

Programma di “**Metodi analitici avanzati, biosensori e lab-on-chip**” (6 CFU)

Corso di Laurea Magistrale in “**Scienze Chimiche**”

Curriculum **Chimica Biomolecolare**

a.a. 2019/2020

Prof. Giuseppe Spoto

Teoria (6 CFU)

Il corso discuterà i principali metodi di rivelazione di sistemi biomolecolari con particolare riferimento ai biosensori. Si farà anche riferimento ai metodi che, sfruttando dispositivi microfluidici, mirano ad integrare operazioni di trattamento dei campioni con quelle di rivelazione (lab-on-chip). Particolare attenzione si porrà nel discutere criticamente l'uso dei metodi trattati nell'ambito della diagnostica medica. Il contenuto del corso verrà integrato con cenni ai principali metodi della microscopia e della spettrometria di massa utilizzati nello studio dei sistemi biomolecolari.

Biosensori

Definizioni ed introduzione sull'evoluzione dei sensori e biosensori. Principali caratteristiche di un biosensore e suoi componenti.

Recettori:

Enzimi, Anticorpi, Acidi nucleici ed analoghi sintetici (Peptide nucleic acids, Locked nucleic acids, morpholino oligonucleotidi), recettori biomimetici (Molecularly imprinted polymers, Aptameri).

Procedure di immobilizzazione di recettori su superfici:

Considerazioni generali, immobilizzazioni orientate e casuali, adsorbimento, intrappolamento in membrane, immobilizzazione covalente, immobilizzazione tramite streptavidina (avidina, neutravidina), immobilizzazione anticorpi tramite IgG, metodi di funzionalizzazione per surface patterning. Interazioni non specifiche e loro minimizzazione.

Sistemi di trasduzione:

Trasduzione ottica: Assorbimento, nanoparticelle metalliche, localized surface plasmons (LSP). Esempi di uso nella rivelazione di acidi nucleici e proteine. Lateral flow test strip. Fibre ottiche. Luminescenza: fluorescenza (principali marcatori fluorescenti ed esempi d'uso), chemiluminescenza, bioluminescenza.

Surface plasmon resonance e principali sistemi di accoppiamento radiazione-plasmone di superficie. Studio delle interazioni recettore/analita: modelli cinetici, rigenerazione di superficie. Esempi d'uso dell' SPR. Surface plasmon resonance imaging, Plasmon-enhanced fluorescence. Metodi di amplificazione segnale SPR: metodi enzimatici, nanoparticle-enhanced SPR. collective- LSP.

Trasduzione elettrochimica: Concetti generali. Cella galvanica. Potenziale elettrodo. Equazione di Nernst. Cella elettrolitica. Potenziale di giunzione, ponte salino. Elettrodi di riferimento: standard ad idrogeno, calomelano, Ag/AgCl. Elettrodi indicatori: prima, seconda e terza specie, redox, a membrana. Elettrodi screen printed. Doppio strato elettrico. Potenziale ohmico. Polarizzazione dell'elettrodo:

concentrazione, reazione, adsorbimento, desorbimento, cristallizzazione, trasferimento di carica, trasporto di massa ed equazione di Nernst-Planck, legge di Fick. Principali metodi elettroanalitici: potenziometrici, voltammetrici/amperometrici, conduttometrici. Sensore per il glucosio: importanza e ruolo nell'ambito dei biosensori.

Trasduzione piezoelettrica: Piezoelettricità, Ceramiche piezoelettriche, quarzo. Equazione di Sauerbrey e Quartz crystal microbalance. QCM con controllo di dissipazione. Informazioni su viscosità e rigidità del layer adsorbito.

Microfluidica

Definizioni ed evoluzione della microfluidica. Effetti della miniaturizzazione su alcuni parametri fisici. Cenni a descrizione idrodinamica dei fluidi confinati in ambiente micrometrico: Equazioni di Navier-Stokes, numero di Reynolds, numero di Peclet, numero capillare. Elettroforesi ed elettroosmosi. Cenni a procedure di fabbricazione ed esempi di componenti (valvole, filtri, pompe). Microfluidica digitale ed esempi d'uso. Digital droplet PCR e digital bioassays.

Lab-on-chip

Ne verrà descritto l'uso facendo riferimento sia ad alcuni sistemi disponibili in commercio che a quanto oggi studiato in relazione ad importanti problematiche nell'ambito della diagnostica medica. In particolare si presterà attenzione a: rivelazione di microRNA, isolamento ed analisi di cellule rare (es. cellule tumorali circolanti), integrazione di metodi per il pre-trattamento di cellule, applicazioni nell'ambito della diagnostica prenatale non invasiva, rivelazione di biomarcatori, accoppiamento di sistemi microfluidici con spettrometria di massa.

Cenni verranno anche forniti sulle prospettive connesse ai wearable biosensors.

Microscopia

Microscopia ottica Caratteristiche di un microscopio ottico, Risoluzione, Apertura numerica, Criteri di Rayleigh e Sparrow, Risoluzione ed ingrandimento, Ingrandimento ed illuminazione, Profondità di campo, Microscopia confocale, Microscopia in fluorescenza, Effetto FRET. **Microscopia elettronica.** De Broglie e principio di Heisenberg, Interazione elettrone-materia. Elettroni secondari, backscattered, Elettroni secondari, backscattered ed Auger,

Microscopia elettronica a scansione, Diametro fascio elettronico e risoluzione, immagini elettroni secondari e backscattered. Sorgenti elettroniche, Microscopia elettronica in trasmissione, Formazione dell'immagine TEM. Cryo-TEM.

Microscopia a sonda. Atomic Force Microscopy, principi di funzionamento, trasduttori piezoelettrici, punte e cantilever. Atomic Force microscopy, forze coinvolte, modalità operative, studi di folding di proteine ed interazioni biomolecolari.

Spettrometria di massa

Concetti base. Sorgenti ioniche: EI, CI, FD, FAB. SIMS, LD-MS, MALDI, ESI. Analizzatori di massa: settore magnetico, quadrupolo, tempo di volo, ICR-MS, trappola ionica: equazione di Mathieu, frequenza secolare, modalità di funzionamento, intrappolamento ioni, isolamento, eccitazione risonante,

Esperimenti di SIM, MS/MS, tecniche ifenate. Sorgente MALDI, principi e modalità di formazione degli ioni.

Analisi di sistemi proteici: determinazione massa molecolare, peptide mass mapping, algoritmi per protein mass mapping.

Supporti allo studio.

-Appunti di lezione

-Skoog, Leary, "Chimica Analitica Strumentale", Edises. -Dispense o altro materiale fornito dal docente