo a contatto con il materiale da rilevare. Possono dunque accadere due fenomeni: il matching (accoppiamento per complementarietà), oppure il mismatching fra le ssDNA. Le misure avvengono nella fase di immobilizzazione e di ibridazione.

I metodi tradizionali di lettura, ovvero di rilevazione della doppia catena, includono le variazioni di massa, le misure *ottiche* e le misure *elettrochimiche*. Attualmente l'uso di tecniche ottiche è predominante, come nel caso di microarray, poiché sono ormai note in letteratura e utilizzate nella maggior parte dei laboratori. Tuttavia hanno ancora dei limiti che ne influenzano il costo, la velocità e la facilità di utilizzo. In primo luogo non forniscono direttamente un segnale elettrico. In secondo luogo il materiale biologico (le catene di DNA) deve essere preparato, ovvero marcato chimicamente con materiali reattivi (*label*), che possono essere fluorescenti, chemiluminescenti o radioattivi². Di conseguenza, le strutture esterne per la rilevazione sono complicate e costose. Inoltre, poiché gli strumenti ottici non sono portabili, le misure *in vivo* e *in situ* sono molto difficili.

I metodi elettrochimici per il riconoscimento dell'ibridazione del DNA offrono un'ottima alternativa: uniscono la semplificazione nella preparazione e nell'utilizzo dei materiali con la velocità, ripetibilità ed estendibilità delle misure e dei dispositivi elettronici. In particolare, la possibilità di usare delle tecniche *label-free* permette una preparazione più facile e veloce del materiale, che non deve essere marcato. Infatti, vengono sfruttate le proprietà chimico/fisiche delle catene di DNA, le quali variano una volta avvenuta o meno l'ibridazione. Per misurare tali grandezze, che forniscono l'informazione, si usano misure dirette. I biosensori elettrochimici che utilizzano misure dirette sfruttano la carica intrinseca delle catene di DNA [17,18] oppure la capacità delle catene di trasportare elettroni [19]: quindi il segnale da analizzare è un segnale elettronico all'origine. Ogni filamento di DNA, infatti, è naturalmente dotato di una carica molecolare intrinseca (legata alla sua struttura chimica) che può essere rilevata dai dispositivi.

¹ Con ssDNA (single stranded DNA) complementari s'intende due singole eliche di DNA in grado di legarsi selettivamente fra di loro, poiché sono composte da sequenze complementari dei nucleotidi dell'acido desossiribonucleico.

² Di recente, Rant *et al.* (2007) [16], hanno sviluppato una tecnica ottica *label-free*.

L'interazione all'interfaccia tra il sensore e un elettrolita provoca una variazione della tensione superficiale causata dal legame che si crea tra molecole cariche e ciò induce un cambiamento delle caratteristiche elettriche del dispositivo. Questo cambiamento si può tradurre in una variazione sia di capacità, sia di conduttività.

Sulla superficie sensibile del dispositivo viene depositato il *DNA probe*, viene poi messo a contatto con una soluzione di *DNA target* e lasciato ibridare.

Ognuno di questi passi va a influenzare il comportamento elettrico del dispositivo che cambia provocando delle variazioni rispetto alle misure effettuate in assenza delle molecole biologiche [20].

Tutti i dispositivi studiati negli ultimi dieci anni, mostrano evidentemente, che il sensore da utilizzare va studiato in base allo scopo e al tipo di risultati che si vogliono ottenere. Non esiste certamente una soluzione unica nel campo dei biosensori, e nemmeno per i biosensori per la rilevazione del DNA, nondimeno tutti gli studi recenti sono indirizzati verso dispositivi il più possibile adattabili e facili da modificare per applicazioni più ampie.

Capitolo 4

Apparato sperimentale

In questo capitolo verranno brevemente presentati il sensore, le sonde e target utilizzate e tutti gli strumenti e i programmi software realizzati con LabVIEW, che hanno permesso di effettuare tutte le misure.

4.1 IL BIOSENSORE

4.1.1 CARATTERISTICHE DEL DISPOSITIVO

Il biosensore è realizzato con l'intento di costituire uno strumento semplice, integrato ed economico, per verificare l'ibridazione del DNA. Le caratteristiche essenziali di questo dispositivo sono:

- una superficie d'oro a bassissima rugosità superficiale sulla quale è possibile immobilizzare il DNA;
- struttura planare a quattro elettrodi. Tale struttura permette di ottimizzare dispositivi ad oggi standard, nei quali gli elettrodi di riferimento sono esterni (ad esempio l'elettrodo all'argento cloruro d'argento (Ag/AgCl) a setto poroso e il *counter* in Platino);
- differenziazione sul mercato con una struttura e processo di fabbricazione economici che permettano la realizzazione di un biosensore monouso in competizione con dispositivi con le stesse funzioni ma molto più costosi e che comunque permettono cicli di utilizzo limitati;

4.1.2 STRUTTURA E PROCESSO DI COSTRUZIONE

Il dispositivo è costituito da un substrato polimerico su cui sono stati depositi 80 nm d'oro. Sullo strato d'oro sono poi incisi 4 elettrodi e, a livello di prototipo, le aree di lavoro sono individuate stendendo sulla superficie una maschera di vinile intagliata. In figura 4.1 è mostrato un dispositivo prototipo simile a quello descritto in questo lavoro di tesi ma con una sola area di lavoro e un reference, usato per misure di spettroscopia.

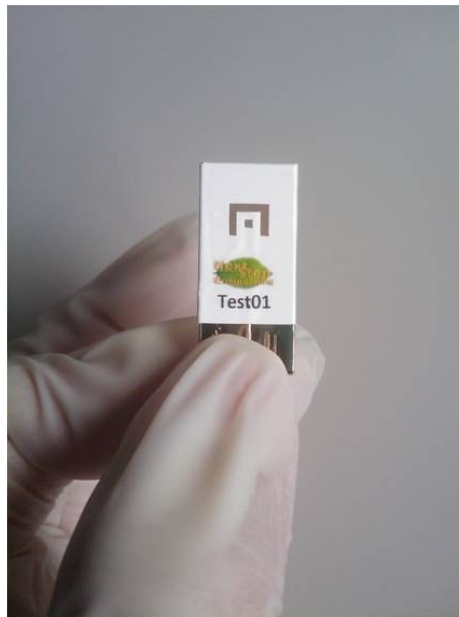


Fig.4. 1 Biosensore simile a quello analizzato in questo lavoro di tesi e usato per misure di spettroscopia, dotato di un solo elettrodo di *reference* e un solo elettrodo di lavoro (*worker*)

Ciò che definisce l'elettrodo è la parte d'oro esposta rispetto alla maschera di vinile e diventa quindi essenziale nella procedura di costruzione del dispositivo, rifinire i contorni della maschera con una pinzetta per eliminare eventuali sporgenze di colla e correggere irregolarità nei bordi. Perimetri imprecisi e differenze d'area tra *worker* e *control* (entrambi con aree da 1 mm²) hanno effetti evidenti sulla dispersione interdispositivo delle caratteristiche misurate (si veda capitolo 5.2.1). È inoltre importante verificare la corretta adesione della maschera una volta stesa sulla superficie d'oro in quanto la soluzione potrebbe penetrare in modo laminare attratta per capillarità sotto il vinile rendendo imprevedibile l'area di lavoro effettivamente coperta dalla soluzione.

Dispositivi preparati molti giorni prima della misura, mostravano segni di deterioramento nella definizione dei contorni delle aree lasciate scoperte dal vinile, per cui la preparazione dei sensori non precedeva mai per più di qualche giorno la misura. La stessa maschera di vinile, dopo poco tempo o qualche lavaggio, iniziava a mostrare segni di staccamento dalla superficie d'oro del biosensore. Per evitare dunque che acqua o sostanze usate durante la misura penetrassero sotto la maschera, ogni qualvolta il dispositivo veniva sciacquato o preparato giorni prima, si è proceduto a marcare la superficie della maschera con una punta rotonda di precisione per ridefinirne l'adesione.

4.1.3 CONVENZIONI SUGLI ELETTRODI

Il numero di elettrodi disegnati è stabilito dal tipo di misure che si effettuano (EIS e DPV) e dalla necessità di avere un elettrodo di riferimento della condizione *fresh*: le misure di spettroscopia vengono effettuate tra 2 elettrodi di cui uno viene preso come riferimento. Quelle di voltammetria necessitano invece di 3 elettrodi: uno di lavoro, uno di riferimento e uno di *counter* che chiude il circuito. Sarebbero quindi sufficienti 3 elettrodi secondo quanto richiesto dalle misure effettuate, ma la struttura è composta da 2 elettrodi di lavoro (chiamati *worker* e *control*) così da permettere un confronto diretto tra un elettrodo funzionalizzato (il *worker*, su cui verrà depresso il DNA probe e target per l'ibridazione) e uno non funzionalizzato, in condizione *fresh* (il *control*).

L'utilizzo degli altri due elettrodi (*reference* e *counter*) varia a seconda del tipo di misura effettuata. L'elettrodo di riferimento, nel caso delle misure di spettroscopia, è quello di dimensione maggiore che circonda gli elettrodi di lavoro (si faccia riferimento alla figura 4.2): viene preso l'elettrodo più ampio per cercare di rendere più omogenea possibile la distribuzione delle linee di campo evitando che si concentrino in un punto danneggiando il dispositivo. Nelle misure di voltammetria, l'elettrodo di *reference* diventa quello a destra del *control*. In queste ultime l'elettrodo che nelle misure di spettroscopia veniva utilizzato come riferimento, viene chiamato *counter* e fornisce gli elettroni necessari per far avvenire le reazioni elettrochimiche di ossidoriduzione chiudendo così il circuito. Viene presentata nell'immagine sottostante la nomenclatura degli elettrodi secondo la convenzione delle misure di voltammetria (per le misure di spettroscopia è sufficiente considerare l'elettrodo di *counter* quale *reference*):

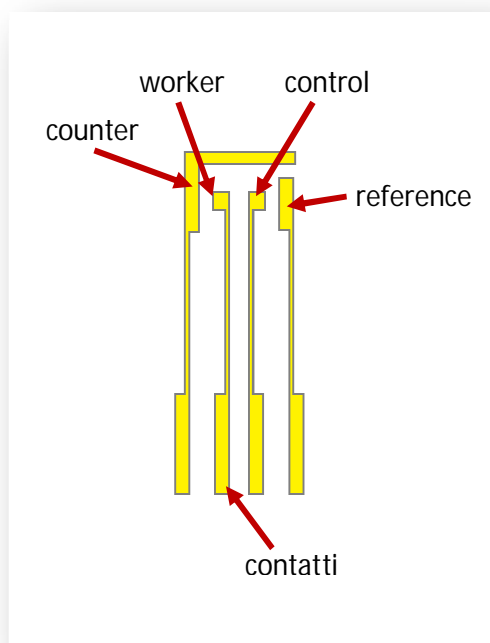


Fig.4.2 Nomenclatura degli elettrodi del biosensore seconda la convenzione delle misure di voltammetria

4.2 SONDE E TARGET UTILIZZATI

Due oligonucleotidi (Sal_CTRL-1A e Sal_CTRL-1B) sono funzionalizzati all'estremità 5' con una catena di 6 atomi di carbonio (C6). Le due sonde riconoscono una specifica regione della specie *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (tutte le 6 subspecie valide).

Nella tabella che segue sono riportate le caratteristiche delle sonde (le prime due) e del target:

NOME SONDA	LUNGHEZZA	% GC	DIMERI	Str. 2ndarie	Modifica
Sal_CTRL-1A	18	55,56	NO	molto deboli	[ThiC6] in 5'
Sal_CTRL-1B	24	50,00	NO	molto deboli	[ThiC6] in 5'
Sent-27-Fluo	27	55,56		molto deboli	Flc in 5'

Tabella 4.1 Caratteristiche degli oligonucleotidi in esame

dove:

- la lunghezza corrisponde al numero di nucleotidi;

- %GC si riferisce alla quantità di coppie C-G (guanina – citosina). Questa percentuale (come già visto nel capitolo) determina molto la stabilità della sequenza e in base a questo si può anche calcolare la temperatura di melting, ovvero la temperatura alla quale avviene l'ibridazione o la denaturazione. Da questa percentuale si sono determinati i 55°C di lavoro.
- l'assenza di dimeri garantisce di avere una sequenza lineare, distesa, così che l'ibridazione è favorita;
- le sonde sono modificate con il tiolo: ogni estremità 5' è legata a un gruppo tiolo, SH, e 6 atomi di carbonio la cui funzione principale è quella di creare un collegamento tra l'estremità dell'elica e il gruppo tiolo (vedi figura 1.12). Il target invece è modificato, sempre all'estremità 5', con la *fluorescina*.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata solamente la sonda “Sal_CTRL-1B” tra le due a disposizione.

Il DNA è sospeso in una soluzione salina Na₂HPO₄ 100 mM, pH 8.5 necessario sia per mantenere il pH costante ed evitare che il DNA si deteriori sia per mantenere in sospensione le eliche per permettere l'ibridazione.

4.3 STRUMENTAZIONE

Nella figura che segue viene presentato il banco di misura costituito dai 3 strumenti utilizzati nelle analisi di spettroscopia, voltammetria e monitoraggio della temperatura nell'ottimizzazione del protocollo di ibridazione.

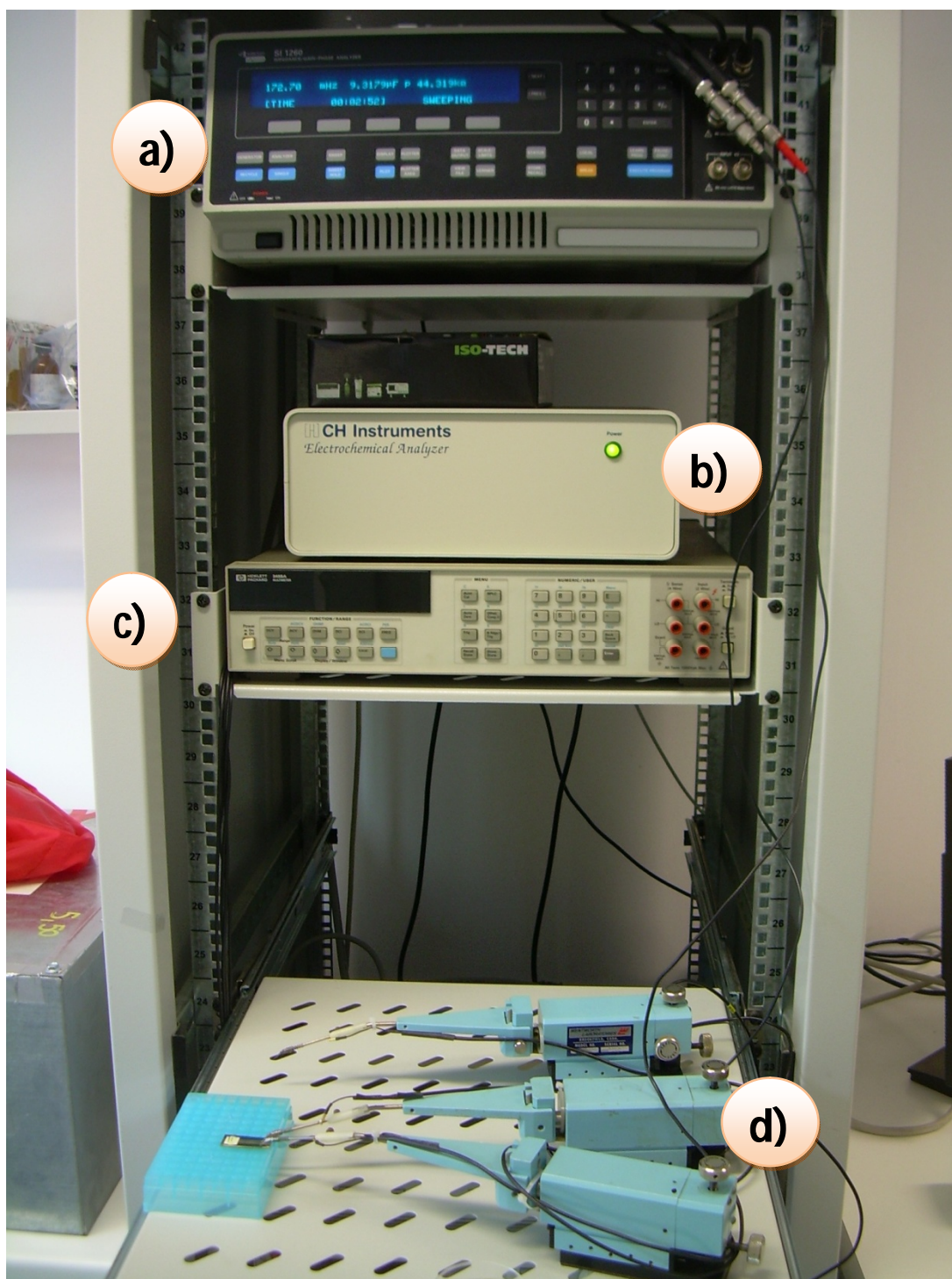


Fig.4. Banco di misura. Dall'alto verso il basso: (a) SCHLUMBERGER SI1260 utilizzato per le misure di spettroscopia (in corso nella foto). (b) "CH 440A Electrochemical Analyzer" adoperato per le misure di voltammetria. (c) Multimetro digitale "HP - Agilent 3458A" utilizzato assieme all'adattatore di termocoppia per monitorare la temperatura nell'ottimizzazione del protocollo di ibridazione. (d) Micromanipolatori con cui contatto il biosensore.

Durante le misure, il dispositivo è contattato attraverso 2 o 3 micromanipolatori a seconda del tipo di misura da effettuare.

4.3.1 SOLARTRON SI1260 IMPEDANCE/GAIN-PHASE ANALYZER

Questo strumento è stato adoperato sul biosensore come analizzatore di impedenza per investigare il comportamento elettrochimico del dispositivo esposto alla soluzione salina o ad altre molecole cariche. L'impedenza è misurata rispetto alla frequenza del segnale applicato tra l'elettrodo di riferimento (*reference*) e quello di lavoro (*worker* o *control*).

In tutte le misure lo strumento è stato impostato per rappresentare il sistema come parallelo RC o come modulo e fase.

I collegamenti che permettono la misura di spettroscopia sono mostrati nello schema sottostante:

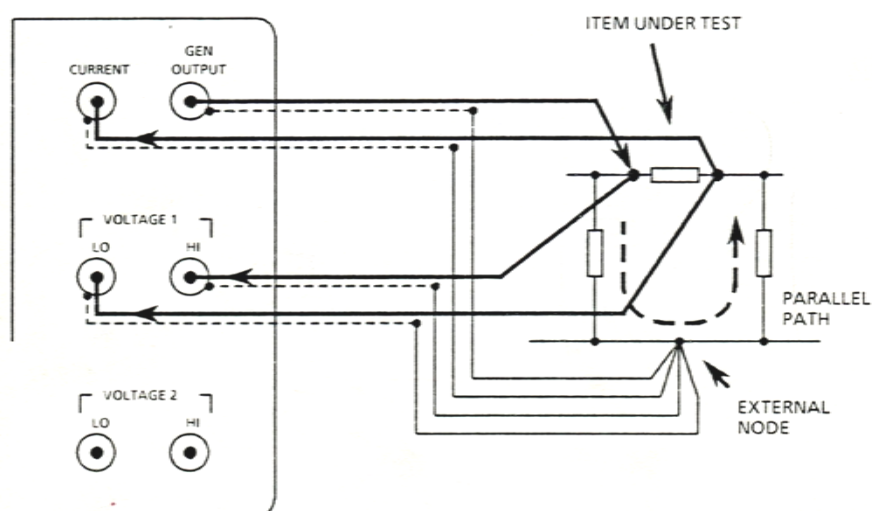


Fig.4. 4 Schema delle connessioni per le misure di impedenza con SI1260

Nella figura 4.5 sotto riportata sono presentate le specifiche delle caratteristiche del SI1260:

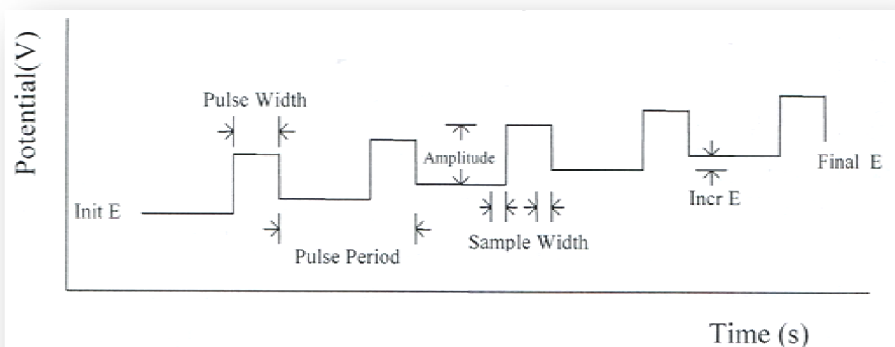
GENERATOR			ANALYSIS			
Frequency,			Three independent analyzers operating in parallel.			
Range:			10μHz to 32MHz			
Resolution, 10μHz to 655.36Hz:			10μHz			
655.36Hz to 6.5536kHz:			100μHz			
6.5536kHz to 65.536kHz:			1mHz			
65.536kHz to 655.36kHz:			10mHz			
655.36kHz to 6.5536MHz:			100mHz			
6.5536MHz to 32MHz:			1Hz			
Error:			±100ppm			
Stability, 24hrs ±1°C:			±10ppm			
Amplitude,			Voltage measurement			
<10MHz:			Range (rms)			
>10MHz:			Resolution			
Resolution:			Full scale peak input			
Error, o/c:			Common mode rejected			
s/c:			30mV 1μV 45mV 5V			
Distortion:			300mV 10μV 500mV 5V			
			3V 100μV 5V 5V			
DC Bias,			Input protected to: ±46V			
Range:			Input configuration			
Resolution:			Connection:			
Error, o/c:			Differential, BNC outers floating			
s/c:			Differential, BNC outers grounded			
			Single-ended, BNC outers floating			
			Single-ended, BNC outers grounded			
Coupling:			dc or ac (-3dB at 1Hz)			
Impedance, Hi to outer:			1MΩ ±2%, <35pF			
Outer to ground:			10kΩ, 330pF			
Common mode rejection (at 1MHz):			>50dB			
Cross-channel isolation (at 1MHz):			>100dB			
Noise floor (at 1MHz):			-110dBV			
Sweep,			Current measurement			
Types:			Range (rms)			
Resolution:			Resolution			
Control:			Full scale peak input			
			Input resistance			
Maximum current:			6μA* 200pA 9μA 110Ω			
Maximum voltage, Hi to Lo:			60μA* 2nA 90μA 110Ω			
Lo to ground:			600μA 20nA 900μA 110Ω			
Output impedance, voltage:			6mA 200nA 10mA 2Ω			
Lo to ground:			60mA** 2μA 100mA 2Ω			
Connection:			* For frequencies <10MHz only			
Output disable:			** For frequencies >10MHz maximum current 20mA rms			
Output is short-circuit proof			Input protected to: ±250mA			
			Connection: floating, single BNC			
			Coupling: dc or ac (-3dB at 1Hz)			
			Impedance, Outer to ground: 100kΩ, <200pF			
			Outer floating to: ±0.4V			
			Integration time: 10ms to 10 ⁵ s, or auto			
			Measurement delay: 0 to 10 ⁵ s			

Fig.4. 5 Caratteristiche del SI1260

4.3.2 CH 440A ELECTROCHEMICAL ANALYZER

Strumento adoperato per le misure di voltammetria. Applicato in ingresso un segnale di tensione con forma definita dalla tecnica di analisi prescelta (in questo caso DPV – *differential pulse voltammetry*, voltammetria differenziale a impulsi) con parametri stabiliti dall'operatore, restituisce in uscita una lettura della corrente nel sistema elettrochimico indagato.

Le caratteristiche della forma d'onda di tensione in ingresso sono presentate nella figura.4.6 :



The following are the experimental parameters, their range and descriptions:

<u>Parameters</u>	<u>Range</u>	<u>Description</u>
Init E (V)	-10 - +10	Initial potential
Final E (V)	-10 - +10	Final potential
Incr E (V)	± 0.001 - ± 0.05	Increment potential of each point
Amplitude (V)	0.001 - 0.5	Potential pulse amplitude
Pulse Width (sec)	0.001 - 10	Potential pulse width
Sampling Width (sec)	1e-4 - 10	Data sampling width
Pulse Period (sec)	0.01 - 50	Potential pulse period or dropping time
Quiet Time (sec)	0 - 100000	Quiescent time before potential scan
Sensitivity (A/V)	1e-12 - 0.1	Sensitivity scale

Fig.4. 6 Forma d'onda di tensione del segnale d'ingresso nella tecnica DPV e relativi parametri impostabili dall'utente

Vengono sotto riportate le caratteristiche tecniche dello strumento:

Potentiostat	CV and LSV scan rate: 0.000001 to 2000 V/s
Galvanostat (Model 440A)	Potential increment during scan: 0.1 mV @ 100 V/s
Potential range: -10 to 10V	CA and CC pulse width: 0.0001 to 1000 sec
Potentiostat rise time: < 2 μ s	CA and CC Steps: 320
Compliance voltage: ± 12 V	DPV and NPV pulse width: 0.0001 to 10 sec
3- or 4-electrode configuration	SWV frequency: 1 to 100 kHz
Current range: 250 mA	ACV frequency: 0.1 to 10 kHz
Reference electrode input impedance: 1×10^{12} ohm	SHACV frequency: 0.1 to 5 kHz
Sensitivity scale: 1×10^{12} - 0.1 A/V in 34 ranges	Automatic potential and current zeroing
Input bias current: < 50 pA	RDE rotation control output: 0 - 10 V (430A and up)
Current measurement resolution: < 1 pA	Potential and current analog output
Minimum potential increment in CV: 100 μ V	Cell control: purge, stir, knock
Potential update rate: 1 MHz	Data length: 128K-4096K selectable
Data acquisition: 16 bit @ 200 kHz	Chassis dimension: 12.5"(W) \times 11"(D) \times 4.75"(H)
Frequency resolution: < 0.1 Hz	Oscillator box (external):
QCM maximum sampling rate: 500 Hz	4.75"(L) \times 2.6" (W) \times 1.55" (H)
Automatic and manual iR compensation	Weight: 15 Lb.
Low-pass signal filters, automatic and manual setting	

Fig.4. 7 Caratteristiche del CH 440A Electrochemical Analyzer.

4.3.3 HP - AGILENT 3458A

Multimetro digitale capace di effettuare misure digitali di tensione continua ed alternata, di corrente continua ed alternata, di resistenza di capacità, di temperatura e di amplificazione.

Lo strumento verrà usato con un adattatore collegato a una termocoppia per compiere misure di temperatura atte ad ottimizzare il protocollo di ibridazione. Nella figura 4.8 sotto riportata sono presentate le specifiche delle caratteristiche del HP - AGILENT 3458A:

<p>dc Volts</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5 ranges: 0.1 V to 1000 V • 8.5 to 4.5 digit resolution • Up to 100,000 readings/sec (4.5 digits) • Maximum sensitivity: 10 nV • 0.6 ppm 24 hour accuracy • 8 ppm (4 ppm optional) / year voltage reference stability <p>Ohms</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 ranges: 10 Ω to 1 GΩ • Two-wire and four-wire Ohms with offset compensation • Up to 50,000 readings/sec (5.5 digits) • Maximum Sensitivity: 10 $\mu\Omega$ • 2.2 ppm 24 hour accuracy 	<p>ac Volts</p> <ul style="list-style-type: none"> • 6 ranges: 10 mV to 1000 V • 1 Hz to 10 MHz bandwidth • Up to 50 readings/sec with all readings to specified accuracy • Choice of sampling or analog true rms techniques • 100 ppm best accuracy <p>dc Current</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8 ranges: 100 nA to 1 A • Up to 1,350 readings/sec (5.5 digits) • Maximum sensitivity: 1 pA • 14 ppm 24 hour accuracy <p>ac Current</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5 ranges: 100 μA to 1 A • 10 Hz to 100 kHz bandwidth • Up to 50 readings/sec • 500 ppm 24 hour accuracy 	<p>Frequency and Period</p> <ul style="list-style-type: none"> • Voltage or current ranges • Frequency: 1 Hz to 10 MHz • Period: 100 ns to 1 sec • 0.01% accuracy • ac or dc coupled <p>Maximum Speeds</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100,000 readings/sec at 4.5 digits (16 bits) • 50,000 readings/sec at 5.5 digits • 6,000 readings/sec at 6.5 digits • 60 readings/sec at 7.5 digits • 6 readings/sec at 8.5 digits <p>Measurement Set-Up Speed</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100,000 readings/sec over GPIB* or with internal memory • 110 autoranges/sec • 340 function or range changes/sec • Post-processed math from internal memory
---	---	--

Fig.4. 8 Caratteristiche dello strumento HP - AGILENT 3458A.

4.3.4 ITA 11 THERMOCOUPLE MODULE

Sonda di termocoppia con adattatore per multimetro. Converte, tramite sonde di termocoppia a goccia di tipo K, qualsiasi multimetro digitale standard in uno strumento che consente il rilevamento di temperature fino a 1000°C (200°C con il sensore fornito a corredo e da noi utilizzato).

Il modulo viene collegato tramite cavi coassiali al multimetro digitale o al tester e utilizzato per monitorare nel tempo la temperatura del sensore durante la fase di ibridazione al fine di ottimizzare tale protocollo (vedi Appendice A).

Sono riportate sotto le specifiche delle caratteristiche dello strumento:

Gamma di temperatura	da -50°C a 1000°C
	da -58°F a 1832°F
Segnale di uscita	1mV= per °C o °F
Precisione	da -50°C a -20°C $\pm(2,0\%+2^\circ\text{C})$
	da -19°C a 350°C $\pm(0,5\%+2^\circ\text{C})$
	da 351°C a 500°C $\pm(2,0\%+2^\circ\text{C})$
	da 501°C a 1000°C $\pm(2,9\% + 2^\circ\text{C})$
Protezione d'ingresso	60V=, 24V valore efficace
Temperatura ambiente	da 0°C a 50°C
Termocoppia a goccia fornita di serie	
Gamma di temperatura	da -40°C a 204°C
	da -40°F a 399°F
Tolleranza	$\pm(2,2^\circ\text{C})$ da 0°C a 204°C

Fig.4. 9 Specifiche tecniche del modulo ITA 11 Thermocouple Module

4.4 SOFTWARE DEDICATI

Per le misure di spettroscopia d'impedenza e per quelle di monitoraggio della temperatura attraverso il multimetro digitale, sono stati realizzati due programmi in LabVIEW8.6 che consentono di comunicare con gli strumenti di misura grazie ad un interfaccia semplice ma completa. Per quanto riguarda le misure di voltammetria, si è utilizzato il software fornito con lo strumento.

Tutti i programmi elencati sotto sono stati dotati di un blocco di salvataggio che permette di salvare i risultati in un file in formato “.txt”. Tutti i grafici sono stati generati con MATLAB R2009a .

4.4.1 MISURE EIS

Questo tipo di misura permette di rilevare l'impedenza del biosensore in funzione della frequenza del segnale applicato sul dispositivo.

Per realizzare tali misure è stato adoperato un software che permette di scegliere l'intervallo entro cui far variare la frequenza del segnale da applicare e il numero di passi in cui dividere tale intervallo. Per ogni valore di frequenza viene salvato il valore

di impedenza relativo, già scomposto in componente capacitiva e resistiva. È possibile definire il numero di ripetizioni della stessa misura. L'interfaccia utente di tale programma è mostrata in figura 4.10 :

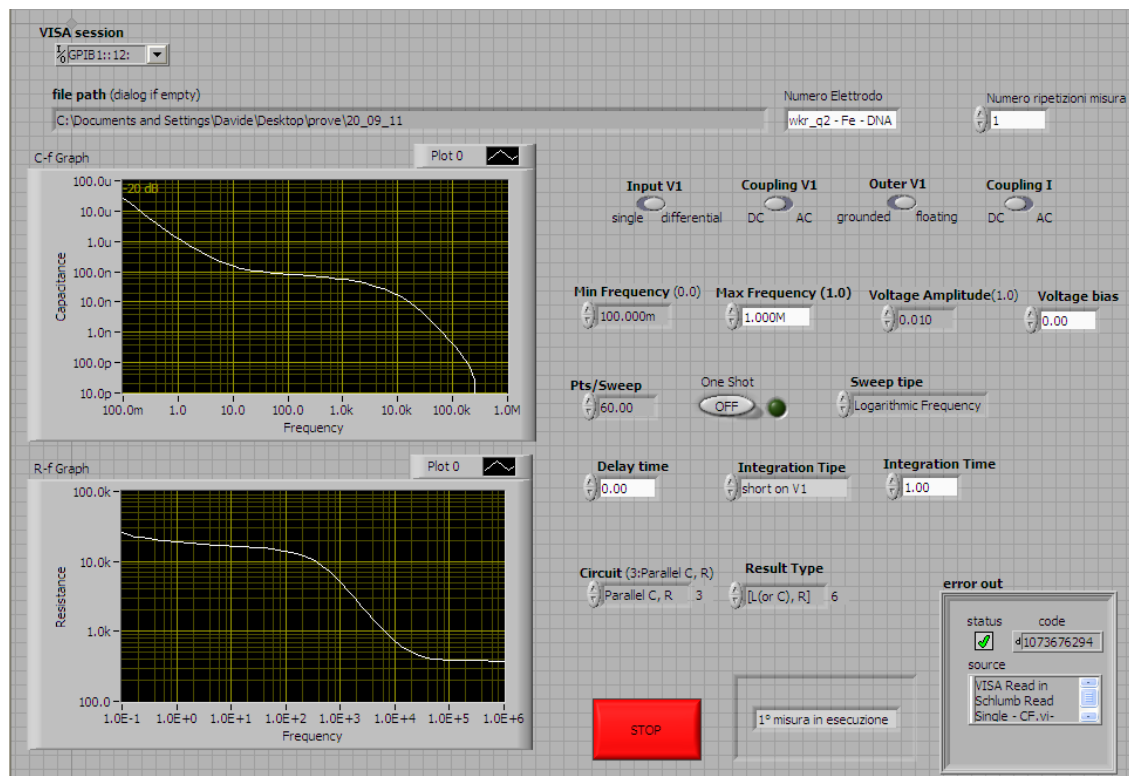


Fig.4.10 Interfaccia utente del programma per le misure EIS

Tra i vari parametri che si possono impostare vi sono:

- **Ampiezza in tensione dell'onda sinusoidale.** Nelle misure di spettroscopia d'impedenza è importante che questo valore sia inferiore a 100 mV per far sì che la soluzione sia in equilibrio termodinamico e venga garantita la linearità; Se questo non avviene si possono generare reazioni che non fanno parte della misura.
- **Tensione di Bias:** componente continua di tensione aggiunta al segnale sinusoidale;
- **Pts/Sweep:** campioni di misura presi nell'intervallo di frequenza analizzato;
- **One shot:** attivato nel caso sia necessario effettuare misure puntuali, acquisire un solo campione;
- **Delay time:** tempo di attesa tra una misura e l'altra quando si eseguono più ripetizioni della misura. Questa impostazione si usa di solito quando non si ha la

certezza che, una volta effettuata la prima misura, il sistema sotto esame sia tornato in equilibrio termodinamico. Dal momento che, come già riportato sopra, impostando un'ampiezza del segnale d'ingresso inferiore a 100 mV è difficile andare fuori equilibrio, questo parametro di solito non viene impostato;

- **Integration time:** è possibile impostare un tempo durante il quale i campioni raccolti vengono mantenuti in memoria e poi restituiti come un unico campione media di quelli acquisiti nell'arco di tempo di integrazione. Questa funzione è utile per attenuare il rumore;
- **Tipo di risultati da restituire e tipo di circuito di misura:** si può modificare il circuito equivalente interno allo strumento che compie la misura e i dati da riportare nel file “.txt” di output;

I valori imposti in questo tipo di misure sono:

- **Range di frequenza da analizzare:** 100 mHz ÷ 1MHz
- **Ampiezza in tensione dell'onda sinusoidale:** 10 mV
- **Bias:** 0 V
- **Pts/Sweep:** 60
- **Delay time:** 0 s
- **Integration time:** 1 s, short on V1

Lo strumento compie lo sweep delle frequenze a partire da quelle più alte verso quelle più basse. Mentre nelle misure effettuate sul sistema elettrodo-soluzione qui in esame questa modalità è poco rilevante, assume particolare importanza quando le medesime misure vengono effettuate su campioni biologici quali cellule. La tensione applicata, per quanto bassa, può influire negativamente su di essi; l'analisi a 100 mHz – 1 Hz, ha una durata considerevole mentre quando sono nei MHz la durata del segnale che sto dando è estremamente più corta. Risulta quindi conveniente partire dalle misure alle alte frequenze per non rischiare di danneggiare subito il campione con le prime misure in bassa frequenza che comprometterebbero l'intera misura.

4.4.2 MISURE DPV

Il software fornito prevede di poter scegliere la tecnica di voltammetria da effettuare e di settarne i parametri presentati in figura.4.6 . Questi ultimi devono essere impostati in base al tipo di soluzione redox che uso nelle misure; ad esempio: il range di tensione variabile tra $-0.4 \div 0.4$ è fissato in quanto è stato individuato il picco di corrente con elettrodo *fresh* e soluzione $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in questo range.

In figura 4.11 si può vedere la finestra di impostazione dei parametri con i valori inseriti per le misure effettuate:

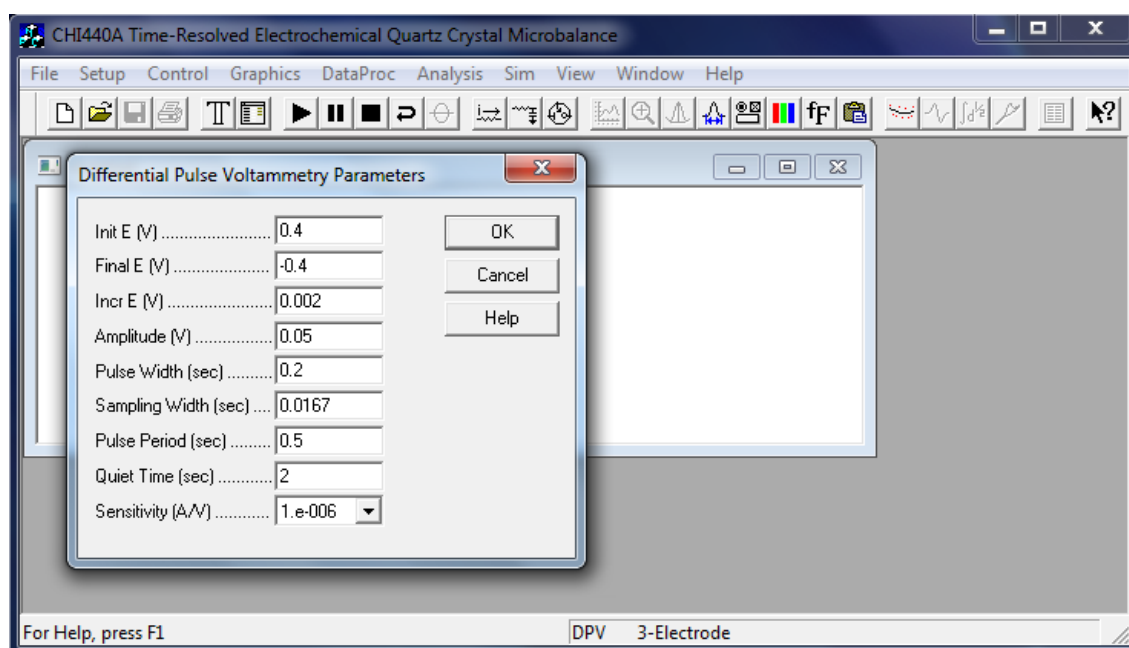


Fig.4. 11 Interfaccia di impostazione dei parametri per una misura DPV

Viene sotto riportata la finestra principale con un esempio di risultato di misura DPV:

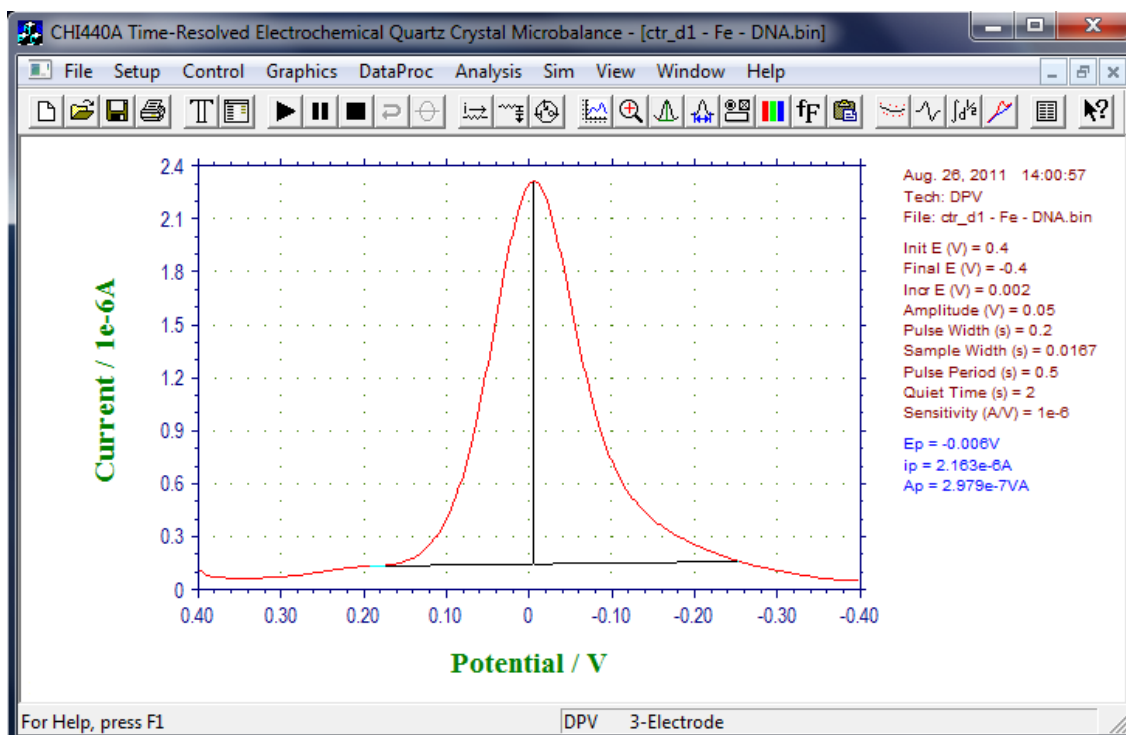


Fig.4. 12 Finestra principale con un esempio di risultato di misura DPV con elettrodo fresh.

Nella finestra principale vengono riportati i parametri relativi alla misura e i valori di picco di corrente (I_p) e la tensione corrispondente (E_p). Il picco di corrente viene valutato sottraendo una componente base.

4.4.3 MISURE DI TEMPERATURA

Questa misura è stata effettuata realizzando un programma in LabVIEW 8.6 la cui interfaccia utente è presentata nella figura sottostante:

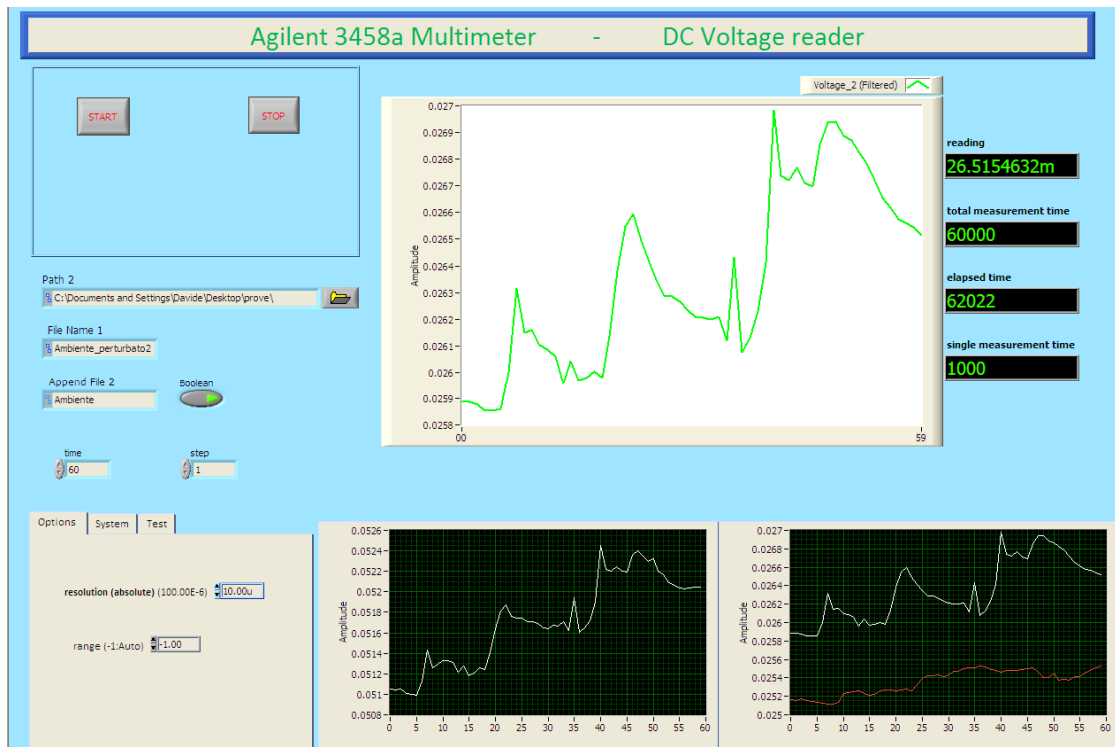


Fig.4. 13 Interfaccia del programma per le misure di temperatura

Il programma, oltre a presentare la misura di tensione in rapporto 1:1000 con la temperatura ($26.5 \text{ mV} = 26.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) percepita dalla termocoppia collegata allo strumento, permette di fare un confronto diretto con misure di temperatura compiute in precedenza e mostrando (nella finestra in basso in centro) la differenza tra l'ultima misura e quella scelta in memoria.

Capitolo 5

Misure effettuate

Dopo aver descritto il dispositivo e la strumentazione utilizzata nelle misure, in questo capitolo verranno presentate le misure compiute per analizzare dettagliatamente le caratteristiche e il comportamento del biosensore nelle varie condizioni di utilizzo.

Dopo un'analisi della risposta del dispositivo in condizioni *fresh*, la quale verrà presa come riferimento per le successive misure, si provvederà a mostrare i risultati inerenti la dinamica di deposizione del probe, la ricerca del “punto di lavoro” del dispositivo e si concluderà con i risultati inerenti la rivelazione di eventi di ibridazione.

Per gli esperimenti effettuati sono stati utilizzati molti dispositivi, tutti con le stesse caratteristiche (a meno di differenze dovute alla variabilità di produzione) già descritte nel capitolo 4.1.

Come già anticipato nei capitoli 2 e 4, sul biosensore sono state fatte misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica e di voltammetria differenziale ad impulsi: le prime mi permettono di determinare capacità e resistenze del modello equivalente del doppio strato associato all'interfaccia, mentre le seconde valutano lo scambio elettronico che avviene tra soluzione ed elettrodo. I dati ricavati ci consentono di analizzare e caratterizzare lo stato dell'elettrodo confrontando i risultati ottenuti con il dispositivo “*fresh*”, ovvero senza cariche sulla superficie, con quelli rilevati dopo avervi depositato il DNA sulla superficie; dall'eventuale variazione d'impedenza (nelle misure EIS) o di ampiezza della corrente (nelle misure DPV) si può capire se il DNA si sia effettivamente combinato e attaccato sulla superficie del biosensore.

Il sistema è composto dal biosensore (con superficie *fresh*, con DNA probe, con DNA probe e target) e dalla soluzione elettrolitica (mediatore redox) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (*ferrocianuro*) a concentrazione 1mM in KCl 100 mM in cui la soluzione ionica KCl è

un buffer che mantiene costante il pH e agevola lo scambio di ioni durante la misura. La medesima sostanza viene usata anche nelle misure di voltammetria.

I parametri impostati per le misure sono quelli mostrati nel capitolo 4.4.

5.1 CONFRONTO CON MISURE EFFETTUATE SU DISPOSITIVO A MICROELETTRODI

La scelta di sperimentare un biosensore con tutti gli elettrodi integrati rispetto ai dispositivi a microelettrodi con elettrodo di riferimento esterno generalmente utilizzati, è giustificata da un confronto effettuato tra le misure di voltammetria compiute su questi ultimi e quelle effettuate sul dispositivo integrato.

La figura 5.1 mostra due misure di ciclovoltammetria: la prima (in verde e blu) compiuta su un dispositivo a microelettrodi con elettrodo di riferimento esterno in Ag\AgCl e *counter* in platino; la seconda compiuta sul biosensore con elettrodo di riferimento (*reference*) integrato in oro.

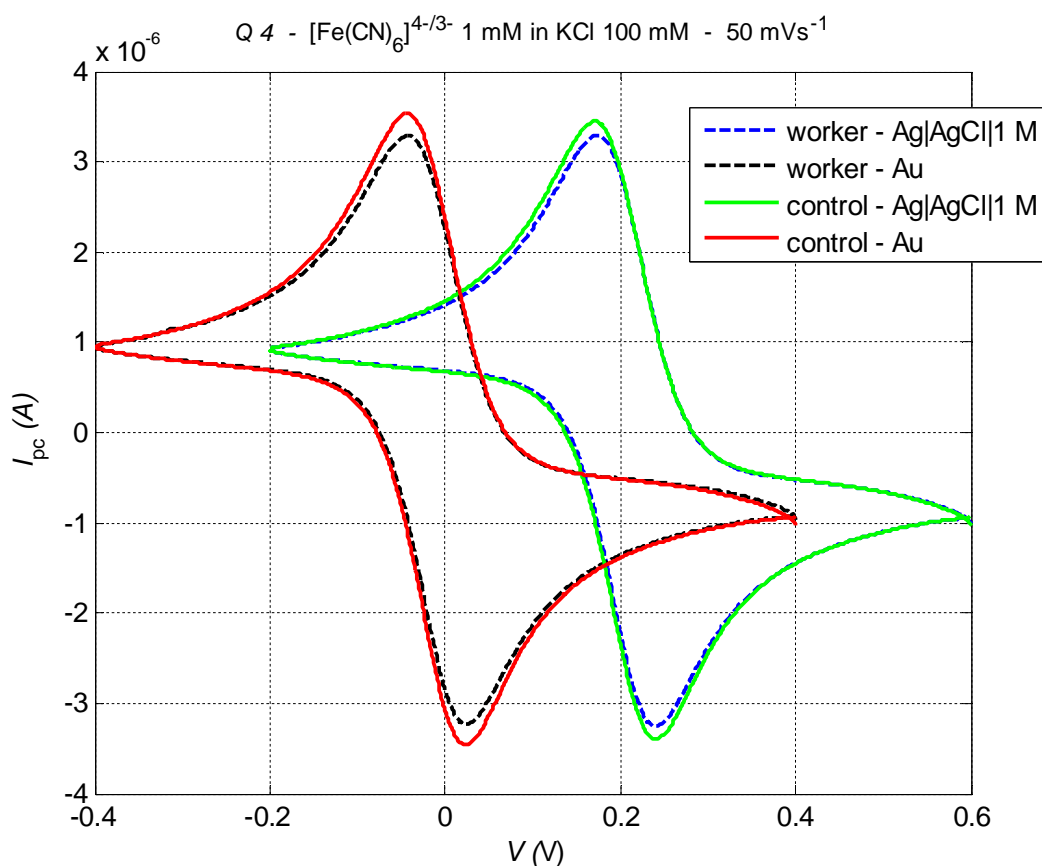


Fig.5.1 Ciclovoltammetrie compiute su dispositivo con elettrodo di riferimento esterno e counter in platino e su dispositivo in oro (Au) completamente integrato.

Si osserva che la misura sul *worker* e quella sul *control* sono molto simili (a meno di una differenza costante di cui si discuterà più avanti, nel paragrafo 5.2) su uno stesso dispositivo. Il confronto più importante è però quello tra i due diversi dispositivi.

Il grafico mostra con evidenza che i due dispositivi sono confrontabili e quindi sostituibili nel tipo di misure effettuate: le caratteristiche dei due biosensori differiscono per uno *shift* costante delle curve dovuto alla differenza di reference (che è l'elettrodo che mi impone la tensione e di conseguenza una variazione sulla composizione di tale elettrodo comporta necessariamente una traslazione in tensione della risposta del dispositivo, anche se questa provenisse dalla stessa struttura a microelettrodi su cui vado ipoteticamente a variare la composizione del riferimento esterno, ad esempio la molarità dell'AgCl).

Grazie a questa analisi si può affermare che è possibile utilizzare il nuovo dispositivo con elettrodi integrati nella stessa struttura (la cui integrazione offre notevoli vantaggi in termini di complessità della misura e di costi) per compiere lo stesso tipo di misure che vengono generalmente compiute con dispositivi a microelettrodi ed elettrodo di riferimento esterno.

5.2 MISURE SUL BIOSENSORE *FRESH*

Per biosensore *fresh* si intende il dispositivo senza alcuna molecola biologica presente sulla superficie, ovvero il biosensore il cui strato d'oro è a diretto contatto con la soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. All'interfaccia elettrodo/soluzione il potenziale è determinato solamente dal doppio strato (vedi capitolo 2). La misura serve da riferimento alle fasi successive.

Poiché le variazioni nell'impedenza dell'intero sistema è dovuta principalmente alla variazione delle condizioni all'interfaccia tra gli elettrodi esposti dalla maschera di vinile e la soluzione elettrolitica, diventa essenziale far precedere ad ogni misura un'adeguata pulizia della superficie del dispositivo risciacquandola abbondantemente con acqua distillata (vedi Appendice A) sia nelle misure con elettrodi *fresh*, sia dopo la deposizione e ibridazione. Inoltre, poiché il legame covalente si può creare esclusivamente tra Au e S, la superficie d'oro, nel momento della deposizione, deve

essere assolutamente priva di impurità o molecole estranee e di conseguenza anche la deposizione del DNA deve essere preceduta da una fase di pulizia.

5.2.1 INFLUENZA DELLA GEOMETRIA DEGLI ELETTRODI SULLA DISPERSIONE DELLE MISURE

Le misure di impedenza si dimostrano uno strumento di analisi utile per determinare lo stato e il corretto funzionamento di un elettrodo. Infatti, indipendentemente dai depositi o residui sulla superficie d'oro, un elettrodo può dare letture non corrette della carica a causa di difetti nei processi di produzione, quali graffi sulle superficie che asportano il sottile strato d'oro deposto sul substrato polimerico o contorni irregolari delle aree esposte dalla maschera in vinile. Le ripetizioni delle misure e la presenza delle stesse curve sul medesimo dispositivo, dimostra che tali sensori devono essere scartati e le relative misure non considerate nelle successive analisi.

Sebbene ad occhio nudo le aree disegnate dalla maschera di vinile appaiano identiche tra vari dispositivi, una verifica al microscopio in trasmissione e in riflessione effettuata successivamente alla costruzione del dispositivo permette di evidenziare le imprecisioni nei contorni (dovute a sporgenze del vinile, tracce di colla,...) ed eventuali danneggiamenti della superficie scartando i dispositivi meno idonei (vedi figura.5.2).

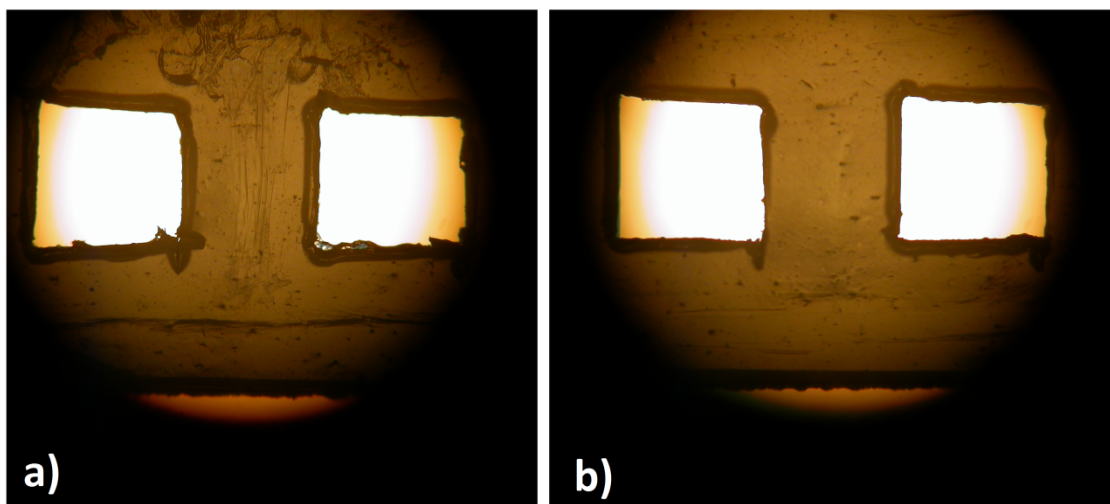


Fig.5. 2 Geometria delle aree degli elettrodi esposti dalla maschera di vinile. In ciascuna foto (realizzata al microscopio in riflessione) sono mostrate le regioni di *worker* (a destra) e di *control* (a sinistra). In basso si intravede il bordo inferiore del lato lungo dell'elettrodo di *reference*. (a) Dispositivo scartato, le cui misure di impedenza si discostano dal valore atteso a causa delle imprecisioni nei contorni dovute a sporgenze di vinile e di colla. (b) Dispositivo idoneo.

Nell'immagine sottostante (figura 5.3) sono presentate le caratteristiche misurate sulla prima serie di dispositivi creati con inevitabili imprecisioni strutturali (il dispositivo mostrato in figura.5.2(a) appartiene alla serie qui rappresentata). È evidente una notevole dispersione interdispositivo. La dispersione si riduce però con l'aumento di precisione nella definizione delle regioni scoperte ed il risultato dell'ottimizzazione è mostrata dalle caratteristiche di figura 5.4 (ottenute da misure su dispositivi con regioni definite come nel dispositivo di figura 5.2(b)).

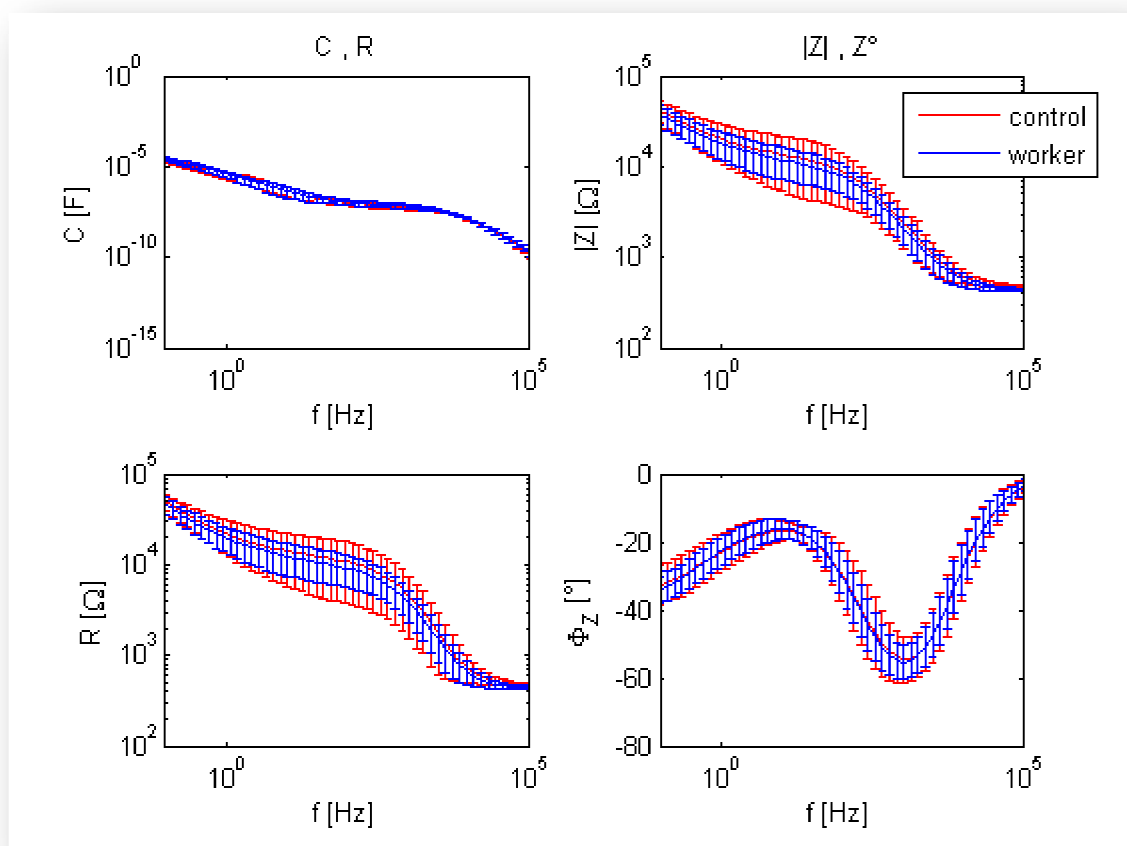


Fig.5.3 Medie e deviazioni standard delle caratteristiche ottenute da misure di spettroscopia con dispositivi fresh (con solo soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) sulla prima serie creata di 10 dispositivi. Le curve presentano notevole dispersione interdispositivo.

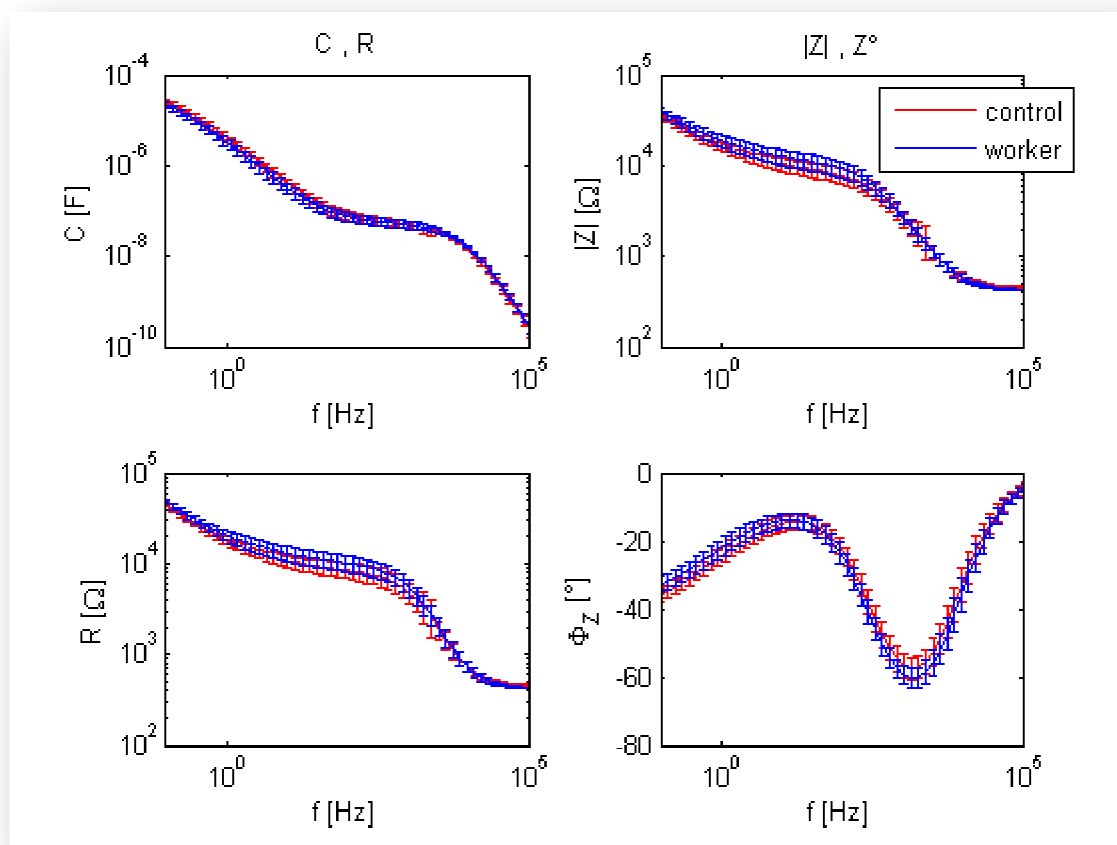


Fig.5. 4 Medie e deviazioni standard delle caratteristiche ottenute da misure di spettroscopia con dispositivi *fresh* (con solo soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) su una serie di 10 dispositivi creata successivamente. Le curve presentano una dispersione interdispositivo ridotta rispetto alla prima serie.

Misure che si discostano dai valori attesi possono presentarsi anche in presenza di bolle d'aria formatisi tra la soluzione e la superficie d'oro che creano punti a più elevata resistenza d'interfaccia (con conseguente maggiore probabilità di deterioramento della superficie durante la misure ed effetti visibili non solo a microscopio). Per questo, nella deposizione del mediatore redox, è necessario ridistribuire più volte tale soluzione e cercare di eliminare eventuali bolle formate all'interfaccia.

Nelle analisi effettuate non viene presa in considerazione la dispersione intradispositivo che, da un'indagine effettuata con 10 ripetizioni di misure EIS su un singolo dispositivo, si è rivelata comunque contenuta nella dispersione della caratteristica valutata su 53 dispositivi *fresh* (vedi paragrafo 5.2.2).

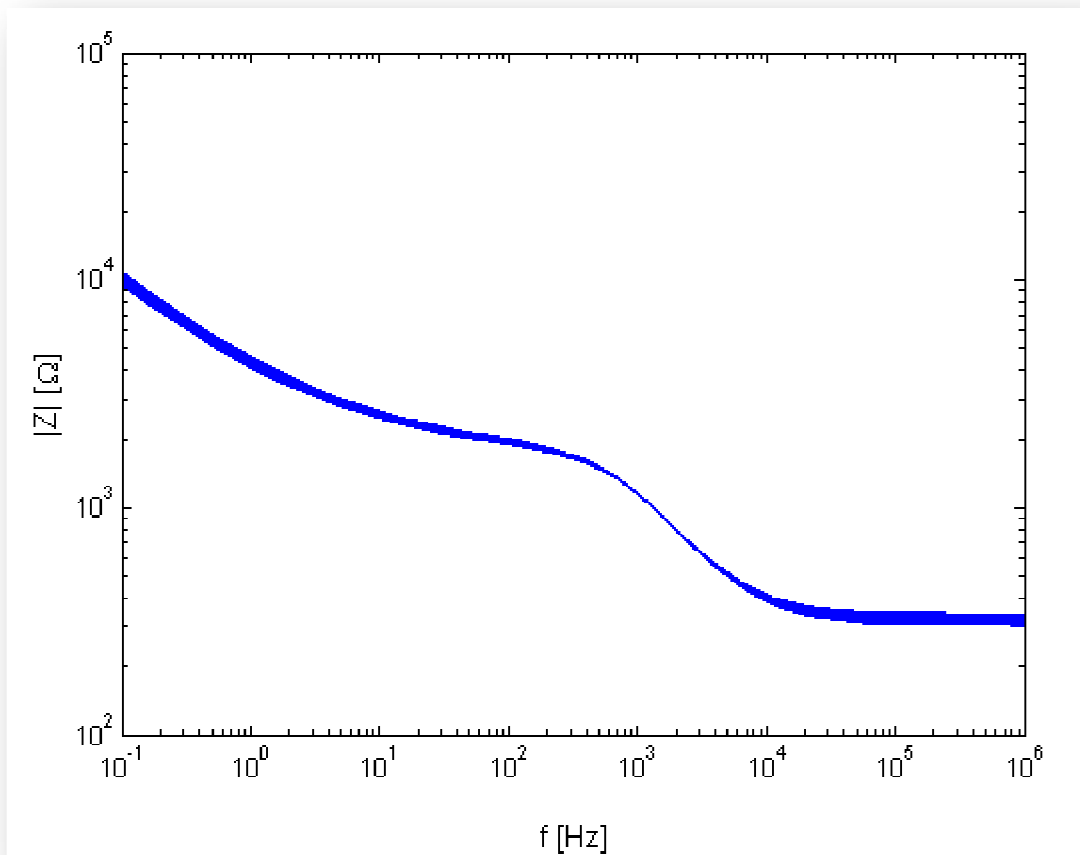


Fig.5. 5 Modulo dell'impedenza valutata con 10 ripetizioni di misure di spettroscopia su un singolo dispositivo *fresh* (con solo soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) valutate sull'elettrodo di *worker*. Le misure sono sovrapposte con minima dispersione, confrontabile con quella interdispositivo valutata su 53 dispositivi *fresh*.

5.2.2 RISPOSTA CON SOLUZIONE ELETTROLITICA $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

Le misure effettuate su 53 dispositivi *fresh* con questa sostanza elettrolitica hanno permesso di ricavare una caratteristica di riferimento per le successive misure.

Si è provato a confrontare due rappresentazioni simili (entrambe valide) della caratteristica di riferimento (che d'ora in avanti, per brevità, verrà nominata “*caratteristica Fe*”):

- la prima ottenuta analizzando i dati relativi a 53 dispositivi;
- la seconda ottenuta analizzando 31 dei 53 dispositivi, selezionati da 2 filtri implementati nel codice di elaborazione delle misure: un filtro manuale che permette di eliminare i dispositivi che mostrano caratteristiche visibilmente discordanti dal valore atteso e un filtro automatico in grado di escludere i

dispositivi meno idonei a partire da un confronto delle singole caratteristiche con il valore atteso e la deviazione standard ad esso associata¹;

Sono mostrati di seguito i diagrammi di Bode con medie e deviazioni standard dei parametri (C , R $|Z|$ e Z°) valutati sui due elettrodi di *worker* e di *control* per le due rappresentazioni della caratteristica appena esposte:

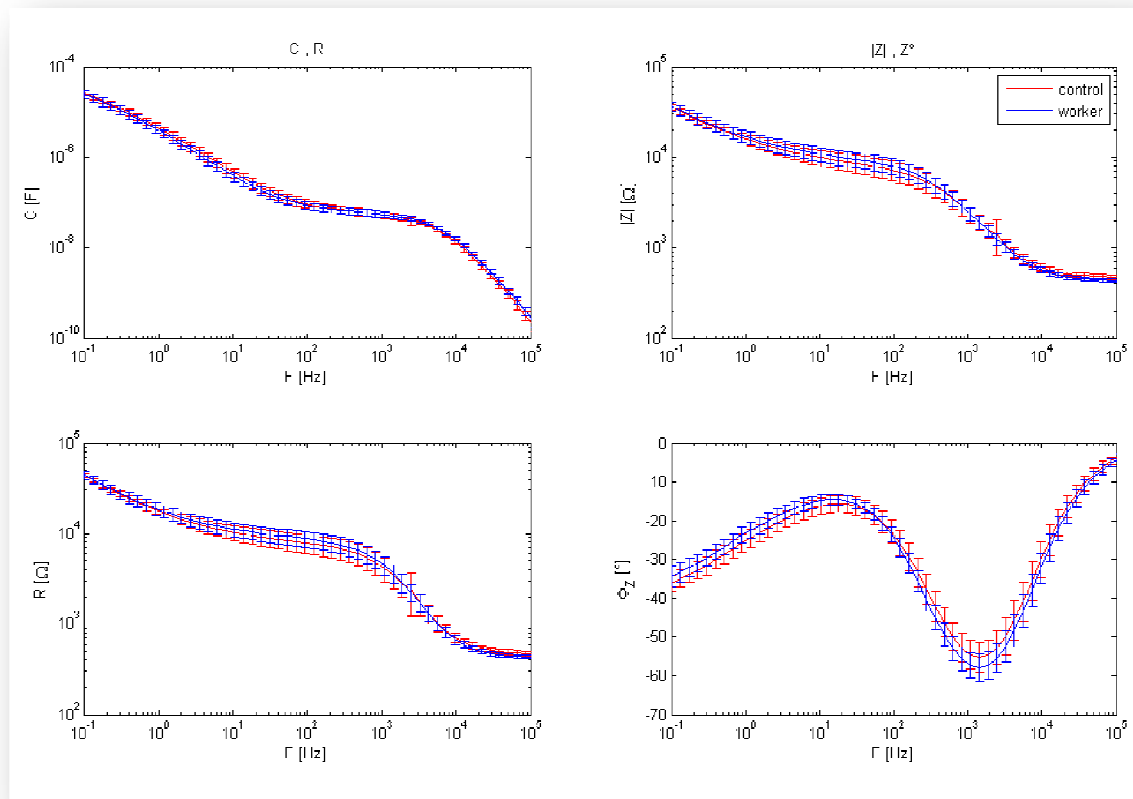


Fig.5. 6 Diagramma di Bode dei valori medi e deviazioni standard dei parametri associati alla caratteristica Fe ottenuta dall'analisi di tutti i 53 dispositivi.

¹ Si tratta in sostanza di un filtro automatico che scarta dall'analisi quei dispositivi che mostrano caratteristiche che si scostano più di un certo multiplo pre-impostato (che verrà chiamato in seguito "fattore di selettività") di σ (nel caso specifico 2.5σ) dai valori attesi di modulo e fase dell'impedenza ($|Z|$ e Z°) su tutto lo spettro analizzato dalle misure EIS (100mHz ÷ 1MHz) sia in riferimento all'elettrodo di *control* che a quello di *worker*.

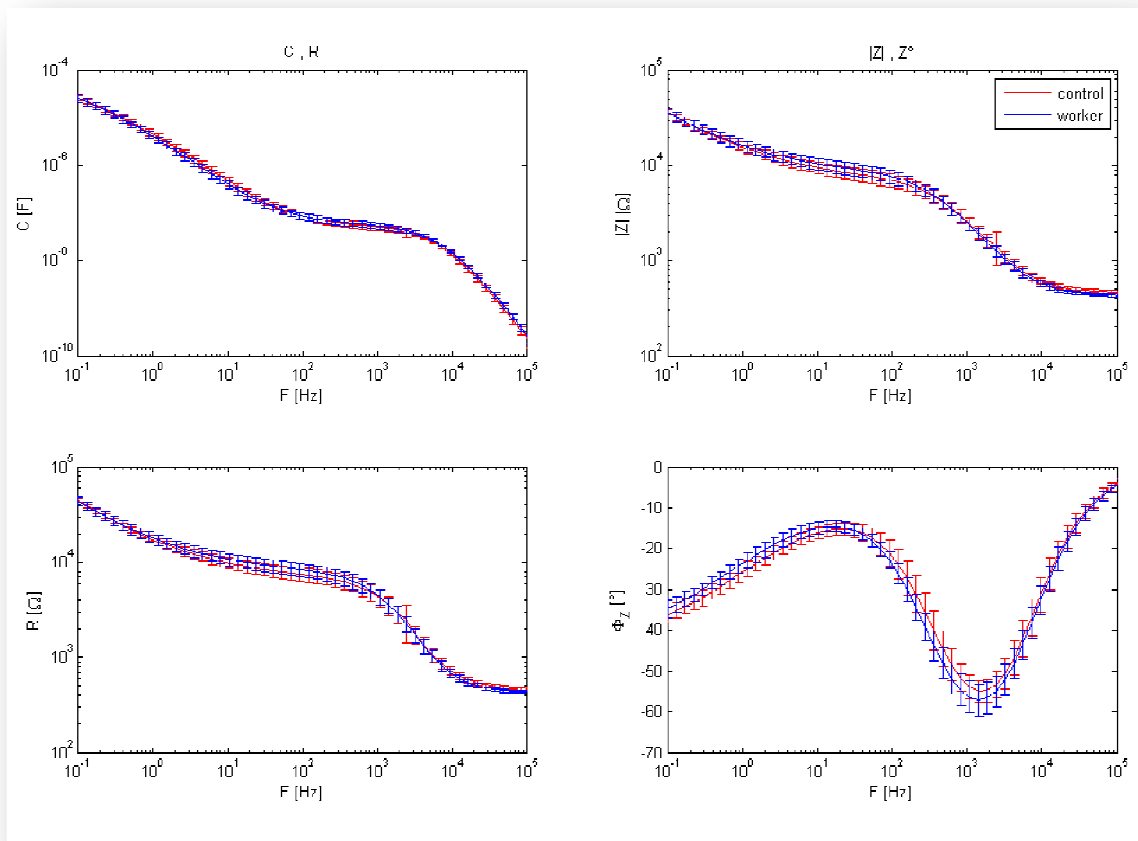


Fig. 5. 7 Diagramma di Bode dei valori medi e deviazioni standard dei parametri associati alla caratteristica Fe ottenuta dall'analisi di soli 31 dispositivi.

Per confrontare le due caratteristiche ottenute e valutare quale si prestasse meglio a diventare la caratteristica di riferimento per le successive analisi, si è calcolato (al variare della selettività del filtro automatico) il *coefficiente di variazione percentuale* (o *deviazione standard relativa percentuale*) definito, per un dato campione, come il rapporto tra la sua deviazione standard (σ) e il valore assoluto della sua media aritmetica (μ):

$$CV\% = \frac{\sigma}{|\mu|} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Si tratta di un indice di dispersione che, rispetto alla semplice deviazione standard, ha il vantaggio di permettere di confrontare misure di fenomeni riferite a unità di misura differenti, in quanto si tratta di un numero puro (ovvero non riferito ad alcuna unità di misura). Viene comunemente considerato un indice della precisione di una misura.

Tale parametro è stato valutato (al variare della selettività del filtro automatico) sulle caratteristiche $|Z|$ e Z° ottenute sul *worker* e *control* in corrispondenza di 2 frequenze significative, 50 Hz e 1 KHz, in cui si nota nei diagrammi di Bode una particolare dispersione delle caratteristiche rispettivamente di modulo e fase dell'impedenza. È stato inoltre valutato il CV% minimo e massimo nelle due caratteristiche.

Il risultato di questi calcoli è presentato nella tabella sottostante:

Selettività	# dispositivi considerati in partenza	Dispositivi che superano l'ulteriore selezione automatica	$ Z $				Z°			
			min	max	a (f = 50 Hz)	a (f = 1 KHz)	min	max	a (f = 50 Hz)	a (f = 1 KHz)
1σ	53	d8, d9, d10, d13, e3, e10, g1, g5, g7, g8, g9, g10, g11	6,0151	42,5729	23,2457	20,5052	5,7282	27,1945	13,9136	6,6959
			3,8007	19,2361	19,1983	16,4829	5,7858	24,1891	8,1505	5,7858
	31	g7	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0
1.5σ	53	d4, d5, d8, d9, d10, d13, d14, e3, e5, e6, e7, e8, e9, e10, e12, e13, e14, f4, f10, f11, f12, g1, g2, g3, g4, g5, g6, g7, g8, g9, g10, g11	5,1357	32,0349	25,8374	23,1374	7,5066	37,0812	15,7242	9,0192
			4,3156	34,1746	34,0185	24,9235	9,7195	35,5652	12,4965	9,7195
	31	d8, d9, d10, e5, e6, e7, e9, e10, g1, g5, g7, g8, g9, g10, g11	3,4092	38,1013	15,4327	16,4909	4,9289	25,0962	13,2971	5,4548
			3,1028	15,5189	15,5044	13,5972	4,8246	20,6045	8,8462	6,9758
2.5σ	53	d3, d4, d5, d6, d7, d8, d9, d10, d12, d13, d14, e1, e2, e3, e5, e6, e7, e8, e9, e10, e12, e13, e14, f1, f2, f3, f4, f8, f10, f11, f12, f13, g1, g2, g3, g4, g5, g6, g7, g8, g9, g10, g11	6,3354	34,6114	34,3683	26,7404	10,2203	43,7226	19,6696	10,8733
			5,0651	41,5209	41,4599	29,8184	10,5505	43,0174	13,8765	10,5505
	31	d4, d5, d6, d8, d9, d10, d13, e5, e6, e7, e8, e9, e10, e14, f4, f12, g1, g2, g4, g5, g6, g7, g8, g9, g10, g11	4,0338	34,9761	16,1191	22,2038	5,6632	34,3967	19,1199	6,1696
			3,9241	24,3989	23,6581	21,7456	8,1854	33,9141	13,4741	8,2702

Tabella 5.1 Coefficienti di variazione percentuale (CV%) valutati per i contatti di *control* e *worker* sulle caratteristiche $|Z|$ e Z° con diversi fattori di selettività del filtro automatico e con un diverso numero di dispositivi di partenza (individuati da una etichetta composta da una lettera e un numero e riportati nella terza colonna).

dove i vari valori sono espressi in percentuale e, per ciascuna cella, il valore superiore è riferito al *control* mentre quello inferiore al *worker*.

Dalla tabella si può trarre alcune considerazioni:

- il *control* ha caratteristiche mediamente più disperse del *worker*;
- le caratteristiche migliori (che mostrano minor dispersione) si ottengono:
 - considerando tutti i 53 dispositivi con un fattore di selettività (per il filtro automatico) di 1σ ;

- considerando i 31 dispositivi (individuati nella terza colonna della tabella) con un fattore di selettività 1.5σ ;

è così che si sono create due caratteristiche di riferimento le quali hanno entrambe dei vantaggi:

la prima ha quello di essere stata valutata su tutti i dispositivi (vantaggio che manterrà ovviamente se ci si impegna a mantenerla aggiornata ogni qualvolta si farà una nuova misura con la sostanza $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, così da convergere man mano alla caratteristica ideale), la seconda ha il vantaggio invece di avere un minor CV% (coefficiente di variazione percentuale) sui campioni.

Nella figura 5.8 sotto riportata vengono evidenziate le differenze rilevate tra le medie delle misure effettuate sull'elettrodo di *control* e quelle sull'elettrodo di *worker*.

Il motivo di un tale scostamento è da attribuirsi alla geometria del dispositivo: le misure di spettroscopia sono molto influenzate dalla distanza tra gli elettrodi utilizzati nella misura in quanto l'impedenza dipende dalla differente curvatura delle linee di campo elettrico che si chiudono tra gli elettrodi ed è quindi inevitabile che la diversa distanza e posizione del *control* e del *worker* rispetto al *reference* (il primo, per esempio, a differenza del secondo è circondato dall'elettrodo di riferimento) influisca sulla misura.

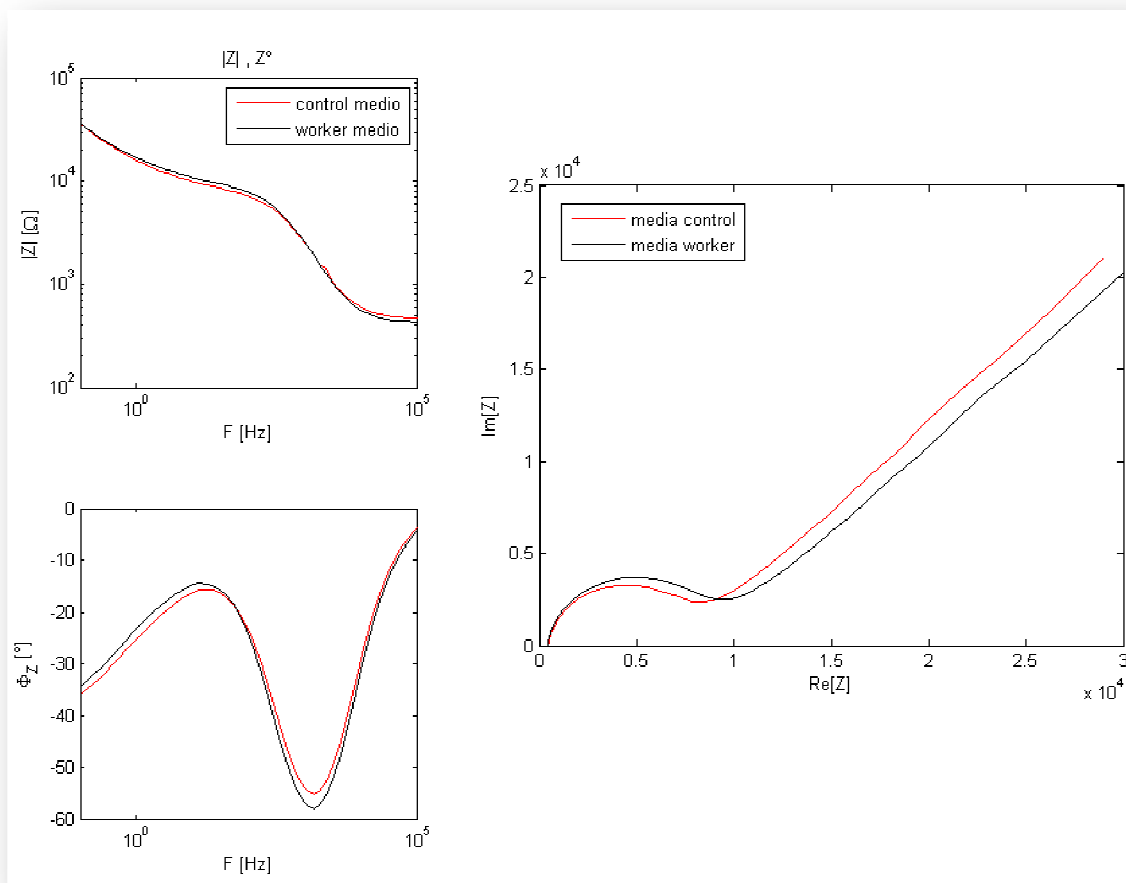


Fig.5. 8 (da sinistra verso destra) Diagrammi di Bode (modulo e fase) e di Nyquist (parte reale e immaginaria) dell'impedenza media valutata su *worker* e *control* di 53 dispositivi fresh (con solo soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). Viene messa in risalto la differenza che intercorre tra le caratteristiche valutate sui due contatti

Confrontando la caratteristica ottenuta dai 53 dispositivi con quella ottenuta dai 31 si vede che la differenza (valutata a 1, 50 e 1000 Hz) tra l'andamento medio associato al contatto di *worker* e quello associato al *control* per $|Z|$ e Z° assume i valori illustrati nelle tabelle sottostanti:

Fe NON filtrata (53 dispositivi)	wkr - ctr		max wkr-ctr		wkr/ctr		max(ctr/wkr)		max(wkr/ctr)	
	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°
1 [Hz]	938,3245	1,9776	960,5821	3,0203	1,0615	0,9194	1,1471	1,1045	1,1063	1,1486
50 [Hz]	839,8261	0,0361			1,1059	0,9981				
1000 [Hz]	8,3818	-2,8351			1,0036	1,0521				

Fe filtrata (31 dispositivi)	wkr - ctr		max wkr-ctr		wkr/ctr		max(ctr/wkr)		max(wkr/ctr)	
	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°	Z	Z°
1 [Hz]	855,9023	2,1143	965,6883	3,7329	1,0577	0,9157	1,1564	1,1022	1,1091	1,1061
50 [Hz]	810,7134	-0,7904			1,1066	1,0458				
1000 [Hz]	-84,0659	-2,4661			0,9655	1,0457				

Tabelle 5. 2 Confronti tra le misure valutate sugli elettrodi di *worker* e di *control* su 53 e 31 dispositivi.

in cui si è valutato, oltre alla differenza tra le caratteristiche alle frequenze di riferimento, anche il rapporto e il massimo delle rispettive variazioni.

L'analisi mostrata mi permette di concludere che le misure effettuate sui due elettrodi di lavoro sono comunque confrontabili. Ciò mi giustifica l'utilizzo del *control* come elettrodo di riferimento della condizione *fresh* nelle successive analisi in cui sull'elettrodo di *worker* verrà depositata il DNA probe e target. Il dispositivo è stato infatti progettato appositamente con 2 elettrodi di lavoro (*control* e *worker*) così da permettere un confronto diretto tra un elettrodo funzionalizzato e uno *fresh*.

5.2.3 DEGRADAZIONE DELLA SUPERFICIE D'ORO NELLE MISURE DI VOLTAMMETRIA

Le misure di voltammetria sono più invasive di quelle di spettroscopia: queste ultime infatti, in linea teorica, non dovrebbero avere alcuna effetto di degradazione sugli elettrodi. Al contrario, si è osservato che misure ripetute sullo stesso elettrodo o anche su elettrodi differenti dello stesso dispositivo, presentavano di volta in volta valori diversi di corrente di picco e questo perché gli elettrodi hanno già avuto una reazione con la soluzione. Il grafico 5.9 mostra per esempio come la seconda misura compiuta su uno stesso dispositivo ma su un elettrodo diverso da quello utilizzato nella prima misura, valuti una corrente di picco maggiore della prima, indipendentemente dal fatto che sia partito a contattare l'elettrodo di *worker* o di *control*:

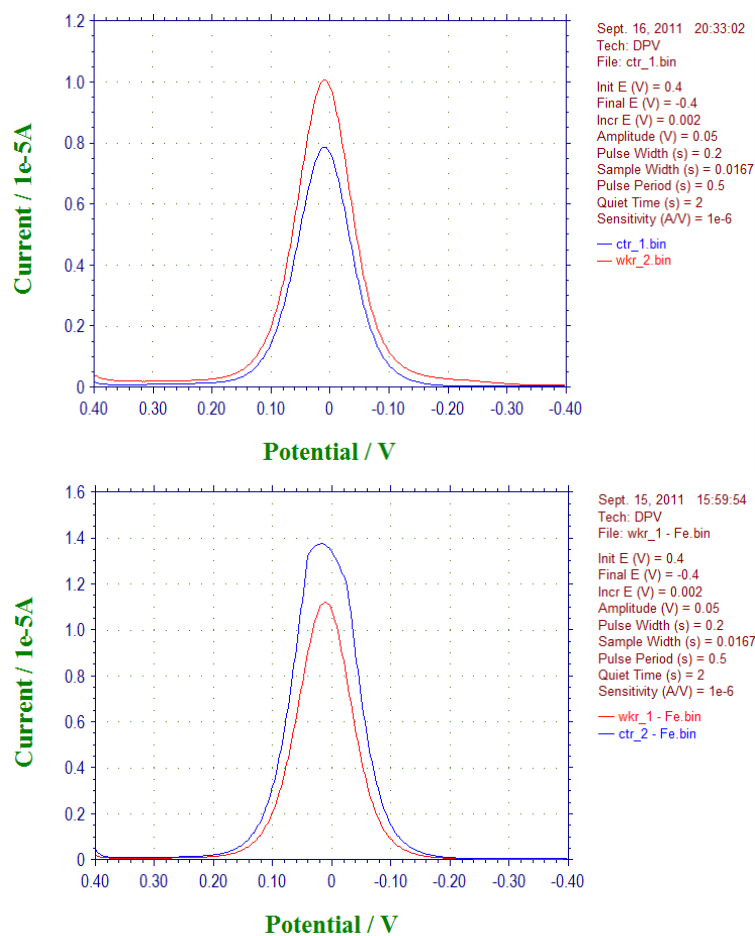


Fig.5. 9 Differenza di corrente di picco valutata misurando la risposta prima su worker e poi su control (in alto) o viceversa (in basso) su uno stesso dispositivo con entrambi gli elettrodi fresh (con solo soluzione elettrolitica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$)

il grafico in alto è stato ottenuto compiendo la prima misura sul control e la seconda sul worker; quello in basso viceversa. Si osserva che la differenza tra la prima e la seconda misura su uno stesso dispositivo rimane pressappoco costante, ma varia l'ordine delle caratteristiche. È chiaro allora che in questo caso, diversamente dalle misure EIS, la differenza che valuto tra il segnale d'uscita sul worker e quello sul control è indipendente dalla geometria del dispositivo, e dipende invece dall'ordine con cui ho compiuto le misure (se ho misurato prima il worker o il control).

Per evitare errori di interpretazione, si è sempre compiuto le misure di DPV prima sul worker e poi sul counter.

5.3 MISURE CON DEPOSIZIONE DEL PROBE

Dopo aver rilevato il comportamento del dispositivo in assenza di molecole all'interfaccia, si passa ora all'analisi degli effetti della deposizione del DNA probe sull'elettrodo di *worker* (secondo il protocollo esposto in Appendice A). Le singole eliche di HS-ssDNA si legano alla superficie d'oro del biosensore attraverso il gruppo tiolo modificando il doppio strato all'interfaccia. L'intenzione è quella di poter utilizzare il dispositivo per indicare l'ibridazione tra un film di DNA probe depositato sulla regione del *worker* e un DNA target deposto successivamente. Questo è possibile in quanto il film di probe è un layer aggiuntivo di carica all'interfaccia che va quindi a variare la capacità di interfaccia nel modello equivalente (vedi capitolo 2).

5.3.1 EFFETTI DELLA DEPOSIZIONE

In seguito alla deposizione del probe, si ottengono le seguenti caratteristiche dalle misure di spettroscopia e di voltammetria:

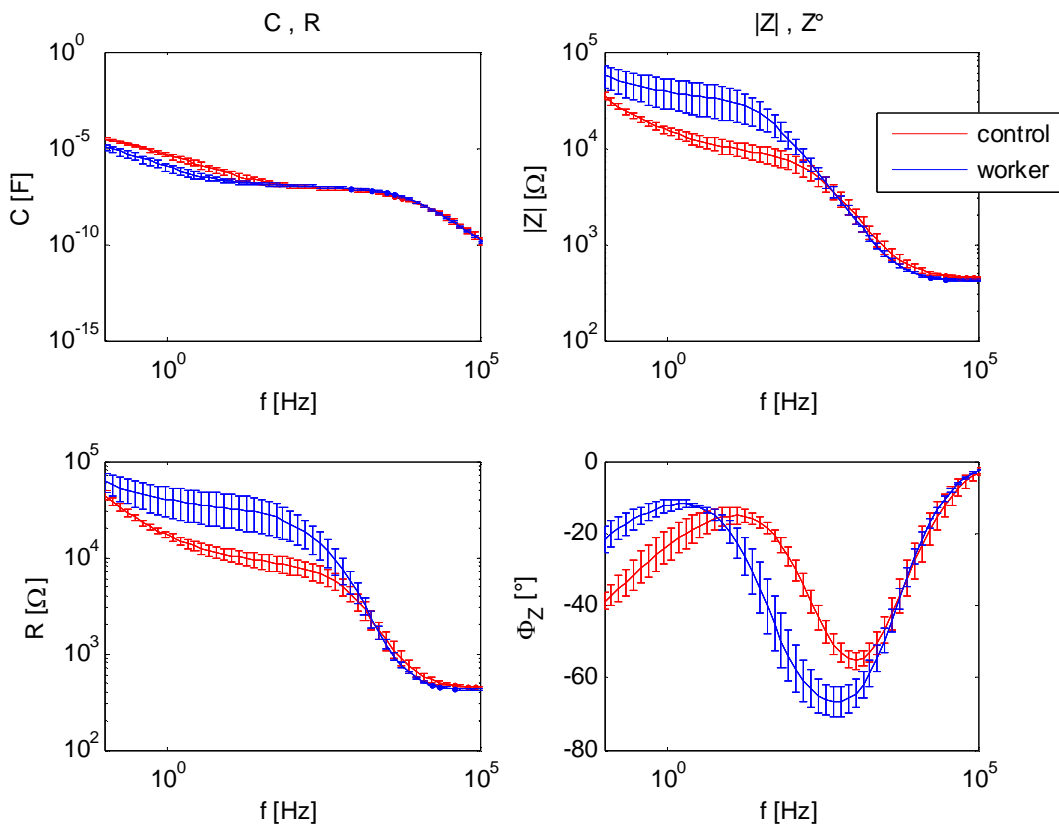


Fig.5. 10 Capacità, resistenza e impedenza valutati con una misura di spettroscopia con probe a concentrazione $2 \mu\text{M}$ sul *worker* e *control fresh*.

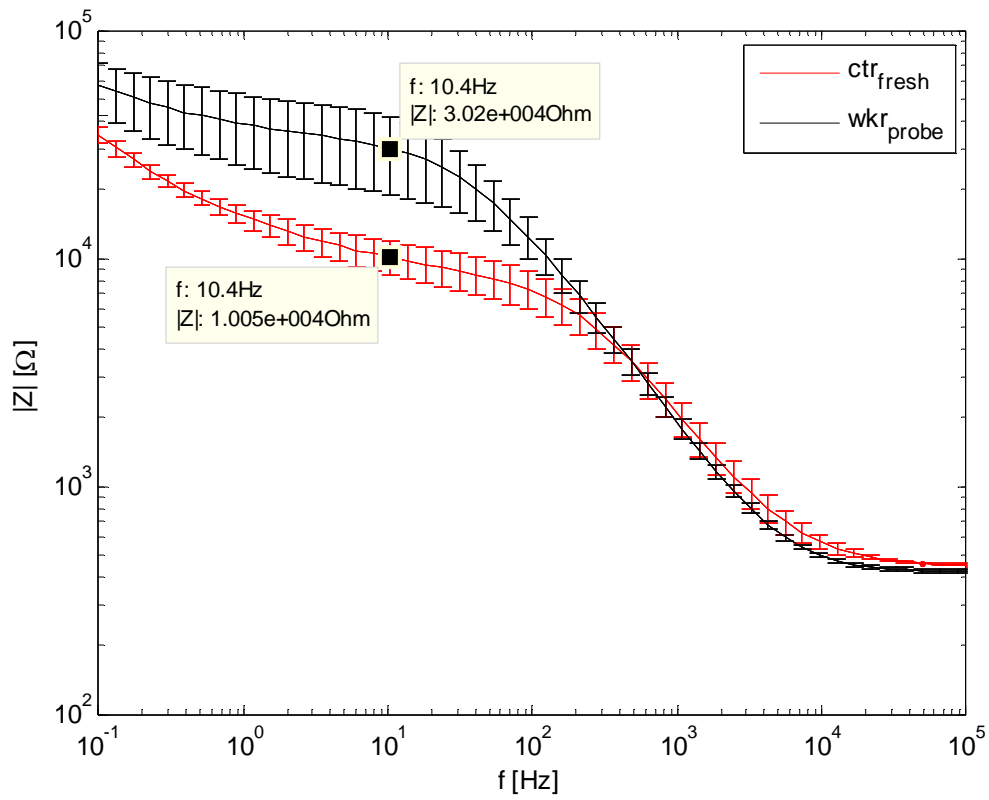


Fig.5. 11 Particolare sul confronto tra i moduli delle impedenze valutate sul worker e sul controllo con deposizione del probe a concentrazione $2 \mu\text{M}$ sul worker.

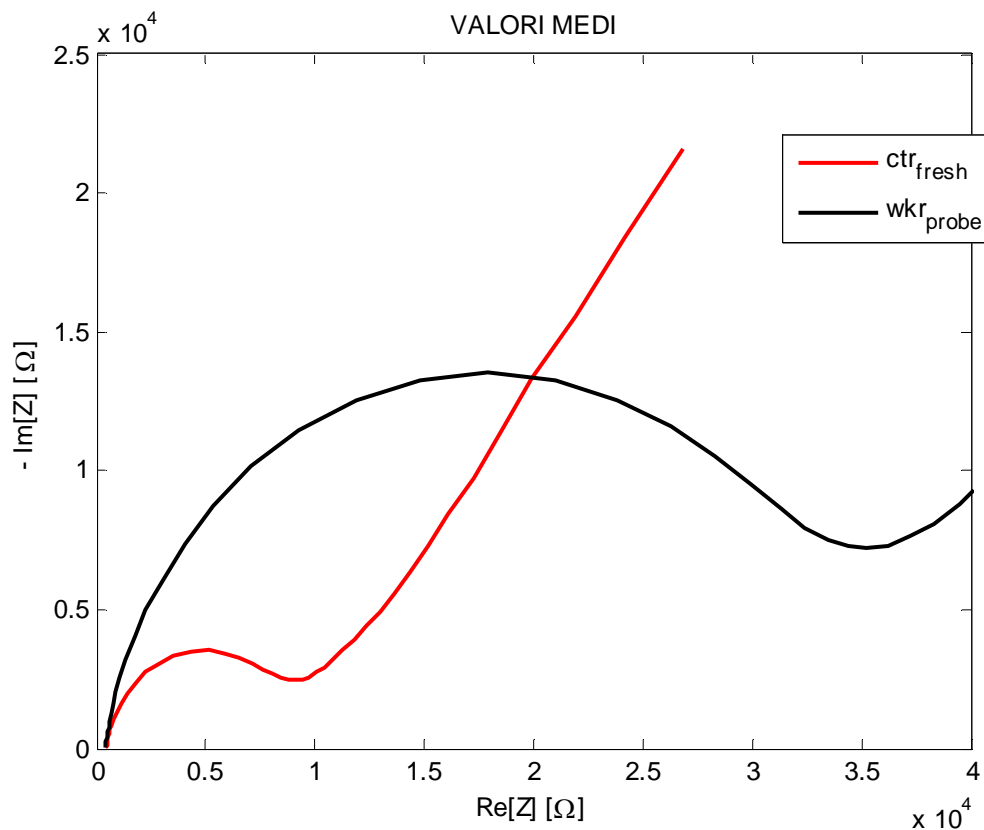


Fig.5.12 Parte reale e immaginaria dell'impedenza valutata su worker in cui è stato deposto DNA probe $2\mu\text{M}$ e control fresh.

La spettroscopia registra un aumento di impedenza all'interfaccia dovuta all'aggiunta di un film di carica ulteriore al modello visto nel capitolo 2.

Da un confronto della figura 5.12 con la figura 2.6 del capitolo 2, si può dedurre che la deposizione della molecola incrementa il valore di resistenza R_t di interfaccia nel modello della cella di Randles coerentemente con quanto previsto dal modello dal momento che avrei: $R_t = R_{\text{Au}} + R_{\text{mod}}$.

Quando applico un film di DNA all'interfaccia soluzione-metallo, le eliche cariche negativamente interagiscono con le molecole redox respingendo gli ioni negativi dall'interfaccia: le coppie redox vengono dunque allontanate dall'interfaccia sulla quale dovrebbe avvenire lo scambio di elettroni tra molecole e metallo. Il film di probe scherma l'elettrodo diminuendo dunque il segnale registrato con una misura di voltammetria ed infatti ottengo un voltammogramma come quello in figura 5.13:

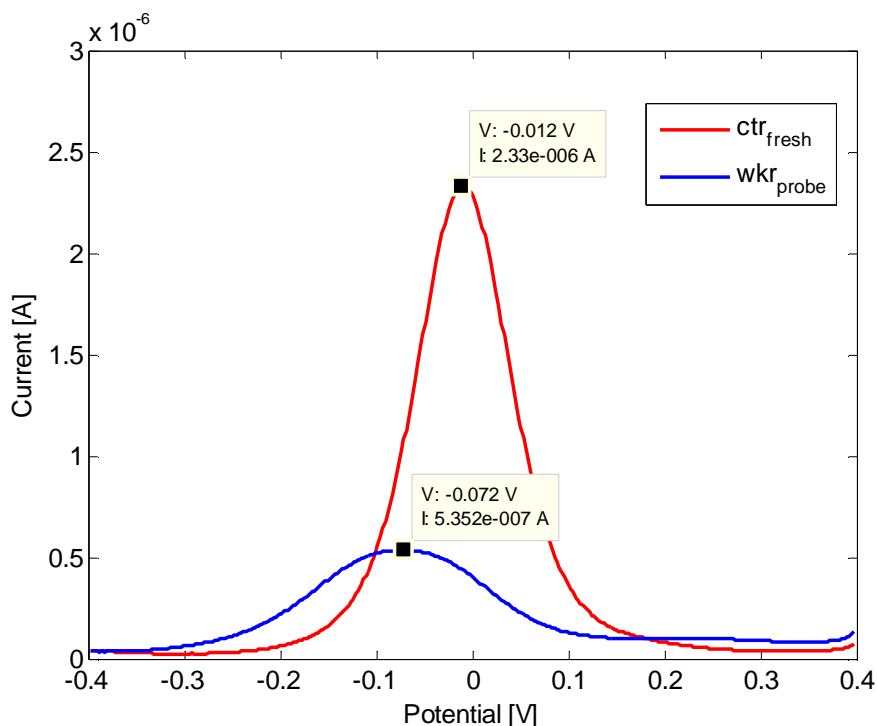


Fig.5.13 Confronto tra i picchi di corrente registrati con una DPV su worker con deposizione di DNA probe 2 μM e control fresh.

5.3.2 DINAMICA DELLA DEPOSIZIONE

La sensibilità del dispositivo è talmente elevata che è possibile addirittura osservare la dinamica della deposizione del cDNA probe compiendo misure su dispositivi in cui il dispositivo è stato esposto alla molecola per diversi periodi regolari di tempo.

Nel grafico sotto proposto, sono mostrate le risposte alle misure di voltammetria compiute su dispositivi in cui il DNA è rimasto in deposizione sull'elettrodo di worker per un periodo variabile tra i 15 min e le 2 ore (allo scadere del periodo, il dispositivo veniva sciacquato e subito misurato).

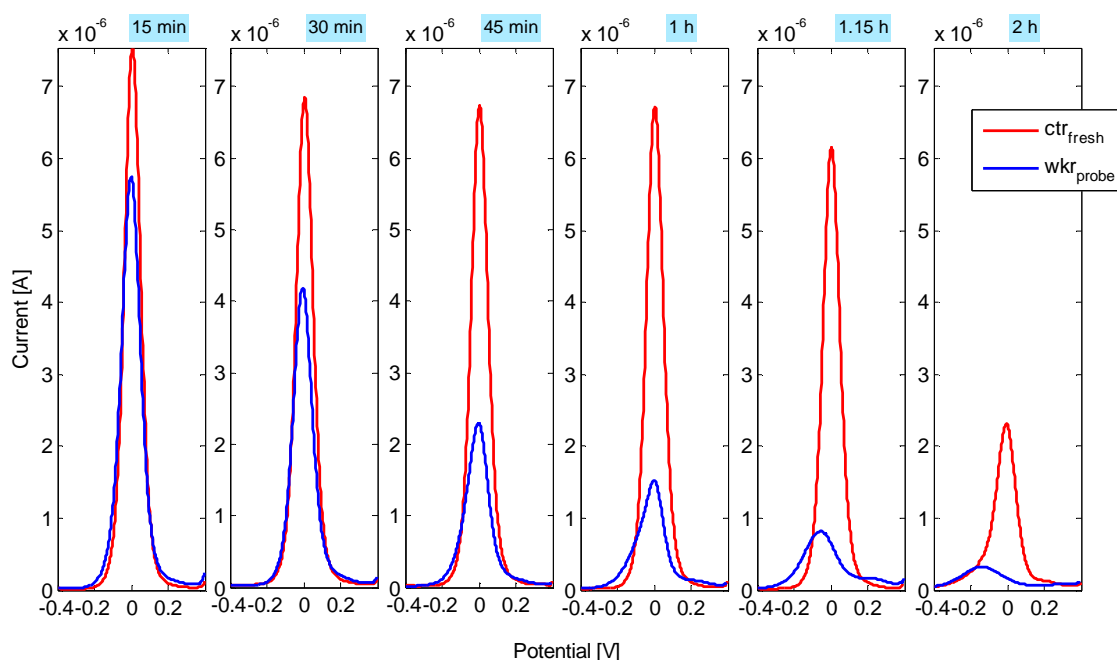


Fig.5.14 Dinamica della deposizione di DNA probe sull'elettrodo di worker per diversi periodi di contatto della molecola con la superficie d'oro.

Si osserva chiaramente l'evoluzione della deposizione e combinazione delle molecole. Più significativo è però il grafico dell'evoluzione della variazione percentuale dell'ampiezza di corrente di picco in funzione del tempo di deposizione, mostrata in figura 5.15 dove:

$$|\Delta I \%|_{worker/control} = \left| \frac{I_{worker} - I_{control}}{I_{control}} \cdot 100 \right| \quad (5.2)$$

e l'elettrodo di *worker* è funzionalizzato mentre quello di *control* è *fresh*. Questa grandezza normalizzata sulla grandezza valutata sul control risulta vantaggiosa, in quanto la misura sul *control* non è un riferimento costante per tutti i dispositivi (ovvero per tutte le diverse concentrazioni del DNA depositato sul *worker*) e questo influenzerebbe negativamente i risultati nel caso considerassi la semplice differenza tra le misure fatte sui due elettrodi.

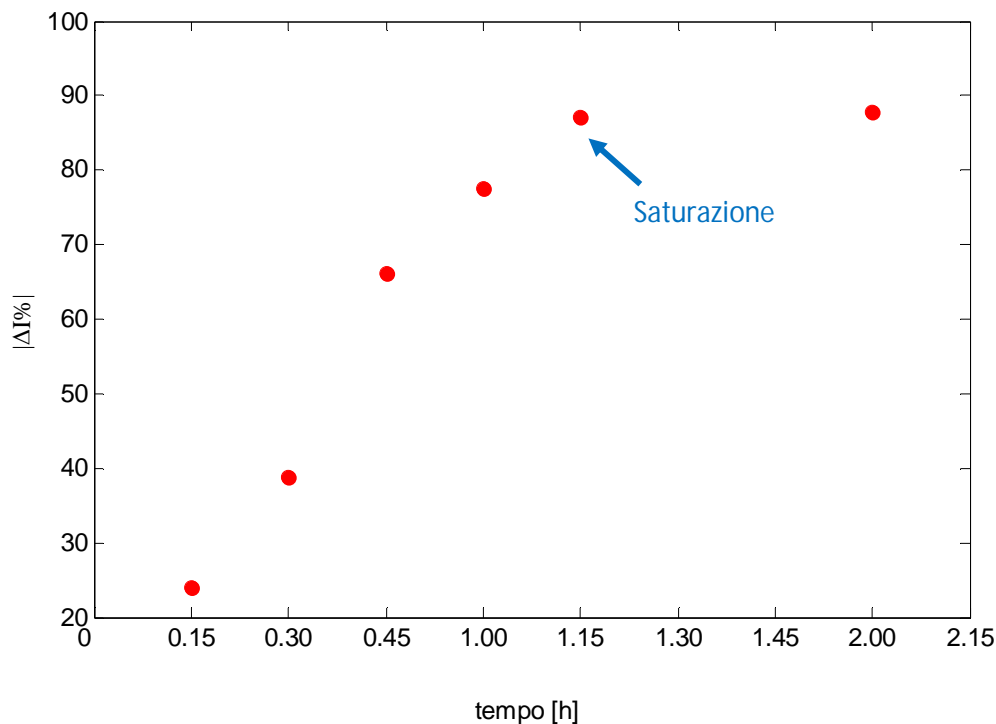


Fig.5. 15 Evoluzione della variazione percentuale dell'ampiezza di corrente di picco in funzione del tempo di deposizione.

Questo grafico è più significativo del precedente in quanto considera la variazione tra i due elettrodi, tra quello fresh e quello funzionalizzato, piuttosto che l'evoluzione in termini assoluti. Si può osservare che dopo un'ora e un quarto si raggiunge già un punto di saturazione della dinamica di deposizione: il DNA probe è stato completamente assorbito dalla superficie d'oro. Questa analisi è il punto di partenza per definire il protocollo di deposizione. Per sicurezza, si attenderà 2 ore dalla deposizione del probe prima di sciacquare il dispositivo e misurarlo.

5.3.3 RISPOSTA A DIVERSE CONCENTRAZIONI DI DNA PROBE

Variando la concentrazione del DNA probe depositato, è possibile studiare la sensibilità del dispositivo ovvero determinare il "punto di lavoro" (concentrazione ottimale per la sensibilità). È possibile per esempio stimare il limite di sensibilità, ovvero il valore più basso di concentrazione di probe per cui riesco a vedere ancora una differenza tra *worker* funzionalizzato e *control fresh* oppure il massimo valore di concentrazione oltre il quale potrei avere una saturazione della risposta.

A tal proposito sono state fatte diverse misure sia di spettroscopia che di voltammetria con differenti concentrazioni di probe ottenendo per esempio il seguente diagramma di confronto:

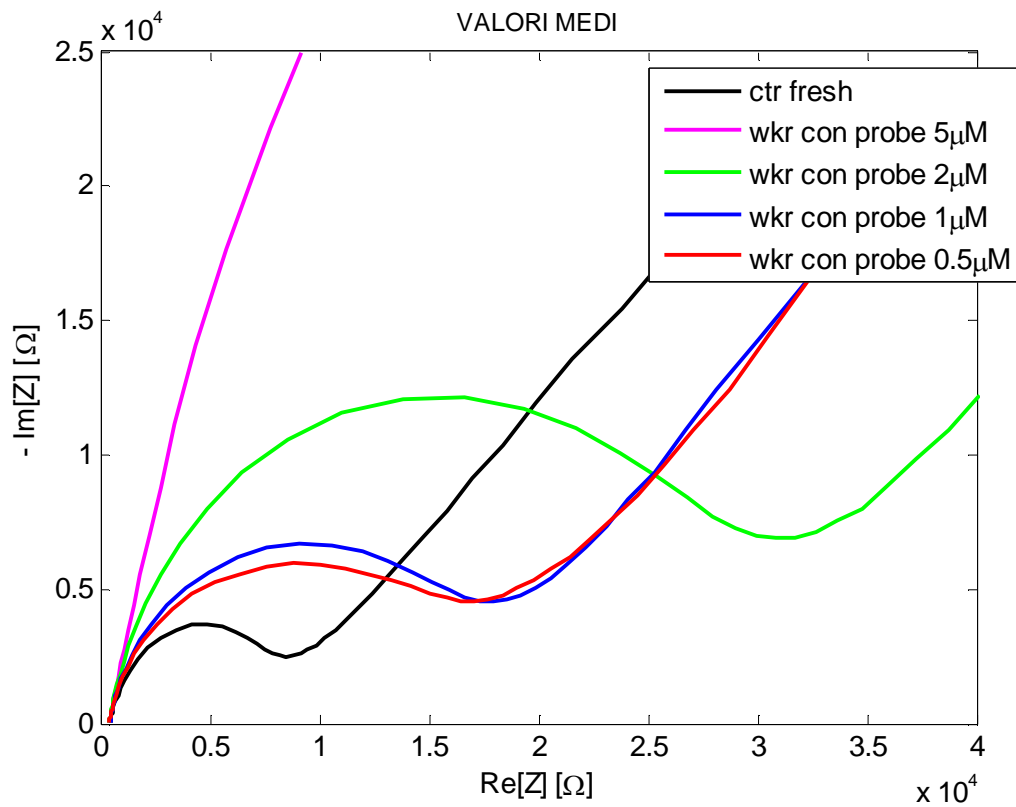


Fig.5.16 Parte reale e immaginaria dell'impedenza valutata su *worker* in cui è stato deposto DNA probe a diverse concentrazioni e *control fresh*.

Si osserva come la resistenza legata al processo faradico di trasferimento elettronico (R_f) aumenti proporzionalmente alla concentrazione del DNA deposto sul dispositivo.

Si ottiene allora il seguente grafico:

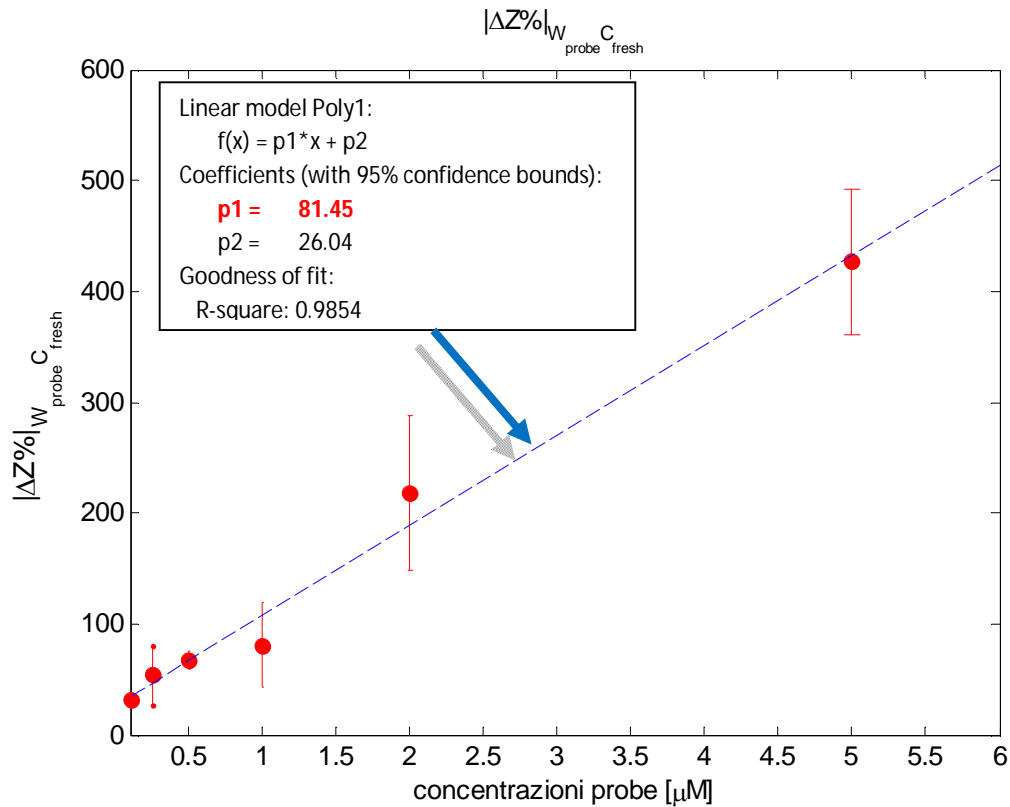


Fig.5. 17 Variazione percentuale di impedenza in funzione della concentrazione di DNA probe deposto sul worker.

Il grafico sopra riportato mostra una variazione di impedenza tra gli elettrodi lineare con la concentrazione, dove:

$$|\Delta Z \%|_{worker/control} = \left| \frac{Z_{worker} - Z_{control}}{Z_{control}} \cdot 100 \right| \quad (5.3)$$

La pendenza della retta interpolatrice mi dà quindi la *sensibilità* (in $1/\mu\text{M}$) del dispositivo funzione della concentrazione di probe, pari a $81.45 \mu\text{M}^{-1}$.

5.4 MISURE DI IBRIDAZIONE

Una volta valutata la risposta del dispositivo alla deposizione del DNA probe, viene deposto il target (seguendo il protocollo presentato in Appendice A) per consentire l'ibridazione. Solo se le semieliche del target sono complementari alle semieliche del probe, queste si ibridano. Essendo doppia l'elica assorbita sulla superficie, ci si attende che vengano amplificati gli effetti misurati con la deposizione del solo probe. Le misure (riportate di seguito per deposizioni sull'elettrodo di worker di concentrazioni di DNA probe $1\mu\text{M}$ e DNA target $20\mu\text{M}$) confermano infatti le previsioni:

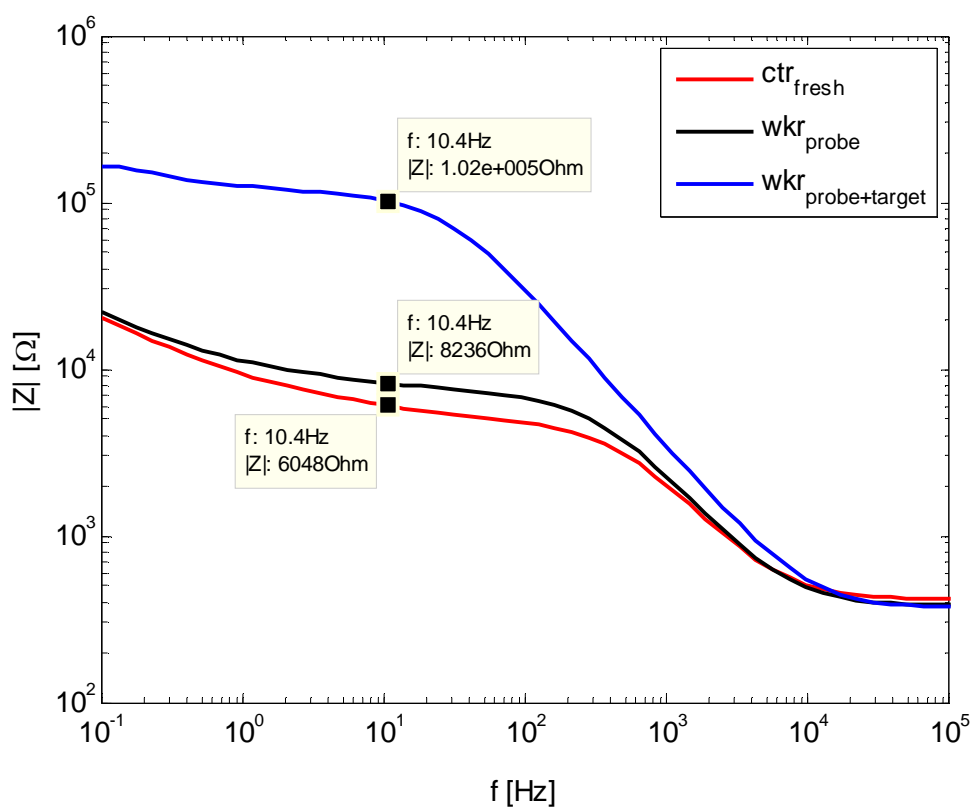


Fig.5. 18 Modulo dell'impedenza valutata con misure EIS su control fresh e worker con deposizione di DNA probe $1\mu\text{M}$ e target $20\mu\text{M}$

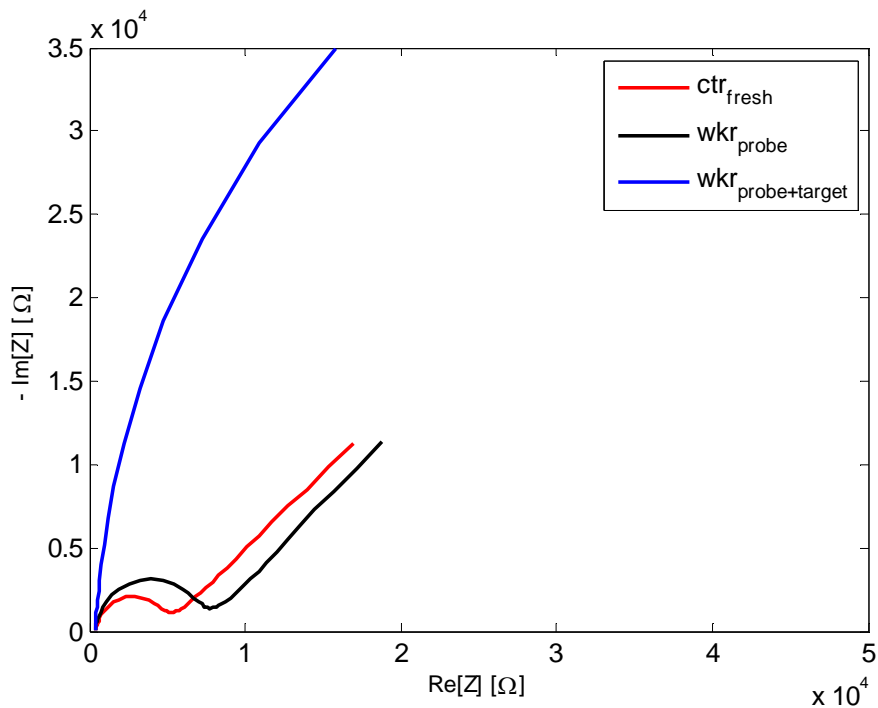


Fig.5. 19 Parte reale e immaginaria dell'impedenza valutata con misure EIS su control fresh e worker con deposizione di DNA probe 1 μ M e target 20 μ M

E lo stesso avviene con le misure di voltammetria:

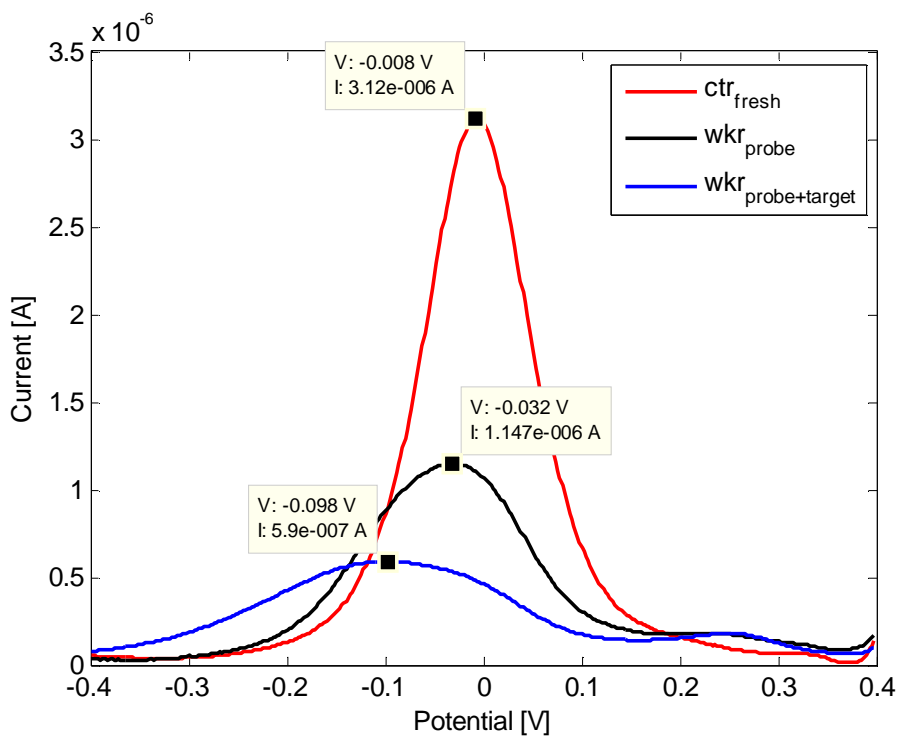


Fig.5. 20 Risultato delle misure DPV su control fresh e worker con deposizione di DNA probe 1 μ M e target 20 μ M

È interessante fare ora un confronto più preciso della variazione di impedenza e di corrente di picco che si percepisce con deposizione del solo probe e quella che si percepisce in seguito all'ibridazione. A tal scopo sono utili i grafici presentati di seguito:

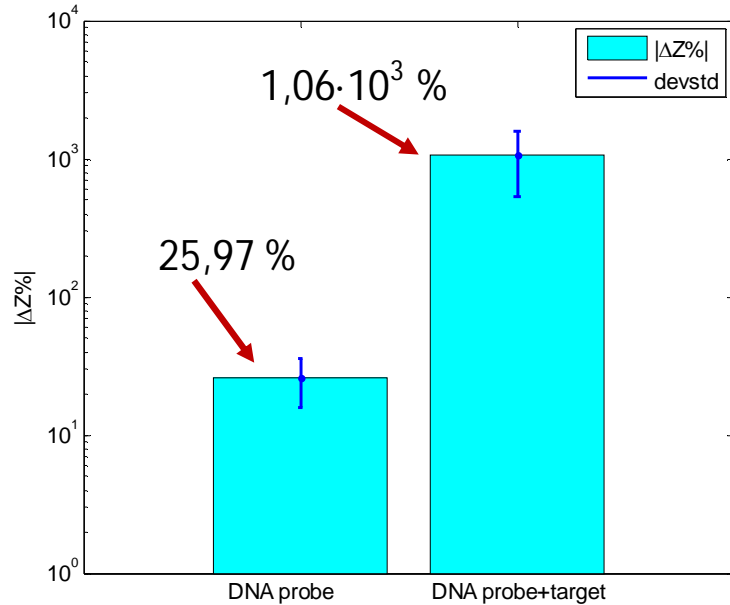


Fig.5. 21 Variazione percentuale di impedenza valutata con misure EIS tra control fresh e worker con probe e tra control fresh e worker sul quale è avvenuta l'ibridazione del probe con il target.

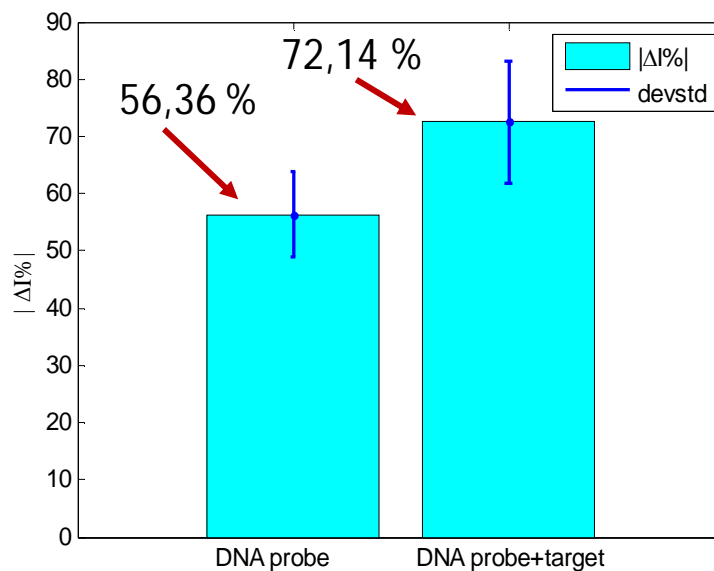


Fig.5. 22 Variazione percentuale di ampiezza di picco valutata con misure DPV tra control fresh e worker con probe e tra control fresh e worker sul quale è avvenuta l'ibridazione del probe con il target.

5.4.1 ANOMALIA DI COMPORTAMENTO DELL'ELETTRODO DI CONTROLLO

Nelle misure di ibridazione si è riscontrato un comportamento anomalo dell'elettrodo di controllo, il quale, essendo non funzionalizzato in tutte queste misure, non avrebbe dovuto variare la sua risposta rispetto alla sua condizione iniziale. Diversamente da quanto previsto invece, il control rispondeva con un segnale di corrente spostato in tensione e di ampiezza più bassa di quello relativo al worker funzionalizzato, come se durante la fase di incubazione del protocollo di ibridazione avesse subito anch'esso una modifica (vedi figura 5.23):

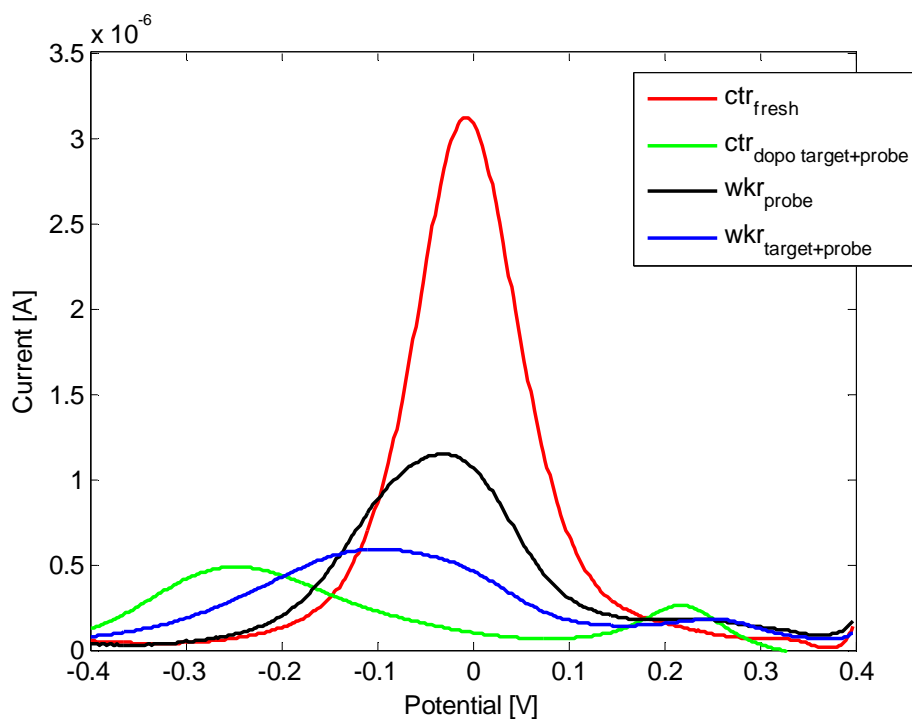


Fig.5.23 Comportamento dell'elettrodo fresh di control dopo l'ibridazione del worker con DNA probe 1 μ M e target 20 μ M.

Conclusioni

Il lavoro svolto in questa tesi ha permesso di studiare le caratteristiche del biosensore a struttura planare a quattro elettrodi. Tale dispositivo permette di ottimizzare biosensori ad oggi standard, nei quali gli elettrodi di riferimento sono esterni (ad esempio l'elettrodo all'argento cloruro d'argento ($\text{Ag}\backslash\text{AgCl}$) a setto poroso e il counter in Platino). Misure di ciclovoltammetria hanno verificato la possibilità di sostituire questi ultimi dispositivi con quello analizzato in questo lavoro di tesi.

Grazie a misure di spettroscopia di impedenza è stato possibile determinare una caratteristica di riferimento dello stato *fresh* del dispositivo e dimostrare la possibilità di usare un elettrodo (*control*) non funzionalizzato identico a quello di lavoro (*worker*) quale riferimento della condizione di *fresh* per misure relative tra i due elettrodi sullo stesso dispositivo.

Con l'aggiunta di misure di voltammetria differenziale a impulsi è stato poi possibile misurare la presenza di molecole di DNA adsorbite sulla superficie d'oro del dispositivo e distinguere la presenza di eventi di ibridazione della sonda deposta con un target. L'elevata sensibilità del dispositivo ha permesso di determinare anche una dinamica di assorbimento della molecola e stabilire un "punto di lavoro del dispositivo" determinandone la sensibilità al variare della concentrazione di DNA deposto.

L'ibridazione effettuata sul biosensore è stata sufficiente a ottenere delle variazioni leggibili e ripetibili, ma la variabilità di produzione limita ancora l'affidabilità del dispositivo e non permette di compiere analisi statistiche. Inoltre il protocollo di ibridazione deve essere ancora perfezionato al fine di evitare la contaminazione dell'elettrodo di controllo, riferimento della condizione *fresh*.

Appendice A

Procedure di deposizione e ibridazione

A.1 DEPOSIZIONE DEL PROBE

Il probe è sospeso in una soluzione salina Na_2HPO_4 100 mM, pH 8.5 necessario sia per mantenere il pH costante ed evitare che il DNA si deteriori sia per mantenere in sospensione le eliche per permettere l'ibridazione.

La soluzione contenente il *probe* viene messa a contatto con l'elettrodo di *worker* del dispositivo a temperatura ambiente e lasciata incubare per 2 ore in ambiente umido per evitare l'evaporazione della soluzione prima dell'ancoraggio del probe alla superficie. In seguito la superficie degli elettrodi viene lavata con acqua distillata.

Per consentire un'efficace deposizione, è necessario che il biosensore sia ben pulito e non abbia residui sulla superficie d'oro.

A.2 IBRIDAZIONE DEL TARGET

Il target è risospeso in una soluzione salina per favorire l'ibridazione con il probe. Il tampone d'ibridazione è composto da Na_2HPO_4 100 mM, pH 8.5.

Il tampone d'ibridazione contenente il *target* viene denaturato a 95°C per 3 minuti e subito dopo messo a contatto con l'elettrodo di *worker* contenente il *probe*. I dispositivi vengono incubati per 2 ore a 55°C , coprendo il dispositivo per evitare l'evaporazione del tampone. In seguito la superficie degli elettrodi viene lavata con acqua distillata.

Bibliografia

- [1] W.S.Klung, M.R.Cummings,C.A.Spencer, *Concepts of genetics*, 8TH edition, Prentice Hall, 2006.
- [2] T. Strachan. *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999
- [3] T.A. Brown, *Biotechnologie molecolari, principi e tecniche*, Ed. Zanichelli, pp.176-178, 2007.
- [4] M. Yang, H.C.M. Yau, H. L. Chan, *Adsorption kinetics and ligand-binding properties of thiol-modified double-strand DNA on gold surface*. *Langmuir*, **14**, 6121-6129 ,1998.
- [5] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov. *Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly*. *Biophysical Journal* Volume **79** , 975–981, August 2000.
- [6] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *Characterization of DNA probes immobilized on gold surface*. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8916-8920 , 1997.
- [7] A.W. Adamson, A.P. Gast. *Physical Chemistry of Surfaces*.6° ed. Wiley, 1997.
- [8] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 8TH edition, Oxford University Press, 2006.
- [9] D. Vladikova, *The Technique of the Differential Impedance Analysis Part I: Basics of the Impedance Spectroscopy*, Proceedings of the International Workshop “Advanced Techniques for Energy Sources Investigation and Testing” , 2004.
- [10] M. Minella, *Caratterizzazione elettrochimica dell’interfaccia semiconduttore – elettrolita in elettrodi a film sottile di TiO₂ nanocristallino*, Università degli Studi di Torino, A.A. 2005-2006.
- [11] D. A. Borkholder, *Cell Based Biosensors using Microelectrodes*, Stanford University, 1998.
- [12] E. Kats., I Willner, *Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric*

- Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, Electroanalysis*, 15, N. 11, 2003.
- [13] G. Sandonà, *Dispense del corso di chimica fisica industriale 2, A.A 2009-2010*.
- [14] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Ed. Wiley, second edition, 2000.
- [15] B. Eggings, *Biosensors*. Wiley, Chichester, 1997.
- [16] U. Rant, K. Arinaga, S. Scherer, E. Pringsheim, S. Fujita, N. Yokoyama, M. Tornow, G. Abstreiter, *Switchable DNA interfaces for the highly sensitive detection of label-free DNA targets*. Proc. Natl. Acad. Sci., **104**, 17364-17369, 2007.
- [17] J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, S. R. Manalis, *Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge*. Proc Natl. Acad. Sci., **99**, 14142-14146, 2002.
- [18] L. Bandiera, G. Cellere, S. Cellere, A. de Toni, E. Zanoni, G. Lanfranchi, L. Lorenzelli, *A fully electronic sensor for measurement of cDNA hybridization kinetics*. Biosensor and Bioelectronics, **22**, 2108-2114, 2007.
- [19] E.M. Boon, J.K. Barton, *Charge transport in DNA*. Nucleic acids, **12**, 320-329, 2002.
- [20] J. Fritz, E.B. Cooper, S. Gaudet, P.K. Sorger, S.R. Manalis. *Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge*. PNAS, 2002.