

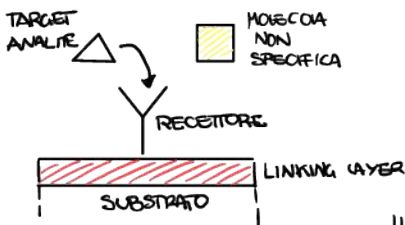
Biochip

BIOSENSORS

UN SENSORE CHIMICO BASATO SU UN'ENTITÀ BIOLOGICA (DEFINIZIONE FORTE)

UN SENSORE CHE MONITORA LO STATO DI SISTEMI BIOLOGICI (DEFINIZIONE DEBOLE)
[DEFINIZIONE CHE GU PIACE]

TIPICAMENTE ABBIAMO UN FLUIDO CHE ESCE DAL CORPO E VOGLIAMO ANALIZZARE IL FLUIDO PER CREARE UNA MOLECOLA CHE POTREBBE ESSERE LA RED FLAG PER UNA MALATTIA. QUESTA MOLECOLA È CHIAMATA ANALITE E PER TROVARLA TIPICAMENTE USIAMO UN'ALTRA MOLECOLA COMPLEMENTARE CHIAMATA BIO RECEPTORE, QUANDO LA MOLECOLA E IL BIORECEPTORE SI COMBINANO C'È UNA RIDUZIONE DI ENERGIA ELETTROSTATICA DEL SISTEMA E LAVORANDO SUL SEGNALE POSSO ARRIVARE A INTERPRETARE LA PRESENZA DELLA MOLECOLA.



CI SONO 3 TIPI DI MECCANISMI DI AFFINITÀ MOLECOLARE

- ANTIBODY-ANTIGEN (IMMUNOSENSORS)
- ENZYME-SUBSTRATE (ENZYMATIC SENSORS)
- DNA AND NUCLEIC ACIDS (GENOSENSORS)

IL RECEPTORE (PROBE) PUÒ ESSERE NATURALE O SINTETIZZATO IN LABORATORIO.

PARAMETRI GEOMETRICI: OLTRE LA DIMENSIONE, IN ALTRE MOLECOLE (ES DNA) CHE SONO FLUO APPROXIMATI TIPICAMENTE SI CONSIDERA LA LUNGHEZZA E IL RAGGIO OF GYRATION

ANTIBODY

GLI ANTIGENI SI COMBINANO ALL'ANTIBODY AUE 2 ESTREMITÀ

ENZIMI

INIBITORI → MOLECOLA SIMILE ALL'ANALITE CHE SI COMBINA COMunque MA QUESTO NON CI VA BENE CI FONNA LA VEITURA

DNA → È LA REPOSITORY DELLE INFORMAZIONI GENETICHE

LA DIMENSIONE PIÙ IMPORTANTE DEL DNA È IL DIAMETRO TRA US 2 SPIRE TIPICAMENTE 2,5nm. LA LUNGHEZZA INVECE PUÒ ESSERE LUNGA CM. LA DISTANZA TRA US BASI È TIPICAMENTE DI 0,33nm.

TUTTE QUESTE RILEVAZIONI AVVENGONO NELL'INTERFACCIA

VOGLIAMO INOLTRE FARE QUESTI RECEPTOR ECONOMICI E PICCOLI.



PARADIGMA → LAB ON A CHIP (AD OGGI LE ANALISI SONO FATTE IN LABORATORIO, NOI VOGLIAMO TUTTO SU CHIP) QUESTO HA SENSO XE' NOI CERCHIAMO UNA MOLECOLA PICCOLA → NON ABBIAMO BISOGNO DI MACCHINE GRANDI PER RIVERLO, INOLTRE FACCIAMO MOLTO USO DI REAGENTI CHE COSTANO UN BOTTO.

SAMPLE PREPARATION → FILTRIAMO PRIMA LE MOLECOLE CHE SAPPIAMO CHE NON VANNO BENE O DANNO FALSI POSITIVI. ALL'ANALISI VOUREMMO SOLO ACQUA + LE MOLECOLE CHE CERCHIAMO.

24.02.2021

2h LEZIONE

• MOVING FLUIDS

(COME MOVERE I FLUIDI NEI MICROCANALI)

IN QUESTO MONDO MICROSCOPICO LE EQUAZIONI DEI FLUIDI SONO LE STESSA, VALGONO ANCORA LE NAVIER-STOKES (FINO A DECINE DI NANOMETRI) E A NOI CI BASTANO.

FLUID MATERIALE CHE SI DEFORMA INDEFINITAMENTE SOTTO STRESS. (PRINCIPALMENTE A NOI CI INTERESSANO I FLUIDI ACQUOSI)

- DENSITA' (ρ)
 - VISCOSITA' (η)
 - TENSIONE SUPERFICIALE (σ)
- } Dipendenti della temperatura

- **FLUIDI SEMPLICI** FLUIDO NEWTONIANO O NON

- **COMPLEX FLUIDS** E' UN FLUIDO SEMPLICE CON PARTICELLE O IONI IN SOSPENSIONE (ELETTRONITE → SIMPLE FLUID + IONS IN SOLUTION)

CARATTERISTICHE

- **DENSITA'** → Ci interessa per sapere per sapere se le particelle galleggiano, affondano o fluttuano [$\rho = \text{mass/volume}$ [kg/m^3]]
Le dipendenza dalla temperatura non e' molto forte

- **VISCOSITA'** → Importante xe' e' un modo per esprimere come i layer del liquido si' legano tra loro
E' calcolata come il rapporto dello shear stress su shear rate

$$\eta = (F/A)/(u/y) \quad [\text{Pa}\cdot\text{s}]$$

e' importante per sapere come si muovera' il fluido nei microcanali

Le viscosita' e' molto dipendente dalla temperatura (quasi esponenziale)

La viscosita' puo' cambiare in casi di fluidi Newtoniani e non, il sangue e' un fluido non Newtoniano. Infatti se impongo una forza ad un fluido non Newtoniano questo cambiora' la sua viscosita', in caso di fluidi Newtoniani non cambia

FLUSSO LAMINARE → Tutti i layer del fluido si spostano ordinatamente e indipendentemente dagli altri. Hanno una soluzione unica nelle Navier Stokes e c'è la minima dissipazione

FLUSSO TURBOLENTO → Turbolenza nel fluido

Per sapere in che range ci troviamo, usiamo il numero di Reynolds

ADIMENSIONALE → $Re = \frac{\rho \cdot 2r \cdot v}{\eta}$

v = velocità flusso
 r = raggio del canale (supposto circolare)

$Re < 2300$ → Flusso Laminare ← **NOI SIAMO SEMPRE IN QUESTO CASO ($Re < 1$)**

$Re > 3000$ → Flusso Turbolento

Questo perché r è molto piccolo e tipicamente v piccole. (MICROFLUIDICS)

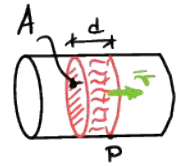
È SE NON SIAMO IN UN CANALE CIRCOLARE? Usiamo il raggio equivalente

$$r_{eq} = \frac{2 \text{Area}}{\text{Perimeter}}$$

-PORTATA VOLUMETRICA
 Si calcola come

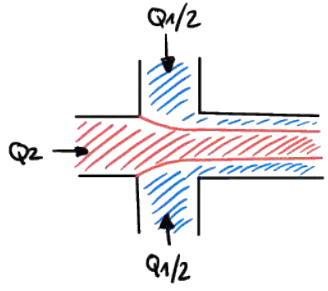
$$Q = \frac{V}{t} = \frac{A \cdot d}{t} = A \bar{v}$$

con $\bar{v} = d/t$



Perché è un vantaggio essere nel flusso laminare? Perché possiamo predire le traiettorie di tutti i layer del fluido.

ES. FOCUSING HYDRODINAMICO → VOGLIAMO CONFINARE IN UNA ZONA PIÙ STRETTA UN LIQUIDO



FLUIDO 2 (blue)
 FLUIDO 1 (red)

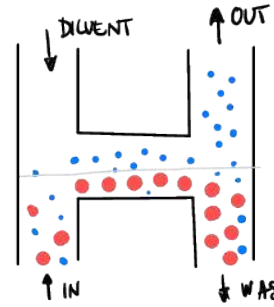
CLOGGING → ACCADE SE USIAMO I MICROCANALI SENZA FOCUSING IDRODINAMICO.

USARE IL FLUIDO COINFINATO EVITA IL CLOGGING CIOÈ IL FATTO CHE IL CANALE SI INTASA A CAUSA DI UN PRECEDENTE. QUESTO FUNZIONA PERCHÉ NON HO DEI MURI "RIGIDI" ATTORNO AL FLUIDO 1.

ES 2) **FILTRO AD H**

VOGLIAMO FISICAMENTE SEPARARE 2 POPOLAZIONI DI MOLECOLE (AD ES GRANDI E PICCOLI)

NON MOLTO USATO

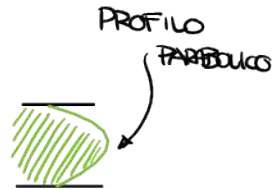


Si basa sulla d : flussare, infatti le molecole piccole tendono a d : flussare di più, non è efficace al 100%

BOUNDARY CONDITIONS

Supponiamo 2 tipi di interazione

- **Condizioni di NON Slip** → le molecole vicino al "muro" non si muovono, si muovono solo quelle centrali



- **CONDIZIONI DI SLIP** → Velocità bassa sui muri e più veloce nel centro (+ realistico)

Esiste una tecnica per separare eventuali difetti dal canale misurando la velocità delle particelle in tutto il canale (mantenete usando una pressione/portata costante)

RESISTENZA AL FLUSSO

È un'espressione che rappresenta l'opposizione data dalla frizione dei muri del tubo sul fluido. Tipicamente consideriamo tubo di sezione circolare.

POISSUE LAW → $Q = \frac{\Delta P}{R}$ ← $\Delta P =$ differenza di pressione

NOTO SIMILE ALLA LEGGE DI OHM

Ci interessa sapere come la resistenza varia questo in base alla geometria del tubo

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4} \left[\frac{\text{Pa} \cdot \text{s}}{\text{m}^3} \right] \rightarrow \text{UNICAMENTE NEL CASO DI TUBO CILINDRICO}$$

Buona Notizia: è lineare con la lunghezza (come Ohm).

Notiamo tuttavia che c'è una grande dipendenza dal raggio (in microfluidics questo è male ci serve molta energia per spostare il liquido)

Nel caso di sezione non circolare calcoliamo il raggio equivalente e lo mettiamo dentro. Se la geometria è molto diversa da un cerchio (larghezza > 1/4 altezza) possiamo usare

$$R = \frac{12\eta L}{C \left(\frac{w}{h}\right) h^3 \cdot w}$$

C'È UN'ALTRA EQUIVALENZA CON I CIRCUITI ELETTRICI (KIRKOFF 1) CIOÈ LA CONSERVAZIONE DELLA MASSA.

CAPACITÀ IDRODINAMICA

Se consideriamo membrane deformabili può essere introdotto il concetto di capacità:

$$Q = C_h \frac{d\Delta P}{dt} \rightarrow C_h = \frac{\int Q(t) dt}{\Delta P} = \frac{\text{VOLUME}}{\Delta P} \left[\frac{\text{m}^3}{\text{Pa}} \right]$$

POSSIAMO VEDERLA COME UNA VARIAZIONE DI PRESSIONE CHE IMPONE UNA VARIAZIONE DI VOLUME.

Otteniamo zbre wa costante di tempo $[R_h \cdot C_h] = \left[\frac{R \cdot s}{m^3} \cdot \frac{m^3}{R} \right] = [s]$

Per avere una variazione di volume z seguito di una variazione di pressione zbbiamo 2 casi:

- Fluido comprimibile: ES Arie ed acqua (ARA SI COMPRIME)
- Muri non Solidi e flessibili: Palloncino

1.03.2021

Zh DI LEZIONE

DOUBLE LAYER

UN ALTRO APPROCCIO PER GUIDARE IL FLUIDO NEL MICROCANALE, QUESTO SI BASA SUL LAVORO DEL CAMPO ELETTRICO, USATO PER MUOVERE GLI IONI DEL LIQUIDO, E CONSEGUENTEMENTE IL FLUSSO.

LA DIFFERENZA DI TENSIONE C'E' TRA LE MURA E IL FLUIDO.

QUESTO CAMPO ELETTRICO ATTRADE GLI IONI POSITIVI (IN QUESTO CASO AL MURO), SE APPROCIAMO UN ALTRO CAMPO MAGNETICO NEL VERSO DELLA LUNGHEZZA DEL MICROTUNNEL QUESTO FAFA MUOVERE IL FLUIDO AVANTI PER VISCOSITA'.

(QUESTO FUNZIONA SOLO PER FLUIDI CON MOLTI IONI (ES SANGUE).

INOLTRE CON QUESTA TECNICA IL PROFILO DI VELOCITA' NEL TUBO E' PRATICAMENTE COSTANTE E NON PARABOLICO COME VISTO NEL CASO DELLA POMPA.

TENSIONE SUPERFICIALE

E' DEFINITA A PARTIRE DA UN FILO DI LUNGHEZZA l E IL FILO E SUL LIQUIDO. SE ALZIAMO IL FILO DOBBIAMO APPLICARE UNA FORZA CHE E' LA GRAVITA' + UN'ALTRA FORZA CHE E' PROPORZIONALE ALLA TENSIONE SUPERFICIALE

$$F = \gamma 2L + mg$$

γ = COEFFICIENTE DI TENSIONE SUPERFICIALE

WETABILITY

Proprietà di una superficie che dice quanto un liquido e' portato ad aderire alle superficie solida.

HYDROPHILIC \rightarrow il liquido tende ad aderire al solido

HYDROPHOBIC \rightarrow il liquido minimizza la superficie di contatto con il solido

Quando zbbiamo un liquido e un solido possiamo misurare l'angolo tangente della pocciz sul solido. se l'angolo e' basso \rightarrow good wettability al contrario angolo grande bad wettability

ELECTROWETTING

Possiamo cambiare la wettability di un materiale anche con un campo elettrico.

PER FARE QUESTO PERO' DOBBIAMO METTERE UN ISOLATORE TRA LIQUIDO E SOLIDO.

QUESTA PROPRIETA' PUO' ESSERE USATA PER MANIPULARE LE GOCCE.

MOVING PARTICLES

Se la particella è carica usiamo un campo magnetico (elettroforesi)
Se la particella è magnetica (campo magnetico)
+ altre.

- DIFFUSIONE
- MIGRAZIONE (DRIFT)
- CONVECTION (MOVIMENTO DEL FLUIDO)

- DIFFUSIONE

$$\text{FICK'S LAW} \quad J = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

IL MOTO BROWNIANO DELLE MOLECOLE TENDE A FAR SI CHE LE MOLECOLE (DI VINO IN QUESTO CASO) SI DIFFONDANO.

ESISTE ANCHE UN COEFFICIENTE DI DIFFUSIONE (QUESTO COEFFICIENTE DIPENDE DAL RAGGIO)

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad k: \text{BOLTZMANN?}$$

SE LE PARTICELLE SONO CARICHE, C'È UN'ALTRA FORMULA

$$D = \frac{\mu kT}{q}$$

LUNGHEZZA DI DIFFUSIONE $L_{\text{DIFF}} = \sim \sqrt{D \cdot t}$

MINIATURIZZAZIONE AIUTA NELLA DIFFUSIONE

SINGLE MOLECULE DETECTION

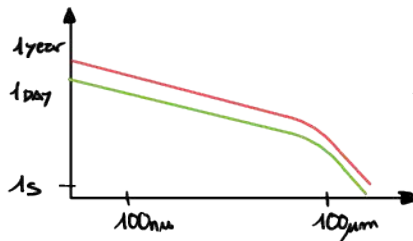
Se io ho un solo molecola nel liquido posso aspettarci che casualmente per diffusione la molecola arrivi sul mio sensore?

Noi dovremmo fare i sensori molto piccoli per essere molto sensibili.

Il tempo per scoprire queste molecole dipende dal volume e dalla dimensione del sensore.

ESempio DI GRAFICO

qui capiamo che non ci bastano sulla diffusione tipicamente richiede troppo tempo.



IN 1FT, cioè un molecola in un volume di: $120\mu\text{m} \times 120\mu\text{m} \times 120\mu\text{m}$

NUMERO DI PECLÉT

DIMENSIONLESS RATIO TRA ADVECTION E DIFFUSION.

$$Pe = \frac{v \cdot L}{D}$$

v = VELOCITÀ FLUIDO [m/s]

L = LENGTH SCALE [m]

D = COEFFICIENTE DI DIFFUSIONE

DRAW FORCE

Se la particella si muove contro il fluido (che è fermo) allora la particella deve combattere una frizione data dal fluido.

Per una molecola sferica e⁻

$$F_{\text{drag}} = -6\pi\eta rv$$

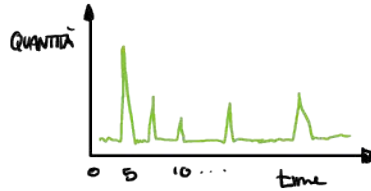
ELETTROKINETICA

CAMPO ELETTRICO PER MUOVERE SOTTO LE PARTICELLE
(NOI SPIAZIAMO FLUIDO SENZA IONI QUI)

$F_E = qE = F_{\text{drag}} = 6\pi\eta rv$ ← Le 2 forze tendono a equilibrarsi e quindi la particella non accelera più e si muove a velocità costante.

Questa velocità limite è chiamata velocità di migrazione $v = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu E$

IL MODO PIÙ COMUNE DI USARE L'ELETTROFORESI È LA DIVISIONE DELLE VARIE PARTICELLE, INFATTI SE APPUCCIAMO UN CAMPO ELETTRICO COSTANTE DIVERSE PARTICELLE AVRANNO DIVERSE VELOCITÀ E QUINDI SE METTO UN SENSORE ALLA FINE POSSO DISCRETIZZARE LE MOLECOLE



TIPICAMENTE SI RAPPRESENTANO TUTTE LE PARTICELLE CON UN GEL

DIELETTROFORESI

è se avessimo una molecola neutra?

Se la molecola è polarizzabile, se mettiamo la particella in un campo magnetico che ha un gradiente spaziale, così posso spostarla.

Vediamo la molecola come un dipolo

PERMEABILITÀ DI UN MATERIALE

$$E = E + \frac{\sigma}{j\omega}$$

Usiamo un campo elettrico variabile a diverse frequenze. Possiamo esprimere qualcosa in un grafico con la frequenza

FORZA DIELETTROFORISTICA

Questa forza è proporzionale al gradiente del campo

$$\vec{F} = \vec{p} \cdot \nabla E = \alpha \nabla E$$

Nel caso di particella sferica omogenea (raggio r , ϵ_p PERMEABILITÀ)

$$\vec{F} = 2\pi \cdot r^3 \cdot \epsilon_m \cdot \text{Re}\{K_{CM}(\omega)\} \cdot \nabla E^2$$

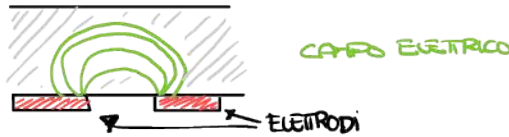
KCM: CLAUSIUS MOSSOTTI FACTOR (QUANDO È POSITIVO ABBIAMO POSITIVE ELECTROPHORESIS, SE È NEGATIVO IL CONTRARIO) QUESTO VALORE DIPENDE DALLA FREQUENZA

Le cellule biologiche possono essere comandate con la dielettroforesi, visto che in genere sono neutre ma dentro hanno numerosissimi ioni.

AD ESEMPIO SE VOGLIAMO DIVIDERE I GLOBULI ROSSI DA QUELLI BIANCHI VADO A VEREBB IL VALORE DI MOSSOTTI CHE MI ATTIRA I GLOBULI ROSSI E MI REPELLE I GLOBULI BIANCHI

CAGING: 4 opio elettrodi che repellono la particella ma gli elettrodi sono messi in modo da bloccare la particella.

Nella retina gli elettrodi sono sul fondo del microcervello messi in modo complementare



03.03.2021

2h DI LEZIONE

DIGITAL MICROFLUIDICS

Fino ad adesso abbiamo considerato un flusso di liquido continuo. Possiamo però controllare anche singole gocce di fluido (Digital Microfluidics) [nel senso che sono discrete]. il vantaggio maggior è dato dal maggior controllo nel tempo e nello spazio (dato che lavoriamo a chunk discreti). Svantaggi → sistema più complesso.

Sono possibili 2 architetture

- Besatz sui canali, ma usiamo una combinazione di 2 fluidi ^{che non si mischiano}, una che porta i campioni e l'altra che serve solo a distanziare i campioni
- Surface based, besatz su un array di punti che tramite l'elettrowetting comandano le gocce

Nel caso 1 posso creare le singole gocce scegliendo il tempo di ON della pompa contenente i campioni e quella dell'altro fluido

Nel caso 2 usiamo l'elettrowetting e questo funziona solo con fluidi che contengono ioni. Imponendo una tensione posso cambiare l'angolo di contatto della goccia

$$\cos \theta = \cos(\theta_0) + \frac{1}{2\gamma} CV^2$$

Nell'elettrowetting il dielettrico spezzatore è essenziale.

Ma come muoviamo le gocce? È fatto con un proprio Layout del sistema e elettrodi.

Infatti per avere forza laterale dobbiamo fare sì che i 2 pedis vedano leggermente a sovrapporsi. Per forza muove molto il ped della goccia idrofobica e quello dove voglio che vada in idrofilico.

Un ulteriore vantaggio della configurazione 2 è che si possono usare questi elettrodi/ped come dei sensori. Infatti questi sono come dei condensatori, infatti basta misurare l'impedenza e ricavare l'ε per capire se c'è il fluido o l'acqua.

Non posso tenere la goccia per sempre perché c'è l'evaporazione.

Nel video l'elettrodo sopra è un metallo trasparente ed è così che le gocce sono conesse.

Microfluidics Components

I design microfluidici sono praticamente tutti custom

CANALI → la cosa che li identifica di più è la forma della cross-section. La forma più comune è quella a rettangolo. Non a meno praticamente mai sezione circolare.

Inoltre l'altezza dei canali è tipicamente fissa e giochiamo solo con la larghezza ecc.

Vedere le slide per sapere i tipi di fabbricazione

VALVOLE MONODIREZIONALI PASSIVE

Vedere le slide per capire come sono fatte. In microfluidica usiamo questa valvole per fare solo ON/OFF, usiamo come componente che permette il passaggio unidirezionale del fluido (diodo).

Parla anche della valvole di Tesla.

VALVOLE ATTIVE POSSIAMO COMANDARE IL FATTO CHE CONDUCA O NO IL FLUIDO.

Tipicamente la valvola è fatta da un materiale flessibile e l'attuatore agisce su questa membrana per permettere o meno il passaggio del liquido.

Vedere slide per diversi tipi di attuatori

Un'altro modo di controllare la membrana è attraverso un altro canale che se aumenta la sua pressione blocca il flusso dell'altro. Ha degli svantaggi però perché fare strutture multilayer è molto difficile e molte ci servono molte pompe per controllare tutte queste linee di controllo.

MIXER (ESISTONO SIA PASSIVI CHE ATTIVI)

PASSIVI → si basano solo sulla diffusione, in un canale lungo in cui entrano i 2 fluidi dopo un po' succedrà che si mischiano.

Inoltre la valvola di testa può essere usata per mescolare i fluidi.

LA POMPA

il cuore del sistema. Vedere le slide per vedere le curve caratteristiche.

Peristaltic pump → vedere le slide per capire a colpo. ottimo perché così il fluido non entra in contatto con nulla. Anche qui non c'è un flow rate costante.

Siringa → lato negativo → non abbiamo un flow rate costante.

08-03-2021

2h di lezione

Un modo per ridurre il ripple dovuto alle pompe peristaltiche è introdurre un filtro passabasso composto da una resistenza e un condensatore il quale è creato tramite l'aria presente in una siringa (vedere slide)
In pratica comprimo l'aria della siringa con un fluido ed in pratica ho il condensatore.

INTERCONNESSIONI

Essenziali per connettere il sistema microfluidico con il mondo esterno.

Per fare questo possiamo usare lo stesso tubo che connette 2 parti rigide per mettere un tubo flessibile e collegarci lì la pompa peristaltica.

POMPA A DIAFRAMMA (vedere slide, molto facile da capire)

Anche questa pompa ha un tipo di flusso non costante.

PIEZOELETTRICITÀ

Schiaccio il cristallo e ottengo un tensione (lo posso usare come sensore) vale anche il contrario.

Vedere slide per vedere il modello molecolare (posso dire che il sistema è in equilibrio perché le cariche sono equamente distribuite quando il materiale è normale, quando lo premiamo creiamo un non bilanciamento delle cariche e quindi creiamo un dipolo).

Lato negativo → Sono di difficile creazione ed implementarli nei biochip non può essere fatto in automatico, quindi sono da aggiungere dopo.

PERISTALTIC MICROPUMP Un modo di spostare nel chip la pompa.

TUBING CONNECTION

Tipicamente si usano tubi di plastica con una parte finale con un zigo di metallo che serve a inserire il fluido nel biochip. nell'interconnessione tipicamente c'è una guarnizione.

LUER LOCK è il tipo di interconnessione usato nelle siringhe, in questo caso non c'è nessuna guarnizione. Questa funziona perché è stata studiata la perdita e tutto per far sì che non ci fossero perdite.

PIPETTA Si può inserire il campione nel biochip con una pipetta con un sistema fatto apposta per ridurre contaminazioni e bolle d'aria. Tipicamente questa tecnica usata nei laboratori, per self-analysis sono qualcosa di più semplice.

MICROFABBRICAZIONE

Ci troviamo sul bordo dello stenderà tre microtecnologie e stenderà fabbricazione delle piazze, queste non è un vantaggio.

Ognuna di questi 2 tipi di fabbricazione ha i suoi vantaggi e svantaggi (Vedere slide).
Questi 2 tipi di fabbricazione non sono così separati perché tipicamente si usano gli stampi creati con la tecnica soft e poi usiamo la Litografia che è la tecnica hard.

CLEAN ROOM

Vogliamo un ambiente in cui non c'è polvere perché se no potrebbero rovinare la fabbricazione dei chip.

il substrato preferito è il silicio, infatti il silicio è molto usato in diversi ambiti e MEMS (Micro electronic Mechanical Systems)

- Bulk → eliminiamo il materiale del substrato

- Processo 2 layer → aggiungiamo i layer e così possiamo creare la struttura a ci serve

il nostro obiettivo è trasferire il design dal progetto al wafers di silicio

Ci sono diverse tecniche per posizionare il film sul substrato (Processo 2 layer)

1) PVD evaporazione termica: vogliamo coprire il wafers con il metallo, scegliamo molto il metallo in una camera a vuoto con il wafers così facendo alcuni atomi del metallo andranno a depositarsi sul wafers. Processo molto lento, in base al tempo che lasciamo il sistema levare possiamo gestire lo spessore del metallo.
Non è un sistema efficiente infatti viene sprecato molto metallo

2) SPUTTERING: Si usano ioni di gas per staccare atomi del metallo. Lato negativo è che alla fine il substrato non è ricoperto in modo eccellente (troppo rugoso)

3) EVAPORAZIONE CHIMICA: Iniziando da un gas che quando tocca la superficie del substrato lascia un atomo di silicio e rilascia ossigeno.
A differenza degli altri qui il sistema non è così lento ma gli atomi di silicio aggiunti possono essere adatti

4) DEPOSIZIONE LIQUIDA: Usato per i photoresist (non per i metalli) per fare questa tecnica ci serve uno stencil con le geometrie che vogliamo trasferire. Prima di tutto ricopriamo il substrato di photoresist (per fare questo possiamo usare lo spin coating), poi mettiamo lo stencil e illuminiamo.
Possiamo avere 2 diversi comportamenti, se il risultato non ha la stessa forma dello stencil allora è positivo se il contrario allora è negativo.

Bulk (si usa acido)

-Dry etching

-Wet etching

LIFT-OFF

Tecniche per avere dei pattern di metallo sul substrato

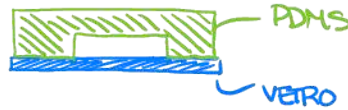
Prima si deposita il layer sacrificale, poi si mette il layer di metallo sopra tutto e poi si elimina il layer sacrificale (che ha sopra il metallo) così ci rimangono solo le parti dove non c'era il layer sacrificale.

SOFT PROCESSING

In questo caso processiamo plastiche o materiali comunque morbidi.

PLASTIC FABRICATION → vedere slide

PDMS → è il materiale più usato (è un polimero composto da carbonio, silicio e ossigeno) vedere slide per ventagli e sventaggi
Per collegare il PDMS al vetro usiamo il plasma, questo serve per chiudere i canali.



Tuttavia anche con il PDMS ci serve uno stampo fatto nella cleanroom poi da quello stampo possiamo replicare quante volte vogliamo il chip (fuori della clean room)

Il problema del PDMS è dovuto alla scarsa possibilità di scelerlo e livello industriale, infatti PDMS è tipicamente usato solo in laboratori per lavori DA2 abbiamo

UN ALTRO APPROCCIO SCALABILE A LIVELLO INDUSTRIALE È Si₃N₄, che è come un rotolo di photoresist che è photopatternabile, quindi noi facciamo il pattern su questo adesivo che attacchiamo sul substrato e poi ci mettiamo sopra il vetro

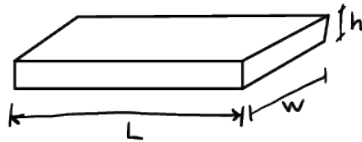
10.03.2021

ESERCITAZIONE

2h DI LEZIONE

(DOVREBBE CARICARE IL FILE)

1) Micro canale rettangolare



$$W = 100 \mu\text{m}$$
$$h = 10 \mu\text{m}$$

Vogliamo trovare la differenza di pressione dato un flow rate $Q = 1 \mu\text{e/s}$ per 2 valori di lunghezza

- $L = 1 \text{mm}$
- $L = 10 \text{mm}$

Non è data la viscosità del liquido \rightarrow allora supponiamo acqua $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$

FACCIAMO IL MODELLO ELETTRICO EQUIVALENTE



$$Q = \frac{\Delta p}{R}$$

Sappiamo che $w/h = 10 > 1,4$ possiamo usare l'espressione specifica per i microcanali rettangolari

$$R = \frac{12 \cdot \eta \cdot L}{(1 - 0,63 \cdot \frac{h}{w}) \cdot h^3 \cdot w}$$

a) $L = 1 \text{ mm}$ Quindi $R = \frac{12 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s} \cdot 10^{-3} \text{ m}}{(1 - 0,63 \cdot \frac{1}{10}) (10 \cdot 10^{-6})^3 \cdot 100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^4} = 128 \cdot 10^{12} \left[\frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3} \right]$

Qui entra in gioco il modello [RICORDARE $1 \text{ m}^3 = 1000 \text{ e}$]

Perciò $Q = 1 \mu\text{l/s}$ $1 \mu\text{l} = \frac{1}{1000} \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$

e quindi $\Delta p = R \cdot Q = 10^{-9} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} \cdot 128 \cdot 10^{12} \frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$
 $= 128 \cdot 10^3 \text{ Pa}$
 $= 1,2 \text{ atm}$

Ricordare $10^5 \text{ Pa} = 1 \text{ atm}$

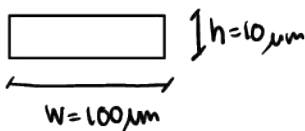
PUNTO b)

$L = 10 \text{ mm}$ Non serve rifare tutti i conti, la resistenza è lineare

$R' = 10 \cdot R$ e anche $\Delta p' = 10 \cdot \Delta p = 12 \text{ atm}$ ← È UNA PRESSIONE MOLTO ALTA

Infatti la pressione massima di una siringa è circa 100 PSI [$1 \text{ atm} = 14,7 \text{ PSI}$] e quindi notiamo che $12 \cdot 14,7 = 176 \text{ PSI}$ che è sopra quella di una siringa (dobbiamo usare qualcosa)

ES 2)



Potremmo anche usare la formula del raggio equivalente e poi usare quel valore per ricavare la resistenza

$$r_{eq} = \frac{2 \cdot A}{\text{perimetro}} \rightarrow R = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r_{eq}^4}$$

SE USIAMO QUESTE FORMULE OTTIENIAMO

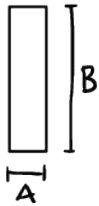
$$R_{eq} = \frac{w \cdot h}{w+h} \approx h$$

$$R_0 = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot h^4} = 2,54 \cdot \frac{\eta \cdot L}{h^4}$$

Mentre nella formula specifica per il canale rettangolare otteniamo $R_{\square} = 1,2 \cdot \frac{\eta \cdot L}{h^4}$

Capiamo quindi che progettiamo per circa il doppio (non è malvagio)

■ COSA CAMBIEREBBE SE IL CANALE FOSSE COSÌ

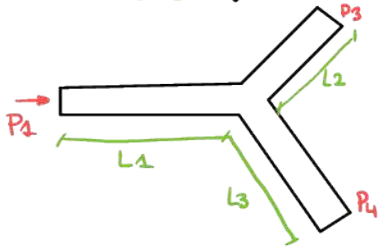


$$B = 10 \cdot A$$

NOI CONSIDERIAMO L'ALTEZZA SEMPRE IL LATO PIÙ CORTO!!!!

Anche perché la formula deve venire uguale

ESERCIZIO 3 (BIFORCAZIONE)



Assumiamo di essere in flusso laminare (vale sempre in microfluidics)

$$L_1 = 0,5 \text{ cm}$$

$$L_2 = 1 \text{ cm}$$

$$L_3 = 2 \text{ cm}$$

$$P_1 = 0,11 \text{ MPa}$$

$$P_3 = 0,1 \text{ MPa}$$

$$P_4 = 0,1 \text{ MPa}$$

Non imponiamo queste pressioni in tutti e 3 i tubi

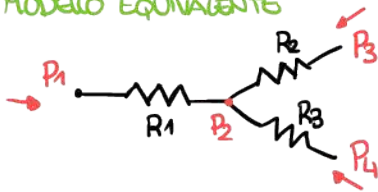
Supponiamo sezione circolare con un raggio pari a



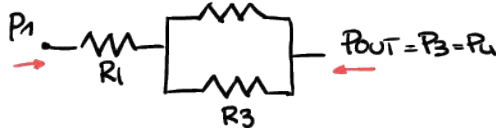
$$r = 20 \mu\text{m}$$

OBBIETTIVO → FLOW RATE NEI 3 TUBI: Q_1, Q_2, Q_3

1) MODELLO EQUIVALENTE



ABBIAMO $P_3 = P_4$ QUINDI R_2 e R_3 SONO IN PARALLELO (Non serve fare Kirchhoff per la stella)



RICAVIAMO LE RESISTENZE

$$R_1 = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi r^4} = \frac{8 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}}{\pi (20 \cdot 10^{-6})^4} = 79,5 \cdot 10^{12} \frac{\text{Pa} \cdot \text{s}}{\text{m}^3}$$

$$R_2 = 159 \cdot 10^{12} \text{ Pa} \cdot \text{s} / \text{m}^3$$

$$\text{e } R_3 = 318 \cdot 10^{12} \text{ Pa} \cdot \text{s} / \text{m}^3$$

$$R_{TOT} = R_1 + R_2 // R_3$$



Otteniamo quindi:

$$Q_1 = \frac{\Delta P}{R_{TOT}} = \frac{110 \text{ kPa} - 100 \text{ kPa}}{R_1 + R_2 // R_3} = 54 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3/\text{s}$$

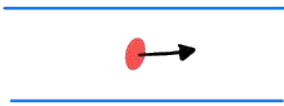
$$P_2 = P_1 - Q_1 \cdot R_1 = 110 \text{ kPa} - 54 \cdot 10^{-12} \cdot 79,5 \cdot 10^{12} = 105,7 \mu\text{Pa}$$

$$Q_2 = \frac{P_2 - P_3}{R_2} = 35,8 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$Q_3 = \frac{P_2 - P_4}{R_3} = \frac{Q_2}{2} \sim 18 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3/\text{s} \quad [1 \mu\text{l}/\text{min}]$$

ESERCIZIO 4)

Prendiamo il caso di avere una particella nel liquido guidata da una forza esterna che non ci interessa



$$r = 5 \mu\text{m}$$

BEAD (la particella)
 ↗ POLYSTIRENE
 ↘ FERRO

La velocità della particella è $v = 1 \mu\text{m}/\text{ms}$

Quali sono le forze sulla particella?



$$F_{drag} = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v = 6 \pi \cdot 10^{-3} \cdot 5 \mu\text{m} \cdot 1 \frac{\mu\text{m}}{\text{ms}} = 0,1 \text{ nN}$$

Visto che la velocità è costante $F_{drag} = F$ visto che la particella non accelera

In verticale abbiamo

$$F_g = m \cdot g = \frac{4}{3} \pi r^3 \cdot \rho_{BEAD} \cdot g$$

La forza di Archimede è

$$F_{arc} = \frac{4}{3} \pi r^3 \cdot \rho_{H_2O} \cdot g$$

La risultante forza verticale è

$$F_{\text{VERTICAL}} = F_g - F_A = \frac{4}{3} \pi r^3 [\rho_{\text{BEAD}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}]$$

$$\rho_{\text{IRON}} = 7,8 \text{ g/cm}^3 \quad \rho_{\text{POLYSTYRENE}} = 1 \text{ g/cm}^3 \quad \rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ g/cm}^3$$

Quindi se $\rho_{\text{BEAD}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}} > 0$ la particella va sul fondo, se è 0 la particella è in sospensione mentre se è minore di 0 sale a galla.

Calcoliamo la forza verticale nel caso la particella fosse ferro.

$$F_v = \frac{4}{3} \pi r^3 (5 \cdot 10^{-6} \text{ m})^3 \cdot 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \cdot (7800 - 1000) \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} = 11 \text{ pN}$$

ESERCIZIO 5

VERTICAL MOTION → Vogliamo trovare la terminal velocity della particella di ferro vista in precedenza (senza forze orizzontali e velocità orizzontali)



Seppiamo che la particella cade

Troviamo la velocità terminale imponendo $v = \sum F_y = 0$
Quindi

$$F_g - F_A - F_{\text{drag}}$$

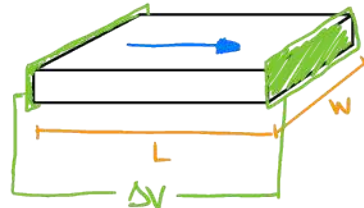
$$\text{Perciò } 6\pi \eta \cdot r \cdot v = (\rho_{\text{IRON}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot g \cdot \frac{4}{3} \pi r^3$$

Da cui otteniamo che la velocità terminale è $374 \mu\text{m/s}$ (è molto veloce!!!)
questa particella in un canale alto $30 \mu\text{m}$ ci mette circa 0,1 s ad arrivare sul fondo

ESERCIZIO 6

ELETTROSMOSI

Consideriamo il canale rettangolare
vogliamo un flusso $Q = 1 \mu\text{l/min}$
tramite elettrosmosi, calcolare la ΔV necessaria



Seppiamo che

$$L = 1 \text{ mm} \quad W = 100 \mu\text{m} \quad h = 10 \mu\text{m}$$

Z POTENTIAL $\zeta = 50 \text{ mV}$ (ci dà l'arricchimento degli ioni nella soluzione)

seppiamo poi che $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 80 \cdot \epsilon_0$
↑
1

$$\eta_{H_2O} = \frac{E_{H_2O} \cdot \epsilon \cdot E}{\eta}$$

CON $E = \frac{\Delta V}{L}$ in parte percolare

viscosità η

$$v = \frac{Q}{w \cdot h} = \frac{1 \mu\text{e}/\text{mn}}{10 \mu\text{m} \cdot 100 \mu\text{m}} = 0,016 \mu\text{m}/\text{s}$$

Possiamo quindi calcolare ΔV come

$$\Delta V = E \cdot L = \frac{v \cdot \eta}{\epsilon \cdot \epsilon_0} \cdot L \approx 4500 \text{ V} \quad \text{molto alta per } L = 10 \text{ mm}$$

Cerchiamo che è molto difficile muovere il fluido con questa tecnica

15-03-2021

2h

DNA E RNA SENSING

NAT (Nucleic Acid Tests)

LAB-on-Chip: le supplies hanno grande parte del costo perché tipicamente il chip è usa e getta, infatti questo tipo di tecniche va molto bene quando non ci sono moltissimi test da fare.

ESERCIZI

(ESERCIZIO SUI ELETTROFORESI, VEDERE VIDEO/SUDE ESERCIZI CIRCA 30min dopo INIZIO)

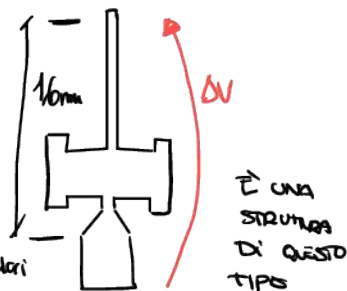
- VELOCITÀ DELLA MOLECOLA DI DNA QUANDO UNA $\Delta V = 15 \text{ V}$ È APPLICATA
- QUALE È LA CARICA DEL DNA?
- FRAME RATE DELLA CCD CAMERA?

a) ABBIAMO UN GRAFICO CHE CI DA LA VELOCITÀ IN BASE AL CAMPO MAGNETICO.

Scepiamo di 1000 V ($625 \text{ KV}/\text{m}$)

$$L = \frac{\Delta V}{E} = \frac{1000 \text{ V}}{625 \text{ KV}/\text{m}} = 1,6 \text{ mm} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{caso in cui da la} \\ \text{nostra stessa lunghezza con valori} \\ \text{diversi} \end{array} \right.$$

$$E = \frac{15 \text{ V}}{1,6 \text{ mm}} = 9,37 \text{ KV}/\text{m} \rightarrow \text{vedo sul grafico} \rightarrow v = 0,15 \text{ mm}/\text{s}$$



$$b) \mu = \frac{Q}{6\pi r g \eta}$$

usiamo la viscosità dell'acqua

Noi vogliamo ricavare la pendenza della curva del grafico che è μ

come r_g per il DNA prendiamo $\frac{1}{2} \mu$

E poi estraiamo la carica, quindi:

$$\mu = \frac{\Delta v}{\Delta E} = \frac{5 \text{ mm/s}}{300 \text{ kV/m}} = 16,6 \cdot 10^{-9} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \right]$$

e quindi:

$$Q = \mu (6\pi r_g \eta) = 16,6 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \cdot (6\pi \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s})$$

$$= 314 \cdot 10^{-18} \text{ C}$$

Calcoliamo il numero di elettroni (sappiamo che la carica è negativa xè il DNA è attratto verso il Polo positivo)

$$\#e^- = \frac{Q}{me} = \frac{314 \cdot 10^{-18} \text{ C}}{1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}} = 2000 e^-$$

Visto che l'esercizio ci dice che il DNA ha 7,3 Kbases strand, allora

$$\frac{2000 e^-}{7300 \text{ b}} \sim 1 \text{ ione negativo ogni } 3 \text{ basi.} \quad (\text{Nel futuro sapremo cosa sono le basi})$$

Possiamo x ore dire che la base è un'unità di misura della lunghezza del DNA.

c) Quanto frequentate deve la camera fare foto?

Sappiamo che $l = 1,6 \text{ nm}$ e noi vogliamo fare 10 foto nel tempo che la molecola sta ad attraversare questa lunghezza

$$t_{\text{traversa}} = \frac{l}{v} = \frac{1,6 \text{ nm}}{0,15 \text{ m/s}}$$

perciò il frame rate sarà FR = $\frac{10}{t_{\text{traversa}}}$

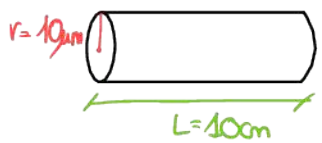
$$= \frac{10 \cdot 0,15}{1,6} \sim 1 \text{ Hz}$$

$$= 1 \text{ fps}$$

numero random

ESERCIZIO 1 SUI CONDENSATORI FLUIDICI

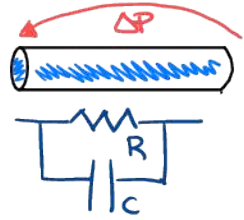
Consideriamo la compressibilità dell'acqua, trovare la costante di tempo idraulica associata a questo microcannello



Solo in questo esercizio consideriamo la compressibilità dell'acqua $\neq 0$

$$\beta = 5 \cdot 10^{-5} \text{ [atm}^{-1}\text{]}$$

Questa compressibilità viene definita come $\beta = -\frac{1}{V_{acqua}} \cdot \frac{\Delta V_{acqua}}{\Delta P_{pressione}}$



$$R = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r^4}$$

$$\tau = R \cdot C$$

$$C = \frac{\Delta V_{acqua}}{\Delta P_{pressione}} = \beta \cdot V_{acqua}$$

Perciò

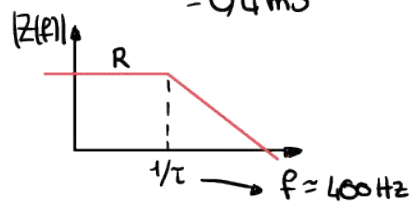
$$\tau = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi r^4} \cdot \beta \cdot \pi r^2 \cdot L \rightarrow \text{semplifichiamo} \rightarrow = \frac{8 \cdot \eta \cdot L^2}{r^2} \cdot \beta$$

$$\beta = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{\text{atm}} \rightarrow 1 \text{ atm} = 10^5 \text{ Pa}$$

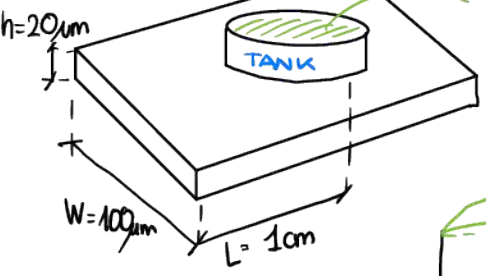
Qui dobbiamo usare Pa così si semplifica

$$= \frac{8 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot (10^{-1})^2}{(10 \cdot 10^{-6})^2} \cdot \frac{5 \cdot 10^{-10}}{\text{Pa}} = 0,4 \text{ ms}$$

Se vogliamo plotte il bode otteniamo

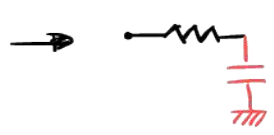


ESERCIZIO 2



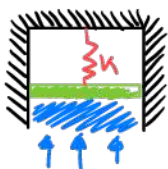
MEMBRANA ELASTICA DI DIAMETRO 100 μm

Trovare la costante K della membrana per attenuare di un fattore 100 un segnale impulsivo periodico T = 2s



$$\tau = R \cdot C$$

Facciamo questo modello semplificato, il substrato ha tutti i muri rigidi ma il tappo può andare su e giù ed è bloccato da una molla con costante k



HOOKE'S LAW:

$$F = k \cdot \Delta z$$

NOI SAPPIAMO CHE $C = \frac{\int Q(t) dt}{P} = \frac{\Delta V_{max}}{P} = \frac{\Delta z \cdot Area}{P}$

$$P = F \cdot Area = k \cdot \Delta z$$

$$= \frac{\Delta z \cdot AREA^2}{\Delta z \cdot k} = \frac{AREA^2}{k}$$

Sappiamo che abbiamo un periodo

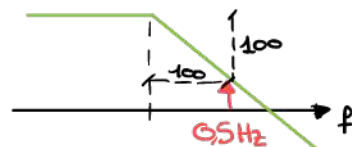
$$T = 2s \rightarrow f_{ruse} = 1/T = 0,5 Hz$$

$$f_{-3dB} = \frac{f_{ruse}}{100} = 5 mHz = \frac{1}{2\pi RC} \tau$$

$$\tau = \frac{1}{2\pi 5 mHz} = 31,8 s \rightarrow C = \frac{\tau}{R}$$

Perciò $C = \tau/R = 125,3 \cdot 10^{-5} \left[\frac{m^3}{Pa} \right]$

$$C = \frac{Area^2}{k} \rightarrow k = \frac{C}{Area^2} = 0,3 \cdot 10^{-3} [Pa \cdot m] = 0,3 \cdot 10^{-3} [N/m]$$



$$R = \frac{12 \cdot \eta \cdot L}{(1-0,63) \cdot h^3 \cdot w^3} = 171,6 \cdot 10^{-12} \left[\frac{Pa \cdot s}{m^3} \right]$$

17.03.2021

2h

OPTICAL DETECTION

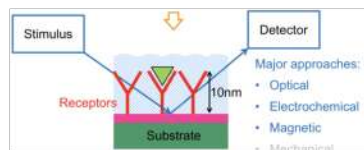
Vogliamo rilevare quando avviene un evento di binding

Tutto avviene all'interfaccia!!

Questo tipo di detection è quella più usata in biologia

Perché non è invasiva, possiamo stimolare il sistema con molta energia (energia ottica)

- Fluorescenza (usata con i marker)
- Silicon Photonics
- Scanning probes.



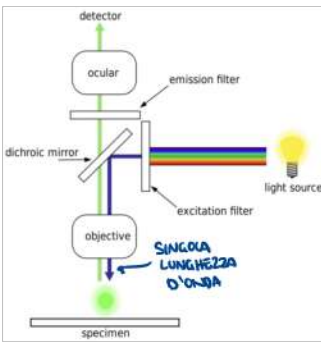
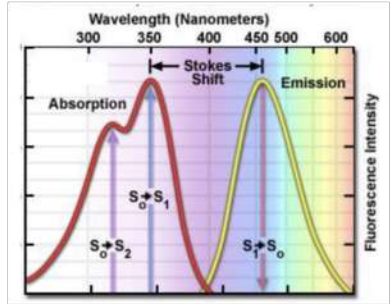
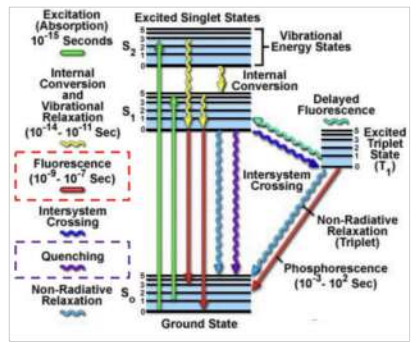
FLUORESCENZA

Se vediamo i livelli energetici della molecola, vediamo che se eccitiamo la molecola questa va in uno stato con energia superiore e poi tende a tornare allo stato energetico base rilasciando energia. Uno di questi modi è la fluorescenza, la quale consiste nel rilasciare un fotone a bassa energia dato un fotone ad alta energia.

Se studiamo la lunghezza d'onda notiamo che questa molecola ha 2 picchi di absorption, ognuno dei quali è relativo al 1° o al secondo livello energetico. La distanza tra le lunghezze d'onda di emissione e assorbimento è detta Stokes shift.

Più volte faccio l'intero ciclo di fluorescenza meno potente sarà la radiazione fluorescente. (Ho quindi un tempo limitato per studiare tutto con la fluorescenza)

Possiamo vedere la fluorescenza anche al microscopio



Eccitiamo il campione solo con un'unica lunghezza d'onda. il campione fluoresce e risponderà con un'altra lunghezza d'onda, noi usiamo un filtro di emissione per fare in modo di far passare unicamente la lunghezza d'onda della risposta del materiale fluorescente.

Il nostro obiettivo è attaccare alla probe o al reagente questo materiale fluorescente così che se abbiamo la fluorescenza sappiamo che abbiamo il campione cercato.

La tecnica fluorescente più usata è la Green Fluorescent Protein. In pratica abbiamo la fluorescenza quando il pezzo di DNA viene processato.

NOTIAMO CHE SE LO STOKES SHIFT È MOLTO PICCOLO ANCHE IL FILTRO OTTICO DEVE ESSERE MOLTO PENDENTE XÈ SENNO' TIPIAMO DENTRO ANCHE LA LUNGHEZZA D'ONDA D'ECCITAZIONE.

IMMUNOSTAINING (prospettiva storica)

Volevamo vedere se c'erano o no molecole nelle membrane di una cella. Vogliamo sapere più in particolare se l'antigene è presente sulla membrano o no. Se abbiamo l'antibody specifico per l'antigen allora questo si collegherà con l'antigen. Ma come possiamo avere la fluorescenza? Attacciamo il fluorophore (materiale fluorescente) all'antibody. questo viene fatto poi prima si fa attaccare l'antibody all'antigen e poi si fa attaccare il fluorophore. Poi usiamo una fluorescenza che non sono attaccati e nulla così possiamo vedere solo i rimasti che sono rimasti attaccati.

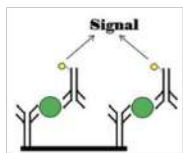
ELISA (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Stessa roba di sopra solo con un enzima e non abbiamo fluorescenza ma dobbiamo colorare il fluido.

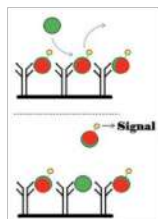
Vantaggio è che è molto facile da capire.

TIPI DI ASSAYS

1) SANDWICH: è quello spiegato prima, un recettore ferma la proteina e un altro recettore fluorescente si attacca alla stessa proteina di prima forma e questo ci permette di rilevare il tutto. Questa tecnica appartiene alla categoria labeling (cioè che facciamo 2 step in cui l'ultimo è molto complesso)



2) COMPETITIVE: Si parte da due recettori in cui la molecola rossa è simile al target e vuole la molecola rossa è già preesistente sul recettore non è fluorescente. Se arriva la proteina viene un switch tra la molecola rossa e la nostra proteina. Questo avviene perché c'è più affinità con la vera proteina. Perciò se non abbiamo la proteina abbiamo tutto luminoso, se invece c'è la proteina abbiamo il buio

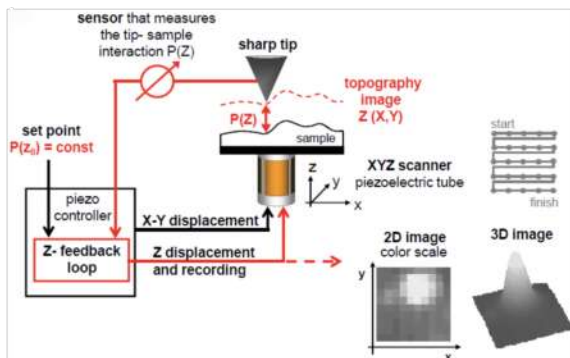
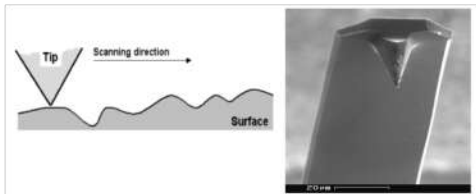


Qual'è il limite di un microscopio ottico?

La risoluzione spaziale è data dalla diffrazione. La distanza minima che riusciamo a vedere è data da

$$r = \frac{0.5\lambda}{NA} = \frac{0.5 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\theta)}$$

Possiamo vedere sotto il limite di diffrazione? Sì, non usiamo i fotoni ma usiamo le capacità di costruire cose nanoscopiche e costruiamo una specie di graticoli in cui la punta è circa grande come un atomo. Tra la punta e quello che voglio analizzare sono presenti delle forze che noi analizziamo.



ATOMIC FORCE MICROSCOPE

Misuriamo la forza di attrazione tra la punta e il campione. Per misurare la forza di attrazione la punta si piegherà e tanto in sistema ottico possiamo ricavare la distanza.

LIGHT ABSORPTION

(è un altro tipo di tecnica che richiede stimolazione esterna)

Posso eccitare il campione con tutte le lunghezze d'onda e poi analizzare le lunghezze d'onda che sono state assorbite dal campione. In base a quale lunghezza d'onda è stata assorbita so che molecole ci sono, questa tecnica è chiamata spettroscopia.

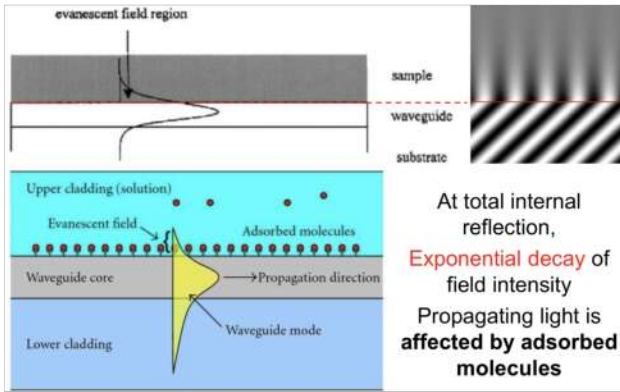
Lati negativi è che non è miniaturizzabile ed è molto lenta e costosa.

Questa può essere miniaturizzata se vogliamo analizzare solo poche lunghezze d'onda (es il pulsometro)

SILICON PHOTONICS (NON CENTRA NULLA CON LA FLUORESCENZA)

In pratica creiamo delle linee d'onda (tipo fibre ottiche) in modo da guidare la luce.

Nella visione standard dell'ottica noi assumiamo che tutta la luce sia confinata nella "fibra". Tuttavia nella visione quantistica noi abbiamo una probabilità che i fotoni scappino fuori della "fibra". Questa probabilità scade come un esponenziale e si annulla dopo 10nm. Numero importante visto che è la lunghezza dei nostri recettori. Noi sfruttiamo questo fenomeno.



la presenza del recettore ^{è la presenza del recettore} fa sì che ci sia una minima differenza di fase nell'onda riflessa.

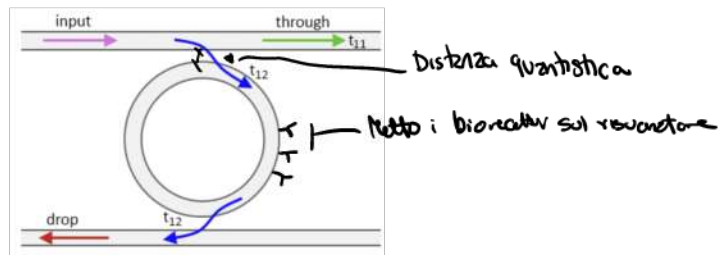
Capriamo quindi che analizzando la luce (la fase) possiamo capire cosa succede ai recettori.

Noi dobbiamo fare in modo di trasformare la differenza di fase in una di ampiezza esistono 2 metodi:

1) Mach-Zehnder Interferometer: in pratica ho 2 percorsi uguali e solo in 1 ho i recettori. Se non c'è l'interferenza ho le 2 fasi uguali e ho interferenza costruttiva altrimenti distruttiva.

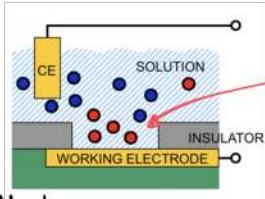
2) Optical ring resonator:

NON HO CAPITO COME FUNZIONA!



Electrochemical detector

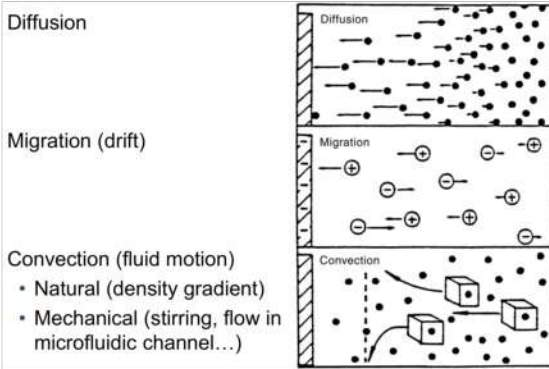
Rezista elettrica il cui output produce un colore in uscita



Qui avviene la reazione

Visto che c'è un campo elettrico abbiamo una redistribuzione delle cariche

Modi con cui si possono muovere le particelle in un liquido



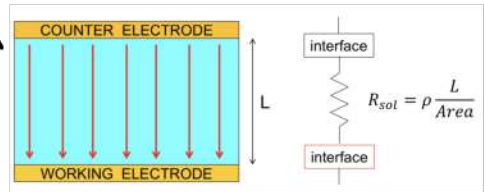
Quando applichiamo un campo magnetico.

GLI IONI CHE SI MUOVONO IN UNA SOLUZIONE CREANO UNA CORRENTE.

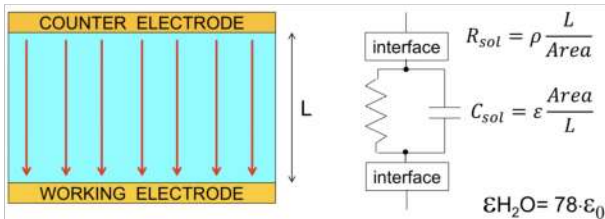
LA MOBILITÀ IN QUESTI LIQUIDI È MOLTO BASSA MA IL NUMERO DI IONI È ELEVATISSIMO e quindi: due fine risultano conduttori

IN CONCLUSIONE ACQUA + IONI PUÒ ESSERE MODELLATA COME UNA RESISTENZA.

ALL'INTERFACCIA QUESTO MODELLO NON VALE PIÙ dobbiamo usare un altro modello per modellare il passaggio delle cariche tra liquido e metallo.



Nella realtà il modello più completo è il seguente



(Non ho ben capito il re' del condensatore)

(Esempio con il PBS)

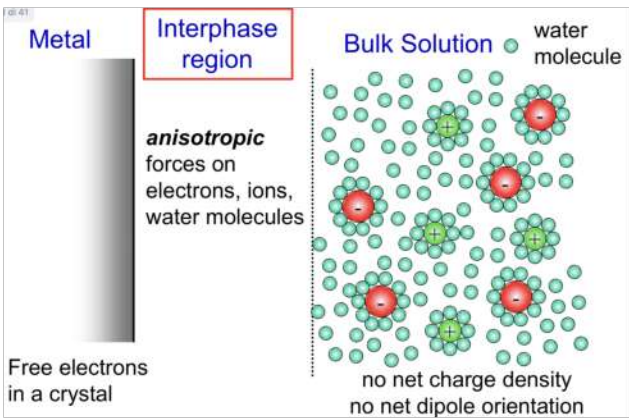
Tipo condensatore dato dalla capacità dell'acqua

Dielectric relaxation time = $R_{sol} \cdot C_{sol} = \rho \cdot \epsilon = 0.5ns$

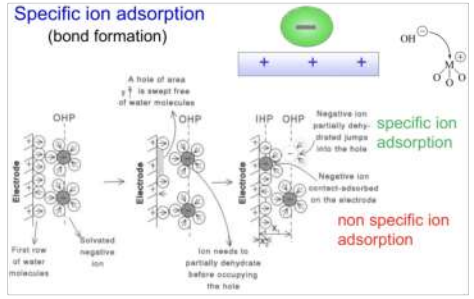
independent of geometry!

the bulk solution is a resistor up to $\approx 350MHz$ (for PBS)

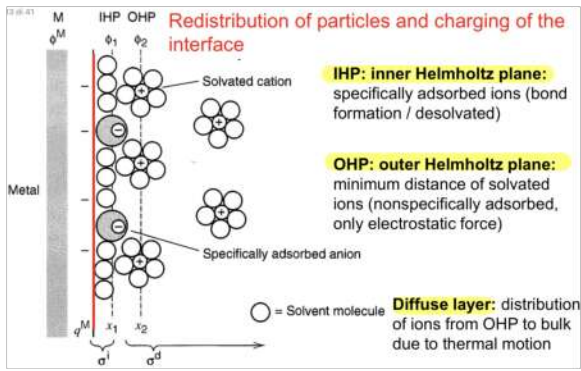
ALL'INTERFACCIA:



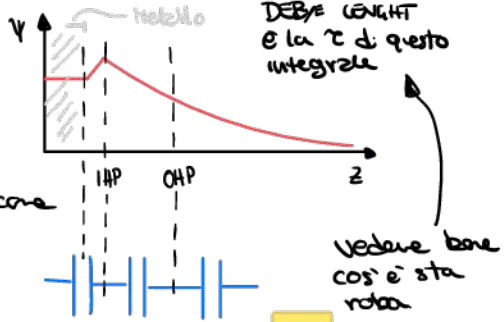
SE IL METALLO È CARICATO POSITIVAMENTE



Se cambio il potenziale del metallo la distribuzione spaziale di ioni nel liquido cambierà andando e stringersi tutte verso l'interfaccia o ad allargarsi



DENTRO IL LIQUIDO HO UN BUILT-IN, IL CAMPO ELETTRICO NELLO SPAZIO DEL LIQUIDO SARÀ:

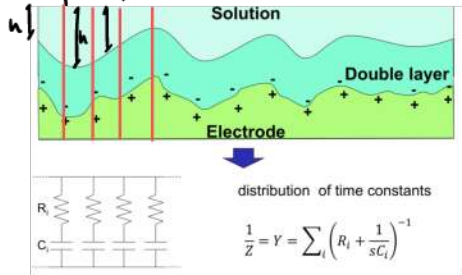


Questa distribuzione di carica può essere modellata con due condensatori. Ho 3 condensatori in serie facciamo la serie di condensatori e otteniamo che nel caso del PBS

$$C = 0,1 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$$

Tuttavia la Capacità può essere + grande di quella aspettata visto che gli elettrodi possono non essere lisci a livello atomico ma ci sia della rugosità che fa sì che l'area in contatto con il liquido sia maggiore.

Questo può portare anche ad una differenza nel modello, infatti

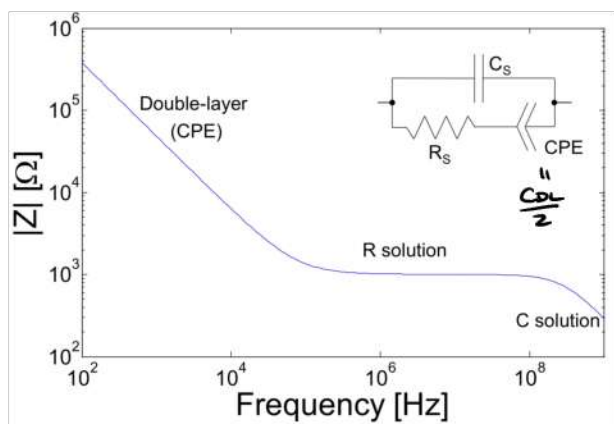


noi possiamo slicare il liquido e per ogni slice otteniamo R e C, tipicamente C è uguale per tutti ma R varia perché l'altezza della schiuma va e costante. Questa differenza di R risulterà in una variazione di elane costanti di tempo e quindi il totale ridotto del sistema non sarà più quello di un condensatore ma sarà diverso (varia la pendenza del guadagno e la fase)

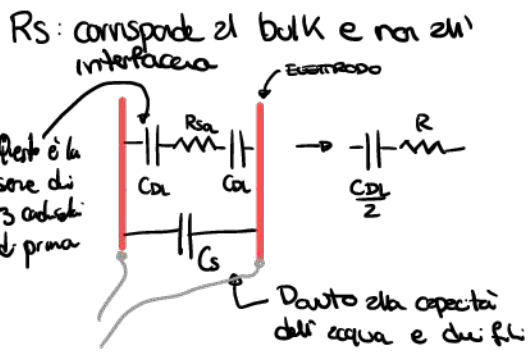
Per rendere questi casi nei modelli/calcoli matematici si usa la CPE (Constant Phase Element)

il circuito 2 piccoli segni dell'interfaccia è:

Se non abbiamo redox l'interfaccia non "assorbe" corrente ma c'è solo la carica? [?]

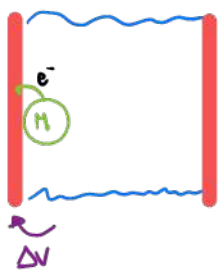


IMPORTANTE!!
QUESTO È IL MODELLO EQUIVALENTE DELL'INTERFACCIA.

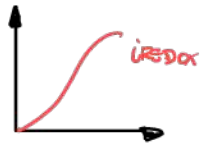


FARADAIC PROCESS

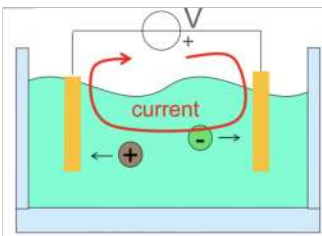
Ora abbiamo corrente che può correre attraverso l'interfaccia.



Se la differenza di potenziale ΔV tra molecola e elettrodo è abbastanza alta da far sì che ci sia uno scambio di elettroni allora abbiamo una Redox. Elemento da aggiungere nel modello

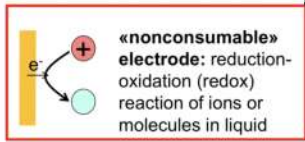
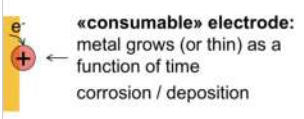


$i_{redox}(t)$ NON È LINEARE, NOI VOGLIAMO RENDERE LINEARE



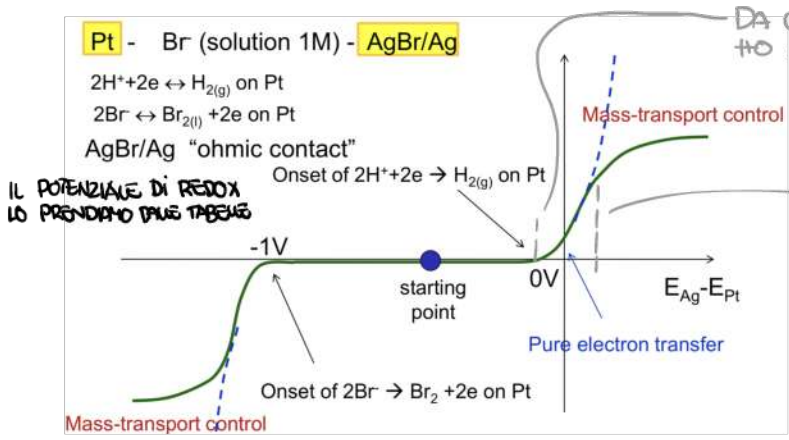
Ions move in the liquid
Electrons move in the electrodes
↓
electron transfer at the metal/liquid interface

Two main cases:



Tipicamente nei sistemi qui ma molto spesso c'è corrosione

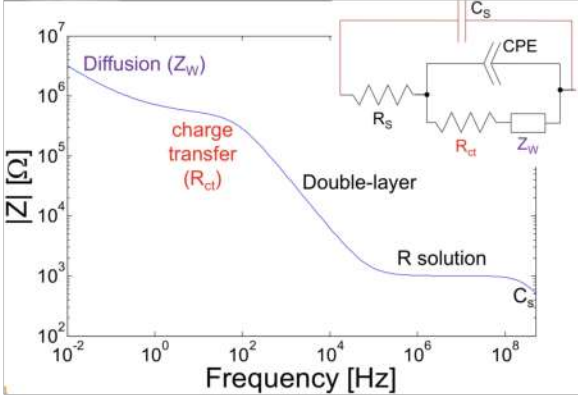
CARATTERISTICA TENSIONE CORRENTE NEL CASO DELLA REDOX



DA QUESTO PUNTO IN POI HO UNA REDOX.

Non ho più un esponenziale
 xè zd un certo pto zbbiano
 "frutto" gli elettrici delle
 molecole più vicine all'elettrodo
 e quindi ora ce molecole
 sono lontane ed è più
 difficile toglierle (elettrone
 (xè x di diffusione) hanno bisogno
 quelle del layer vicino in modo
 che ci sia spazio per le altre per
 arrivare)

CAPIAMO CHE LA CURVA NON È LINEARE,
 VOGLIAMO LINEARIZZARLA IN ALCUNI PUNTI
 il modello perciò sarà:



In parallelo al CPE mettiamo un
 resistore che è la linearizzazione della
 bas current pesa in un certo pto

$$R_{ct} = \left[\frac{2F}{2V} \right]^{-1}$$

Z_w è un termine aggiuntivo di mobilità
 (WARBURG IMPEDANCE) che serve a
 modellare l'umidità dell'impedenza a via
 via basse frequenze.

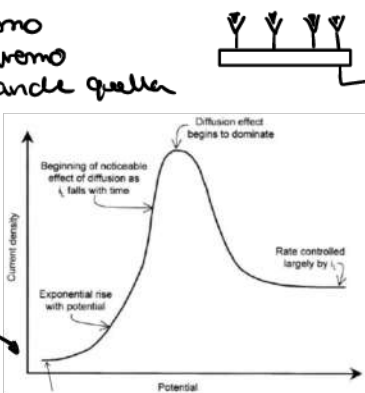
21.03.2021

2h

Dobbiamo usare potenziali bassi xè sono possiamo
 indurre reazioni redox (es. elettrolisi) e così avremo
 non solo la corrente data dal binding ma anche quella
 della redox

L'andamento della corrente nel sistema sarà:

Circa ϕ prima del potenziale
 di redox poi ho un piccolo poco dopo (sembra
 basso) che mi dà un errore di offset
 (indipendente dalla redox): Corrente di
 double layer.



MISURIAMO
 LA CORRENTE
 CHE SARA' DIPENDENTE
 DAL BINDING



Qui la corrente non è zero perché (NON HO CAPITO 16.52h)

Il perché dell'aumento della corrente a campana è sempre dovuto alla distribuzione di ceriche e alla diffusione.

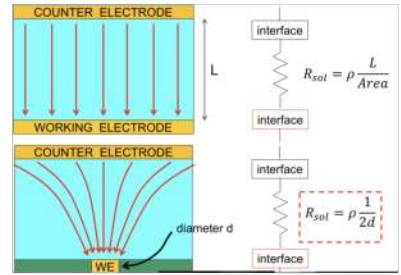
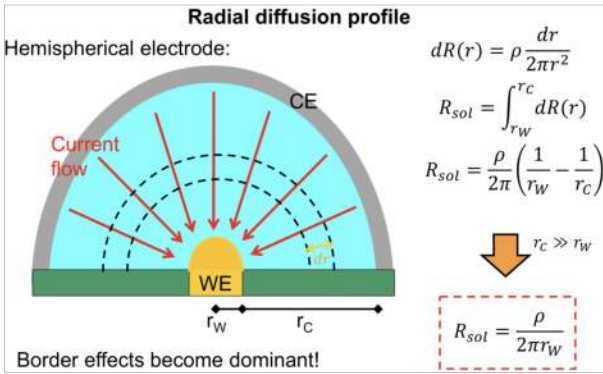
Tutti questi discorsi valgono per elettrodi molto grandi (non consideriamo gli effetti di bordo)

Cosa succede se abbiamo degli elettrodi molto piccoli?

Vogliamo andare molto nel piccolo per poter misurare cose più piccole (cellule)

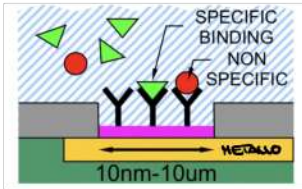
Intenzionalmente elettrodo piccolo relativamente alla distanza di diffusione delle molecole nel fluido

Possiamo prendere ceriche anche dai lati dell'elettrodo, c'è la base perché abbiamo più corrente del previsto. Questo fatto "fa cambiare" tutti i dati visti prima.



Ad esempio notiamo che la formula di R_{sol} cambia non dipende più dell'area ma del diametro.

PER TUTTO QUELLO DETTO

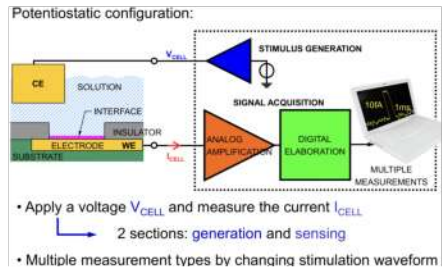


Noi vogliamo misurare in evento all'interfaccia, un modo per farlo è mettere un elemento che fa redox nel liquido se ho lì zeri questi fanno da "blocco" per gli ioni della redox e così c'è la corrente.

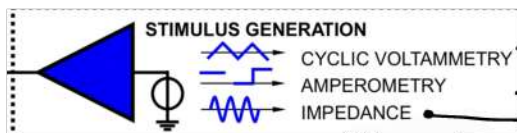
Se ho dell'acqua o altre molecole che possono fare la redox ho una corrente spuria in più che legge e zeri non va bene (credo che noi sappiamo quante molecole redox mettiamo).

PER CONTROLLARE QUESTO ESISTONO 2 TECNICHE

- POTENZIOSTATICA
- CORRENTOSTATICA?

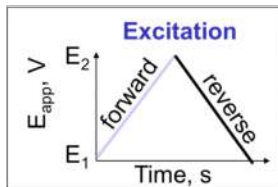


ESISTONO DIVERSE TIPOLOGIE DI STIMOLO (NEI NO STUDIAMO SOLO 3)



GRANDI SEGNALE - NON LINEARE
 PICCOLI SEGNALE - LINEARIZZABILE

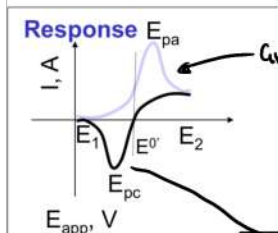
CYCLIC VOLTAMMETRY : perché è periodico



• Triangular wave: slope = scan rate

• Important parameters:

- E_{pa} and E_{pc}
- i_{pc} and i_{ac}
- $E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$
- $\Delta E = |E_{pa} - E_{pc}|$



↳ Questo appena visto prima

- E^0 formal redox potential
- detection of chemical reactions
- evaluation of electron transfer kinetics and diffusion rates

Imponiamo una tensione triangolare

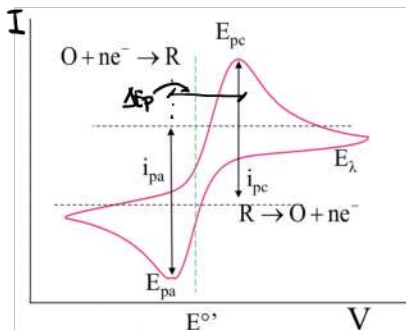
Per l'elettrodo noi usiamo l'oro

Se abbiamo una redox abbiamo il picco di corrente altrimenti la corrente è 0.

Ogni redox ha il suo picco. Perché ogni redox ha la sua redox potential

grafico dell'ossidazione

Otteniamo un grafico del tipo



$i_{pa} = i_{pc}$ for a reversible system

$$i_p = 0.4463 n F A C (DSR n q / kT)^{1/2}$$

n : n. of electrons

F : Faraday's constant (96485 C/mol)

A : electrode area;

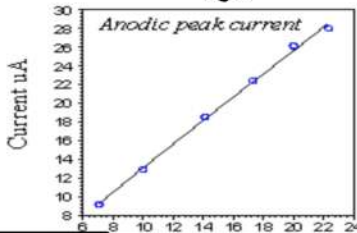
C : concentration (mol/litre)

D : diffusion coefficient (cm²/sec).

SR: scan rate $dv(mV)/dt$

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 59 mV$$

è la distanza tra i 2 picchi se la reazione è reversibile



Se la reazione è reversibile i 2 picchi hanno la stessa ampiezza, altrimenti no.

Se ho più reazioni una dietro l'altra il picco della seconda parte del plotto è a un livello della prima.

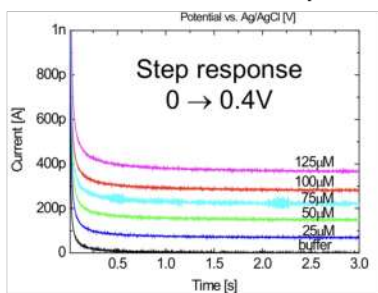
Vogliamo più corrente nei 1 letter di corrente sono rincarosi, o zanzano gli elettrodi: o lo Scan Rate.

C'è un limite a questo: la corrente di redox dipende da \sqrt{SR} ma anche la corrente di Double layer che per noi è solo rumore cresce come SR e quindi per noi è molto male

• AMPEROMETRY

Misuriamo la corrente nel tempo. Imporziamo una tensione dc e misuriamo la corrente nel tempo.

Oppure usiamo un step di tensione allora la risposta sarà



Dove il primo picco è dovuto dalla carica del condensatore double layer.

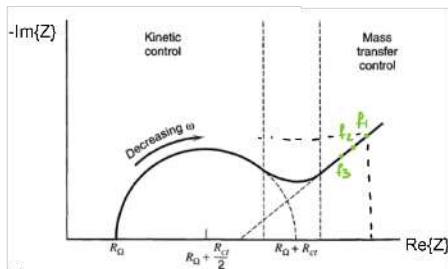
• IMPEDENCE SENSING

Noi applichiamo un segnale sinusoidale in un elettrodo e misuriamo la corrente dal quale il rapporto corrente tensione mi darà l'impedenza.

Possò anche variaz la frequenza del segnale che stiamo imponendo, e studiamo l'impedenza a diverse frequenze (questo è chiamato Spettroscopia d'impedenza)

Capiamo che in frequenza abbiamo una variazione di C_{dl} e R_{ct} e tramite questa variazione noi vogliamo capire cosa è successo all'interfaccia.

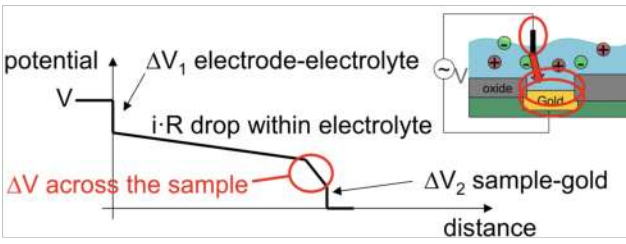
il grafico dell'impedenza può anche essere fatto nel Cole-Cole plot che per ogni frequenza dà il valore della parte reale e immaginaria.



2 electrode measurement

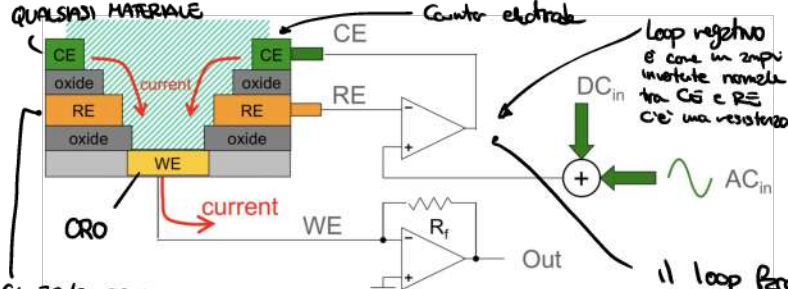
Qual'è la vera caduta di tensione all'interfaccia?

Cioè io ho il working electrode e la maggior parte della caduta è data dalla molecola di redox poi però il counter electrode (l'elettrodo per chiudere il circuito) è molto lontano e quindi ho altre cadute di tensione



Non imponiamo V ma vogliamo controllare ΔV cioè la tensione di cella nel sample x.e. e la corrente che triggera la redox

Per risolvere è questo scavalco aggiungiamo un 3° elettrodo per misurare la tensione ΔV . **IMPORANTE**. nessuna corrente scorre nel 3° elettrodo se c'è nel pin ad alta impedenza dell'OP-AMP.



Vogliamo $V_{RE} = V_{SUTATA}$ DA NOI

Il Reference electrode (il 3° elettrodo) deve essere più vicino possibile alla zona di lavoro vicino al Working Electrode

SWISS/SWISS CIRCUIT (perché due zone in interfaccia stabile)

il loop pari si che V sia uguale a V_t e così posso controllare la tensione

Si chiama potenziostatico

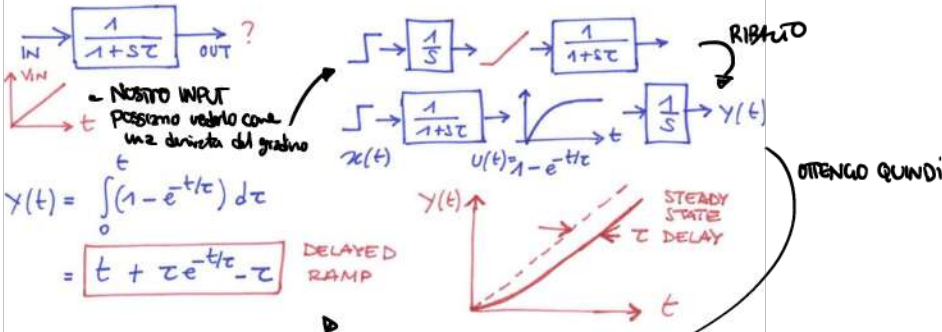
QUALI DEVONO ESSERE LE BANDI DEI 2 OP-AMP?

Per ciò dipende dalla f con cui eccitiamo il sistema (ma è così facile, pensiamo al segnale triangolare)

C'è un modo facile per sapere la banda

In order to design the circuit for CV measurement, the response of a 1st order system to a ramp input waveform is needed:

il nostro sistema del 1° ordine



Allora se noi abbiamo il max errore di tensione $\Delta V_e = \tau \cdot SR$
 ricavo τ e la banda pi sarà

SR = scan rate

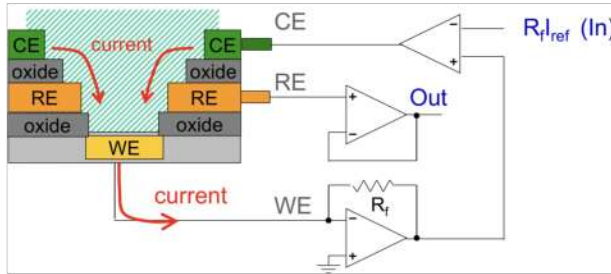
$$BW = \frac{1}{2\pi\tau} = \frac{SR}{2\pi \cdot \Delta V_e}$$



29.03.2021

2h

Queste zelle si possono fare anche impando la corrente e misurando la tensione. Questi si chiamano galvanostatici.

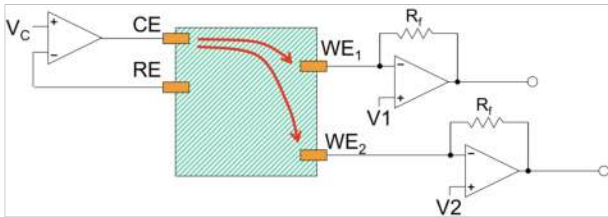


ha un corretto di forza molto simile

SCARSO USATO X NOI

TORNIAMO AL POTENZIOSTAT

Possiamo avere due diversi Working electrodes (es 2) e biasarli a 2 diverse tensioni in modo che la caduta di tensione all'interfaccia sia diversa tra i 2 Working Electrodes. (Nota che abbiamo sempre 1 solo Control e Reference electrode)

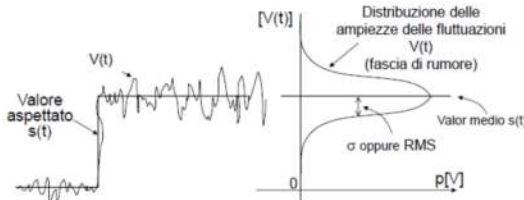


MISURAZIONE DELLA CORRENTE SUL WE

Tipicamente abbiamo segnali molto piccoli → il rumore dell'amplificatore diventa importante
 SNR diventa di vitale importanza

Any electrical signal is affected by **noise** and disturbances:
 $v(t) = signal(t) + n(t) + d(t)$

Noise is a **random fluctuation** of the electrical variables due to the physical behaviour of *internal* components of the circuit



Random process characterized by **standard deviation** $\sigma = RMS$

$n(t)$ RUMORE: INTERNO AL SISTEMA (CONTROLLI)

$d(t)$: DISTURBI CHE VENGONO DA FUORI

Considera solo rumore stazionario

He pi spiegato il rumore bianco e i 1/f

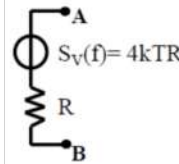
Rumore termico nei resistori

Più alta è la resistenza maggiore è il rumore ai suoi capi.

L'unità di misura della densità spettrale di potenza è

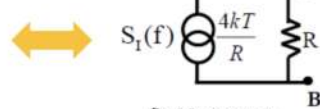
$$\frac{V}{\sqrt{\text{Hz}}} \text{ oppure } \frac{A}{\sqrt{\text{Hz}}}$$

Thermal (Johnson) noise: due to the random motion of e⁻



VOLTAGE EQ

- white (flat) power spectrum
- independent of how the resistor is biased
- a 1kΩ resistor generates 4nV/√Hz at 25°C



CURRENT EQ.

Shot Noise

è un rumore ce c'è sempre quando ho una barriera di potenziale $S_{Ic} = 2 \cdot q \cdot I_c$

Rumore negli OP-AMP

Idealmente senza rumore → realmente ci sarà rumore in uscita.

Per caratterizzare il rumore negli op-amp prendiamo il rumore d'uscita, lo dividiamo per il guadagno dell'OP-AMP e lo riportiamo come rumore in ingresso dell'OP-AMP.

Facciamo questo se così possiamo comparare il segnale e il rumore prima dell'OP-AMP in modo da capire se Segnale > Rumore.

NOI VOGLIAMO MISURARE LA CORRENTE E AVERE IN USCITA UNA TENSIONE (vogliamo anche massimizzare l'SNR)

• Studiamo tutti i modi per fare questo

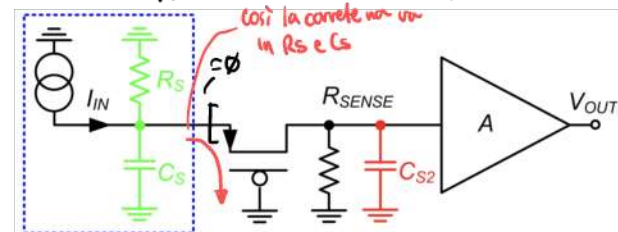
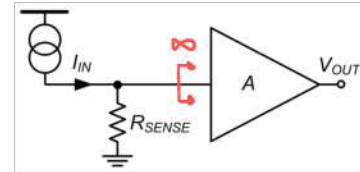
PASSIVE CURRENT CONVERSION (LEGGI DI OHM)

La conversione è estremamente lineare, però ci sono molti lati negativi.

Se I è molto grande R_{sense} non può essere molto grande (?)

Se I è molto piccolo e oltre a R_{sense} ho degli elementi parassiti (tipo altre R o C) allora ho degli effetti nella conversione da I a V

Per disaccoppiare l'impedenza di input e R_{sense} si usa un cascode (current buffer)



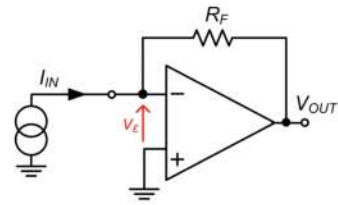
così la corrente non va in R_S e C_S

l'impedenza d'ingresso del transistor è $\frac{1}{g_m}$ che dipende dalla corrente

TRANSMIMPEDANCE AMPLIFIER

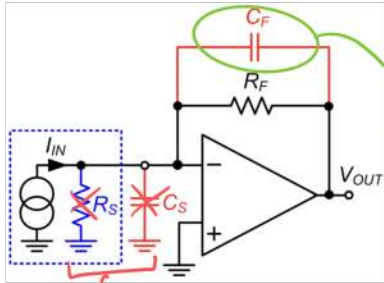
$$V_e \rightarrow \emptyset$$

Usiamo sempre un transistorino ma usiamo 2nde componenti attivi, inoltre con il feedback eliminiamo l'impetto di componenti passivi.



The feedback tends to cancel the control voltage (V_{error}) keeping the input at virtual ground, the whole current must flow in R_F .

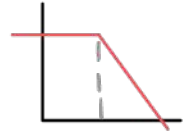
$$V_{OUT} = -I_{IN} \cdot R_F$$



Questa parò rimane e ci sarà sempre per via dei piedini ecc...

$$C_F = 0,2 \text{ pF}$$

L'effetto di C_F è quello di limitare la banda dell'amplificatore



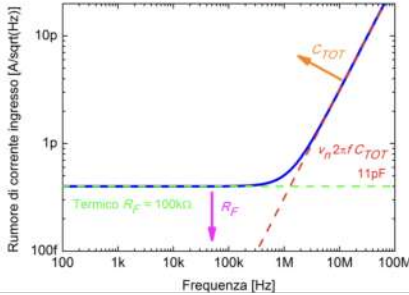
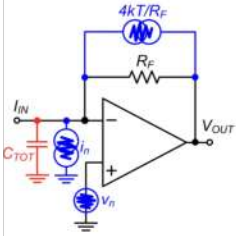
Queste vengono eliminate

COSA SUCCEDDE PER IL RUMORE?

Input-referred total current noise:

$$S_i(f) = \sqrt{i_n^2 + \frac{4kT}{R_F} + \left(\frac{v_n}{R_F}\right)^2 + (v_n 2\pi f C_{TOT})^2}$$

Minimize C_S !



i_n : RUMORE DI CORRENTE DEL OP-AMP

$4kT/R_F$: RUMORE DI R_F

il rumore v_n ha 2 componenti, una variazione di tensione virtuale = corrente che scade in C_{TOT} e quindi la prima componente è

$$(v_n 2\pi f C_{TOT})^2$$

l'altra è un rumore di corrente su R_F dato da v_n ed è:

$$\left(\frac{v_n}{R_F}\right)^2$$

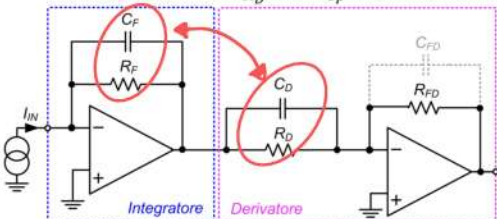
Seppiamo che il Guadagno $\propto R_F \rightarrow$ vorremo R_F grande, ma se tanto R_F vedo 2 diminuire la banda dell'amplificatore che si ora con C_F .

Ricordiamoci che la banda è $1/2\pi R_F C_F$

VUOLIAMO ESTENDERE LA BANDA E TENERE IL RUMORE BASSO

Introduce a zero that cancels the pole: $R_F C_F = R_D C_D$

$$V_{OUT} = R_{FD} \frac{R_F}{R_D} = R_{FD} \frac{C_D}{C_F}$$



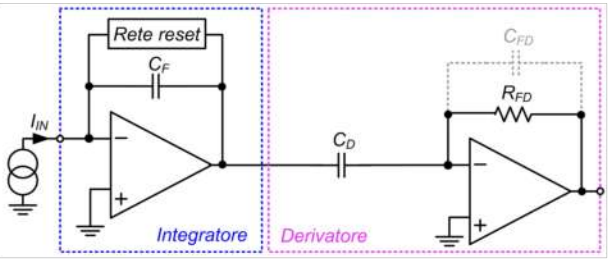
Pro: extends the bandwidth, preserving the lower noise

Con: manual tuning of the zero (due to parasitics)

- Nel primo stage metto R_F molto grande \rightarrow la banda si diminuisce
- Metto uno stage 2 con un zero per cancellare il polo di prima
- Nel secondo stage metto R_F piccolo \rightarrow diminuisco di poco la banda \rightarrow il rumore di C_{FD} è regolabile rispetto al rumore del primo stadio visto che R_F era molto grande

Laici negativi = Nella realtà io non so G quindi devo avere un derivatore con T variabile per beccare quello del primo stadio

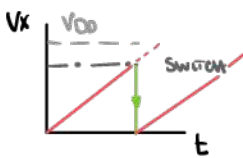
Dato che Rf dell'integratore è l'elemento da poter rince lo togliamo, ci serve una rete di reset altrimenti il OP-AMP saturere subito solo con un condensatore in feedback.



Switch periodically closed to discharge the capacitor:

Limits the maximum measurement time

For example: $I_{IN-DC} = 1nA$, $C_F = 1pF \rightarrow (5V) T_{MAX} = 5ms$

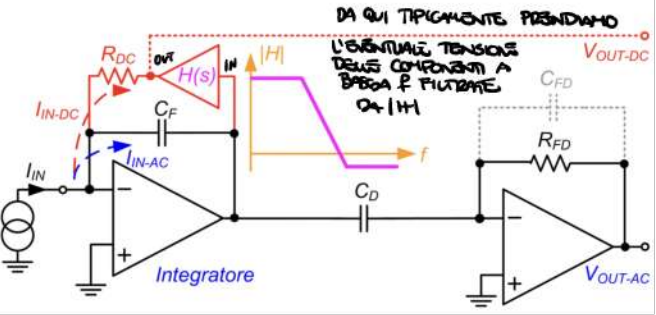


La tensione sale a rampa

Questo fatto di resettare ogni test fa sì che questo metodo non sia adatto in tutte le situazioni (x temperature)

Per risolvere questi problemi facciamo un reset continuo

To achieve continuous-time operation: additional feedback branch $H(s)$ with high gain at low frequency:

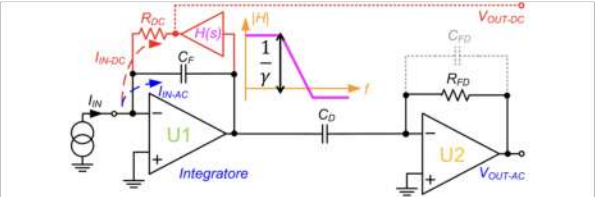


A basse frequenze la corrente va nel branch di $H(s)$ così togliamo le componenti a bassa frequenza

ad alta frequenza la corrente scorrerà in C_F e il circuito si comporterà come al solito

(Erano le componenti continue a far salire la tensione a rampa e a far saturare l'OP-AMP)

$H(s)$ aggiunge rumore? Sì, ogni componente attivo in feedback aggiunge rumore

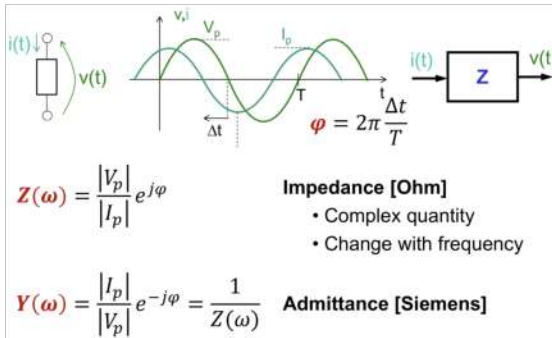


- $U2$ infinitesima rispetto a $U1$ quindi non la consideriamo
- $H(s)$, la possiamo diminuire molto aumentando R_{DC} .

Attenuation of $U2$ noise, but additional noise of $R_{DC}-H(s)$

$$S_i(f) = \underbrace{v_1^2 + \left(\frac{v_1}{R_{DC}}\right)^2 + (v_1 2\pi f C_F)^2}_{U1} + \underbrace{\left(v_2^2 + \left(\frac{v_2}{R_{FD}}\right)^2 + (v_2 2\pi f C_D)^2 + \frac{4kT}{R_{FD}}\right) \left(\frac{C_F}{C_D}\right)^2}_{U2} + \underbrace{\frac{4kT}{R_{DC}} + \left(\frac{v_3}{\gamma R_{DC}}\right)^2}_{H(s)}$$

MISURA DELL' IMPEDENZA



Noi avremo correnti molto piccole e perciò avremo impedenze molto elevate.
 Noi studieremo modi per misurare queste grandi impedenze

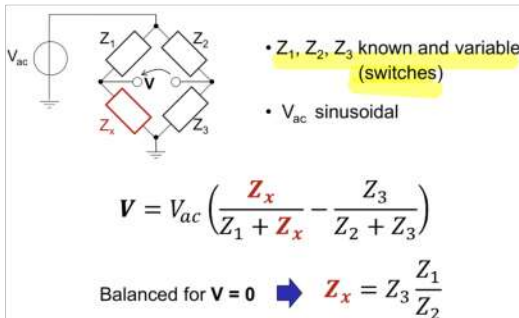
COSA IMPORTANTE: l'impedenza dei microcampioni scelta con la dimensione, ma gli elementi parassiti nel sezino perciò diventano estremamente importanti

TIPICI DI TECNICHE PER MISURARE L'IMPEDENZA

Balancing Bridge

Noi misuriamo V al centro del ponte

Tipicamente facciamo sì che $V=0$ in modo che sappiamo il valore di Z_x della formula



Pros:

- Good accuracy (no active stages, depends on the accuracy of the reference impedances)
- Voltage reader operates always with $V=0V$
- Common mode rejection (se V_{ac} fluttua a noi non interessa xè noi facciamo la differenza)

Cons:

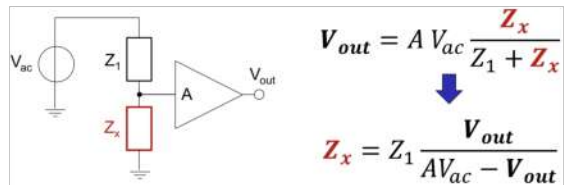
- Requires several switches
 - Slow balancing routine
 - Not very convenient for spectroscopy
 - Inoltre dobbiamo sapere prima che impedenza andiamo cercando (resistenza/condensatore/induttore)
- Questo conto si risolve al primo

Retometric: Half-Bridge

è solo un partitore di tensione

ATTENZIONE: La scelta di Z_1 deve essere fatta considerando qualcosa (tipo e ordine di grandezza di Z_x)

Se Z_1 è troppo grande il nodo in pratica va a 0 e al contrario va a V_{ac} e così perdo di informazione.



- V_{out} depends on the impedance ratio
- Z_1 has to be accurate:

$Z_x \gg Z_1: AV_{ac} - V_{out} \approx 0$
 $Z_x \ll Z_1: V_{out} \approx 0$

$\Rightarrow Z_1 \sim Z_x$ Difficult matching

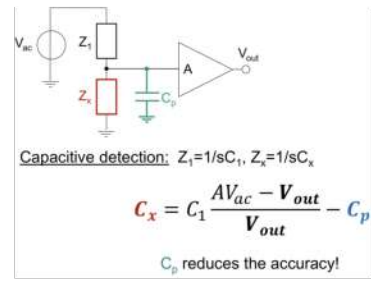
Un altro limite di questa topologia è dato dagli elementi parassiti

Un condensatore sul parallelo da errori, la quantità dell'error dipende dal tipo di impedenza di Z_x
 Se Z_x è un condensatore allora \rightarrow
 Al contrario se Z_x è una resistenza otteniamo

$$V_{out} = AV_{ac} \frac{R_x}{R_x + R_1} \frac{1}{1 + sC_p R_x || R_1}$$

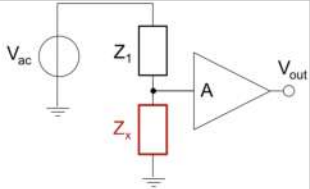
Quindi se $\omega \ll 1/C_p R_x || R_1$ allora $R_x \approx R_1 \frac{V_{out}}{AV_{ac} - V_{out}}$

Per $\omega \gg 1/C_p R_x || R_1$ R_1 è cortocircuitata da C_p .



Pros:

- Independent of the impedance
- One terminal can be grounded



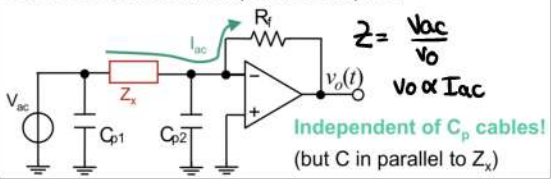
Cons:

- Z_1 must match Z_x
- Need for phase-sensitive detection for complex impedance
- Critical impact of stray capacitance:
 - Limits the bandwidth in resistive sensing
 - Reduces the accuracy in capacitive sensing

CURRENT SENSING

Come possiamo ridurre gli effetti parassiti tra l'impedenza e l'AMP?
 Il modo migliore di eliminarli è quello di usare una terra virtuale.

Current readout: transimpedance amplifier

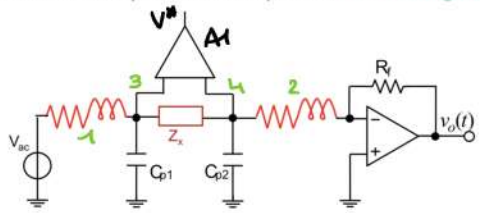


In pratica zero i condensatori parassiti grazie alla terra virtuale, infatti questi avranno sempre tensione zero capi nulla

Abbiamo cancellato C_{p1} e C_{p2} .
 Con questa tecnica però non eliminiamo gli elementi parassiti messi in parallelo a Z_x

UN ALTRO TIPO DI ELEMENTI PARASSITI È DOWTO ALLE CONNESSIONI E AI FILI

In macro-scale setups often it is adopted the 4-wire configuration



$L = 100nH$, $f = 10MHz \rightarrow R = 6.2\Omega$
 Nanoscale $I_{max} \approx$ tens of μA (Joule dissipation)
 \rightarrow typically inductances are negligible

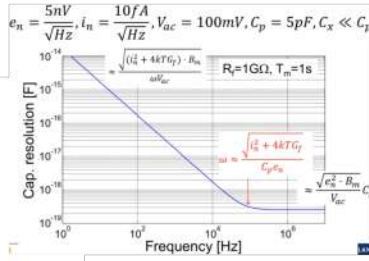
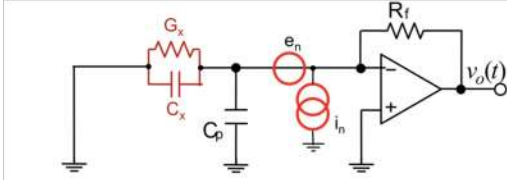
Abbiamo una struttura a 4 fili in cui i fili 3 e 4 non passa corrente. Uso quel ampl. A2 per misurare la tensione ai capi di Z_x , la tensione non sarà affetta da effetti parassiti perché $i=0$ nei cavi.

Per ricavare Z_x facendo $Z_x = \frac{V^*}{I/R_f}$

con V^* tensione ai capi di Z_x

Tuttavia se Z_x è abbastanza elevato possiamo non considerare questi elementi parassiti.

Calcolo del rumore del current sensing



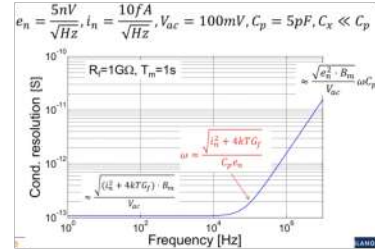
Simula l'andamento della SNR, notiamo che dopo un certo valore di frequenza non ha senso andare la frequenza

$$S_i = \bar{i}_n^2 + 4kT(G_f + G_x) + \bar{e}_n^2 \omega^2 (C_x + C_p)^2 + \bar{e}_n^2 (G_x + G_f)^2$$

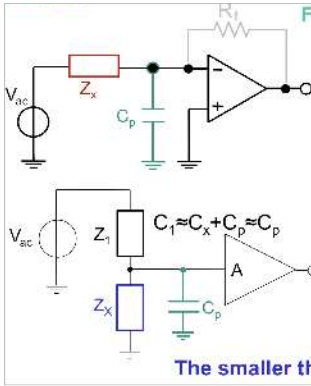
$$V_{ac} \Delta G_{xmin} = \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta G_{xmin} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{V_{ac}}$$

$$V_{ac} \omega \Delta C_{xmin} = \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta C_{xmin} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{\omega V_{ac}}$$

Simula il rumore della corrente di input



COMPARIAMO LE RISOLUZIONI



Feedback does NOT alter SNR:

$$\Delta C_x \approx \frac{\sqrt{e_n^2 \cdot B_m}}{V_{ac}} C_p$$

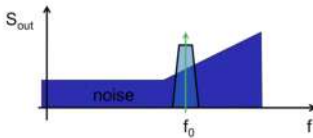
$$\Delta C_x \approx \frac{\sqrt{e_n^2 \cdot B_m}}{V_{ac}} \ll C_p$$

The smaller the C_p the better the resolution

Vedere slide per altre comparazioni

Dopo aver estratto la corrente dobbiamo estrarre il segnale per capire le diverse componenti?

In both cases a sinusoidal excitation at f_0 is applied:



A band-pass filter is required to maximize the SNR:

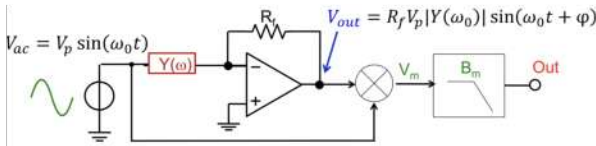
- Very selective ($T_m=1s, f_0=1MHz \rightarrow \Delta f/f_0=10^{-6}$)
- Variable frequency (large spectrum sub-Hz - MHz)

l'informazione di fase vogliamo anche ridurre il rumore. Noi vogliamo tenere solo f_0 e una piccola banda attorno a f_0 .

Se facciamo l'impedance spectroscopy f_0 cambia da 1Hz a 10MHz e quindi il passabanda dovrebbe essere variabile.

Estremamente difficile fare ciò.

Per fare questo filtraggio e recuperare l'informazione di fase usiamo un Lock-in (stessa cosa vista ad RF)



$$V_m = V_{ac}(t) \times V_{out}(t) = R_f V_p^2 |Y(\omega_0)| \sin(\omega_0 t) \times \sin(\omega_0 t + \varphi)$$

$$V_m = R_f V_p^2 |Y(\omega_0)| \frac{\cos(\varphi) - \cos(2\omega_0 t + \varphi)}{2}$$

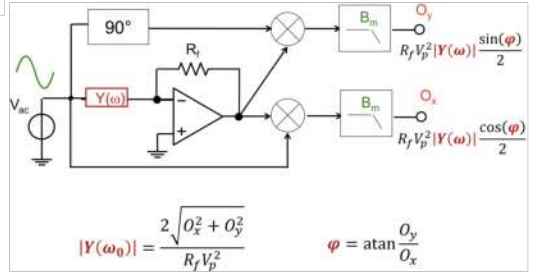
$$\text{Out} = R_f V_p^2 |Y(\omega_0)| \frac{\cos(\varphi)}{2}$$

Out DC signal corresponds to the admittance (in-phase)

The averaging time is set by the low-pass filter

Abbiamo in output un valore dipendente dalle differenze di fase delle 2 componenti

Con questo ricevo la parte reale, cioè la componente orizzontale (parcau cos phi)

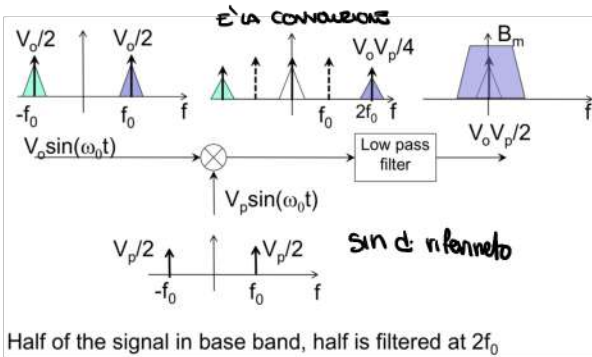


$$|Y(\omega_0)| = \frac{2 \sqrt{O_x^2 + O_y^2}}{R_f V_p^2}$$

$$\varphi = \text{atan} \frac{O_y}{O_x}$$

Se volessi anche la parte immaginaria allora

E per questo riguarda il rumore e il filtro passa banda cosa ho fatto?



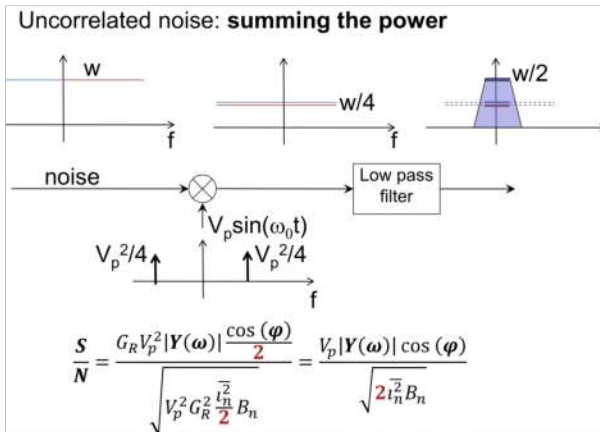
In pratica la convoluzione shifta lo spettro d'ingresso tra f_0 e $-f_0$ e poi somma.

Poi noi mettiamo un passabasso e prendo tutto quello attorno a ϕ

In pratica ho creato un passabanda attorno a f_0 con un passabasso

La cosa bella è che questo filtro è sempre in lock visto che se varia la f_m cambia anche la f_{ret} e quindi il filtro si zittoschetta

Per il rumore abbiamo (nel caso di rumore bianco)



Si possono usare altre altri approcci: al contrario di quello varando la frequenza della sinusoida. Time domain approach

Studio tutto lo spettro della frequenza in un colpo solo. Credo si faccia applicando un segnale che ha tutte le frequenze e poi estraggo lo spettro

Vantaggio: Veloce, perché faccio solo una volta

Svantaggio: Forse questo rende molto più difficile il circuito

Alternative **time-domain approach**:

- Apply a non-monochromatic stimulation V_{ac} (white noise...)
- A/D conversion of the transimpedance output
- Calculate the DFT of the current signal

$$Y(\omega_i) = \frac{DFT[I_{out}]_i}{DFT[V_{ac}]_i} \quad N_c \text{ points in frequency} \\ \Delta f = f_s/N_c$$

$$f_{max} = 1\text{MHz}, f_{min} = 1\text{Hz} \rightarrow f_s = 5\text{MHz}, N_c \approx 10\text{MSamples}$$

Ci sono poi altre tecniche come quelle di risonanza ecc.. (non le ha spiegate ha detto di vedere le slide) ha detto che si utilizzano solo quando l'impedenza è solo un condensatore o un induttore.

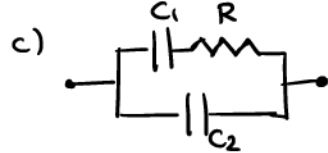
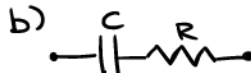
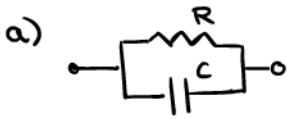
07.06.2021

2h

ESERCIZI

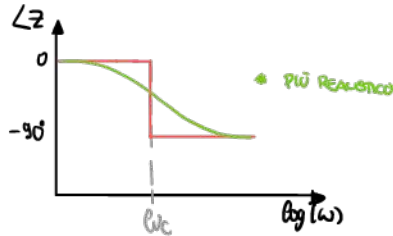
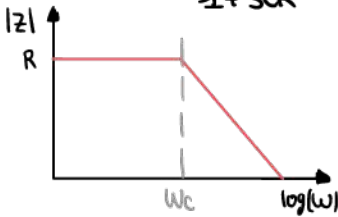
① IMPEDANCE MODELS AND PLOT

Disegnare sia Bode che Cole-Cole plot di 3 modelli.



a) INIZIAMO CON BODE

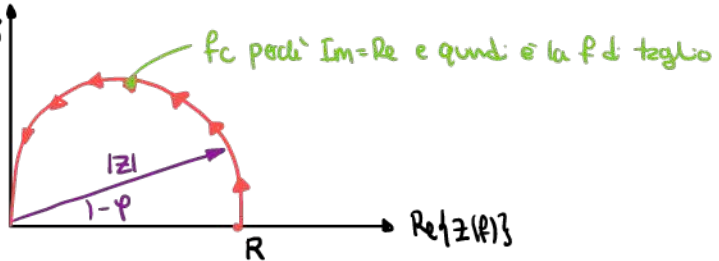
$$Z = R // \frac{1}{sC} = \frac{R}{1 + sCR}$$



(importante se possiamo vedere $C_a = C_b$ $R = R_{sa}$ e $C_L = C_p$)

> COLE-COLE PLOT

il meno è importante $-\text{Im}\{Z(f)\}$



Ricaviamo parte reale e immaginaria

$$\frac{R}{1+SCR} = \frac{R}{1+SCR} \cdot \frac{(1-SCR)}{(1-SCR)} = \frac{R(1-j2\pi fRC)}{1+(wCR)^2} = \underbrace{\frac{R}{1+(wCR)^2}}_{Re} - j \underbrace{\frac{wCR^2}{1+(wCR)^2}}_{Im}$$

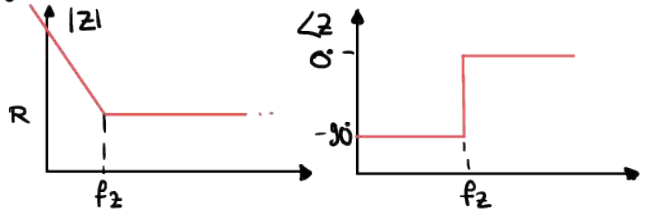
Per $f=0$ ho solo parte reale (R)

Per $f \rightarrow \infty$ $Z \rightarrow \emptyset$ e ho solo parte immaginaria

b)

$$Z = R + \frac{1}{sC} = \frac{1+SCR}{sC}$$

BODE

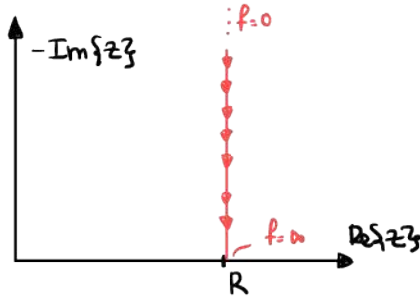


> COE-COE PLOT

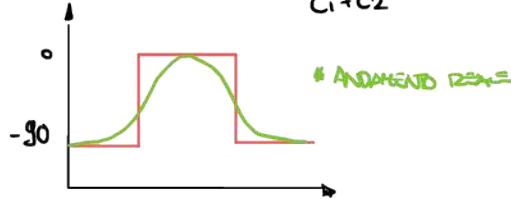
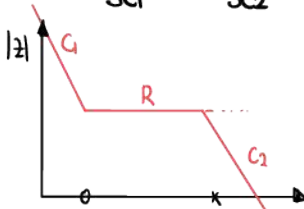
$$Z = R - j \frac{1}{wC}$$

$$f=0 : |Z| \rightarrow \infty$$

$$f \rightarrow \infty : |Z| \rightarrow \emptyset$$



c) $Z = \frac{1+SC_1R}{SC_1} \cdot \frac{1}{SC_2} = \frac{1+SCR}{s(C_1+C_2)} \cdot \frac{1}{1+SR \frac{C_1 \cdot C_2}{C_1+C_2}}$ $C_1 > C_2$



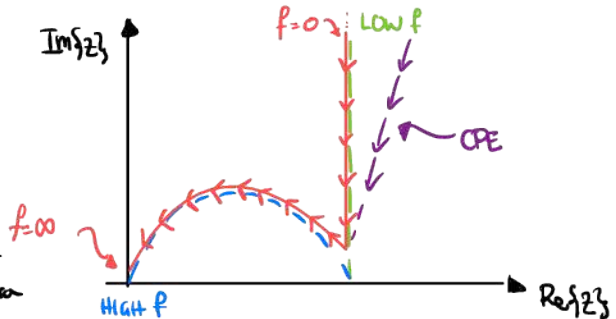
In tutti i casi in cui vogliamo misurare la resistenza di soluzione di un campione biologico è dato lavorare da una finestra di frequenza dove abbiamo solo la resistenza (resistive plateau)

> COE-COE PLOT (alla fine è nyquist solo con -Im sull'asse)

Non ricaviamo più Re e Im, risulta complesso. Lo costruiamo come abbiamo fatto con bode

il coe-coe plot è una combinazione dei 2 grafici visti prima

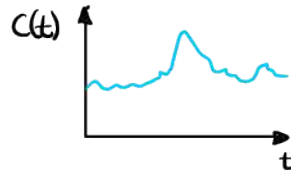
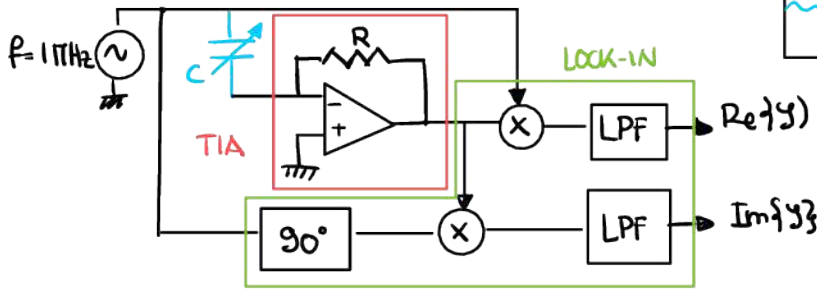
Nel caso di condensatore ideale la curva è verticale mentre se abbiamo un CPE, constant phase element allora la linea è tiltata a destra



ESERCIZIO 2

IMPEDENZA APPARENTE

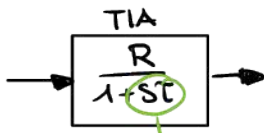
LOCK-IN DETECTOR, C cambia continuamente



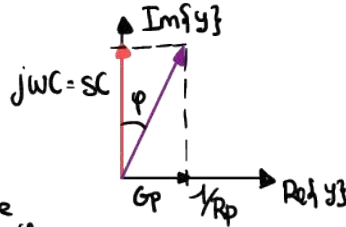
se $C = 1 \text{ pF}$
in teoria $\text{Re}\{y\} = 0$

Trovare la banda del TIA (Trans Impedance Amplifier) che da una resistenza parallela apparente $R_p > 16 \text{ M}\Omega$

Cioè nella realtà il TIA ha una sua banda che fa sì che C sia una resistenza apparente e da quindi $\text{Re}\{y\} \neq 0$



$$BW = \frac{1}{2\pi T} \rightarrow \text{Phase Shift } \varphi$$



L'ammettenza $G_p = \frac{1}{R_p} = \frac{1}{16 \text{ M}\Omega} = 62,5 \text{ nS}$ ammettenza massima

Ricaviamo φ grazie a G_p e $|Y|$

$$|Y| = |j2\pi f C| = 2\pi \cdot 1 \text{ MHz} \cdot 1 \text{ pF} = 6,2 \mu\text{S}$$

$$G_p = |Y| \cdot \sin(\varphi) \rightarrow \varphi = \arcsin\left(\frac{G_p}{|Y|}\right) = 9,57^\circ$$

• Ricaviamo L'FDT del TIA

$$H(s)|_{\text{TIA}} = \frac{R}{1+sT} = \frac{R}{1+j2\pi f T}$$

$$\angle H(f=1 \text{ MHz}) \approx 9,57^\circ$$

$$= \arctan\left(\frac{f}{f_p}\right) = \arctan\left(\frac{1 \text{ MHz}}{f_p}\right) = 9,57^\circ$$

E QUINDI

$$f_p = 10,0 \text{ MHz}$$

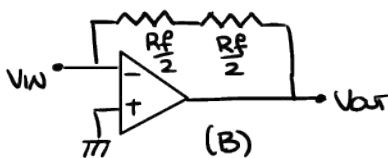
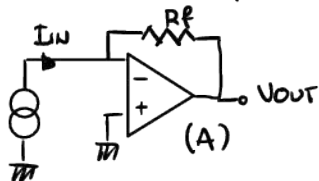
Dobbiamo quindi avere un'impedante zbroia banda 10 volte quella del segnale



ESERCIZIO 4

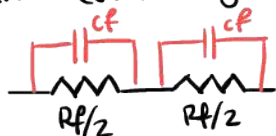
MISURAZIONE DI CORRENTE: BANDWIDTH EXTENSION

Cerchiamo un modo per aumentare la banda del trasimpedante amplifier



Confrontiamo i 2 schemi, perché B è meglio?

Il vantaggio è l'impetto della capacità parassita di tracciamento in parallelo alla resistenza, infatti con un singolo resistore abbiamo solo C_f in parallelo, ma nel caso di B abbiamo



$$\text{L'impedanza è } -2 \cdot \frac{\frac{R_F}{2}}{1 + sC_f \cdot \frac{R_F}{2}} = -\frac{R_F}{1 + sC_f \cdot \frac{R_F}{2}}$$

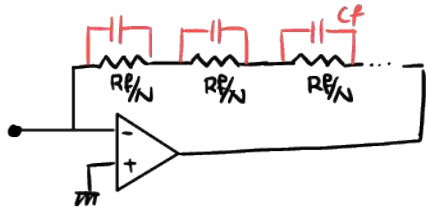
$$\text{mentre nel caso A abbiamo di } Z = -\frac{R_F}{1 + sC_f R_F}$$

Abbiamo lo stesso guadagno in continua R_F ma:

Notiamo che T_B è $\frac{1}{2} T_A$ e quindi la banda di B è 2 volte maggiore di quella di A.

$$BWB = 2 \cdot BWA$$

ESTENDIAMO QUESTO A N-RESISTORI



$$V_{OUT} = -\frac{R_F}{\left(1 + sC_f \cdot \frac{R_F}{N}\right)}$$

Aumentiamo la banda di N

Tuttavia questa tecnica funziona solo per N piccoli se è un problema di matching, infatti questo risultato lo abbiamo solo se $C_{F1} = C_{F2} = C_{F3} \dots$ ed è molto difficile fare in modo che le capacità parassite siano uguali in tutte le resistenze.

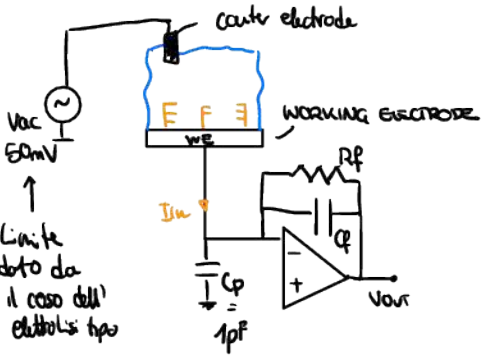
Inoltre se consideriamo una capacità parassita tra le resistenze e terra questa fa così: che il trick non funziona.

AGGIUNGE UN FILE ONLINE CON GLI ALTRI ESERCIZI + SOLUZIONI

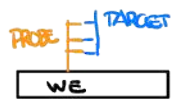
12 Oct. 2021

2h

CAPACITIVE DNA BIOSENSOR



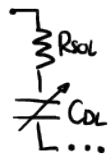
Vogliamo trovare una sequenza di DNA in soluzione



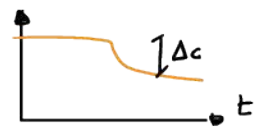
Quando la probe perde il target toglie un po' di cariche dalla superficie del working electrode

cerchiamo che a noi interessa la Capacità Debe logar

Allora modelliamo il sistema come

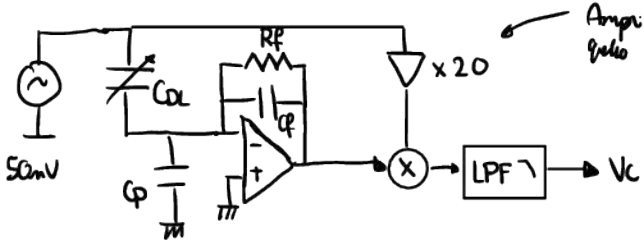


Ci interessa vedere un cilo di capacità



Non ci interessa Rsa quindi per noi Rsa → ∞

Il modo migliore per studiare il sistema e' il lock in

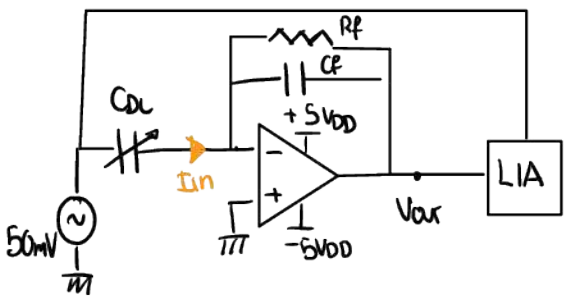


Amplificaz. di 20 il segnale d'uscita vale un po' più d'alto e basso 50mV

DISK ELECTRODE 10µm Ø

ARRIVAL RATE 1 molecule/sec

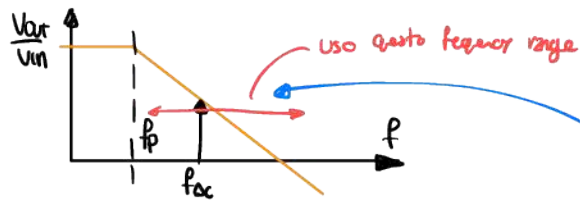
- a) Size Cf
- b) trovare la capacitive resolution con $BW_{LFF} = 100\text{Hz}$
- c) l'ibridazione del DNA da $\Delta C = 10/C_{sol}$ trovare il minimo C misurabile
- d) che impatto ha il rince su Vac?
- e) Trovare BW_{LFF} (non ho capito in che caso)



$Rf \sim 1\text{G}\Omega$

$$V_{out} = I_{in} \cdot \frac{-R_F}{1 + sCR_F}$$

$$f_p = \frac{1}{2\pi C R_F}$$



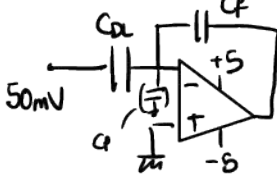
Visto che abbiamo un R_F molto grande e visto che noi misuriamo il condensatore C in base a opere nella zona capacitiva della curva.

Noi facciamo così perché visto che in input abbiamo un condensatore allora la corrente entra con la frequenza e quindi la tensione d'uscita dipende dal rapporto dei 2 condensatori. Si fa così quando si deve misurare un condensatore, infatti:

$$I_{in} = \frac{V_{ac}}{\frac{1}{sC}} = V_{ac} s C D_L \rightarrow \text{uso questa formula in questa } V_{out} = I_{in} \cdot \frac{-R_F}{1 + sCR_F}$$

(alla fine in questo caso la resistenza è L solo per togliere le componenti DC)

Se $f_{ac} \gg f_p$ allora



$$V_{out} = -V_{ac} \cdot \frac{C_{DL}}{C_F} \quad \left| \begin{array}{l} 50mV \\ E(+5, 5V) \end{array} \right.$$

questi valori devono stare tra -5 e 5 volt se è l'linearità del OP-AMP

su C_p non circola corrente.

Noi sappiamo che

$$C_{DL} = \frac{0,1 pF}{\mu m^2} \cdot Area_{we} = \frac{0,1 pF}{\mu m^2} \cdot \pi (5 \mu m)^2 = 7,8 pF$$

numero dato per la soluzione PBS, se cambiamo soluzione questo numero varrà.

$$V_{out} = \left(-V_{ac} \cdot \frac{C_{DL}}{C_F} \right) = 5V \rightarrow C_F = C_{DL} \cdot \frac{50mV}{5} = 78 pF$$

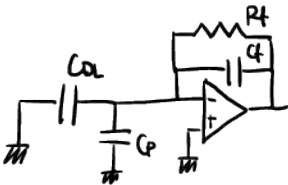
velocità molto basso non si può comprare

Se mettiamo $C_F = 1 pF$ allora ci viene che

$$V_{out} = 50 \cdot \frac{7,8 pF}{1 pF} = 390V$$

• PUNTO b

minimo DC che possiamo misurare, ora la capacità C_p diventa rilevante



Calcoliamo la C_{TOT} connessa all'input

$$C_{TOT} = C_p + C_{DL} + C_F \approx 10 pF$$

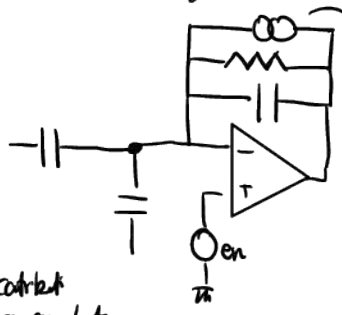
↑ ↑ ↑
stray sensor ampl

Vogliamo minimizzare C_{TOT} perché questo contribuisce al rumore e alla stabilità del sistema

Dobbiamo calcolare il minimo valore misurabile. Per fare questo dobbiamo considerare il rumore delle varie componenti.

Ci viene detto che L'OPAMP ha un errore di tensione di input

$$e_n = \frac{4nV}{\sqrt{Hz}}$$

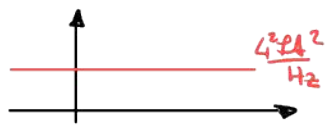


$\frac{4KT}{Rf}$
 è la corrente del rumore di R, vedo la corrente che va verso l'input dell'OPAMP

Abbiamo 2 componenti di rumore, quella dell'amp e quella della resistenza, tutti questi contributi vanno sommati in potenza. Noi usiamo la radice quadrata del valore al quadrato

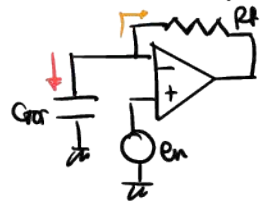
$$\sqrt{\frac{4KT}{Rf}} = \sqrt{4 \cdot \frac{KT}{9} \cdot 9 \cdot \frac{1}{Rf}} = 4 \frac{fA}{\sqrt{Hz}}$$

$26mV$
 $1,6 \cdot 10^{-19} C$



studiamo adesso il rumore dell'OPAMP e dividiamo il rumore in bianco o no.

Ricordiamo che se viene il valore dal + dell'OPAMP verso zero quello di -, cioè si produce un tensione a correnti che va a sommersi sul segnale.
 Abbiamo 2 correnti quella sul resistore e quella sui condensatori.



La parte sul resistore è

$$\sqrt{\frac{e_n^2}{Rf^2}} = \frac{4 \frac{nV}{\sqrt{Hz}}}{100} = 900n \frac{fA}{\sqrt{Hz}}$$

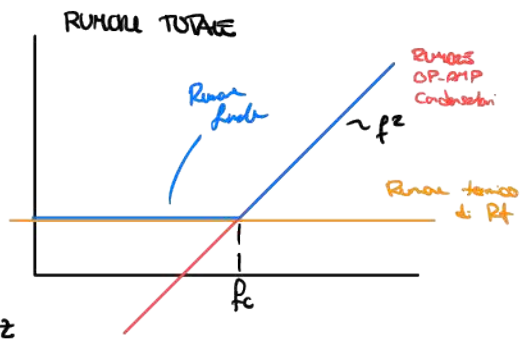
approssimabile a 0 se considerato o il rumore di Rf (e' no di voltage di zero Rf grande)

La parte sui condensatori è

$$\sqrt{e_n^2 (2\pi f C_{TOT})^2} = e_n 2\pi f C_{TOT}$$

è un rumore che aumenta con la frequenza
 Cerchiamo f_c per capire la Banda

$$\frac{4nV}{\sqrt{Hz}} \cdot 2\pi f_c \cdot 10pF = \frac{4fA}{\sqrt{Hz}} \rightarrow f_c = 16KHz$$



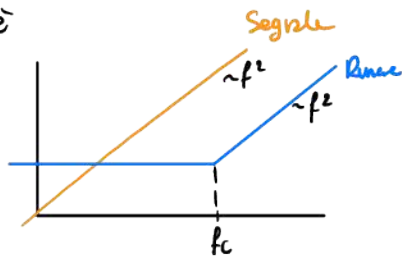
Dove mettiamo quindi la nostra sensing frequency?
 In genere se il segnale non dipende dalla frequenza noi pensiamo una frequenza $< f_c$.

Tuttavia nel nostro caso il segnale dipende dalla frequenza, dobbiamo vedere anche il segnale
 parte a noi ci interessa l'SNR. Poi per avere il minimo segnale misurabile mettiamo
 $SNR=1$. (2 kcal il segnale dipende dalla frequenza e abbiamo un coefficiente in ingresso)

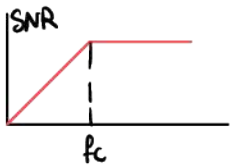
Infatti il segnale d'ingresso è

$$V_{ac} \cdot 2\pi f C_{in}$$

L'SNR del segnale è dato dalla distanza tra i 2 segnali visto che il grafico è log-log



Allora l'SNR è



Notiamo che a noi va meglio una frequenza $f_{ac} > f_c$. (Tipicamente noi ce > intendiamo ~ fattore 10)

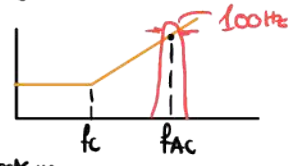
$$\text{Supponiamo } f_{ac} = 200 \text{ kHz}$$

• d) dobbiamo calcolare il valore del rumore a f_{ac} (=200kHz)

il rumore dominante è quello dell'OP-AMP

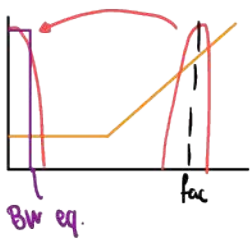
il lock in è fatto per integrare il segnale con banda 100 Hz attorno a f_{ac} .

Perciò facciamo l'SNR in a narrow bandwidth, grazie al lock in.



il rumore quindi sarà calcolabile tramite l'SNR

Debbiamo ricordare che il lock-in porta il nostro segnale a frequenza zero e nel f_c parte il segnale perde nella impedenza



$$\sqrt{\frac{S_i(f_{ac}) \cdot BW}{2}}$$

dato del lock in

$$\text{Ma } SNR=1 = \frac{\frac{C_{in}}{2}}{\sqrt{\frac{(e_n \cdot 2\pi \cdot f_{ac} \cdot C_{in})^2 \cdot BW}{2}}}$$

superiore del lock in

$$= \frac{\frac{1}{2} V_{ac} \cdot 2\pi \cdot f_{ac} \cdot C_{in}}{e_n \cdot 2\pi \cdot f_{ac} \cdot C_{in} \cdot \sqrt{\frac{1}{2} BW}}$$

la nostra incognita = 1

Perciò

$$\Delta C_{MIN} = \frac{C_{TOT} \cdot e_n}{V_{ac}} \sqrt{2} \cdot \sqrt{BW}$$

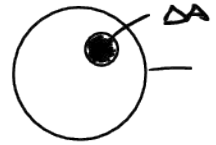
CAPACITIVE RESOLUTION
 ← FORMULA IMPORTANTE

Perciò $\Delta C = 1 \text{ aF}$ (arto Farad?)

• PUNTO C

Supponiamo che C_{DL} cambia del 10% quando abbiamo l'ibridazione, se $\Delta C = 1 \text{ aF}$ (cioè la minima capacità rilevabile) allora

$$\Delta C = 1 \text{ aF} = \frac{0.1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot \text{Area} \cdot 0.1 \quad \leftarrow 10\%$$



Calcoliamo l'area del DNA? $\Delta A|_{\text{DNA}} = \frac{1 \text{ aF}}{\frac{0.1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot 0.1} = 1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$

Se solo $1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$ del working electrode sia coperti allora posso rilevare una variazione di capacità.

• Limit of Detection lo posso vedere con n° di molecole / volume della zona piccola questo n° da la minima concentrazione.

Calcolo il volume con un semicircolo sopra l'area



Noi sappiamo che il diametro del DNA è 2,5 nm.

Perciò il numero di molecole di DNA \wedge e' calcolabile con n° molecole DNA = $\frac{1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2}{\pi \left(\frac{2.5 \text{ nm}}{2}\right)^2} = 22 \text{ molecole}$

il volume del semi-circolo e'

$\Delta A = \pi r_{eq}^2$ perciò il volume $V = \frac{1}{3} \pi r_{eq}^3 \leftarrow ? \text{ non dovrebbe essere noto?}$

e quindi

$$\text{LoD} = \frac{22 \text{ h}}{\text{Volume}}$$

14.04.2021

lezione

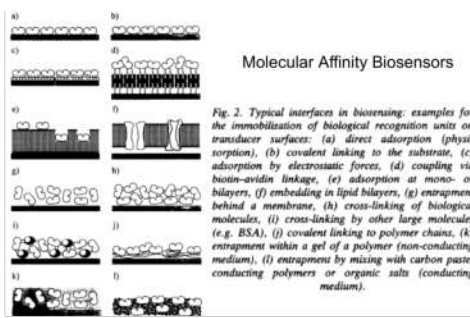
2h

Molecole

Come possiamo bloccare le molecole che usano come recettori?

L'idea sarebbe mettere i sull'interfaccia e spero che si attaccino, questo ha 2 lati negativi, 1) Non si attaccano sull'interfaccia e si spostano con il liquido, inoltre la presenza di una superficie rigida, la quale può essere anche carica cambia il comportamento della molecola.

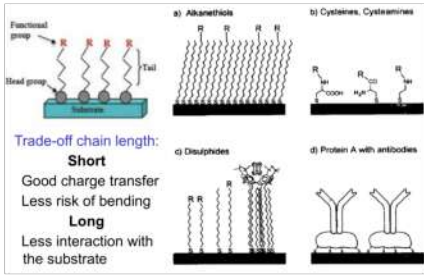
Ci sono altri modi per per attaccare le molecole, una sorta di bio lego [d] o di biopolimeri che bloccano le molecole. [g, h, i, j, k, l]



Molecular Affinity Biosensors

Fig. 2. Typical interfaces in biosensing: examples for the immobilization of biological recognition units on transducer surfaces: (a) direct adsorption (physisorption), (b) covalent linking to the substrate, (c) adsorption by electrostatic forces, (d) coupling via biotin-avidin linkage, (e) adsorption at mono- or bilayers, (f) embedding in lipid bilayers, (g) entrapment behind a membrane, (h) cross-linking of biological molecules, (i) cross-linking by other large molecules (e.g. BSA), (j) covalent linking to polymer chains, (k) entrapment within a gel of a polymer (non-conducting medium), (l) entrapment by mixing with carbon paste, (m) conducting polymers or organic salts (conducting medium).

INIZIAMO STUDIANDO IL CASO E/F [e' e' uguale a F solo che F e' retto e e' fatto in lab]
 questi sono chiamati Self assembled monolayers (si mettono in automatico in
 quelle strutture ordinate

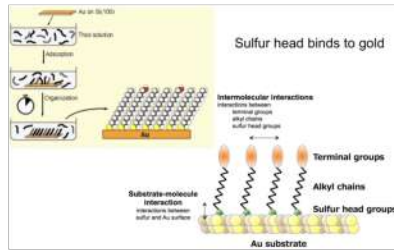


Noi ingegnerizziamo una testa per stare legata al substrato e una per legare con i reagenti.
 Possiamo anche scegliere la lunghezza.

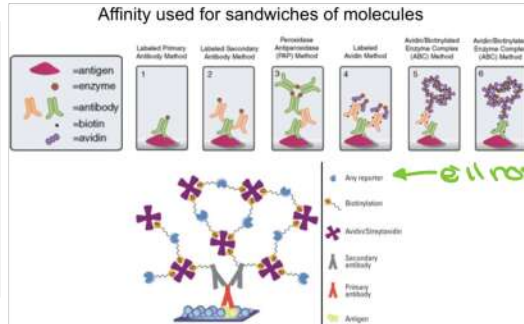
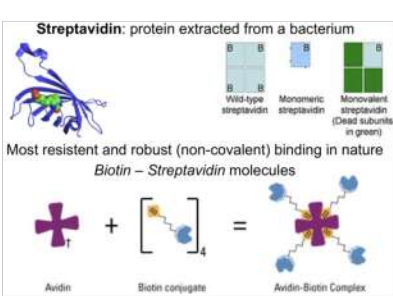
Sono chiamati self assemble anche perché noi mettiamo queste molecole in un fluido e li mettiamo sul substrato la testa si lega al substrato e quando il liquido sarà evaporato abbiamo i nostri reattori

Tipicamente la lunghezza di questi reattori e' 10 atomi di carbonio

Tipicamente questi self assembled monolayers si legano ad un substrato di oro e la loro testa e' tipicamente di zolfo se questo si lega molto bene all'oro. Questo tipo di reattori si chiamano: Thiolos.

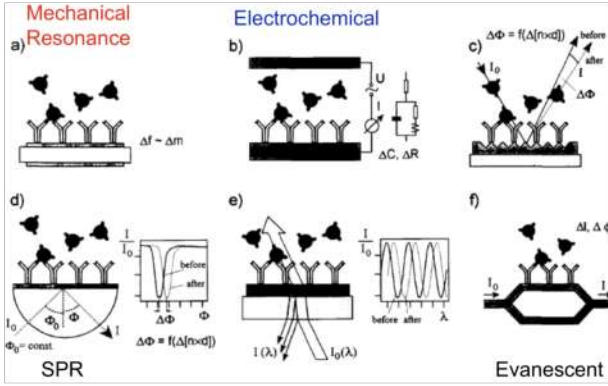


L'altro approccio e' quello di lego, abbiamo una streptavidin che e' una proteina estratta da un batterio



Abbiamo il marker legato da biotin, questi saranno tenuti in siera degli zucchi, P: questo si attaccherà a un anticorpi secondario

TIPY DI DETECTION (RICORDIAMO)

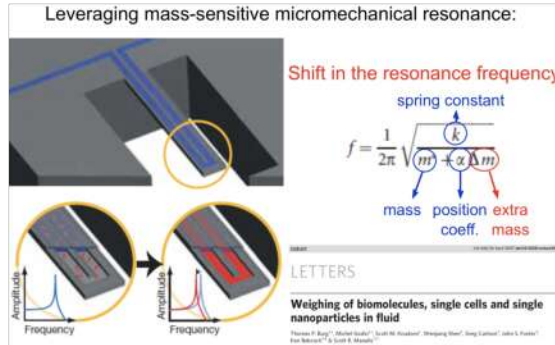


Ci sono 2 tipi delle tecniche a)/c) che studiano la presenza delle molecole in base alla riflessione della luce

d) è una tecnica molto complessa

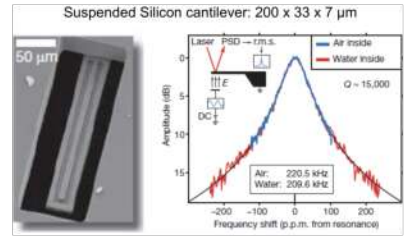
e) si basa sulla risonanza meccanica, in pratica creo un oscillatore meccanico e misuro la Req di risonanza, questa varia in base alla massa delle molecole che si fermano nel canale

ESEMPIO DI TIPO e)



IN PRATICA HO CREATO UNA SPECIE DI NANO BILANCIA

il risonatore è nell'ordine di grandezza di μm

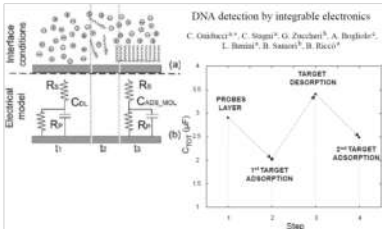


Per far risuonare il sistema usiamo un piccolo campo magnetico e lo misuriamo con i laser.

Per fare questo eseme noi dobbiamo avere un ambiente estremamente controllato (stabilizzazione umidità ecc...) capiamo dunque che questo non è utilizzabile in un lab on chip

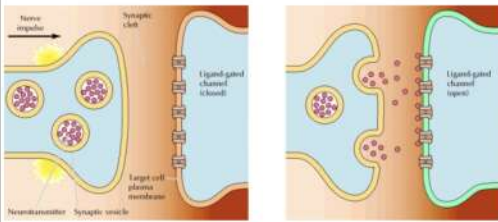
CAPACITIVE DETECTION DNA

In pratica è l'esercizio di abbiamo fatto giorno



NEUROTRANSMITTERS

Chemical mediation: 5×10^{14} synapses in the human brain



Exocytosis: extra-cellular release of small molecules in vesicles

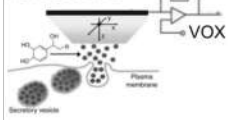
Sono molecole rilasciate da un neurone, questo avviene quando c'è un salto tra 2 neuroni (sinapsi). Questo processo è chiamato **EXOCITOSI**

Dell'altra parte della sinapsi ci sono delle proteine target che si agganciano a i neurotransmitter e poi ridurranno l'impulso elettrico.

Neurotransmitters can undergo redox

Se mettiamo un piccolo elettrodo vicino al sito dove la molecola (neuro) rilascia i neurotrasmettitori e mettiamo un potenziale scelto per fare una redox allora un volta abbiamo una corrente dipendente dal numero di molecole

Microelectrode:

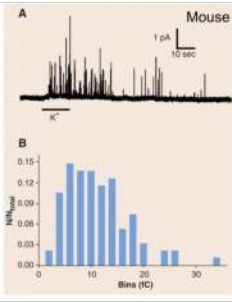


Chemical messengers:

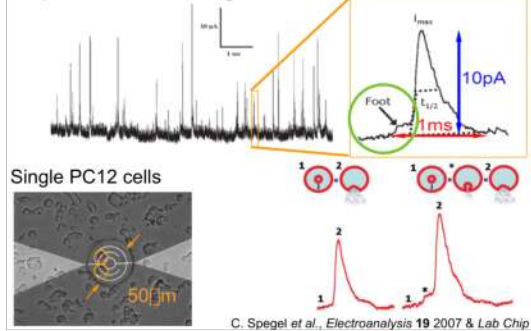
- Dopamine, adrenaline etc..

Current tracking:

- 5×10^4 molecules in a vesicle
- 10FC released in 1ms ≈ 10 pA



Amperometric recording:



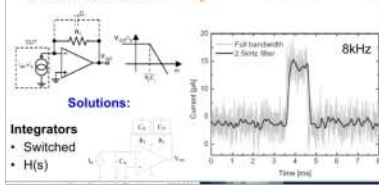
C. Spegel et al., Electroanalysis 19 2007 & Lab Chip

è molto un caso misure questi impulsi di corrente molto veloci, molte dobbiamo avere molta risoluzione, infatti se la corrente ha un foot, questo significa che c'è un problema neurologico

At the limits achievable with a standard transimpedance amplifier:

- $R_f = 200M\Omega$
- 0.2pF stray capacitance

- BW = 4kHz
- 1.4pA rms



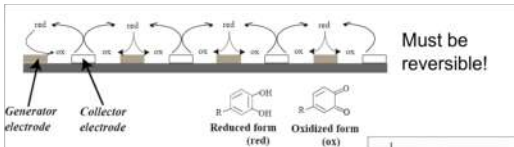
Solutions:

- Switched
- H(s)

Sono troppo al limite con questa topologia di transimpedance amplifier.

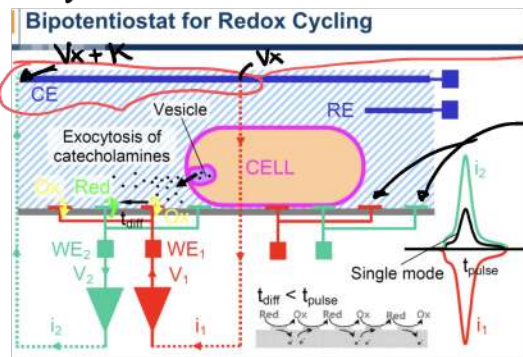
Ci sono un'altra topologia, quella sotto.

C'è un altro trick per aumentare il segnale **Redox Cycling**, infatti se di neurotransmitter possono fare una redox e ossidazione in continuo più di una volta, allora noi possiamo mettere più elettrodi per leggere questo effetto di redox \rightarrow ossidato \rightarrow redox $\rightarrow \dots$, (non possiamo usare un singolo elettrodo se non riusciamo a fare bene le molecole)



Ho 2 famiglie di elettrodi messi a 2 potenziali diversi, i generator electrode fanno la redox e ossidano la molecola, la molecola ossidata per diffusione si muove, probabilmente questa traversa un collector electrode che la riduce (fa tornare a redox).

Tra te questo modo posso zutare il segnale. Il problema è che dopo un po' la molecola va via, quindi noi abbiamo un tempo limitato per studiarla, tuttavia possiamo amplificare il segnale di S/G.

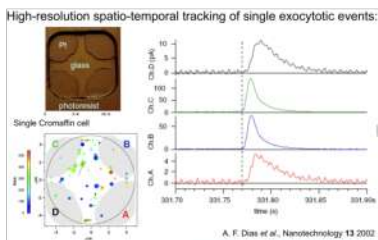


Bipotentiostat

Famiglia di 2 tipi di elettrodi:

Per "generare" le 2 tensioni diverse si può usare un Bipotentiostat

SUB CELLULAR RESONANCE (17.39)

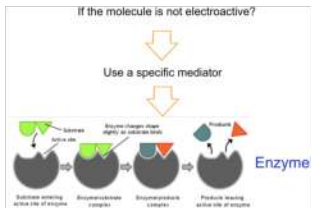


(Non ho ascoltato cosa ha detto)

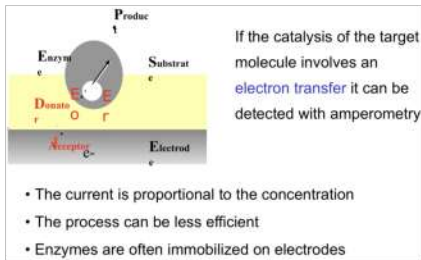
hanno funzioni diverse e noi vogliamo misurare solo un tipo di neurotrasmettitori, tuttavia essendo simili hanno voltammetria simile...

I PROBLEMI DELLE INTERFERENZE: Neurotrasmettitori simili, cioè che hanno voltammetria molto simile, (cioè la tensione per cui vanno la redox) e quindi possono risultare in corrente non volta che indica la lettura. Per risolvere questo problema facciamo qualcosa simile alla ciclo voltammetria, cioè sweepiamo la tensione e per ogni valore di tensione misuriamo la corrente.

SE LA MOLECOLA NON È ELETTROATTIVA NON POSSIAMO USARE TECNICHE DI MISURAZIONE CHE USANO L'ELETTROATTIVITÀ. Tuttavia possiamo risolvere facendo sì che la molecola si legni ad un enzima e questo fa sì che ci possono essere prodotti elettroattivi:



Un esempio di questa tecnica è il lettore del glucosio



Nel lettore di glucosio nella striscetta ho l'enzima asciutto, con il sorge lo bagno e lo attivo, ho un prodotto di reazione che è redox detectabile e perciò ottengo una corrente che è proporzionale al valore di glucosio.

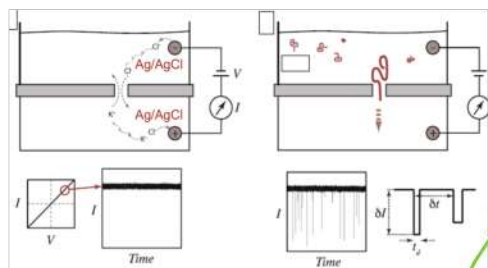
CAPIAMO CHE QUESTO È UN CASO FORTUNATO XÈ HO L'ENZIMA GIUSTO E NON HO BLOCCATO

DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

NANOSCALED TRANSDUCERS

L'idea è di rilevare la presenza di una molecola di DNA o meno usando una tecnica. Prendo un pezzo di materiale isolante e faccio un buco piccolissimo nel centro di questo in soluzione e ci sono 2 capi di questo materiale isolante nel centro 2 elettrodi.

Avrò quindi una corrente data dagli ioni che passano in questo buco, tuttavia quando una molecola passa per questo buco blocca il buco e perciò gli ioni non si muovono e quindi la corrente si annulla.

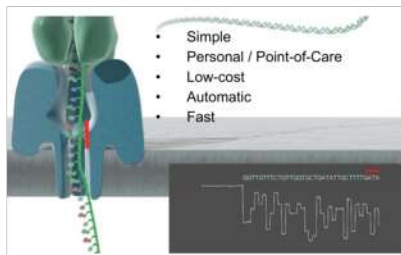


Non solo posso sapere quando la molecola passa nel buco (la molecola deve essere carica $x e^-$ dove x è un numero intero per forzare questa operazione altrimenti non passerebbe mai di lì), ma posso stimare ad esempio la lunghezza della catena di DNA o molte se ho un rilevatore di corrente estremamente sensibile posso vedere le variazioni di corrente dei singoli pezzi di DNA (che sono n) e quindi di quei tre forme un po' diversa e quindi passa più o meno corrente.

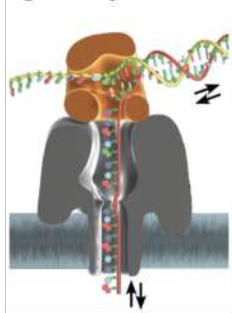
In pratica ho fatto un sequenziatore di DNA

Per dare i numeri:

- l'impulso grande è ≈ 100 pA
- i piccoli cambiamenti di livello della corrente sono nell'ordine della decina di pA



Enzyme gateway



Per avere queste basse correnti devo avere una banda di kHz e questo significa che la molecola di DNA deve stare ferma nel buco per ms (ma è troppo), ci vorrebbe troppo tempo a sequenziare un'intera catena di DNA, però si può fare per pezzi piccoli. Per mandare avanti il DNA una base alla volta con la velocità che vogliamo c'è un enzima apposito.

Ad oggi non riusciamo ancora a fare un rilevatore di corrente con altra banda in modo da leggere molti pezzi di pezzi di DNA per sequenziare un'intera sequenza.

19.06.2021

2h

Sample preparation

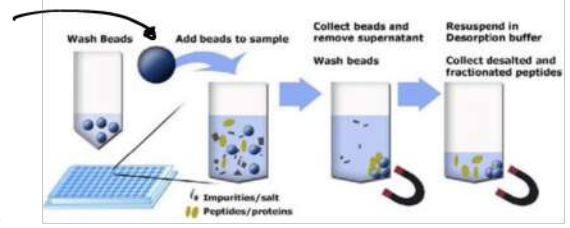
tipicamente vogliono estrarre le molecole dalle cellule, gli step per la sample preparation sono:

- Purification
- Concentration (aumentare la concentrazione)
- Extraction
- Mixing con i reagenti
- Labeling (mixare i campioni con i fluorofori)
- Amplification

ESEMPLO DI PURIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE

Purification and concentration at the same time with magnetic beads functionalized to capture specific molecules

è magnetico e si collega alla nostra proteina / elemento e lo rende magnetico (collegamento clinico)

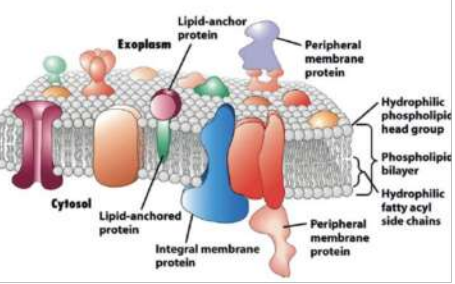


Tutto questo posso farlo direttamente in un biochip.

Dopo questo step vorremo staccare questi beads dal target anziché, si può fare alzando la temperatura in modo da dare + energia al target anziché in modo da rompere il collegamento, oppure attraverso composti clinici.

Cell lysis: rompiamo la membrana lipidica della cellula per prendere una molecola all'interno

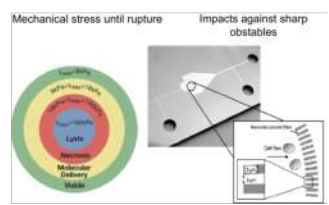
Very complex and robust: 4nm thickness, dynamical



Vogliamo rompere la membrana che pur essendo sottile è molto resistente. Per rompere la membrana ci sono diverse tecniche

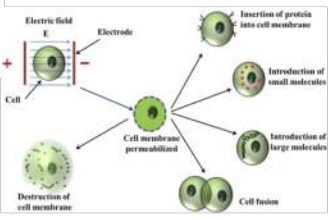
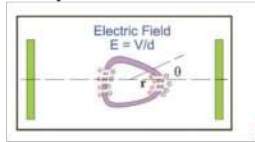
- **Chimica** (usa il sodio dodecil solfate, finemira è facile ma più tossico la molecola in in soluzione con questo composto)

- **Meccanica**: con forza lenciamo la cellula contro uno degli spunti a punta



Altre sono per compressione o tramite altre tecniche meccaniche.

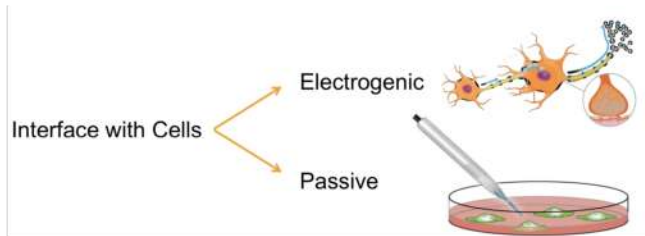
- **Approccio elettrico. ELECTROPORATION**:



se si applica un campo elettrico abbastanza alto si può distruggere la barriera della cellula. Se si usa un campo elettrico un po' più basso si può aprire temporaneamente la membrana della cellula in modo da poterle inserire dentro qualcosa. Tipicamente l'elettroporazione caso A è usata per inserire il DNA.

- **Temperatura**: Aumentano la temperatura del campione in modo che si sciolgono le proteine e quindi si rompe la membrana della cellula

Cellule



Le applicazioni di: Per crescere le cellule su di un chip sono per lo studio di reti neurali, scoperta di farmaci o per nuove organi.

Direct Electrical Interface with Cells

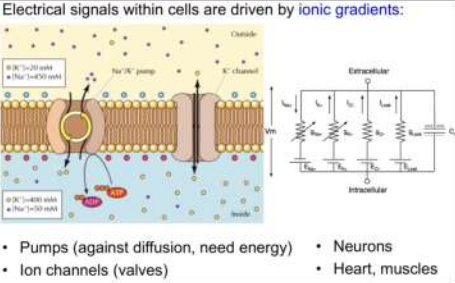
Biological investigation mainly relies on optical microscopy

Advantages of direct electrical sensing:

- Label-free (save time and reagents, non intrusive)
- Quantitative
- Integration with microelectronics
- Miniaturization and portability
- Some cells generate electrical signals

I VANTAGGI DELL'ELETTROGENICA

Alla base delle cellule elettrogeiche ci sono i canali di ioni. Ogni ion channel (che dovrebbe essere una proteina) lascia passare solo un tipo di ione dato da un elemento



Ion channels: transmembrane protein.

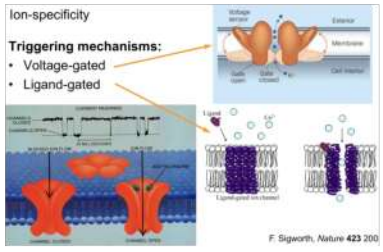
Se chiusi: $I = 0$

Se aperti il passaggio degli ioni è dato solo dalla diffusione

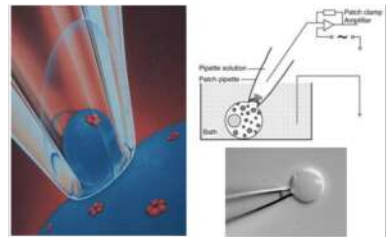
Esiste anche un'altra transmembrane protein chiamata pump che spinge gli ioni in modo opposto alla diffusione

Per interfacciarsi ad una cellula elettrogeica sono 3

- leggere la tensione (ci serve 1 elettrodo dentro e uno fuori dalla cellula) ci serve la tensione ai capi della membrana. Tuttavia abbiamo una grande capacità condensata (??) questo fa sì che la tensione letta sia molto minore rispetto a quella reale.
- leggere la corrente attraverso i canali degli ioni, questi canali possono essere aperti imponendo una tensione ampia tot sulla membrana oppure tramite particelle chimiche. Perciò noi con queste 2 tecniche aprono i canali e poi misurano la corrente.

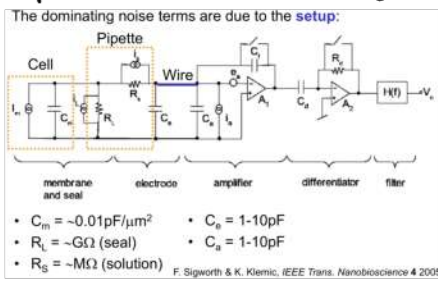


PATCH-CLAMP: Misurano la corrente di un singolo ION channel. Facciamo questo tramite una mini pipetta. Se siamo fortunati, nella parte che puntiamo con la pipetta c'è solo un ion channel



la corrente di un singolo canale è estremamente piccola (per sodio e potassio 1-10pA per il calcio 0.1 pA) e abbiamo un timescale di ms. Abbiamo lo stesso problema della scorsa lezione.

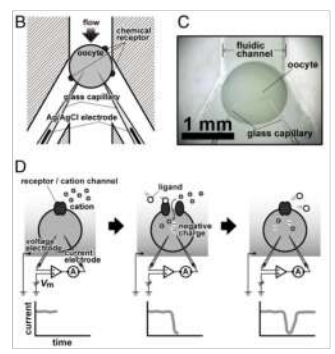
L'aspetto critico è dato dagli elementi parassiti della pipetta



Si è provato a cercare di migliorare la pipetta facendo uso di altri materiali: quale quarzo ecc... Oppure all'esterno si può evitare di usare la pipetta.

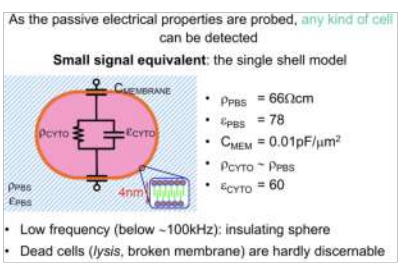
Live cell osbrent sensor:

Uso una molecola molto grande e ci mette dentro un elettrodo, basta uno. E misuriamo la presenza dei gas perché questi faranno aprire gli ion channel e quindi ci sarà una corrente



ALTRO TIPO DI CELLULE: PASSIVE CELLS

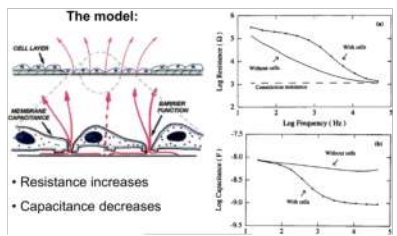
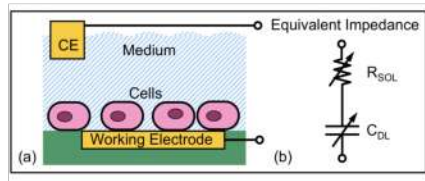
PASSIVE ELECTRICAL SIGNAL EQUIVALENT



la membrana si comporta da capacitor. la zona blu è il medium dove stiamo la cellula che è conduttiva. All'interno della cellula zero la resistenza e la capacità dei orto (?)

Possiamo vedere la cellula come una sfera isolata all'interno di una zona totalmente conduttiva. Perciò possiamo amperare una zona senza e una zona con cellule aumentando le impedenze.

Per vedere la presenza o meno di queste cellule usano la solita tecnica con i WS



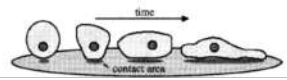
Notiamo che nella parte dell'elettrodo coperto da molecole la doppia layer capacitance decade mentre la resistenza aumenta il suo valore.

Se supponiamo di avere il WE su tutta la base di un piatto di petri allora possiamo tracciare l'andamento della coltura delle cellule.

- Different mechanism are taking place:
- Sedimentation
 - Adhesion and spreading
 - Growth and reproduction
 - Response to chemo-mechanical stimuli
 - Confluence
 - Death



The contact area changes over time
Average population information



Cioè capire quanto si sono espese le cellule e capire quante ne muoiono.

Un lato negativo di questa tecnica è che è indipendente del tipo di cellula, cioè non possiamo discretizzarla.

Inoltre non ci basta solo il valore dell'impedenza ma dobbiamo sapere tutto, temperatura, cellule di adesione delle cellule, medium in cui sono le cellule ecc.

Capiamo dunque che per questi motivi non si possono in genere comparare 2 o più colture perché queste si trovano in condizioni diverse.

26.04.2021

2h

(Prima di questa lezione c'è la conferenza, proprietà del DNA. lezione da rivedere)

Biology	Task	Information technology
Capillary electrophoresis	Measure the size of a sequence	Length(x)
DNA Microarray	Find the occurrence of a sequence	Find(x) in file
PCR	Replicate a sequence	Copy + Paste
DNA Sequencing	Acquire a sequence	File read



Questa lezione sarà sui DNA microarrays.

- Gene expression
 - X is any sequence in the human genome, File is RNA taken from a cell.
 - If X is found, the cell is executing that portion of genetic code.
- Comparative research on gene functions
 - 2 populations differing from 1 characteristic (i.e. eye color) == File1 and File2
 - Any X found on File1 and not on File2 may be related to the functions
- Diagnose an infectious disease:
 - X is a sequence typical of a pathogens, File is the sample taken from a patient
 - if X is found, the pathogen is present
- Genetic disease or predispositions
 - X is the mutated sequence causing the disease
 - If X is found, the patient is at risk

In pratica noi prendiamo una cella che supponiamo faccia qualcosa la apriamo prendiamo l'RNA e confrontiamo con quello che ci aspettavamo

Se non sappiamo nemmeno cosa faccia la cellula prendiamo 2 cellule e le confrontiamo

Tipo con il covid, prendo una sequenza di basi unica del covid e la cerco nei campioni. Devo anche sapere parti che non cambiano con le varianti

La DNA microarray funziona tramite l'ibridazione del DNA.

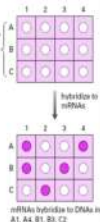
Praticamente quando scegliamo il DNA sopra a 95° questo si apre (denaturazione del DNA) quando la temperatura cede sotto i 75° il DNA si riunisce (ibridazione) soltanto con il suo complementare (Non so se è vero).

Per fare il microarray io preparo un substrato con diversi pezzi di DNA che stanno cercando poi metto la sostanza, scelgo e poi scoglio via.

Se il dna si è attaccato rimane attaccato al substrato e posso vederlo / detectarolo.

Principle of the microarray

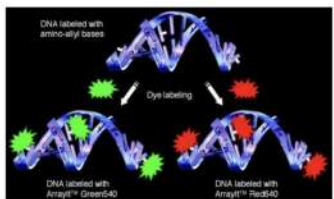
- Known DNA is attached (i.e. By spotting) on the chip surface, at **known positions**
- An unknown sample containing DNA is placed on the chip.
- Wait for the DNA to hybridize to its complementary and then wash.
- Acquire the map of positions where DNA sticks (i.e. optically or electrically).
- Result: in the sample there where the sequences correspondent to the active spots



il metodo preferito per vedere se ho il DNA e' per la fluorescenza. Posso fare questo attaccando chimicamente molecole fluorescenti al DNA prima dell'ibridazione.

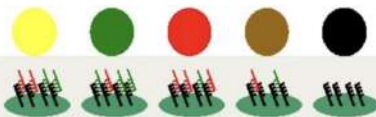
Tramite la fluorescenza si possono usare anche piu' colori

- Different samples are attached to different fluorophores (with different emission wavelength)

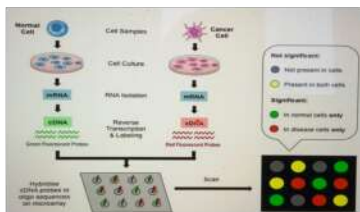


Two colors: Comparative tests

- One sample is labeled with green fluorophore, the other is labeled with red.
- Results:
 - Green: DNA found in sample 1
 - Red: DNA found on sample 2
 - Yellow: DNA found on both samples
 - Black: DNA not present in any sample

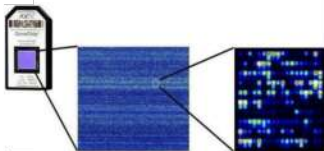


Questo tipo di analisi si può fare anche con l'RNA, anche se non c'è l'ibridazione del RNA. Si usa la reverse transcriptase che è un enzima, tipicamente nei virus, che trasforma una sequenza di RNA in una di DNA



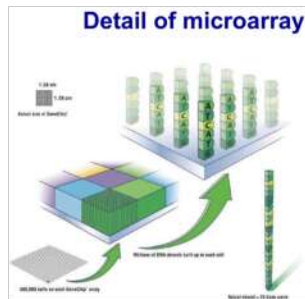
High density microarrays

- Microarrays containing thousands (on millions) of spot.
- It is possible to have a full genome and all its variations (SNPs) on a single chip



In pratica su questo microarray c'è tutto il genoma dell'uomo in tantissime copie ognuna di lunghezza di 26 basi

Detail of microarray

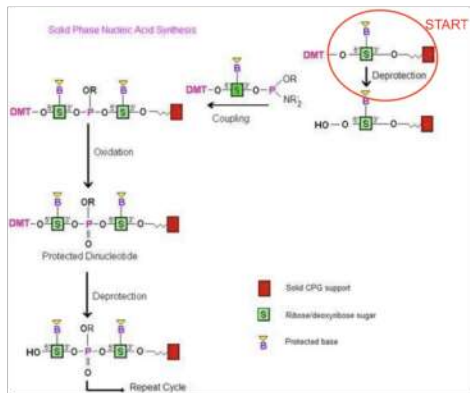


Come si può creare questo microarray e come facciamo ad avere il DNA che mettiamo sul microarray e come facciamo a impalzarlo e tutto?

Artificial DNA synthesis

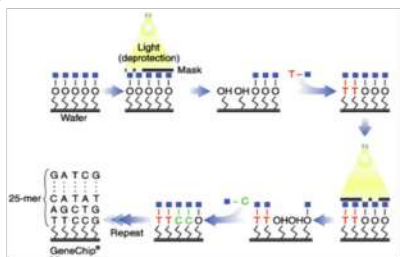
- We start with a base linked on its 3' end on a solid medium (i.e. Porous column, Bead, chip). The 5' end is protected by a 'capping' (DMT=Dimethoxytrityl), preventing the formation of other bonds.
- 1: DMT is chemically removed (i.e. with trichloroacetic acid TCA), the 5' carbon becomes reactive. The chemical agent is then washed away
- 2: A solution containing pure basis (only A or T or C or G) is put on the substrate. Those new bases are already 'capped' in 5'. These bases react in 3' with the 5' of the DNA chain
- 3: The bond is fixed by oxidation of the phosphate
- The cycle is repeated from step1, reactivating the new end by de-capping
- When the desired sequence is finished, the DNA is 'harvested' cutting the original 3' bond to the medium.
- The final DNA sequence depend on the order of the bases as chosen in step 2

il DMT nelle basi: è molto importante perché blocca la possibilità che io per sbaglio possa mettere tante basi uguali una dietro l'altra e fare una volta tipo AAAAAA BBBB BB... quando io volevo solo AB.



il blocco rosso è il substrato, poi S è lo zucchero e poi abbiamo B che è una delle basi. Abbiamo poi DMT che è una molecola che impedisce alla base di reagire, perciò noi la togliamo clinicamente. Per aggiungere la seconda base mettiamo una soluzione di solo la base che vogliamo aggiungere prima. Questa si lega al nostro "vamo vecchio", a sua volta però questa base aggiunta ha un DMT che dobbiamo togliere e via così. In mezzo c'è anche una fase di ossidazione che serve a stabilizzare il tutto.

Per distruggere il DMT posso usare anche luce UV, grazie a questo e grazie alla foto litografia cerco di togliere il DMT solo alle basi che voglio e non a tutte

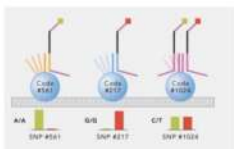
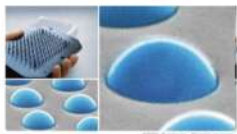


Un altro modo di fare i microarray è quello di illuminare

Illumina bead-array

- Instead of growing DNA on the array, it is synthesized in lots with high quality and purity.
- DNA is attached on the surfaces of small balls (Beads) 3 micron diameter. This step is done in lots for high quantities..
- Different beads are mixed to create a pool
- Beads are randomly placed on the chip
- Each chip is different from others. It has a specific map, provided with the interpretation SW

Si è fatto questo perché con il DNA sintetizzato tramite foto litografia non è proprio pratico perché magari non tutte le DMT si sono rimosse ecc..



PCR (Reazione a catena della polimerasi)

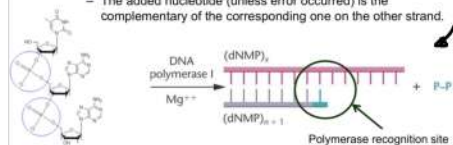
Permette di replicare in vitro copie identiche di un campione DNA iniziale. In pratica permette di amplificare il segnale.

Si basa su un enzima che c'è in ogni organismo, (l'enzima è il polimerasi)

DNA polimerase



- In living cells has a key role in DNA duplication.
- Function:
 - Adds a nucleotide on 3' termination of a DNA strand, when it is partially hybridized
 - The added nucleotide (unless error occurred) is the complementary of the corresponding one on the other strand.



Come fa il polimerasi a duplicare il DNA?

Quando abbiamo questa condizione DNA, cioè quando abbiamo una discontinuità su uno degli stelli, in questo caso la polimerasi conclude la catena prezzando il coniugato della base.

In pratica facciamo un'ibridazione per aprire il DNA, quando rifechiamo il DNA si torna ad attaccare ma non si attacca perfettamente ma lascia le discontinuità dove la polimerasi lavora per amplificare il DNA.

Ogni volta che scaldiamo e rifechiamo il DNA teoricamente raddoppiamo il DNA.

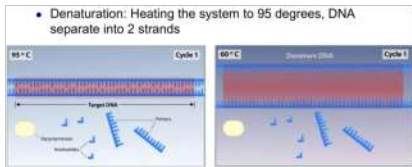
- For the reaction to happen it is required in solution to be present:
 - DNA target to amplify, usually called 'template'
 - The polymerase enzyme, in a thermal-stable version
 - The tri-phosphate bases (the building 'bricks')
 - A salt buffer with specific concentration
 - Magnesium ions, to stabilise pH levels
 - Couples of DNA Primers

← i pezzi che la polimerasi andrà ad attaccare sul DNA

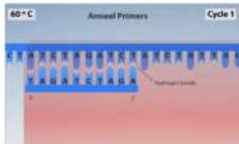
3 phases: Thermally driven:

- Denaturation
 - At temperature around 100 C, the 2 DNA strands separate
 - Annealing
 - At lower temperature (60 C), the single strands hybridize with primers, selecting the portion to be amplified
 - Extension
 - At medium temperature (70 C), the polymerase start working, duplicating the DNA
- The cycle repeats several times, every cycle the amount of DNA doubles

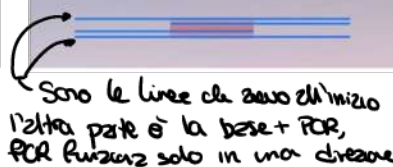
Tipicamente noi con la PCR non vogliamo amplificare tutto il DNA ma amplifichiamo solo le parti che mettiamo con il primer



- Annealing: Cooling the system, primers find their complementary sequence and hybridise

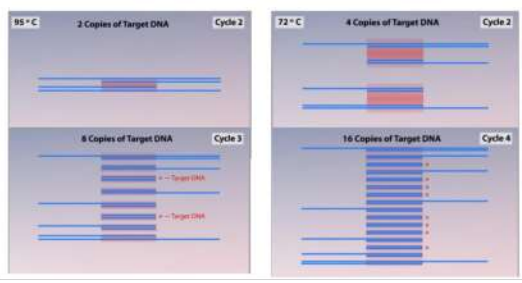


- Extension: the active phase of the reaction: starting from primers the new nucleotides are incorporated
- The temperature depends on the enzyme. Usually is about 72 degrees
- The result is a new DNA strand, starting from the primer and proceeding in 5' to 3' direction

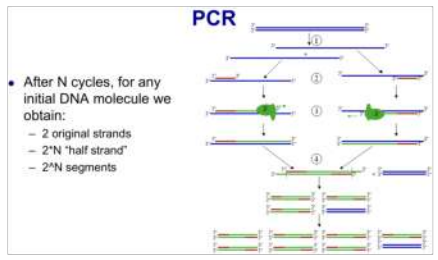


Quando rifechiamo il primer si attacca al DNA

- Cycling: The steps are repeated sequentially, in each cycle DNA doubles.



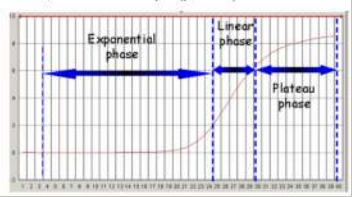
Capriamo quindi che andando avanti amplifichiamo solo il segmento del primer e non tutto il DNA.



- After N cycles, for any initial DNA molecule we obtain:
 - 2 original strands
 - 2^N "half strand"
 - 2^N segments

Capriamo che il tutto ha un comportamento esponenziale, solo che non può durare all'infinito perché i reagenti finiscono o si degradano

- During initial phase, the DNA quantity doubles every cycle, the reaction has an exponential behavior.
- When reagents start depleting, the growth slows down, becoming almost linear
- When the reagents exhaust, the reaction stops. (plateau)



Usi della PCR

PCR to increase microarray sensitivity

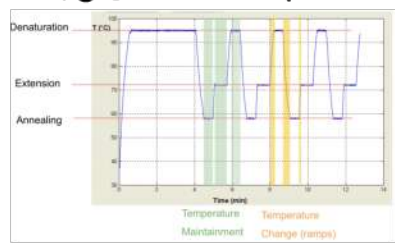
- Microarray signal is proportional to the DNA quantity
- If in the sample there is low DNA concentration, a direct hybridization may not be enough to detect the signal
- If a PCR is made before the microarray test, the potential DNA target is amplified and so become detectable.
- Quantitative information is completely lost

Amplifica il segnale solo se presente, se poi è presente posso usare un microarray per identificare la presenza.

L'informazione sulla quantità iniziale di DNA sono perse

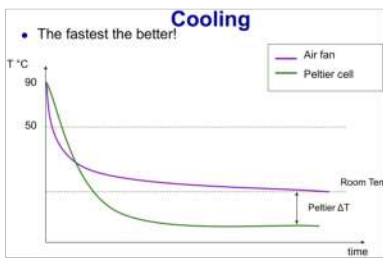
Nella PCR è molto importante avere un ottimo controllo sulla temperatura.

- **T denaturation**
 - Too high: polymerase can be damaged **No reaction**
 - Too low: DNA does not denature completely **Low efficiency**
- **T hybridization**
 - Too low: primers may bind a-specifically, amplifying unwanted DNA **Wrong result**
 - Too high: Primers do not bind. **Low efficiency / No reaction**
- **T extension**
 - Too high: primers may detach during extension **Low efficiency**
 - Too low: reaction slows down. **Low efficiency / No reaction**



La cosa + difficile in tutto questo è rettificare abbastanza velocemente il sistema.

Peltier è + lenta ma va a meno gradi.

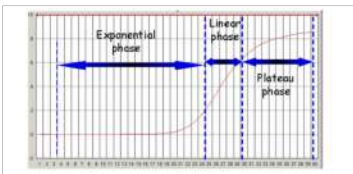


REAL TIME PCR (anche chiamata qPCR)

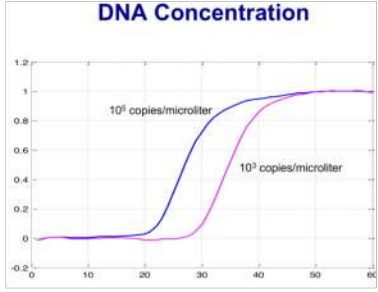
- Standard PCR allows the amplification in vitro of the DNA, to obtain identical copies of the initial molecule.
- The detection at endpoint (by microarray or electrophoresis) does NOT provide quantitative results.
- Realtime PCR allows a precise quantification of the DNA present in the initial sample.

De non confondere con RT-PCR che sta per reverse transcribed PCR.

In pratica con questa posso anche la quantità.



Plateau phase depends only upon the reagents
The exponential phase depends upon the sample



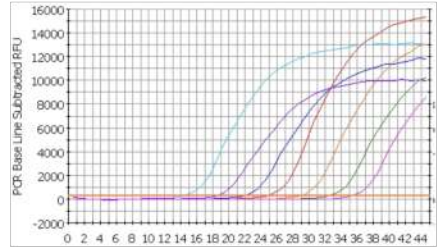
Abbiamo differenza solo in mezza 2^a amplificazione

Con un po' di matematica notiamo che la parte esponenziale dipende dalla concentrazione e che la concentrazione consiste in uno shift o meno della curva esponenziale.

PCR efficiency

- In the ideal case with PCR we obtain a perfect duplication of the DNA at every thermal cycle: $qDNA = C_i \cdot 2^n$
- In reality, the efficiency is not perfect due to various factors:
 - Not perfect reagents (inefficient enzymes, degraded bases etc.)
 - Not perfect thermal control (i.e. inhomogeneity)
 - Replication errors
 - Inhibitors that interfere with the reaction
- In this case we define PCR efficiency:
 - 100% $qDNA = C_i \cdot 2^n$
 - 80% $qDNA = C_i \cdot 1.8^n$
 - 60% $qDNA = C_i \cdot 1.6^n$
 - 0% $qDNA = C_i \cdot 1^n$

Esempio con 7 campioni con diversi valori di concentrazioni



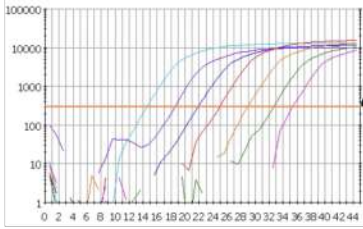
Il campione viola è diluito 1 milice di volte il primo (azzurro)

Notiamo che tutte le parti iniziali delle curve sono uguali solo shiftate

Per ricavare valori da questo esperimento tipicamente mettiamo un valore di barriera e vediamo per ogni esperimento quanti cicli ci vogliono per arrivare a quel valore.

Dobbiamo scegliere un giusto valore della barriera (non sul plateau)

...In log scale



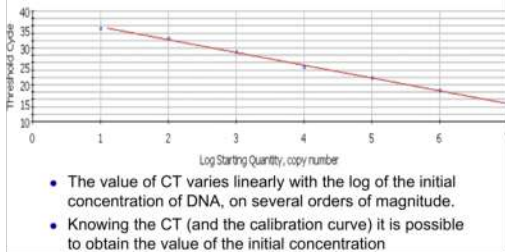
Threshold.

Cycle threshold

- An arbitrary threshold is defined for the amount of DNA
- The cycle when the amount of DNA becomes greater than the threshold is named Cycle threshold (C_T)
- In practice, C_T can also be a non-integer number, obtained by interpolating the discrete PCR curve.

Ricevo la C_T di tutti gli esperimenti e ricevo un grafico.

Realtime PCR linearity



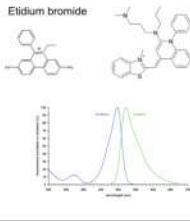
- The value of C_T varies linearly with the log of the initial concentration of DNA, on several orders of magnitude.
- Knowing the C_T (and the calibration curve) it is possible to obtain the value of the initial concentration

Visto che io so il valore della concentrazione di DNA in tutti e 7 gli esperimenti, visto che sono appunto esperimenti, posso quindi usare questa curva come reference e ricavare la concentrazione per un qualsiasi valore di C_T .

Credo che per misurare il valore di DNA per arrivare alla barriera si usi una tecnica ottica usando la fluorescenza. In genere questa cosa funziona comunque

DNA Intercalants

- Are molecules that fits inside the grooves of the DNA double helix
- Normally they are not fluorescent. They emit fluorescence only when coupled to DNA
- In a solution with excess of intercalants, the measure of fluorescence is directly proportional to the DNA concentration.



← Molecola che dà la fluorescenza unicamente se il DNA è unito a doppia elica.

SYBR Green: principle

- Uses a non-specific fluorescent molecule that binds to the minor groove of DNA.
- SYBR green emits fluorescence only if a DNA double strand it is present.
- It detects only the total amount of DNA, it can't distinguish between different sequences



Un altro modo per avere la fluorescenza è quello di usare le TaqMan probes

TaqMan probes

- Is a chain of normal DNA with a fluorophore linked at its 5' end (Reporter) and another molecule (Quencher) in its 3' termination
- The property of the quencher is to 'switch off' the fluorescence of R when Q and R are close each-other. The photons are absorbed by Q instead of being emitted by R.

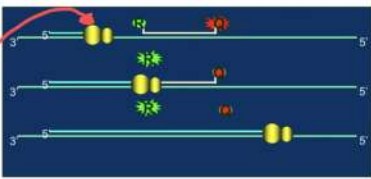


Ho una molecola verde e rossa, se queste sono abbastanza vicine sotto una luce fluorescente risultano buie. Per avere alla stessa distanza R e Q sono attaccate ad un pezzetto di DNA.

Ho poi una rotta tipo polymerase che mangia il pezzetto di DNA che tiene uniti R e Q in modo che questi si possano distanziare e risultare luminosi sotto una luce fluorescente.

È la polimerasi quella che fa polymerase con il DNA.

Real-Time PCR: 5' to 3' endonuclease activity



- The Polymerase enzyme during replication cuts out any existing DNA on its trail
- For any duplication event a new probe becomes fluorescent

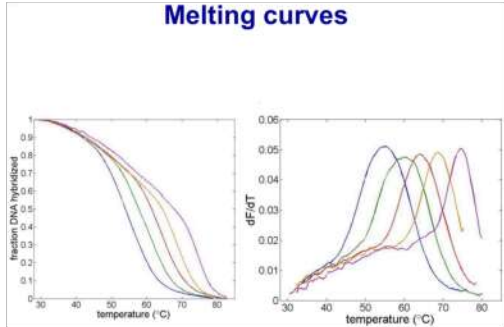
il pezzo di DNA che stiamo e un pezzo di DNA complementare che vogliamo rilevare

Questo l'ha fatto molto-molto veloce.

Melting curve

- After amplification, the system is slowly heated (thermal ramp) while the fluorescence is measured continuously.
- If a molecular beacon or an intercalant is present, when the DNA double helix denaturates, the fluorescence exhibits a negative peak.
- Dissociation temperature depends on
 - Amplicon length
 - CG percentage (3 H-bonds) over AT percentage (2 H-bonds)
- The (negated) derivative of the fluorescence is the most used indicator
- Melting curve can't be done with TaqMan probes

Melting curves



In base al picco si possono discriminare diversi prodotti della amplificazione.

Isothermal amplification → amplifica il DNA senza il bisogno di scaldare e raffreddare.

Isothermal amplification

- After PCR, several methods have been invented that doesn't require temperature change to amplify DNA
- Among them, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) is the most known
- Advantages:
 - Very simple instrumentation, just a stable heater, typ 60C
 - Faster than PCR, typ 10-15 min (continuous time)
- Disadvantages
 - Not quantitative (no cycles → no Ct → no calibration curve → no concentration)

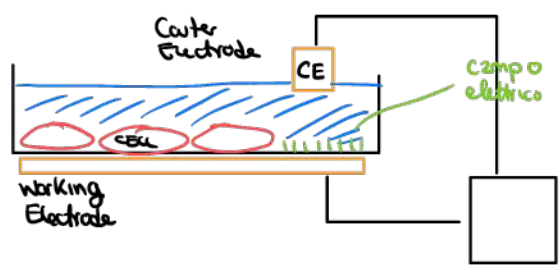
è più veloce della PCR classica ma non possiamo fare un quantitativo approssimativo con questa tecnica

Inoltre sono anche più difficili da realizzare

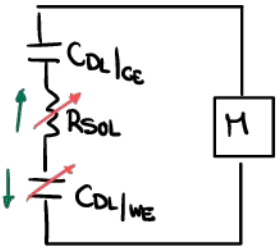
RITORNA LEZIONE CON IL CAPACITANZA

Contare le cellule in modo dinamico.

Quando abbiamo una cellula in una soluzione ionica abbiamo un elemento ad alta impedenza dentro un liquido a bassa impedenza. Avremo parlato della crescita delle cellule in un piatto di Petri.

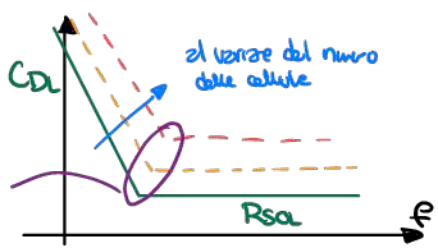


Circuito equivalente



Qual'è la frequenza ottima per calcolare l'impedenza Z ? Vediamo su bode

$|Z(f, f_0)|$

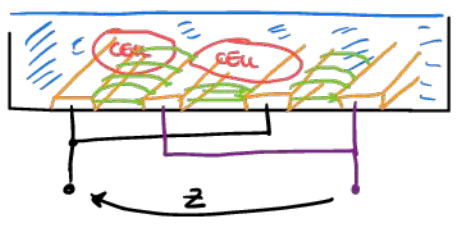


Tipicamente $CDL|CE$ è da considerare perché è molto grande

Qui ho la maggiore sensibilità

Quando abbiamo molte cellule abbiamo che R aumenta mentre la $CDL|WE$ diminuisce il punto ottimo dove staziona l'impedenza è dove ce' la corner frequency così riesco a tracciare il comportamento sia di R che di C

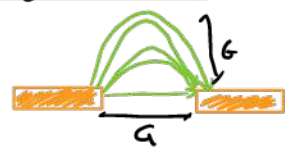
Questa era la vertical configuration, esiste anche un altro tipo di struttura Siffatta:



Complanar Configuration

Quello che cambia rispetto a prima è il campo elettromagnetico E

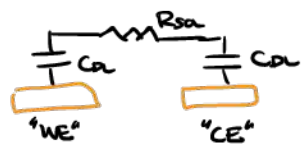
Possiamo dire che se la distanza tra gli elettrodi è G allora anche le linee del campo si alzeranno di una distanza G



Posso fare G in modo che sia uguale all'altezza delle cellule che andranno sopra gli elettrodi

Del punto di vista del modello è la stessa cosa rispetto a prima

ma l'effetto della cellula "seduta sopra" l'elettrodo può essere diverso, perciò il livello d'interazione tra cellula e campo elettrico è diverso



Sperimentalmente si vede che con la giusta G la capienza configurata è più precisa.

IMPEDANCE FLOW CYTOMETER

Vogliamo rilevare la presenza di cellule che viaggiano nel nostro microchannel

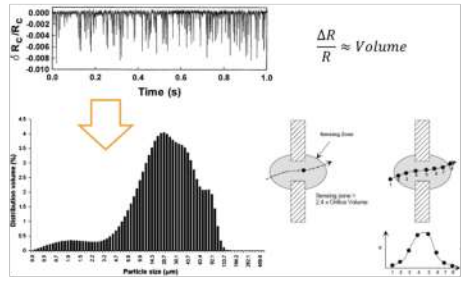
la base è lo stesso concetto dei nanopore solo che sono micropore cioè il buco è grande micrometry

Invented by W.H. Coulter 1950 A routine lab. instrument

March 24, 1970 W. H. COULTER ET AL. 3,502,974

Measures DC resistive pulses for cell counting and sizing

il picco di altezza di impedenza misurato è dipendente dalla grandezza della cellula quindi possiamo discretizzare le dimensioni delle cellule.



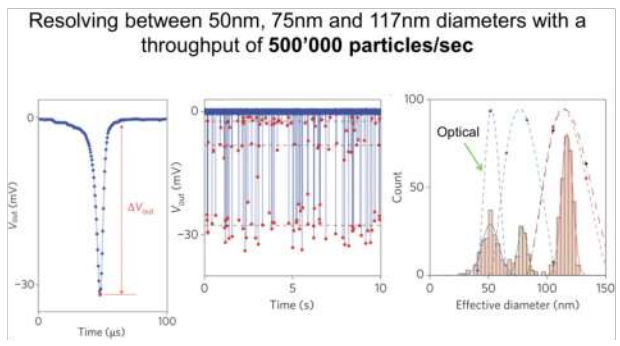
Tipicamente la parte con il microprolo è intercambiabile.

For circular holes:

Aperture diameter, μm	
0.4 - 12	50
15 - 20	75
25 - 30	100
35 - 45	150
50 - 60	200
75 - 90	300

Si può anche calcolare la resistenza fluidica del microporo, considerando il buco cilindrico.

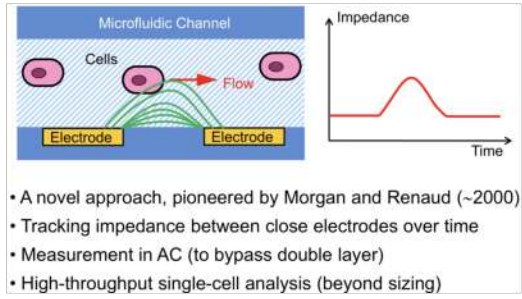
Vogliamo essere veloci a rilevare queste cellule, solo che c'è il solito trade off velocità rumore visto che per andare più veloce devo aumentare la banda dell'amplificatore



Qual'è uno dei rischi maggiori nell'uso dei micropori? è il clogging cioè il fatto che un insieme di cellule venga a bloccare il canale.

Se faccio il buco + grande non è una grande idea perché posso molto in sensibilità.

Possono trovare un modo di misurare le cellule senza contatto

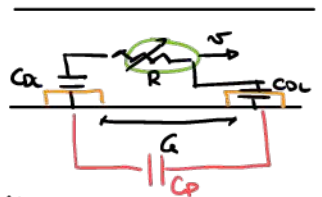


- A novel approach, pioneered by Morgan and Renaud (~2000)
- Tracking impedance between close electrodes over time
- Measurement in AC (to bypass double layer)
- High-throughput single-cell analysis (beyond sizing)

Usiamo il metodo di prima solo che qui le cellule fluiscono senza toccare l'elettrodo non comunque vedo un cambiamento d'impedenza.

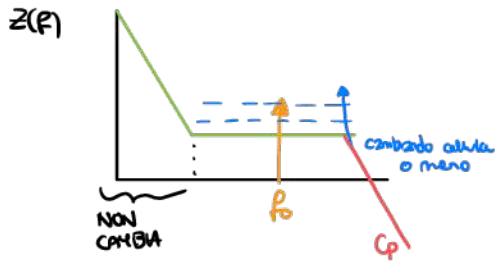
Non ho problema del clogging perché il canale microfluidico è molto largo.

• IN QUESTO CASO PERÒ HO TEMPO LIMITATO PER FARE LA MISURAZIONE



$$\Delta t = \frac{G}{v} \quad \text{tipicamente } \approx 91 \mu s$$

• **NOTE** in questo caso le cellule non toccano i WE perciò qui i double layer non variano anzi solo Rsa.

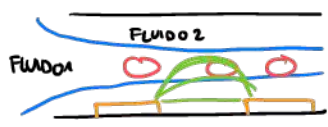


f_0 è il punto ottimo in quest caso dove fare la misurazione

ATTENZIONE!! Ad alte frequenze entra in gioco la capacità parassita tra WE, perciò non un limite sulle alte frequenze

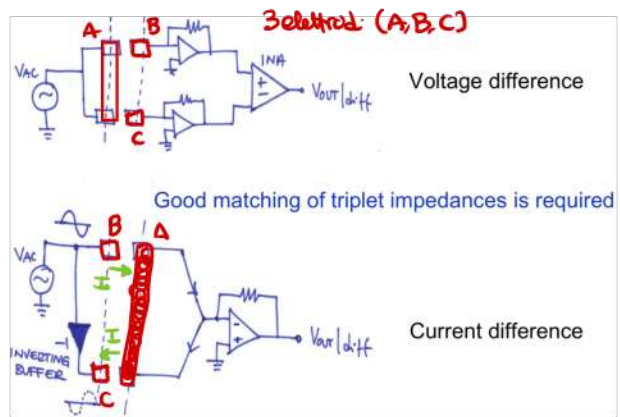
Un altro problema di questa tecnica è che l'altezza della variazione del picco di impedenza dipende dalla altezza cui passa la cellula, più la cellula è vicina agli elettrodi più il picco è alto (è parte di volume). QUESTO È UN PROBLEMA SE VOGLIO ESTRARRE LA GRANDEZZA DELLE CELLULE.

SI PUÒ USARE UN HYDRO DYNAMIC CHANNEL PER "BLOCCARE" LE CELLULE IN UNA DETERMINATA ZONA



Per ridurre effetti di common mode si può usare una tecnica differenziale usando 3 elettrodi misurando l'impedenza tra 2 elettrodi al colpo.

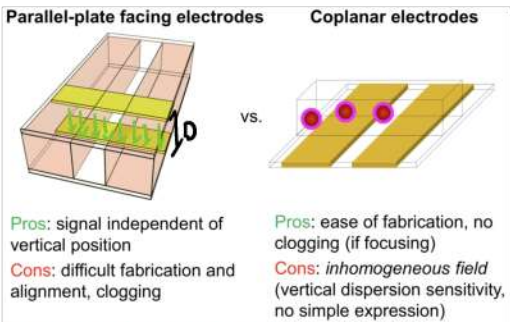
La differenza tra i 2 segnali può essere fatta sia in tensione che in corrente



In condizioni di bilanciamento la corrente nel transimpedenza ampli è 0 quando non c'è differenza di impedenza tra le correnti che entrano nell'ampli

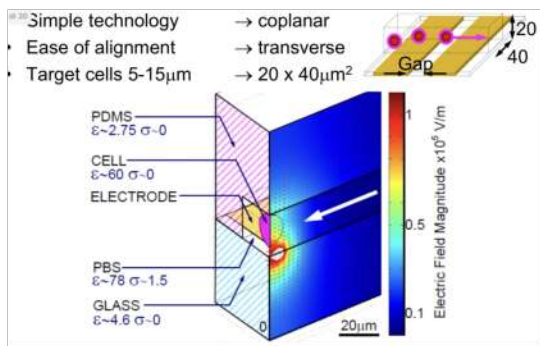
Quale tra i 2 è meglio? Dipende

Per ora abbiamo discusso della configurazione coplanare, posso mettere anche gli elettrodi sotto e sopra al canale, in questo caso il campo magnetico è fisso dritto ed un pro è che è indipendente dalla posizione verticale delle cellule

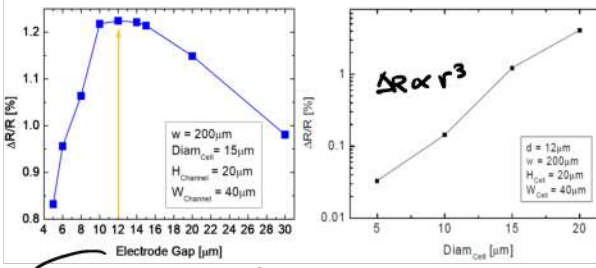


Uno dei lati negativi del caso coplanare è che il campo magnetico da calcolare è un cerchio.

Design of a Sensitive Electrode



- The gap sets the vertical extension of the sensing volume
- An optimal gap exists for a given cell diameter
- Sensitivity scales with cell volume and vertical height

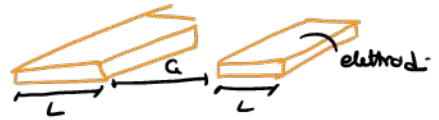
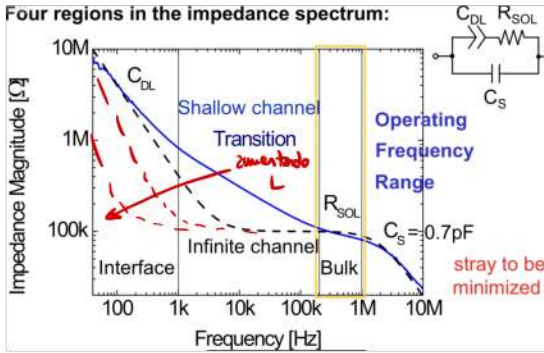


Distanza tra elettrodi

Tipicamente puntano la distanza tra gli elettrodi grande quanto la cellula da misurare

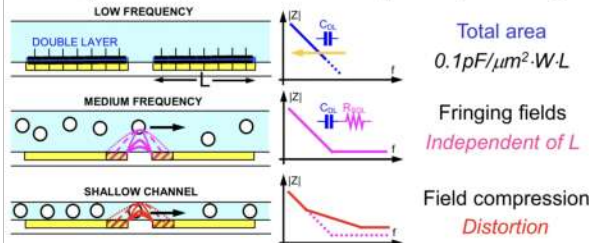
Un elemento importante è dato anche dalla lunghezza (larghezza) dell'elettrodo, perché la Double layer capacitance dell'elettrodo è dipendente della zona dell'elettrodo se tanto L quanto la zona del plateau

Four regions in the impedance spectrum:



la curva nera tratteggiata è quella ideale, nella realtà vedo che ho più Impedenza (ho un BW)
Questo effetto è dato da una distorsione del campo elettrico dovuta dal fatto che in questo caso l'acqua non è più incisa sopra il campo elettrico (ho ridotto il canale)

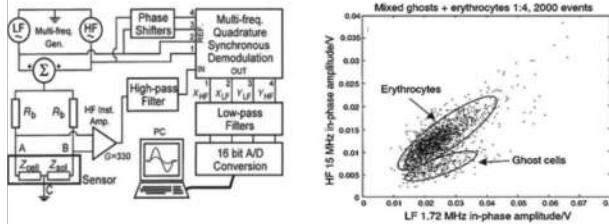
Different geometric parameters control separate spectral regions:



- R_{SOL} set by channel size and gap (max. sensitivity)
- Maximize L (and minimize C_S) to extend the resistive plateau
- Take into account impedance increase due to confinement

Questo fatto rende praticamente inutile fare un aumento della L degli elettrodi per aumentare il plateau perché zero sempre il canale piccolo e ci sarà sempre questo effetto.

Label-free cell discrimination based on intrinsic electrical properties



Two frequencies 1.7MHz and 15MHz

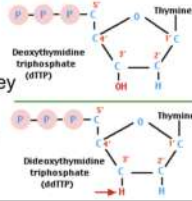
Non so cosa sta dicendo parla di cellule morte e 2 frequenze, quella bassa per contare e quella alta per classificare il tipo di cellula. Questo può poi essere utilizzato per poter ottenere un risultato nel canale microfluidico e fare un sorting delle cellule.

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

il costo del sequenziamento del DNA dal 2000 e' crollato. Dal 2004 il costo e' cominciato a crollare, ad oggi: sono circa 1000€ a sequenziamento.

Primo generazione di sequenziamento (198x - 2004)

- Sanger method (Chain termination "dideoxy").
- In the PCR mix, beside the normal deoxy-triphosphate nucleotides, a small percentage of dideoxy-tri-phosphate nucleotides is introduced.
- Those modified bases are incorporated by the polymerase in the growing DNA, but they don't allow the next step.
- So, the amplified strands are interrupted at the point where the dideoxy has been incorporated

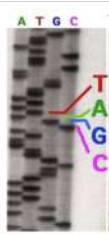


Tecnica simile al PCR, la polimerasi aggiunge una base alla volta. Il DNA si attacca tra la 3^a e la 5^a base

(Non ho capito un cazzo di quello che ha detto)

Dna sequencing

- A small percentage of Dideoxy base of a single type (Ex. Timine) is added to a PCR mix. The PCR is performed and the resulting DNA chains if are interrupted where the complementary base was present ((Ex. Adenine)
- By electrophoresis it is possible to quantify the lengths of the fragments. The lengths corresponds to the places where Adenine is present
- Repeating 4 reactions, adding each time a different dideoxy (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), it is possible to find the places of all the bases and so the sequence



Facciamo 4 test, ognuno modificato per una base.

L'unica cosa che ho capito e che abbiamo DNA di lunghezza diversa

Credo che la tecnica consista nel far sì che la polimerasi aggiunga basi finché non trova il complementare della stessa base

In pratica credo che in pratica per ogni base ho tanti DNA di lunghezza diversa d'istante da dove c'è la base. Poi faccio un test per tutte e 4 le basi. Poi faccio un grafico in base alla lunghezza e leggendo per la lunghezza riesco a capire qual'è la sequenza.

il grafico si può anche fare con elettroforesi, ma non si può sequenziare direttamente tutto il genoma tipo quello umano con l'elettroforesi: si usa lo shotgun sequencing (cioè sequenziano piccole parti di DNA).

Si basa sul fatto che prima di sequenziare il DNA lo bombardi con qualcosa in modo da spezzarlo in modo casuale. ATTENZIONE !! il DNA c'è l'ho in diverse copie quindi lo spezzo tutte e spaccandole casualmente zero delle parti che si sovrappongono. Allora io sequenzo tutti i pezzi e poi con un SW lo accorgo delle parti che si sovrappongono e allora unisco le 2 parti. ATTENZIONE! potrei non riuscire a sequenziare tutto

Un'altra cosa importante è la dimensione massima sequenziabile, perché se la dimensione massima è molto piccola è come se avessimo un puzzle con molti pezzi che è molto difficile da completare. Inoltre se la dimensione sequenziabile è molto lunga (quindi anche il DNA spezzato è abbastanza lungo) allora sono solo resistenti alle ripetizioni infatti nel DNA posso avere parti che si ripetono ma se i miei blocchi sono abbastanza grandi non c'è problema e non c'è una ripetizione e non una continuazione.

Second Generation sequencing

Second generation

- Flush and scan:

1. The 'library' is produced. It is a sample containing all the oligo subsequences generated by the shotgun specifically treated.
2. The library is used to make the array. Any oligonucleotide of the library is in a fixed place on the array, the position is random. The DNA is single strand and primed.
3. A solution containing a pure base is flown on the array and a single base is made to be attached to the growing chain.
4. It is measure where and if an incorporation happened
5. The procedure is repeated from Step 3, using a different base
6. For any pixel, the temporal series of measures gives the sequence of the corresponding oligonucleotide
7. Using Software the original whole sequence is reconstructed

Preparation

Run

Post Processing

Si basa sul paradigma flush and scan. All'inizio abbiamo tutti i pezzi riciccati dello shotgun sono messi su una base solida fissa

(nota: la shotgun può avere pezzi molto piccoli e molto lunghi che a noi non vanno bene, allora tramite la elettroforesi noi prendiamo solo i pezzi di DNA che ci vanno bene, così creiamo una libreria).

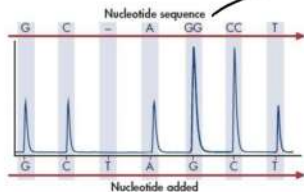
Prendiamo questa libreria e la mettiamo sull'array e sopra questa iniziamo a flushare sopra basi pure. Grazie ad un

effetto tipo PCR queste basi si attaccano alle loro basi complementari. Grazie a una tecnica che non ricordo vedo dove queste basi si incorporano e quindi so dove queste basi si pesano. Il grande vantaggio è che questo avviene in contemporanea per tutti i pezzi di DNA della "libreria". Quindi riesco a prendere molta informazione in parallelismo.

Per vedere se una certa base è incorporata in un punto del microarray si può usare una tecnica elettronica. È che una macchina fotografica che al posto di pixel ha i punti del microarray ed è sensibile ai protoni. Infatti i protoni indicano il PH della soluzione e grazie a questo riusciamo a capire come leggiamo il fatto che una nuova base sia incorporata. (Questa è la tecnica che non tornerò a studiare).

Pyrogram

- For any single pixel is recorded a specific signal. This relates the sequence of insertion of bases to the sequence of DNA



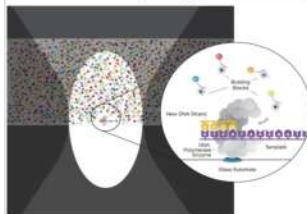
Spike + grande = molto probabilità ci sono 2 basi che si sono incorporate.

3a generazione di sequenziamento. Hanno sempre un array ma non ha bloccato il DNA ma bensì la polimerasi

NON CI HO CAPITO NUNCA !!!
lezione (1-35)

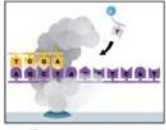
PacBio (3rd generation)

- DNA polymerase is placed on the bottom of a nano-well (1 single molecule per well)

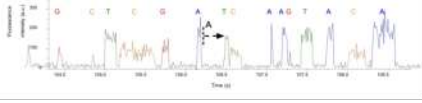


- The bases in solution are labelled with 4 different fluorophores
- Instead of being the polymerase moving on DNA is DNA moving over the fixed polymerase.

Working principle



- Every time a new base is incorporated, the relative fluorophore emits a fluorescence flash, its color depends on the kind of added base.



In pratica vedo che per zone la fluorescenza re: illuminano in un modo qualsiasi la parte solo zittero e che e' aumentata la reazione.

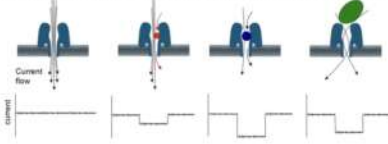
il vantaggio e' che noi dobbiamo fare flow e wash perche' il DNA passa da solo nella porcellana.

Un'altro vantaggio e' che qui usano direttamente il DNA senza fare lavorazioni.

4^o generazione: Nanopori

Towards 4th generation: nanopores

- A nanopore is a tiny hole in a membrane that separates two chambers containing ionic solution.
- A voltage is applied across the membrane, a current is produced by ions crossing the membrane through the hole
- When DNA enters in the pore, the ionic flow decreases and the measured current is reduced.
- Any macromolecule crossing the pore blocks the current in a different way, depending on its size.
- Measuring the current it is possible to know the size of the passing molecule



Ci sono di nanopori nella membrana. si basa sulla corrente che passa nel buco. (stessa cosa vista con il sequenziatore)

Non molto precisi: 20/30% di error rate.

Più che altro e' un metodo complementare rispetto ai precedenti, infatti tipicamente viene usato complementemente con la shotgun per "scaglie" le basi che ci sta meglio.

Con la shotgun infatti posso non vedere quale fosse tipo il DNA che si e' combinato.

in modo diverso (casero) allora uso questa tecnica così so l'ordine della sequenza.

12.05.2021

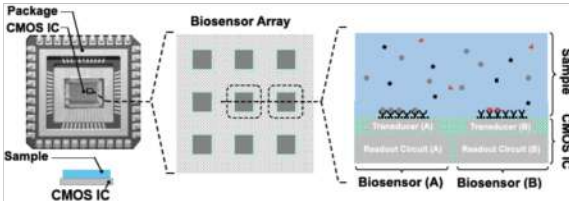
Lezione

2h

CMOS Biochip

Ci si aspetta che la microelettronica stenda nel campo medico.

Andando nel campo della microelettronica abbiamo che abbiamo una limitazione nella massima potenza dissipata e nei valori dei componenti (R, L, C) (tipo di cui non posso farlo).

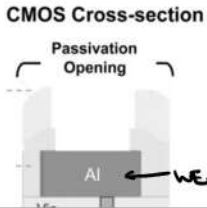
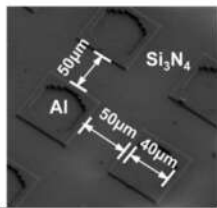


Aluminum of metal lines and bonding pad is too reactive and must be «converted» into gold or platinum for electrochemical detection.

The top passivation (Si_3N_4) is waterproof.

Unione tra microelettronica e microfluidica, ci saranno dei pezzi di metallo che spuntano dal substrato che fanno da working electrodes.

il problema e' il tipo di metallo. In microelettronica tipicamente il metallo che si usa verso il modo esterno sono alluminio e rame, questi non vanno bene per l'elettrochimistry. Abbiamo visto che il top sarebbe oro o platino.



Abbrazzo che l'elettrodo e' qui in una sorta di buco. Questo succede per come e' stato creato il circuito (per passivazione?) questa montaggio puo' ridurre il movimento del fluido e la diffusione.

Prima di tutto vogliamo cambiare metallo con uno + compatibile e poi vogliamo che ricopra tutto con un nuovo strato di metallo

non ci sia la montaggio. Si puo' per se questo ci sono 2 modi:

In the clean-room	On the bench
Accurate (expensive) Limitation on materials Temperature limitations: Chip: 450°C PDMS: 343°C SUB: 200°C Glue: 340°C	Electroplating High roughness

Uno in camera bianca con la stessa tecnica che zeemo visto in passato e l'altra con l'elettroplating che fa crescere il metallo dove vogliamo.

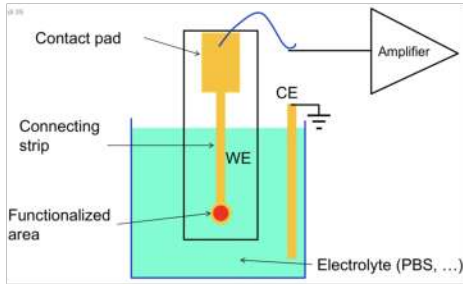
Lo svantaggio e' che non sono molto liscie con questa tecnica

Qual e' l'input di zero il silicio come substrato di supporto?

il vantaggio e' che possiamo mettere l'amplificatore subito in modo da fare poca strada e zero poco rumore.

Ci sono svantaggi: ad zero il silicio come substrato pero'?

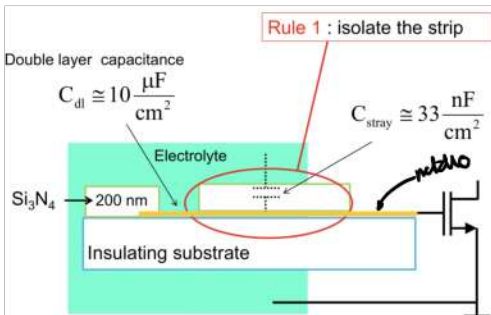
Si, supponiamo di essere in una situazione del tipo



Possiamo zero 2 casi:

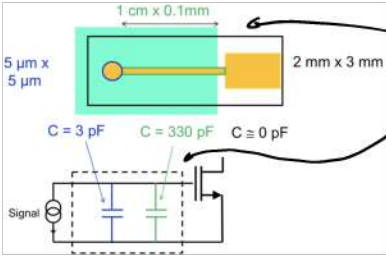
- Substrato isolato
- Substrato di silicio

Substrato isolato

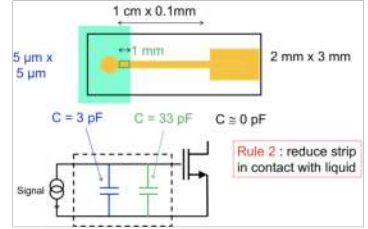


Avremo comunque una capacitai parassita dovuta al fatto che il metallo e' isolato dal substrato da un piccolo strato di materiali isolante. Al contrario nel caso del vetro la zona isolante era molto alta e quindi la capacitai era molto piccola

Per ridurre questa capacità: Fare l'isolato + spesso possibile, e ridurre la lunghezza inutile per la qual netto il working electrode non zocqua

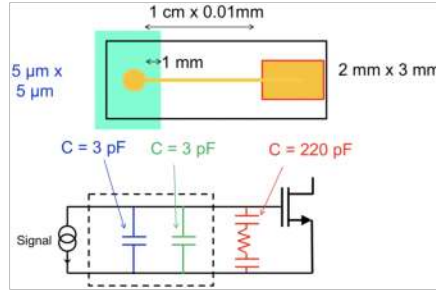
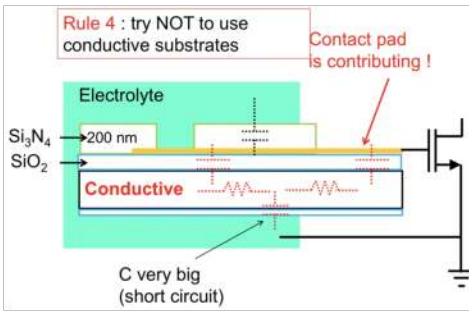


Se al posto di mettere dietro l'acqua netto dietro solo il w/e riduco questa capacità



Substrato di Silicio

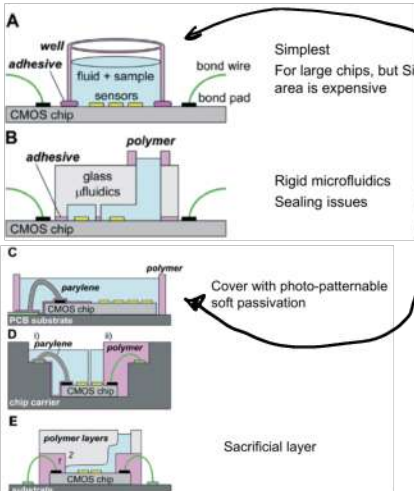
In pratica non c'è il substrato di silicio e sopra il silicio non il metallo e l'isolante, il problema è che il silicio in pratica diventa acqua.



Che porta molto più rumore (circa 3 volte tanto) e quindi il substrato di silicio non è il top.

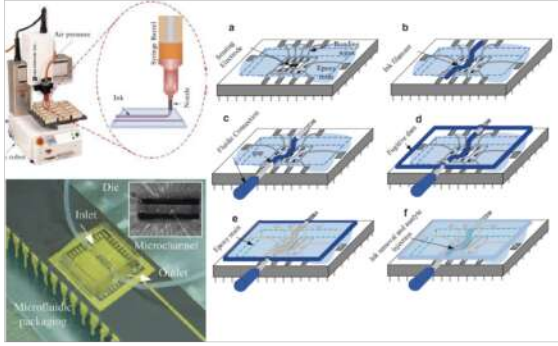
Packaging

In elettronica tutti i packaging sono fatti per risolvere il chip del mondo esterno, al contrario qui vogliamo tenere delle regioni del chip aperte tali da determinati punti passano l'acqua su cui vogliamo fare i test!



Possiamo mettere un contenitore per avere il fluido solo sulla parte di chip, il problema è che di solito la parte microfluidica è molto più grande di quella del chip, allora si può fare una rete (che copriamo tutto con un polimero e poi lo togliamo dove c'è senso, ma è difficile dal pto di vista del substrato e materiali (quando intenda che è difficile pulire bene tutto)).

Si può anche fare con un 4° filamento scrivibile:



ho il chip, ci costruisco un canale per
ci metto il plasma sopra 2 volte,
poi uso un solvente per rimuovere il
cerone iniziale.

il problema principale è che non so
se riesco a pulire molto bene il
cerone con il solvente.

TESI INTERESSANTI PER IC