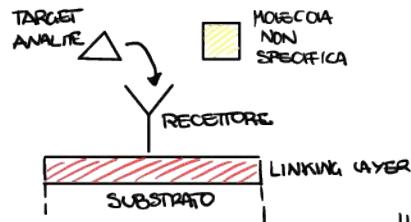


Biochip

BIOSENSORS

- UN SENSORE CHIMICO BARATO SU UN'ENTITÀ BIOLOGICA
(DEFINIZIONE FORTE)
- UN SENSORE CHE MONITORA LO STATO DI SISTEMI BIOLOGICI (DEFINIZIONE DEBOLE)
[DEFINIZIONE CHE GUA PIADE]

TIPICAMENTE ABBIANO UN FLUIDO CHE ESCE DAL CORPO E VOGLIAMO ANALIZZARE IL FLUIDO PER OBTENERE 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 RESEPTORE, QUANDO LA MOLECOLA E IL BIORESEPTORE SI COMBINANO C'È UNA RIDUZIONE DI ENERGIA ELETROSTATICA DEL SISTEMA E LANZANDO UN SEGNALE POSSO ARRIVARE A INTERROGARE LA PRESENZA DELLA MOLECOLA.



CI SONO 3 TIPI DI MECCANISMI DI AFFINITÀ MOLECOLARE

- ANTIBODY-ANTIGEN (IMMUNSENSORS)
- ENZYME-SUBSTRATE (ENZYHATIC SENSORS)
- DNA AND NUCLEAR ACIDS (GENOSENSORS)

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

PARAMETRI GEOMETRICI: oltre la dimensione, in altre molecole (es DNA) che sono più articolate tipicamente si considera la lunghezza e il Raggio of gyration

ANTIBODY

GLI ANTIGENI SI COMBINANO ALL'ANTIBODY ALLE 2 ESTREMITÀ

ENZIMI

INIBITORI → MOLECOLA SIMILE ALL'ANALITE CHE SI COMBINA COMUNQUE MA QUESTO NON CI VA BENE CI RONINA LA VETTURA

DNA

LA DIMENSIONE PIÙ IMPORTANTE DEL DNA È IL DIAMETRO TRA LE 2 SPIE TIPICAMENTE 2,5nm. LA LUNGHEZZA INVECE PUÒ ESSERE LUNGA CM. LA DISTANZA TRA LE BASI È TIPICAMENTE DI 0,38nm.

TUTTE QUESTE RILEVAZIONI AVVENGONO NELL'INTERFAZIA

VOGLIAMO INOLTRE FARLE QUESTI RILEVATORI ECONOMICI E PICCOLI.



PARADIGMA → LAB ON A CHIP (AD OGGI LE ANALISI SONO FATTE IN LABORATORIO, NOI VOGLIAMO TUTTO SUL CHIP) QUESTO HA SENSO XE' NOI CERCHIAMO UNA MOLECOLA PICCOLA → NON ABBIANO BISOGNO DI MACCHINE GRANDI PER RIVESTIRLO, INSTEAD FACCIOMO MENO USO DI REACTANTI CHE COSTANO UN BOTTO.

SAMPLE PREPARATION → FILTRIAMO PRIMA LE MOLECOLE CHE SAPPIAMO CHE NON VANNO BENE O DANNANO FAESI POSITIVI.
ALL'ANALISI VOGLIEMMO SOLO ACQUA + LE MOLECOLE CHE CERCHIAMO.

24.02.2021

2h LEZIONE

• MOVING FLUIDS

(COME MUOVERE I FLUIDI NEI MICROCANALI)

IN QUESTO MONDO MICROSCOPICO LE EQUAZIONI DEI FLUIDI SONO LE STESE, VECCHIO ANCORÀ LE NAVIER-STOKES (FINO A DECINES DI NANOMETRI) E A NOI CI BASTANO.

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

- DENSITÀ (ρ)
 - VISCOSITÀ (η)
 - TENSIONE SUPERFICIALE (σ)
- } Dipende dalla temperatura

- **FLUIDI SEMPLICI** FLUIDO NEWTONIANO O NON

- **COMPLEX FLUIDS** È UN FLUIDO SEMPLICE CON PARTICELLE DI IONI IN SUSPENSIONE (ELETROTELE → SIMPLE FLUID + IONS IN SOLUTION)

CARATTERISTICHE

- **DENSITÀ** → Ci interessa per sapere per sapere se le particelle galleggiano, affondano o fluttuano [$\rho = \text{Mass}/\text{Volume}$ [kg/m³]]
La dipendenza dalla temperatura non è molto forte

- **VISCOSITÀ** → Importante xe' c'è un modo per esprimere come i layer del liquido si legano tra loro
È definita come il rapporto dello shear stress su shear rate

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

È importante per sapere come si muoverà il fluido nei microcanali:

La Viscosità è molto dipendente dalla temperatura (quasi esponenziale)

La Viscosità può cambiare in casi di fluidi Newtoniani e non, il sangue è un fluido non Newtoniano. Infatti se impiego una forza ad un fluido non Newtoniano questo cambierà la sua viscosità, in caso di fluidi Newtoniani non cambia

FLUSSO LAMINARE → Tutti i layer del fluido si spostano ordinatamente e indipendentemente degli 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)

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

$Re > 3000 \rightarrow$ Flusso Turbolento

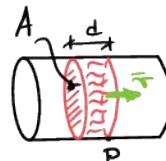
Questo perché r è molto piccolo e tipicamente v piccole. (MICROFLUIDICS)

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

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

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

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

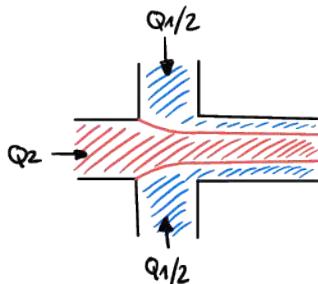


-PORTATA VOLUMETRICA

Si calcola come

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

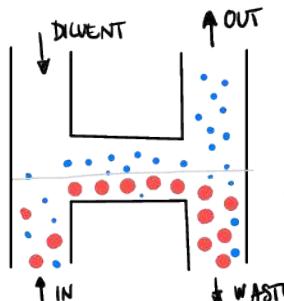
ES. FOCUSING HYDRODINAMICO → VOLIAMO CONFINARE IN UNA ZONA PIÙ STRETTA UN LIQUIDO



FLUIDO 2
FLUIDO 1

CLOGGING → ACCADE SE USANO I MICROCANALI SENZA FOCUSING IDRODINAMICO.

USARE IL FLUIDO CONFINATO ENTRO IL CLOGGING, CIÒ È IL FATTO CHE IL CANALE SI INTASCI A CAUSA DELLE PARTECIPAZIONI. QUESTO FUNZIONA PERCHÉ NON HA DEI MURI "RIGIDI" ATTORNO AL FLUIDO 1.



Si basa sulla diffusione, infatti le molecole piccole tendono a diffondersi di più, non c'è effetto al 100%

ES 2) FILTRO AD H

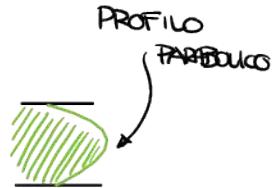
VOLIAMO FISICAMENTE SEPARARE 2 PORZIONI DI MOLECULE (AD ES GRANDE E PICCOLE)

NON MOLTO VERTO

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 SUP → Velocità bassa sui muri e più veloce nel centro (+ realistico)



Esiste una tecnica per sapere eventuali difetti del canale misurando la velocità delle particelle in tutto il canale (avendo una pressione/potere costante)

• RESISTENZA AL FLUSSO

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

$$\text{POISUUE LAW} \rightarrow Q = \frac{\Delta P}{R} \quad \begin{array}{l} \Delta P = \text{differenza di pressione} \\ R = \text{RADIO SOSPETTO ALLA LEGGE DI OHM} \end{array}$$

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

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

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 buttiamo dentro. Se la geometria è molto diversa da un arco (lunghezza > 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.

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

Possiamo vedere come una variazione di pressione che impone una variazione di volume.

$$\text{Otteniamo che una costante di tempo } [Rh \cdot Ch] = \left[\frac{Pa \cdot s}{m^3} \cdot \frac{m^3}{Pa} \right] = [S]$$

Per avere una variazione di volume e seguito di una variazione di pressione abbiamo 2 casi:

- **Fluido compressibile**: es Ar12 ed acqua (aria si comprime)

- **Muri non Solidi e flessibili**: Palloncino

1.03.2021

2h DI LEZIONE

Double layer

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

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

QUESTO CAMPO ELETTRICO ATTRARREGLI IONI POSITIVI (IN QUESTO CASO AL MURO), SE APPLICHIAMO UN ANTO CAMPO MAGNETICO NEL VERSO DELLA LUNGHEZZA DEL MICROTUBO, QUESTO FARÀ MUovere IL FLUIDO AVANTI PER VISCOSITÀ.

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

INOLTRE CON QUESTA TECNICA IL PROFILo DI VELOCITÀ NEL TUBO È PRATICAMENTE COSTANTE E NON PARABOLICO COME VISTO NEL CASO DELLA POMPA.

Tensione Superficiale

È DEFINITA A PARTIRE DA UN FILO DI LUNGHEZZA L E IL FILO È SUL LIQUIDO. SE ALZIAMO IL FILO DOBBIANO APPLICARE UNA FORZA CHE È LA GRAVITÀ + UN'ALTRA FORZA CHE È PROPORTIONALE ALLA TENSIONE SUPERFICIALE

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

γ = COEFFICIENTE DI TENSIONE SUPERFICIALE

WETTABILITY

Proprietà di una superficie che dice quanto un liquido è portato ad aderire alla superficie solida.

HYDROPHILIC → il liquido tende ad aderire al solido

HYDROPHOBIC → il liquido minimizza la superficie di contatto con il solido

Quando abbiamo un liquido e un solido possiamo misurare l'angolo tangente della goccia sul solido. se l'angolo è basso → good wettability al contrario angolo grande bad wettability

ELECTROWETTING

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

per fare questo dobbiamo mettere un isolatore tra liquido e solido.

questa proprietà può essere utile per manipolare le gocce.

• MOVING PARTICLES

Se la particella è carica - usiamo un campo magnetico (eletto-forze)

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 $L_{\text{DIFF}} = \sqrt{D \cdot t}$

TIPIFICAZIONE AIUTA NELLA DIFFUSIONE

SINGLE MOLECULE DETECTION

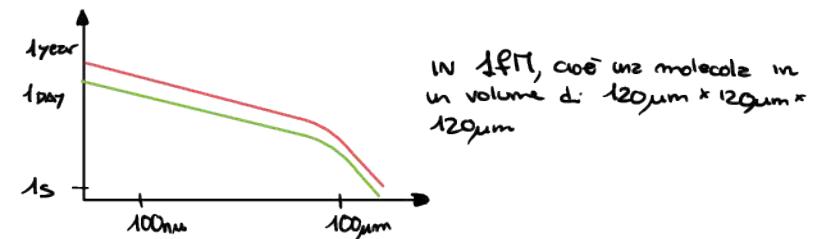
Se io ho unz sola molecola nel liquido posso aspettarmi che casualmente per diffusione le molecole arrivi sul mio sensore?

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

il tempo per scoprire queste molecole dipende del volume e dalla dimensione del sensore

ESEMPIO DI GRAFICO

qui ceprimo che
non ci basiamo
sulla diffusione
tipicamente richiede troppo
tempo.



NUMERO DI PECLET

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

DRAG FORCE

Se la particella si move contro il fluido (che è fermo) allora la particella deve compiere una forza detta da fluido.

Per una molecola sferica è:

$$F_{\text{DRAG}} = -6\pi\eta r v$$

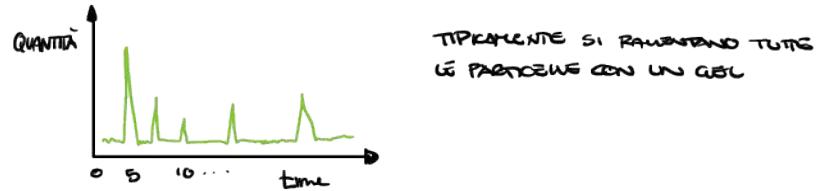
ELETROKINETICA

CAMPIONE ELETTRICO PER MUOVERE SONO LE PARTICOLE (NOI SPECIFICO FLUIDO SENZA IONI QUI)

$$F_E = qE = F_{\text{DRAG}} = 6\pi\eta r v \quad \leftarrow \text{Le 2 forze tendono a equilibrarsi e quindi la particella non accelererà più e si move a velocità costante.}$$

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

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



DIELETROFORESI

è se avessimo una molecola neutra?

Se la molecola è polenzabile, se mettiamo la particella in un campo magnetico che ha un gradiente speciale, così posso sposterla.

Vediamo la molecola come un dipolo

PERMEABILITÀ DI UN MATERIALI

$$\epsilon = \epsilon_0 + \frac{\sigma}{j\omega}$$

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

FORZA DIELETROFORERICA

Questa forza è proporzionale al gradiente del campo

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

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

$$\vec{F} = 2\pi \cdot r^3 \cdot \epsilon_m \cdot \operatorname{Re}\{K_m(\omega)\} \cdot \vec{V} E^2$$

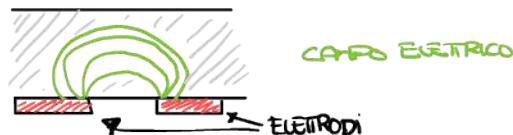
K_m : CLAUSIUS MOSSOTI FACTOR (QUANDO È POSITIVO ABBIANO POSITIVE ELECTROPHORESIS, SE È NEGATIVO IL CONTRARIO) QUESTO VALORE DIPENDE DA UNA FREQUENZA

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

AD ESEMPIO SE VOLIAMO DIVIDERE I GLOBULI ROSSI DA QUELLI BIANCHI VADO A VEDERE IL VALORE DI MOSSOTTI CHE MI ATTRAI I GLOBULI ROSSI E MI REPELLE I GLOBULI BIANCHI.

CAGINA: 4 o più elettrodi che repellono la particella ma gli elettrodi sono messi in modo da bloccare la particella.

Nella rete gli elettrodi sono sul fondo del microcanale messi in modo complementare



03.03.2021

2h DI LEZIONE

DIGITAL MICROFLUIDICS

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

Sono possibili 2 architetture

- Beads on canals, ma usiamo una combinazione di 2 fluidi, uno che porta i campioni e l'altro che serve solo a distanziare i campioni
che non si mischiano
- Surface based, beads su un array di punti che tramite l'elettronetting comandano le gocce

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

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

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

Nell'elettronetting il dielettrico spezzettato è essenziale.

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

Infatti per avere forza laterale dobbiamo fare sì che i 2 pedi vedano leggermente a sovrapporsi. Per farla muovere metto il ped della goccia idrofobico e quello dove voglio che vada in idrofilico.

Un ulteriore vantaggio della configurazione 2 è che si possono usare questi eletrodi/ped come dei sensori. In fatti questi sono come dei condensatori, infatti basta misurare l'impedenza e ricavare l'E 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 connesse.

Microfluidics Components

I design microfluidici sono praticamente tutti custom

CANALI → La cosa da L'identifica di più è la forma della cross-section. La forma più comune è quella a rettangolo. Non avremo praticamente mai sezione circolare

Inoltre l'altezza dei canali è tipicamente fissa e giochiamo solo con le differenze 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 valvola per fare solo ON/OFF, usiamo come componente che permette il passaggio unidirezionale del fluido (diodo).

Per le ande della valvola di Tesla.

VALVOLE ATTIVE POSSONO COMANDARE IL FATTO CHE CONDUCANO O NO IL FLUIDO.

Tipicamente la valvola è fatta da un materiale flessibile e l'attuator 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 zampa la sua pressione blocca il flusso dell'altro. Ha degli svantaggi però perché fare strutture multilayer è molto difficile e inoltre 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' succederà che si mischiano.

onde 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.

Peristatic 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 flusso costante.

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

08.08.2021

2h DI LEZIONE

Un modo per ridurre i ripetuti dovuti alle pompe peristatiche 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

Essenziale per connettere il sistema microfluidico con il mondo esterno.

Per fare questo possiamo usare lo stesso tubo da cui mettere 2 parti rigide per mettere un tubo flessibile e collegare la la pompa peristatica.

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 una 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 egualmente distribuite quando il materiale è normale, quando lo premetto creano un rimbalsamento delle cariche e quindi creano un dipolo).

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

PERSTATIC MICROPUMP

Un modo di spostare nel chip la pompa

TUBING CONNECTION

Tipicamente si usano tubi di plastica con una parte finita con un ago 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 viene usata nei laboratori, per self-analysis serve qualcosa di più semplice

MICROFABBRICAZIONE

Ci troviamo sul bordo dello standard tra microtecnologia e standard fabbricazione delle plastiche, 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 usano la litografia che è la tecnica hard.

CLEAN ROOM

Vogliamo un ambiente in cui non ci può essere perché sommo potrebbero rovinare la fabbricazione dei chip.

Il substrato preferito è il silicio, infatti il silicio è molto usato in diversi ambienti e MEMS (Micro electrical Mechanical Systems)

- Bulk → eliminiamo il materiale del substrato
- Processo 2 layer → aggiungiamo i layer e così possiamo creare la struttura che ci serve

Il nostro obiettivo è trasferire il design dal progetto al wafer di silicio

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

1) PVD Evaporazione termica: vogliamo coprire il wafer con il metallo. scaldiamo molto il metallo in una camera a vuoto con il wafer, così facendo elargi atomi del metallo zatteremo e depositarsi sul wafer. Processo molto lento, in base al tempo che lasciamo il sistema lavorare 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: Iniziamo da un gas che quando tocca la superficie del substrato lascia un alone di silicio e rilascia ossigeno. A differenza degli altri qui il sistema non è caotico ma gli atomi di silicio raggruppati possono essere ordinati

4) DEPOSIZIONE LIQUIDA: Usata 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 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 zucare dei pattern di metallo sul substrato

Prima si deposita il layer sacrificale, poi si mette il layer di metallo sopre 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 plastic 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 vantaggi e svantaggi
Per collegare il PDMS al vetro usiamo il plasma, queste serve per chiudere i canali.



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

Il problema del PDMS è che non ha scorsa possibilità di scalarlo a livello industriale, infatti PDMS è tipicamente usato solo in laboratori per lavori DIY clean room

UN ALTRO APPROCCIO SCALABILE A LIVELLO INDUSTRIALE E' Si-NR, che è come un vello di photoresist che è photopatternabile, quindi noi facciamo il pattern su questo adesivo che attacchiamo sul substrato e poi ci mettiamo sopra il vetro

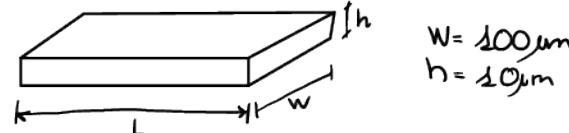
10-03-2021

ESERCITAZIONE

2h DI LEZIONE

(DOVREBBE CARICARE IL FILE)

1) Micro canale rettangolare



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

a) $L = 1\text{mm}$

b) $L = 10\text{mm}$

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

FACCIA IL MODELLO ELETTRICO EQUIVALENTE



Sappiamo che $w/h = 10 > 1,4$ possiamo usare l'espressione specifica per i microcerchi 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 $R = \frac{12 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s} \cdot 10^{-3} \cdot \text{m}}{(1 - 0,63 \cdot \frac{1}{10}) (10 \cdot 10^{-6})^3 \cdot 100 \cdot 10^{-6} \cdot \text{m}^4} = 128 \cdot 10^{12} \left[\frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3} \right]$

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

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

e quindi $\Delta P = R \cdot Q = \frac{10^3 \frac{\text{m}^3}{\text{s}}}{1} \cdot 128 \cdot 10^{12} \cdot \frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$
 $= 128 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ Ricordare $10^5 \text{ Pa} = 1 \text{ atm}$
 $= 1,2 \text{ atm}$

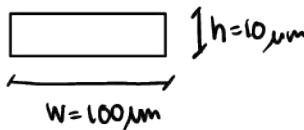
PUNTO b)

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

$$R' = 10 \cdot R \quad \text{e anche } \Delta P' = 10 \cdot \Delta P = 12 \text{ atm} \quad \text{E UNA PRESSIONE 1000 ATMA}$$

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

ES 2)



Potremo 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

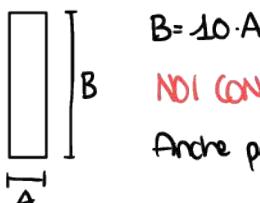
$$r_{eq} = \frac{w \cdot h}{w+h} \approx h$$

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

Mentre nella formula specifica per i canali rettangolari ottieniamo $R_0 = 1,2 \cdot \frac{\eta \cdot L}{h^4}$

Così dunque per progettare per circa il doppio (non è malvagio)

■ COSÌ CAMBIEREBBE SE IL CANALE FOSSE COSÌ

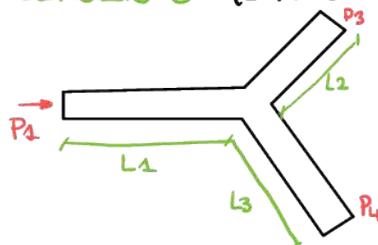


$$B = 10 \cdot A$$

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 (veli sempre in microfluidics)

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

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

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

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

$$P_3 = 0,17 \text{ MPa}$$

$$P_4 = 0,17 \text{ MPa}$$

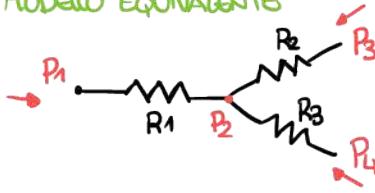
Noi imponiamo
quasi pressioni
in tutti e 3
i tubi

Supponiamo sezione circolare
con un raggio pari a

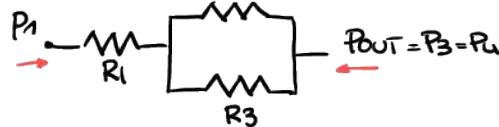
$$r = 20 \mu\text{m}$$

OBIETTIVO \rightarrow FLOW RATE NEI 3 ram: Q_1, Q_2, Q_3

1) MODELLO EQUIVALENTE



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



RICAVIAMO LE RESISTENZE

$$R_1 = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi r_1^4} = \frac{8 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}}{\pi (20 \cdot 10^{-6})^4} = 79,5 \cdot 10^{12} \frac{\text{Pa} \cdot \text{s}}{\text{m}^3}$$

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

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

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



Otteniamo quindi:

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

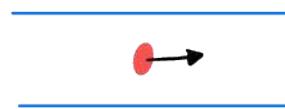
$$P_2 = P_1 - Q_1 \cdot R_1 = 110 \text{ kPa} - 54 \cdot 10^{-12} \cdot 79,5 \cdot 10^{-2} = 105,7 \mu\text{Pa}$$

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

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

ESERCIZIO 4)

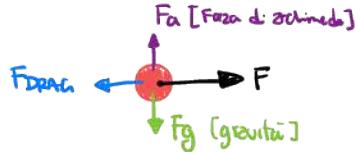
Prendiamo il caso di avere una particella nel liquido guidata da una forza esterna che non ci interessa.



$r = 5 \mu\text{m}$
BEAD (la particella)
POLISTIRENE
FERRO

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

Quali sono le forze sulla particella?



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

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

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

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

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

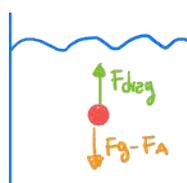
Quindi se $\rho_{\text{BEAD}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}} > 0$ la particella va sul fondo, se è $<$ la particella è in sospensione mentre se è minore di 0 sale a galla.

Calcoliamo la forza verticale nel caso la particella fosse ferro.

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

ESERCIZIO 5

VERTICAL MOTION \rightarrow Vogliamo trovare la termica velocità della particella di ferro vista in precedenza (senza forze orizzontali e velocità orizzontali)



Seppiamo che la particella cade

Troviamo la velocità terminale impostando $v = \sum \bar{F}_y = 0$
Quindi

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

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

Da cui ottieniamo 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 $0,1 \text{ s}$ ed arrivare sul fondo

ESERCIZIO 6

ELETROOSMOSI

Consideriamo il canale rettangolare
vogliano in flusso $Q = 1 \mu\text{l/mm}$
tramite elettroosmosi, 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'ammontare degliioni nella soluzione)

Seppiamo poi che $E_{\text{H}_2\text{O}} = 80 \cdot E_0$



$$V_{E0} = \frac{E h_0 \cdot \xi \cdot E}{\eta} \quad \text{CON } E = \frac{\Delta V}{L} \quad \text{in piane parallele}$$

viscosità

$$V = \frac{Q}{w \cdot h} = \frac{1 \mu\text{L}/\text{min}}{10 \mu\text{m} \cdot 100 \mu\text{m}} = 0,016 \mu\text{m}/\text{s}$$

Possiamo quindi calcolare ΔV come

$$\Delta V = E \cdot L = \frac{V \cdot \eta}{\xi \cdot h_0} \cdot L \approx 4500 \text{ V} \quad \text{molto alta per } L = 10 \text{ mm}$$

Capiamo che è molto difficile misurare 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 tecnica va molto bene quando non ci sono moltissimi test da fare.

ESERCIZI

(ESERCIZIO SUL ELETROFORESI, VEDERE VIDEO/SLIDE ESERCIZI CIRCA 30min dopo INIZIO)

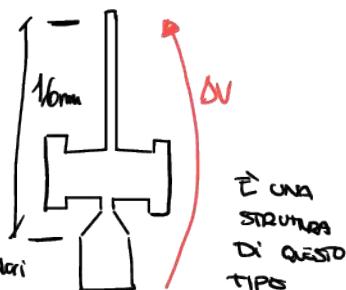
- VELOCITÀ DELLA MOLECOLA DI DNA QUANDO UNA $\Delta V = 15 \text{ V}$ È APPLICATA
- QUALE È LA CARICA DEL DNA?
- FRAME RATE DELLA CCD CAMERÀ?

- ABBIAVO UN GRAFICO CHE CI DA LA VELOCITÀ IN BASE AL CAMPO MAGNETICO.

Sappiamo che 1000 V (625 KV/m)

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

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



b) $\mu = \frac{Q}{6\pi r g \cdot \eta}$ usiamo la viscosità dell'acqua

Noi vogliamo ricavare la pendenza della curva del grafico che è μ come $r g$ per il DNA prendiamo $\frac{1}{\mu}$

E poi estremo la curva, quindi:

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

e quindi:

$$Q = \mu (6\pi \cdot r g \cdot \eta) = 16,6 \cdot 10^{-9} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{V s}} \right] \cdot (6\pi \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}) \\ = 314 \cdot 10^{-18} \text{ C}$$

Calcoliamo il numero d'elezioni (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 Kbasis strand, allora

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

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

c) Quanto frequentemente deve la camera fare foto?

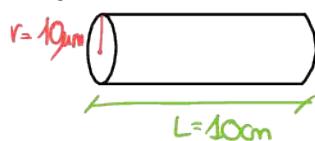
Numero random

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

$$t_{travel} = \frac{l}{v} = \frac{1,6 \text{ nm}}{0,15 \text{ m/s}} \quad \text{perciò il frame rate sarà FR} = \frac{10}{t_{travel}} \\ = \frac{10 \cdot 0,15}{1,6} \underset{!}{=} 1 \text{ Hz} \\ = 1 \text{ fps}$$

ESERCIZI SUI CONDENSATORI FLUIDICI

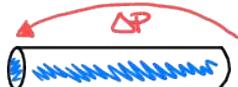
Consideriamo la compressibilità dell'acqua, trovare la costante di tempo idraulica associata a questo microcanale.



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

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

Questa compressibilità viene definita come $\beta = -\frac{1}{\text{Volume}} \cdot \frac{\partial \text{Volume}}{\partial \text{Pressione}}$



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

$$\tau = R \cdot C$$



$$C = \frac{\Delta \text{Volume}}{\Delta \text{PRESSIONE}} = \beta \cdot \text{Volume}$$

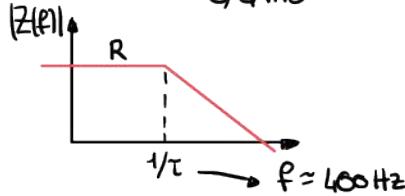
Perciò

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

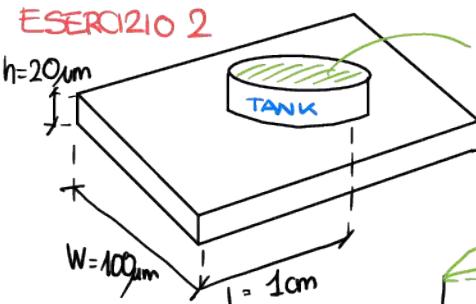
$$\beta = 5 \cdot 10^{-5} \text{ atm} \rightarrow 1 \text{ atm} = 10^5 \text{ Pa}$$

$$\begin{aligned} & \text{Qui dobbiamo usare} \\ & 1 \text{ Pa così si} \\ & \text{semplifica} \end{aligned} \rightarrow = \frac{8 \cdot 10^3 \text{ Pa} \cdot s (10^{-1})^2}{(10 \cdot 10^{-4})^2} \cdot \frac{5 \cdot 10^{-10}}{\text{Pa}} \\ = 0.4 \text{ ms} \end{aligned}$$

Se vogliono plottere il bode otteniamo

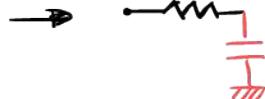


ESERCIZIO 2



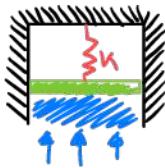
MEMBRANA ELASTICA DI DICHIERO 100 μm

Trovare la costante K della membrana per ottenere di infettare 100 μm segnale impulsivo periodico $T=2$ s



$$\tau = R \cdot C$$

Facciamo questo modello semplificato, il setaccio ha tutti i muri rigidi ma il terreno 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

$$C = \frac{\int Q(t) dt}{P} = \frac{\Delta V_{air}}{P} = \frac{\Delta z \cdot \text{Area}}{P}$$

$P = F \cdot \text{Area} = K \cdot \Delta z$

$$\begin{aligned} &= \frac{\Delta z \cdot \text{Area}^2}{\Delta z \cdot K} \\ &= \frac{\text{Area}^2}{K} \end{aligned}$$

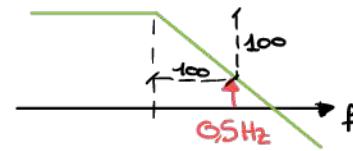
Sappiamo che abbiamo un periodo

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

$$f_{-3dB} = \frac{f_{pulse}}{100} = 5 \text{ Hz} = \frac{1}{2\pi R C} \tau$$

$$\tau = \frac{1}{2\pi S \text{ Hz}} = 31,8 \text{ s} \rightarrow C = \frac{\tau}{R}$$

Perciò $C = \tau/R = 185,3 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{m}^3}{\text{Pa}} \right]$



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

$$C = \frac{\text{Area}^2}{K} \rightarrow K = \frac{C}{\text{Area}^2} = 0,3 \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{Pa} \cdot \text{m}}{\text{m}^2} \right] = 0,3 \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}} \right]$$

17.03.2021

2h

OPTICAL DETECTION

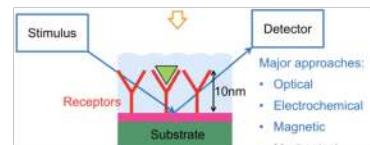
Vogliamo rilevare quando avviene un evento di binding.

Tutto avviene all'interfaccia!!

Questo tipo di detection è quello più usato 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

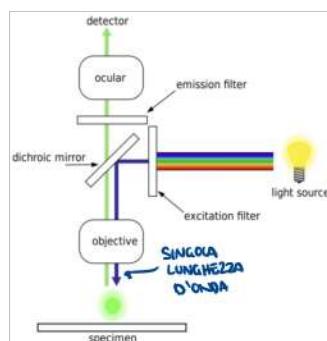
Se vediamo i livelli energetici della molecola, vediamo che se eccitiamo la molecola questa va in uno stato di energia superiore e poi tende a tornare allo stato energetico base rilasciando energia. Uno di questi modi è la fluorescenza, la quale consiste nel rilasciare un fotone a bassa energia dato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

Se studiamo la lunghezza d'onda notiamo che questa molecola ha 2 picchi di assorbimento, ognuno dei quali è relativo a 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 una lunghezza d'onda.

Il campione fluorescente risponderà con un'altra lunghezza d'onda, noi usiamo un filtro di emissione per fare in modo di far passare vicinamente la lunghezza d'onda della risposta del materiale fluorescente.

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

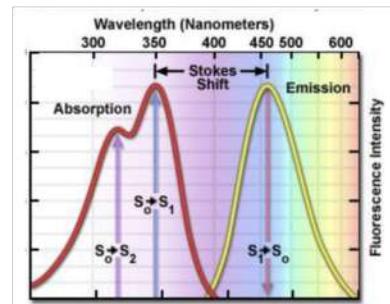
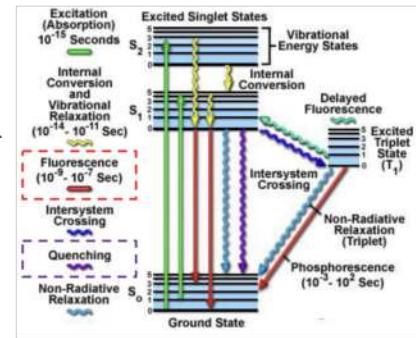
La tecnica fluorescente più usata è la Green Fluorescent Protein. In pratica abbiano la fluorescenza quando il pezzo di DNA viene processato.

NOTIAMO CHE SE LO STOKES SHIFT È MOLTO PICCOLO ANDRA IL FILTRO OTICO DIRESSO ESSERE MOLTO PENDENTE XE' SENSO TIRARO DENTRO ANCHE LA LUNGHEZZA D'ONDA D'ECCITAZIONE.

IMMUNOSTAINING (prospettiva storica)

Vogliamo vedere se crescono o no molecole nelle membrane di una cella. Vogliamo sapere più in particolare se l'antigeno è presente sulla membrana o no.

Se abbiamo l'antibody specifico per l'antigeno allora questo si collegherà con l'antigeno. Ma come possiamo avere la fluorescenza? Attacchiamo il fluorofore (molecola fluorescente) all'antibody. Questo viene fatto poi prima si fa attaccare l'antibody all'antigeno e poi si fa attaccare il fluorofore. Poi "laviamo via" i fluorofore che non sono attaccati a nulla così possiamo vedere solo i rimandi che sono rimasti attaccati.



ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

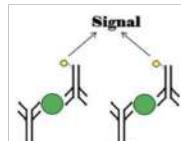
Stessa rete di sopra solo con un enzima e non abbiamo fluorescenza ma dovrebbe colorare il fluido.

Vantaggio è che è molto facile da capire.

TIPI DI ASSAYS

1) SANDWICH: è quello spiegato prima, un reattore ferma la proteina e un altro reattore fluorescente si attacca alla stessa proteina e prima ferma e quest'ci permette di rilevare il tutto.

Questa tecnica appartiene alla categoria labeling (cioè di facciamo 2 step in cui l'ultimo è molto complesso)



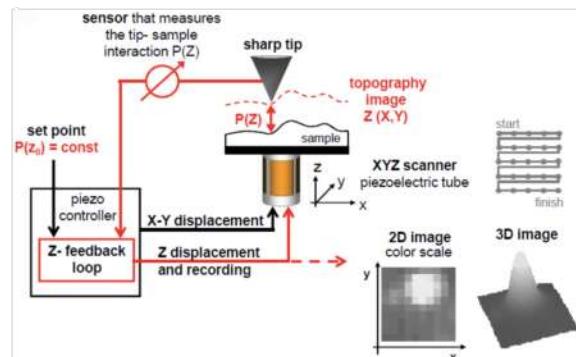
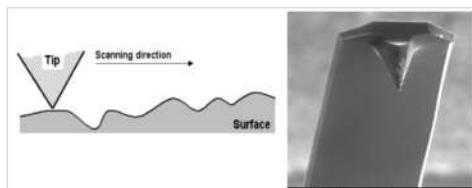
2) COMPETITIVE: Si parte da due reattori, in cui la molecola rossa è simile al target e insieme la molecola rossa e già legata sul reattore nobile è fluorescente. Se arriva la proteina zanna fa switch tra la molecola rossa e la nostra proteina. Questo avviene perché c'è più similitudine con la vera proteina. Perciò se non abbiamo la proteina abbiamo tutto luminesce, se invece c'è la proteina abbiamo il buio

Quel'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 nanoskopiche e costruiamo una specie di guardia-scu in cui la punta è circa grande come un atomo. Tra la punta e questo che voglio analizzare sono presenti delle forze che mi autorizzano.



ATOMIC FORCE MICROSCOPE

Misuriamo la forza d'attrazione tra la punta e il campione. Per misurare la forza d'attrazione la punta si presterà e tramite un sistema ottico possiamo ricavare la distanza.

LIGHT ABSORPTION

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

Possiamo 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.

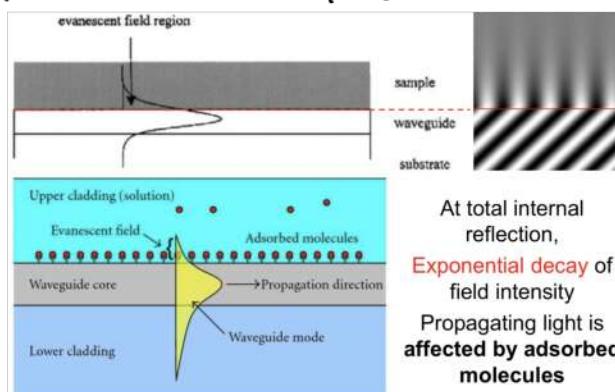
Lato negativo è che non è miniaturizzabile ed è molto lenta e costosa.

Questo può essere miniaturizzato se vogliano analizzare solo poche lunghezze d'onda (es "pulsimetro")

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 un problema: i fotoni sono fuori della "fibra". Questo problema si saede come un espansore e si somma dopo 10nm. Numero importante visto da è la lunghezza dei nostri vezzetti. Noi sfruttiamo questo fenomeno.



La presenza del solido
la presenza del vezzetto fa sì
che ci sia un minima differenza
di fase nell'onda riflessa.

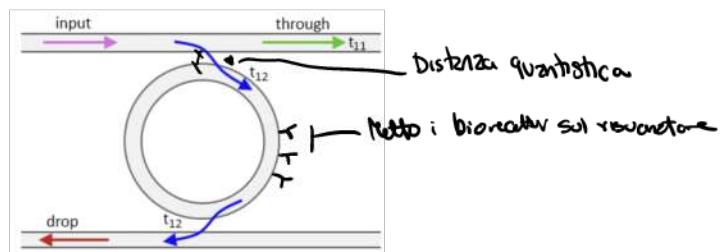
Capiamo quindi che analizzando la
luce (la fase) possiamo capire
cos'è accaduto ai reattivi.

Noi dobbliamo fase 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 reattivi. Se non c'è l'interfaccia ho le 2 fasi uguali e ho interferenza costruttiva
distruttiva.

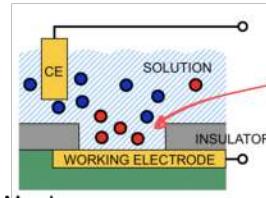
2) Optical ring - Resonator:

**NON HO CAPITO COME
FUNZIONA!**



Elettrode chimici detettori

Pezzice elettrica il cui output produce un colpo in uscita.

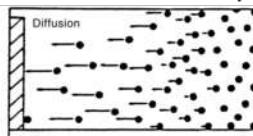


Qui avviene la reazione

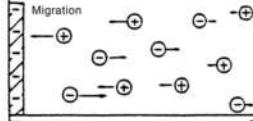
Visto che c'è un campo elettrico
abbiamo una ridistribuzione delle cariche

Modi con cui si possono muovere le particelle in un liquido

Diffusion



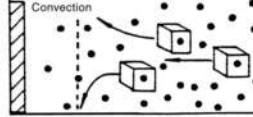
Migration (drift)



Quando applichiamo un campo magnetico.

Convection (fluid motion)

- Natural (density gradient)
- Mechanical (stirring, flow in microfluidic channel...)

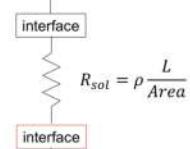
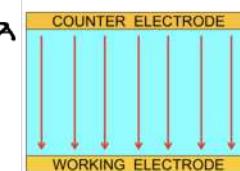


GLI IONI CHE SI MOVONO IN UNA SOLUZIONE CREANO UNA CORRENTE.

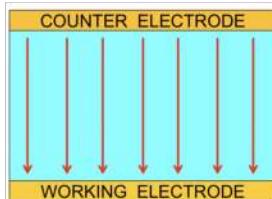
LA MOBILITÀ IN QUESTI LIQUIDI È MOLTO BASSA MA IL NUMERO DI IONI È ELEZIOSISSIMO e quindi alla fine risultano conduttori

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



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

independent of geometry!

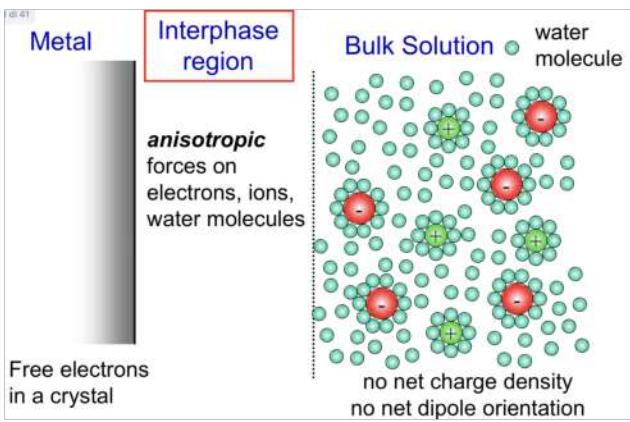
(Non ho ben capito il xe del condensatore)

(Esempio con il PBS)

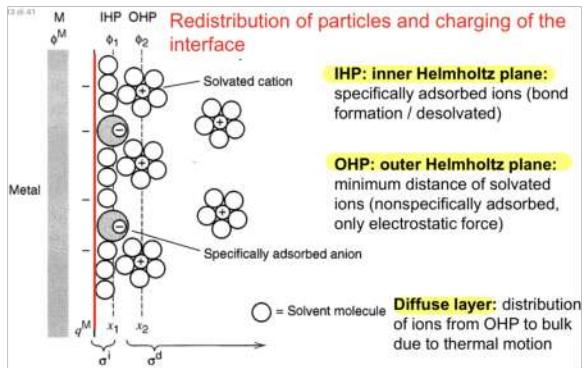
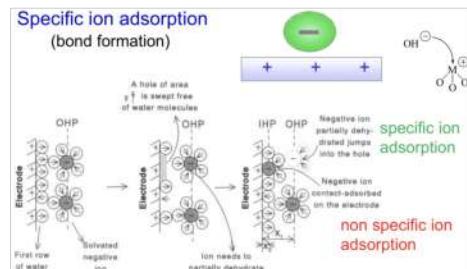
Tipo condensatore dato dalla capacità dell'acqua

the bulk solution is a resistor up to ≈ 350MHz (for PBS)

All'INTERFACCIA:

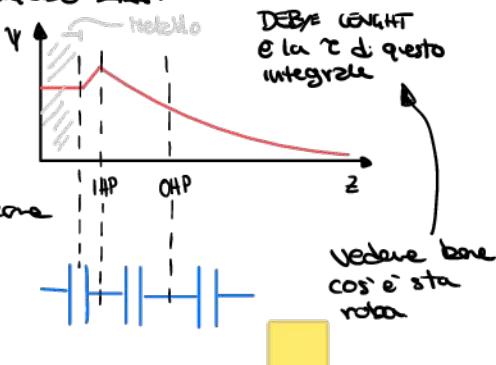


SE IL METALLO È CARICATO POSITIVAMENTE



Se cambio i potenziali del metallo la distribuzione esponeziale di iei nel liquido cambierà addendo e stringerà tutte verso l'interfaccia o andrà allontanarsi

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



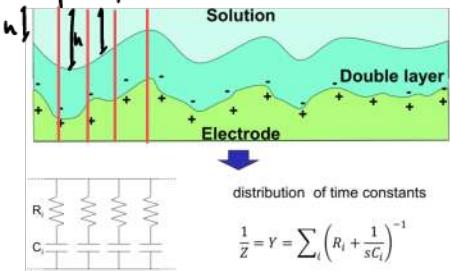
Questa distribuzione di carica può essere modellata come dei condensatori

Ho 3 condensatori in serie, faccio
la serie di condensatori e ottengo 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 sarà della rugosità che farà che l'area in contatto con il liquido sia maggiore.

Questo può portare anche ad una differenza nel modello, infatti



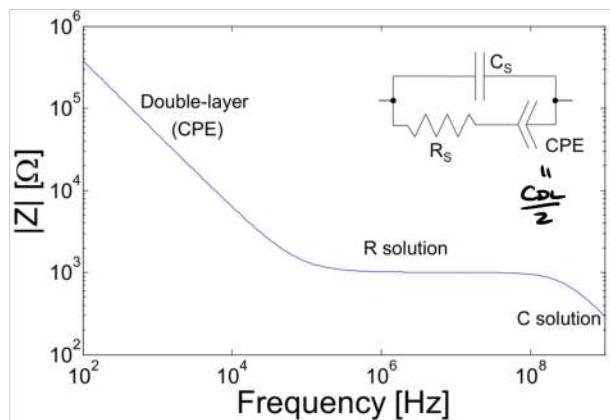
noi possiamo slicare il liquido e per ogni slice otteniamo R e C , tipicamente C è uguale per tutti ma R varia perché l'altezza delle strisce non è costante.

Questa differenza di R risulterà in una variazione di elenzi costanti di tempo e quindi il totale resistore del sistema non sarà più quello di un condensatore ma sarà diverso (varia la perdita di guadagno e la Pesa)

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

Il circuito 2 piccoli segnali dell'interfaccia è:

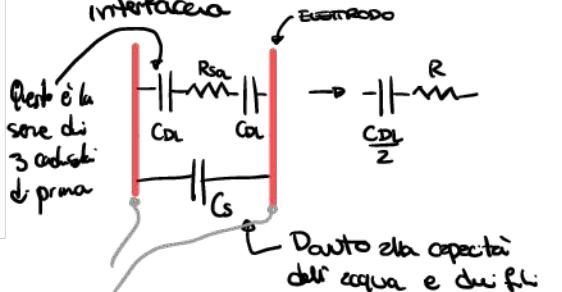
Se non abbiamo Redox l'interfaccia non "assorbe" corrente ma c'è solo la "capacità" [?]



IMPORTANTE!!

QUESTO È IL MODELLO EQUIVALENTE DELL'INTERFACCIA.

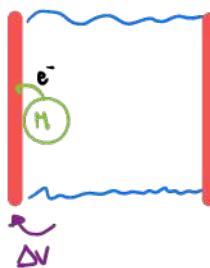
R_s : corrisponde al bulk e non all'interfaccia



Dato che capacità dell'acqua e dei fili

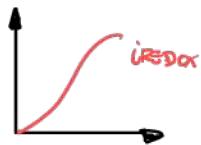
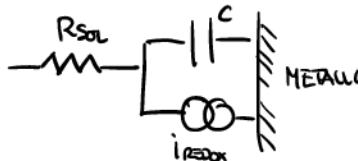
FARADIC PROCESS

Oraabbiamo corrente che può correre attraverso l'interfaccia.

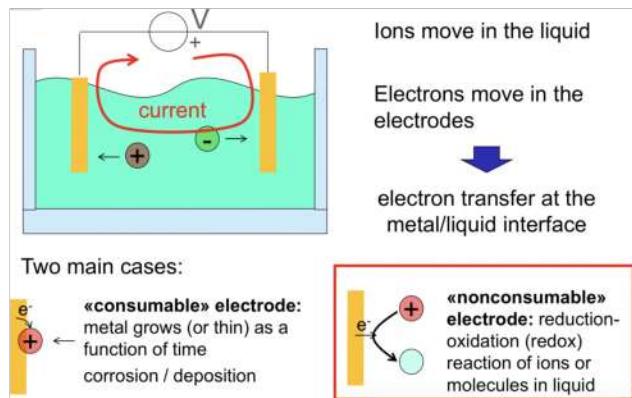


Se la differenza di potenziale ΔV tra molecola e elettrodo è abbastanza alta da far sì che ci sia uno scambio di elettroni alloraabbiamo un Redox.

È bene di aggiungere nel modello



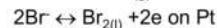
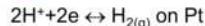
$i_{REDOX}(t)$ NON È UNA PESA NOI VOGLIAMO PENSARE CHE SE



Tipicamente noi stiamo qui
ma molto spesso c'è corrosione

CARATTERISTICA TENSIONE-CORRENTE NEL GASO DELLA REDOX

Pt - Br (solution 1M) - AgBr/Ag



AgBr/Ag "ohmic contact"

IL POTENZIALE DI REDOX
LO PRENDIAMO DALLA TABEUA

Onset of $2H^+ + 2e \rightarrow H_{(g)}$ on Pt

starting point

-1V

Mass-transport control

$E_{Ag} - E_{Pt}$

Pure electron transfer

0V

Onset of $2Br \rightarrow Br_2 + 2e$ on Pt

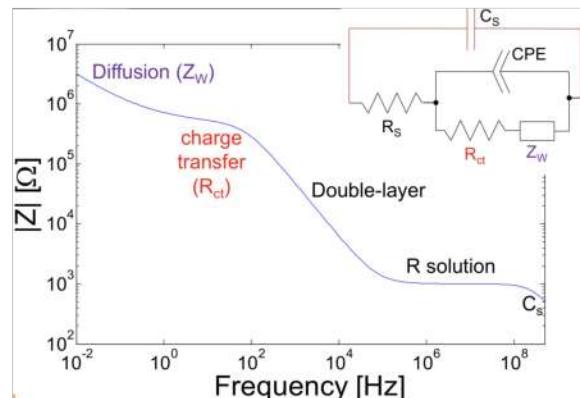
Mass-transport control

DA QUESTO PUNTO IN POCO
HO UNA REDOX.

Non ho più un esponezziale
xe' zt in certo punto zbbiano
"finito" gli elettroni delle
molecole piu vicine all'elettrodo
e quindi ora ce n'è molecole
solo latente ed è più
difficile togliere i elettroni
(xe' x diffusione devono cercare
quelle del layer vicino in modo
che ci sia spazio per le altre per
muoversi)

CAPIAMO CHE LA CURVA NON È LINEARE,
VOGLIAMO LINEARIZZARLA IN ALTRI PTG

Il modello perciò sarà:



In parallelo al CPE mettiamo in
resistore che c'è la linearizzazione delle
bss correnti pesa in un certo punto

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

Z_w è un termine aggiuntivo di modello
(WARBURG IMPEDANZA) che serve a
modellare l'andamento dell'impedenza a va
via bassa frequenza.

26.03.2021

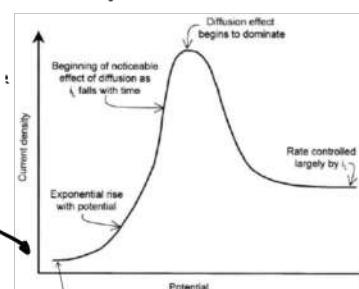
2h

Dobbiamo usare potenziali bassi xe' sono possiamo
indurre reazioni redox (es. elettrolisi) e così avremo
non solo la corrente detta del binding ma anche quella
della redox

L'andamento della corrente nel sistema sarà:

Circa 8 prima del potenziale

d redox poi ho un picco poco dopo (sembra
basso) che mi dà un errore di offset
(indipendente della redox); Corrente d.
double layer.



MISURAMO LA CORRENTE CHE SARÀ DIPENDENTE DAL BINDING



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

Il perciò dell'andamento della corrente a campata è sempre dovuto alla distribuzione di carica e alla diffusione.

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

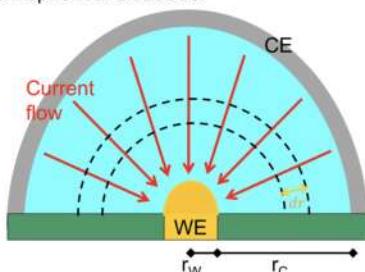
Cosa succede se abbiano degli elettrodi molto piccoli?

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

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

Radial diffusion profile

Hemispherical electrode:



Border effects become dominant!

$$dR(r) = \rho \frac{dr}{2\pi r^2}$$

$$R_{sol} = \int_{r_W}^{r_C} dR(r)$$

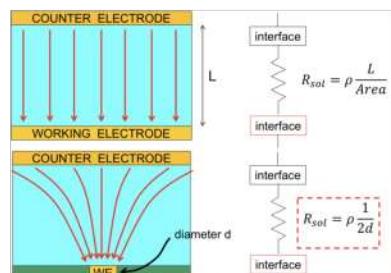
$$R_{sol} = \frac{\rho}{2\pi} \left(\frac{1}{r_W} - \frac{1}{r_C} \right)$$

$$r_C \gg r_W$$

$$R_{sol} = \frac{\rho}{2\pi r_W}$$

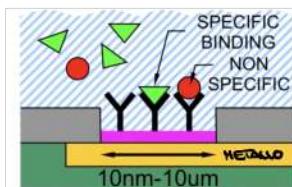
Possiamo prendere cariche anche dai lati dell'elettrodo, ci va bene perché abbiamo più corrente del previsto

Questo fatto "fa cambiare" tutti i dati visti prima



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

PER TUTTO QUESTO DENTRO



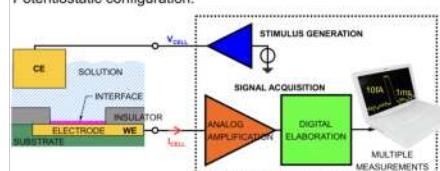
Noi vogliamo misurare in avanti all'interfaccia, un modo per farlo è mettere un elemento che fa redox nel liquido se ho li zoccoli questi fanno da "blocco" per gli ion della redox e così cela la corrente

Se ho delle zuppe o altre molecole che possono subire la redox ho una corrente spuria in più che leggo e 2 non mi va bene (credo che ne sapezno queste molecole redox molto)

PER CONTROLLARE QUESTO ESISTONO 2 TECNICHE

- POTENZIOSTATICA
- CORRENTOSTATICA?

Potentiostatic configuration:

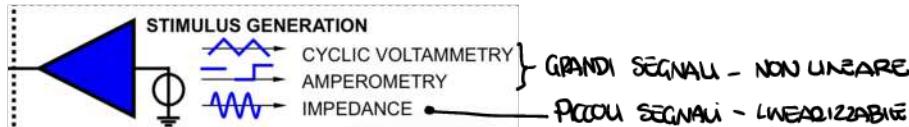


- Apply a voltage V_{CELL} and measure the current I_{CELL}

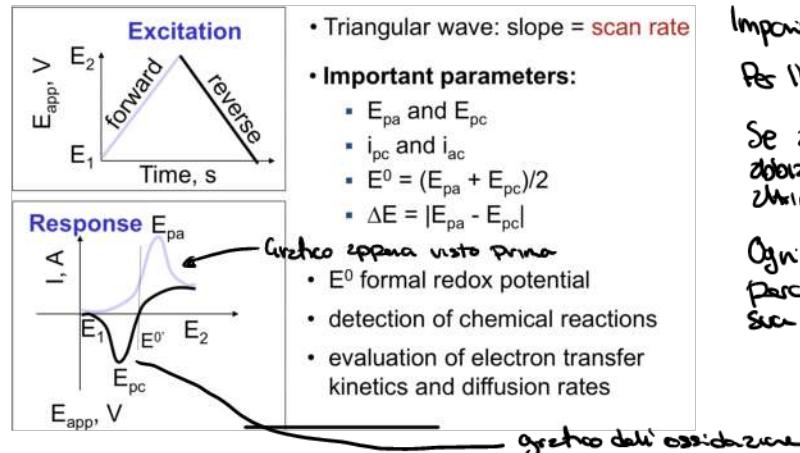
↳ 2 sections: generation and sensing

- Multiple measurement types by changing stimulation waveform

ESISTONO DIVERSE TIPOLOGIE DI STIMULI (NEI NOSTRI STUDI SONO SOLO 3)



CYCCLIC VOLTAMMETRY : perché è periodico



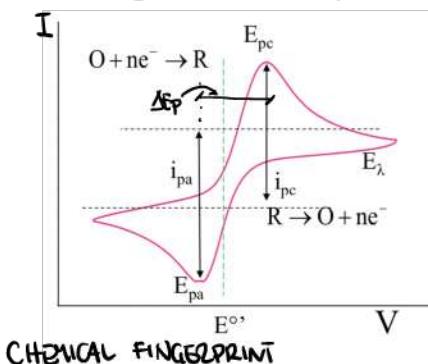
Imponiamo una tensione triangolare

Per l'elettrodo noi usiamo l'oro

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

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

Ottieniamo un grafico del tipo



n : n. of electrons

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

A : electrode area;

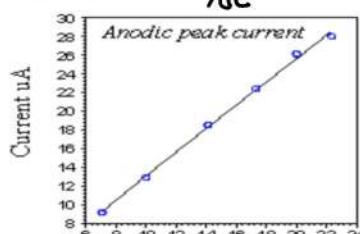
C: concentration (mol/litre)

D: diffusion coefficient (cm^2/sec).

SR: scan rate $\frac{dV}{dt}$

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

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



CHEMICAL FINGERPRINT

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

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

Se ho più reazioni in serie l'allora il picco della seconda parte del plotto' level della prima

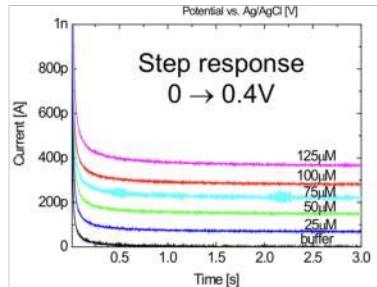
Vogliamo più corrente né i lettori di corrente sono riusciti, o funzionano gli elettrodi o lo Scen Rete.

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

• AMPEROMETRY

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

Ogni uscita ha step di tensione allora la risposta sarà



Dove il primo picco è davuto della cernica del condensatore doppio layer.

• IMPEDENCE SENSING

Noi applichiamo un segnale sinusoidale in un elettrodo e misuriamo la corrente dell'elettrodo il rapporto corrente tensione mi darà d'impedenza. Posso anche variare la frequenza del segnale che stiamo imponendo, e studiano l'impedenza a diverse frequenze (questo è chiamato Spettroscopia d'impedenza)

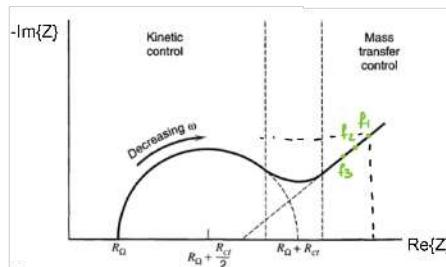
Ci siamo che in frequenza abbiamo una variazione di C_{dl} e R_{ct} e tramite questa variazione noi vogliamo capire cosa è successo all'interfaccia.

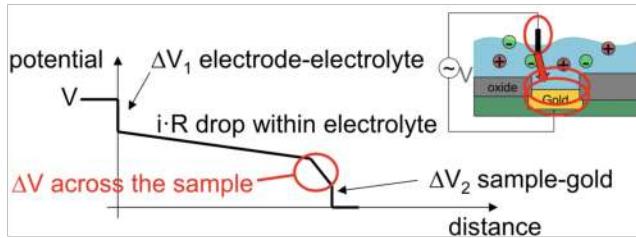
Il grafico dell'impedenza può anche essere fatto nel Cole-Cole plot che per ogni frequenza da il velle della parte reale e immaginaria.

2 Electrode measurement

Quel'è la vera ceduta di tensione all'interfaccia?

Cioè io ho il working electrode e la maggior parte della ceduta di tensione delle molecole di redox poi però il counter electrode (l'elettrodo per chiudere il circuito) è molto lontano e quindi ho altre cedute di tensione

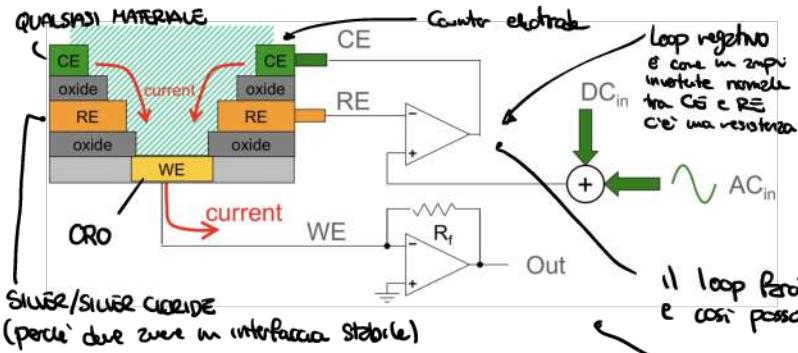




Noi impostiamo V ma vogliamo controllare ΔV cioè la tensione di corte nel sample x e la corrente che triggerà la redox.

Per risolvere 2 questo scriveremo un 3° elettrodo per misurare la tensione ΔV . IMPORTANTE: nessuna corrente scorrerà nel 3° elettrodo se non ci sarà pure ad essa l'impedimento dell'OP-AMP.

QUALSiasi MATERIALE



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

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

Il loop farà sì che V sia uguale a V_t e così posso controllare la tensione

Sì chiama potentiostato

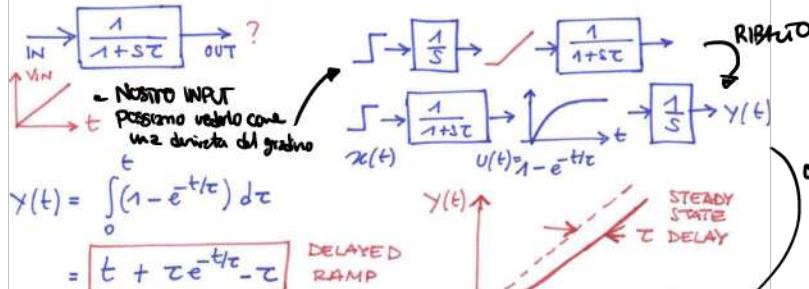
QUAI DEVONO ESSERÈ LE BANDI DEI 2 OP-AMP?

Per questo 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^o ordine



OTTENGO QUINDI

Allora Se noi abbiamo il max errore di tensione $\Delta V_e = T \cdot SR$
ricavo T e la banda per sì sarà

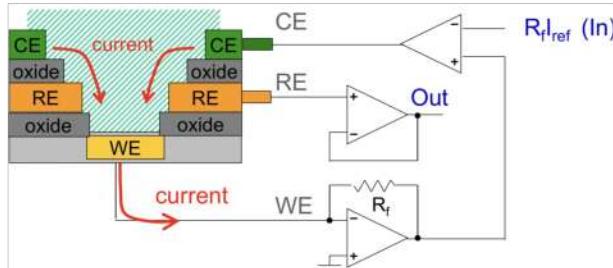
SR=scan rate

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

29.03.2021

2h

Queste zcelle si possono fare anche imponendo la corrente e misurando la tensione. Queste si chiamano galvanostatiche.

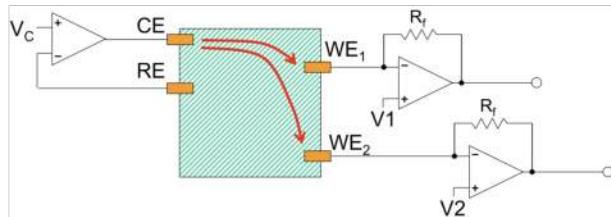


ha un circuito di fondo molto simile

SCARSO USATO X NOI

TORNIAMO AL POTENZIOMETRAT

Possiamo avere diversi Working electrodes (es 2) e biasare a 2 diverse tensioni in modo che la ceduta di tensione all'interfaccia sia diversa tra i 2 working electrodes. (Notate che abbiamo sempre 1 solo Control e Reference electrode).



misurazione della corrente sul WE

Tipicamente abbiamo segnali molto piccoli \rightarrow il rumore dell'amplificatore diventa importante
SNR diretta di grande importanza

Any electrical signal is affected by noise and disturbances:

$$v(t) = signal(t) + n(t) + d(t)$$

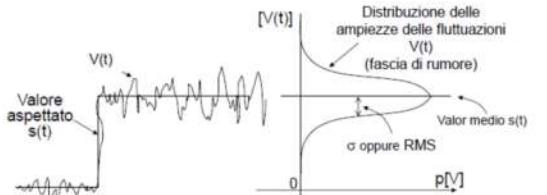
Noise is a random fluctuation of the electrical variables due to the physical behaviour of internal components of the circuit

$n(t)$ RUMORE: INTERNO AL SISTEMA / componenti

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

Considerate solo rumore stazionario

Ha più spiegato il rumore bianco e l' $1/f$



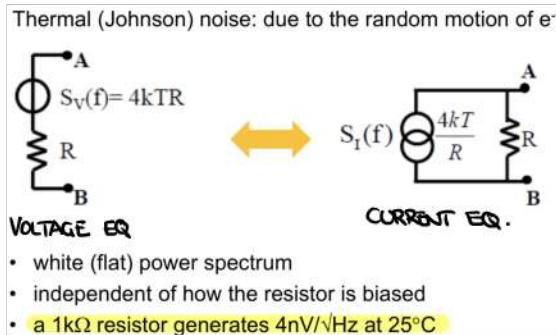
Random process characterized by standard deviation σ = RMS

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

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



Shot Noise

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

Rumore negli OP-Amp

Idealmente senza rumore \rightarrow realmente ci sarà rumore in uscita.

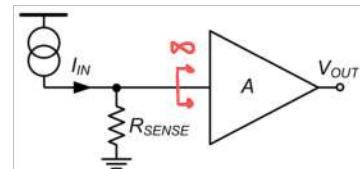
Per cancellare il rumore negli op-amp prendiamo il rumore d'uscita, lo dividiamo per il guadagno dell'op-amp e lo riportiamo come rumore in ingresso dell'op-amp.
Facciamo questo se così possiamo comporre il segnale e il rumore prima dell'op-amp in modo da capire se Segnale > Rumore.

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 (LEGGE DI OHM)

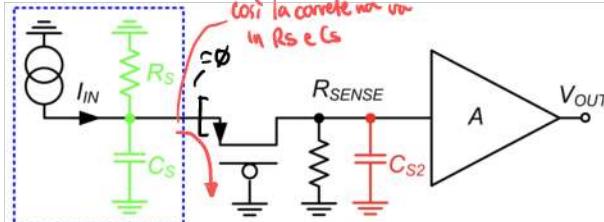
La conversione è estremamente lineare, però ci sono molti lati negativi.



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

Se I è molto piccolo e oltre a R_{sense} ho degli effetti passivi (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)

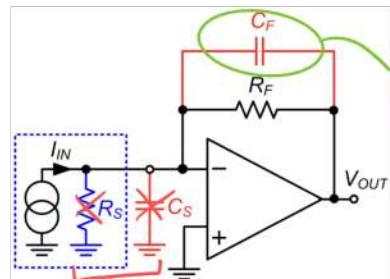


l'impedenza d'ingresso del transistore è βg_m che dipende dalla corrente

TRANSIMPEDANCE AMPLIFIER

$V_E \rightarrow \emptyset$

Usiamo sempre un transistor ma usiamo anche componenti esterni, inoltre con il feedback eliminiamo l'impedimento dei componenti parasitici.

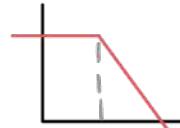


Queste vengono eliminate

Questa però
rimane e c'è sempre per via dei piedini ecc...

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

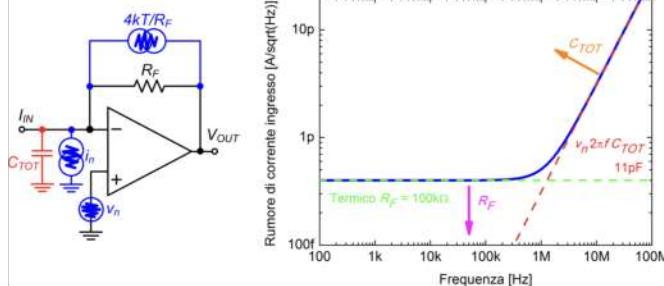
L'effetto di C_F è quello di limitare la banda dell'amplificazione



COSA SUCCIDE 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_{TOT} !

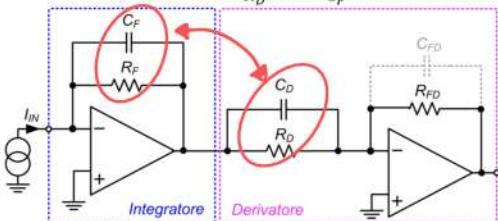


Sappiamo che il Guadagno $\alpha R_F \rightarrow$ vorremo R_F grande, ma se α è alto R_F vuole anche diminuire la banda dell'amplificazione che si crea con C_F . Ricordiamoci che la banda è $1/2\pi R_F C_F$.

VOLUOVO ESTENDERE LA BANDA E TENERE IL RUMORE BASSO

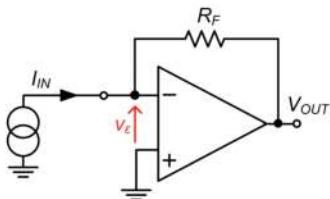
Introduce a zero that cancels the pole: $R_F C_F = R_D C_D$

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



Pro: extends the bandwidth, preserving the lower noise

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



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

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

Questo però rimane e c'è sempre per via dei piedini ecc...

In: Rumore di corrente del OP-AMP

$4kT/R_F$: rumore di R_F

Il rumore Ω_R ha 2 componenti, una variazione di tensio virtuale = corrente di scorrere in C_{TOT} e quindi la prima componente è

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

Poi c'è un rumore di corrente su R_F dato da Ω_R ed è: $(\frac{\Omega_R}{R_F})^2$

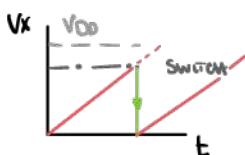
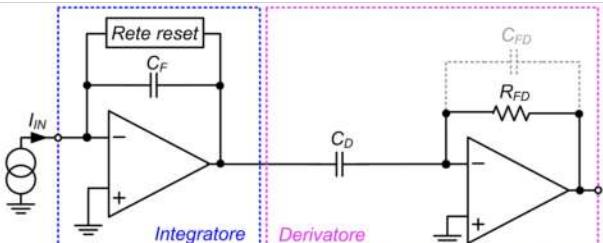
Nel primo stage metto R_F molto grande \rightarrow la banda mi diminuisce

Nel secondo stage ho un zero per cancellare il polo di prima

Nel secondo stage metto R_F piccolo \rightarrow diminuisco la banda \rightarrow il rumore di C_{FD2} è regolabile rispetto al rumore del primo studio visto che R_F era molto grande

Lati regativi = Nella rete di input non so se quindi devo avere un condensatore con la tensione variabile per boccare quello del primo stadio.

Dato che RF dell'integratore è l'elemento che porta verso lo zappone, ci serve una rete di reset attivata il OP-AMP saturazione subito solo con un condensatore in feedback.



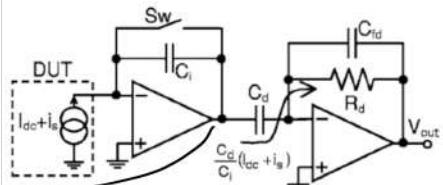
La tensione sale a
tempo

Switch periodically closed to discharge the capacitor:



Limits the maximum measurement time

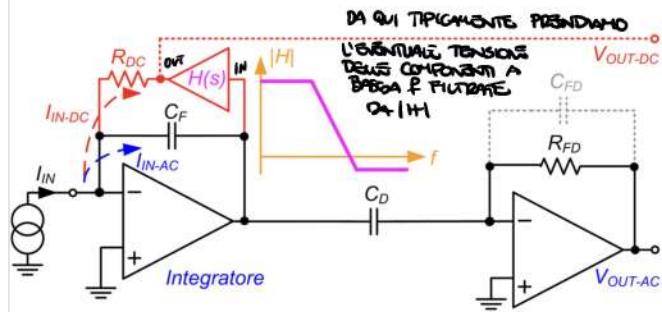
For example: $I_{IN-DC} = 1\text{nA}$, $C_F = 1\text{pF} \rightarrow (5\text{V}) T_{MAX} = 5\text{ms}$



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

Per risolvere questi problemi facciamo un reset continuo

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

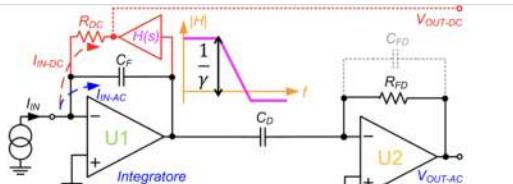


A basse frequenze la corrente va nel branch di $H(s)$ così togliamo le componenti a bassa frequenza

ed a alte frequenze la corrente scorre in C_F e il circuito si comporterà come al solito

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

$H(s)$ aggiunge rumore? Sì, oggi capirete subito in feedback aggiunge rumore

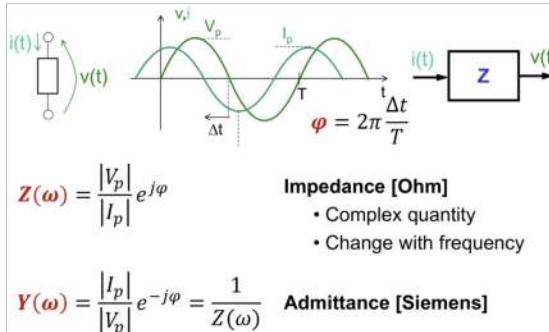


- $H(s)$ infinitesima rispetto a U_2 quindi non la consideriamo
- $H(s)$, la possiamo diminuire molto aumentando R_{DC} .

Attenuation of U_2 noise, but additional noise of $R_{DC}H(s)$

$$S_1(f) = \underbrace{\left(i_1^2 + \left(\frac{v_1}{R_{DC}} \right)^2 + (v_1 2\pi f C_F)^2 + (i_2^2 + \left(\frac{v_2}{R_{FD}} \right)^2 + (v_2 2\pi f C_D)^2 + \frac{4kT}{R_{FD}} \left(\frac{C_F}{C_D} \right)^2 + \frac{4kT}{R_{DC}} + \left(\frac{v_3}{y R_{DC}} \right)^2 \right)}_{U_1} + \underbrace{\left(v_2 2\pi f C_D \right)^2}_{U_2} + \underbrace{H(s)}_{H(s)}$$

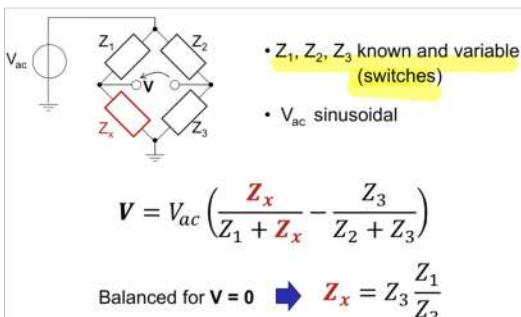
TIURA DELL'IMPEDENZA



COSA IMPORTANTE: l'impedenza dei microcomponenti scatta con la dimensione, ma gli elementi parassiti non scattano perciò diventano estremamente importanti.

TIPI DI TECNICHE PER MISURARE L'IMPEDENZA

• Balancing Bridge



Noi misuriamo V al centro del ponte

Tipicamente facciamo sì che $V=0$ in modo che seppiamo il valore di Z_x dalla 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, xe' noi facciamo la differenza)

Cons:

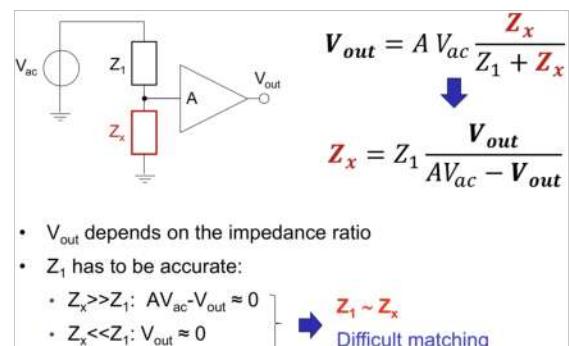
- Requires several switches
 - Slow balancing routine
 - Not very convenient for spectroscopy
 - Inoltre dobbiamo sapere prima che impedenze andiamo cercando (resistenza/capacitatore/induttore)
- Questo controllo si ricoglie al primo

• Retrometric: Half-Bridge

è solo un partitore di tensione

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

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



Un altro limite di questa topologia è dato dagli elementi parassiti

Un condensatore sul parallelo da errore, la quantità dell'errore dipende dal tipo d'impedenza di Z_x
Se Z_x è un condensatore allora
Al contrario se Z_x è una resistenza ottengono

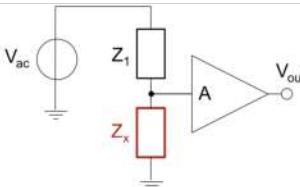
$$V_{out} = AV_{ac} \frac{R_x}{R_x + R_1} \frac{1}{1 + sC_p R_x || R_1}$$

Quindi se $W \ll 1/C_p R_x // R_1$ allora $R_x = R_1$ $\frac{V_{out}}{AV_{ac} - V_{out}}$

Per $W \gg 1/C_p R_x // R_1$ R_1 è cortocircuitato da C_p .

Pros:

- Independent of the impedance
- One terminal can be grounded



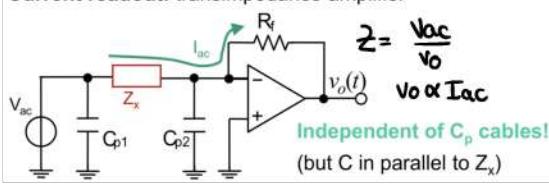
Cons:

- 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 GND?
Il modo migliore di eliminarli è quello di usare la terra virtuale.

Current readout: transimpedance amplifier



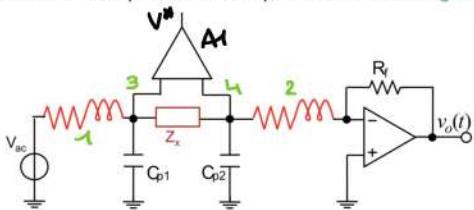
In pratica zommizzo i condensatori parassiti grazie alla terra virtuale, infatti questi avranno sempre tensione zero e capi nulla

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 DOVUTO ALLE CONNESSIONI E AI FILI

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



$$L = 100\text{nH}, f = 10\text{MHz} \rightarrow R = 6.2\Omega$$

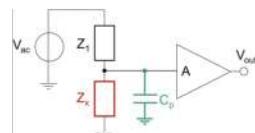
Nanoscale $I_{max} \approx$ tens of μA (Joule dissipation)

→ typically inductances are negligible

Abbiamo una struttura a 4 fili in cui i fili 3 e 4 non passa corrente. Uso quel ampli A1 per misurare la tensione V^* capi di Z_x , la tensione non sarà affetta da effetti parassiti perché $i=0$ nei cavi.

$$\text{Poi ricavo } Z_x \text{ facendo } Z_x = \frac{V^*}{V_o R_f}$$

con V^* tensione ai capi di Z_x



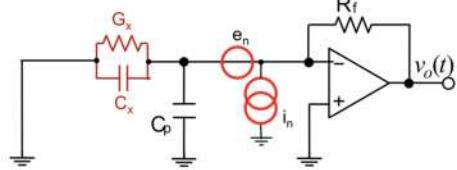
Capacitive detection: $Z_1 = 1/sC_1$, $Z_x = 1/sC_x$

$$C_x = C_1 \frac{AV_{ac} - V_{out}}{V_{out}} - C_p$$

C_p reduces the accuracy!

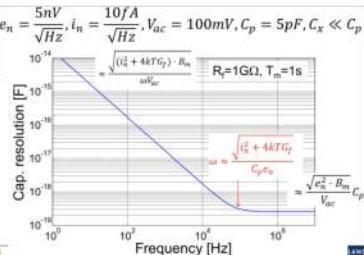
Tuttavia se Z_x è abbastanza elevato possiamo non considerare questi elementi per sì.

Calcolo del rumore del current sensing



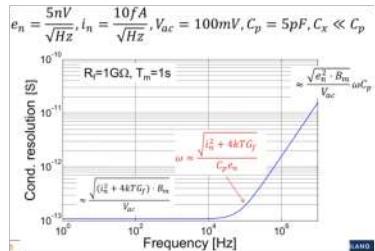
$$S_i = i_n^2 + 4kT(G_f + G_x) + \overline{e_n^2} \omega^2 (C_x + C_p)^2 + \overline{e_n^2} (G_x + G_f)^2$$

$$\begin{aligned} V_{ac} \Delta G_{x\min} &= \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta G_{x\min} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{V_{ac}} \\ V_{ac} \omega \Delta C_{x\min} &= \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta C_{x\min} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{\omega V_{ac}} \end{aligned}$$

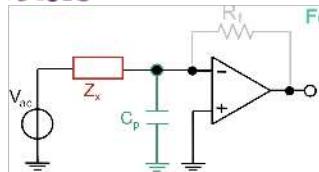


Simula l'andamento della SNR, notiamo che dopo un certo valore di frequenza non ha senso andare la frequenza

Simula il rumore della corrente di input

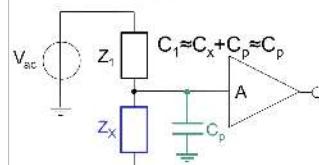


COMPARAZIONE DI RISOLUZIONI



Feedback does NOT alter SNR:

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



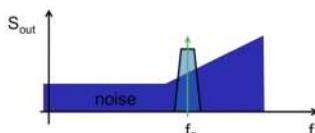
$$\Delta C_x = \frac{\sqrt{e_n^2 \cdot B_m}}{V_{ac}} 4 C_p$$

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? vogliamo solo ridurre il rumore

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)

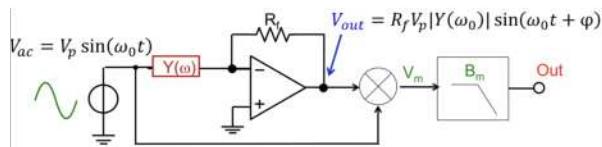
l'informazione di fase

Noi vogliamo avere solo f_0 e una piccola banda attorno a f_0 .

Se facciamo l'impedimento spettroscopico f_0 cambia da 1Hz a 10MHz e quindi il passband dovrebbe essere tunabile

Estrattamente difficile fare ciò.

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



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

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

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

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

The averaging time is set by the low-pass filter

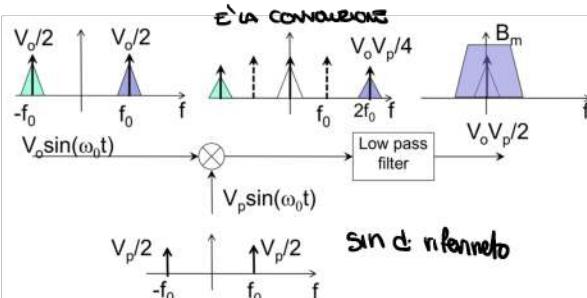
Abbiamo in output un valore dipendente dalla differenza di fase delle 2 componenti

Con questo ricevo la parte reale, cioè la componente orizzontale (perché $\cos \psi$)



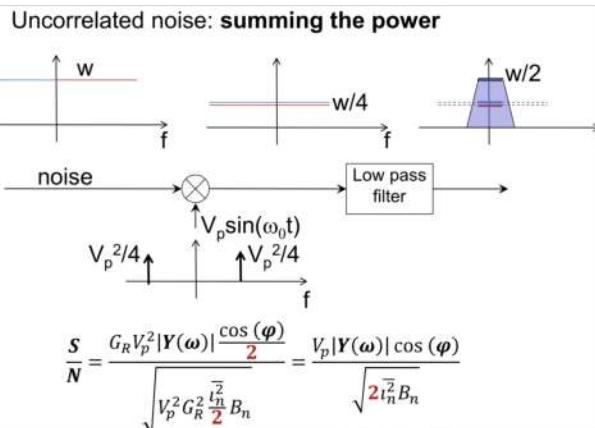
Se volessi anche la parte immaginaria
altra

E per quanto riguarda il rumore
e il filtro pass banda cosa ha fatto?



Half of the signal in base band, half is filtered at 2f_0

Per il rumore abbiamo (nel caso di rumore bianco)



In pratica la convoluzione sposta lo spettro d'ingresso tra fo e -fo e poi somma.

Poi noi mettiamo un passabasso e prendiamo quello attorno a fo

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

La cosa bella è che questo filtro è sempre in lock visto che se varia la fin cambia anche la freq e quindi il filtro si autoadatta

Si possono usare anche altri approcci al contrario di quello variazione la Resonanza della Sinusoidale. Time domain approach

Studio tutto lo spettro della Resonanza 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: Fare 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

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

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

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

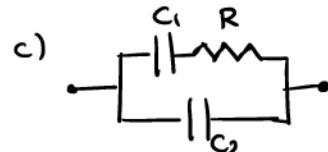
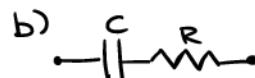
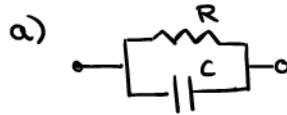
07.06.2021

2h

ESERCIZI

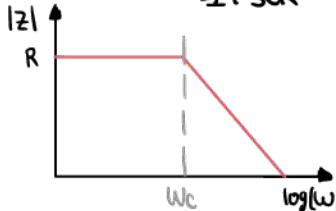
① IMPEDANCE MODELS AND PLOT

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

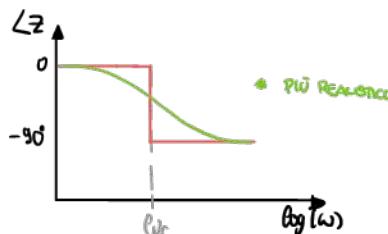


a) INIZIAZIONE CON BODE

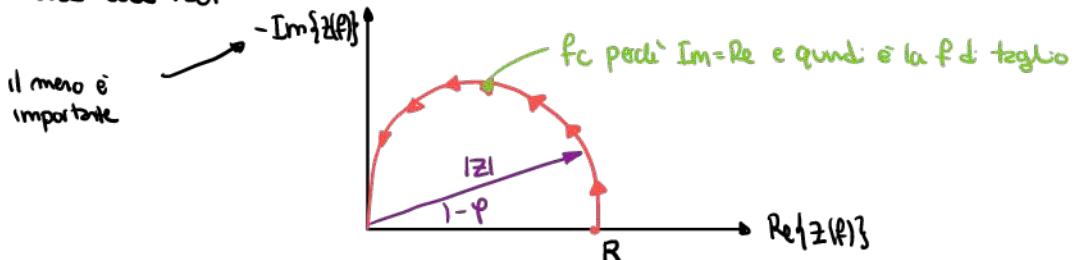
$$Z = R // \frac{1}{j\omega C} = \frac{R}{1 + j\omega RC}$$



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



> COLE-COLE PLOT



Ricaviamo parte reale e immaginaria

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

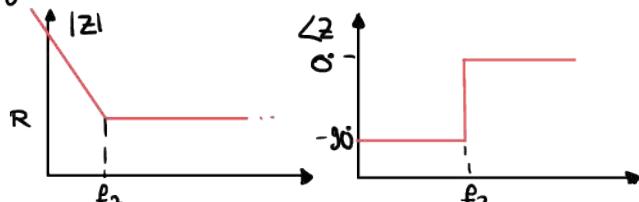
Per $f=0$ ho solo parte reale (R)

Per $f \rightarrow \infty$ $Z \rightarrow 0$ e ho solo parte immaginaria

b)

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

BODE

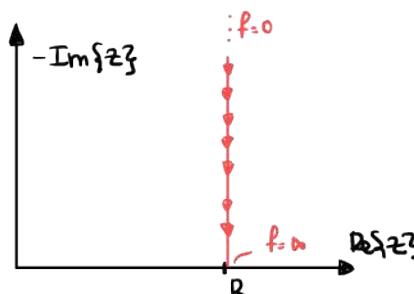


> COUE-COUE PLOT

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

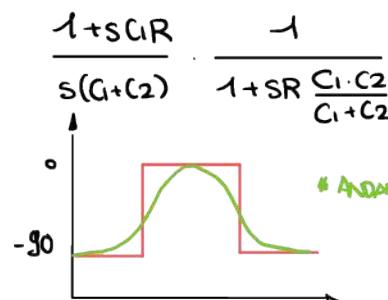
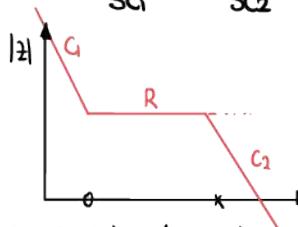
$f=0$: $|Z| \rightarrow \infty$

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



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

$C_1 > C_2$



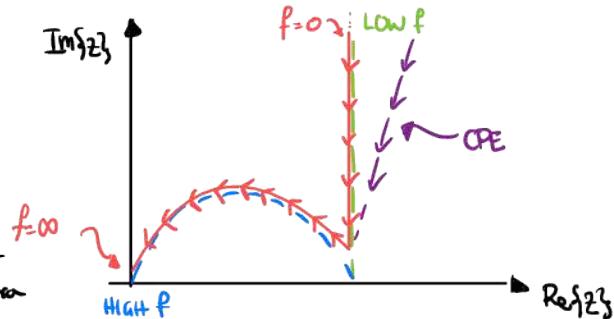
In tutti i casi in cui vogliamo misurare la resistenza di soluzione di un campione biologico c'è deto unica che da una finestra di frequenza dove abbiamo solo la resistenza (resistive plateau)

> COUE-COUE PLOT (alla fine è myquist solo con -Im sulle zee)

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

Il Cole-Cole plot è una combinazione dei 2 grafici visti prima

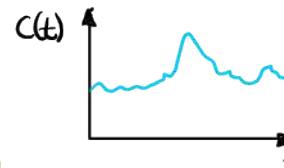
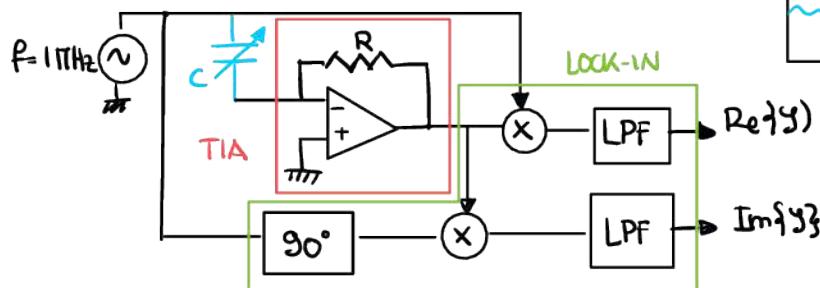
Nel caso di condensatore ideale la curva è rettilinea mentre se abbiamo un CPE, costantephase element allora la linea è tilta a destra



ESERCIZIO 2

IMPEDENZA APPARENTE

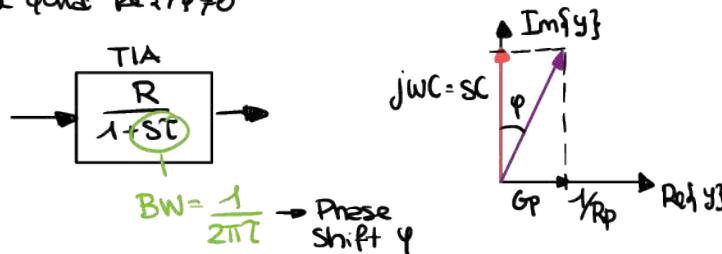
LOCK-IN DETECTOR, C cambia continuamente



Se $C = 1 \text{ pF}$
in teoria $\text{Re}\{y\} = \infty$

Traccia la banda del TIA (Trans Impedance Amplifier) che dà una resistenza parallela apparente $R_p > 16 \Omega$

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



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

Ricaviamo φ grazie a $G_p = 1 \text{ M}$

$$|Y| = |j2\pi f C| = 2\pi \cdot 1 \text{ MHz} \cdot 1 \text{ pF} = 62 \mu\text{s}$$

$$G_p = |Y| \cdot \sin(\varphi) \rightarrow \varphi = \arcsin\left(\frac{G_p}{|Y|}\right) = 957^\circ$$

• Ricaviamo l'FDT del TIA

$$\begin{aligned} H(s)|_{\text{TIA}} &= \frac{R}{1+sT} \\ &= \frac{R}{1+j2\pi f C} \end{aligned}$$

$$\angle H(f=1 \text{ MHz}) \leq 957^\circ$$

$$= \tan^{-1}\left(\frac{f}{f_p}\right) = \tan^{-1}\left(\frac{1 \text{ MHz}}{f_p}\right) = 0,57^\circ$$

E QUINDI

$$f_p = 100 \text{ MHz}$$

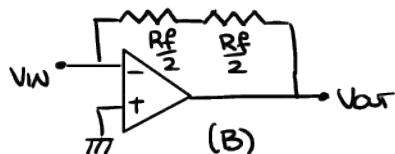
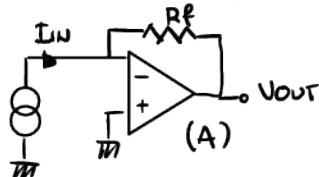
Dobbiamo quindi avere che l'amplificatore abbbia banda 10 volte quella del segnale



ESERCIZIO 4

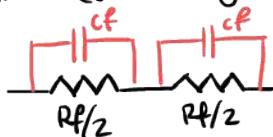
MISURAZIONE DI CORRENTE : BANDWIDTH EXTENSION

Cerciamo un modo per aumentare la banda del transimpedenza amplificatore



Confrontiamo i 2 schemi, perché B è meglio?

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



$$\text{L'impedenza è } -2 \cdot \frac{\frac{R_f}{2}}{1 + SCF \cdot \frac{R_f}{2}} = -\frac{R_f}{1 + SCF \cdot \frac{R_f}{2}}$$

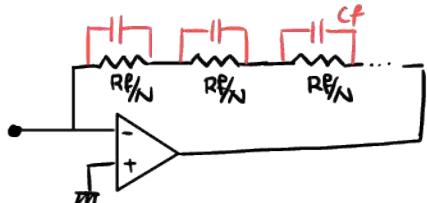
mentre nel caso A abbiamo che $Z = -\frac{R_f}{1 + SCF R_f}$

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.

$$BW_B = 2 \cdot BW_A$$

ESTENDIAMO QUESTO A N-RESISTORI



$$V_{out} = -\frac{R_f}{(1 + SCF \cdot \frac{R_f}{N})}$$

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.

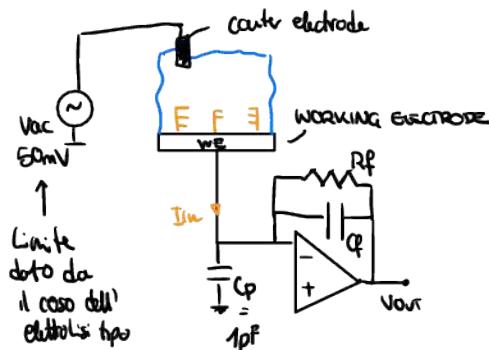
Inoltre se consideriamo una capacità parallela tra le resistenze e teniamo questa fissa si che il tricck non funzioni.

AGGIUNGE UN FILE ONLINE CON GLI ALTRI ESEMPI + SOLUZIONI

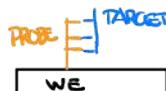
12 Ott. 2021

2h

CAPACITIVI DNA BIOSENSOR



Vogliamo trarre una sequenza di DNA in soluzione



Quando la pista perde il target toglie un po' di carica dalla superficie del working electrode

Cepiamo che a noi interessa la capacità Dc che tocca

Allora modelliamo il sistema come

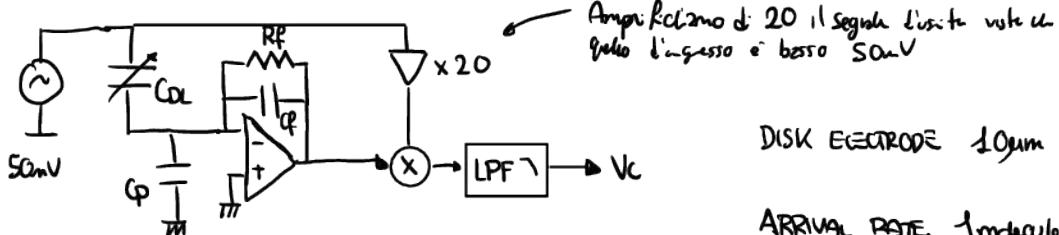


Ci interessa vedere in modo d' capacità



Non ci interessa R_{sa} quindi per noi $R_{sa} \rightarrow \infty$

Il modo migliore per studiare il sistema è il lock-in



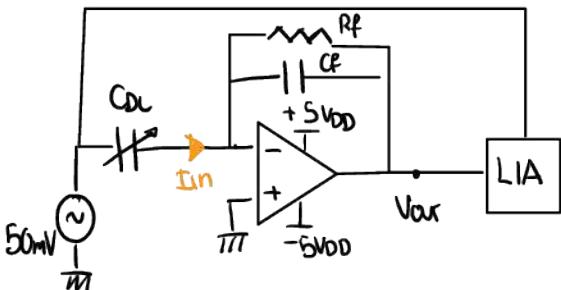
a) Size C_p

b) trarre la capacitive resolution con $BW/LPF = 100\text{Hz}$

c) l'ibrillazione del DNA da $\Delta C = 10/\text{CdR}$ trarre il minimo C misurabile

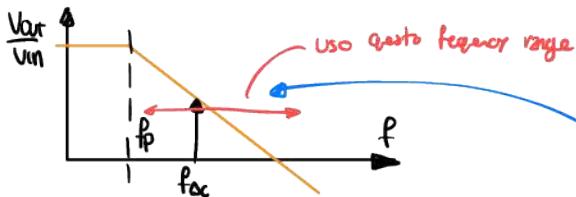
d) che impatto ha il variazione su Vac?

e) Trarre BW/LPF (non ho capito in che caso)



$$V_{OUT} = I_{IN} \cdot \frac{-R_F}{1 + SCF \cdot f}$$

$$f_p = \frac{1}{2\pi C F R}$$



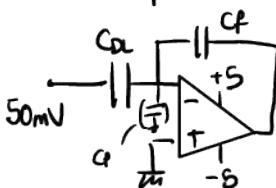
Visto che abbiamo un R_F molto grande e visto che noi misuriamo il condensatore ci va bene operare nella zona capacitiva della curva.

Noi facciamo così perché visto che in input abbiamo un condensatore allora la corrente zetta con la frequenza e quindi la tensione d'usita dipende dal rapporto dei 2 condensatori.
Si fa così quando si misura una capacità, infatti:

$$I_{IN} = \frac{V_{AC}}{\frac{1}{SC}} = V_{AC} S C D L \rightarrow \text{uso questa formula in questa} \quad V_{OUT} = I_{IN} \cdot \frac{-R_F}{1 + SC F R}$$

(alle fine in questo caso la resistenza è L solo per togliere le capacità DC)

Se $f_{AC} \gg f_p$ allora



$50mV$

$$V_{OUT} = -V_{AC} \cdot \frac{C_{DL}}{C_F} \Big|_{E(+5, -5V)}$$

questi valori devono stare fra -5 e 5 volt
se c'è l'biasing del OP-AMP

Se C_P non circola corrente.

Noi sappiamo che

$$C_{DL} = \frac{0,1 \mu F}{mm^2} \cdot \text{Area}_{WE} = \frac{0,1 \mu F}{mm^2} \cdot \pi (50 \mu m)^2 = 2,8 \mu F$$

numero dato per la soluzione PBS, se cambiamo soluzioce questo numero varia.

$$V_{OUT} = \left(-V_{AC} \cdot \frac{C_{DL}}{C_F} \right) = 5V \rightarrow C_F = C_{DL} \cdot \frac{50mV}{5} = 78 \mu F$$

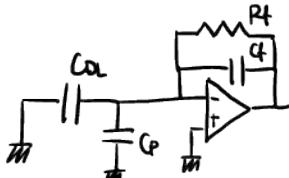
valore molto basso
non si può comprare

Se mettiamo $C_F = 1 \mu F$ allora ci viene che

$$V_{OUT} = 50 \cdot \frac{2,8 \mu F}{1 \mu F} = 94V$$

• PUNTO b

minimo ΔC che possiamo misurare, ora la capacità C_P diventa rilevante



Calcoliamo la CTOT connessa all'input

$$C_{TOT} = C_P + C_{DL} + C_F \approx 10 \mu F$$

stray sensor ampl.

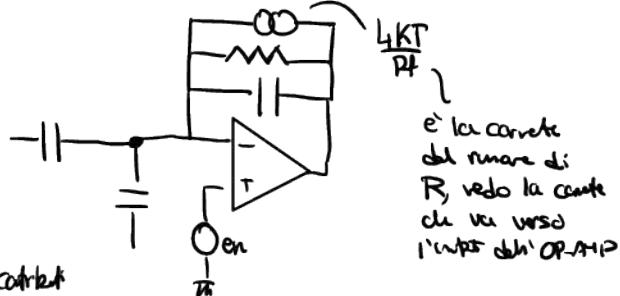
Vogliamo minimizzare G_{TOT} perché questo contribuisce al rumore e alla stabilità del sistema.

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

Ci viene detto che l'OP-AMP ha un errore di tensione di input

$$e_{in} = \frac{4nV}{\sqrt{Hz}}$$

Abbiamo 2 fonti di rumore, quella del
zmp e quella della resistenza, tutti questi contributi
vanno sommati in potenza. Nota: usiamo la radice quadrata
del valore al quadrato



$$\sqrt{\frac{4KTR_p}{\sqrt{Hz}}} = \sqrt{4 \cdot \frac{KT}{q} \cdot q \cdot \frac{1}{R_p}} = 4 \frac{pA}{\sqrt{Hz}}$$

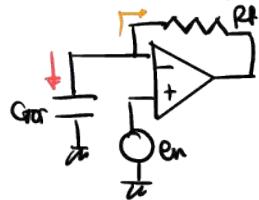
26mV $1,6 \cdot 10^{-19} C$



Studiamo adesso il rumore dell'OP-AMP e dividiamo il rumore in bianco o no.

Ricordiamo che se varia il valore del + dell'OP-AMP verso zerro quello di - , cioè si produce una tensione continua che va a sommarsi sul segnale.

Abbiamo 2 fonti di rumore, quella sui resistori e quella sui condensatori.



La parte sui resistori è

$$\sqrt{\frac{e_{in}^2}{R_p^2}} = \frac{4nV}{\sqrt{Hz}} = 900 \text{ pA}/\sqrt{Hz}$$

approssimabile a 0 se considerato a 1 rumore di R_p
(e' uno di solito e non R_p grande)

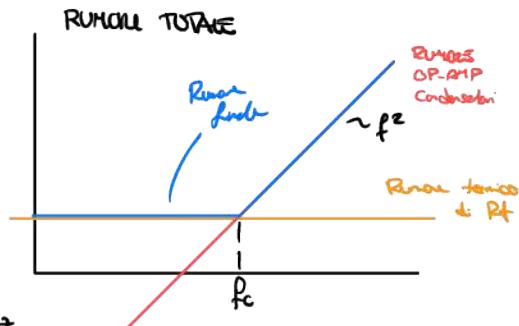
La parte sui condensatori è

$$\sqrt{e_{in}^2 (2\pi f G_{TOT})^2} = e_{in} 2\pi f G_{TOT}$$

è un rumore di zerro con la frequenza

Cerchiamo f_c per capire la banda

$$\frac{4nV}{\sqrt{Hz}} \cdot 2\pi f_c \cdot 10pF = \frac{4pA}{\sqrt{Hz}} \rightarrow f_c = 16 \text{ kHz}$$



Dove mettiamo quindi la nostra sensing frequency?

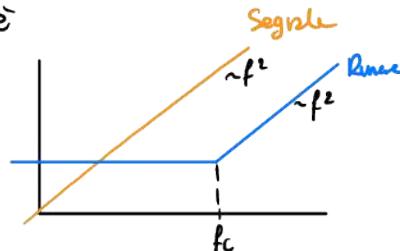
In genere se il segnale non dipende dalla frequenza noi poniamo una frequenza $< f_c$.

Tuttavia nel nostro caso il segnale dipende dalla frequenza, dobbiamo vedere anche se il segnale parla a noi ci interessa l'SNR. Per capire il minimo segnale misurabile mettiamo $\text{SNR}=1$. (2 ha il segnale dipende dalla frequenza se abbiamo un condensatore in ingresso)

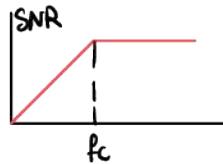
Infatti il segnale d'ingresso è

$$V_{\text{AC}} \cdot 2\pi f C_{\text{in}}$$

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 $f_{\text{AC}} > f_c$. (Tipicamente noi cerchiamo > intorno a fattore 10)

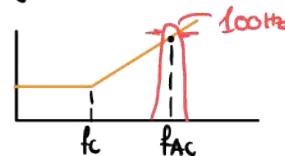
Supponiamo $f_{\text{AC}} = 200 \text{ kHz}$

- d) dobbiamo calcolare il valore del rumore a f_{AC} ($= 200 \text{ kHz}$)

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

Dobbiamo ricordare che il lock-in porta il nostro segnale a frequenza zero e nel fare questo il segnale perde metà ampiezza.



$\sqrt{\frac{S_n(f_{\text{AC}}) \cdot \text{BW}}{2}}$
Dato dal lock-in

$$\text{Allora } \text{SNR} = \frac{\frac{V_{\text{AC}}}{2}}{\sqrt{\frac{(e_n \cdot 2\pi f_{\text{AC}} \cdot G_{\text{tot}})^2 \cdot \text{BW}}{2}}} = \frac{\frac{1}{2} V_{\text{AC}} \cdot 2\pi f_{\text{AC}} \cdot C_{\text{in}}}{e_n \cdot 2\pi \cdot f_{\text{AC}} \cdot G_{\text{tot}} \cdot \sqrt{\frac{1}{2} \text{BW}}} \xrightarrow{\text{La nostra incognita} = 1}$$

Perciò

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

CAPACITIVE RESOLUTION

FORMULA IMPORTANTE

Perciò

$$\Delta C = MAF \quad (\text{arto Farad ?})$$

• PUNTO C

Supponiamo che C_DL cambie del 10% quando abbiamo l'ibridizzazione, se $\Delta C = 11 \mu F$ (cioè la minima capacità rilevabile) allora

$$\Delta C = MAF = \frac{0.1 \mu F}{\mu m^2} \cdot \text{Area} \cdot 0.1 \quad \xrightarrow{10\%}$$



Calcoliamo l'area del DNA? $\Delta A|_{DNA} = \frac{MAF}{\frac{0.1 \mu F}{\mu m^2} \cdot 0.1} = 1 / 1 \cdot 10^{-3} \mu m^2$

Se solo $1 / 1 \cdot 10^{-3} \mu m^2$ del working electrode sia coperto allora posso rilevare una variazione di capacità.

• Limit of Detection lo posso vedere come n° di molecole / volume della area piccola questo n° da la minima canticcia.

Così il volume cui un singolare sopra l'area



Noi sappiamo che il diametro del DNA è 2.5 nm.

Perciò il numero di molecole di DNA è calcolabile con $n^{\circ} \text{ molec. DNA} = \frac{1,1 \cdot 10^{-3} \mu m^2}{\pi \left(\frac{2,5 \text{ nm}}{2} \right)^2}$
in una slice 2D
= 22 h molecole

Il volume del semi-cilindro è:

$$\Delta A = \pi r^2 \quad \text{Perciò il volume } V = \frac{4}{3} \pi r^3 \rightarrow ? \text{ non dà il volume noto?}$$

E quindi:

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

14.06.2021

lezione

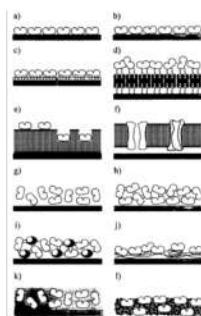
2h

Molecole

Come possiamo bloccare le molecole che mi vengono come ricezatori?

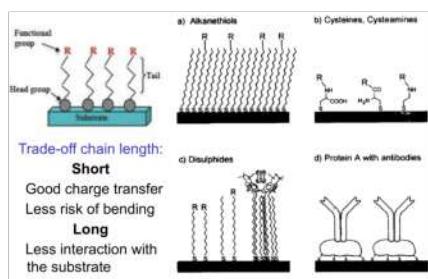
L'idea sarebbe buttare L sulla interfaccia e sperare che si attaccino, questo ha 2 lati negativi, 1) Non si attaccano sull'interfaccia e si spostano nel liquido, inoltre la presenza di una superficie rigida, la quale può essere anche carica cambia il comportamento della molecola.

Ci sono altri mod per far 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

INIZIAMO STUDIANDO IL CASO e/f [e è quella f solo che f è naturale e c'è fatto in lab] questi sono chiamati Self assembled monolayers (si mettono in automatico in quelle strutture ordinate)

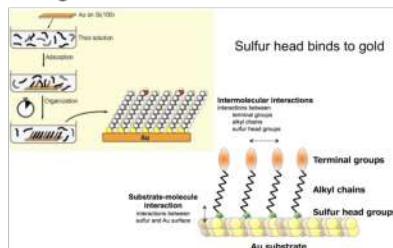


Noi ingegnerizziamo una testa per stare legata al substrato e una per legare con i reagenti.
Possiamo anche scegliere la lunghezza.

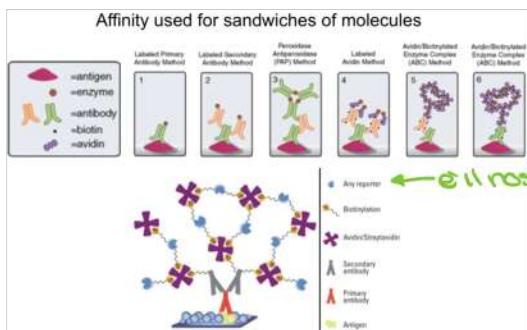
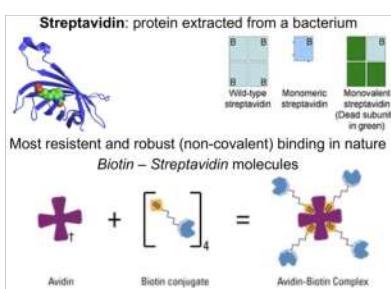
Sono chiamati self assemble perché noi mettiamo queste molecole in un fluido e le mettiamo sul substrato la testa si lega con il substrato e quando il liquido sarà evaporato vibreranno i nostri recettori

Tipicamente la lunghezza di questi reattori è 10 atomi di carbonio

Tipicamente questi Self assembled monolayers si legano ad un substrato di oro e la loro testa è tipicamente di 20Å se questo si lega molto bene all'oro. Questo tipo di recettori si chiamano : **Thiols**.

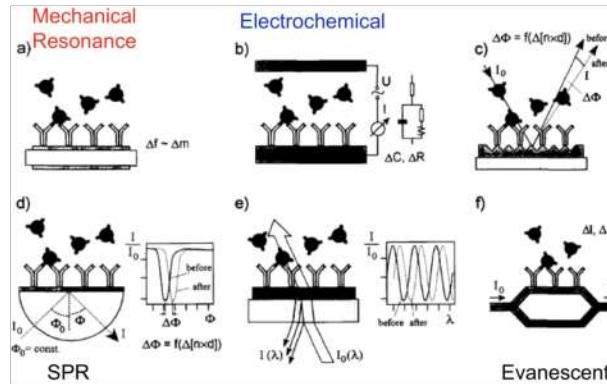


L'altro approccio è quello del lego, vibrano una Streptavidin che è una proteina estratta da un batterio

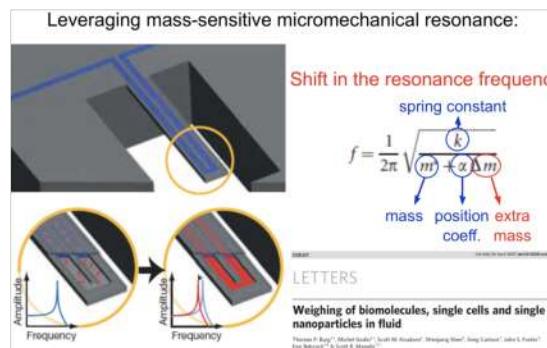


Abbiamo il marker tenuto da biotin, questi saranno tenuti in sospensione degli anti-IgG, per questo si attaccherà a un anticorpo secondario

TIPI DI DETECTION (Riordino)



ESSEMPO DI TIPO e)



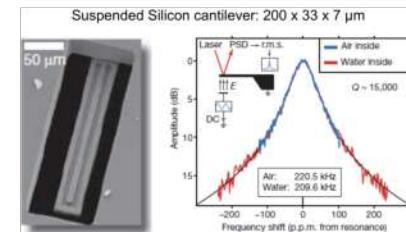
Ci sono 2 tipi delle tecniche
a)/c) che studiano la presenza delle molecole in base alla variazione rifrazione della luce

d) è una tecnica molto complessa

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

IN PRATICA HO CREATO UNA SPECIE DI NANO BILANCIA

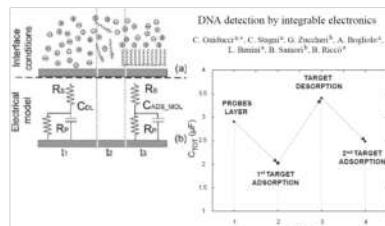
il risonatore è nell'ordine di grandezza di μm



Per far risuonare il sistema usano un piccolo campo magnetico e lo misurano con laser.

Per fare questo esiste per due zone un ambiente estremamente controllato (stabilizzatori di temperatura ecc...) capiamo dunque che questo non è utilizzabile in un lab on chip

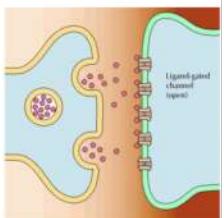
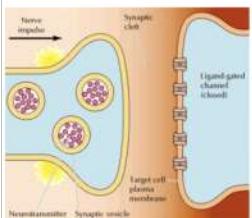
CAPACITIVE DETECTION DNA



In pratica è l'esercizio di elaborare fatto tutto giorno

NEUROTRANSMITTERS

Chemical mediation: 5-1014 synapses in the human brain



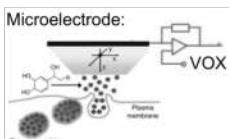
Exocytosis: extra-cellular release of small molecules in vesicles

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

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

Neurotransmitters can undergo redox

Se mettiamo un piccolo elettrodo vicino al punto dove la molecola/revo rilascia i neurotrasmettitori e mettiamo un potenziale edetto per zee una redox allora in vita abbiamo un corrente dipendente dal numero di molecole



Chemical messengers:

- Dopamine, adrenaline etc..

Current tracking:

- 5-1014 molecules in a vesicle
- 10fC released in 1ms $\approx 10\text{ pA}$

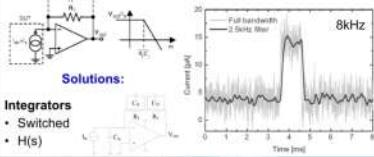
è molto un casino misurare questi

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

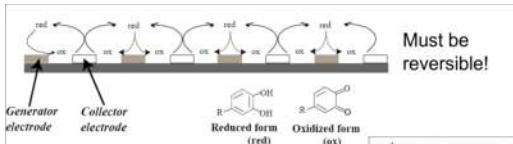
At the limits achievable with a standard transimpedance amplifier:

- R_f = 200MΩ
- 0.2pF stray capacitance

- BW = 4kHz
- 1.4pArms

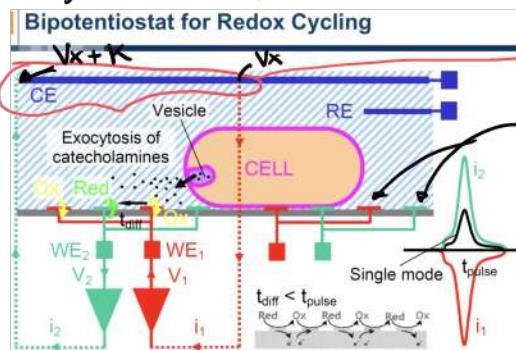


C'è un altro trucco per zannettere il segnale. **REDOX CYCLING**, infatti se di neurotrasmettori possono fare una redox e ossidazione in continuo più d'una volta, allora noi possiamo mettere più elettrodi per leggere questo effetto d: redox → oxidized → redox → ..., l'ho posizionato come in singolo elettrodo se non riusciamo a tenere le molecole



Ho 2 famiglie di elettrodi: messi a 2 potenziali diversi, i generator electrode fanno la redox e ossidano la molecola, la molecola si riduce per d'altrose si muove, probabilmente questa travasi in collector electrode che la riduce (fa tornare a redox).

Tranne questo modo possiamo zittire 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 5/6.



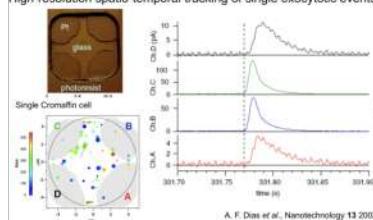
Bipotentiostat

Famiglia di 2 tipi di elettrodi:

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

SUB CELLULAR RESOLUTION (17.35)

High-resolution spatio-temporal tracking of single exocytic events:

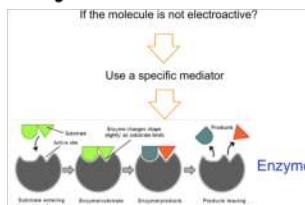


(Non ho ascoltato cosa ha detto)

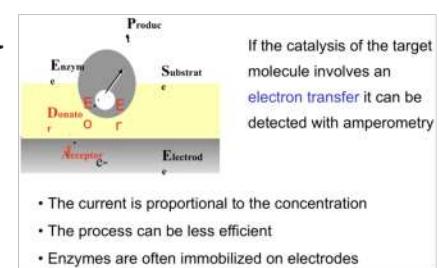
hanno funzoni diverse e noi vogliamo misure solo su tipo di neurotrasmettitori, tuttavia questi simili hanno voltammetria simile...

I PROBLEMI DELL'ELETTERFERENZE: Neurotrasmettitori simili, cioè che hanno voltammetria molto simile, (così la tensione per cui hanno la redox) quindi possono risultare in corrette non volute che inficia la lettura. Per risolvere questo problema facciamo qualcosa simile alla colorimetria, cioè sweepiamo la tensione e per ogni valore di tensione misuriamo la corrente

SE LA MOLECOLA NON È ELETROATTIVA NON POSSIAMO USARE TECNICHE DI MISURAZIONE CHE USANO L'ELETTRICITÀ. Tuttavia possiamo risolvere facendo sì che la molecola si leghi ad un enzima e questo perché ci possono essere prodotti eletroattivi



Un esempio di questa tecnica è il lettore del glucosio



Nel lettore di glucosio nella striscetta ho l'eletrodo ascotto, un "senz'aria" bagnato e lo rettivo, ho un prodotto di reazione che è redox detectable e perciò ottengo una corrente che è proporzionale al livello di glucosio.

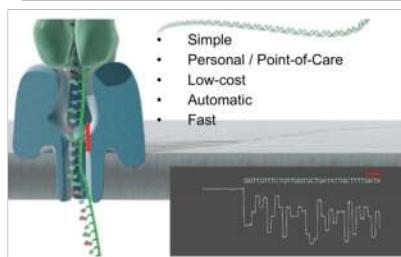
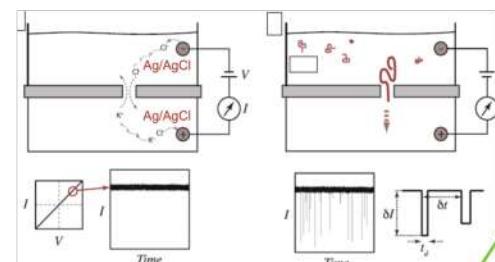
CAPITANO CHE QUESTO È UN CASO FORTUNATO XE' HO L'ENZIMA GIUSTO E NON HO BLOCCATO

DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

NANOSCALED TRANSDUCERS

L'idea è di rilevare la presenza di una molecola d' DNA ovvero usando una tecnica. Prendo un pezzo di materiale isolante e faccio un buco piccolo-piccolo nello stesso in soluzione e ci 2 capi di questo materiale isolante metto 2 elettrodi.

Anzi quando una corrente detta dagli iai che passano in questo buco, tuttavia quando una molecola passa per questo buco blocca il buco e perciò gli iai non si muovono e quindi la corrente non circola.



Non solo posso sapere quando la molecola passa nel buco (la molecola deve essere circa xer due zue in modo attivo per forzare questa operazione attivata da pressione meccanica), ma posso stimare ad esempio la lunghezza della catena d' DNA o inoltre se ho un rilevatore di corrente estremamente sensibile posso vedere le variazioni di corrente dei singoli pezzi d' DNA (che sono u) e giro di giri in forme in paleo diverse e quindi passa più o meno corrente.

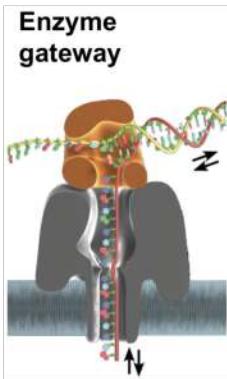
In pratica ho fatto un sequenziatore d' DNA

Per dire i numeri:

- l'impulso grande è $\approx 100 \text{ pA}$
- i piccoli cambiamenti di livello della corrente sono nell'ordine della decina di pA

Per zue queste belle correnti due zue me banda d' kHz e questo significherebbe che la molecola d' DNA deve stare ferma nel buco per ms (ma è troppo), Ci vorrebbe troppo tempo a sequenziare un intero catena d' DNA, però si può fare per pezzi piccoli.

Per mandare zutti il DNA in 2 base zta volta con la velocità che vogliamo c'è un enzima apposta



Ad oggi non riusciamo ancora a fare un rilevatore di corrente con zta banda in modo da leggere molti pezzi d' DNA: d' DNA per sequenziare un intero sequenza

19.04.2021

2h

Sample preparation

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

- Purification
- Concentration: (ridurre la concentrazione)
- Extraction
- Mixing con i reagenti
- Labeling (mixere i campioni con i fluorofore)
- Amplification

ESEMPIO DI PURIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE

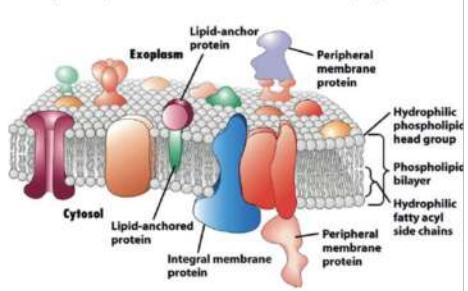
è magnetico e s'collega alla nostra proteina / elenco e lo rende magnetico (collegamento chimico)

Tutto questo passo perlo avviene in un biochip.

Dopo questo step vorremo staccare questi beads dal target zndk, si può fare calzando la superattiva in modo da dare + energia al target zndk in modo da rompere il collegamento, oppure estrarre composti chimici.

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

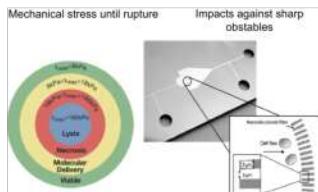
Very complex and robust: 4nm thickness, dynamical



Vogliamo rompere la membrana che per essere sottile è molto resistente. Per rompere la membrana c' sono diverse tecniche

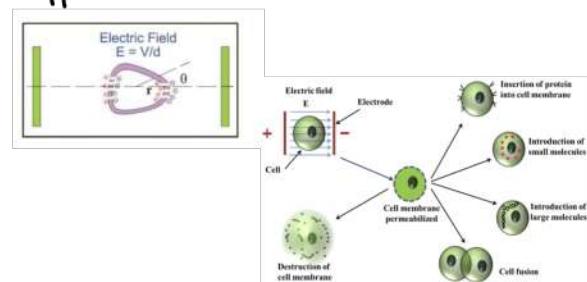
- **Chimica** (usa il sodio dodcil sulfato, funziona e' facile ma piu' abbano le molecole in soluzione con questo composto)

- **Mecanica**:
con forza teniamo la cellula contro uno degli spazi a pita



Alte sono per compressione o tranne le tecniche meccaniche.

- **Approccio elettrico. ELECTROPORATION**:

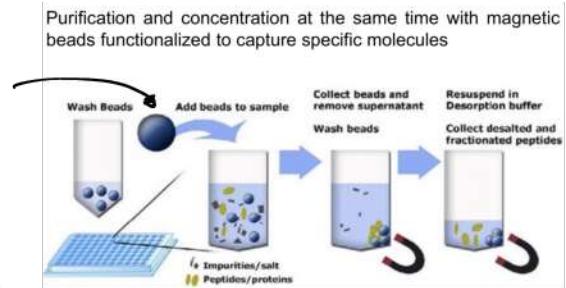


se si applica un campo elettrico abbastanza alto si può distruggere la barriera della cellula.

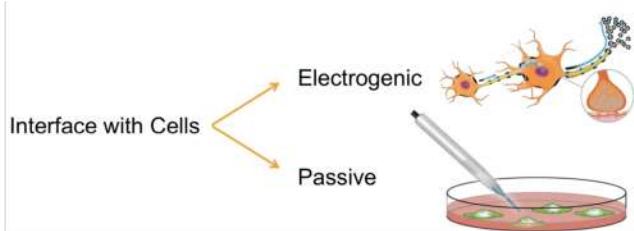
Se si usa un campo elettrico un po' più basso si può aprire temporaneamente la membrana della cellula in modo da poter inserire dentro qualcosa.

Tipicamente l'eletroporazione (250 V e 1ms) per ricaricare 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 d'uso cresce le cellule su d' un chip sono per lo studio di reti neurali, scoperta di farmaci o per crescere organi.

Direct Electrical Interface with Cells

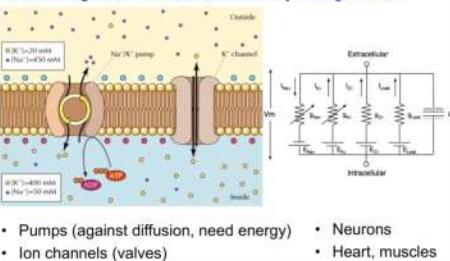
Biological investigation mainly relies on [optical microscopy](#)

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

Altre basse delle cellule elettrogeiche ci sono i canali di ion. Ogni ion chiamato (che dovrebbe essere una proteina) lascia passare solo un tipo di ion dato da un canale.

Electrical signals within cells are driven by [ionic gradients](#):



- Pumps (against diffusion, need energy)
- Ion channels (valves)
- Neurons
- Heart, muscles

Ion channels: transmembrane protein.

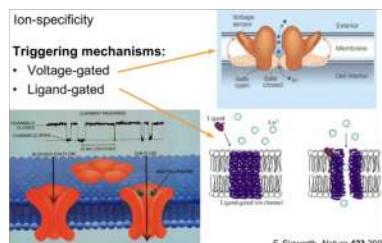
Se chiusi: $I = 0$

Se aperti il passaggio degli ion è dato solo dalla diffusione

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

Per interfacciarsi ad una cellula elettrica ci sono 3

- leggere la tensione (ci sono 1 elettrodo dentro e uno fuori dalla cellula ci sono la tensione ai capi della membrana. Tuttavia abbiamo una grande capacità capacitiva (??) Questo fa sì che la tensione letta sia molto minore rispetto a quella reale).
- leggere la corrente attraverso i canali dei ion, questi canali possono essere aperti imponendo una tensione sopra tot sulla membrana oppure tramite particelle chimiche. Però nei due casi queste 2 tecniche zappano i canali e può misurare la corrente.

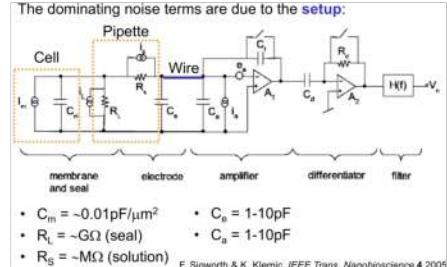


PATCH-CLAMP: Misurano la corrente di un singolo ion channel. Facciamo questo tenendo una mini pipetta. Se siamo fortunati, nella parte che prendiamo con la pipetta c'è solo un ion channel.

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

L'aspetto critico è dato dagli elementi presenti della pipetta

The dominating noise terms are due to the setup:

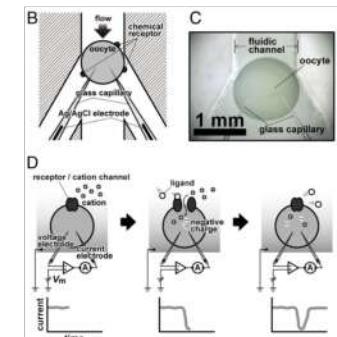


F. Sigworth & K. Klemic, IEEE Trans. Nanobioscience 4 2005

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 odorant sensor:

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

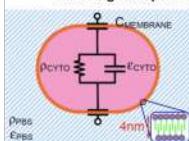


ALTRO TIPO DI CELLE: PASSIVE CELLS

PASSIVE ELECTRICAL SIGNAL EQUIVALENT

As the passive electrical properties are probed, any kind of cell can be detected

Small signal equivalent: the single shell model



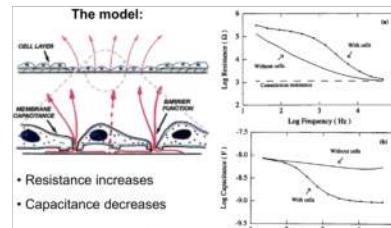
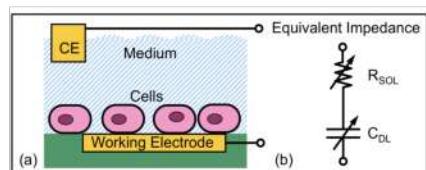
- $\rho_{PBS} = 66 \Omega \cdot \text{cm}$
- $\varepsilon_{PBS} = 78$
- $C_{MEM} = 0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$
- $\rho_{CYTO} \sim \rho_{PBS}$
- $\varepsilon_{CYTO} = 60$

- Low frequency (below $\sim 100 \text{ kHz}$): insulating sphere
- Dead cells (lysis, broken membrane) are hardly discernable

La membrana si comporta da capacità. La zona blu è il medium dove teniamo la cellula che è conduttivo. All'interno della cellula c'è la resistenza e la capacità del citoplasma (?)

Possiamo vedere la cellula come una sfera isolata all'interno di una zona totale di conduttività. Perciò possiamo comporre una zona senza e una zona con cellule sovrapposta le impedenze.

Per vedere la presenza o meno di queste cellule usiamo la solita tecnica con i WE

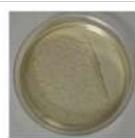


Notiamo che nella parte dell'elettrodo coperto dai molecole la dabile layer appiattisce debolese mentre la resistenza aumenta il suo veloce.

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

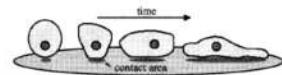
Different mechanism are taking place:

- Sedimentation
- Adhesion and spreading
- Growth and reproduction
- Response to chemo-mechanical stimuli
- Confluence
- Death



The contact area changes over time

Average population information



Così come queste sono espanso le cellule e queste sono in movimento.

Un altro vantaggio di questa tecnica è che è indipendente dal tipo di cellula, così non possiamo discutere.

Inoltre non ci serve solo il veloce dell'impatto ma abbiamo soprattutto temperatura, concentrazione di sostanze delle cellule, medium in cui sono le cellule ecc.

Capitano dunque che per questi motivi non si possono in genere confrontare 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. Leggono 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 ne prendiamo una cella che sappiamo 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 comparemo

Tipo con il covid, prendo una sequenza di basi vicina del covid e la cerco nei campioni.

Dovrò anche scegliere parti che non cambiano con le varianti

La DNA microarray funziona tramite l'ibridizzazione del DNA.

Pretendiamo quindi selettivo il DNA sopra i 95° questo si spezzi (denaturazione del DNA).

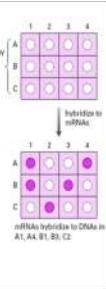
Quando la temperatura cala sotto i 75° il DNA si riunisce (ibridizzazione) soltanto con il suo complementare (Non so se è vero).

Per fare il microarray io preparo un substrato su diversi pezzi di DNA che stanno cercando poi metto la sorgente, scelto e poi scavo via.

Se il DNA si è attaccato rimane attaccato al substrato e posso vedervi / detectarlo.

Principle of the microarray

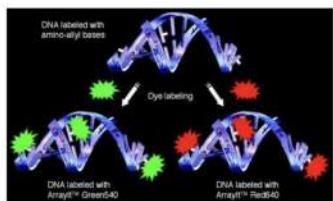
- Known DNA is attached (i.e. By spotting) on the chip surface, at known positions
- An unknown sample containing DNA is placed on the chip.
- Wait for the DNA to hybridize to its complementary and then wash.
- Acquire the map of positions where DNA sticks (i.e. optically or electrically).
- Result: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



Il metodo per vedere se ho il DNA è per la fluorescenza. Posso fare questo attaccando chincante molecole fluorescenti al DNA prima dell'ibridazione.

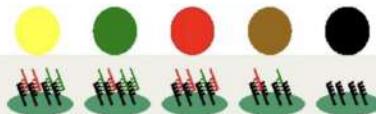
Tramite la fluorescenza si possono usare anche più colori:

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

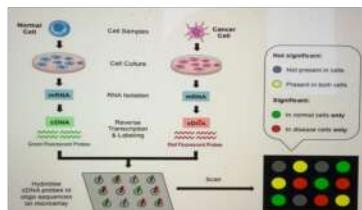


Two colors: Comparative tests

- 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

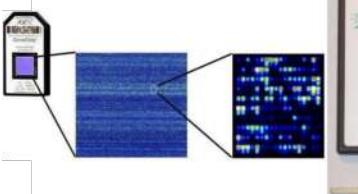


Questo tipo di analisi si può fare anche con l'RNA, anche se non c'è l'ibridazione del RNA. Si usa la reverse transcriptase che è un enzima, tipicamente nei virus, che trasforma una sequenza d'RNA in una d'DNA



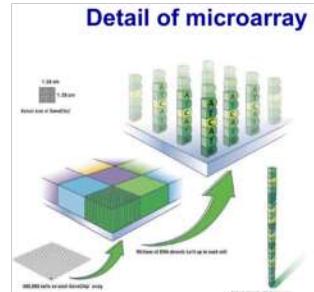
High density microarrays

- 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 celle, ognuna di lunghezza di 26 basi

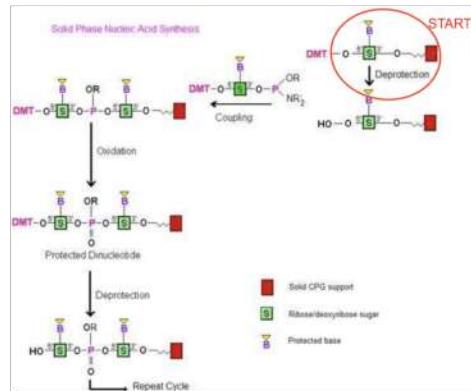
Detail of microarray



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

Artificial DNA synthesis

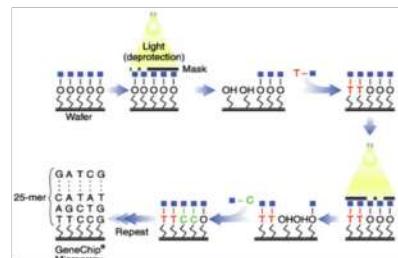
- We start with a base linked on its 3' end on a solid medium (i.e. Porous column, Bead, chip). The 5' end is protected by a 'capping' (DMT=Dimethoxytrityl), preventing the formation of other bonds.
- 1: DMT is chemically removed (i.e. with trichloroacetic acid TCA), the 5' carbon becomes reactive. The chemical agent is then washed away
- 2: A solution containing **pure** bases (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 step 1, 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 tutte basi uguali una dietro l'altra e avere una volta tipo AAAAAAABBBBBB... quando io volevo solo AB.

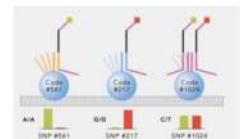
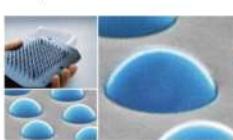
I blocchi rossi sono il substrato, poi S è lo zucchero e poi abbiamo B che è una delle basi. Abbiamo poi DMT che è una molecola che impedisce alla base di legare, perciò noi la togliamo chimicamente. Per aggiungere la seconda base mettiamo una soluzione di solo la base che vogliamo aggiungere prima. Questa S leggerà al nostro "vano reattivo", a sua volta però questa base aggiunta ha un DMT che dobbiamo togliere e via così. In mezzo c'è anche una base di ossidazione che serve a stabilizzare il tutto.

Per distruggere il DMT posso usare anche luce UV, grazie a questo e grazie alla fotolitografia verso a 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 fotolitografia non è proprio perfetto perché magari non tutte le DMT si sono rimossi ecc..

PCR (Reazione a catena della polimerasi)

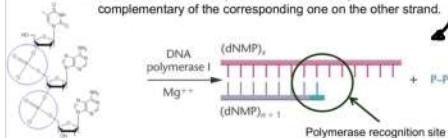
Permette di replicare *in vitro* copie identiche di un campione DNA iniziale.
In pratica permette di amplificare il segnale.

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 one on the other strand.



Come fa il polimerasi a duplicare il DNA?

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

In pratica facciamo un ibridizzazione per capire il DNA, quando riscaldamo il DNA si torna ad attaccare ma non si attacca perfettamente ma belli lascia le discontinuità dove la polimerasi lavorerà per amplificare il DNA.

Ogni volta che scaldano e raffreddano il DNA tecnicamente raddoppiano 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

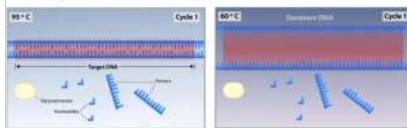
i pezzi che la polimerasi andrà ad attaccare sul DNA

3 phases: Thermally driven:

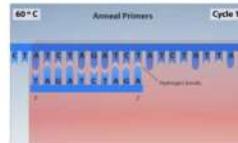
- Denaturation
 - At temperature around 100°C, the 2 DNA strands separate
- Annealing
 - At lower temperature (60°C), the single strands hybridize with primers, selecting the portion to be amplified
- Extension
 - At medium temperature (72°C), the polymerase start working, duplicating the DNA

The cycle repeats several times, every cycle the amount of DNA doubles

- Denaturation: Heating the system to 95 degrees, DNA separate into 2 strands

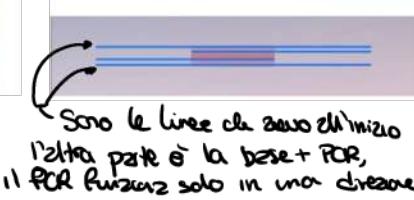


- Annealing: Cooling the system, primers find their complementary sequence and hybridise



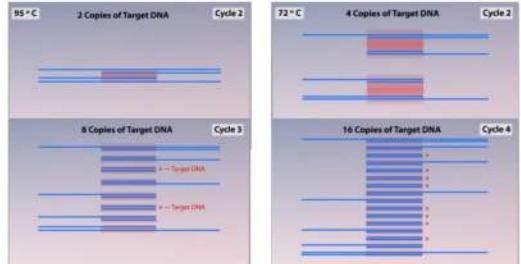
Tipicamente noi con la PCR noi vogliamo amplificare tutto il DNA ma amplifichiamo solo le parti che mettono con il primer

- 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

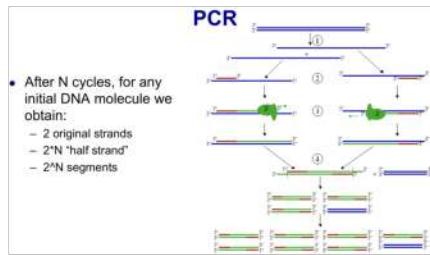


Quando raffreddano il primer si attacca al DNA

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

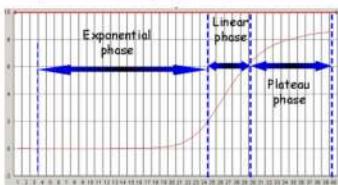


Capriamo quindi che entro avanti amplificano solo il segmento del Primer e non tutto il DNA.



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

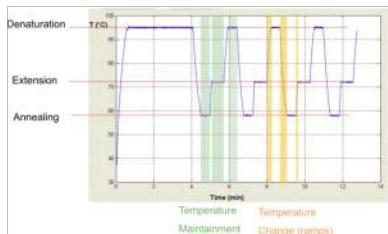
- Microarray signal is proportional to the DNA quantity
- If in the sample there is low DNA concentration, a direct hybridization may not be enough to detect the signal
- If a PCR is made before the microarray test, the potential DNA target is amplified and so become detectable.
- Quantitative information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

Amplifica i segnali solo se presenti, se poi ci sono possono usare un microarray per identificare la presenza.

L'informazione sulla Quantità iniziale di DNA sono perse

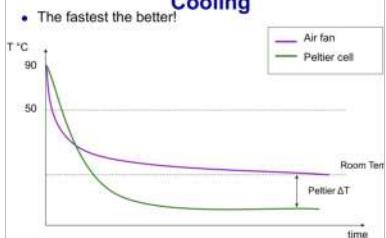
Nella PCR è molto importante avere un ottimo controllo sulla temperatura.

- T denaturation
 - Too high: polymerase can be damaged
 - Too low: DNA does not denature completely
- T hybridization
 - Too low: primers may bind a-specifically, amplifying unwanted DNA Wrong result
 - Too high: Primers do not bind.
- 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 raffreddare abbastanza velocemente il sistema.

Cooling



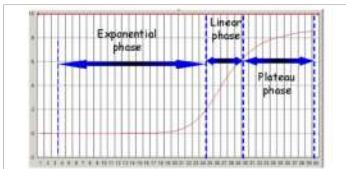
Peltier è + lenta ma va a meno gradi.

REAL TIME PCR (anche chiamata QPCR)

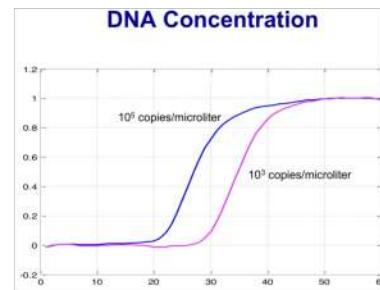
- Standard PCR allows the amplification in vitro of the DNA, to obtain identical copies of the initial molecule.
- The detection at endpoint (by microarray or electrophoresis) does NOT provide quantitative results.
- Realtime PCR allows a precise quantification of the DNA present in the initial sample.

De non confondere con RT PCR che sta per reverse transcripted PCR.

In pratica con questa perde anche la quantità.



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



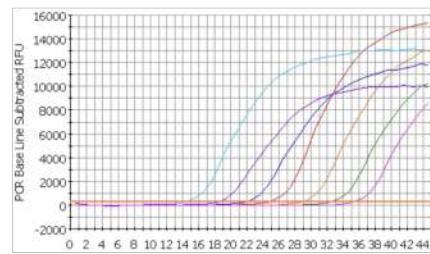
Abbiamo differenza solo in mezzo al amplificazione

Con un po' di matematica notiamo che la parte esponenziale dipende dalla concentrazione e che la concentrazione consente 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:
 $qDNA = Ci \cdot 2^n$
- 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 = $Ci \cdot 2^n$
 - 80% qDNA = $Ci \cdot 1.8^n$
 - 60% qDNA = $Ci \cdot 1.6^n$
 - 0% qDNA = $Ci \cdot 1^n$

Esempio con 7 campioni con diversi valori di concentrazione



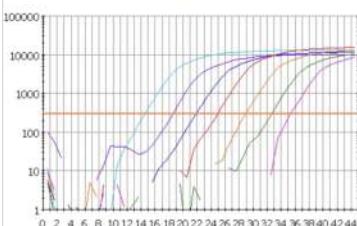
Il campione viola è diluito 1 milione di volte il primo (azzurro)

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

Per ricevere valori da questo esperimento tipicamente mettono in 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

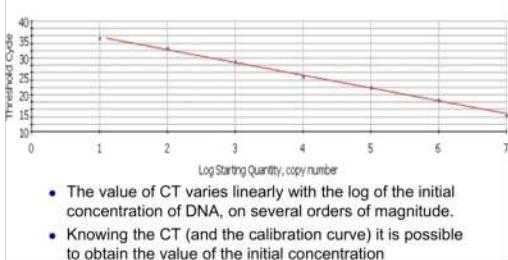


Cycle threshold

- 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.

Ricavo la C_T di tutti gli esperimenti e ricavo un grafico.

Realtime PCR linearity



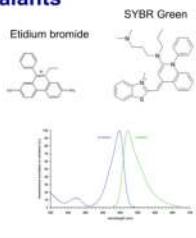
Visto che io so il valore della concentrazione di DNA in tutti e 7 gli esperimenti, visto che sono appena esperimenti.

Potrei quindi usare questa curva come riferimento e ricavare la concentrazione per un qualsiasi valore di CT.

Credo che per misurare il valore di DNA per superare 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 sotto 2 doppie eliche.

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 is present.
- It detects only the total amount of DNA, it can't distinguish between different sequences



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

TaqMan probes

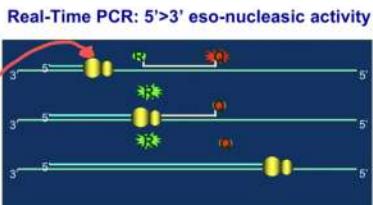
- Is a chain of normal DNA with a fluorophore linked at its 5' end (Reporter) and another molecule (Quencher) in its 3' termination
- The property of the quencher is to 'switch off' the fluorescence of R when Q and R are close each-other. The photons are absorbed by Q instead of being emitted by R.



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

Ho poi una reba tipa parma che mangia il pezzetto di DNA che tiene con R e Q in modo che questi si possano distanziare e risultare luminosi sotto una luce fluorescente.

È la polimerasi quella che fa par-ma con il DNA.



il pezzetto di DNA che c'è sotto è un pezzo di DNA complementare che vogliamo rilevare

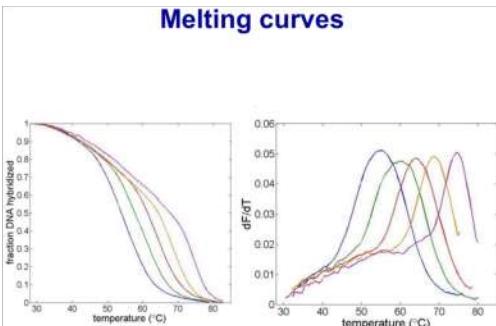
- The Polymerase enzyme during replication cuts out any existing DNA on its trail
- For any duplication event a new probe becomes fluorescent

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
 - Amplicone 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 discartare diversi prodotti dell'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 60°C
 - 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
approach con questa tecnica

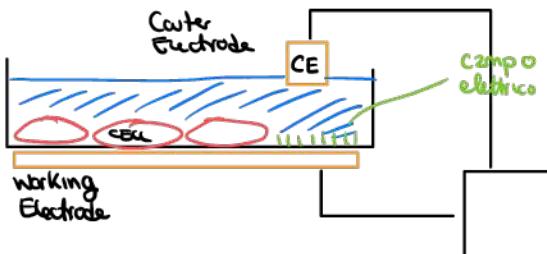
Inoltre sono anche più difficili da realizzare

RITORNA LEZIONE CON IL CARMWATI

Controllare le cellule in modo dinamico.

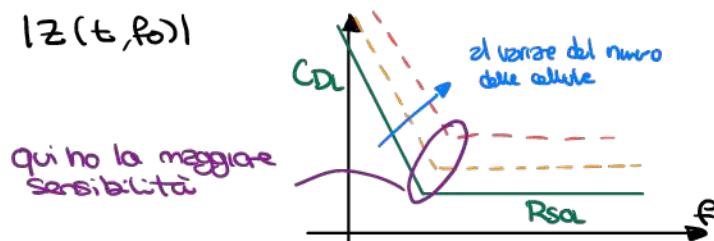
Quando abbiamo una cellula in una soluzione ionica abbiamo un elemento ed una impedenza dentro un liquido a bassa impedenza. Avremo parlato della crescita delle cellule in un petri di Petri.

Circuito equivalente



Qual'è la pendenza ottima per calcolare l'impedenza Z ? vediamo su bolla

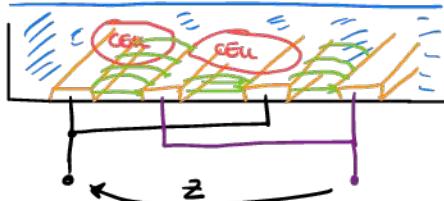
$$|Z(t, f_0)|$$



Tipicamente $C_{DL/CE}$ è
una la considerano
perché è molto grande

Quando abbiamo molte cellule abbiamo che R aumenta mentre la $C_{DL/CE}$ diminuisce
il punto ottimo dove misurare l'impedenza è dove ce la correr peggiori così
riesco a trarre il comportamento sia di R che di C

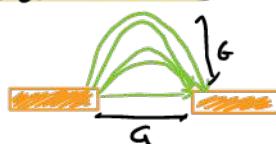
Questa era la vertical configuration, esiste anche un altro tipo di struttura
sia detta:



Complexer Configuration

Quello che cambia rispetto a prima è
il campo elettromagnetico E

Possiamo dire che se la distanza tra gli elettrodi
è 6 volte quella le linee del campo si allargano
di una distanza G

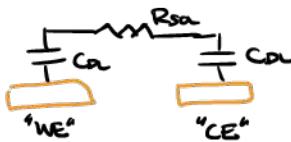


Posso fare G in modo che sia
uguale all'altezza delle cellule che
andranno sopra gli elettrodi

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

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

Sperimentalmente si vede che con la guida G la copertura configurata è più precisa.



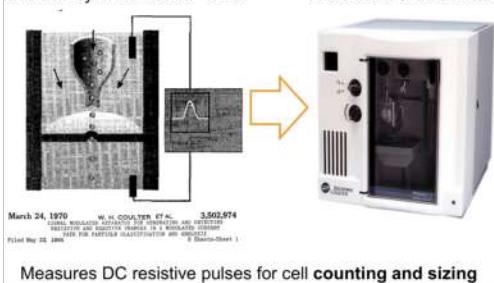
IMPEDANCE FLOW CYTOMETER

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

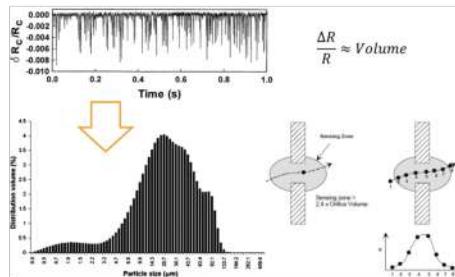
A routine lab. instrument



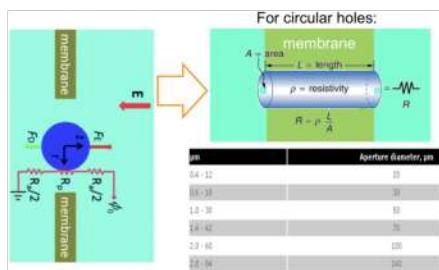
Measures DC resistive pulses for cell counting and sizing

Tipicamente la parte con il micropore è intercambiabile.

il picco d'alterazione d'impedenza misurato è dipendente dalla grandezza della cellula quindi possiamo discriminare le dimensioni delle cellule.

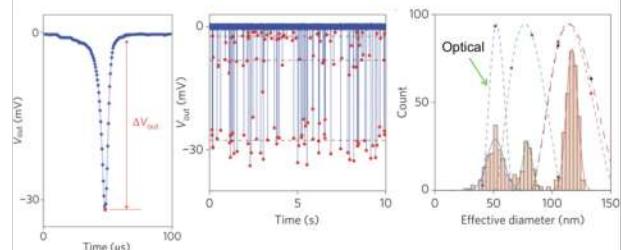


Si può anche calcolare la resistenza fluidica del micropore, considerando il buco cilindrico.



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

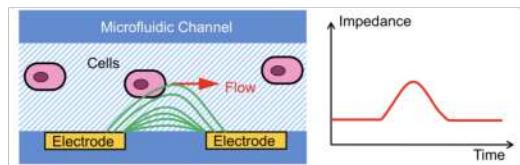
Resolving between 50nm, 75nm and 117nm diameters with a throughput of 500'000 particles/sec



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

Se faccio il buco + grande non è una grande idea perché perdere molto in sensitività.

Potremo trovare in modo di misurare le cellule senza contatto

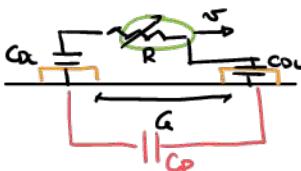


- A novel approach, pioneered by Morgan and Renaud (~2000)
- Tracking impedance between close electrodes over time
- Measurement in AC (to bypass double layer)
- High-throughput single-cell analysis (beyond sizing)

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

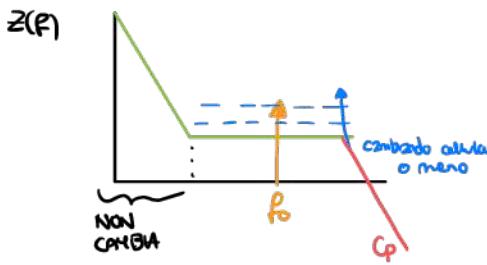
Non ho problema del clogging perché il canale microfluidico è molto largo.

- IN QUESTO CASO PERÒ HÒ TEMPO LIMITATO PER FARLE LA MISURAZIONE**



$$\Delta t = \frac{G}{\omega} \quad \text{tipicamente} \approx 0.1 \text{ ms}$$

- (NOTAÈ IN questo caso le cellule non toccano i WE perciò qui i double layer non vengono visti solo R_{sd} .



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

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

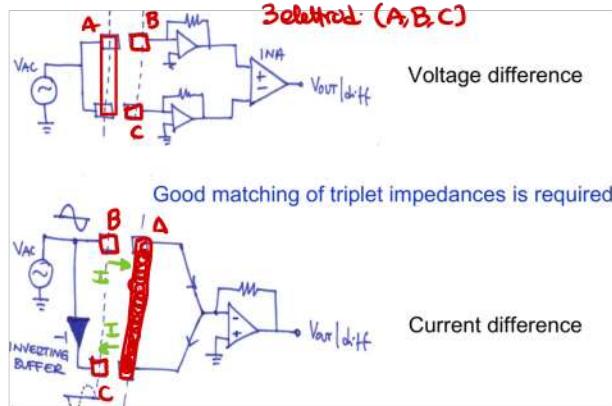
Un altro problema di questa tecnica è che l'altezza della variazione del picco di impedenza dipende dalla altezza cui passa la cellula, più la cellula è vicina agli elettrodi più il picco è alto (e pertanto di volume).
QUESTO È UN PROBLEMA SE VOGLIO ESTRARRE LA GRANDEZZA DELLE CELLULE.

SI PUÒ USARE UN HYDRO DYNAMIC CHANNEL PER "BLOCCARE" le cellule in una determinata area



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

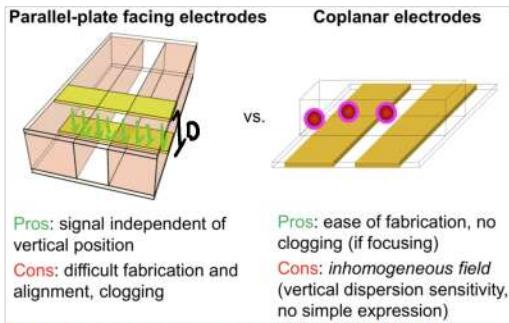
La differenza tra i 2 segnali può essere fatta sia in tensione che in corrente



In condizioni di bilancio la corrente nel transimpedenza ampli è 0 quando non ha differenza, dunque non ha corrente che entra nell'ampli

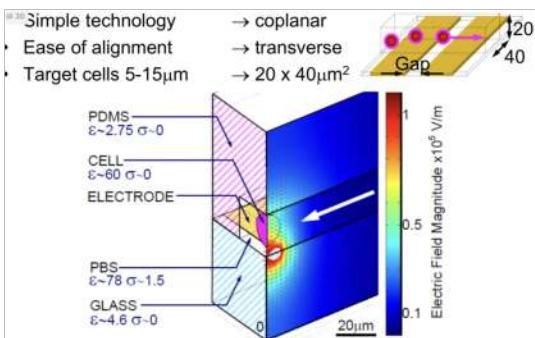
Quale tra i 2 è meglio? Dipende

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

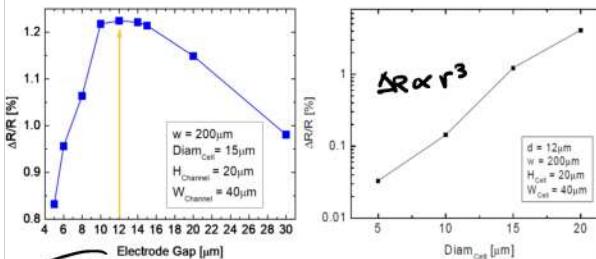


Uno dei lati negativi del caso coplanare e' che il campo magnetico da calcolare e' un cerchio.

Design of a Sensitive Electrode



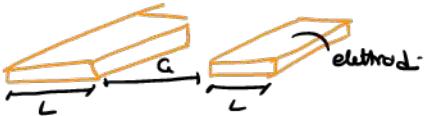
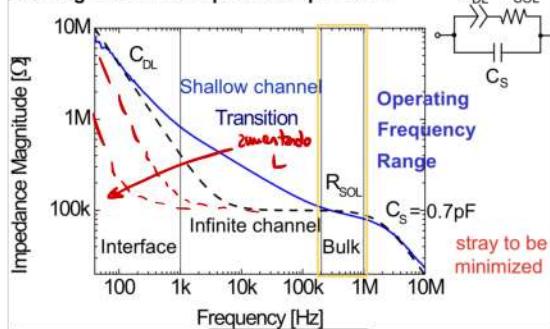
- The gap sets the vertical extension of the sensing volume
- An optimal gap exists for a given cell diameter
- Sensitivity scales with cell volume and vertical height



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

Un elemento importante è dato anche dalla lunghezza (larghezza) dell'elettrodo, perché la Doppia layer capacitance dell'elettrodo è dipendente dalla sua lunghezza. Se zero L zero la zona del plateau.

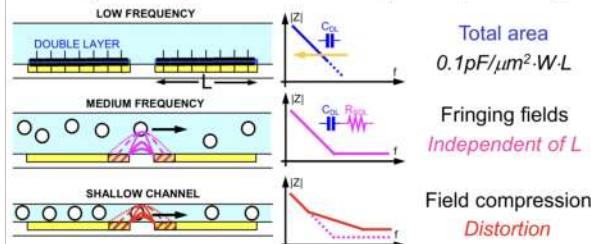
Four regions in the impedance spectrum:



la curva vera tratteggiata è quella ideale, nella retta vedo che ho più impedenza (linea blu).

Questo effetto è dato da una distorsione del campo elettrico dovuta dal fatto che in questo caso l'acqua non è più nera sopra il campo elettrico (no ridotto il campo).

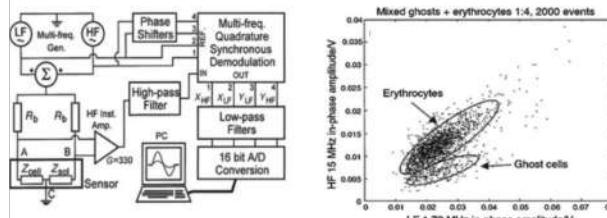
Different geometric parameters control separate spectral regions:



- 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 zero della L degli elettrodi per avere il plateau perché avrai sempre il canale piccolo e ci sarai sempre questo effetto.

Label-free cell discrimination based on intrinsic electrical properties



Two frequencies 1.7MHz and 15MHz

S. Gawad et al., Lab Chip 1 2001

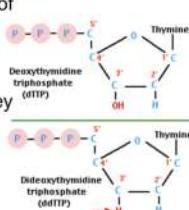
Non so cosa sta dicendo prima di. Cellule morte e 2 Regole, quella bassa per contare e quella alta per classificare i tipi di cellule. Questo poi può essere utilizzato per poter estrarre un elettore nel canale microfluidico e fare un sorting delle cellule.

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

Il costo del sequenziamento del DNA dal 2000 è crollato. Dal 2004 il costo è cominciato a crescere, ed oggi sono circa 1000 € a sequenziato.

Primo generatore di sequenziamento (198x - 2004)

- Sanger method (Chain termination "dideoxy").
- In the PCR mix, beside the normal deoxy-tri-phosphate 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



Dna sequencing

- A small percentage of Dideoxy base of a single type (Ex. Thymine) 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



Credo che la teoria consista nel far sì che la polimerasi aggiunga basi finché non trova l'ampiante della stessa base.

In pratica credo che in pratica per ogni base ho testi DNA di lunghezza diversa dipendente 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 riusco a capire qual'è la sequenza.

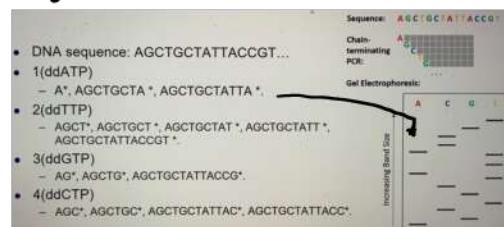
Il grafico si può anche fare con l'elettroforesi, ma non si può seguire direttamente tutto il genoma tipo quello che ho con l'elettroforesi. Si usa lo shotgun sequencing (cioè sequenziare piccole parti di DNA).

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)

Facciamo 4 test, ognuno modificato per una base.

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



Si basa sul fatto che prima di sequenziare il DNA lo lo bombardano con qualcosa in modo da spezzarlo in modo casuale.

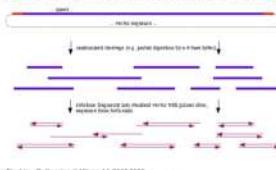
ATTENZIONE!! Io il DNA c'è l'ho in diverse copie quindi le spezzo tutte e spaccando risultante varie delle parti che si incollano.

Allora io sequenzio tutti i pezzi e poi con un SW io mi accorgo delle parti che si incollano e allora mico le 2 parti.

ATTENZIONE! potrei non riuscire a sequenziare tutto

Shotgun sequencing

- The whole genome is broken randomly in small segments.
- Starting from several copies of the genome, the fragments will partially overlap.
- Each segment is separately sequenced.
- After sequencing all the fragments, a software program finds the overlaps and matches the fragments reconstructing the whole sequence.



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

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.

Preparation

- Flush** 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.

Run

- Scan** 4. It measures 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

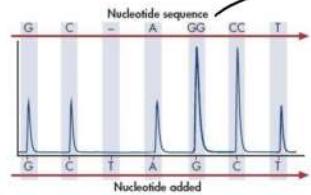
Post Processing

effetto tipo PCR queste basi si attaccano alle loro basi complementari. Grazie a una lucina di un ricordo vedo dove queste basi si incarnaano e quindi dove questa base è presente. Il grande vantaggio è che questo avviene in contemporanea per tutti i pezzi d' DNA della "Libreria". Quindi riesco a perdere molte informazioni in parallelo.

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 pellicola 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 pezzo di una nuova base sia incorporata. (Questa è la tecnica che ho studiato)

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 d' sequenziamento.
Hanno sempre un array ma non crea bloccato il DNA ma bensì la polimerasi

NON CI HO CAPITO NUNCA !!!
L'esame (1.35)

PacBio (3rd generation)

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

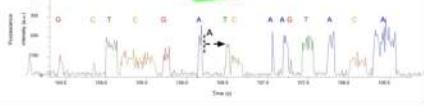


- The bases in solution are labelled with 4 different fluorophores
- Instead of being the polymerase moving on DNA is DNA moving over the fixed polymerase.

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 Gedo le per zone la fluorescenza re: illuminata in un modo qualitativo la parte solo esterna e che e' smentita la reazione.

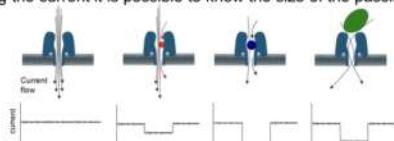
Il vantaggio e' di non dobbiamo have flow e wash perché il DNA passa da solo nella piumerina.

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

4^a 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 dei nanopori retta membrana.
e basa sulla corrente che passa nel buco.
(stessa idea vista con i carmelli)

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

Più che altro e' un metodo complementare
rispetto ai precedenti, infatti tipicamente viene
usato complementaremente con la sfoglia per
"scorgere" la base che ci sta meglio.

Con la sfoglia infatti posso non vedere
tutte le cose tipo il DNA che e' ribombato
però.

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

12.05.2021

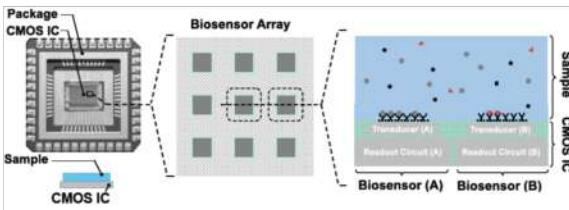
Lezione

2h

CMOS Biochip

Ci si aspetta che la microelettronica sfondi nel campo medico.

Andando nel campo della microelettronica abbiamo da abbiano una limitazione nella massima potenza dissipata e nei valori dei componenti (R, L, C) (tipico che non possa farlo).

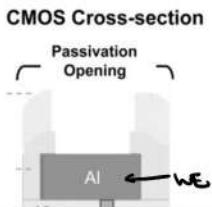
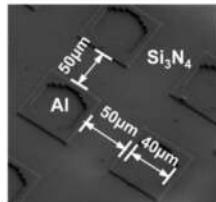


Aluminum of metal lines and bonding pad is too reactive and must be «converted» into gold or platinum for electrochemical detection.

The top passivation (Si_3N_4) is waterproof.

Unione tra microelettronica e
microfluidica, ci saranno dei
pezzi di metalli di spessore del
stesso del ferro da working
electrodes.

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



non c'è la montagna. Si può ricoprire tutto con un nuovo strato di metallo per far gesto ci sono 2 mod:

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

Abbiamo che l'elettrodo è qui, in una sorta di buco. Questo succede per come è stato creato il circuito (per passivazione?), questa montagna può ridurre il movimento del fluido e la diffusione.

Prima di tutto vogliamo cambiare metallo (in uno + compatibile e poi vogliamo che lo svantaggio è che non sono molto usati con questa tecnica).

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

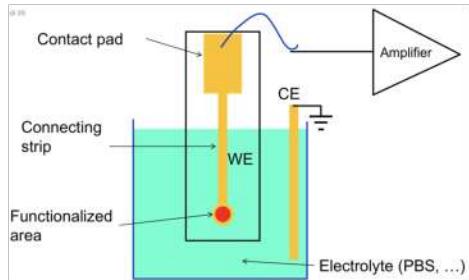
Lo svantaggio è che non sono molto usati con questa tecnica.

Quel è l'impiego di zee il silicio come substrato di supporto?

Il vantaggio è che possiamo mettere l'amplificatore subito in modo da fare poco strato e zee poco ruvide.

Ci sono svantaggi ad zee il silicio come substrato però?

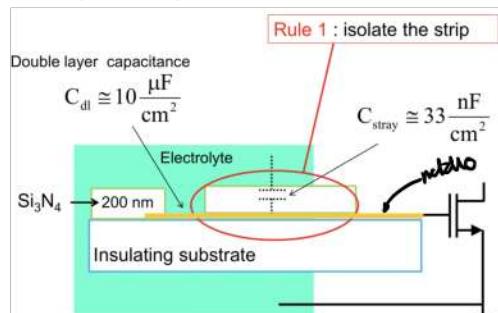
Sì, supponiamo d'estre in una situazione del tipo



Possiamo zee 2 casi:

- Substrato isolato
- Substrato di silicio

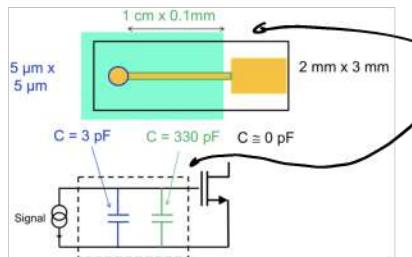
Substrato isolato



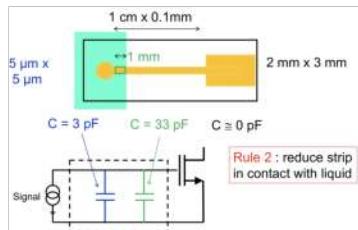
Avremo comunque una capacità parallela data al fatto che il metallo è isolato dal substrato da un piccolo strato di materiale isolante. Al centro del CEO del metallo la zona isolante era molto alta e quindi la capacità era molto piccola.

Per ridurre questa capacità :

Fare l'isola + spesso possibile, e ridurre la lunghezza inutile per la qual metto il working electrode nell'acqua

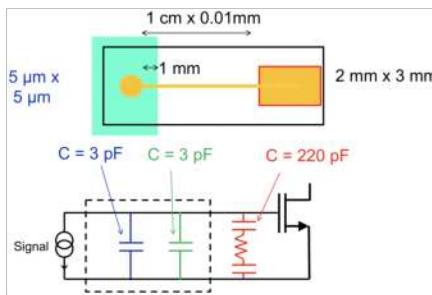
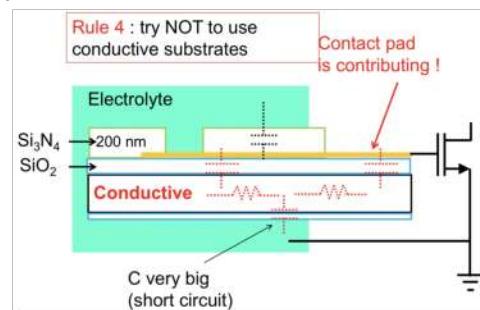


Se il posto d'acqua è fatto altro ben nello stesso solo il ws riduce questa capacità



Substrato di Silicio

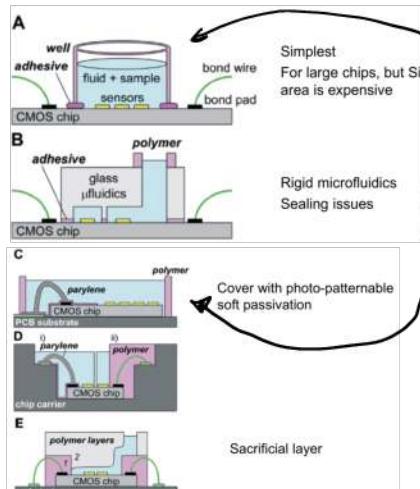
In pratica ho che il substrato è di silicio
e secca il silicio ha il netto e l'isola, il problema è che il silicio in pratica dev'essere abitare



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

Packaging

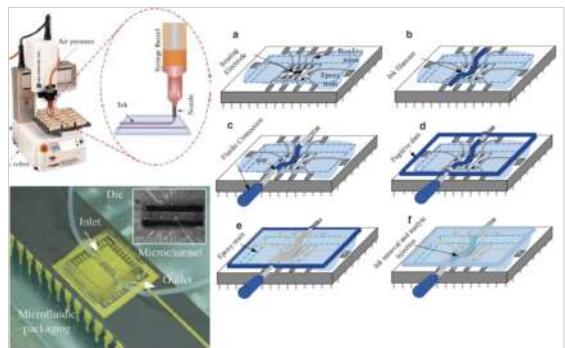
In elettronica tutti i packaging sono fatti per rendere il chip del mondo esterno, gli elettroni qui vogliono tenere delle regole del dip zperte belli da determinati punti possono toccare l'acqua su cui vogliono fare l'analisi.



Possiamo mettere un contenitore per avere il fluido solo sulla parte di chip. Il problema è che c'è soltanto la parte microfluidica e molto più grande è quella del chip, allora 3: può fare male nel caso C

Copriamo tutto con un polimero e poi lo togliamo dove c'è bene, ma è difficile del pto d: vista del substrato e materiali (vedo intendo che è difficile pulire bene tutto)

Si può anche fare con un "flaskette sacrificale"



ho il chip, ci costruisco un canale perciò ci metto il pezzo sopra 2 volte. Poi uso un solvente per rimuovere il canale iniziale.

Il problema principale è che non so se riusco a pulire tutto bene il canale con il solvente

TESI INTERESSANTI PER IC