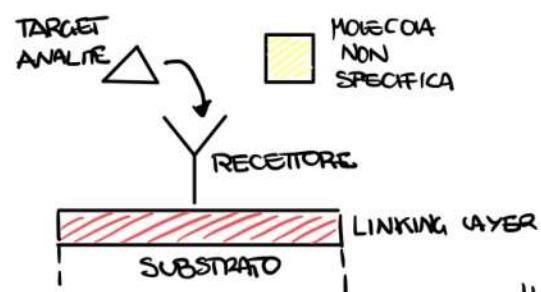


Biochip

BIOSENSORS

- UN SENSORI CHIMICO BASEATO SU UN'ENTITÀ BIOLOGICA (DEFINIZIONE FORTE)
- UN SENSORI 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 CERCARE 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 ENTROSPATICA DEL SISTEMA E LANCIANDO SU 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 (GENOSSENSORS)

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

Parametri Geometrici: oltre la dimensione, in altre molecole (es DNA) che sono fili avvolgati tipicamente si considera la lunghezza e il passo di gyration

ANTIBODY

GLI ANTIGENI SI COMBINANO ALL'ANTIBODY ALLE 2 ESTREMITÀ

ENZIMI

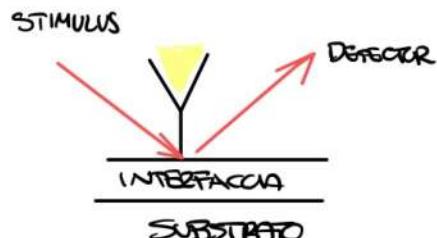
INIBITORI → MOLECOLA SIMILE ALL'ANALITE CHE SI COMBINA COMUNQUE MA QUESTO NON CI VA BENE CI ROVINA LA VETTURA

DNA → È LA REPOSITORY DELLE INFORMAZIONI GENETICHE

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

TUTTE QUESTE RILEVAZIONI AVVENGONO NELL'INTERFAZIA

VOGLIAMO INOLTRE FAR QUESTI RILEVAZIONI ECONOMICHE E PICCOLI.



PARADIGMA → LAB ON A CHIP (AD OGNI LE ANALISI SONO FATTE IN LABORATORIO, NOI VOGLIAMO TUTTO SUL CHIP) QUESTO HA SENSO XE' NOI DESCHIAMO UNA MOLECOLA PICCOLA → NON ABBIANO BISOGNO DI MACHINE GRANDI PER RIVARZO, INOLTRE FACCiamo MENO USO DI REAGENTI CHE COSTANO UN BOTTO.

SAMPLE PREPARATION → FILTRIAMO PRIMA LE MOLECOLA CHE SAPPIAMO CHE NON VANNO BENE O DANNANO FAULI POSITIVI.
ALL'ANALISI VORREMMO SOLO ACQUA + LE MOLECOLA CHE DESCHIAMO.

24.02.2021

2h LEZIONE

• MOVING FLUIDS

(COME MUOVERE I FLUIDI NEI MICROCANALI)

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

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

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

- **FLUIDI SEMPLICI** FLUIDO NEWTONIANO O NON

- **COMPLEX FLUIDS** È UN FLUIDO SEMPLICE CON PARTICELLE O IONI IN SUSPENSIONE (ELETROTE -> SIMPLE FLUID + IONS IN SOLUTION)

CARATTERISTICHE

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

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

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

e' importante per sapere come si 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)

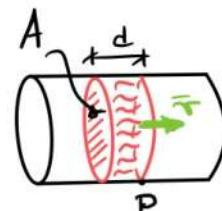
$Re < 2300 \rightarrow$ Flusso Laminare ← NOI SIAMO SEMPRE IN QUESTO CASO ($Re < 1$)

$Re > 3000 \rightarrow$ 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

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

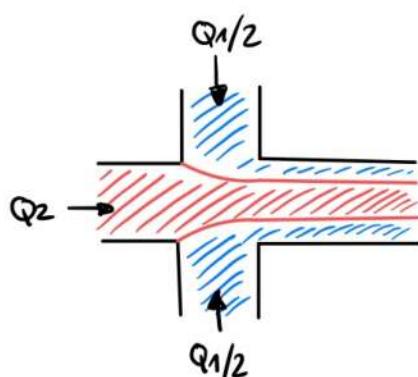


$$Q = \frac{V}{t} = \frac{A \cdot d}{t} = A \bar{v}$$

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

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

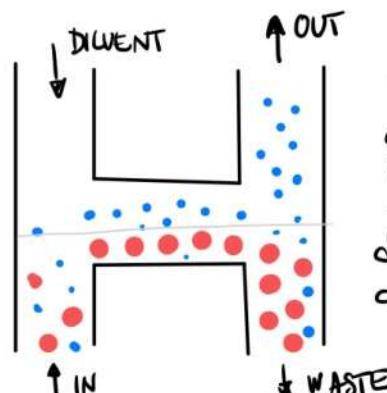
ES. FOCUSING HYDRODINAMICO → VOGLIAMO CONFINARE IN UNA ZONA PIÙ STRETTA UN LIQUIDO



FLUIDO 2
FLUIDO 1

CLOGGING → ACCADE SE USIAMO I MICROCANALI SENZA FOCUSING IDRODINAMICO.

USARE IL FLUIDO COINFINATO EVITA IL CLOGGING, CIOÈ IL FATTO CHE IL CANALE SI INTASI A CAUSA DELLE PARTICOLE. QUESTO FUNZIONA PERCHÉ NON HA DEI MURI "RIGIDI" ATTORNO AL FLUIDO 1.



Si basa sulla diffusione, infatti le molecole piccole tendono a diffondersi più, non è efficiente al 100%

ES 2) FILTRO AD H

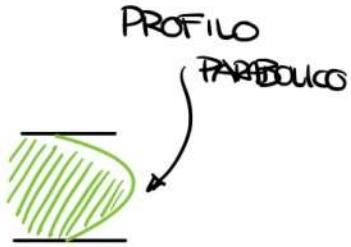
VOGLIAMO FISICAMENTE SEPARARE 2 POROSITÀ DI MOLECULE (AD ESE GRANDE E PICCOLA)

NON HANNO VAPPO

BOUNDARY CONDITIONS

Supponiamo 2 tipi di interazione

- **Condizioni di Non Slip** → le molecole vicino al "muro" non si muovono, si muovono solo quelle centrali
- **CONDIZIONI DI SLIP** → Velocità bassa sui muri e più veloce nel centro (+ realistico)



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

• RESISTENZA AL FLUSSO

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

$$\text{POISEUille LAW} \rightarrow Q = \frac{\Delta P}{R} \quad \begin{matrix} \Delta P = \text{differenza di pressione} \\ \text{PIOTTO SIMILE ALLA LEGGE DI OHM} \end{matrix}$$

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

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

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 cerchio (lunghezza > 1,4 · ettezza) possiamo usare

$$R = \frac{12\eta L}{C \left(\frac{W}{h} \right)^2 h^3 \cdot W}$$

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

• CAPACITÀ IDRODINAMICA

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

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

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

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

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

- **Fluido compressibile**: es. aria 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 SU L'ANZO DEL CAMPO ELETTRICO, DATO PER MUOVERE GLI IONI DEL LIQUIDO, E CONSEGUENTEMENTE IL FLUSSO.

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

QUESTO CAMPO ELETTRICO ATTRASCI GLI IONI POSITIVI (IN QUESTO CASO AL MURO), SE APPRENDIAMO UN ALTRO CAMPO MAGNETICO NEL VERSO DELLA LUNGHEZZA DEL MICROTUNNEL 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 PROPORTZIONALE 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 wettabilità di un materiale anche con un campo elettrico. per fare questo però dobbiamo mettere un isolatore tra liquido e solido. Questa proprietà può essere utile per manipolare le gocce.

• MOVING PARTICLES

Se la particella è carica usciamo un campo magnetico (eletroforesi)
 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 CARICATE, C'È UN'ALTRA FORMULA $D = \frac{\mu k T}{q}$

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

MINIATURIZZAZIONE AIUTA NELLA DIFFUSIONE

SINGLE MOLECULE DETECTION

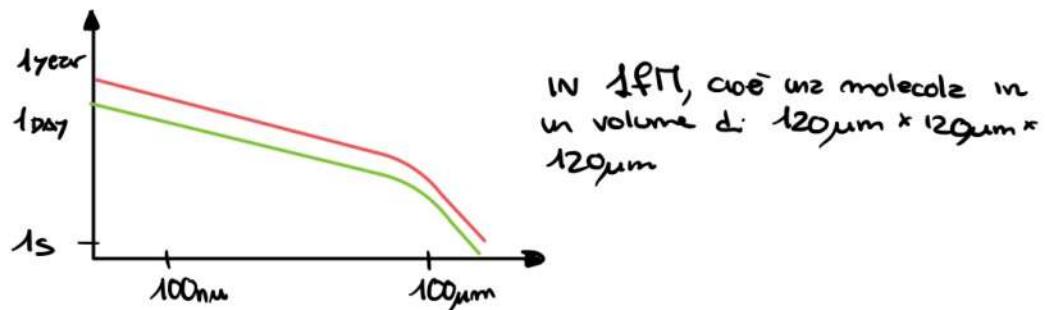
Se io ho unz sola molecola nel liquido posso aspettarmi che casualmente per diffusione le molecole arriveranno sul mio sensore?

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 capiamo che non c'è bisogno di parlare di diffusioni tipicamente richiede troppo tempo.



NUMERO DI PECLET

DIMENSIONLESS RATIO TRA ADVECTION E DIFFUSIONE.

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

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 combattere una frizione data dal fluido.

Per una molecola sferica è

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

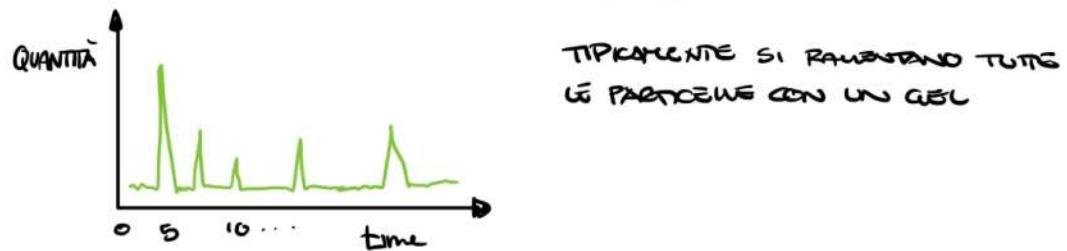
ELETTROCHINETICA

CAMPO ELETTRICO PER MUOVERE SONO LE PARTICELLE
(NOI SPECIAMO FLUIDO SENZA IONI QUI)

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

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

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



DIELETTROFOResi

è se avessimo una molecola neutra?

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

Vediamo la molecola come un dipolo

PENETRATIVITÀ DI UN MATERIALE

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

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

FORZA DIELETTROFORÉTICA

Questa forza è proporzionale al gradiente del campo

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

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

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

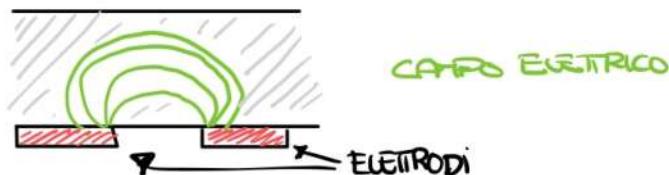
K_m : CLAUSIUS MOSSOTTI FACTOR (QUANDO È POSITIVO ABBIANO POSITIVE ELECTROPHORESIS, SE È NEGATIVO IL CONTRARIO) QUESTO VALORE DIPENDE DALLA FREQUENZA

Le cellule biologiche possono essere comandate con la dielektroforesi, 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.

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

Nella retezza 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). Svantaggi → sistema più complesso.

Sono possibili 2 architetture

- Bead on channel, 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, bead su un array di punti che tramite l'eletrowetting 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'eletrowetting e questo funziona solo con fluidi che contengono ioni. Imponendo una tensione posso cambiare l'angolo di tocco della goccia

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

Nell'eletrowetting 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 pads vadano leggermente a sovrapporsi. Per farla muovere metto il pad della goccia idrofobico e quello dove voglio che vada in idrofilico.

Un ulteriore vantaggio della configurazione 2 è che si possono usare questi eletrodi/pad come dei sensori. Infatti questi sono come dei condensatori, infatti basta misurare l'impedenza e ricavare l'E per capire se c'è il fluido o no.

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

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

Microfluidics Components

I design microfluidici sono praticamente tutti custom.

CANALI → La cosa che ti 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 sapere come sono fatte. In microfluidica usiamo questa valvola per fare solo ON/OFF, usiamo come componente che permette il passaggio unidirezionale del fluido (diodo).

Perché anche delle valvole di Testa.

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

Tipicamente la valvola è fatta da un materiale flessibile e l'attuatora 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 molte ci servono molte pompe per controllare tutte queste linee di controllo.

MIXER (ESISTONO SIA PASSIVI CHE ATTIVI)

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

Quale la valvola di testa può essere usata per mescolare i fluidi

LA POMPA

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

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

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

08.03.2021

2h DI LEZIONE

Un modo per ridurre il ripple dovuto alle pompe 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

Essenziali per connettere il sistema microfluidico con il mondo esterno.

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

POMPA A DIAFRAMMA

(Vedere slide, molto facile da capire)

Anche questa pompa ha un tipo di flusso non costante.

PIEZOELETTRICITÀ

Schiaccio il cristallo e ottengo 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 creo uno sbilanciamento delle cariche e quindi creo uno dipolo).

Lato negativo → Sono d'efficienze cattive. Ed implementarli nei biochip non può essere fatto in automatico, quindi sono da aggiungere dopo.

PERISTATIC MICRO PUMP

Un modo di portare nel chip la pompa

TUBING CONNECTION

Tipicamente si usano tubi di plastica con una parte finita con un zgo di metallo che serve a inserire il fluido nel biochip. Nell'interconnessione tipica c'è una guarnizione

LUER LOCK è il tipo di interconnessione usato nelle siringhe, in questo caso non c'è nessuna guarnizione. Questo 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 di stoppi 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 febbraiozione delle plastiche, queste non è un vantaggio.

Ognuna di questi 2 tipi di febbraiozione ha i suoi vantaggi e svantaggi (vedere slide). Questi 2 tipi di febbraiozione non sono così separati perché tipicamente si usano gli stampi creati con la tecnica soft e poi usano la litografia da o la tecnica hard.

CLEAN ROOM

Vogliamo un ambiente in cui non c'è polvere perché se non potrebbero rovinare la febbraiozione dei chip.

Il substrato preferito è il silicio, infatti il silicio è molto usato in diversi ambiti e MEMS (Micro electro-mechanical Systems)

- Bulk → eliminiamo il materiale del substrato

- Processo a 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 a layer)

1) PVD (Deposizione Vapori di Metallo): vogliamo coprire il wafer con il metallo, scaldiamo molto il metallo in una camera a vuoto con il wafer, così facendo elargiamo atomi del metallo zadranno e depositarsi sul wafer. Processo molto lento, in base al tempo che lasciamo il sistema lavorare possiamo gestire lo spessore del metallo.
Non c'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 accettabile (troppo rugoso)

3) EVAPORAZIONE CHIMICA: Iniziamo da un gas che quando tocca la superficie del substrato lascia un atomo di silicio e rilascia ozono. A differenza degli altri qui il sistema non è circolare ma gli atomi di silicio raggiunti possono essere adorati

4) DEPOSIZIONE LIQUIDA: Usato per i photoresist (non per i metalli) per fare questa tecnica ci serve uno stencil con le geometrie che vogliamo trasferire. Prima di tutto ricopriamo il substrato di photoresist (per fare questo possiamo usare lo spin coating), poi mettiamo lo stencil e illuminiamo.

Possiamo avere 2 diversi comportamenti, se il risultato 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

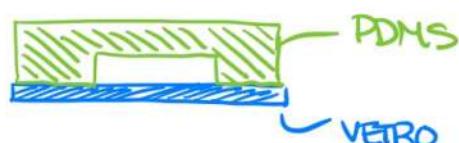
Prima si deposita il layer sacrificale, poi si mette il layer di metallo sopre tutto e poi si elimina il layer sacrificale (che ha sopra il metallo) così ci rimangono solo le parti dove non c'era il layer sacrificale.

SOFT PROCESSING

In questo caso processiamo plastici 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 poi da quello stampo possiamo replicare quante volte vogliamo il chip (fuori della cleanroom)

Il problema del PDMS è dato alla scarsa possibilità di scavarlo a livello industriale, infatti PDMS è tipicamente usato solo in laboratori per lavori DIY durante

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

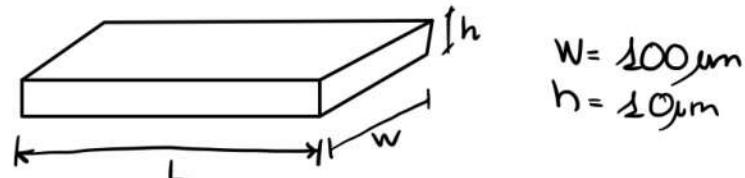
10.03.2021

ESERCITAZIONE

2h DI LEZIONE

(DOVREBBE CARICARE IL FILE)

1) Micro canale rettangolare

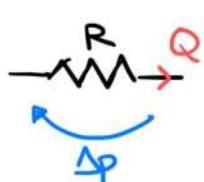


Vogliamo trovare la differenza di pressione data un flow rate $Q = 1 \mu\text{L/s}$ per 2 valori di lunghezza

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

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

FACCIA IL MODELLO ELETTRICO EQUIVALENTE



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

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

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

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

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 $\Delta P = R \cdot Q = \frac{10^{-9} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} \cdot 128 \cdot 10^{12} \cdot \frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}}{1} = 128 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ Ricordare $10^5 \text{ Pa} \approx 1 \text{ atm}$
 $= 1,2 \text{ atm}$

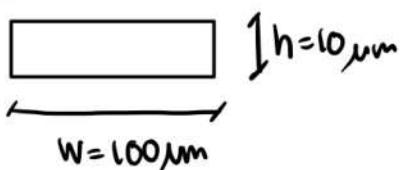
PUNTO b)

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

$R' = 10 \cdot R$ e anche $\Delta P' = 10 \cdot \Delta P = 12 \text{ atm}$ E' UNA PRESSIONE
MOLTO ALTA

Inoltre 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 ricevere la resistenza

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

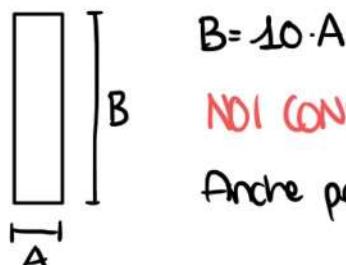
SE USIAMO QUESTE FORMULE OTTIENIAMO

$$R_{eq} = \frac{w \cdot h}{w+h} \approx h \quad R_0 = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot h^4} = 2,54 \cdot \frac{\eta \cdot L}{h^4}$$

Mentre nella formula specifica per il canale rettangolare ottieniamo $R_0 = 1,2 \cdot \frac{\eta \cdot L}{h^4}$

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

■ COSA CAMBIEREBBE SE IL CANALE FOSSE COSÌ

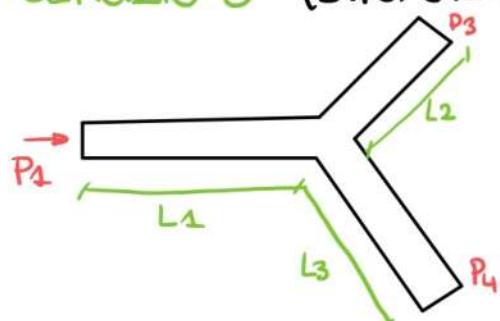


$$B = 10 \cdot A$$

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

Anche perché la formula deve venire uguale

ESERCIZIO 3 (BIFORCAZIONE)



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

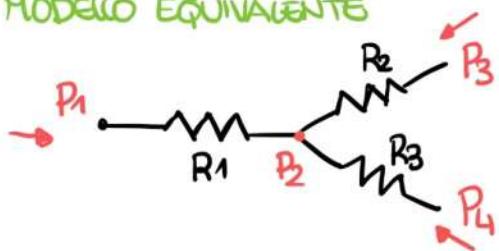
$$\begin{aligned} L_1 &= 0,5 \text{ cm} & P_1 &= 0,11 \text{ MPa} \\ L_2 &= 1 \text{ cm} & P_3 &= 0,1 \text{ MPa} \\ L_3 &= 2 \text{ cm} & P_4 &= 0,1 \text{ MPa} \end{aligned} \quad \left. \begin{array}{l} \text{Noi imponiamo} \\ \text{queste pressioni} \\ \text{in tutti e 3} \\ \text{i tubi} \end{array} \right\}$$

Supponiamo sezione circolare
con un raggio pari a

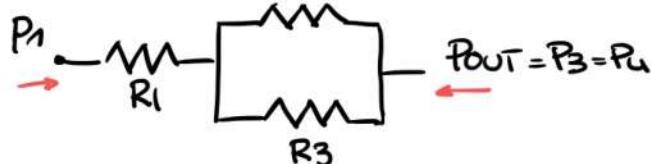
$$r = 20 \mu\text{m}$$

OBIETTIVO \rightarrow FLOW RATE NEI 3 ramo: 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 per Kirchhoff per la stessa)



RICAVIAMO LE RESISTENZE

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

$$R_2 = 159 \cdot 10^{12} \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{m}^3 \quad \text{e} \quad R_3 = 318 \cdot 10^{12} \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{m}^3$$

$$R_{TOT} = R_1 + R_2 \parallel R_3$$



Otteniamo quindi:

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

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

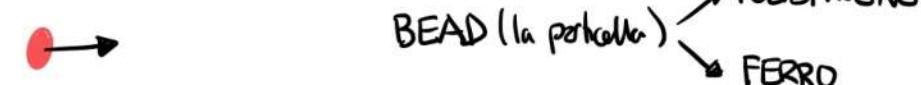
$$Q_2 = \frac{P_2 - P_3}{R_2} = 35,8 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3/\text{s}$$

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

ESERCIZIO 4)

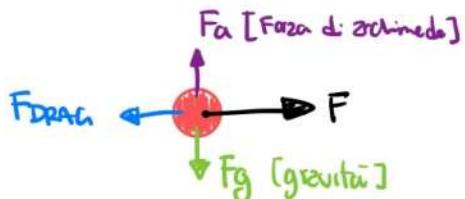
Prendiamo il caso di avere una particella nel liquido guidata da una forza esterna che non ci interessa.

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



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

Quale 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

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

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

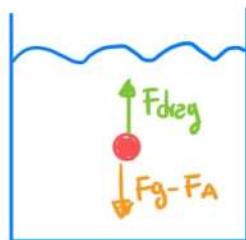
Quindi se $\rho_{\text{BEAD}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}} > 0$ la particella va sul fondo, se è 0 la particella è in sospensione mentre se è minore di 0 sale a galla.

Calcoliamo la forza verticale nel caso la particella fosse ferro.

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

ESERCIZIO 5

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



Seppiamo che la particella cade

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

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

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

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

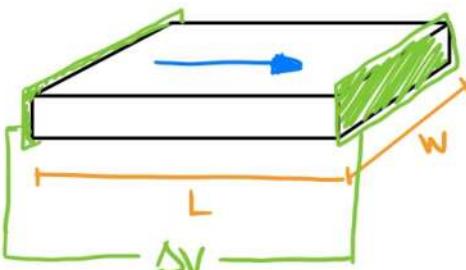
Consideriamo il canale rettangolare vogliano in flusso $Q = 1 \mu\text{l/min}$
tramite eletroosmosi, calcolare la ΔV necessaria

Seppiamo che

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

$$Z \text{ POTENTIAL } \zeta = 50 \text{ mV} \quad (\text{ci dà l'ammontare degliioni nella soluzione})$$

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



$$\eta_{\text{EO}} = \frac{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \xi \cdot E}{\eta} \quad \text{CON } E = \frac{\Delta V}{L} \quad \text{in piane parallele}$$

VISCOSETÀ

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

Possiamo quindi calcolare ΔV come

$$\Delta V = E \cdot L = \frac{V \cdot \eta}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \xi} \cdot L \approx 4500 \text{ V} \quad \text{molto alta per } L = 10 \text{ mm}$$

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, VEDRE VIDEO/SIDE ESERCIZI CIRCA 30min dopo INIZIO)

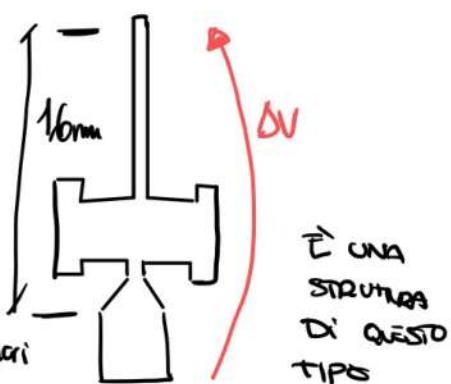
- a) VELOCITÀ DELLA MOLECOLA DI DNA QUANDO UNA $\Delta V = 15 \text{ V}$ È APPLICATA
- b) QUANÈ LA CARICA DEL DNA?
- c) FRAME RATE DELLA CCD CAPTURA?

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

Sappiamo che 1000 V (625 KV/m)

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

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



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

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

E poi estraiamo la carica, quindi:

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

e quindi:

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

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

$$\#e^- = \frac{Q}{me} = \frac{314 \cdot 10^{-18} \text{ C}}{1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}} = 2000 e^-$$

Visto che l'esercizio ci dice che il DNA ha 7,3 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 orz dire che la base è un'unità di misura della lunghezza del DNA.

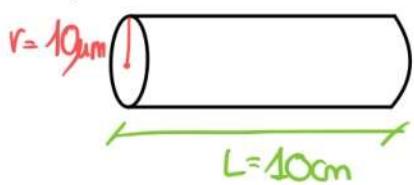
c) Quanto frequentemente deve la camera fare foto? numero random

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

$$t_{TRAVEL} = \frac{L}{v} = \frac{1,6 \text{ mm}}{0,15 \text{ mm/s}} \quad \text{perciò il frame rate sarà FR} = \frac{10}{t_{TRAVEL}} \\ = \frac{10 \cdot 0,15}{1,6} \approx 1 \text{ Hz} \\ = 1 \text{ fps}$$

ESERCIZI SUI CONDENSATORI FLUIDICI

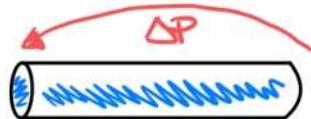
Consideriamo la compressibilità dell'acqua, trovare la costante di tempo idraulica associata a questo microcanale



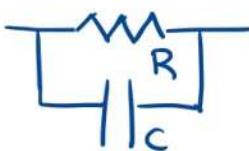
Solo in questo esercizio consideriamo la compressibilità dell'acqua $\neq 0$

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

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



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



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

$$\tau = R \cdot C$$

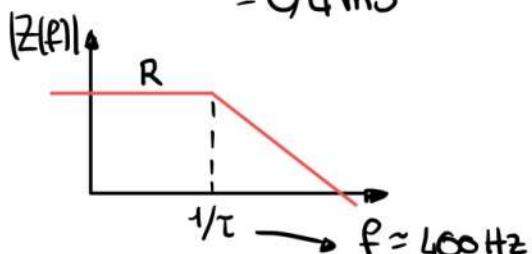
Perciò

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

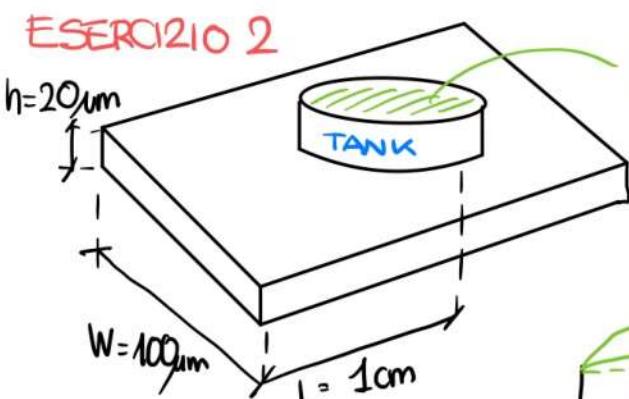
$$B = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{\text{atm}} \rightarrow 1 \text{ atm} = 10^5 \text{ Pa}$$

$$\begin{aligned} & \text{Qui dobbiamo usare} \\ & 1 \text{ Pa così si} \\ & \text{semplifica} \end{aligned} = \frac{8 \cdot 10^3 \text{ Pa} \cdot s (10^{-1})^2}{(10 \cdot 10^{-6})^2} \cdot \frac{5 \cdot 10^{-10}}{\text{Pa}} = 0.4 \text{ ms}$$

Se vogliono plottere il bode otteranno



ESERCIZIO 2



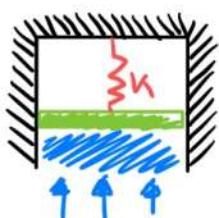
MEMBRANA EUSTICA DI DIAMETRO 100μm

Trovare la costante K della membrana per ottenere di un fattore 100 in segnale impulsivo periodico $T=2 \text{ s}$



$$\tau = R \cdot C$$

Facciamo questo modello semplificato, il setaccio ha tutti i muri rigid ma il setaccio può andare su e giù ed è bloccato da una molla con costante K



Hooke's Law:

$$F = K \cdot \Delta z$$

NON SAPPIAMO CHE

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

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

$$= \frac{\text{AREA}^2}{K}$$

Sappiamo che abbiamo un periodo

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

$$f_{-3dB} = \frac{f_{\text{PULSE}}}{100} = 5 \text{ Hz} = \frac{1}{2\pi RC} \approx \tau$$

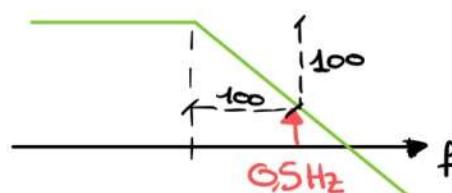
$$\tau = \frac{1}{2\pi f_{\text{Hz}}} = 31,8 \text{ s} \rightarrow C = \frac{\tau}{R}$$

$$\text{Perciò } C = \tau/R = 185,3 \cdot 10^{-15} \left[\frac{\text{m}^3}{\text{Pa}} \right]$$

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

17.03.2021

2h



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

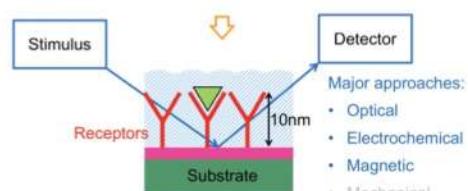
OPTICAL DETECTION

Vogliamo rilevare quando avviene un evento di binding

Tutto avviene all'interfaccia!!

Questo tipo di detection è quella più usata in biologia

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



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

FLUORESCENZA

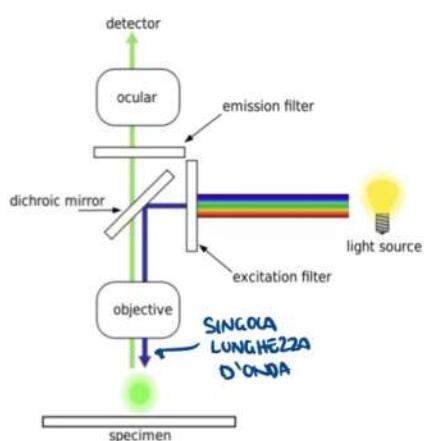
Se vediamo i livelli energetici della molecola, vediamo che se eccitiamo la molecola questa va in uno stato con energia superiore e poi tende a tornare allo stato energetico base rilasciando energia. Uno di questi modi è la fluorescenza, la quale consiste nel rilasciare un fotone a bassa energia dato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

Se studiamo la lunghezza d'onda notiamo che questa molecola ha 2 picchi di assorbimento, ognuno dei quali è relativo al S_0 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 potrete sentire la radiazione fluorescente. (Ho quindi un tempo limitato per studiare tutto con la fluorescenza)

Possiamo vedere la fluorescenza anche al microscopio



Eccitazione del campione

solo con un'unica 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 unicamente 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 abbiamo la fluorescenza sappiamo che abbiamo il campione cercato.

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

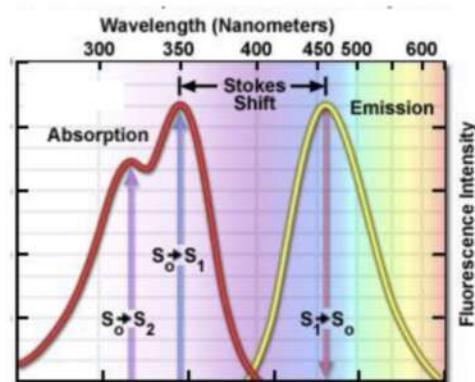
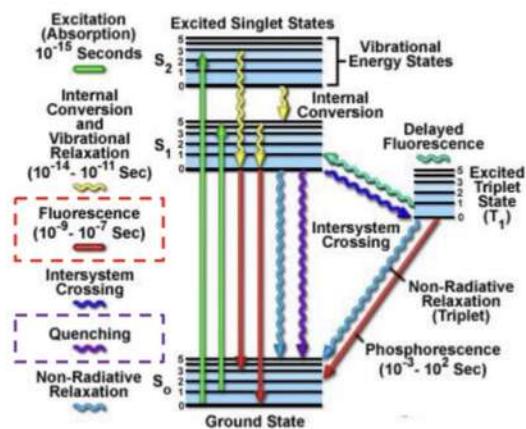
NOTIAMO CHE SE LO STOKES SHIFT È MOLTO PICCOLO ALLORA IL FILTRO OTICO DEVE ESSERE MOLTO PENDENTE XE' SENSO TIRARLO DENTROANCHE LA LUNGHEZZA D'ONDA D'ECCITAZIONE.

IMMUNOSTAINING (prospettiva storica)

Vogliamo vedere se c'è o no molecole nelle membrane di una cella.

Vogliamo sapere più in particolare se l'antigeno è presente sulla membrana o no.

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



ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT Assay)

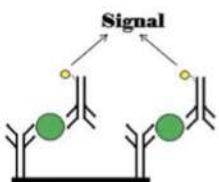
Stessa roba di sopra solo che un enzima e non abbiamo fluorescenza ma dobbiamo colorare il fluido.

Vantaggio è che è molto facile da capire.

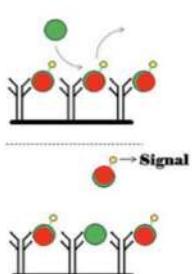
TIPI DI ASSAYS

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

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



2) COMPETITIVE: Si parte da due receptori, in cui la molecola rossa è simile al target e insieme la molecola rossa è già legata sul receptore nullo o fluorescente. Se arrivano la proteina emette uno 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 luminoso, se invece c'è la proteina abbiamo il buio

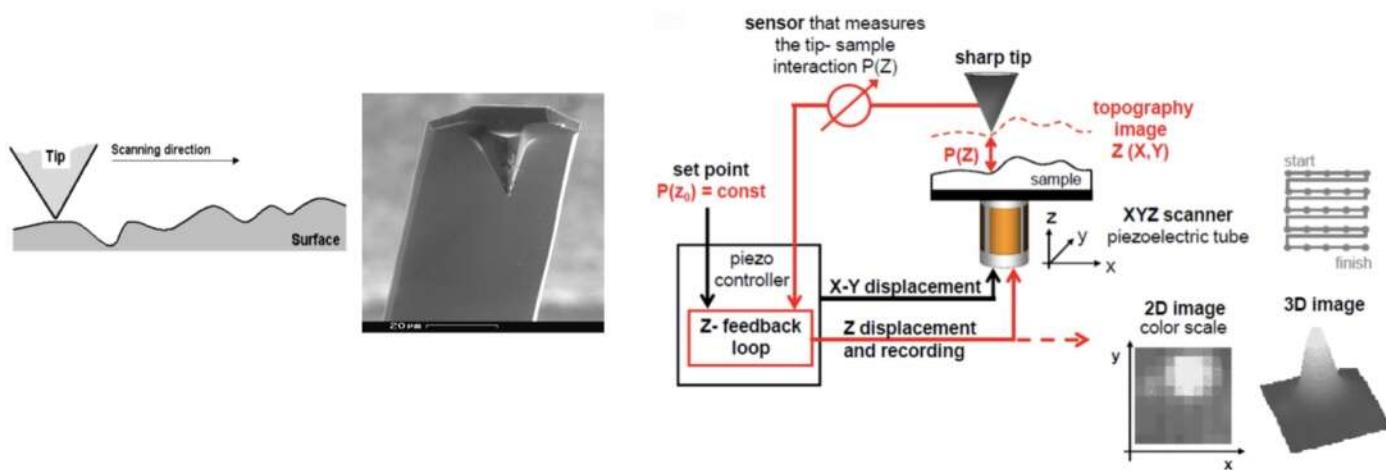


Quel è il limite di un microscopio ottico?

La risoluzione spaziale è data dalla diffrazione. La distanza minima da cui siamo a vedere è data da

$$r = \frac{0.5\lambda}{N.A} = \frac{0.5 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\theta)}$$

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



ATOMIC FORCE MICROSCOPE

Misuriamo la forza d'attrazione fra la punta e il campione. Per misurare la forza d'attrazione la punta si piegherà 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 da cui molecole e sono, questa tecnica è chiamata spettroscopia.

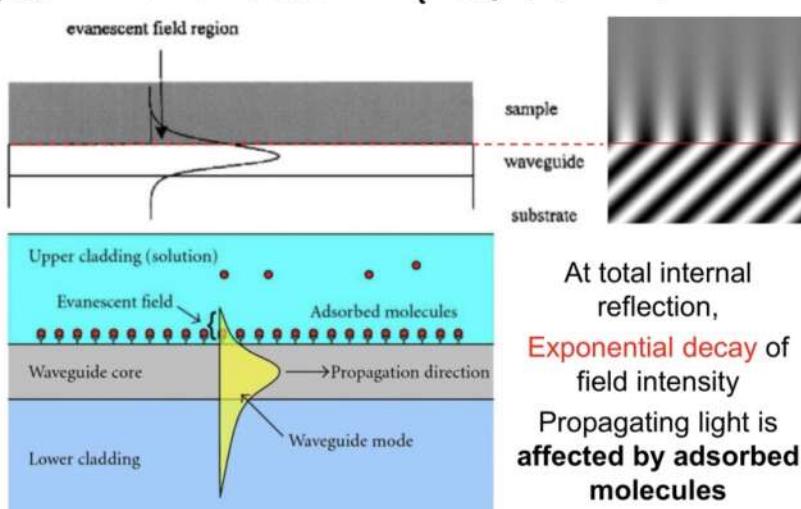
Lati negativi: è da noi e non è miniaturizzabile ed è molto lenta e costosa.

Questo può essere minimizzato se vogliano analizzare solo poche lunghezze d'onda (es. il pulsometro)

SILICON PHOTONICS (NON CENTRA NULLA CON LA FLUORESCENZA)

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

Nella visione standard dell'ottica noi assumiamo che tutta la luce sia confinata nella "fibra". Tuttavia nella visione quantistica noi abbiamo un problema: i fotoni sono fuori della "fibra". Questa problematica serve come un esempio perché è già avvenuta dopo 10nm. Numero importante visto da è la lunghezza dei nostri ricevitori. Noi sfruttiamo questo fenomeno.



La presenza del ricevitore fa sì
che ci sia una minima differenza
di fase nell'onda riflessa.

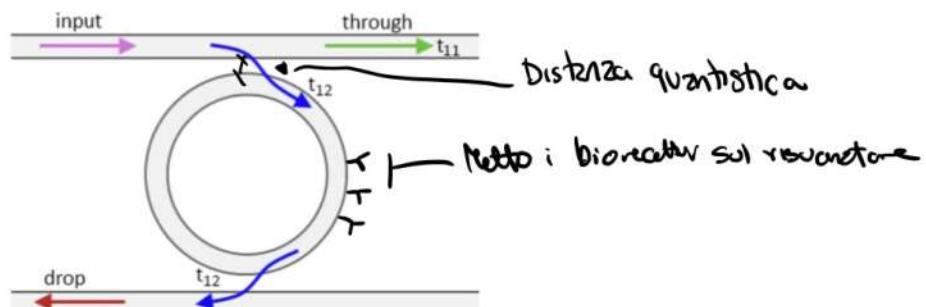
Capiamo quindi che analizzando la
luce (la fase) possiamo capire
cos'è accaduto ai ricevitori.

Noi dobbiamo fare in modo di
teorizzare la differenza di fase
in una d'ampiezza esistono 2
metodi:

1) Mach-Zehnder Interferometro: In pratica ho 2 percorsi uguali e solo in 1
ho i ricevitori. Se non c'è l'interfaccia ho le 2 fasi uguali e ho interferenza costruttiva
distruttiva.

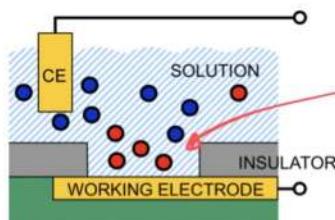
2) Optical ring - Resonator:

**NON HO CAPITO COME
FUNZIONA!**



Elettrochemical detector

Pezzice elettrica il cui output produce un colpo in uscita

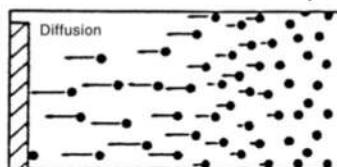


Qui avviene la reazione

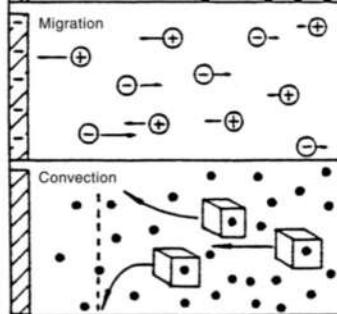
Visto che c'è un campo elettrico
abbiamo una ridistribuzione delle cariche

Modi con cui si possono muovere le partecipanti in un liquido

Diffusion



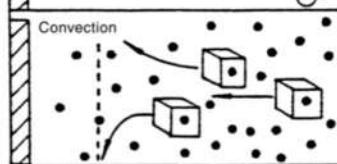
Migration (drift)



Quando applichiamo un campo magnetico.

Convection (fluid motion)

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

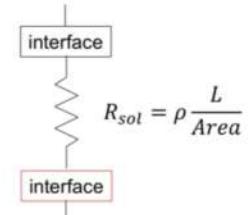
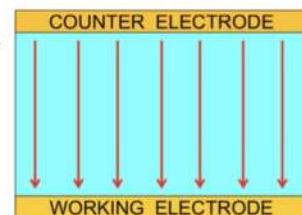


Gli ioni che si muovono in una soluzione creano una corrente.

La mobilità in questi liquidi è molto bassa ma il numero di ioni è elevatissimo e quindi essi fanno risultare conduttori.

In conclusione acqua + ioni può essere modellata come una resistenza.

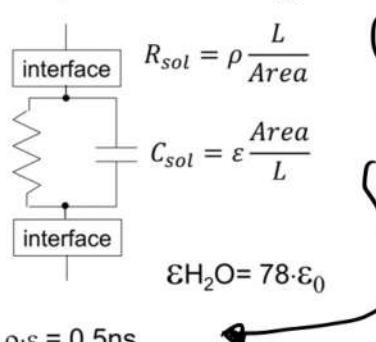
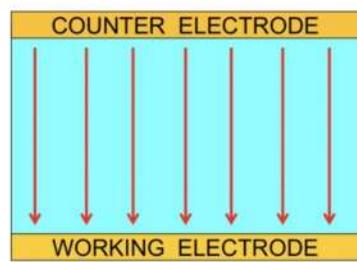
All'interfaccia questo modello non vale più
abbiamo usato un altro modello per modellare
il passaggio delle cariche tra liquido e metallo.



(Non ho ben capito il re del condensatore)

(Esempio con il PBS)

Tipo condensatore dato dalla
capacità dell'acqua

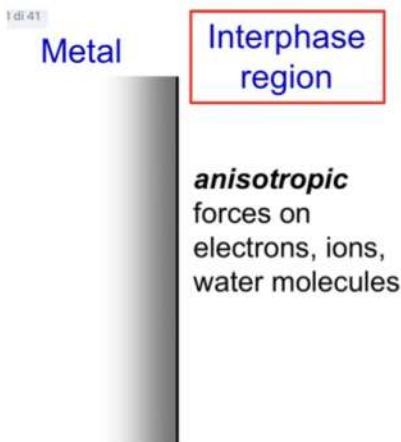


$$\text{Dielectric relaxation time} = R_{\text{sol}} \cdot C_{\text{sol}} = \rho \cdot \epsilon = 0.5 \text{ ns}$$

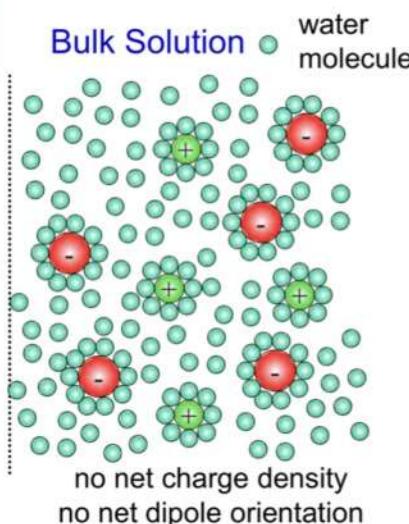
independent of geometry!

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

All'INTERFACCIA:

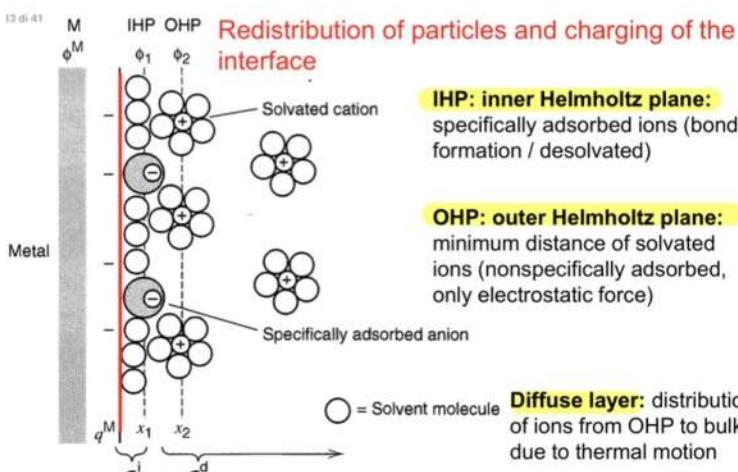
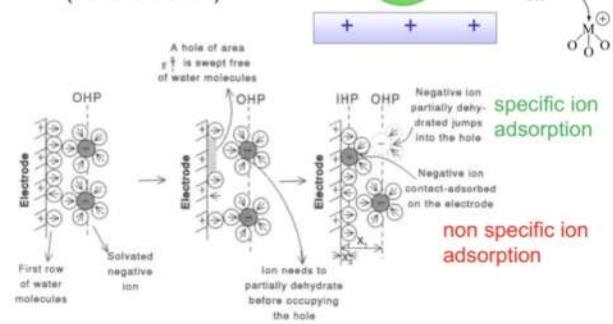


Free electrons
in a crystal



SE IL METALLO È CARICATO POSITIVAMENTE

Specific ion adsorption
(bond formation)



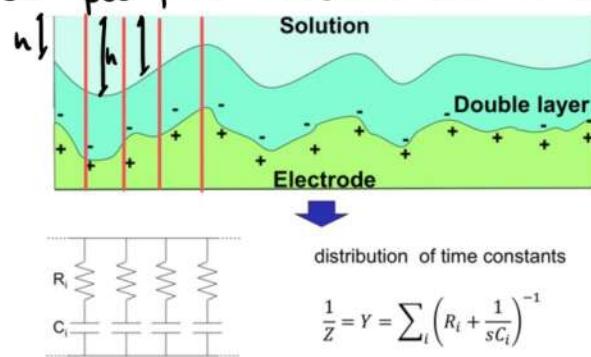
Questa distribuzione di carica può essere modellata come dei condensatori.

Ho 3 condensatori in serie, faccio uno
la serie di condensatori è ottenuta 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 eletrodi 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



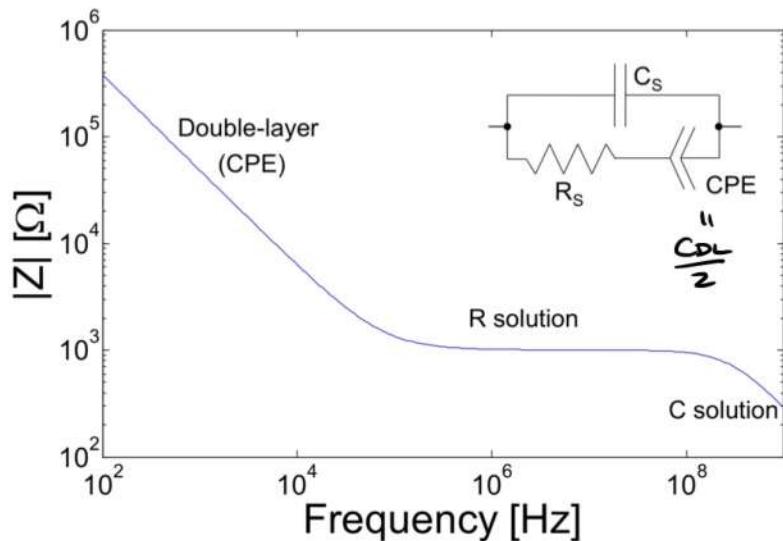
noi possiamo slicare il liquido e per ogni slice otteniamo R e C, tipicamente C è uguale per tutti ma R varia perché l'altezza della sbarra non è costante.

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 PSS).

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

Il circuito 2 piccoli segreti dell'interfaccia è:

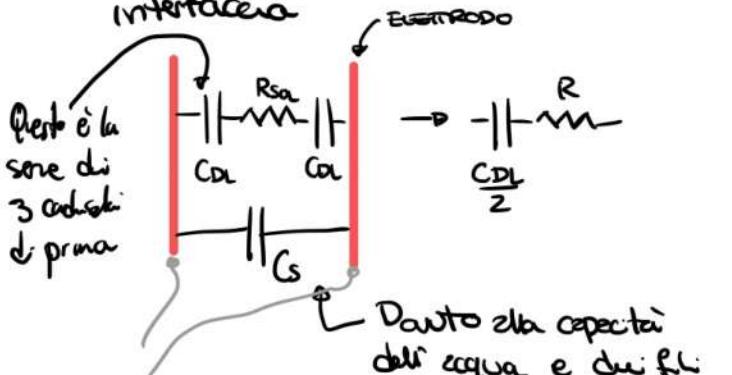
Se non abbiamo Redox l'interfaccia non "assorbe" corrente ma c'è solo la "cerica" [?]



IMPORTANTE !!

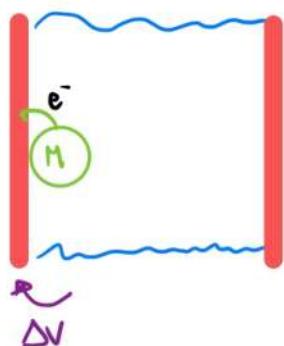
QUESTO È IL MODELLO EQUIVALENTE DELL'INTERFACCIA.

R_s : corrisponde al bulk e non all'interfaccia

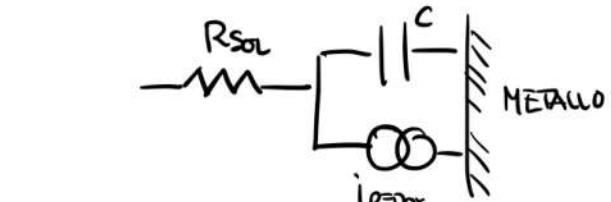


FARADAIC PROCESS

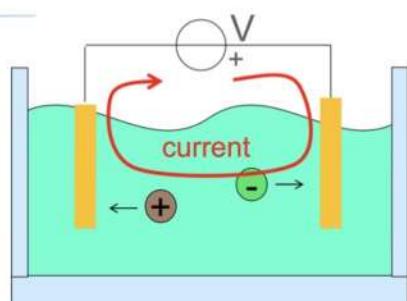
Oraabbiamo corrente che può correre attraverso l'interfaccia.



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



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



electron transfer at the metal/liquid interface

Ti piccante noi stiamo qui
ma molto spessa c'è corrosione

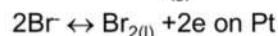
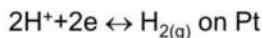
Two main cases:

«consumable» electrode:
metal grows (or thin) as a
function of time
corrosion / deposition

«nonconsumable»
electrode: reduction-
oxidation (redox)
reaction of ions or
molecules in liquid

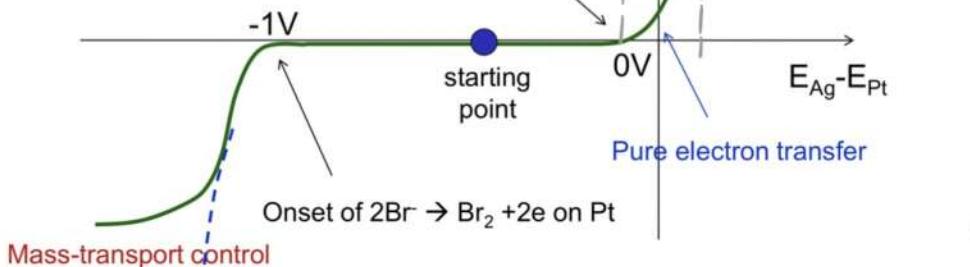
CARATTERISTICA TENSIONE-CORRENTE NEL GASO DELLA REDOX

Pt - Br⁻ (solution 1M) - AgBr/Ag



AgBr/Ag "ohmic contact"

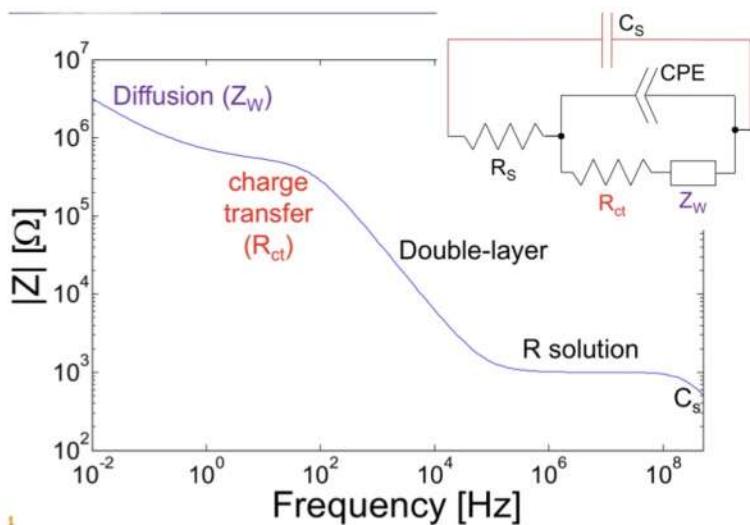
IL POTENZIALE DI REDOX
LO PRENDIAMO DALLE TABEZZE



DA QUESTO PUNTO IN POI
HO UNA REDOX.

Non ho più un esponenziale
xe' 2d in certo pto abbiano
"fatto" gli elettroni delle
molecole più vicine all'elettrodo
e quindi ora le molecole
sono latte ed è più
difficile togliere l'elettrone
(xe' x diffusione devono cercarsi
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 PRT
Il modello perciò sarà:



In parallelo al CPE mettiamo in
resistore che è la linearizzazione delle
bss correnti passa in un altro pto

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

Zw è un termine oggettivo di modello
(WARBURG IMPEDIMENTA) che serve a
modellare l'effetto dell'impedimento a una
via base legare.

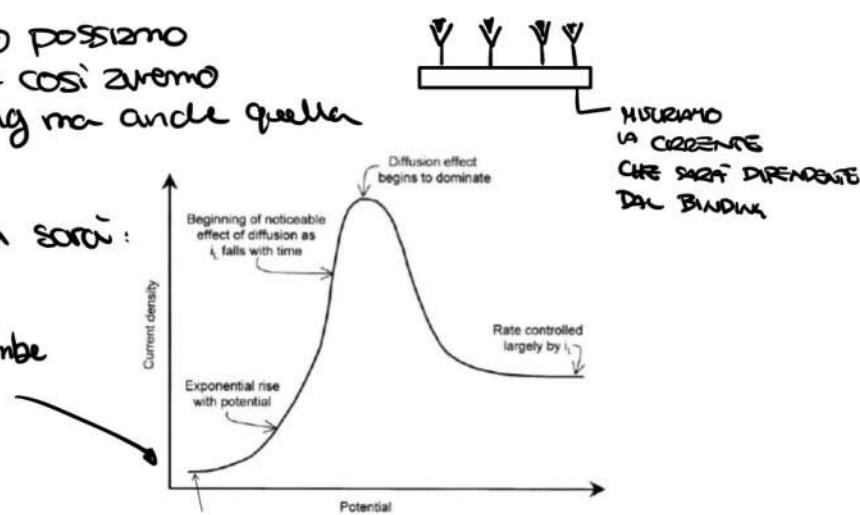
26.03.2021

2h

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

L'andamento della corrente nel sistema sarà:

Circa 0 prima del potenziale
di redox poi ho un picco poco dopo (sembra
basso) che mi dà un errore di offset
(independente della redox). Corrente d'
double layer.



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

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

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

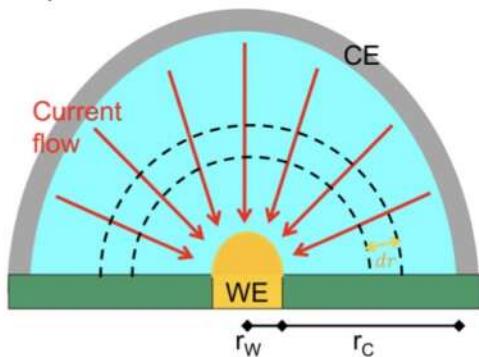
Cosa succede se abbiamo degli elettrodi molto piccoli?

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

Intendiamo elettrodi piccoli relativamente alla distanza di diffusione delle molecole nel fluido

Radial diffusion profile

Hemispherical electrode:



Border effects become dominant!

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

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

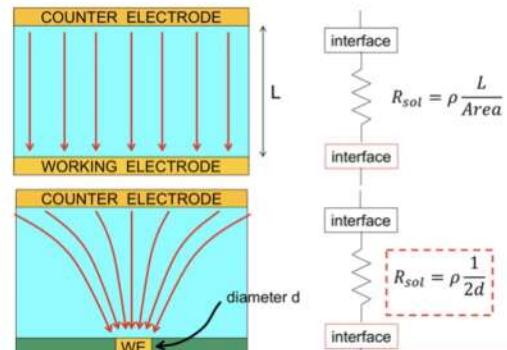
$$R_{sol} = \frac{\rho}{2\pi} \left(\frac{1}{r_W} - \frac{1}{r_C} \right)$$

$$r_C \gg r_W$$

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

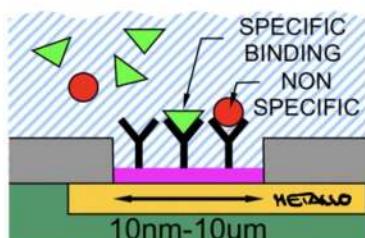
Possiamo prendere cariche anche da lontani dall'elettrodo, ci va bene
Perché abbiamo più corrente del previsto

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 DENO

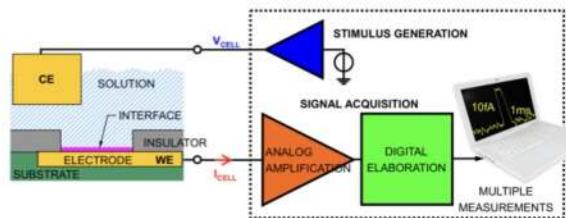


Noi vogliamo misurare un evento all'interfaccia, in modo per farlo è mettere un elento che fa reazioni nel liquido se ho li zoccoli questi fanno da "blocco" per gli ioni della redox e così cela la corrente
Se ho delle zocche o altre molecole che possono subire la redox ho una corrente spuria in più che leggo e 2 nei vari va bene (credo che ne separano queste molecole redox netto)

PER CONTROLLARE QUESTO ESISTONO 2 TECNICHE

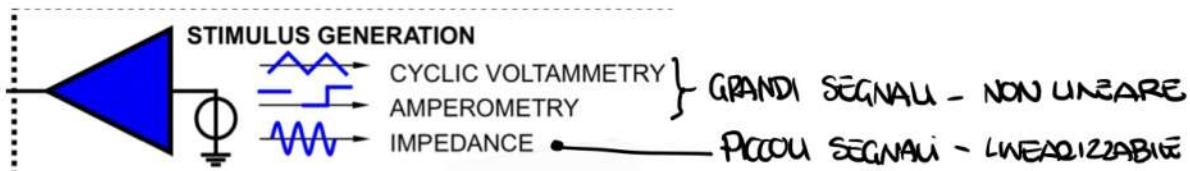
- POTENZIOSTATICA
- CORRENTOSTATICA?

Potentiostatic configuration:

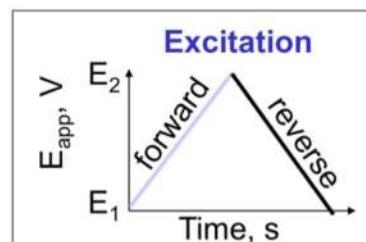


- Apply a voltage V_{CELL} and measure the current I_{CELL}
- 2 sections: generation and sensing
- Multiple measurement types by changing stimulation waveform

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



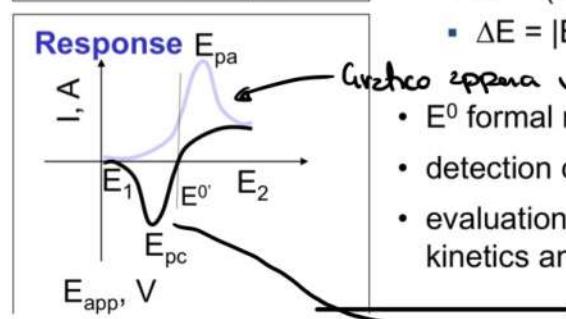
CYCCLIC VOLTAMMETRY : perché è periodico



- Triangular wave: slope = scan rate

• Important parameters:

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



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

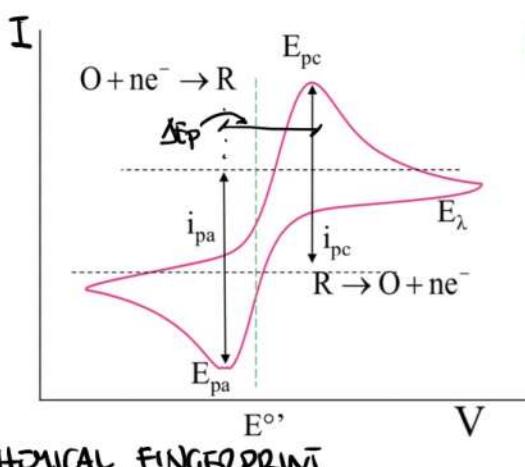
Imponiamo una tensione triangolare

Per l'elettrodo noi usiamo l'oro

Se abbiamo una redox abbiamo il picco d. corrente
Ultimamente la corrente è 0.

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

Otteneremo un grafico del tipo



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

n : n. of electrons

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

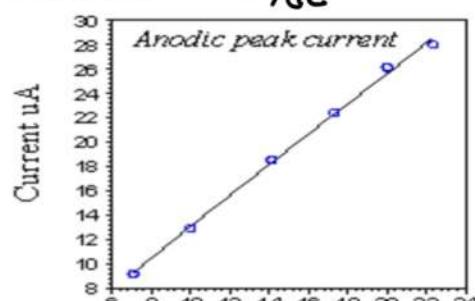
A : electrode area;

C: concentration (mol/litre)

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

SR: scan rate dV/dt

$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 59 \text{ mV}$
è la distanza tra i 2 picchi
se la reazione è reversibile



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

Se ho più reazioni su uno stesso elettrodo il picco della seconda parte del plotto level della prima

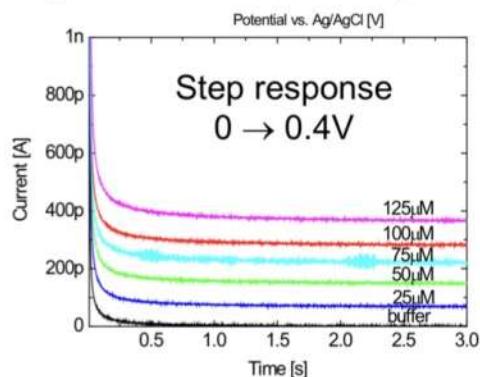
Vogliamo più corrente né i lettori di corrente sono rumorosi, o zeriamo gli elettrodi o lo Scen Rete.

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

• AMPEROMETRY

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

Oltre usiamo un step di tensione allora la risposta sarà



Dove il primo picco è dovuto alla cernita del condensatore double layer.

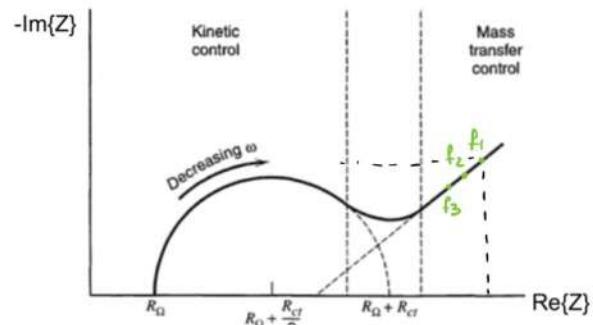
• IMPEDENCE SENSING

Non applichiamo un segnale sinusoidale in un elettrodo e misuriamo la corrente dell'altro il rapporto corrente tensione mi darà d'impedenza.

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

Cepiamo che in frequenza abbiamo una variazione di R_{ct} e R_{ea} e tramite questa variazione noi vogliamo capire cosa c'è dietro l'interfaccia.

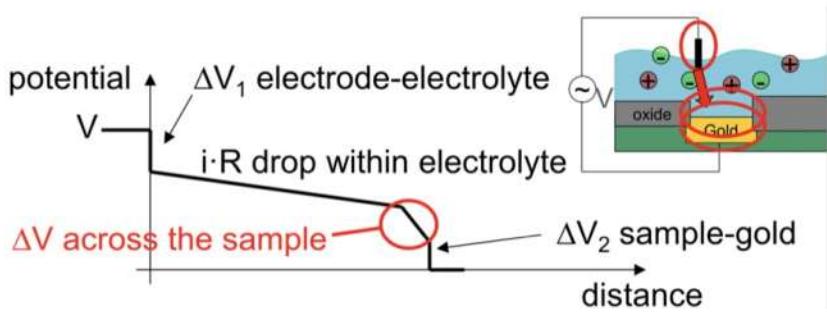
Il grafico dell'impedenza può anche essere fatto nel Cole-Cole Plot che per ogni frequenza da il valore della parte reale e immaginaria.



2 electrode measurement

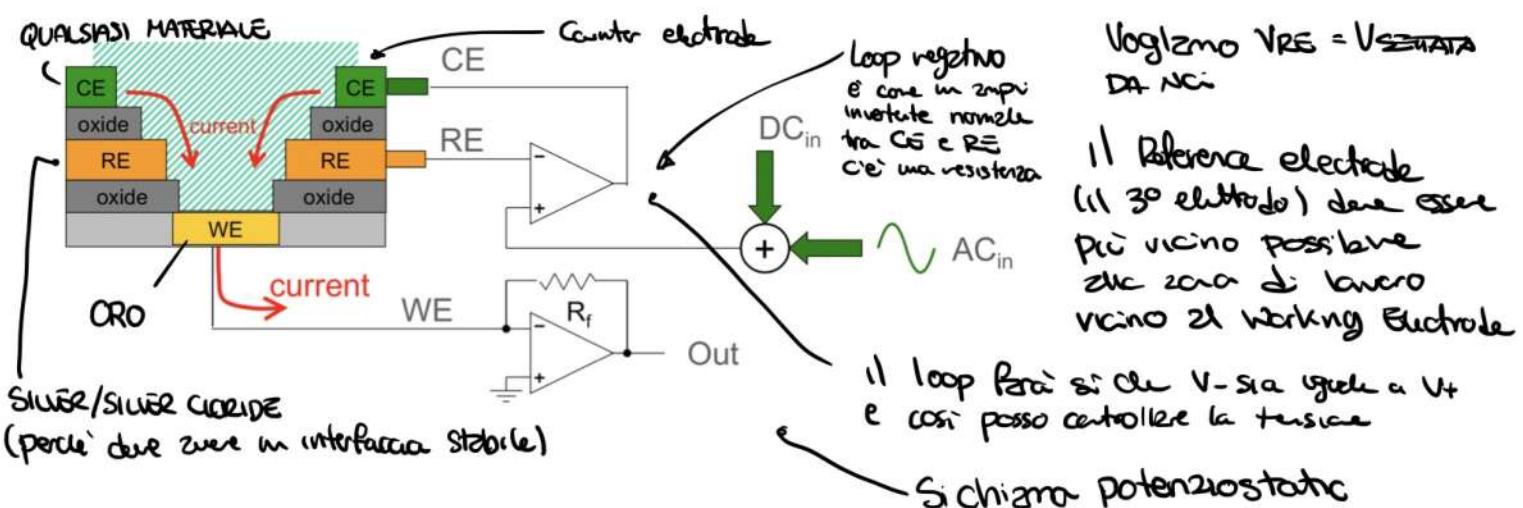
Qual'è la vera ceduta di tensione all'interfaccia?

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



Nel impostiamo V ma vogliamo controllare ΔV cioè la tensione che cede nel campione se è la corrente che triggera la redox

Per risolvere questo scavalco aggiungiamo un 3° elettrodo per misurare la tensione ΔV . IMPORTANTE: misura corrente scorsa nel 3° elettrodo se entra nel punta di uscita dell'OP-AMP.



SILVER/SILVER CHLORIDE

(perché deve avere un'interfaccia stabile)

Vogliamo $V_{RE} = V_{ZIARIA}$
DA NCi

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 possa controllare la tensione

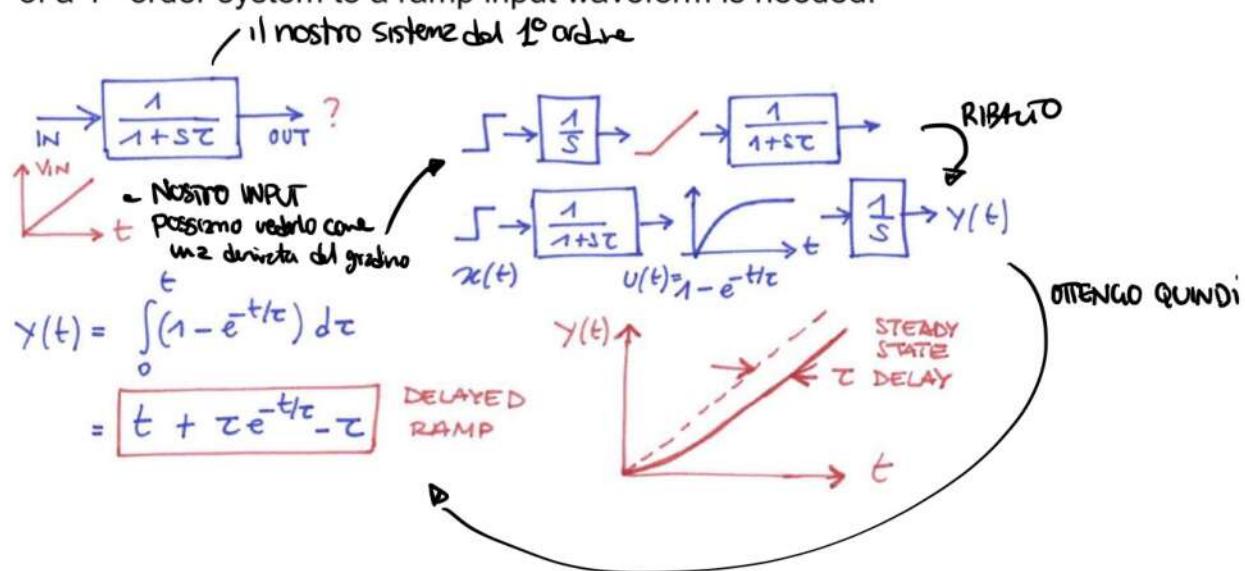
Si chiama potentiostato

QUALI DEVONO ESSERE LE BANDI DEI 2 OP-AMP?

Per otto 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:



Allora se noi abbiamo il max errore di tensio $\Delta V_e = T \cdot SR$
ricavo T e la banda poi sarò

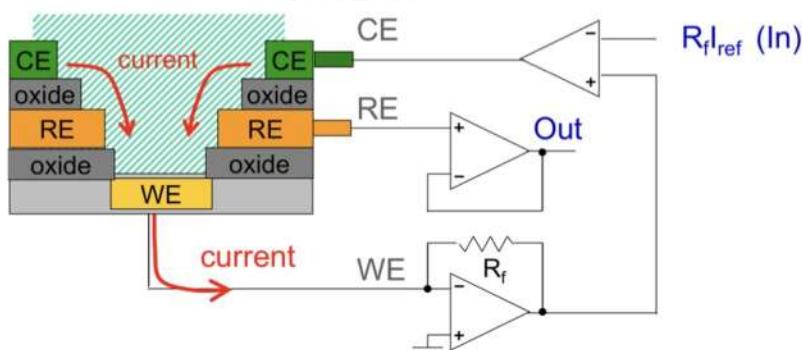
$SR = \text{scan rate}$

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

29.03.2021

2h

Queste zicche si possono fare anche imparando la comite e misurando la tensione. Questi si chiamano **galvanostatici**.

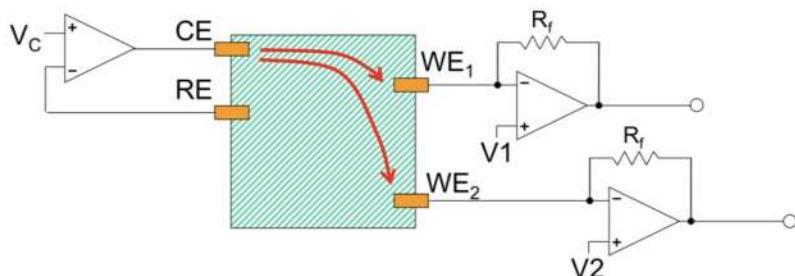


ha un corretto d. fondo molto
smile

SCARSO USATO X NOI

TORNIAMO AL POTENZIOMETRAT

Possiamo avere diversi Working electrodes (es 2) e biasarli a 2 diverse tensioni in modo che la ceduta di tensio all'interfaccia sia diversa tra i 2 working electrodes. (Notare 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 diventa d. vitale importanza

Any electrical signal is affected by noise and disturbances:

$$v(t) = \text{signal}(t) + n(t) + d(t)$$

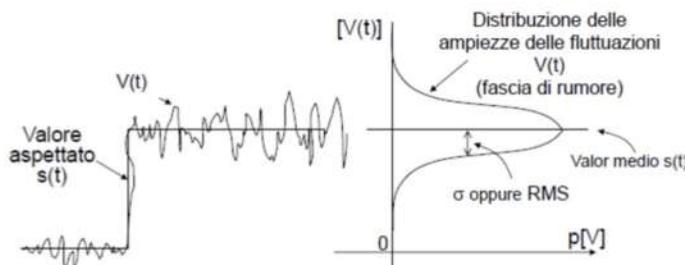
Noise is a **random fluctuation** of the electrical variables due to the physical behaviour of *internal* components of the circuit

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

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

Considerz solo rumore stazionario

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



Random process characterized by standard deviation σ = RMS

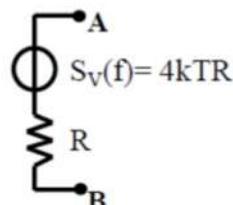
Rumore termico nei resistori

Più alta è la resistenza
maggiore è il rumore che succede.

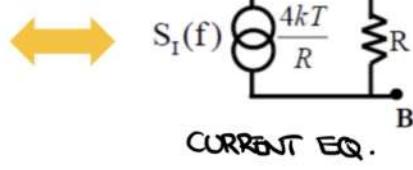
L'unità di misura della densità spettrale di potenza è

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

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



VOLTAGE EQ



CURRENT EQ.

- white (flat) power spectrum
- independent of how the resistor is biased
- a $1\text{k}\Omega$ resistor generates $4\text{nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ at 25°C

Shot Noise

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

Rumore negli OP-Amp

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

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

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

- Studiamo tutti i modi per fare questo

PASSIVE CURRENT CONVERSION

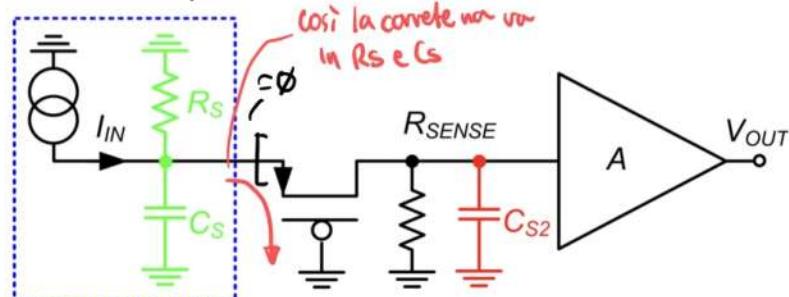
(LEGGE DI OHM)

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 elementi 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)

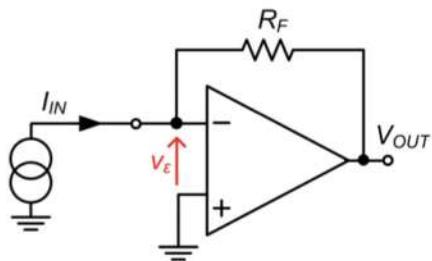


l'impedenza d'ingresso del transistor è λ_{gm} che dipende dalla corrente

TRANSIMPEDANCE AMPLIFIER

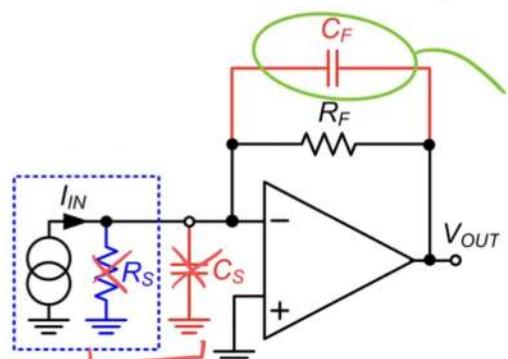
$V_E \rightarrow 0$

Usiamo sempre un transistore ma usiamo anche capacitors zeners, inoltre con il feedback diminuiamo l'impedimento dei componenti parasitari.



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

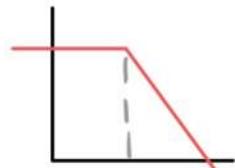
$$V_{OUT} = -I_{IN} \cdot R_F$$



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

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

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

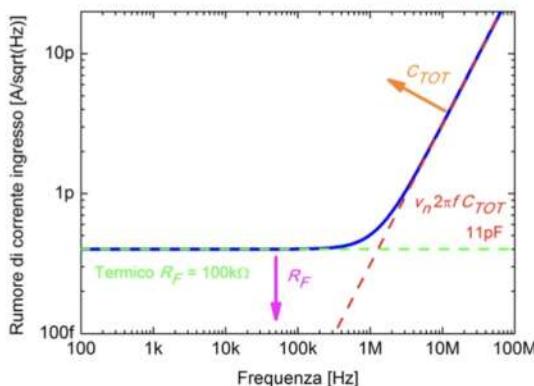
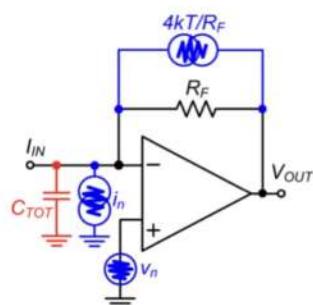


COSA SUCCIDE PER IL RUMORE?

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_S !

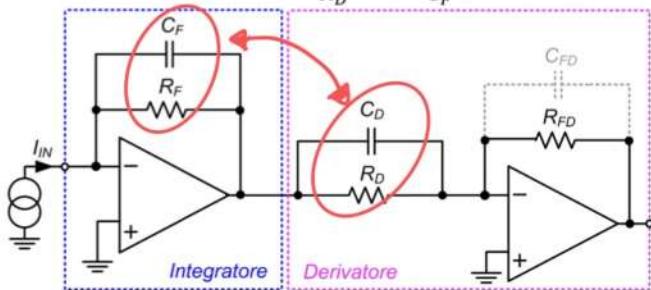


Supponiamo che il Guadagno $\alpha R_F \rightarrow$ vorremo R_F grande, ma se tanto R_F vedo a diminuire la banda dell'amplificatore che si vede con C_F . Ricordiamoci che la banda è $1/2\pi R_F C_F$.

VOLIAMO ESTENDERE LA BANDA E TENERE IL RUMORE BASSO

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

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

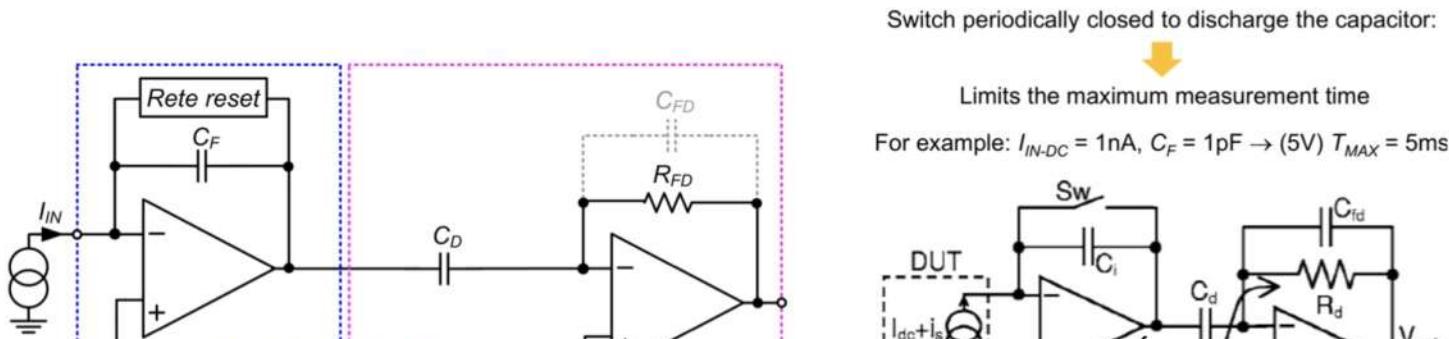


Pro: extends the bandwidth, preserving the lower noise
Con: manual tuning of the zero (due to parasitics)

- Nel primo stage netto R_F molto grande \rightarrow la banda si diminuisce
- Nel secondo stage 2 ha uno zero per cancellare il polo di prima
- Nel secondo stage netto R_F piccolo \rightarrow diminuisce di poco la banda \rightarrow il rumore di C_{FD2} è regolabile rispetto al rumore del primo stadio visto che R_F era molto grande

Lati negativi = Nella rete di feedback ci sono componenti che variano con T e bisogna tenerne conto.

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

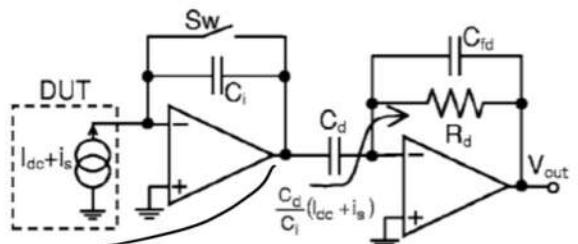


Switch periodically closed to discharge the capacitor:



Limits the maximum measurement time

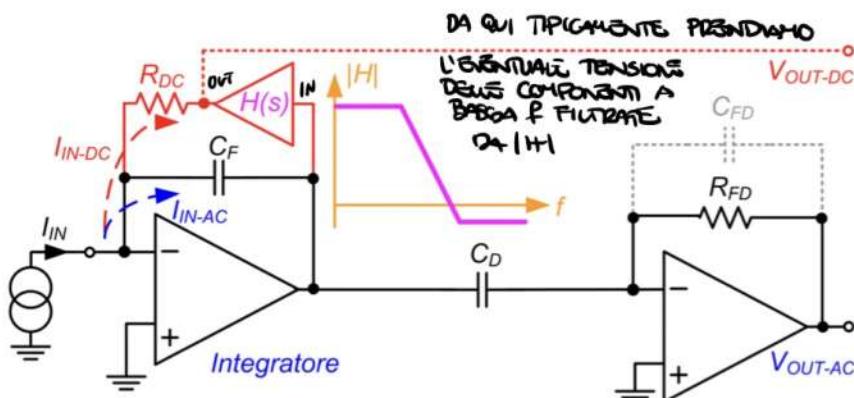
For example: $I_{IN-DC} = 1\text{nA}$, $C_F = 1\text{pF} \rightarrow (5\text{V}) T_{MAX} = 5\text{ms}$



Questo fatto di resettare ogni tant. fa sì che questo metodo non sia adatto in tutte le situazioni (x tempi scambi)

Per risolvere questi problemi facciamo un reset continuo

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

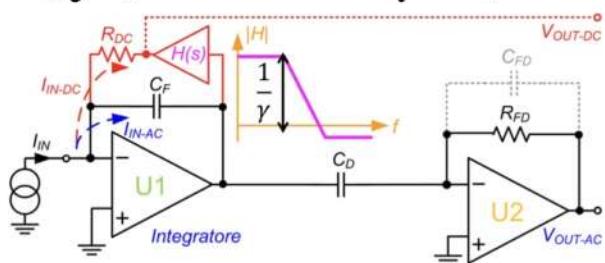


A basse frequenze la corrente va nel branch di $H(s)$ così togliamo le componenti a bassa frequenza

ed altra frequenza la corrente scatterà in C_F e il circuito si comporterà come un condensatore

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

$H(s)$ aggiunge rumore? Sì, oggi capiamo altro in feedback aggiunge rumore

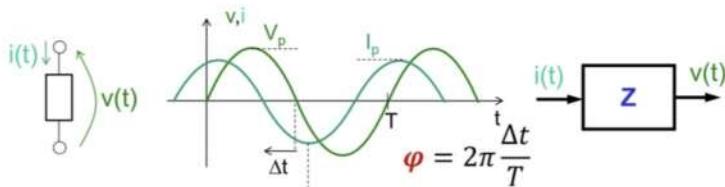


- M_2 infinitesima rispetto a M_1 quindi non la consideriamo
- $H(s)$, la possiamo dimensionare molto antecedendo R_{DC} .

Attenuation of U_2 noise, but additional noise of $R_{DC} \cdot H(S)$

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

MISURA DELL'IMPEDENZA



$$Z(\omega) = \frac{|V_p|}{|I_p|} e^{j\phi}$$

Impedance [Ohm]

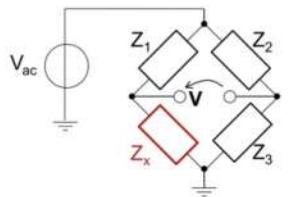
- Complex quantity
- Change with frequency

$$Y(\omega) = \frac{|I_p|}{|V_p|} e^{-j\phi} = \frac{1}{Z(\omega)} \quad \text{Admittance [Siemens]}$$

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

TIPI DI TECNICHE PER MISURARE L'IMPEDENZA

• Balancing Bridge



- Z_1, Z_2, Z_3 known and variable (switches)
- V_{ac} sinusoidal

$$V = V_{ac} \left(\frac{Z_x}{Z_1 + Z_x} - \frac{Z_3}{Z_2 + Z_3} \right)$$

$$\text{Balanced for } V = 0 \rightarrow Z_x = Z_3 \frac{Z_1}{Z_2}$$

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 $V \approx 0V$
- Common mode rejection (se V_{ac} fluttua a noi non interessa X è nci facciamo la differenza)

Cons:

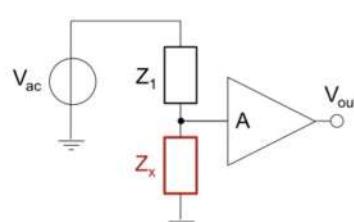
- Requires several switches
- Slow balancing routine
- Not very convenient for spectroscopy
- Inoltre dobbiamo sapere prima che impedenze andiamo cercando (resistenza/capacità/induttanza)
Questo contro si collega al primo

• Ratiometric: 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 $0V$ e il catenio va a V_{ac} e così perdo d'informazione.



$$V_{out} = A V_{ac} \frac{Z_x}{Z_1 + Z_x}$$

$$Z_x = Z_1 \frac{V_{out}}{AV_{ac} - V_{out}}$$

- V_{out} depends on the impedance ratio

- Z_1 has to be accurate:

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

$Z_1 \sim Z_x$
Difficult matching

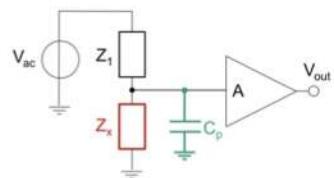
Un altro limite di questa topologia è dato dagli elementi parassiti

Un condensatore sul parallelo da errori, la quantità dell'errore dipende dal tipo d'impedenza di Z_x

Se Z_x è un condensatore allora

Al contrario se Z_x è una resistenza otteniamo

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



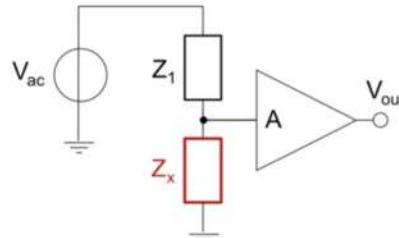
Capacitive detection: $Z_1 = 1/sC_1$, $Z_x = 1/sC_x$

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

C_p reduces the accuracy!

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

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



Pros:

- Independent of the impedance
- One terminal can be grounded

Cons:

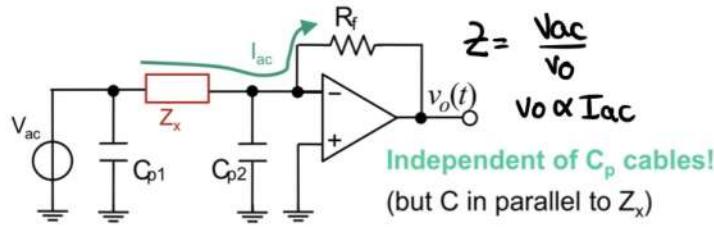
- Z_1 must match Z_x
- Need for phase-sensitive detection for complex impedance
- Critical impact of stray capacitance:
 - Limits the bandwidth in resistive sensing
 - Reduces the accuracy in capacitive sensing

CURRENT SENSING

Come possiamo ridurre gli effetti parassiti tra l'impedenza e GND?

Il modo migliore d'eliminarli è quello di usare la terra virtuale.

Current readout: transimpedance amplifier



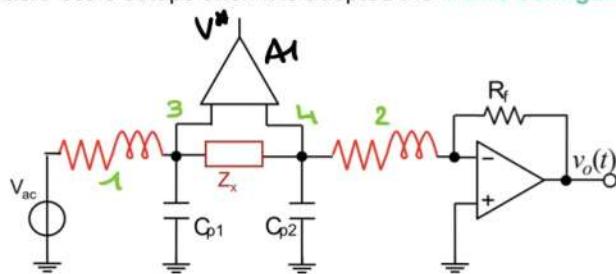
In pratica zommizzo i condensatori parassiti grazie alla terra virtuale, infatti questi saranno sempre tenuti a capi nulla

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

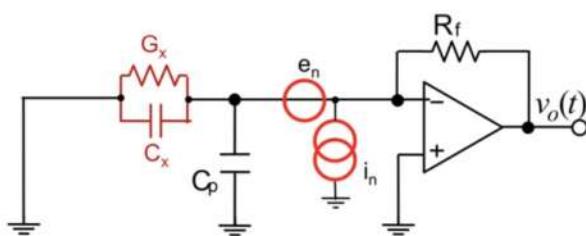
Abbiamo una struttura a 4 fili in cui i fili 3 e 4 non passa corrente. Usando quel segnale A1 per misurare la tensione 2: capi di Z_x , la tensione non sarà affetta da effetti parassiti perché $i=0$ nei cavi.

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

con V^* tensione 2: capi di Z_x

Tuttavia se Z_x è una resistenza elevata possiamo non considerare questi elementi per sì.

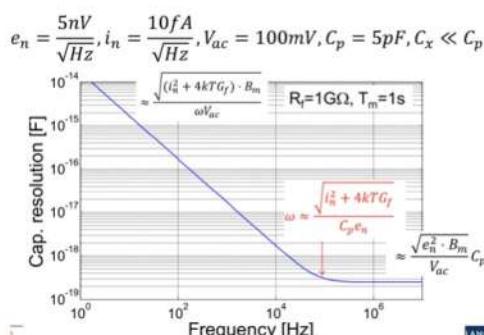
Calcolo del rumore del current sensing



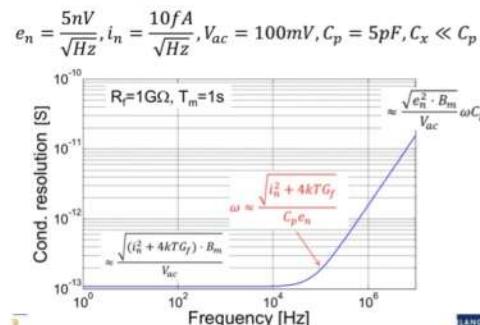
$$S_i = i_n^2 + 4kT(G_f + G_x) + \overline{e_n^2} \omega^2 (C_x + C_p)^2 + \overline{e_n^2} (G_x + G_f)^2$$

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

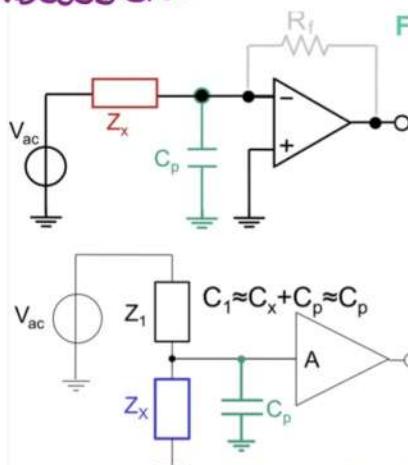
$$V_{ac} \omega \Delta C_{xmin} = \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta C_{xmin} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{\omega V_{ac}}$$



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



COMPARAZIONE RISOLUZIONI



Feedback does NOT alter SNR:

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

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

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 anche ridurre il rumore

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

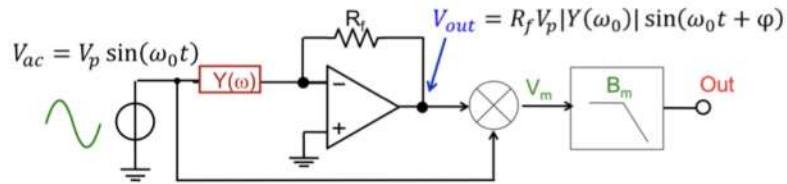
Se facciamo l'impedance spectroscopy f_0 cambia da 1Hz a 1MHz e quindi il passbande dovrebbe essere tunabile

Estremamente difficile fare ciò.

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

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

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



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

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

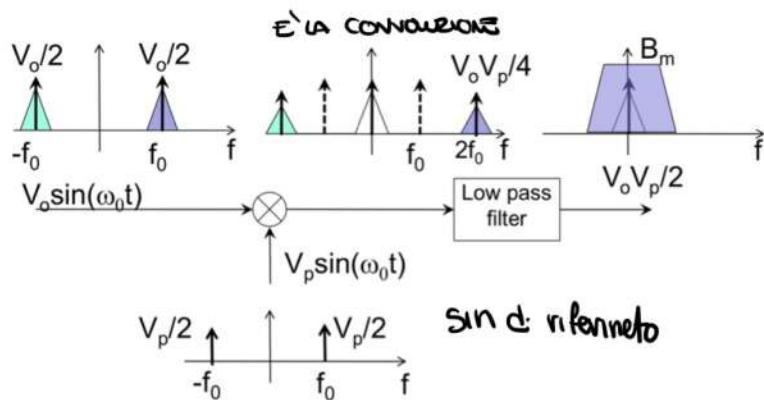
$$\text{Out} = R_f V_p^2 |Y(\omega_0)| \frac{\cos(\varphi)}{2}$$

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

The averaging time is set by the low-pass filter

Se volessi anche la parte immaginaria
allora

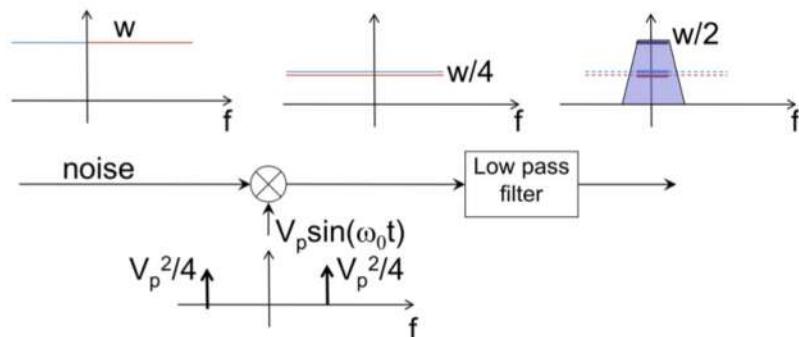
E per quanto riguarda il rumore
e il filtro pass banda cosa ho fatto?



Half of the signal in base band, half is filtered at 2f₀

Per il rumore abbiamo (nel caso di rumore bianco)

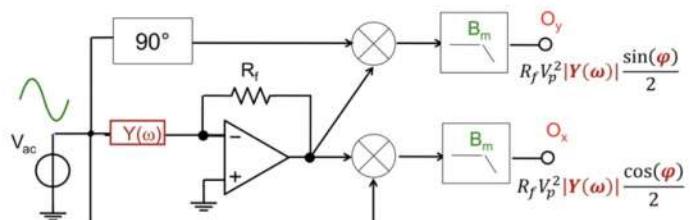
Uncorrelated noise: summing the power



$$\frac{S}{N} = \frac{G_R V_p^2 |Y(\omega)| \frac{\cos(\varphi)}{2}}{\sqrt{V_p^2 G_R^2 \frac{l_n^2}{2} B_n}} = \frac{V_p |Y(\omega)| \cos(\varphi)}{\sqrt{2 l_n^2 B_n}}$$

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

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



$$|Y(\omega_0)| = \frac{2 \sqrt{O_x^2 + O_y^2}}{R_f V_p^2} \quad \varphi = \tan^{-1} \frac{O_y}{O_x}$$

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

Poi noi mettiamo un passabasso e pedo tutto 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 varando la frequenza della sinusode. Time domain approach

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

Vantaggio: Veloce, poiché faccio solo una volta

Svantaggio: Forse questo rende molto più difficile il circuito

Alternative time-domain approach:

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

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

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

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

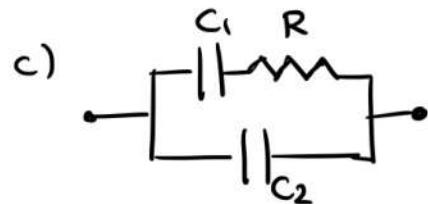
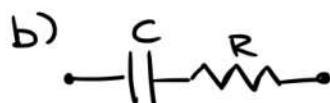
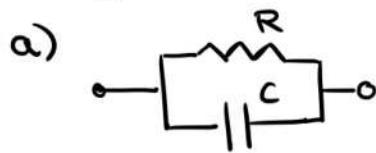
07.04.2021

2h

ESERCIZI

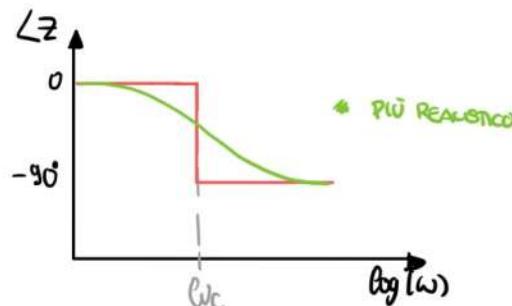
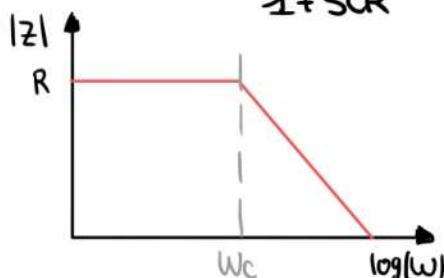
① IMPEDANCE MODELS AND PLOT

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

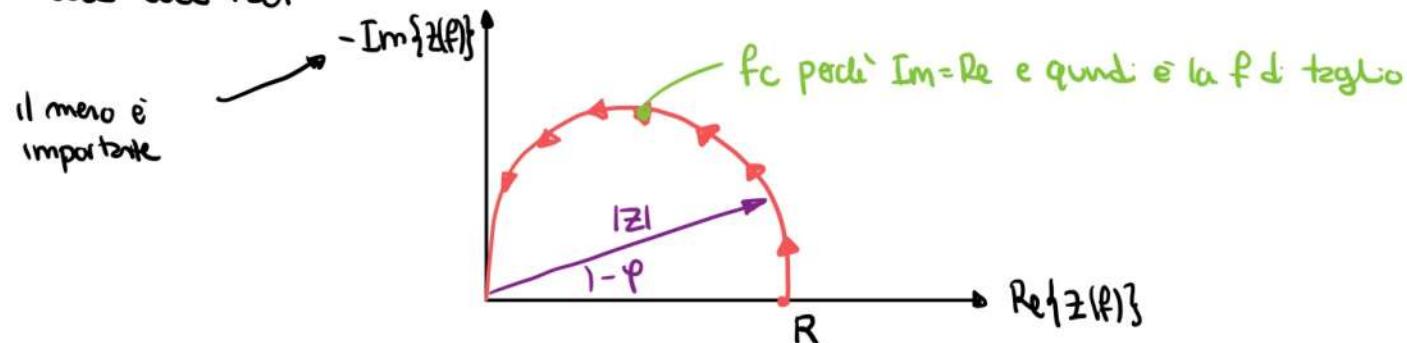


a) INIZIAMO CON BODE

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



> COLE-COLE PLOT



il meno è
importante

Ricaviamo parte reale e immaginaria

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

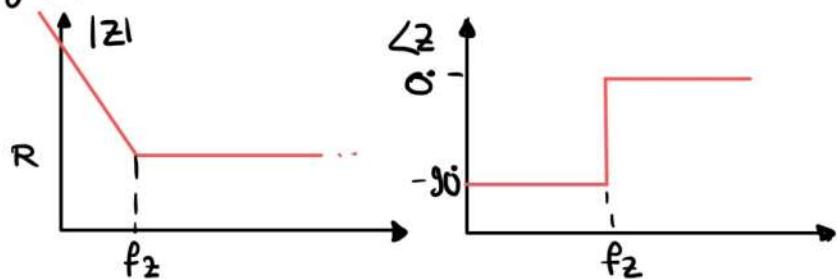
Per $f=0$ ho solo parte reale (R)

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

b)

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

BODE

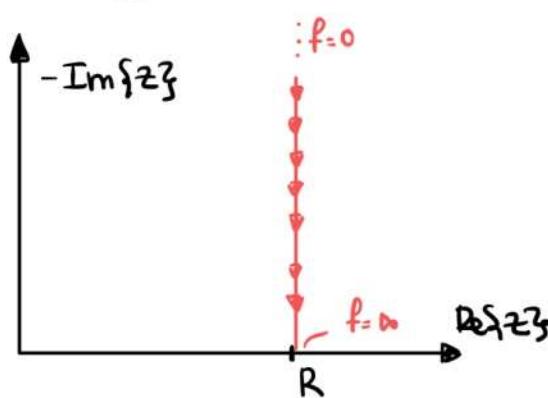


> COUE-COUE PLOT

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

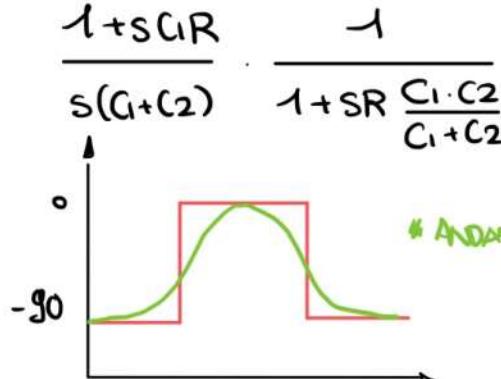
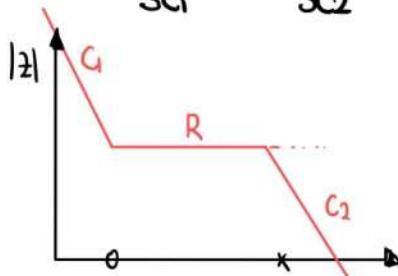
$f=0$: $|Z| \rightarrow \infty$

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



c) $Z = \frac{\frac{1+SCR_1}{SC_1} \cdot \frac{1}{SC_2}}{\frac{1+SCR_1}{SC_1} + \frac{1}{SC_2}} = \frac{\frac{1+SCR_1}{SC_1}}{s(C_1+C_2)} \cdot \frac{-1}{1+SR \frac{C_1 \cdot C_2}{C_1+C_2}}$

$C_1 > C_2$



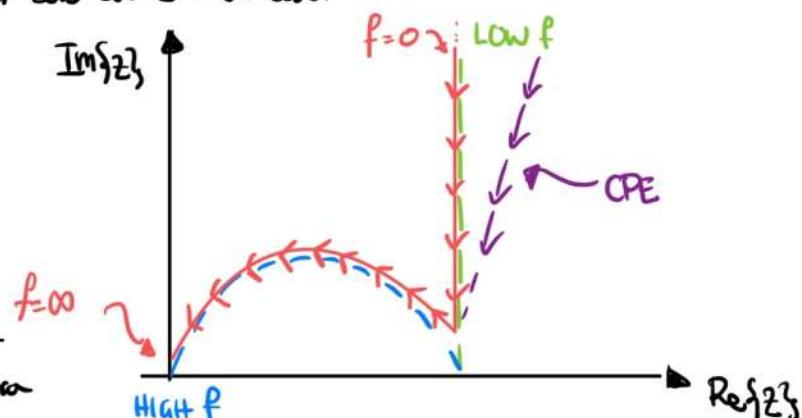
In tutti i casi in cui vogliamo misurare la resistenza di soluzione di un campione biologico c'è detto unica volta una finestra di frequenze dove abbiamo solo la resistenza (resistive plateau)

> COUE-COUE PLOT (alla fine è nyquist solo con -Im sulle zisse)

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

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

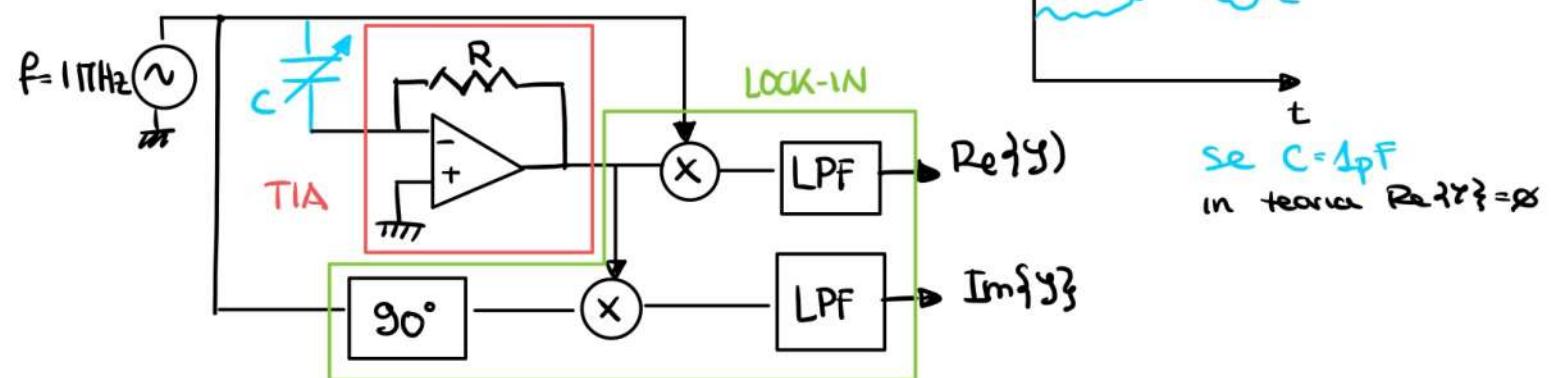
Nel caso di condensatore ideale la curva è verticale mentre se abbiamo un CPE, costantephase element allora la linea è tiltata a destra



ESERCIZIO 2

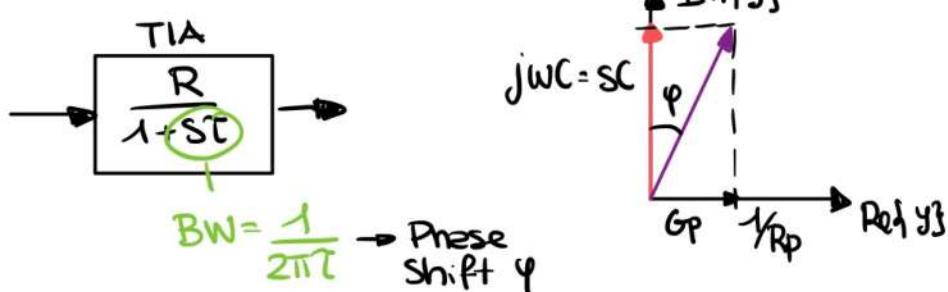
IMPEDENZA APPARENTE

LOCK-IN DETECTOR, C cambia continuamente



Travate la banda del TIA (Trans Impedance Amplifier) che da una resistenza parallela apparenente $R_p > 16 M\Omega$

Cioè nella rete di ritorno il TIA ha una sua banda che fa sì che ci sia una resistenza apparenente e che quindi $\text{Re}\{Y\} \neq 0$



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

Ricaviamo φ grazie a $G_p \approx 1 M\Omega$

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

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

• Ricaviamo l'FDT del TIA

$$\begin{aligned} H(s)|_{\text{TIA}} &= \frac{R}{1+sT} & \angle H(f=1 \text{ Hz}) &\leq 957^\circ \\ &= \frac{R}{1+j2\pi f T} & & \\ & & = \text{atan}\left(\frac{f}{f_p}\right) = \text{atan}\left(\frac{1 \text{ Hz}}{f_p}\right) = 0,57^\circ \end{aligned}$$

E QUINDI

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

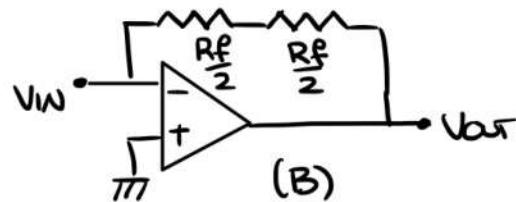
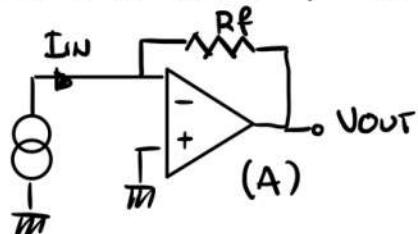
Dobbiamo quindi avere che l'impedenza zbia benda 10 volte quella del segnale



ESERCIZIO 4

MISURAZIONE DI CORRENTE : BANDWIDTH EXTENSION

Cercchiamo un modo per aumentare la banda del trasmettitore amplifier



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 G_f in parallelo, ma nel caso di B abbiamo



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

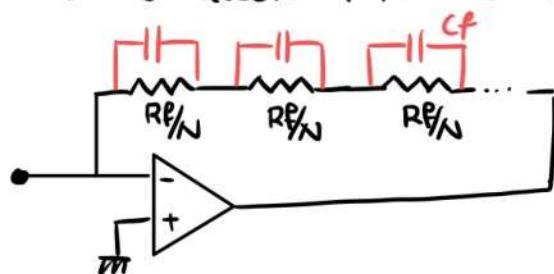
mentre nel caso A abbiamo che $Z = -\frac{R_f}{1 + S C f R_f}$

Abbiamo lo stesso guadagno in continua R_f ma:

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

$$BWB = 2 \cdot BW_A$$

ESTENDIAMO QUESTO A N-RESISTORI



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

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 $Cf_1 = Cf_2 = Cf_3 \dots$ ed è molto difficile fare in modo che le capacità parassite siano uguali in tutte le resistenze.

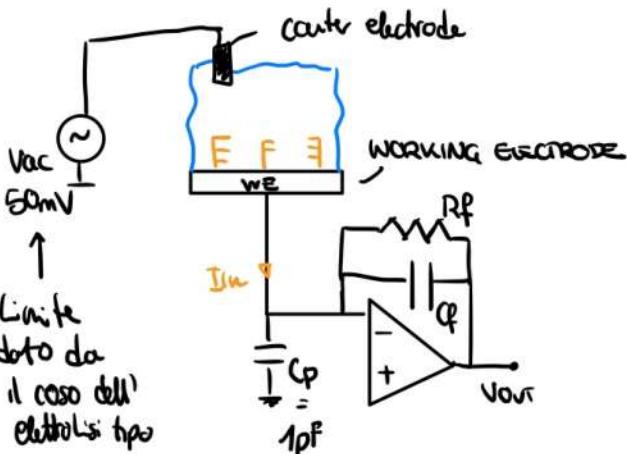
Inoltre se consideriamo una capacità parallela tra le resistenze e terra questa farà sì che il triclick non funzioni.

AGGIUNGE UN FILE ONLINE CON GLI ALTRI ESEMPI + SOLUZIONI

12 Oct 2021

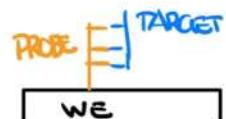
2h

CAPACITIVE DNA BIOSENSOR



L'impedenza
data da
il caso dell'
elettrodo tipo

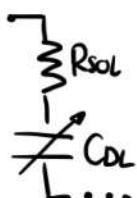
Vogliamo trovare una sequenza di DNA in soluzione



Quando la probe prende
il target toglie un po'
di carica dalla superficie
del working electrode

Cerchiamo che cosa ci interessa la Capacità Doble Layer

Allora modelliamo il sistema come

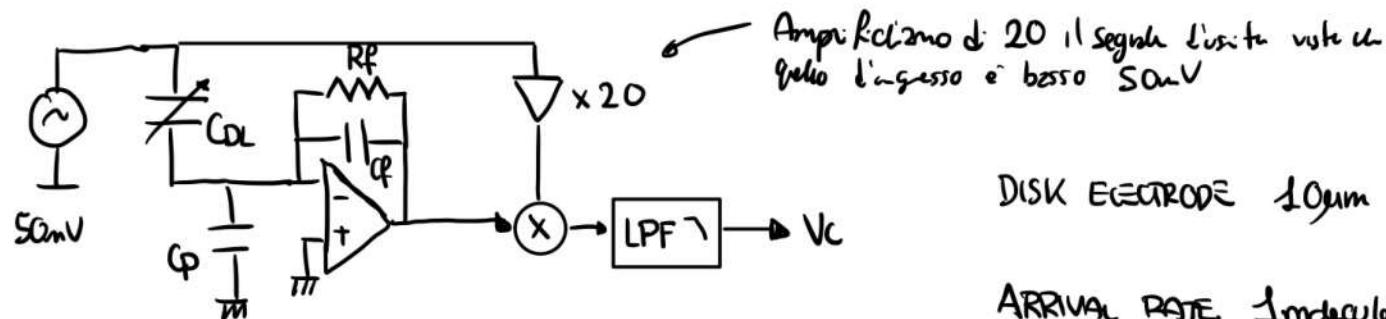


Ci interessa vedere
in che modo
cambia
capacità



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

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



DISK ELECTRODE 10μm Ø

ARRIVAL RATE 1 molecule/sec

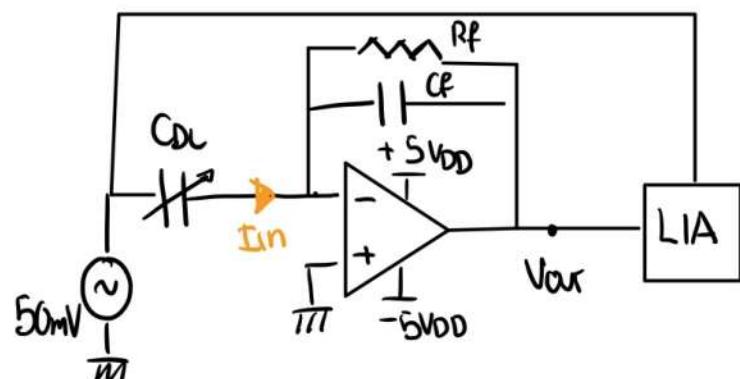
a) Size C_p

b) trovare la capacità risolvente con $BW/LPF = 100\text{Hz}$

c) l'ibridizzazione del DNA da $\Delta C = 10/\text{C}_{dl}$ trova il minimo C misurabile

d) che impatto ha il rumore su V_{ac} ?

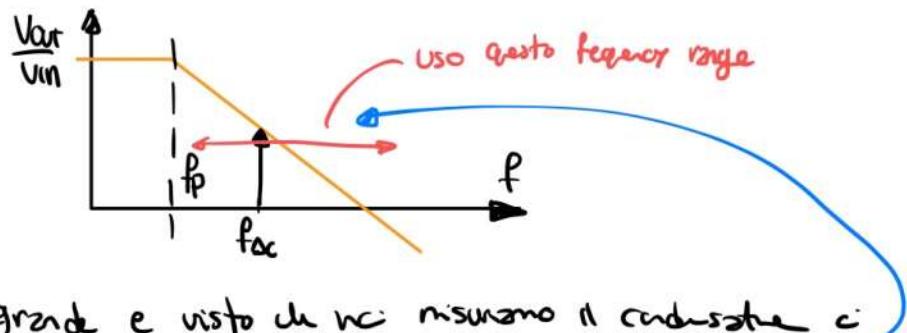
e) Trovare BW/LPF (non ho capito in che caso)



$R_f \sim 1G\Omega$

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

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



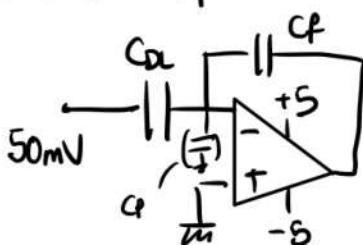
Visto che abbiamo un R_F molto grande e visto che noi misuriamo il condensatore ci serve operare nella zona capacitiva della curva.

Noi facciamo così perché visto che in input abbiamo un condensatore allora la corrente reale con la frequenza è quindi la tensione d'uscita dipende dal rapporto di 2 condensatori. Si fa così quando si due misure una capacità, infatti

$$I_{IN} = \frac{V_{AC}}{\frac{1}{SC}} = V_{AC} SCDL \rightarrow \text{uso questa formula in questa } V_{OUT} = I_{IN} \cdot \frac{-R_F}{1 + SCFPR}$$

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

Se $f_{AC} \gg f_p$ allora



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

questi valori dicono che tra -5 e 5 volt se c'è 12 unità del OPAMP

5V C_F non circola corrente.

Noi sappiamo che

$$CDL = \frac{0,1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot \text{Area}_{WE} = \frac{0,1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot \pi (S_{sum})^2 = 2,8 \text{ pF}$$

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

$$V_{OUT} = \left(-V_{AC} \cdot \frac{CDL}{CF} \right) = 5V \rightarrow CF = CDL \cdot \frac{50mV}{5} = 78 \text{ fF}$$

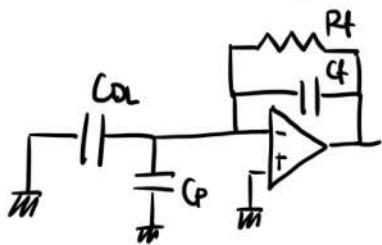
velocità molto bassa non si può comprare

Se mettiamo $CF = 1 \text{ pF}$ allora ci viene che

$$V_{OUT} = 50 \cdot \frac{2,8 \text{ pF}}{1 \text{ pF}} = 9 \text{ uV}$$

• PUNTO b

minimo DC da possiamo misurare, ora la capacità C_P diventa rilevante



Calcoliamo la CTOT connessa all'input

$$CTOT = C_P + C_{DL} + C_F \approx 10 \text{ pF}$$

↑ ↑ ↓
stray sensor ampli

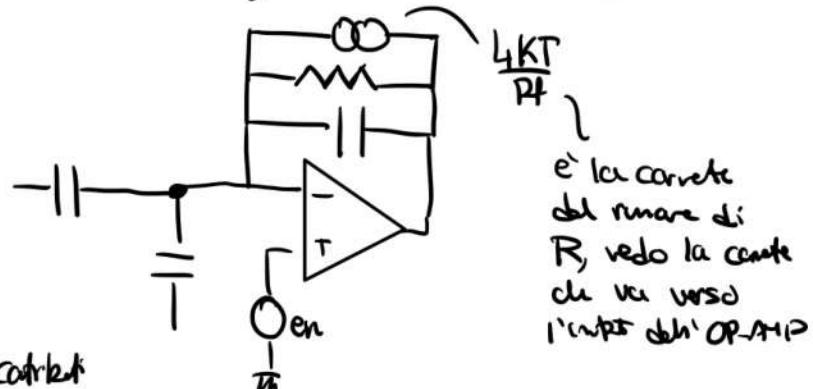
Vogliamo minimizzare G_{OT} perché questo contribuisce al rumore e alla instabilità del sistema

Dobbiamo calcolare il minimo rumore 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

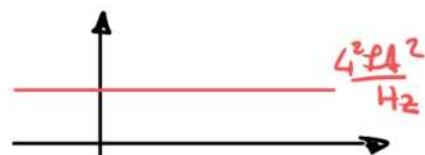
$$e_n = \frac{4nV}{\sqrt{Hz}}$$

Abbiamo 2 componenti di rumore, quella della $26mV$ e quella della resistenza, tutti questi contributi vengono sommati in potenza. Allora usiamo la radice quadrata del valore al quadrato



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

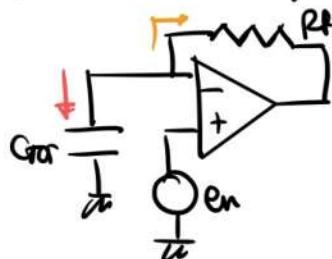
$26mV$ $1,6 \cdot 10^{-19} C$



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

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

Abbiamo 2 correnti: quella sul resistore e quella sui condensatori.



La parte sul resistore è

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

Approssimabile a 0 se considerato a 1 rumore di Rf
(è uno di solito di cui Rf grande)

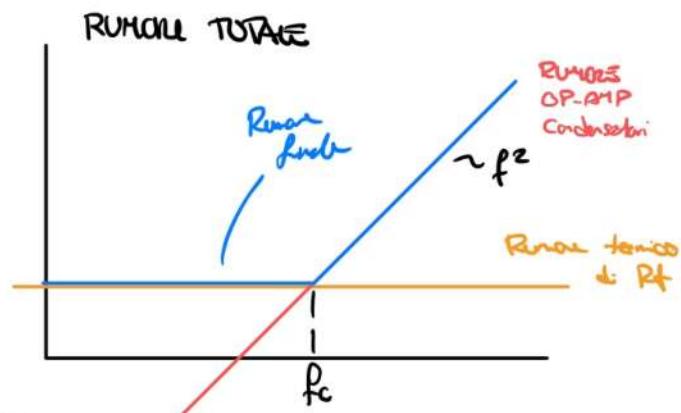
La parte sui condensatori è

$$\sqrt{e_n^2 (2\pi f G_{OT})^2} = e_n 2\pi f G_{OT}$$

è un rumore che varia con la frequenza

Cerchiamo f_c per capire la banda

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

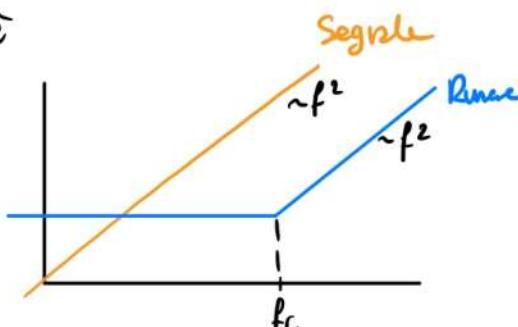


Dove mettiamo quindi la nostra sensing frequency?
 In geoch se il segnale non dipende dalla frequenza ne perdiamo una frequenza $< f_c$.
 Tuttavia nel nostro caso il segnale dipende dalla frequenza, dobbiamo vedere anche il segnale parsi a noi ci interessa l'SNR. Poi per capire il minimo segnale misurabile mettiamo $\text{SNR} = 1$. (2 ha il segnale dipende dalla frequenza da' abbiamo un condizionale in ingresso)

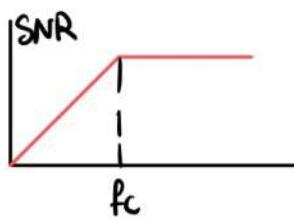
Infatti il segnale d'ingresso è

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

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 con > intendiamo in fattore 10)

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

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

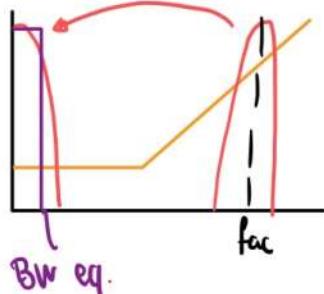
il rumore dominante è quello dell'OP-Amp

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

Perciò facciamo l'SNR in un 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 PZB gestisce il segnale perché metti ampiezza



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

Dato dal lock-in

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

La nostra incognita
= 1

Perciò

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

CAPACITIVE RESOLUTION

→ FORMULA IMPORTANTE

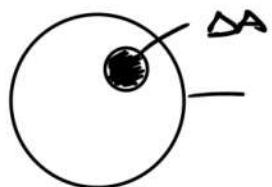
Perciò

$$\Delta C = 11 \text{ aF} \quad (\text{arto Farad ?})$$

• PUNTO C

Supponiamo che (DL cambia del 10% quando abbiamo l'ibridizzazione, se $\sigma_C = 11 \text{ aF}$ (cioè la minima capacità rilevabile) allora

$$\sigma_C = 11 \text{ aF} = \frac{0.1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot \text{Area} \cdot 0.1 \quad \xrightarrow{10\%}$$



$$\text{Calcoliamo l'area del DNA? } \Delta A|_{\text{DNA}} = \frac{11 \text{ aF}}{\frac{0.1 \text{ pF}}{\mu\text{m}^2} \cdot 0.1} = 1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$$

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

- Limit of Detection lo posso vedere come n° di molecole / volume della area piccola questo mi dà la minima carica rilevabile.

Così ho il volume con un semicilindro sopra l'area



Noi sappiamo che il diametro del DNA è 2.5 nm.

Perciò il numero di molecole di DNA è calcolabile come $n^{\circ} \text{ molec. DNA} = \frac{1.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2}{\pi \left(\frac{2.5 \text{ nm}}{2} \right)^2}$

in una slice 2D

$$= 22 \text{ h molecole}$$

Il volume del semi-cilindro è

$$\Delta V = \pi r_{eq}^2 \quad \text{Perciò il volume } V = \frac{4}{3} \pi r_{eq}^3 \leftarrow ? \text{ non dovrebbe essere metà?}$$

E quindi

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

14.04.2021

lezione

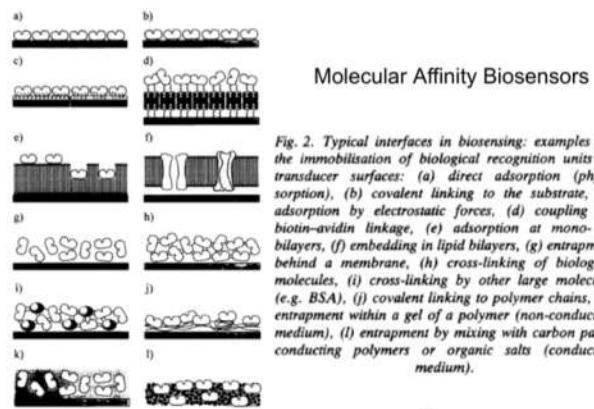
2h

Molecole

Come possiamo bloccare le molecole che noi utilizziamo come recettori?

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

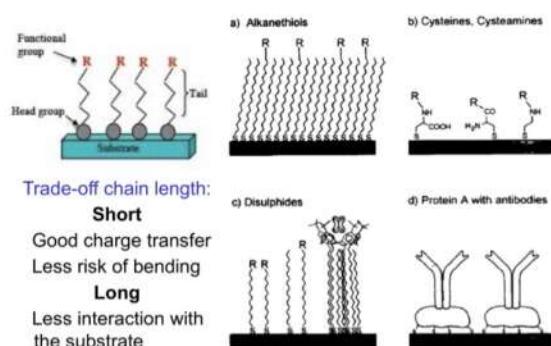
Ci sono altri modi per attaccare le molecole, una sorta di bio lego [d] o di biopolimeri che bloccano le molecole. [g, h, i, j, k, l]



Molecular Affinity Biosensors

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

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

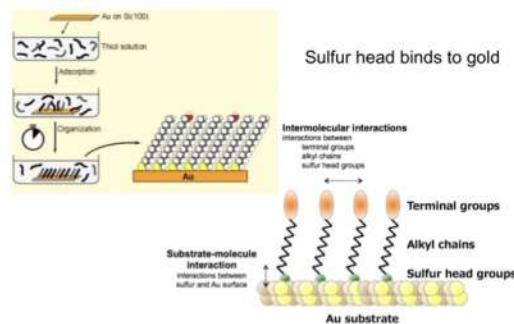


Noi ingegneriamo una testa per stare legata al substrato e una per legare con i reagenti.
Possiamo anche scegliere la lunghezza.

Sono chiamati self assembled perché noi mettiamo queste molecole in un fluido e le mettiamo sul substrato la testa si leggerà al substrato e quando il liquido sarà evaporato abbiamo i nostri recettori

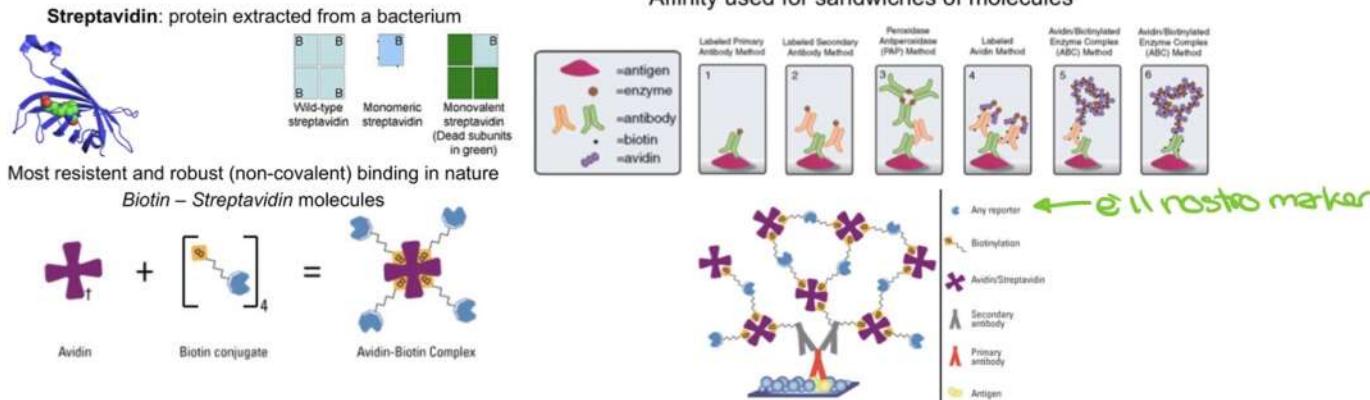
Tipicamente la lunghezza di questi recettori è 10 atomi di carbonio

Tipicamente questi self assembled monolayers si legano ad un substrato di oro e la loro testa è tipicamente a destra se questo si lega su lega molto bene sull'oro. Questo tipo di recettori si chiamano Thiolos.



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

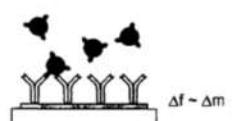
Affinity used for sandwiches of molecules



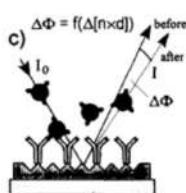
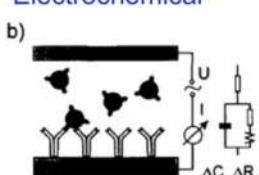
Abbiamo il marker tenuto da biotin, questi saranno tenuti in siero degli znidin, per questo si attaccherà a un anticorpo secondario

TIPI DI DETECTION (RICORDIAMO)

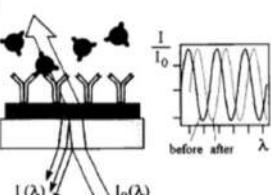
Mechanical Resonance



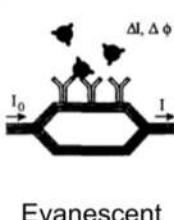
Electrochemical



e)



f)



Ci sono 2 tipi delle tecniche

a)/c) che studiano la presenza delle molecole in base alla tecnica rifrazione della luce

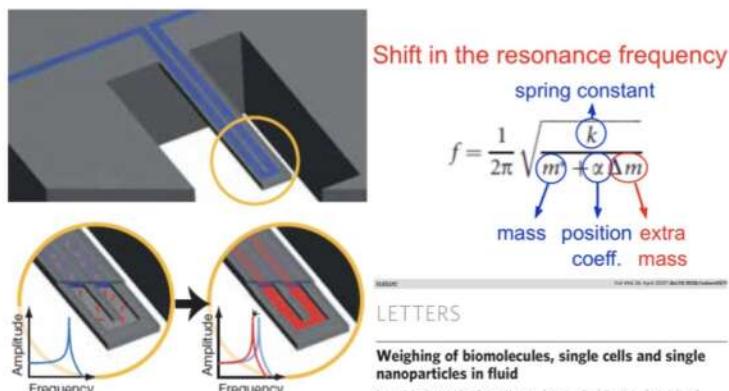
d) è una tecnica molto complessa

e) si basa sulla risonanza

meccanica, in pratica crea un oscillatore meccanico e misura la freq d'oscillazione, questa varia in base alla massa delle molecole che si formano nel canale

ESEMPPIO DI TIPO e)

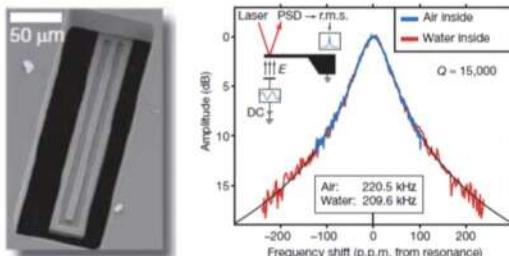
Leveraging mass-sensitive micromechanical resonance:



IN PRATICA HO CREATO UNA SPECIE DI NANO BILANCIA

Il risonatore è nell'ordine di grandezza di μm

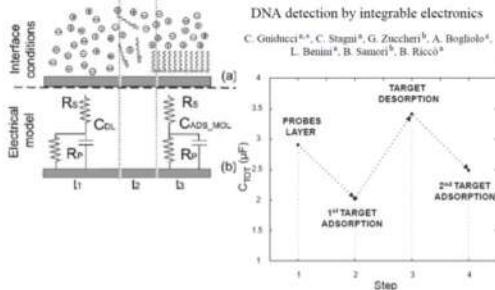
Suspended Silicon cantilever: 200 x 33 x 7 μm



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

Per fare questo esiste solo uno in ambiente estremamente controllato (stabilizzatore di temperatura ecc...) capiamo dunque che questo non è utilizzabile in un lab o on chip

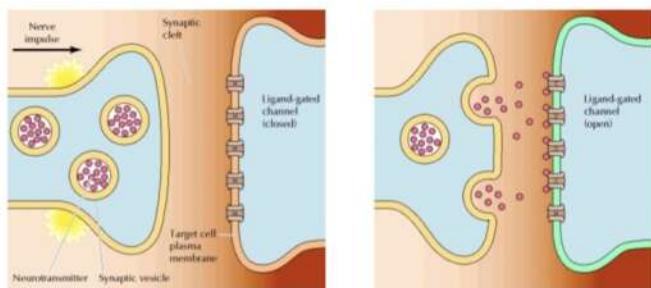
• CAPACITIVE DETECTION DNA



IN PRATICA È L'ESERCIZIO DI ELABORARE POCO POCO GIRO

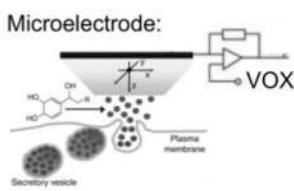
NEUROTRANSMITTERI

Chemical mediation: 5-1014 synapses in the human brain



Exocytosis: extra-cellular release of small molecules in vesicles

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

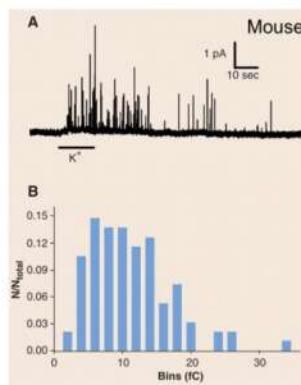


Chemical messengers:

- Dopamine, adrenaline etc..

Current tracking:

- 5-104 molecules in a vesicle
- 10fC released in 1ms $\approx 10\text{ pA}$

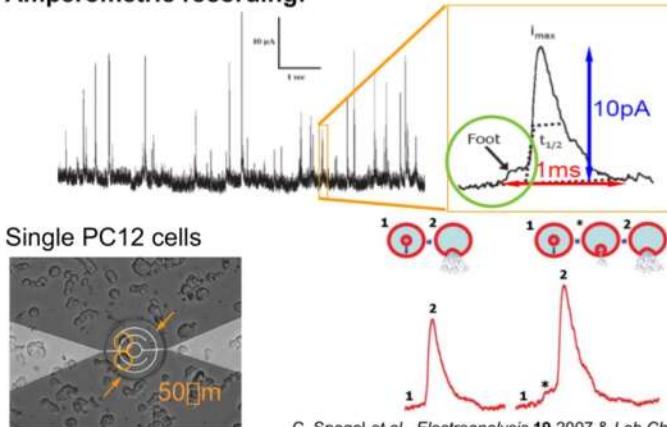


Sono molecole rilasciate da un neurone, questo avviene quando c'è un salto tra 2 neuroni (sinapsi). Questo processo è chiamato **EXOCITO**

Dell'altra parte della sinapsi ci sono delle proteine target che si appoggiano a i neurotrasmettori e poi ridisegnano l'impulso elettrico.

Neurotransmitters can undergo redox

Amperometric recording:



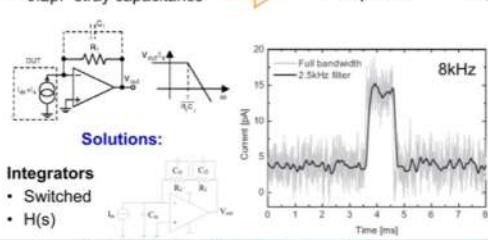
C. Spegel et al., *Electroanalysis* 19 2007 & *Lab Chip*

è molto un casinò misurare questi

impulsi di corrente molto veloci. molte dobbiamo avere molto 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:

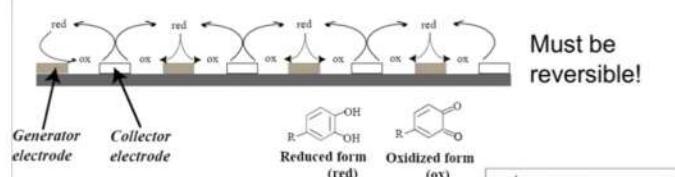
- R_f = 200MΩ
- 0.2pF stray capacitance
- BW = 4kHz
- 1.4pA rms



Siamo troppo al limite con questa topologia d' transimpedenza amplificatore.

C'è un'altra topologia, quella sotto.

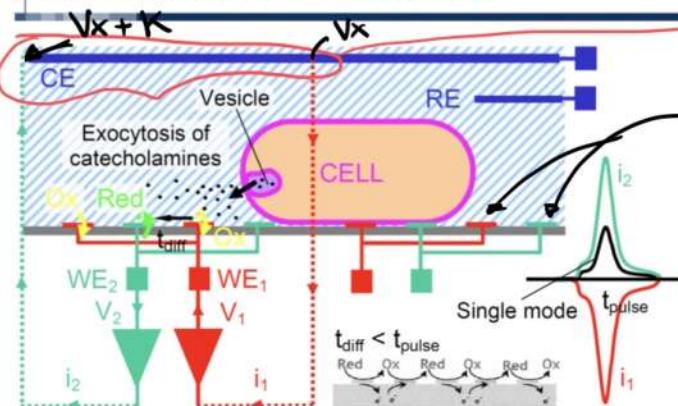
C'è un altro trick per aumentare il segnale **REDOX CYCLING**, infatti se di neurotrasmettore possiamo fare una redox e ossidazione in continuo più d' una volta, allora noi possiamo mettere più elettrodi per leggere questo effetto d' redox → oxidized → redox → ..., (non possiamo usare un singolo elettrodo se non riusciamo a tener ferme le molecole)



Ho 2 famiglie d' elettrodi: messi a 2 potenziali diversi, i generator electrode fanno la redox e ossidano la molecola, la molecola oxidata per diffondere si muova, probabilmente questa traevi in collector electrode da la riduce (fa tornare a redox).

Tramite questo modo posso catturare i segnali. 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 for Redox Cycling



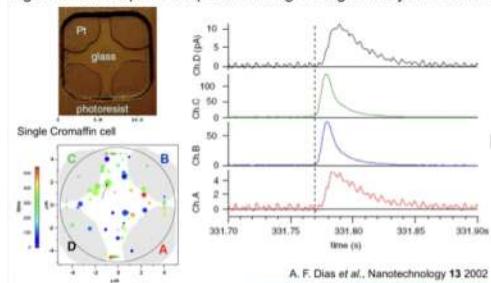
Bipotentiostat

Fazile & 2 tipi di eletrodi

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

SUB CELLULAR RESOLUTION (17.39)

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



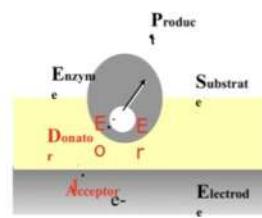
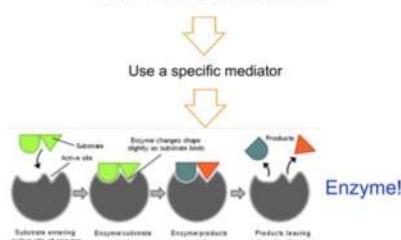
(Non ho ascoltato cosa ha detto)

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

I PROBLEMI DALLE INTERFERENZE: Neurotrasmettitori simili, cioè che hanno voltammetria molto simile, fanno la tensione per cui hanno la redox e quindi possono risultare in corrente non voluta che inficia la lettura. Per risolvere questo problema facciamo qualcosa simile alla cyclic voltammetry, cioè sweepiamo la tensione e per ogni velle di tensione misuriamo la corrente.

SE LA MOLECCOLA NON È ELETROATTIVA NON POSSIAMO USARE TECNICHE DI MISURAZIONE. OTTI USANO L'ELETTRICITÀ. TUTTAVIA POSSIAMO RISOLVERE PARANDO SÌ CHE LA MOLECCOLA S. LEGGI AD UN ENZIMA E QUESTO REA SÌ CHE C' POSSANO ESSERE PRODOTTI ELETROATTIVI.

If the molecule is not electroactive?



If the catalysis of the target molecule involves an electron transfer it can be detected with amperometry

- The current is proportional to the concentration
- The process can be less efficient
- Enzymes are often immobilized on electrodes

Nel lettore di glucosio, nella striscetta ho l'enzima asciutto, con il sangue lo bagni e lo metti, ho un prodotto di reazione che è redox detectable e perciò ottengo una corrente che è proporzionale al veloce di glucosio.

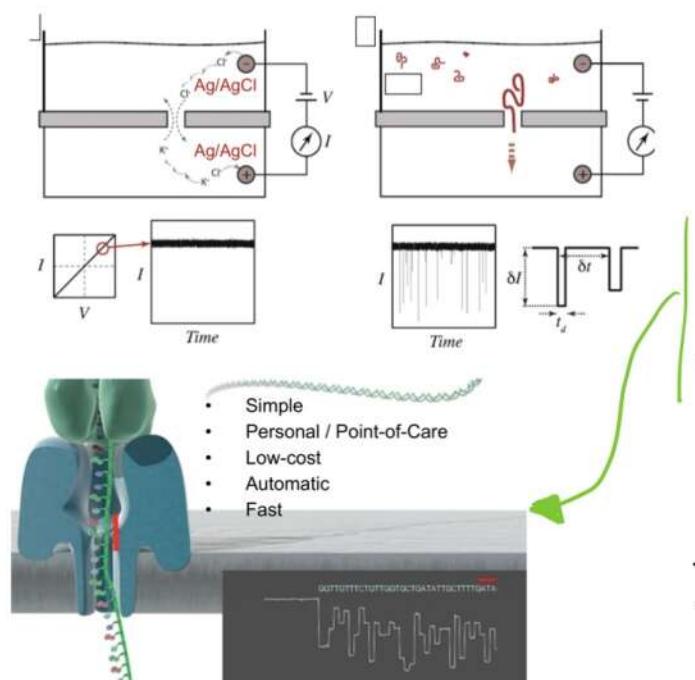
CAPIAMO CHE QUESTO È UN CASO FORTUNATO XE' CHE L'ENZIMA GIUSTO E NON HA BLOCCATO

DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

NANOCODED 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 netto gesto in soluzioce e ai 2 capi di questo materiale isolante metto 2 elettrodi.

Anzi quando una corrente data dagli ion che passano in questo buco, tuttavia quando una molecola passa per questo buco blocca il buco e perciò gli ion non si muovono e quindi la corrente mi diminuisce



Non solo posso sapere quando la molecola passa nel buco (la molecola deve essere circa $\times 10$ volte in modo attivo per farcere questo operazione elettronici non percepibili da noi), 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 di singoli pezzi d' DNA (da solo) e giro di questi in forme in modo diverso e quindi passa più o meno corrente

In pratica ho fatto un sequenziatore d' DNA

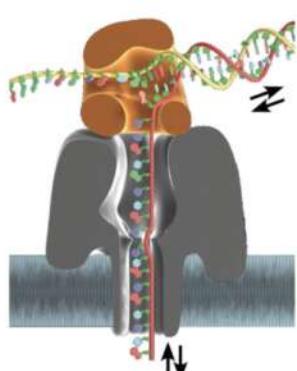
Per dare i numeri:

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

Per avere queste belle correnti bisce una banda di kHz e questo significa che la molecola d' DNA deve stare ferma nel buco per ms (ma è troppo), ci vorrebbe troppo tempo a sequenziare un intera catena d' DNA, però si può fare per pezzi piccoli

Per rendere questo il DNA una base alla volta con le velocità che vogliamo e in ezima apposta

Enzyme gateway



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

19.04.2021

2h

Sample preparation

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

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

ESEMPIO DI PURIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE

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

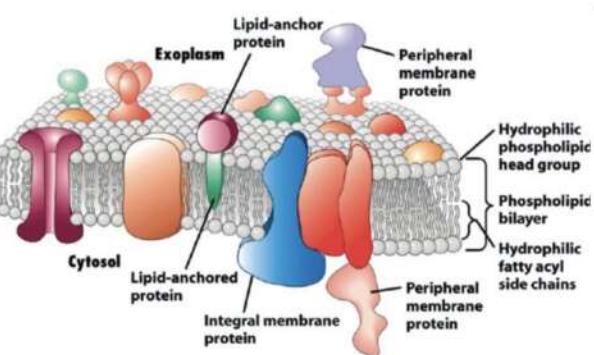
Tutto questo posso farlo direttamente in un biochip.

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

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

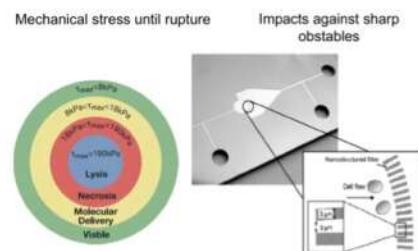
Very complex and robust: 4nm thickness, dynamical

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



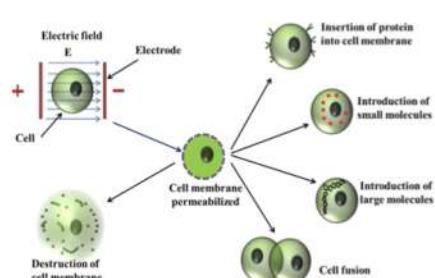
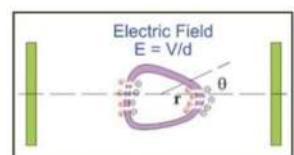
- Chimica (usa il sodio dodecilsulfato, finora è facile ma più abbiano le molecole in soluzione con questo composto)

- Meccanica:
con forza teniamo la cellula contro uno degli spari a piatto



Altro sono per compressione o tramite altre tecniche necessarie.

- Approccio elettrico. ELECTROPORATION:



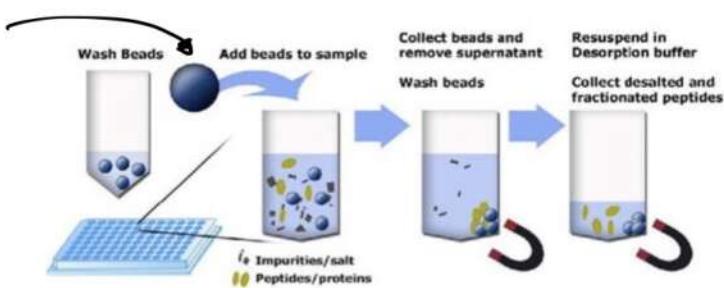
se si applica un campo elettrico abbastanza alto si può distruggere la barriera della cellula.

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.

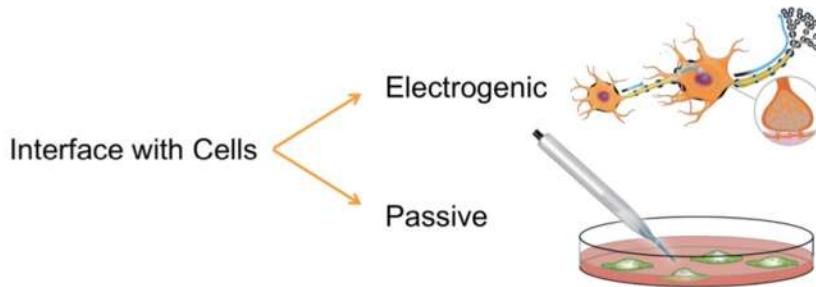
Tipicamente l'eletroporazione (250V) è usata per ricevere il DNA.

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

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



Cellule



Le applicazioni d'uso creare le cellule su d' un chip siano per lo studio d' reti neurali, scoperta d' farmaci o per creare organi.

Direct Electrical Interface with Cells

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

I VANTAGGI DELL'ELETROGENESI

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 basi delle cellule elettrogene si sono i canali d'ioni. Ogni ion chiamato (deve essere una proteina) lascia passare solo un tipo di ione dato da un elenco

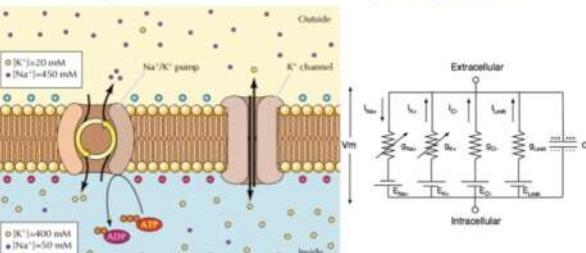
Ion channels: transmembrane protein.

Se chiusi: $I = 0$

Se aperti il passaggio degli ioni è dato solo dalla diffusione

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

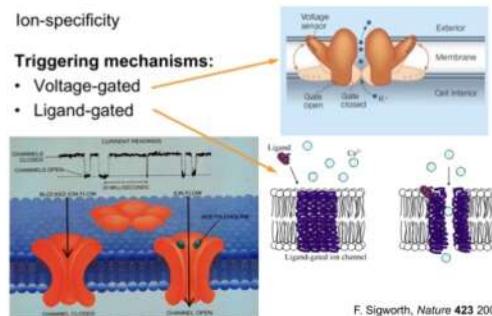
Electrical signals within cells are driven by [ionic gradients](#):



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

Per interfacciare ad una cellula elettricamente ci sono 3

- leggere la tensione (ci sono 2 elettrodi uno esterno e uno interno della cellula ci sono la tensione ai capi della membrana. Tuttavia abbiamo una grande capacità parallela (??) Questo fa sì che la tensione letta sia molto minore rispetto a quella reale).
- leggere la corrente attraverso i canali del ion, questi canali possono essere aperti imponendo una tensione sopra tot sulla membrana oppure tramite particelle chimiche. Però noi con queste 2 tecniche sappiamo i canali e puoi misurare la corrente.



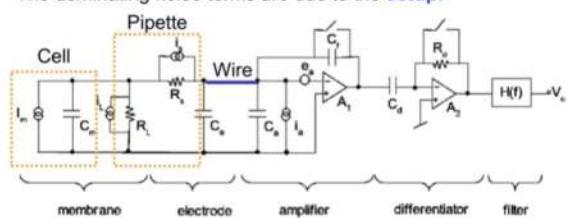
F. Sigworth, *Nature* 423 200

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 $1-10 \text{ pA}$ per il calcio 0.1 pA) e sfioriamo in timescale di ms. Abbiamo lo stesso problema della scorsa lezione.

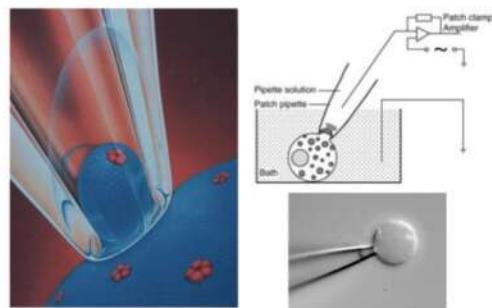
L'aspetto critico è dato dagli elementi presenti della pipetta

The dominating noise terms are due to the setup:



- $C_m = 0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$
- $R_L = \sim G\Omega$ (seal)
- $R_S = \sim M\Omega$ (solution)
- $C_e = 1-10 \text{ pF}$
- $C_a = 1-10 \text{ pF}$

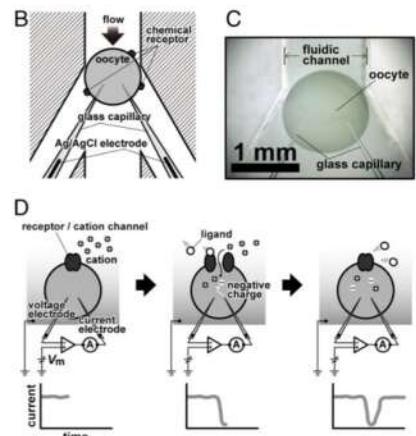
F. Sigworth & K. Klemic, IEEE Trans. Nanobioscience 4 2005



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

Live cell odorant sensor:

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

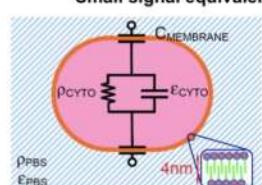


ALTRÒ TIPO DI CELLE: PASSIVE CELLS

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

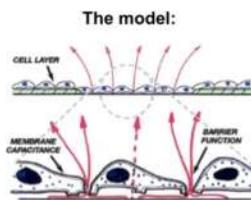
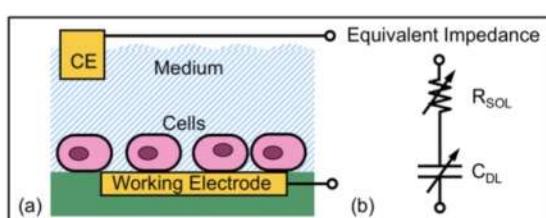


- Low frequency (below $\sim 100 \text{ kHz}$): insulating sphere
- Dead cells (lysis, broken membrane) are hardly discernable

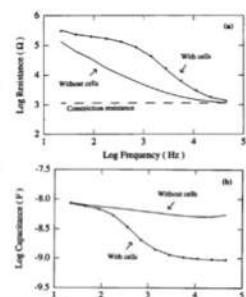
la membrana si comporta da capacità. La zona blu è il medium dove teniamo la cellula che è conduttiva. All'interno della cellula sono la resistenza e la capacità dei orto (?)

Possiamo vedere la cellula come una sfera isolata all'interno di una zona tutt'attorno conduttrice. Perciò possiamo compiere una zona senza e una zona con cellule interferendo le impedisce.

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



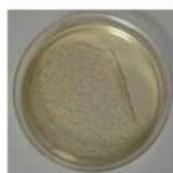
- Resistance increases
- Capacitance decreases



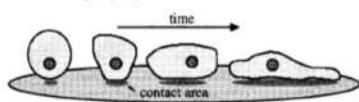
Notiamo che nella parte dell'elettrodo coperto da microdele la doppia layer capitrice diminuisce mentre la resistenza aumenta il suo veloce.
Se supponiamo di avere il NFT su tutta la base di un piatto di petri allora possiamo tracciare l'andamento della coltura delle cellule.

Different mechanism are taking place:

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



The contact area changes over time
Average population information



Cioè capire quanto si sono espresse le cellule e capire quanto se muovono.

Un altro motivo di questa tecnica è che è indipendente dal tipo di cellula, cioè non possiamo discriminare.

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

Capiamo 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. Lezione da rivedere)

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



Questa lezione sarà sui DNA microarrays.

- Gene expression
 - X is any sequence in the human genome, File is RNA taken from a cell.
 - If X is found, the cell is executing that portion of genetic code.
- Comparative research on gene functions
 - 2 populations differing from 1 characteristic (i.e. eye color) == File1 and File2
 - Any X found on File1 and not on File2 may be related to the functions
- Diagnose an infectious disease:
 - X is a sequence typical of a pathogen, 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 cellula che supponiamo faccia qualcosa la apriamo prendiamo l'RNA e confrontiamo con quello che ci aspettavamo
 Se non sappiamo nemmeno cosa faccia la cellula prendiamo 2 cellule e le confrontiamo
 Tipo con il covid, prendo una sequenza di basi unica del covid e la cerco nei campioni.
 Devo anche seguire parti che non cambiano con le varianti

La DNA Microarray funziona tramite l'ibridizzazione del DNA.

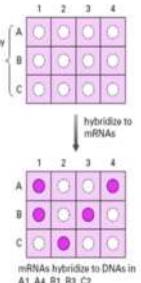
Pretendete quindi scaldano il DNA sopra i 95° questo si spegne (denaturazione del DNA). Quando la temperatura cala sotto i 75° il DNA si riunisce (ibridizzazione) soltanto con il suo complementare (Non so se è vero).

Per fare i microarray io preparo un substrato con diversi pezzi di DNA che stanno crescendo poi metto la sorgente, scaldo e poi scavo via.

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

Principle of the microarray

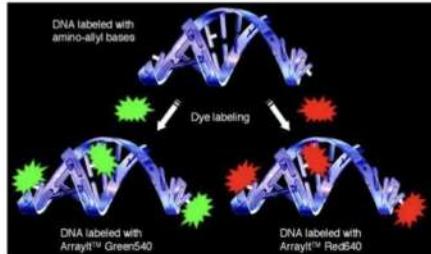
- Known DNA is attached (i.e. By spotting) on the chip surface, at known positions
- An unknown sample containing DNA is placed on the chip.
- Wait for the DNA to hybridize to its complementary and then wash.
- Acquire the map of positions where DNA sticks (i.e. optically or electrically).
- Result: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

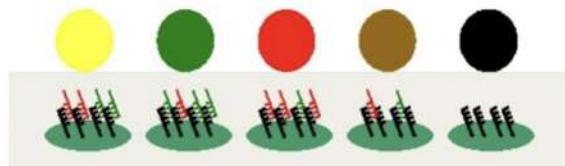
Tramite la fluorescenza si possono usare anche più colori.

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

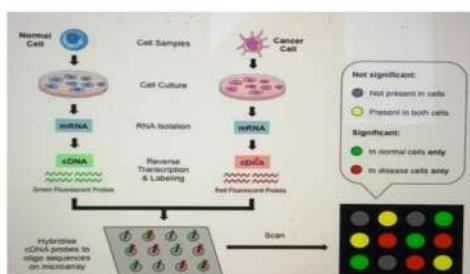


Two colors: Comparative tests

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

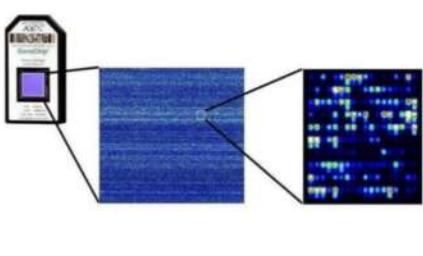


Questo tipo di analisi si può fare anche con l'RNA, anche se non c'è l'ibridizzazione del RNA. Si usa la reverse transcriptase che è un enzima, tipicamente nei virus, che trasforma una sequenza d'RNA in una d'DNA



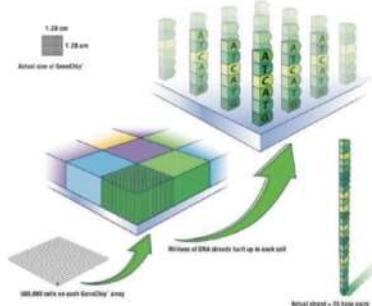
High density microarrays

- 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

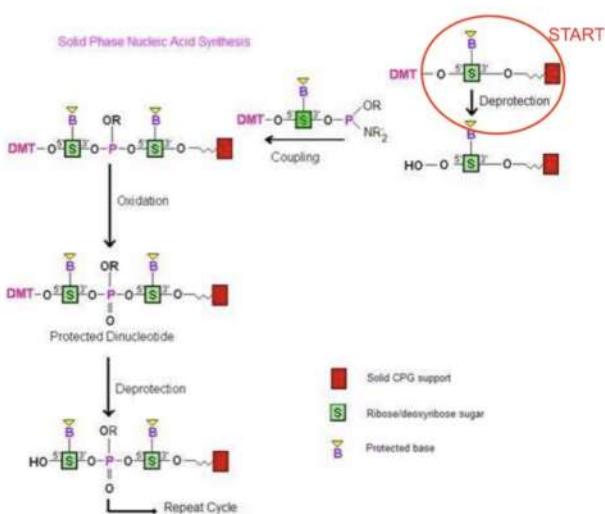
Detail of microarray



Come si può creare questo microarray e come facciamo ad avere i DNA da mettere sul microarray e come facciamo a impiantarli e tutto?

Artificial DNA synthesis

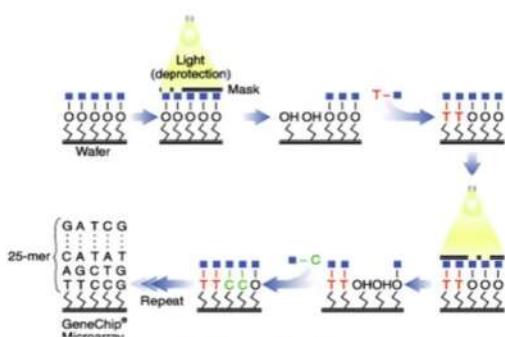
- We start with a base linked on its 3' end on a solid medium (i.e. Porous column, Bead, chip). The 5' end is protected by a 'capping' (DMT=Dimethoxytrityl), preventing the formation of other bonds.
- 1: DMT is chemically removed (i.e. with trichloroacetic acid TCA), the 5' carbon becomes reactive. The chemical agent is then washed away
- 2: A solution containing pure 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 nell'base è molto importante perché blocca la possibilità che io per sbaglio possa mettere tante basi uguali una dentro l'altra e avere una volta tipo AAAAAAABBBBBB... quando io volevo solo AB.

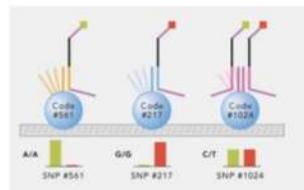
Il blocco rosso è il substrato, poi S è lo zucchero e poi abbiamo B che è una delle basi. Abbiamo poi DMT che è una molecola che impedisce alla base di reagire, perciò noi la togliamo chimicamente. Per aggiungere la seconda base mettiamo una soluzione di solo la base che vogliamo aggiungere prima. Questa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

Per distruggere il DMT posso usare onde luce UV, grazie a questo e grazie alla fotolitografia riesco 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)

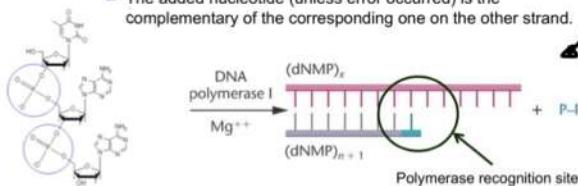
Permette di replicare in vitro copie identiche di un campione DNA iniziale.
In pratica permette di amplificare il segnale.

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

DNA polimerase



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



Come fa la polimerasi a duplicare il DNA?

Quando abbiamo questo condizone DNA, cioè quando abbiamo una distinzione su uno degli stralli, in questo caso la polimerasi conclude la catena pizzendo il coniugato della base.

In pratica facciamo un ibridizzazione per capire il DNA, quando riscalidiamo il DNA si torna ad attaccare ma non si attacca perfettamente ma belli lascia le distinzioni 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

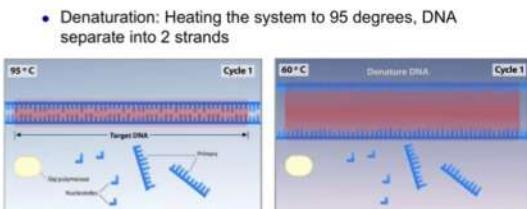
i pezzi che la polimerasi andrà ad attaccare sul DNA

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

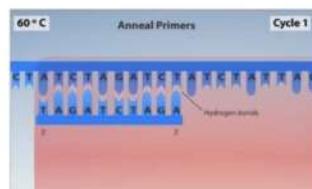
3 phases: Thermally driven:

- 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 starts working, duplicating the DNA

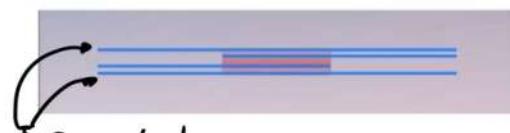
The cycle repeats several times, every cycle the amount of DNA doubles



- Denaturation: Heating the system to 95 degrees, DNA separate into 2 strands
- Annealing: Cooling the system, primers find their complementary sequence and hybridise



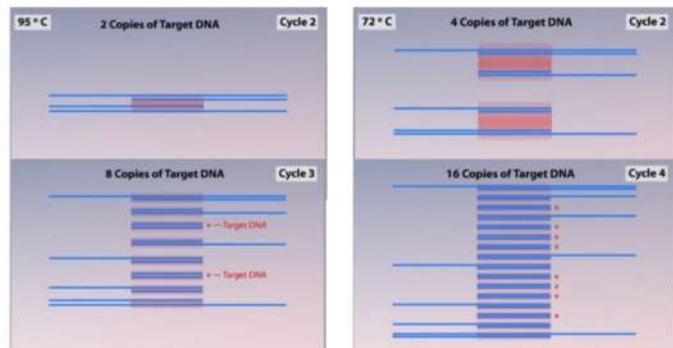
- Extension: the active phase of the reaction: starting from primers the new nucleotides are incorporated
- The temperature depends on the enzyme. Usually is about 72 degrees
- The result is a new DNA strand, starting from the primer and proceeding in 5' to 3' direction



Quando raffreddano il primer si attacca al DNA

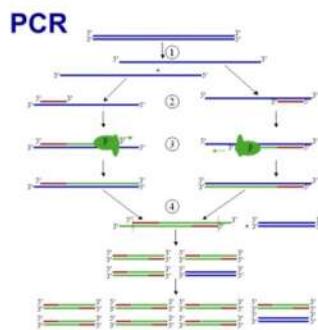
Sono le linee che sono all'inizio l'altra parte è la base + POR, il PCR funziona solo in una direzione

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



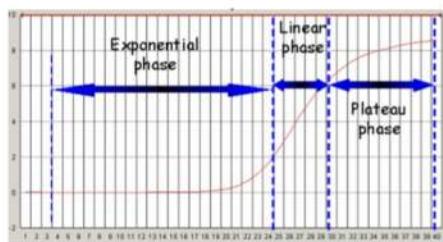
Copiamo quando le enderive sintetiche amplificano solo il segmento del Primer e non tutto il DNA.

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



Copiamo 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

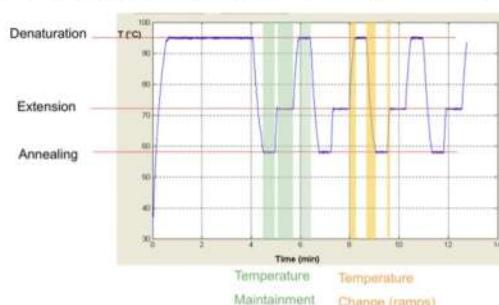
- Microarray signal is proportional to the DNA quantity
- If in the sample there is low DNA concentration, a direct hybridization may not be enough to detect the signal
- If a PCR is made before the microarray test, the potential DNA target is amplified and so become detectable.
- Quantitative information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

Amplifica i segnali solo se presenti, se poi è presente posso usare un microarray per identificare la presenza.

L'informazione sulla Quantità iniziale di DNA sono perse

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

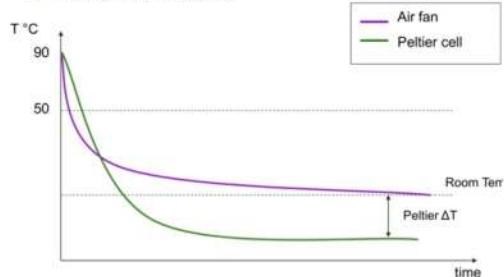
- T denaturation
 - Too high: polymerase can be damaged
 - Too low: DNA does not denature completely
- T hybridization
 - Too low: primers may bind a-specifically, amplifying unwanted DNA Wrong result
 - Too high: Primers do not bind. Low efficiency / No reaction
- T extension
 - Too high: primers may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



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

Cooling

- The fastest the better!



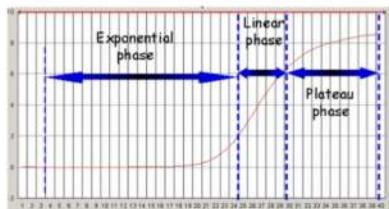
Peltier è + lenta ma va a meno gradi.

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.

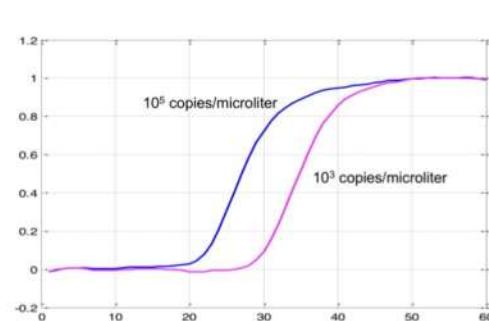
De non confondere con RT PCR che sta per reverse transcripted PCR.

In pratica con questa pendo anche la quantità.



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

DNA Concentration



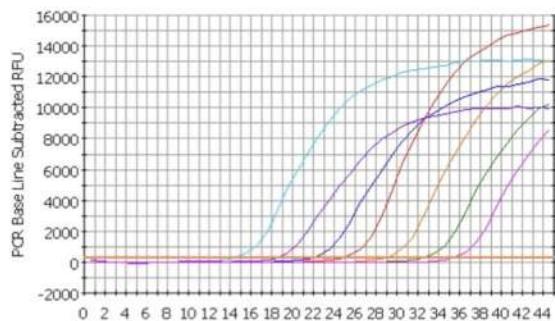
Abbiamo differenza
solo in mezzo
alla amplificazione

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

PCR efficiency

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

Esempio con 7 campioni con diversi valori di concentrazione



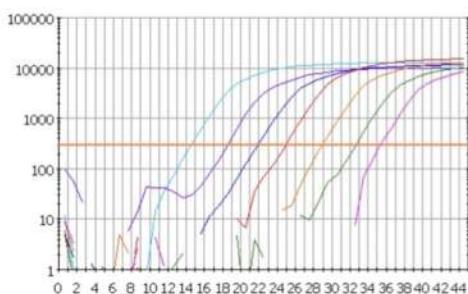
Il campione viola è diluito 1 mila di volte il primo (azzurro)

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

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

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

...In log scale

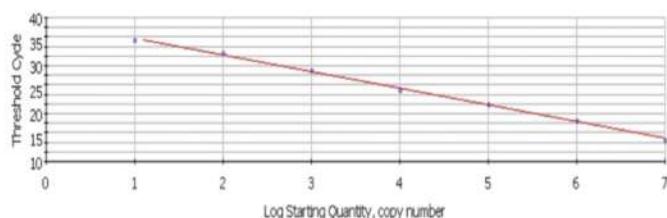


Cycle threshold

- 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



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

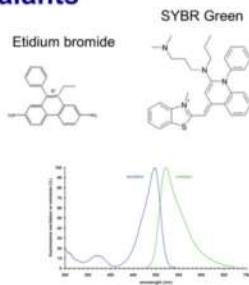
Visto che io so il valore della concentrazione di DNA in tutti e 7 gli esperimenti, visto che sono 7 punti esperimenti.

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 arrivare alla barriera si usi una tecnica ottica usando la fluorescenza. In genere questa cosa funziona comunque

DNA Intercalants

- Are molecules that fit 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 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.

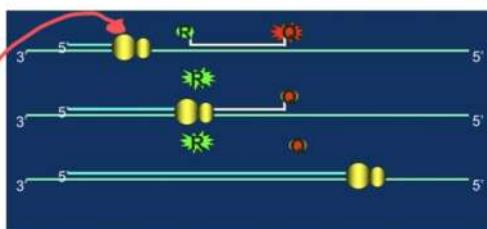


Ho una molecola verde e rossa, se queste sono abbinate vicine sotto una luce fluorescente risultano buie. Per avere una stessa distanza R e Q sono attaccate ed un pezzetto di DNA.

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

È la polimerasi quella che fa pcr manca il DNA.

Real-Time PCR: 5'>3' eso-nucleasic activity



il pezzetto di DNA che usiamo è un pezzo d' DNA complementare che vogliamo rilevare

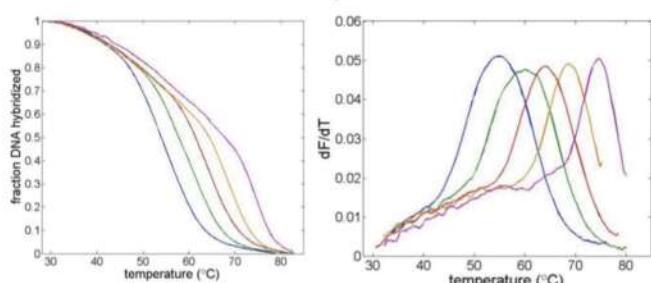
- The Polymerase enzyme during replication cuts out any existing DNA on its trail
- For any duplication event a new probe becomes fluorescent

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 discettizzare 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)

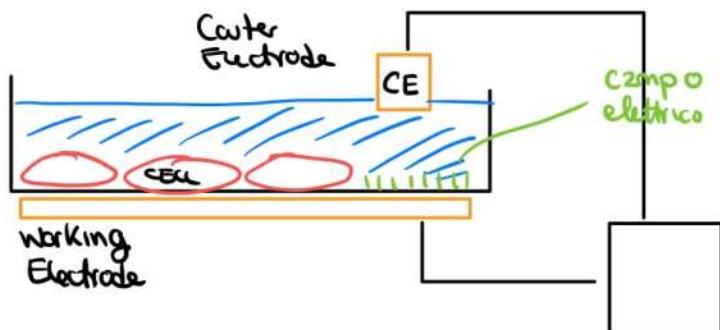
è più veloce della PCR classica
ma non possiamo fare un quantitativo
approach con questa tecnica

Inoltre sono anche più difficili da realizzare

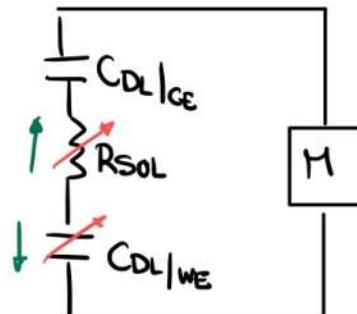
RITORNA VEDERONE CON IL CARMINATI

Contare le cellule in modo dinamico.

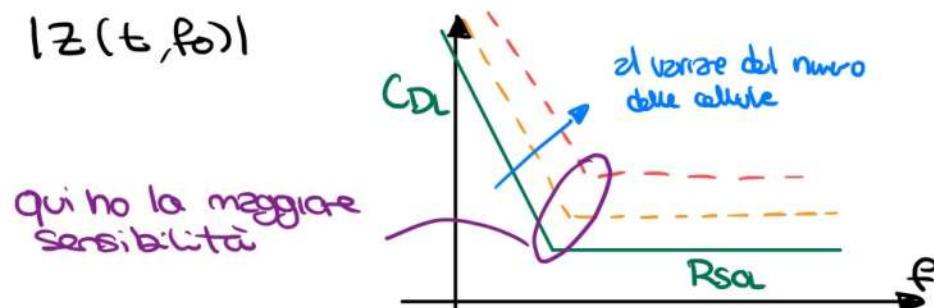
Quando abbiamo una cellula in una soluzione ionica abbiamo un elemento ad alta impedenza dentro in liquido a bassa impedenza. Avendo più spazio della crescita delle cellule in un piatto di Petri.



Circuito equivalente



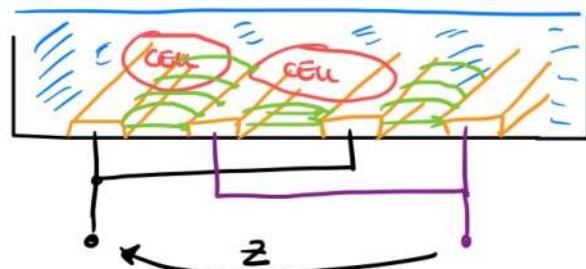
Qual'è la frequenza ottima per calcolare l'impedenza Z ? vediamo subito $|Z(t, f_0)|$



Tipicamente CDL è una linea costante perché è molto grande

Quando abbiamo molte cellule abbiamo che R aumenta mentre la CDL diminuisce il punto ottimo dove studiare l'impedenza è dove ce la corner frequenza così riesco a trarre il comportamento sia di R che di C

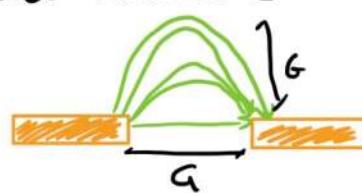
Questa era la vertical configuration, esiste anche un altro tipo di struttura. Schemi:



Combiner Configuration

Quello che cambia rispetto a prima è il campo elettromagnetico E .

Possiamo dire che se le distanze tra gli elettrodi è G allora anche 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 seconda configurazione è più precisa.

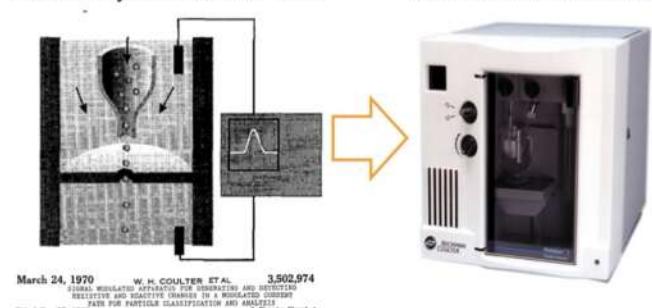
IMPEDANCE FLOW CYTOMETER

Vogliamo rilevare la presenza di cellule che viaggiano nel nostro microchannel

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

Invented by W.H. Coulter 1950

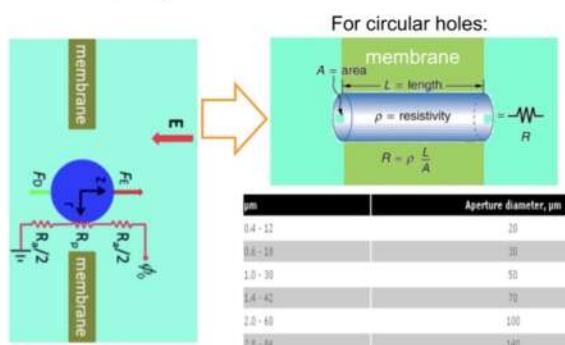
A routine lab. instrument



March 24, 1970
W. H. COULTER ET AL.
SIGNAL MODULATED APPARATUS FOR GENERATING AND DETECTING ELECTRICAL SIGNALS FOR THE DETERMINATION OF SIZE AND CONCENTRATION OF PARTICLES FOR PARTICLE CLASSIFICATION AND ANALYSIS
Patent No. 3,502,974
Filed May 22, 1968

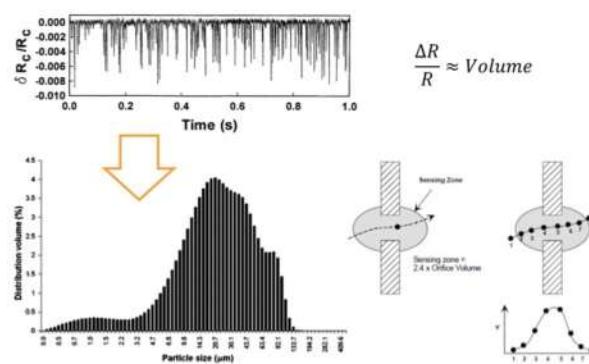
Measures DC resistive pulses for cell counting and sizing

Tipicamente la parte con il microporo è intercambiabile.



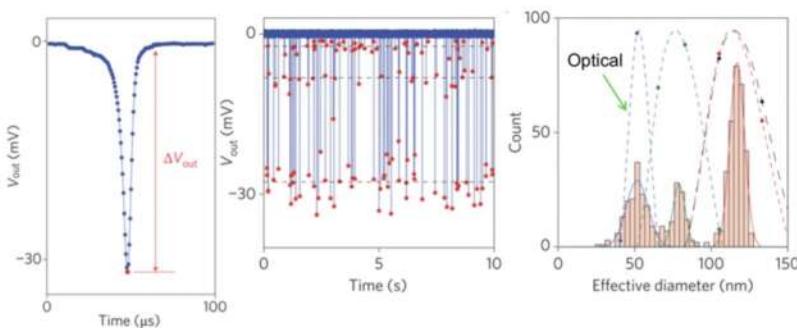
Vogliamo essere veloci a rilevare queste cellule, solo che c'è il solito trade off velocità rumore visto che per andare più veloce deve aumentare la banda del' amplificatore

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



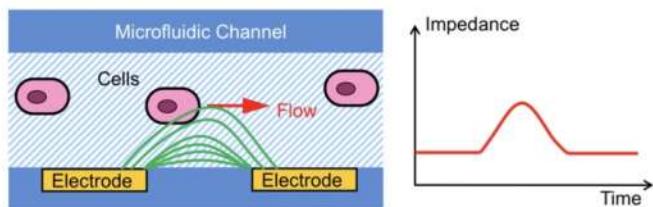
Si può anche calcolare la resistenza fluidica del microporo, considerando il buco cilindrico.

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



Quel'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 perdo molto in sensitività.

Possiamo trarre in modo di misurare le cellule senza contatto

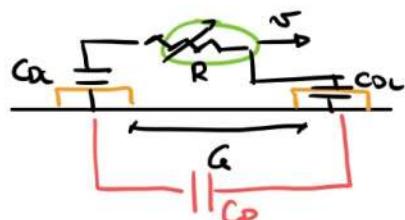


- A novel approach, pioneered by Morgan and Renaud (~2000)
- Tracking impedance between close electrodes over time
- Measurement in AC (to bypass double layer)
- High-throughput single-cell analysis (beyond sizing)

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

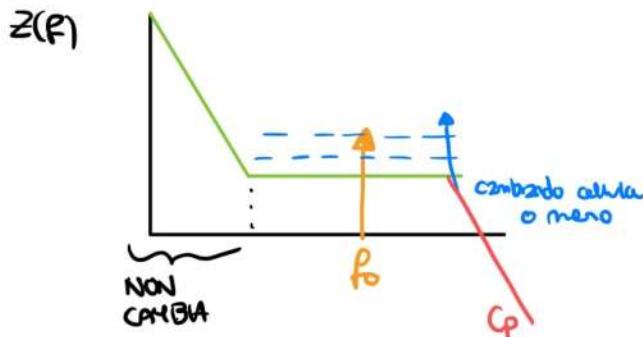
Non ho problema del clogging perché il canale microfluidico è molto largo.

• IN QUESTO CASO PERO' HO TEMPO LIMITATO PER FARLE LA MISURAZIONE



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

- NOTATE in questo caso le cellule non toccano i WE perché qui i double layer non variano quindi solo R_{sa} .

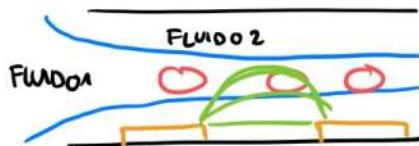


f_0 è il punto ottimo in questo caso dove fare la misurazione

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

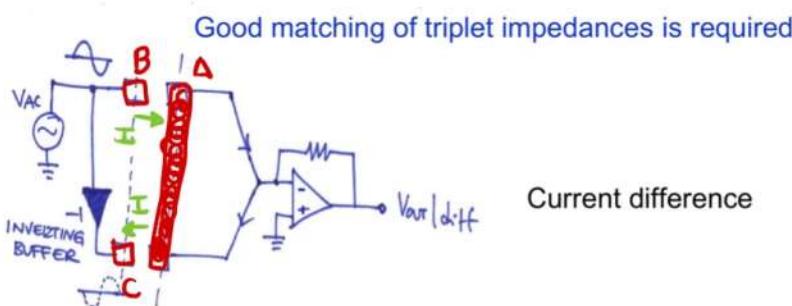
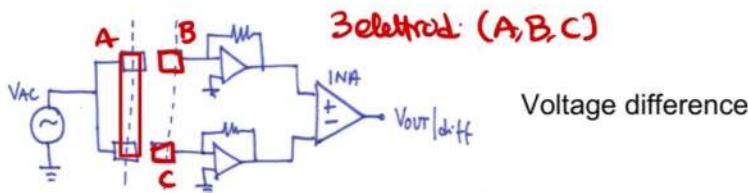
Un altro problema di questa tecnica è che l'altezza della variazione del picco di impedenza dipende dalla altezza cui passa la cellula, più la cellula è vicina agli elettrodi più il picco è alto (a parte di volume).
QUESTO È UN PROBLEMA SE VOGLIO ESTRARRE LA GRANDEZZA DELLE CELLULE.

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



Per ridurre effetti di corona mode si può usare una tecnica dell'interferenza 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

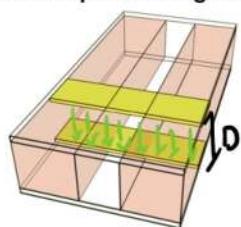


In condizioni di bolla la corrente nel transimpedenza ampi è 0 quando non ma differenza zavorra ha una corrente che entra nell'amplificatore

Quale tra i 2 è meglio? Dipende

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

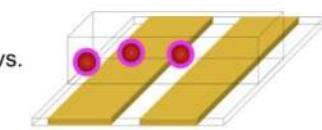
Parallel-plate facing electrodes



Pros: signal independent of vertical position

Cons: difficult fabrication and alignment, clogging

Coplanar electrodes



Pros: ease of fabrication, no clogging (if focusing)

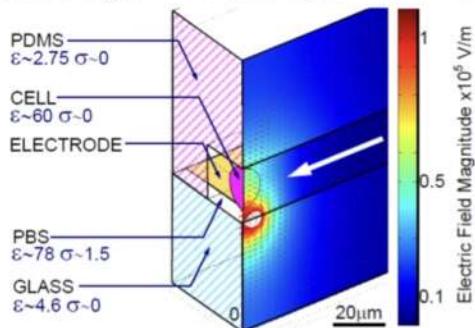
Cons: inhomogeneous field (vertical dispersion sensitivity, no simple expression)

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

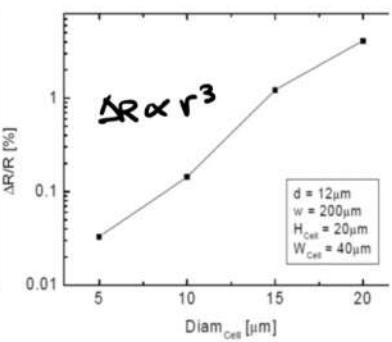
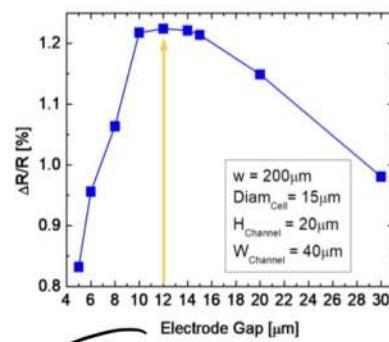
Design of a Sensitive Electrode

- Simple technology
- Ease of alignment
- Target cells 5-15 μm

- coplanar
- transverse
- 20 x 40 μm²



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

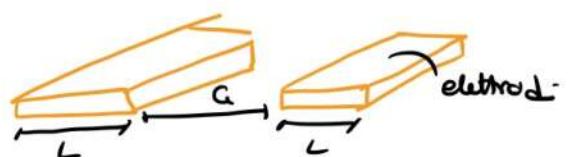
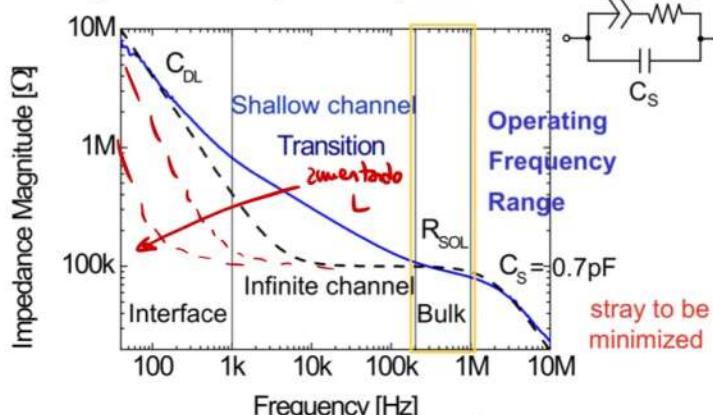


Distanza tra elettrodi:

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

Un elemento importante è dato anche dalla lunghezza (l'ampiezza) dell'elettrodo, perché la Doble Layer capacitance dell'elettrodo è dipendente dalla sua lunghezza
Se zero L zero la zona del piston

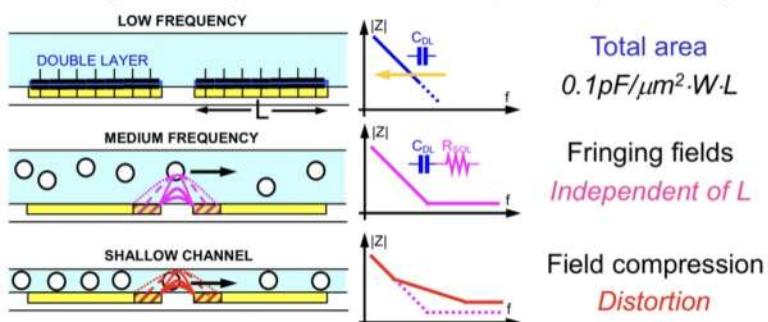
Four regions in the impedance spectrum:



la curva rossa tratteggiata è quella ideale, nella retta vedo che ho più impedenza (chea blu)

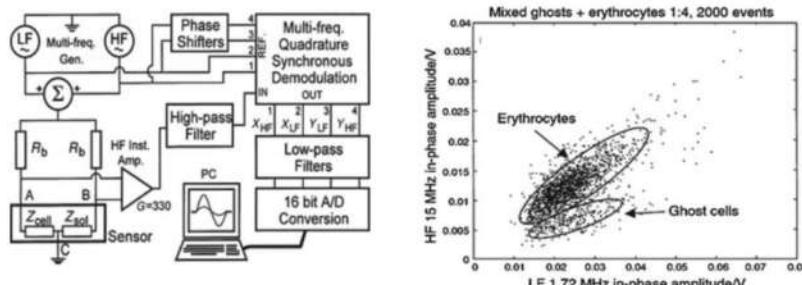
Questo effetto è dato da una distorsione del campo elettrico dovuta dal fatto che in questo caso l'acqua non è più molto sopra il campo elettrico (non ridotto il campo)

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

Label-free cell discrimination based on **intrinsic electrical properties**



Two frequencies 1.7MHz and 15MHz

S. Gawad et al., Lab Chip 1 2001

Questo fatto rende praticamente inutile fare un zero della L degli elettrodi per zentare il piston perché zero sempre il campo piccolo e ci saranno sempre questo effetto.

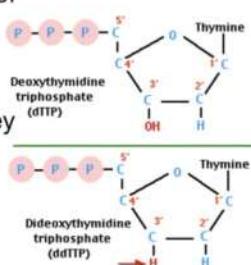
Non so cosa sta dicendo prima di: cellule morte e 2 Regenze, quella bassa per contare e quella alta per classificare i tipi di cellule
Questo poi può essere utilizzato per poter estrarre un'estrattore nel canale microfluidico e fare un sorting delle cellule

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

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

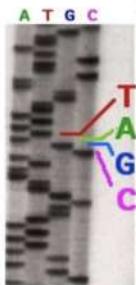
Primo generazione di sequenziamento (198x - 2004)

- 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 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

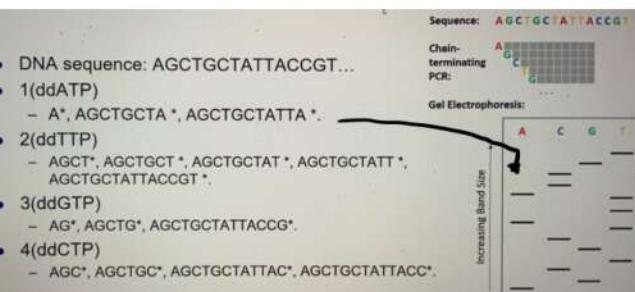


Marco Bianchetti - Corso Biochip - Politecnico di Milano AA 2008/2009

Credo che la teoria consista nel per sì che la polimerasi aggiunga basi finché non trova il complementare della stessa base.

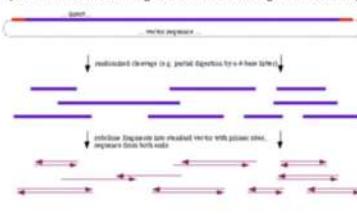
In pratica credo che in pratica per ogni base ho testi DNA di lunghezza diversa dipendente da dove c'è la base. Poi faccio un test per tutte e 4 le basi. Poi faccio un grafico in base alla lunghezza e leggendo per la lunghezza riesco a capire qual'è la sequenza.

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



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.



Marco Bianchetti - Corso Biochip - Politecnico di Milano AA 2008/2009

Sì basa sul fatto che prima di sequenziare il DNA io lo bombardo con qualcosa in modo da spezzarlo in modo casuale.

ATTENZIONE!! Io il DNA ci ho in diverse copie quindi le spacca tutte e spaccando risultante varie delle parti che si sovrappongono.

Allora io sequenzo tutti i pezzi e poi carico su io mi accorgo delle parti che si sovrappongono e allora misco le 2 parti.

ATTENZIONE! potrei non riuscire a sequenziare tutto

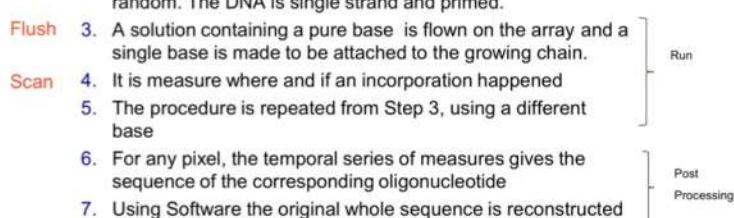
Un'altra cosa importante è la dimensione massima sequenziabile, perché se la dimensione massima è molto piccola è come se avessimo un puzzle con molti pezzi che è molto difficile da comporre. Inoltre se la dimensione sequenziabile è molto lunga (quando anche il DNA spazzato è abbastanza lungo) allora sono solo resistente alle ripetizioni infatti nel DNA posso avere parti che si ripetono ma se i miei blocchi sono abbastanza grandi nessuno sa dove comincia quella e' una ripetizione e non una continuazione.

Second Generation sequencing

Second generation

- Flush and scan:

- The 'library' is produced. It is a sample containing all the oligo subsequences generated by the shotgun specifically treated.
- 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.
- A solution containing a pure base is flown on the array and a single base is made to be attached to the growing chain.
- It is measured where and if an incorporation happened
- The procedure is repeated from Step 3, using a different base
- For any pixel, the temporal series of measures gives the sequence of the corresponding oligonucleotide
- Using Software the original whole sequence is reconstructed

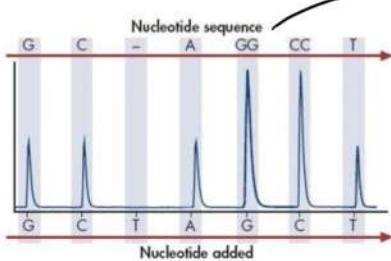


effetto tipo PCR queste basi si attaccano alle loro basi complementari. Grazie a una tecnica di ricordo vedo dove queste basi si incontrano e quindi so dove questa base è presente. Il grande vantaggio è che questo avviene in contemporanea per tutti i pezzi di DNA della "Libreria" quindi riesco a perdere 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 ha una macchina fotografica che al posto di punti ha i punti del microarray ed è sensibile ai protoni. Infatti i protoni indicano il pH della schiuma e grazie a questo riusciamo a capire come leggiamo il punto in cui nuova base sia incorporata. (Questa è la tecnica di ion torrent studi)

Pyrogram

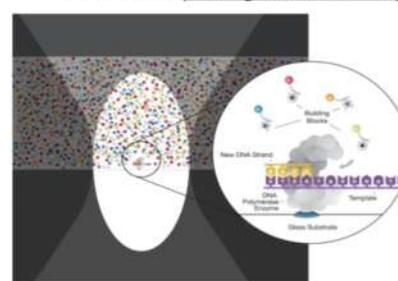
- For any single pixel is recorded a specific signal. This relates the sequence of insertion of bases to the sequence of DNA



Spike + grande xè molto probabile ci sono 2 basi che si sono incorporate.

PacBio (3rd generation)

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



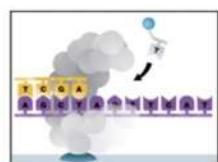
- The bases in solution are labelled with 4 different fluorophores
- Instead of being the polymerase moving on DNA is DNA moving over the fixed polymerase.

3a generazione di sequenziamento.
Non sono serpe in array ma non ve bloccato il DNA ma bensì la polimerasi

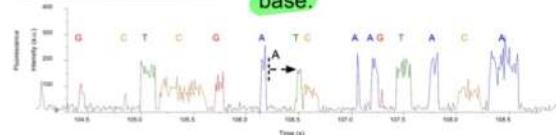
NON CI HO CAPITO NUNCA !!!

(verifica (135))

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 credo che per fare la fluorescenza non illuminiamo in un modo qualsiasi la parte solo esterna e dove è avvenuta la reazione.

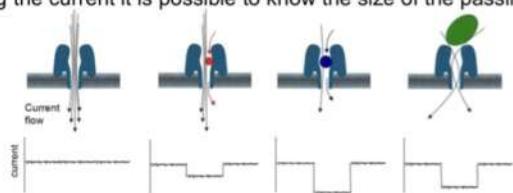
Il vantaggio è di non dobbiamo fare flow e wash perché il DNA passa da solo nella piastra.

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

4th generation : 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



In modo diverso (contro) all'altra uso gesta teica così so l'ordine della sequenza.

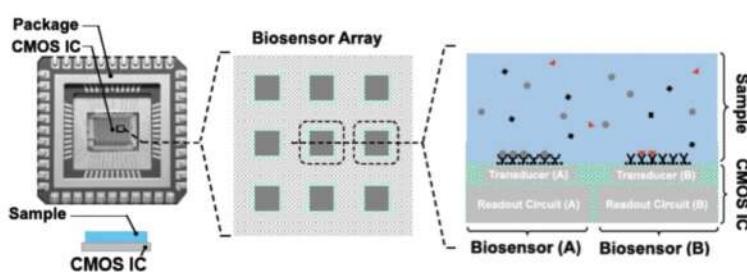
12.05.2021

Lezione

2h

CMOS Biochip

Ci si aspetta che la microelettronica sfondi nel campo medico.
Andando nel campo della microelettronica abbiamo che abbiamo una limitazione nella stessa potenza dissipata e nei valori dei componenti (R, L, C) (tipo Si non posso farlo).



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

The top passivation (Si_3N_4) is waterproof.

Ci sono dei nanopori nella membrana. Si basa sulla corrente che passa nel buco. (stessa idea vista con i carminali)

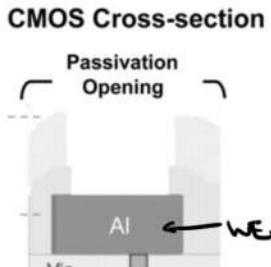
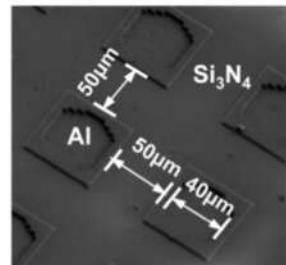
Non metto preci: 20/30% di errore rate.

Più che altro è un metodo complementare rispetto ai precedenti, infatti tipicamente viene usato complementariamente con la shotgun per "scaglier" la base che c'è sta meglio.

Con la shotgun infatti posso non vedere delle cose tipo il DNA che si è ricombinato così so l'ordine della sequenza.

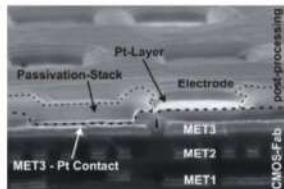
Unione tra microelettronica e microfluidica, a scissione di pezzi di metallo da spazio del substrato da formare working electrodes.

Il problema è 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 size la montagetta. Si può però fare questo ci sono 2 modi:

In the clean-room



Accurate (expensive)

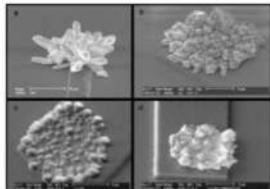
Limitation on materials

Temperature limitations:

Chip: 450°C PDMS: 343°C

SUB: 200°C Glue: 340°C

On the bench



Electroplating

High roughness

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

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

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.

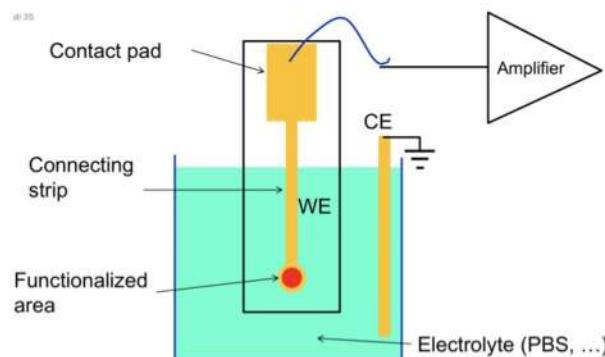
Lo svantaggio è che non sono molto usati con questa tecnica

Quell'è l'incontro di avere il silicio come substrato di supporto?

Il vantaggio è che possiamo mettere l'amplificatore subito in modo da fare poco strada e avere poco rumore.

Ci sono svantaggi ad avere il silicio come substrato però?

Sì, supponiamo di essere in una situazione del tipo



Possiamo avere 2 casi:

- Substrato isolato
- Substrato di silicio

Substrato isolato

Double layer capacitance

$$C_{dl} \approx 10 \frac{\mu F}{cm^2}$$

Electrolyte

Si₃N₄ → 200 nm

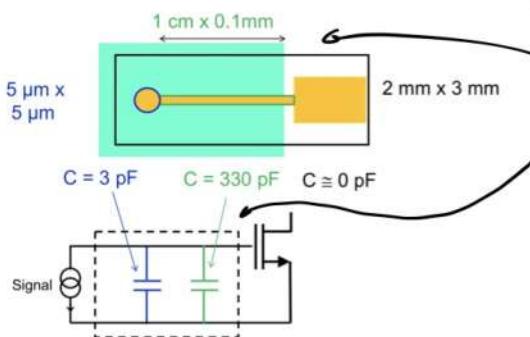
Insulating substrate

Rule 1: isolate the strip

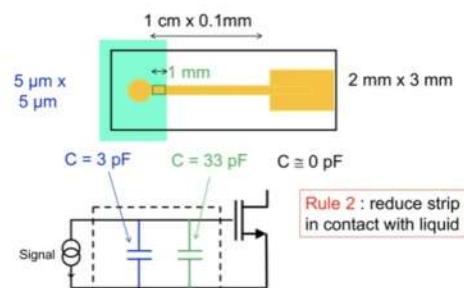
$$C_{stray} \approx 33 \frac{nF}{cm^2}$$

Avremmo comunque una capacità parassita dovuta al fatto che il metallo è isolato dal substrato da un piccolo strato di materiale isolante. Al contrario nel caso del vetro 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

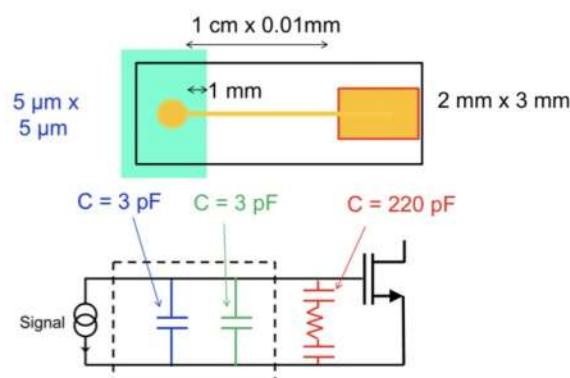
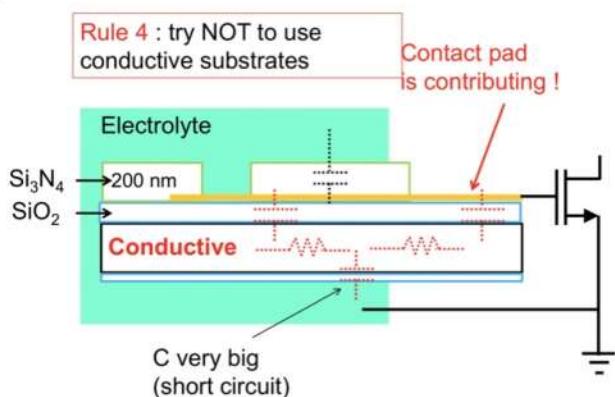


Se il posto è molto altro far molto altro solo il WS riduce questa capacità



Substrato di Silicio

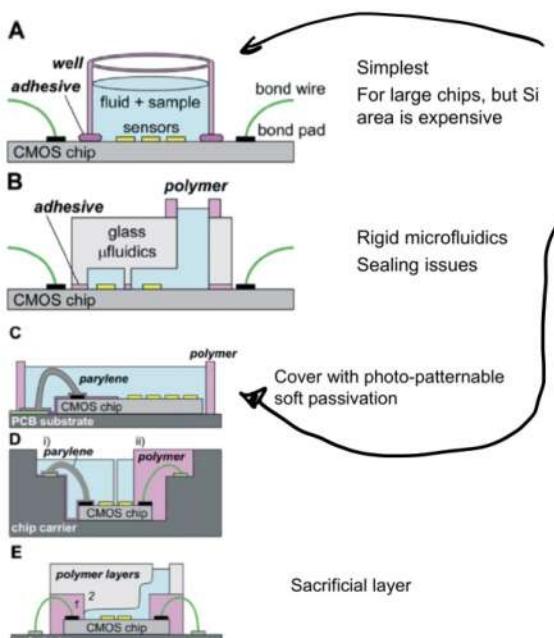
In pratica ho che il Substrato è di silicio e separa il silicio da il netto e l'isola. Il problema è che il silicio in pratica diventa conduttore.



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

Packaging

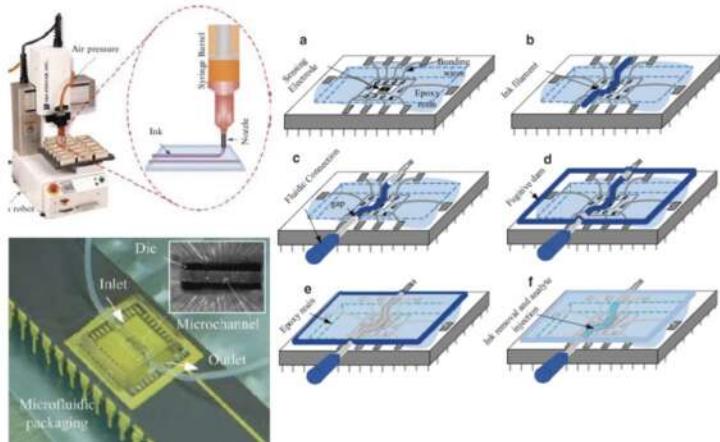
In elettronica tutti i packaging sono fatti per nascondere il chip dal mondo esterno, al contrario qui vogliamo tener delle regioni del chip aperte tali che determinati punti possano toccare l'acqua su cui vogliano fare l'analisi.



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

Copriamo tutto con un polimero e poi lo togliamo dove ci serve, ma è difficile del pto di vista del substrato e materiali (vedo intendo che è difficile pulire bene tutto)

Si può anche fare con un "filamento sacrificale"



ho il chip, ci costruisco un canale più
ci metto il perno 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

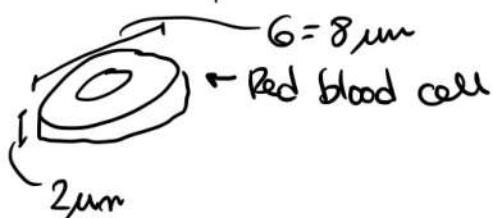
31.05.2021

Esercizi

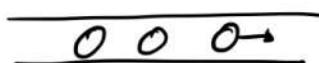
2h

Esercizio sulla parte 1

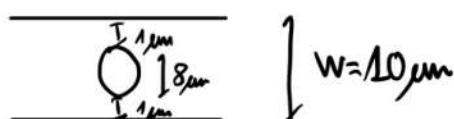
Determinare le dimensioni di un canale per elenche e trasportare Red Blood cell
con $Q = 1 \mu\text{l}/\text{min}$



Voglio realizzare un canale poco abbondanza
perché siano in linea un RBC alla volta



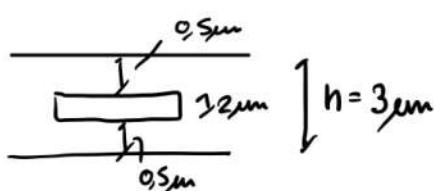
Supponiamo che nella Top view perdiamo un micro per ogni lato



Dimensioni del canale per una cella
ellenica.

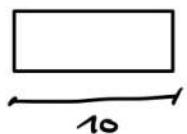
Non considerano la possibilità del
Clogging

Nella side view



Non abbiamo un numero di cellule da inserire nel canale per ricevere la lunghezza.
Però ci si suppone lunghezza 1mm.

Calcoliamo la resistenza vediamo la pressione drop se è compatibile con quello
che possiamo avere noi



13

$$\frac{W}{h} > 1/4$$

$$R = \frac{12 \cdot \eta \cdot L}{(1 - 0.63 \frac{h}{W}) h^3 \cdot W}$$

$$= 56 \cdot 10^{15} \cdot \frac{\text{Pa} \cdot \text{s}}{\text{m}^3}$$

Allora

$$\Delta P = Q \cdot R = 10^{-6} \frac{\rho}{\text{min}} \cdot \frac{10^{-3}}{60} \cdot 56 \cdot 10^{15} = 937 \text{ kPa} \approx 9,3 \text{ atm}$$

$\underbrace{\phantom{10^{-6} \cdot \frac{\rho}{\text{min}} \cdot 10^{-3}}}_{\text{m}^3/\text{s}}$

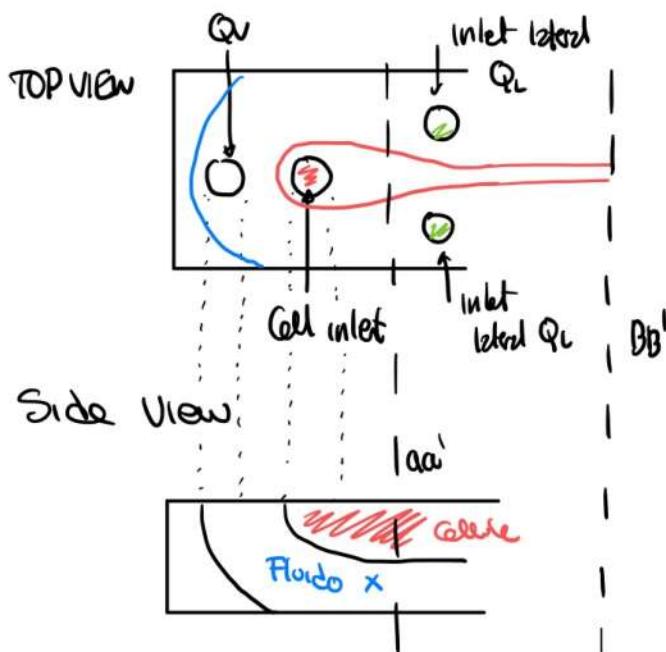
Numero decisamente troppo
grasso (per cui stringo zibbrano
al max 7 atm ma proprio un
estremo)

NON REALIZZABILE!!

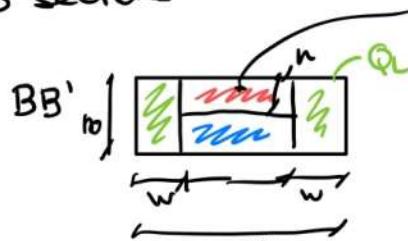
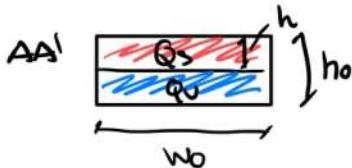
Quale soluzione possono avere per zone collegate direttamente ma pressioni minori
Usiamo l'hydrofoaming

Come fanno a dimensionare i fluidi laterali?

Decidiamo ora $h_0 = 10 \mu\text{m}$ e $W = 20 \mu\text{m}$ (ricordiamo che nella resistenza c'è
l'1/2ezza del tubo quindi se raddoppiano R si raddoppia P minima)



Allora dobbiamo 2 cross sections



Q_S quello che vedo, ho visto il
cavolo sia di letto che di
altezza

Supponiamo che questo cavolo
sia $h = 3 \mu\text{m}$ e $W = 10 \mu\text{m}$

Dobbiamo trovare Q_U e Q_L per far sì che il cavolo è delle dimensioni

Portiamo da AA'. La velocità di qualsiasi poto nella top regione = a qualsiasi poto della bottom regione

$$V = \frac{Q_S}{W \cdot h} = \frac{Q_U}{W \cdot (h_0 - h)} \rightarrow Q_U = \frac{Q_S \cdot (h_0 - h)}{h} = 2,33 \mu\text{l/min}$$

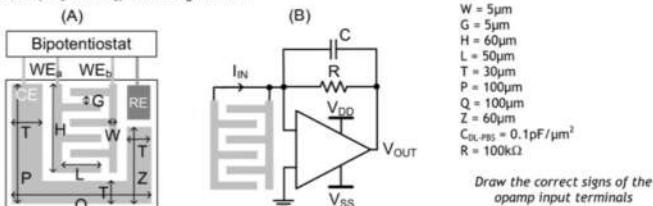
Adesso usiamo BB' per calcolare la larghezza

$$\frac{Q_S}{h \cdot W} = \frac{Q_L}{h_0 \cdot \frac{(W_0 - W)}{2}} = \frac{Q_S + Q_U}{h_0 \cdot W} \rightarrow Q_L = \frac{Q_S + Q_U (W_0 - W)}{W} = 1,66 \mu\text{l/min}$$

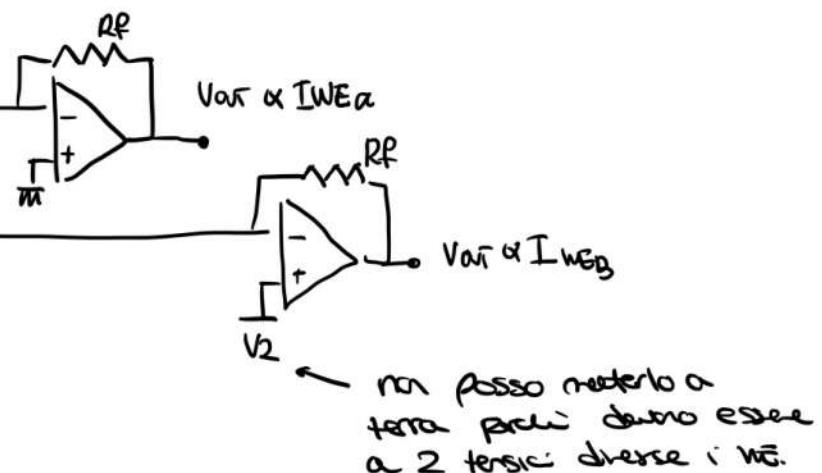
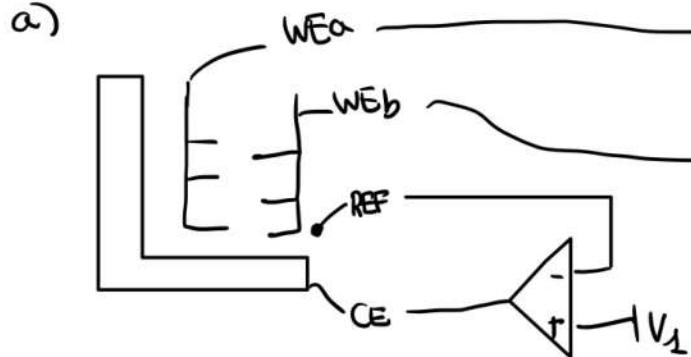
Possiamo ora a esercizio tipo 2.

Exercise 2

Consider the following set of microfabricated planar electrodes, including a pair of interdigitated working electrodes (WE_a and WE_b) with 3 fingers each:



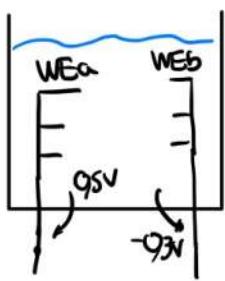
- Draw the detailed scheme of a Bipotentiostat connected to the electrodes shown in (A).
- For the Bipotentiostat of point a), set the biases in the circuit in DC in order to have the potential of WE_a = +0.5V (with respect to the solution), and the potential of WE_b = -0.3V (with respect to the solution).
- Now consider both working electrodes connected together to a single current amplifier as shown in (B):
- Determine the value of the double layer capacitance C_{DL} connected at the amplifier input when the electrodes are PBS. Is the C_{DL} of the counter electrode (CE) negligible?
- Considering an ideal opamp and only the thermal noise of the feedback resistor R, determine the value of the bandwidth BW (and consequently of C) in order to have an input current resolution of 100 pA RMS.
- Now considering the input equivalent voltage noise source of the opamp e_n = 3 nV//Hz, determine the value of the corner frequency and plot the input-referred noise spectrum.
- Considering a cyclic voltammetry measure in the macroscopic regime, if the area of the working electrodes is reduced by a factor 2, how should the scan rate be modified to measure the same input current?
- What is the spatial accuracy of the mask aligner necessary to fabricate the electrodes in (A)?
- Propose a scheme to measure the total current flowing from the COUNTER electrode (CE).



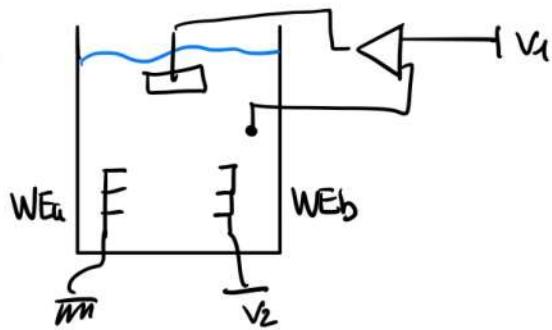
b) Scegliamo i valori di V₁ e V₂ per soddisfare i valori

WE_a = +0.5 V rispetto alla soluzione non rispetto a terra

WE_b = -0.3 V sempre rispetto alla soluzione

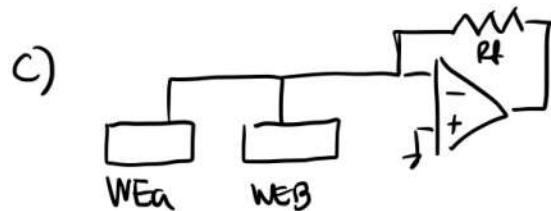


Però non abbiamo zerro



Visto che WEa è a terra dobbiamo mettere il fluido a -95V così WEa si trova a 95V sopra la tensio del liquido.

$$V_1 = -95V \quad \text{e quindi} \quad V_2 = -0,8V$$



$$C_{DL} = \text{Area} \cdot C_0$$

PBS/Gold
91 pF/ μm^2

$$\text{Area cattura elettrone} = 600\text{pF} \quad \text{Area working electrode} = 20\text{pF}$$

d) NOISE



Rumore resistenza $\frac{4kT}{R}$

$$\sigma = \sqrt{\int \frac{4kT}{R} |H^2(t)| dt}$$

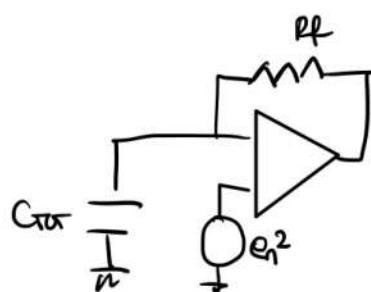
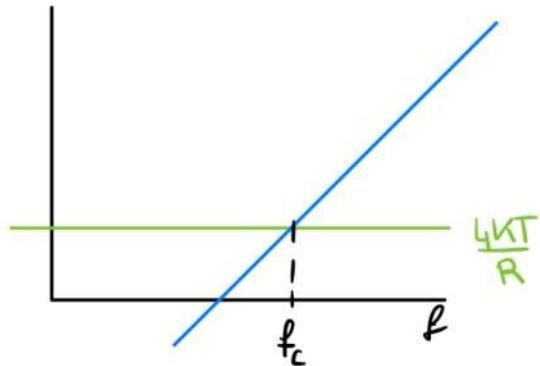
$$100\text{pA} = \sqrt{\frac{4kT}{R} \cdot BW \cdot \frac{\pi}{2}}$$

Approssimazione banda equivalente
quindi noi facciamo la moltiplicazione per $\pi/2 \cdot BW$.

$$\text{Dove } BW = \frac{1}{2\pi RC_{PR}}$$

$$BW = 25\text{kHz} \rightarrow BW = \frac{1}{2\pi RC} \rightarrow C = 64\text{pF}$$

e)



2 comparatore in +

$$\left(\frac{e_n}{R}\right)^2 \ll \frac{4kT}{R}$$

$$+ corrente \quad (en 2\pi G_{OT} f_c)^2$$

Per trovare f_C uguaglio i 2 termini

$$\frac{4kT}{R} = (2\pi f_C \cdot G_{OT} \cdot en)^2$$

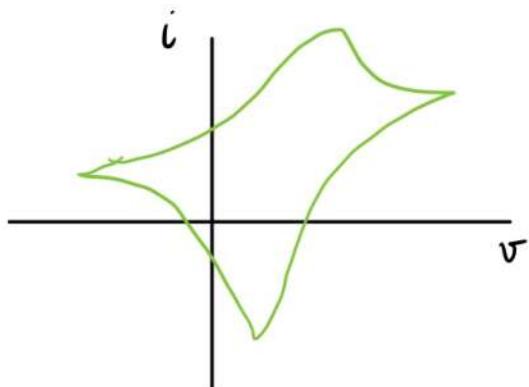
dove $G_{OT} = G_{DL} + G_P$

*altri già le G_{DL}
di 2 WS*

$$= 210\text{pF} + 64\text{pF}$$

$$\rightarrow f_C = 77\text{kHz}$$

f) Ciclovoltmetrica



Se l'Area è ridotta di un fattore 2
come cambio l'SR per avere la stessa
corrente?

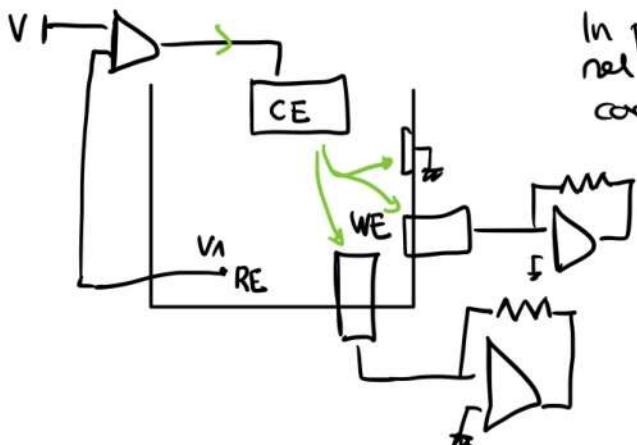
Dobbiamo ricordare la formula della corrente

$$G_{REDOX} \propto A \cdot \sqrt{SR}$$

$$SR \uparrow (4)$$

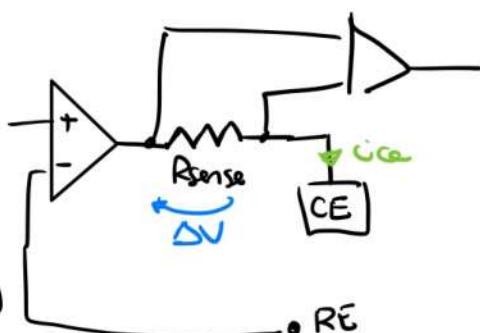
g) L'carattere per eliminare le mask dove essere elenco come il + prezzo corrente fatto.
in questo caso $G = S_{un}$

h) La corrente da scorrere nel cating non è necessariamente la stessa del couter



In prima approssimazione sono uguali ma
nel finale potremo avere delle rette che non sono
rette

Il miglior modo allora per misurare la
corrente è



Siamo dentro al loop quindi se mettiamo
una grande R questa viene "assorbita dal feedback"
perciò non cancella la corrente del loop

ALTRÒ ESAME INTERESSANTE : del 2014 quello con la ciclovoltametria

Seminario

Introduzione del DNA

è composto da le basi diverse

Ogni step tra le 2 eliche (tra le basi opposte) è .34 nanometri

Il DNA umano 3 billions di basi, ognuna può salvare 2 bit \rightarrow 6Gb di informazione del DNA umano.

La molecola del DNA non è simmetrica tra i 2 stand di DNA

Si chiamano 3' e 5' perché è l'estremità di ciascuno delle 2 catene su cui le basi si attaccano.

Ci sono 4 basi e 2 gruppi (purines e pyrimides) queste basi formano bonds di idrogeno tra di loro, ci sono eliche minori che sono + stabili di altre il legame da idrogeno è facile da rompere.

DNA Complementarity

le basi che tra di loro fanno un buon legame sono

Adenina \rightarrow Timina

Citosina \rightarrow Guanina (legame + forte di quello AT)

Il DNA si fonde con i legami ad idrogeno e possibile distingue questi legami con la temperatura e quindi dividere i 2 strand di DNA.

La temperatura di apertura dipende dalla lunghezza e della natura delle basi (C-G è + forte quindi sono + caldo)

Si può creare un zucchero nucleico in laboratorio che usi sempre le 4 basi ma usa un legame peptidico come struttura