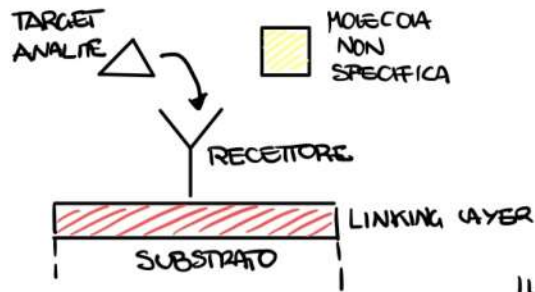


Biochip

BIOSENSORS

- UN SENSORE CHIMICO BASATO SU UN'ENTITA' BIOLOGICA (DEFINIZIONE FORTE)
- UN SENSORE CHE MONITORA LO STATO DI SISTEMI BIOLOGICI (DEFINIZIONE DEBOLE) [DEFINIZIONE CHE GU PACE]

TIPICAMENTE ABBIAMO 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 E' CHIAMATA ANALITE E PER TROVARLA TIPICAMENTE USIAMO UN'ALTRA MOLECOLA COMPLEMENTARE CHIAMATA BIO RECEPTORE, QUANDO LA MOLECOLA E IL BIORECEPTOR SI COMBINANO C'E' UNA RIDUZIONE DI ENERGIA EUSTROSTATICA DEL SISTEMA E LANDRANDO SUL SEGNALE POSSO ARRIVARE A INTERCETARE LA PRESENZA DELLA MOLECOLA.



CI SONO 3 TIPI DI MECCANISMI DI AFFINITA' MOLECOLARE

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

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

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

ANTIBODY

GLI ANTIGENI SI COMBINANO ALL' ANTIBODY ALLE 2 ESTREMITA'

ENZIMI

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

DNA → E' LA REPOSITORY DELLE INFORMAZIONI GENETICHE

LA DIMENSIONE PIU' IMPORTANTE DEL DNA E' IL DIAMETRO TRA LE 2 SPIRE TIPICAMENTE 2,5nm. LA LUNGHEZZA INVECE PUO' ESSERE LUNGA CM. LA DISTANZA TRA LE BASI E TIPICAMENTE DI 0,33nm.

TUTTE QUESTE RILEVAZIONI AVVENGONO NELL'INTERFACCIA

VOGLIAMO INOLTRE FARE QUESTI RECEPTOR ECONOMICI E PICCOLI.



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

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

24.02.2021

2h LEZIONE

• MOVING FLUIDS

(COME MOVERE I FLUIDI NEI MICROCANALI)

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

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

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

- **FLUIDI SEMPLICI** FLUIDO NEWTONIANO O NON

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

CARATTERISTICHE

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

- **VISCOSITA'** → Importante xè 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

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

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

La viscosita' e' molto dipendente dalla temperatura (questi esponenziale)

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

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

FLUSSO TURBOLENTO → Turbolenza nel fluido

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

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

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

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

$Re > 3000$ → Flusso Turbolento

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

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

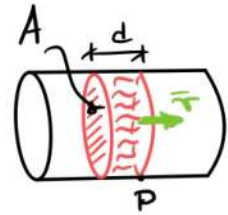
$$r_{eq} = \frac{2 \text{Area}}{\text{Perimeter}}$$

-PORTATA VOLUMETRICA

Si calcola come

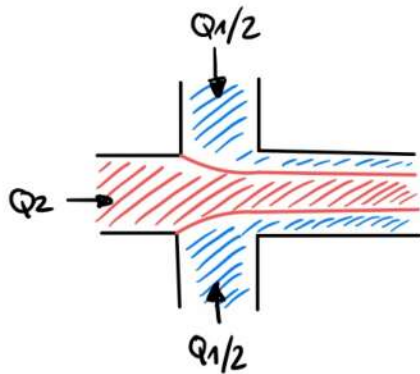
$$Q = \frac{V}{t} = \frac{A \cdot d}{t} = A \bar{v}$$

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



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

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



FLUIDO 2 (blue)
 FLUIDO 1 (red)

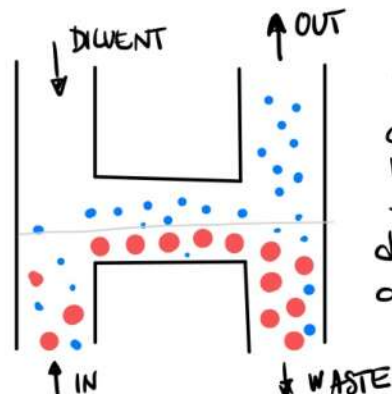
CLOGGING → ACCADE SE USIAMO I MICROCANALI SENZA FOCUSING IDRODINAMICO.

USARE IL FLUIDO COINFANATO EVITA IL CLOGGING CIOÈ IL FATTO CHE IL CANALE SI INTASCA A CAUSA DELLE PARTICELLE. QUESTO FUNZIONA PERCHÉ NON HO DEI MURI "RIGIDI" ATTORNO AL FLUIDO 1.

ES2) FILTRO AD H

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

NON MOLTO USATO

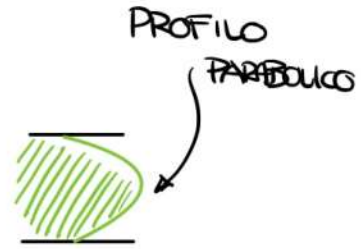


Si basa sulla d : di flusso, infatti le molecole piccole tendono a d : fluire di più, non è efficace al 100%

BOUNDARY CONDITIONS

Supponiamo 2 tipi di interazione

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



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

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

RESISTENZA AL FLUSSO

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

POISSUE LAW → $Q = \frac{\Delta P}{R}$ ← $\Delta P =$ differenza di pressione
MOLTO SIMILE ALLA LEGGE DI OHM

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

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

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

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

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

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

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

CAPACITÀ IDRODINAMICA

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

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

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

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

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

- **Fluido comprimibile**: ES Arie ed acqua (ARIA SI COMPRIME)

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

1.03.2021

Zh DI LEZIONE

DOUBLE LAYER

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

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

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

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

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

TENSIONE SUPERFICIALE

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

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

γ = COEFFICIENTE DI TENSIONE SUPERFICIALE

WETTABILITY

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

HYDROPHILIC → il liquido tende ad aderire al solido

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

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

ELECTROWETTING

POSSIAMO CAMBIARE LA WETTABILITY DI UN MATERIALE ANCHE CON UN CAMPO ELETTRICO.

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

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

MOVING PARTICLES

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

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

- DIFFUSIONE

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

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

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

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

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

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

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

MINIATURIZZAZIONE AIUTA NELLA DIFFUSIONE

SINGLE MOLECULE DETECTION

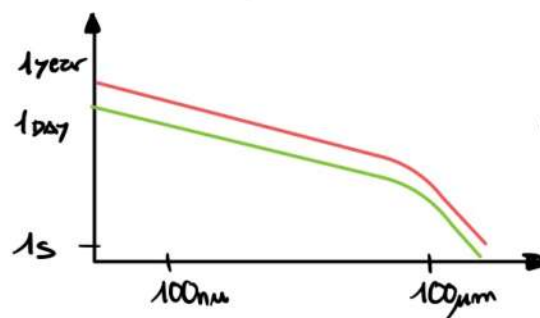
Se io ho un solo molecola nel liquido posso aspettarmi che casualmente per diffusione la molecola arrivi sul mio sensore?

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

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

ESEMPIO DI GRAFICO

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



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

NUMERO DI PECLÉT

DIMENSIONLESS RATIO TRA ADVECTION E DIFFUSION.

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

v = VELOCITÀ FLUIDO [m/s]

L = LENGTH SCALE [m]

D = COEFFICIENTE DI DIFFUSIONE

DRAG FORCE

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

Per una molecola sferica e⁻

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

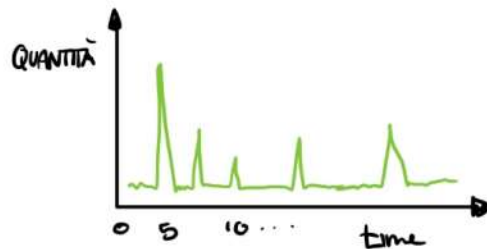
ELETTROKINETICA

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

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

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

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



TIPICAMENTE SI RILEVANO TUTTE LE PARTICELLE CON UN GEL

DIELETTROFORESI

è se avessimo una molecola neutra?

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

Vediamo la molecola come un dipolo

PERMEABILITÀ DI UN MATERIALE

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

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

FORZA DIELETTROFORETICA

Questa forza è proporzionale al gradiente del campo

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

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

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

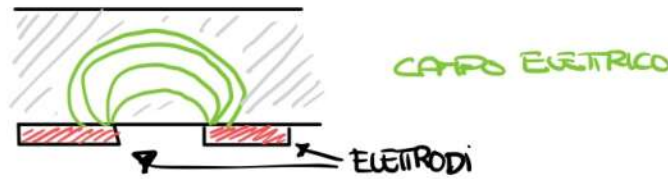
K_{CM} : **CLAUSIUS: MOSSOTTI FACTOR** (QUANDO È POSITIVO ABBIAMO POSITIVE ELECTROPHORESIS, SE È NEGATIVO IL CONTRARIO) QUESTO VALORE DIPENDE DALLA FREQUENZA

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

AD ESEMPIO SE VOGLIAMO DIVIDERE I GLOBULI ROSSI DA QUELLI BIANCHI VADO A VEDERE IL VALORE DI MOSSOTTI CHE MI ATTRA 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 realtà gli elettrodi sono sul fondo del microcanale messi in modo complementare



03.03.2021

2h DI LEZIONE

DIGITAL MICROFLUIDICS

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

Sono possibili 2 architetture

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

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

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

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

Nell'electrowetting il dielettrico spezzatore è essenziale.

Ma come muoviamo le gocce? È fatto con un proprio layout del sistema e elettrodi:

Infatti per avere forza laterale dobbiamo fare sì che i 2 pads vedano leggermente a sovrapporsi. Per farla muovere mettiamo 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 elettrodi/pad come dei sensori. Infatti questi sono come dei condensatori, infatti basta misurare l'impedenza e ricavare l' ϵ per capire se c'è il fluido o l'acqua.

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

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

Microfluidics Components

I design microfluidici sono praticamente tutti custom

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

Inoltre l'altezza dei canali è tipicamente fissa e giochiamo solo con le differenze ecc.

Vedere le slide per sapere i tipi di fabbricazione

VALVOLE MONODIREZIONALI PASSIVE

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

Parla anche della valvola di Tesla.

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

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

Vedere slide per diversi tipi di attuatori

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

MIXER (ESISTONO SIA PASSIVI CHE ATTIVI)

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

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

LA POMPA

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

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

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

08-03-2021

2h di lezione

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

In pratica comprimo l'aria della siringa con un fluido ed in pratica ho il condensatore.

INTERCONNESSIONI

Essenziali per connettere il sistema microfluidico con il mondo esterno.

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

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

Anche questa pompa ha un tipo di flusso non costante.

PIEZOELETTRICITÀ

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

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

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

PERISTALTIC MICROPUMP Un modo di spostare nel chip la pompa.

TUBING CONNECTION

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

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

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

MICROFABBRICAZIONE

Ci troviamo sul bordo dello standard tra microtecnologia e standard fabbricazione delle plastiche, queste non è un vantaggio.

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

CLEAN ROOM

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

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

- Bulk → eliminiamo il materiale dal substrato

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

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

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

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

2) SPUTTERING: Si usano ioni di gas per staccare atomi dal 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 ossigeno.
A differenza degli altri qui il sistema non è così veloce ma gli atomi di silicio aggiunti possono essere adunati

4) DEPOSIZIONE LIQUIDA: Usato per i photoresist (non per i metalli) per fare questa tecnica ci serve uno stencil con la geometria 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 avere dei pattern di metallo sul substrato

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

SOFT PROCESSING

In questo caso processiamo plastiche o materiali comunque morbidi.

PLASTIC FABRICATION → vedere slide

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



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

Il problema del PDMS è dovuto alla scarsa possibilità di scelerlo a livello industriale, infatti PDMS è tipicamente usato solo in laboratori per lavori DV a basso volume.

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

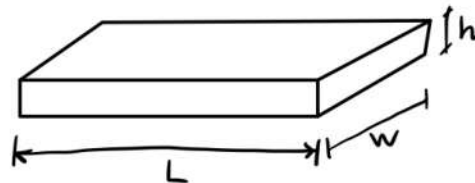
10-03-2021

ESERCITAZIONE

2h DI LEZIONE

(DOVREBBE CARICARE IL FILE)

1) Micro canale rettangolare



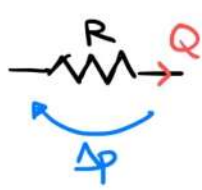
$$W = 100 \mu\text{m}$$
$$h = 10 \mu\text{m}$$

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

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

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

FACCIAMO IL MODELLO ELETTRICO EQUIVALENTE



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

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

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

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

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

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

e quindi $\Delta P = R \cdot Q = 10^{-9} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} \cdot 128 \cdot 10^{12} \cdot \frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$

$= 128 \cdot 10^3 \text{ Pa}$

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

$= 1,2 \text{ atm}$

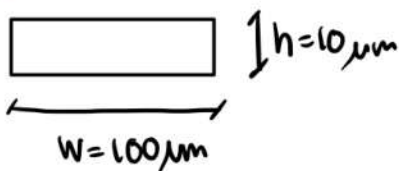
PUNTO b)

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

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

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

ES 2)



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

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

SE USIAMO QUESTE FORMULE OTTIENIAMO

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

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

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

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

■ COSA CAMBIEREBBE SE IL CANALE FOSSE COSÌ

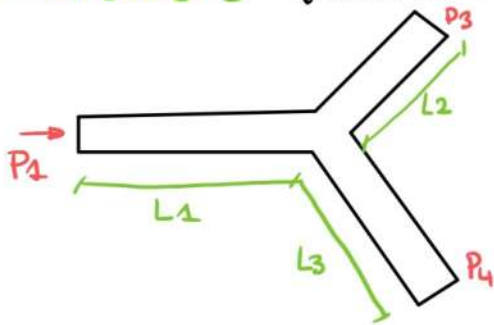


$$B = 10 \cdot A$$

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

Anche perché la formula deve venire uguale

ESERCIZIO 3 (BIFORCAZIONE)



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

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

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

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

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

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

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

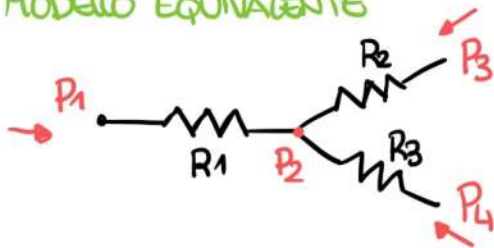
Non imponiamo queste pressioni in tutti e 3 i tubi

Supponiamo sezione circolare con un raggio pari a

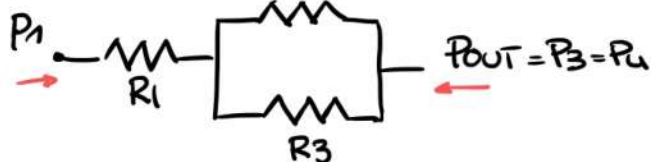
$$r = 20 \mu\text{m}$$

OBIETTIVO → FLOW RATE NEI 3 rami: Q_1, Q_2, Q_3

1) MODELLO EQUIVALENTE



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



RICAVIAMO LE RESISTENZE

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

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

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

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



Otteniamo quindi:

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

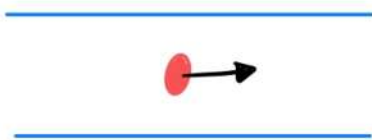
$$P_2 = P_1 - Q_1 \cdot R_1 = 110 \text{ kPa} - 54 \cdot 10^{-12} \cdot 79,5 \cdot 10^{12} = 105,7 \text{ } \mu\text{Pa}$$

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

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

ESERCIZIO 4)

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

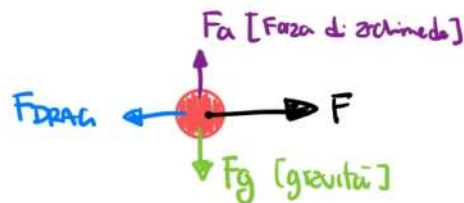


$$r = 5 \mu\text{m}$$

BEAD (la particella) $\begin{cases} \rightarrow \text{POLYSTIRENE} \\ \rightarrow \text{FERRO} \end{cases}$

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

Quali sono le forze sulla particella?



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

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

In verticale abbiamo

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

La forza di Archimede è

$$F_{\text{arc}} = \frac{4}{3} \pi r^3 \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot g$$

La risultante forza verticale è

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

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

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

Calcoliamo la forza verticale nel caso la particella fosse ferro.

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

ESERCIZIO 5

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



Sappiamo che la particella cade

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

Quindi

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

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

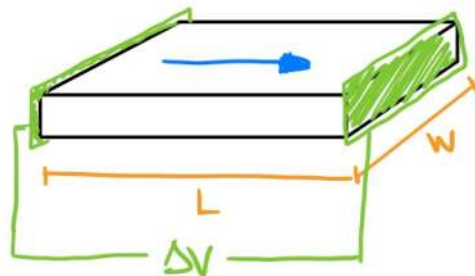
Da cui otteniamo che la velocità terminale è $374 \mu\text{m/s}$ (è molto veloce!!!)

questa particella in un canale alto $30 \mu\text{m}$ ci mette circa 0,1 s ad arrivare sul fondo

ESERCIZIO 6

ELETTROSMOSI

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



Sappiamo che

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

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

sappiamo poi che $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 80 \cdot \epsilon_0$

$$\eta_{E0} = \frac{\epsilon_{H2O} \cdot \epsilon \cdot E}{\eta}$$

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

viscosità

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

Possiamo quindi calcolare ΔV come

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

Capiamo che è molto difficile muovere il fluido con questa tecnica

15.03.2021

2h

DNA E RNA SENSING

NAT (Nucleic Acid Tests)

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

ESERCIZI

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

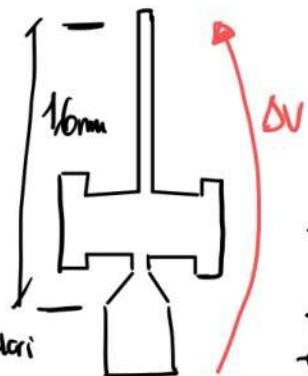
- VELOCITÀ DELLA MOLECOLA DI DNA QUANDO UNA $\Delta V = 15 \text{ V}$ È APPLICATA
- QUANT'È LA CARICA DEL DNA?
- FRAME RATE DELLA CCD CAMERA?

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

Sappiamo che 1000 V (625 KV/m)

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

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



È UNA STRUTTURA DI QUESTO TIPO

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

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

E poi 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 Kbases strand, allora

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

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

c) Quanto frequentemente deve la camera fare foto?

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

$$t_{\text{TRAVEL}} = \frac{L}{v} = \frac{1,6 \text{ mm}}{0,15 \text{ m/s}}$$

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

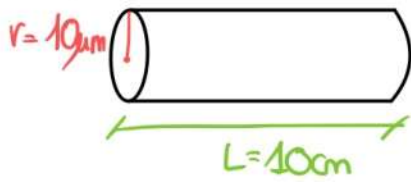
$$= \frac{10 \cdot 0,15}{1,6} \approx 1 \text{ Hz}$$

$$= 1 \text{ fps}$$

numero random

ESERCIZI SUI CONDENSATORI FLUIDICI

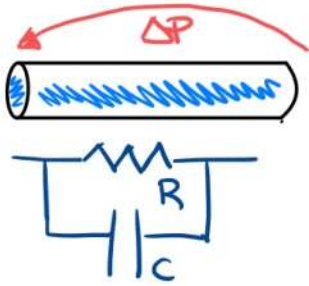
Consideriamo la compressibilità dell'acqua, trovare la costante di tempo idraulica associata a questo microcannello



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

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

Questa compressibilità viene definita come $\beta = -\frac{1}{V_{\text{volume}}} \cdot \frac{\partial V_{\text{volume}}}{\partial \text{pressione}}$



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

$$\tau = R \cdot C$$

$$C = \frac{\Delta V_{\text{volume}}}{\Delta \text{pressione}} = \beta \cdot V_{\text{volume}}$$

Perciò

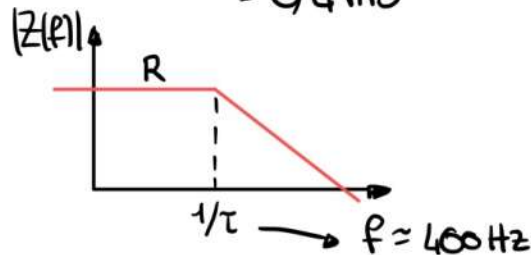
$$\tau = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi r^4} \cdot \beta \cdot \pi r^4 \cdot L \rightarrow \text{semplifichiamo} \rightarrow = \frac{8 \cdot \eta \cdot L^2}{r^2} \cdot \beta$$

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

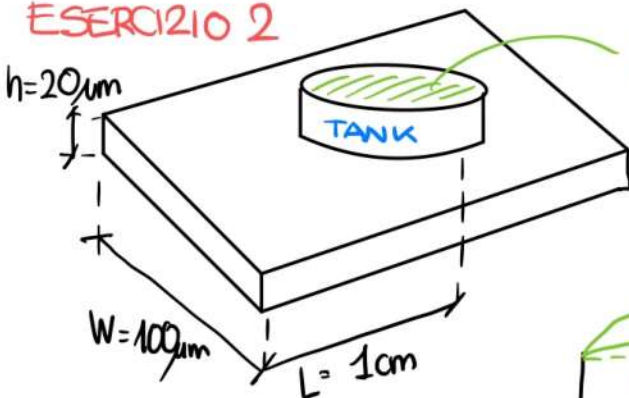
Qui dobbiamo usare 1 Pa così si semplifica

$$= \frac{8 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot (10^{-1})^2}{(10 \cdot 10^{-6})^2} \cdot \frac{5 \cdot 10^{-10}}{\text{Pa}} = 0.4 \text{ ms}$$

Se vogliamo plotare il bode otteniamo

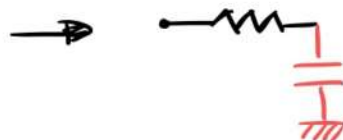


ESERCIZIO 2



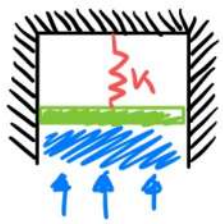
MEMBRANA ELASTICA DI DIAMETRO 100 μm

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



$$\tau = R \cdot C$$

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



Hooke's LAW:

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

NOI SAPPIAMO CHE

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

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

$$= \frac{AREA^2}{k}$$

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

Sappiamo che abbiamo un periodo

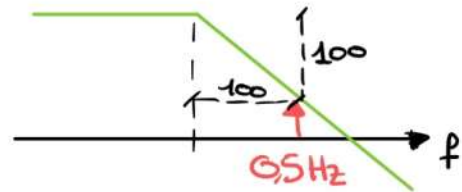
$$T = 2s \rightarrow f_{ruse} = 1/T = 0,5 Hz$$

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

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

Perciò $C = \tau/R = 185,3 \cdot 10^{-5} [Pa \cdot s]$

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



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

17.03.2021

2h

OPTICAL DETECTION

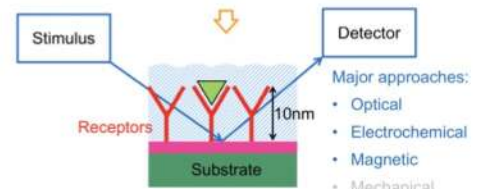
Vogliamo rilevare quando avviene un evento di binding

Tutto avviene all'interfaccia!!

Questo tipo di detection è quella più usata in biologia

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

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



FLUORESCENZA

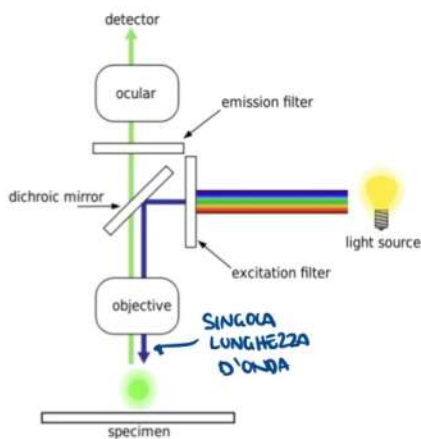
Se vediamo i livelli energetici della molecola, vediamo che se eccitiamo la molecola questa va in uno stato con energia superiore e poi tende a tornare allo stato energetico base rilasciando energia. Uno di questi modi è la fluorescenza, la quale consiste nel rilasciare un fotone a bassa energia dato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

Se studiamo la lunghezza d'onda notiamo che questa molecola ha 2 picchi di absorption, ognuno dei quali è relativo al 1° o al secondo livello energetico.

La distanza tra le lunghezze d'onda di emissione e assorbimento è detta Stokes shift.

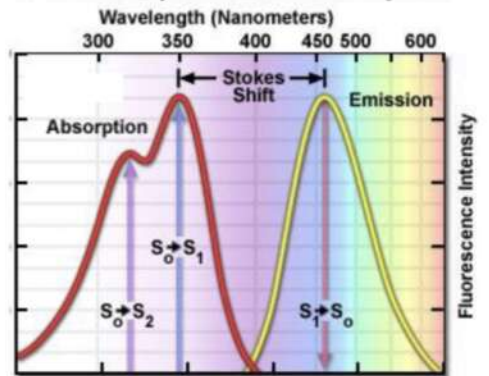
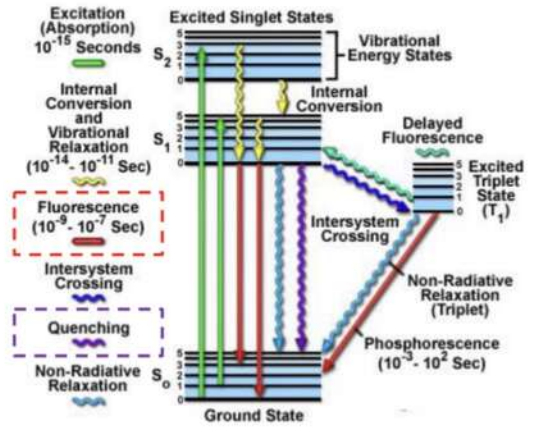
Più volte faccio l'intero ciclo di fluorescenza meno potente sarà la radiazione fluorescente. (Ho quindi un tempo limitato per studiare tutto con la fluorescenza)

Possiamo vedere la fluorescenza anche al microscopio



Eccitiamo il campione solo con un'unica lunghezza d'onda. Il campione 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 che se abbiamo la fluorescenza sappiamo che abbiamo il campione cercato.



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

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

IMMUNOSTAINING (prospettiva storica)

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

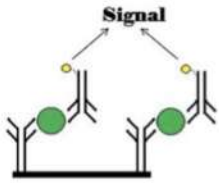
ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

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

Vantaggio è che è molto facile da capire.

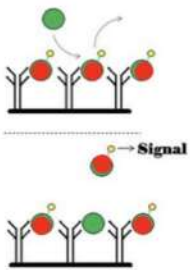
TIPI DI ASSAYS

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



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

2) COMPETITIVE : Si parte da due recettori, in cui la molecola rossa è simile al target e inoltre la molecola rossa è già pre-ricca sul recettore molto è fluorescente. Se arriva la proteina zinne no switch tra la molecola rossa e la nostra proteina. Questo avviene perché c'è più affinità con la vera proteina. Perciò se non abbiamo la proteina abbiamo tutto luminoso, se invece c'è la proteina abbiamo il buio

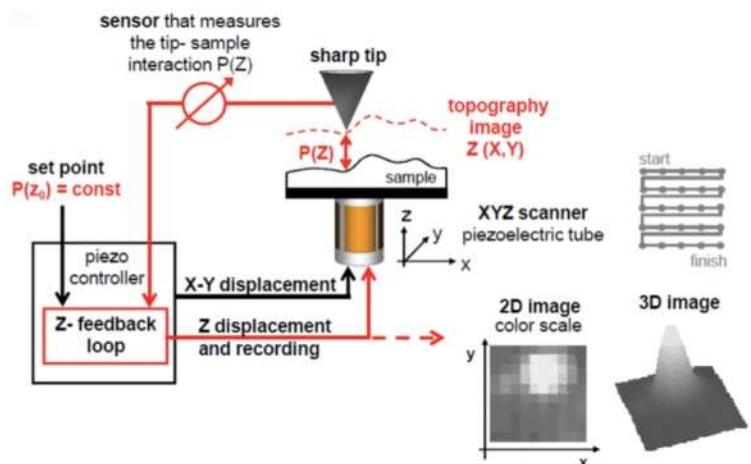
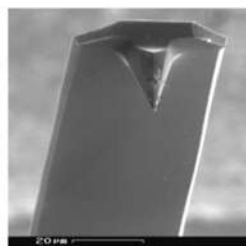
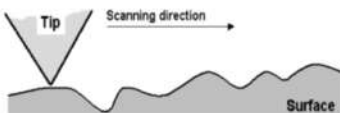


Qual'è il limite di un microscopio ottico?

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

$$r = \frac{0,5\lambda}{N \cdot A} = \frac{0,5 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\theta)}$$

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 griglia in cui la punta è circa grande come un atomo. Inizialmente e quello che voglio realizzare sono presenti dalle forze che noi realizziamo.



ATOMIC FORCE MICROSCOPE

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

LIGHT ABSORPTION

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

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

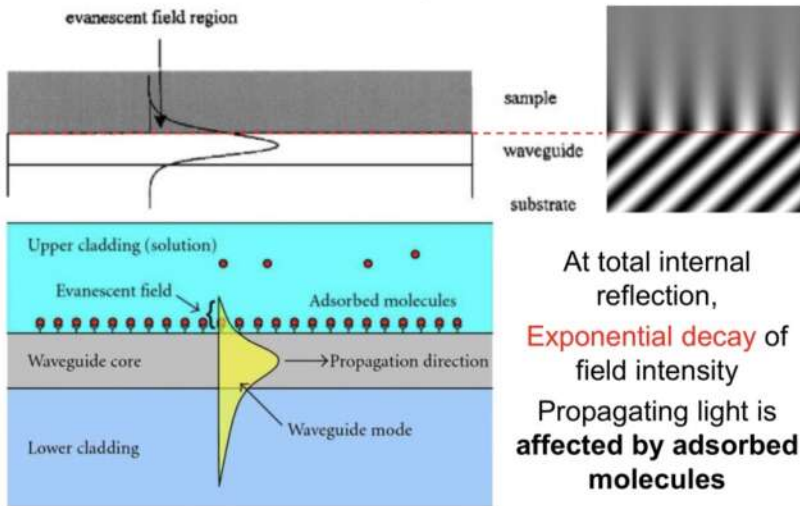
La tecnica è da non essere miniaturizzabile ed è molto lenta e costosa.

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

SILICON PHOTONICS (NON CENTRA NULLA CON LA FLUORESCENZA)

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

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



At total internal reflection,
Exponential decay of field intensity
Propagating light is affected by adsorbed molecules

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

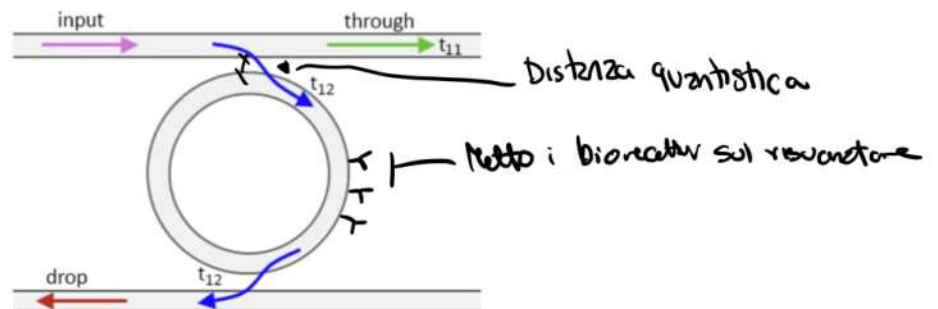
Capiamo quindi che analizzando la luce (la fase) possiamo capire cosa succede ai recettori.

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

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

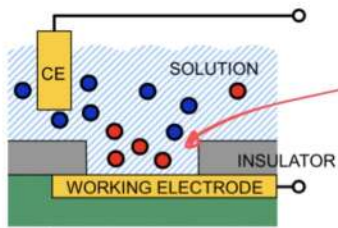
2) Optical ring - Resonator:

NON HO CAPITO COME FUNZIONA!



Electrochemical detector

Reazione elettrica il cui output produce un colore in uscita

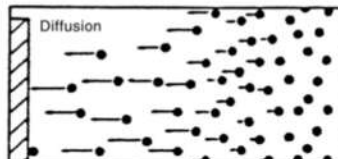


Qui avviene la reazione

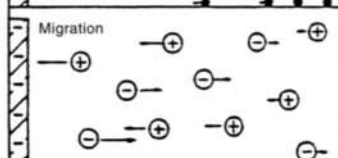
Visto che c'è un campo elettrico abbiamo una redistribuzione delle cariche

Modi con cui si possono muovere le particelle in un liquido

Diffusion

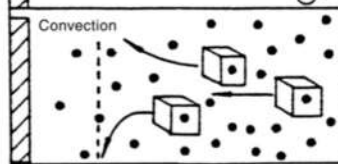


Migration (drift)



Convection (fluid motion)

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



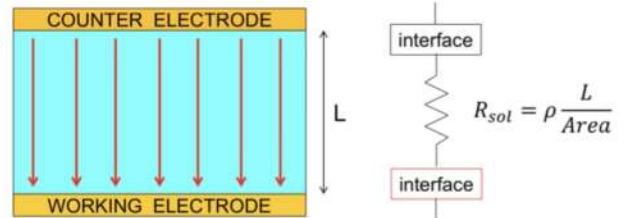
Quando applichiamo un campo magnetico.

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

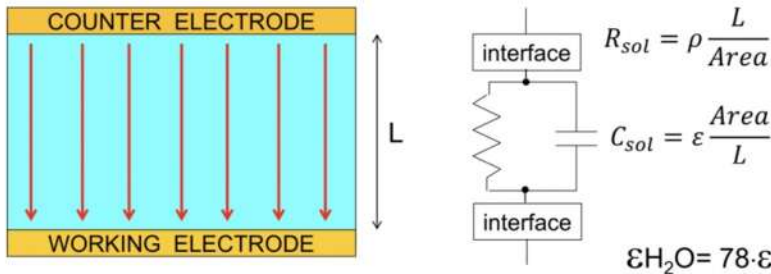
LA MOBILITÀ IN QUESTI LIQUIDI È MOLTO BASSA MA IL NUMERO DI IONI È ELEVATISSIMO E QUINDI ZUA FINE RISULTANO CONDUTTORI

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

ALL'INTERFACCIA QUESTO MODELLO NON VALE PIÙ DOBBIAMO USARE UN ALTRO MODELLO PER MODELLARE IL PASSAGGIO DELLE CARICHE TRA LIQUIDO E METALLO.



Nella realtà il modello più completo è il seguente



(Non ho ben capito il re' del condensatore)

(Esempio con il PBS)

Tipo condensatore dato dalla capacità dell'acqua

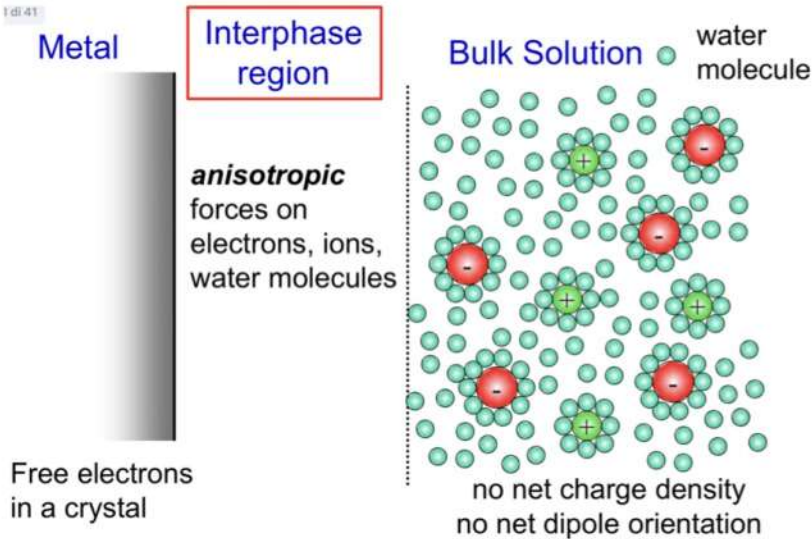
Dielectric relaxation time = $R_{sol} \cdot C_{sol} = \rho \cdot \epsilon = 0.5ns$

independent of geometry!

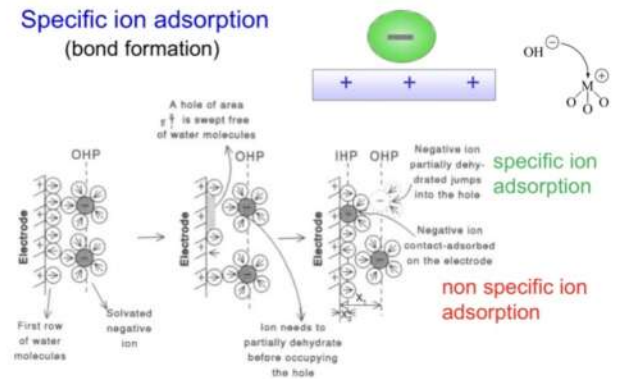


the bulk solution is a resistor up to $\approx 350MHz$ (for PBS)

All'interfaccia:

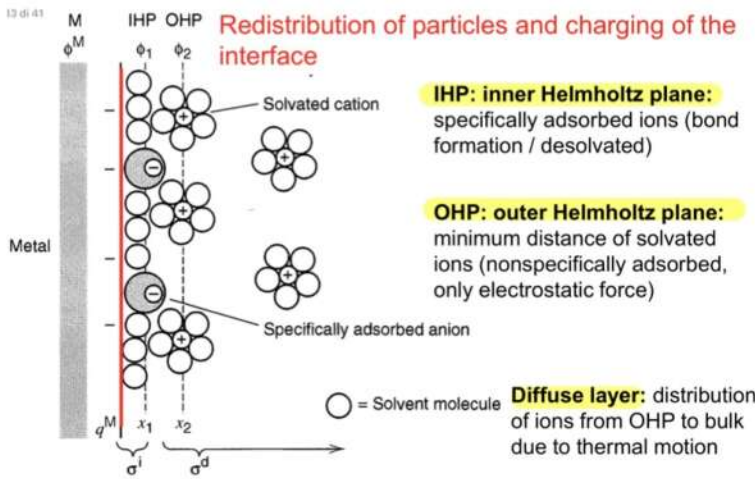
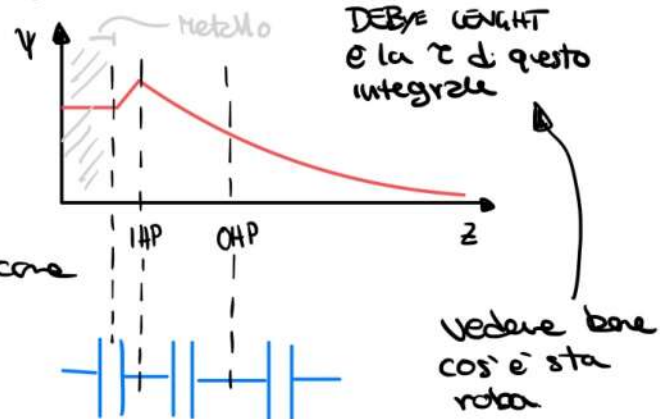


SE IL METALLO È CARICATO POSITIVAMENTE



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

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

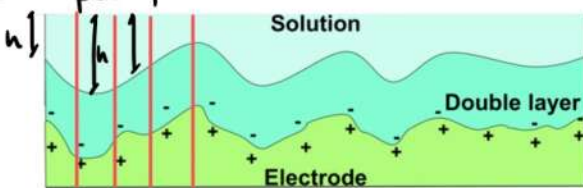


Questa distribuzione di carica può essere modellata come dei condensatori. Ho 3 condensatori in serie, facciamo la serie di condensatori e otteniamo che nel caso del PBS

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

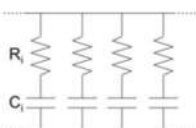
Tuttavia la Capacità può essere + grande di quella aspettata visto che gli elettodi possono non essere lisci a livello atomico ma ci sia della rugosità che fa sì che l'area in contatto con il liquido sia maggiore.

Questo può portare anche ad una differenza nel modello, infatti:



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

Questa differenza di R risulterà in una variazione di time constants di ogni slice e quindi il totale ridotto del sistema non sarà più quello di un condensatore ma sarà diverso (varia la pendenza del guadagno e la fase)



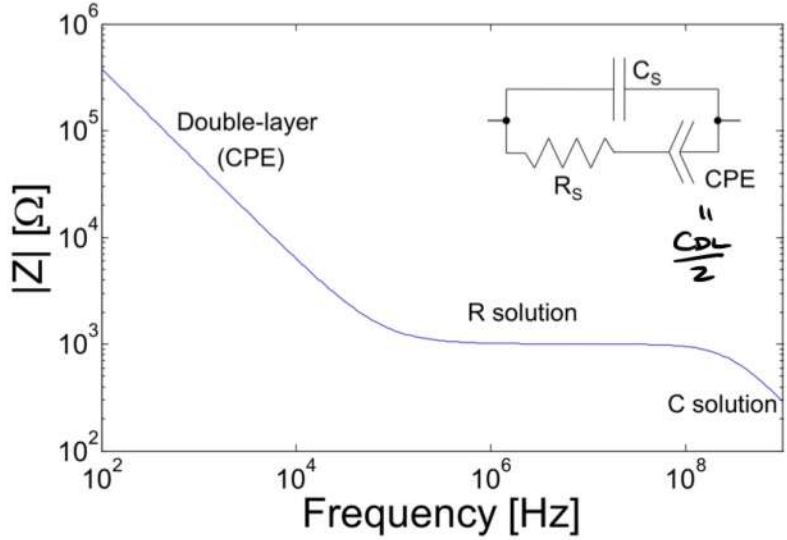
distribution of time constants

$$\frac{1}{Z} = Y = \sum_i \left(R_i + \frac{1}{sC_i} \right)^{-1}$$

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

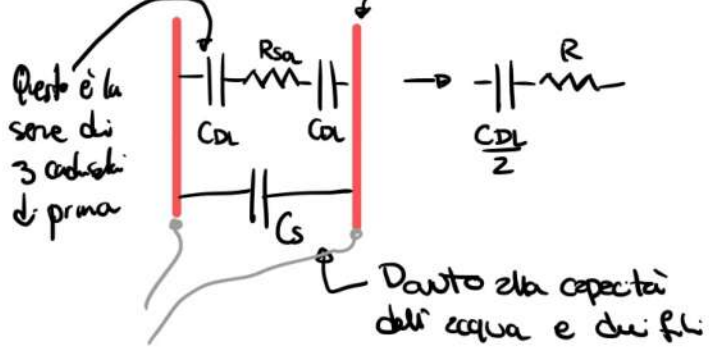
il circuito 2 piccoli segmenti dell'interfaccia e:

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



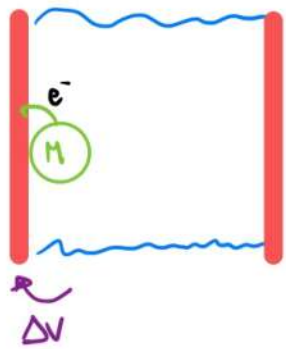
IMPORTANTE!!
QUESTO È IL MODELLO EQUIVALENTE DELL'INTERFACCIA.

R_s : corrisponde al bulk e non all'interfaccia

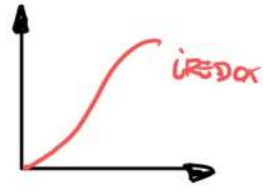
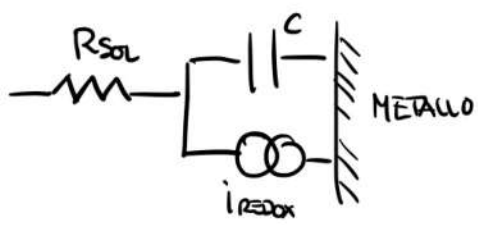


FARADAYIC PROCESS

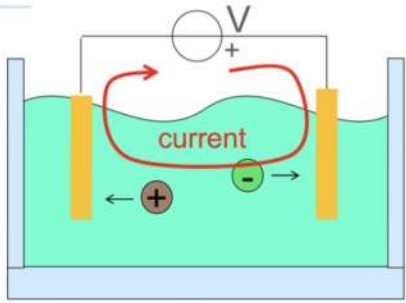
Orz abbiamo corrente che può correre attraverso l'interfaccia.



Se la differenza di potenziale ΔV tra molecola e elettrodo è abbastanza alta da far sì che ci sia lo scambio di elettroni allora abbiamo un redox. elemento da aggiungere nel modello



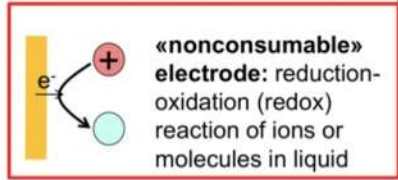
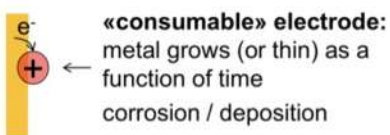
$i_{redox}(t)$ NON È LINEARE, NOI VOGLIAMO RENDERE LINEARE



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

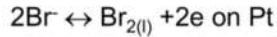
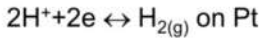
Tipicamente nei sistemi qui ma molto spesso c'è corrosione

Two main cases:



CARATTERISTICA TENSIONE CORRENTE NEL CASO DELLA REDOX

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



AgBr/Ag "ohmic contact"

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

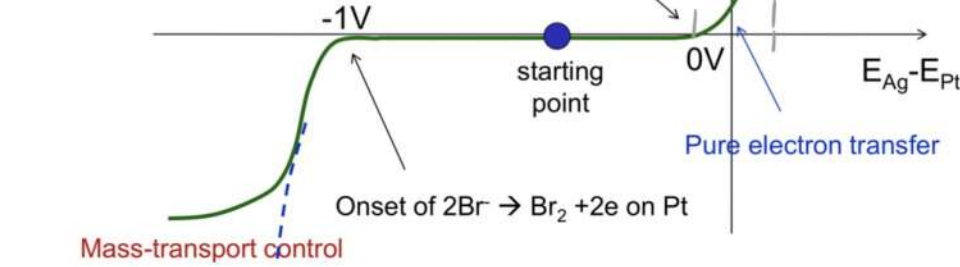
Onset of $2Br \rightarrow Br_2 + 2e$ on Pt

IL POTENZIALE DI REDOX LO PRENDIAMO DALLE TABELLE

Mass-transport control

Pure electron transfer

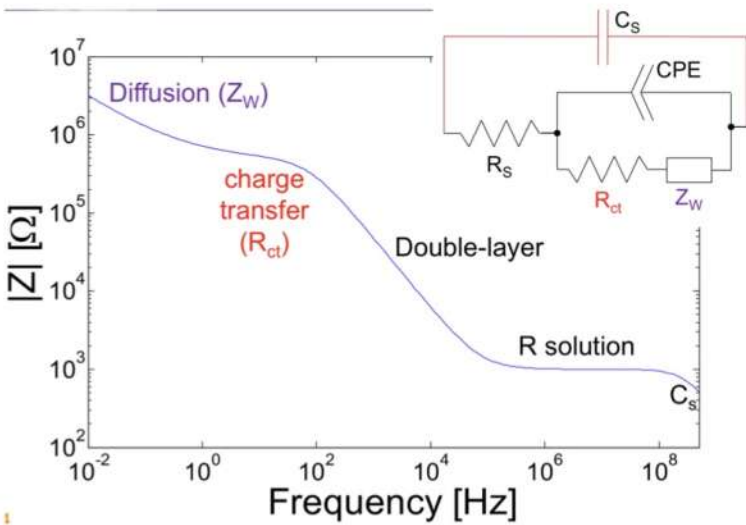
DA QUESTO PUNTO IN POI HO UNA REDOX.



Non ho più un esponenziale xè ad un certo punto abbiamo "finito" gli elettroni delle molecole più vicine all'elettrodo e quindi ora le molecole sono lontane ed è più difficile toglierle elettrone (xè x di diffusione devono arrivare quelle del layer vicino in modo che ci sia spazio per le altre per arrivare)

CAPIAMO CHE LA CURVA NON È LINEARE, VOGLIAMO LINEARIZZARLA IN ALCUNI PUNTI

il modello più o' sarà:



In parallelo al CPE mettiamo un resistore che è la linearizzazione della base current presa in un certo punto

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

Z_W è un termine aggiuntivo di metallo (WARBURG IMPEDANCE) che serve a modellare l'effetto dell'impedenza a via via basse frequenze.

24.03.2021

2h

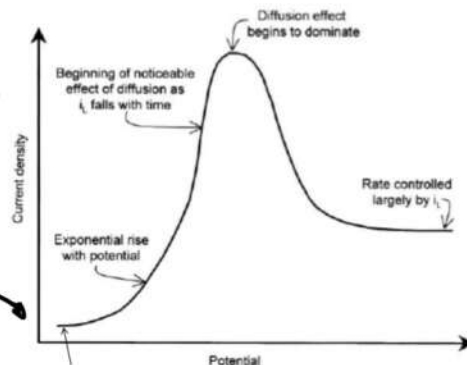
Dobbiamo usare potenziali bassi xè se sono possiamo indurre reazioni redox (es. elettrolisi) e così avremo non solo la corrente data dal binding ma anche quella della redox

L'andamento della corrente nel sistema sarà:

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



MISURIAMO LA CORRENTE CHE SARA' DIPENDENTE DAL BINDING



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

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

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

Cosa succede se abbiamo degli elettrodi molto piccoli?

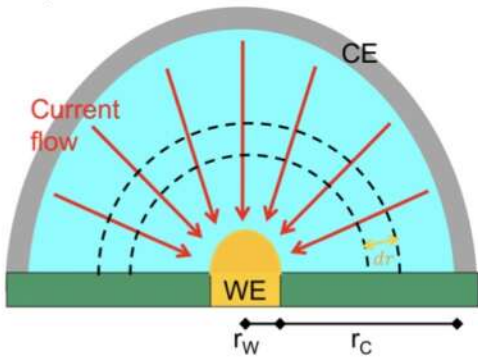
Vogliamo andare molto nel piccolo per poter misurare cose più piccole (cellule)

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

Possiamo prendere correnti solo dai bordi dell'elettrodo, ci va bene perché abbiamo più corrente del previsto. Questo fatto "fa cambiare" tutti i dati visti prima

Radial diffusion profile

Hemispherical electrode:



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

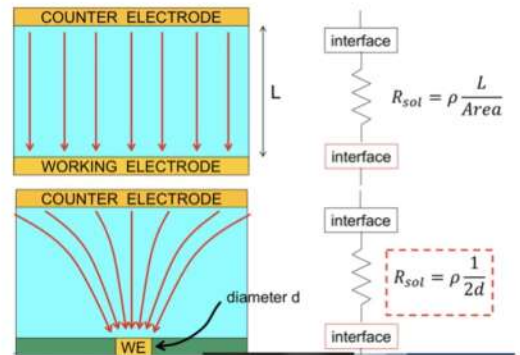
$$R_{sol} = \int_{r_w}^{r_c} dR(r)$$

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

$r_c \gg r_w$

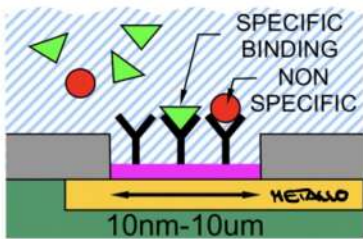
$$R_{sol} = \frac{\rho}{2\pi r_w}$$

Border effects become dominant!



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

PER TUTTO QUELLO DETTO

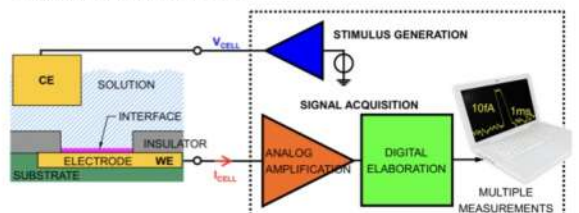


Noi vogliamo misurare in evento all'interfaccia, un modo per farlo è mettere un elemento che fa redox nel liquido se ho i reagenti questi fanno da "blocco" per gli ioni della redox e così c'è la corrente. Se ho delle acque o altre molecole che possono subire la redox ho una corrente spuria in più che leggo e 2 mV non va bene (credo che noi separiamo queste molecole redox netto)

PER CONTROLLARE QUESTO ESISTONO 2 TECNICHE

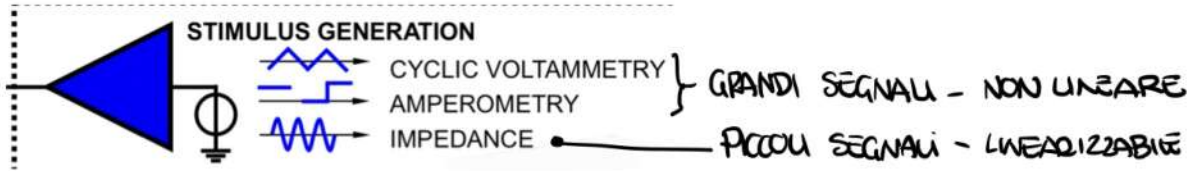
- POTENZIOSTATICA
- CORRENTOSTATICA?

Potentiostatic configuration:

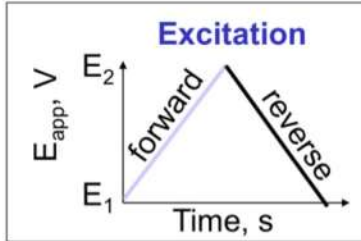


- Apply a voltage V_{CELL} and measure the current I_{CELL}
- Multiple measurement types by changing stimulation waveform

ESISTONO DIVERSE TIPOLOGIE DI STIMOLO (NEI NŌ STUDIAMO SOLO 3)



CYCLIC VOLTAMMETRY : perché è periodico



• Triangular wave: slope = scan rate

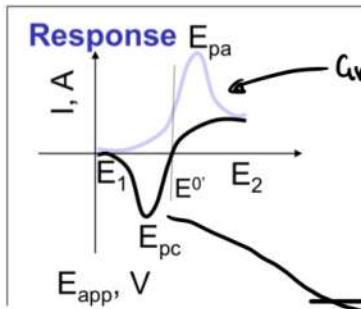
Imponiamo una tensione triangolare

• Important parameters:

Per l'elettrodo noi usiamo l'oro

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

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



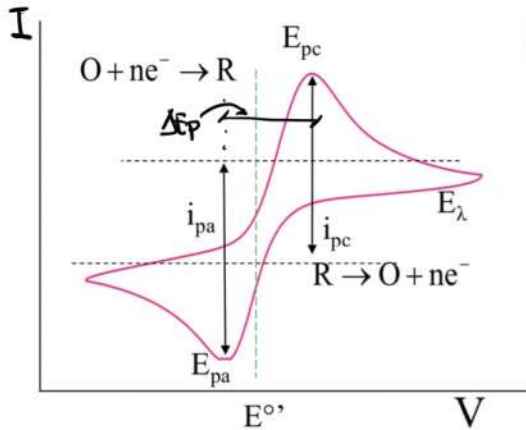
↳ Grafico appena visto prima

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

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

↳ grafico dell'ossidazione

Otteniamo un grafico del tipo



CHEMICAL FINGERPRINT

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

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

n : n. of electrons

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

A : electrode area;

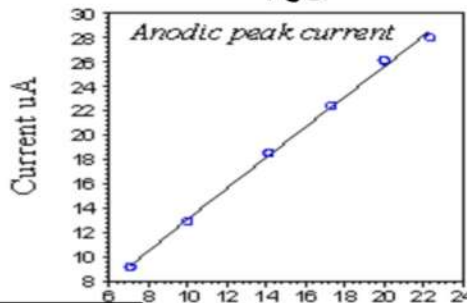
C : concentration (mol/litre)

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

SR : scan rate $dV(t)/dt$

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

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



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

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

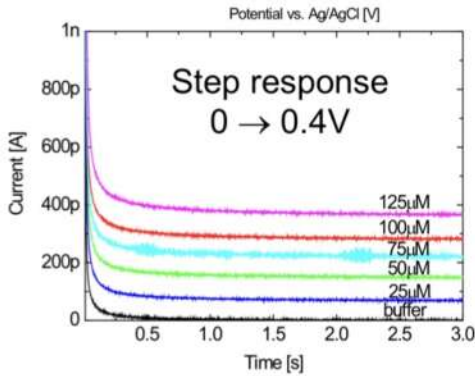
Vogliamo più corrente nei lettori di corrente sono rincarosi, o aumentano gli elettrodi o lo Scan Rate.

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

• AMPEROMETRY

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

Oppure usiamo un step di tensione allora la risposta sarà



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

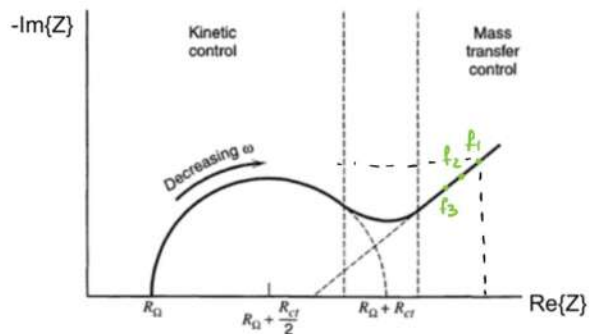
• IMPEDENCE SENSING

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

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

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

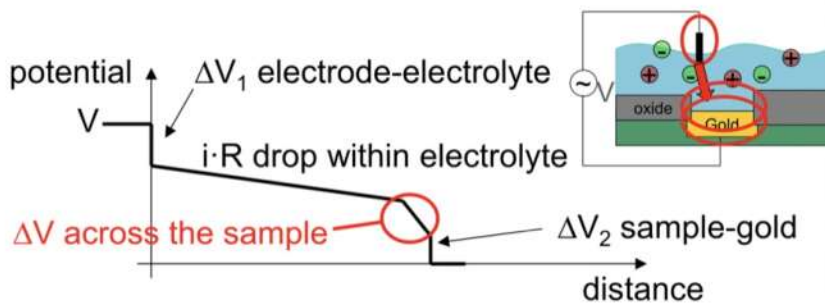
il grafico dell'impedenza può anche essere fatto nel Cole-Cole plot che per ogni frequenza dà il valore della parte reale e immaginaria.



2 electrode measurement

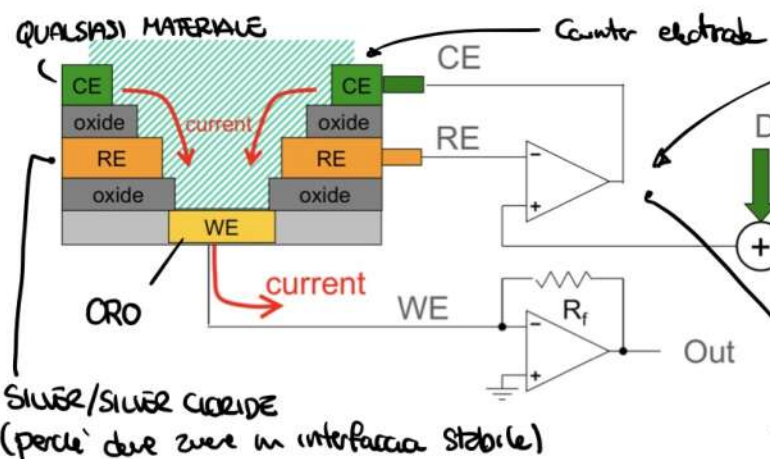
Qual'è la vera caduta di tensione all'interfaccia?

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



Noi imponiamo V ma vogliamo controllare ΔV cioè la tensione che cade nel sample xè e la corrente che triggera la redox

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



Loop negativo è come un zmpù invertute normale tra CE e RE c'è una resistenza

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

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

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

Si chiama potenziostatico

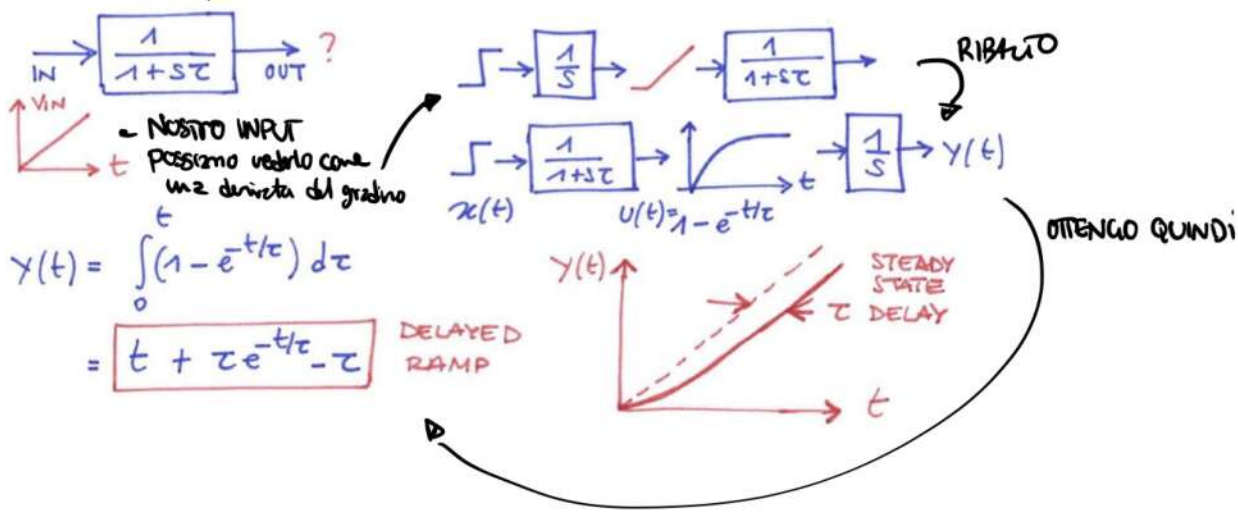
QUALI DEVONO ESSERE LE BANDI DEI 2 OP-AMP?

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

C'è un modo facile per sapere la banda

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

il nostro sistema del 1° ordine



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

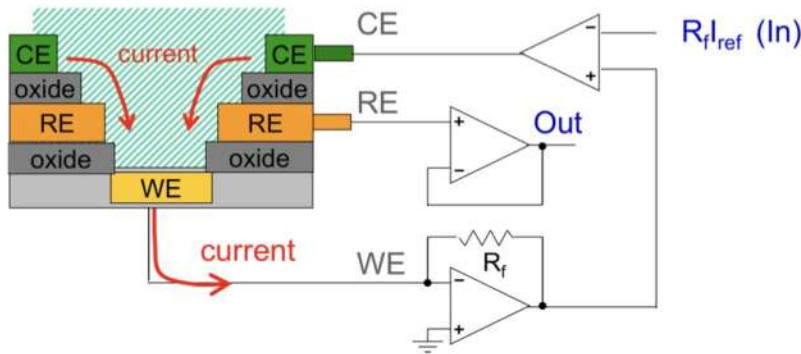
SR = scan rate

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

29.03.2021

2h

Queste zelle si possono fare anche impedendo la corrente e misurando la tensione. Questi si chiamano **galvanostatic**.

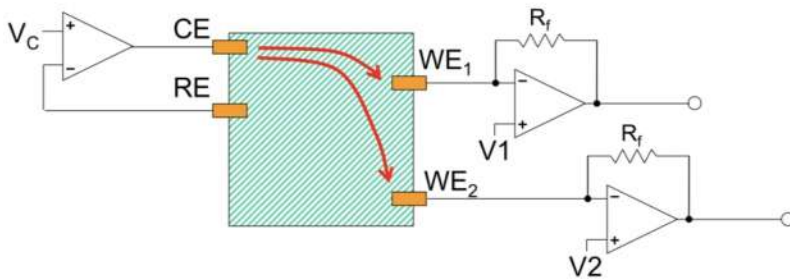


ha un concetto di forza molto simile

SCARSO USATO X NOI

TORNIAMO AL POTENZIOSTAT

possiamo avere diversi Working electrodes (es 2) e biasarli a 2 diverse tensioni in modo che la caduta di tensione all'interfaccia sia diversa tra i 2 working electrodes. (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 di vitale importanza

Any electrical signal is affected by **noise** and disturbances:

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

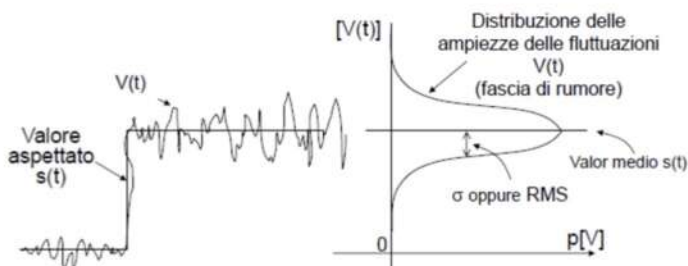
Noise is a **random fluctuation** of the electrical variables due to the physical behaviour of **internal** components of the circuit

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

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

Considera solo rumore stazionario

He poi spiegherò il rumore bianco e $1/f$



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

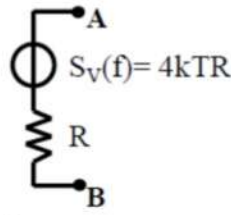
Rumore termico nei resistori

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

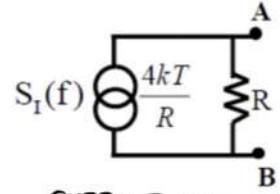
L'unità di misura della densità spettrale di potenza è

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

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



VOLTAGE EQ



CURRENT EQ.

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

Shot Noise

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

Rumore negli OP-AMP

idealmente senza rumore → realmente ci sarà rumore in uscita.

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

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

- Studiamo tutti i modi per fare questo

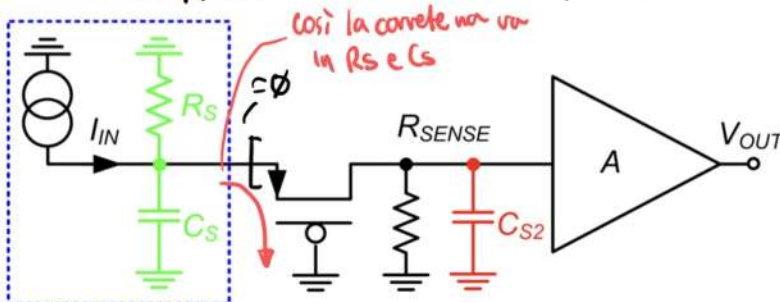
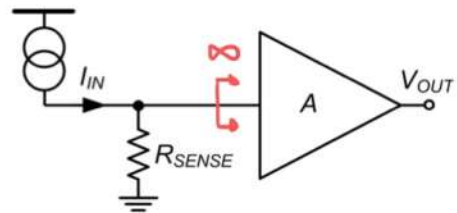
PASSIVE CURRENT CONVERSION (LEGGE DI OHM)

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

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

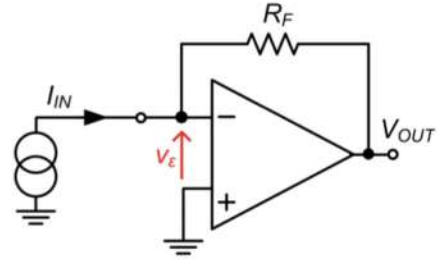


l'impedenza d'ingresso del transistor è g_m che dipende dalla corrente

TRANSMIMPEDANCE AMPLIFIER

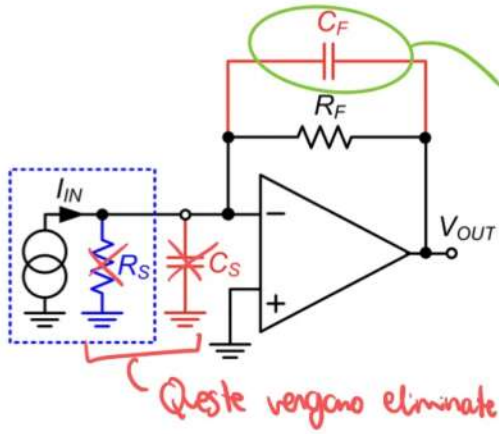
$V_E \rightarrow \emptyset$

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



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

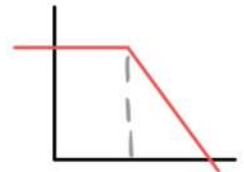
$V_{OUT} = -I_{IN} \cdot R_F$



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

$C_F = 0,2 pF$

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

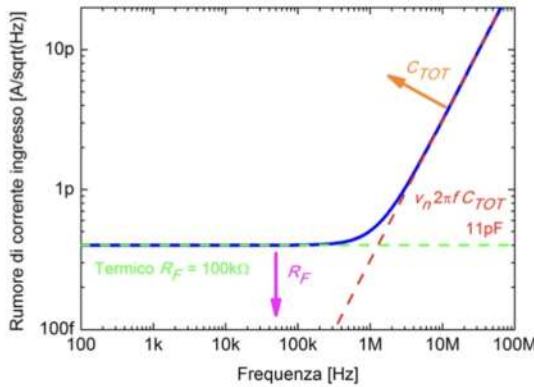
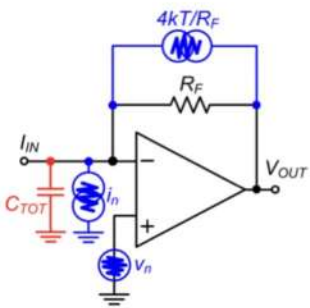


COSA SUCCIEDE PER IL RUMORE?

Input-referred total current noise:

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

Minimize C_S !



i_n : Rumore di corrente dell'OP-AMP

$4kT/R_F$: Rumore di R_F

Il rumore i_n ha 2 componenti, una variazione di terra virtuale = corrente di scorie in C_{TOT} e quindi la prima componente è

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

L'altra è un rumore di corrente su R_F dato da v_n ed è: $\left(\frac{v_n}{R_F}\right)^2$

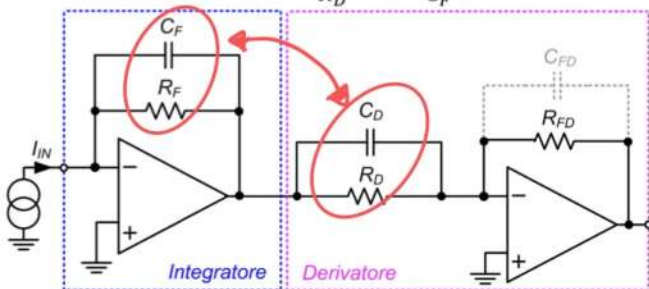
Seppiamo che il Guadagno $\propto R_F \rightarrow$ vorremo R_F grande, ma se tanto R_F vedo \rightarrow diminuire la banda dell'amplificatore che si crea con C_F .

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

VUOLIAMO ESTENDERE LA BANDA E TENERE IL RUMORE BASSO

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

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



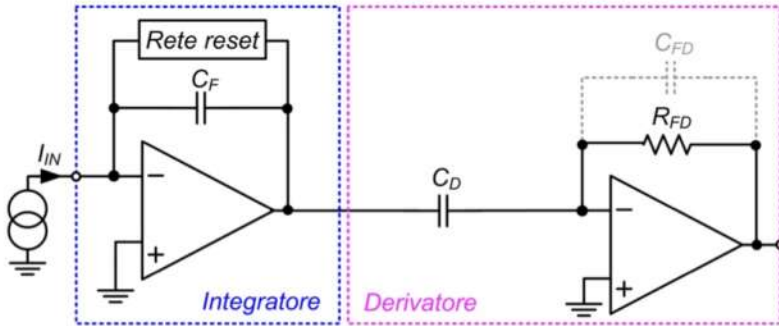
- Pro: extends the bandwidth, preserving the lower noise
- Con: manual tuning of the zero (due to parasitics)

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

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

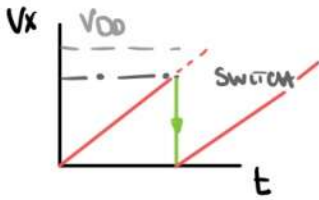
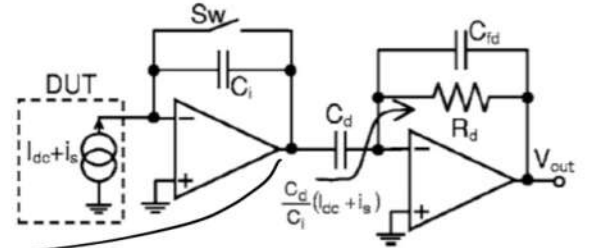
Dato che R_F dell'integratore è l'elemento da poter rivedere lo togliamo, ci serve una rete di reset altrimenti il OP-AMP saturerebbe subito solo con un condensatore in feedback.

Switch periodically closed to discharge the capacitor:



Limits the maximum measurement time

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

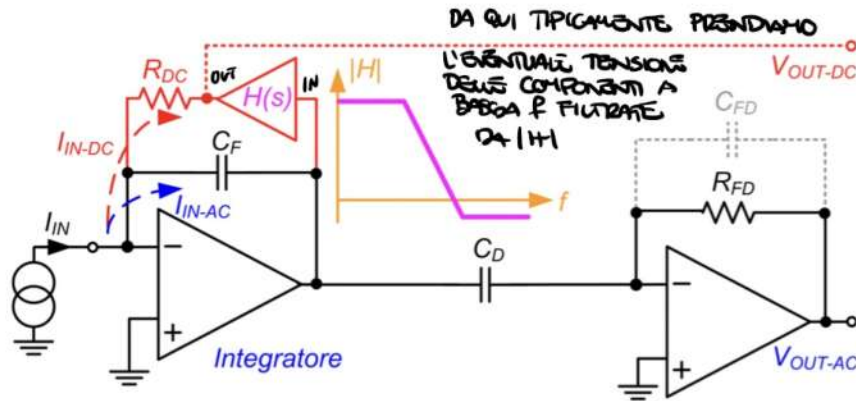


La tensione sale a rampa

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

Per risolvere questi problemi facciamo un reset continuo

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



DA QUI TIPICAMENTE PRENDIAMO

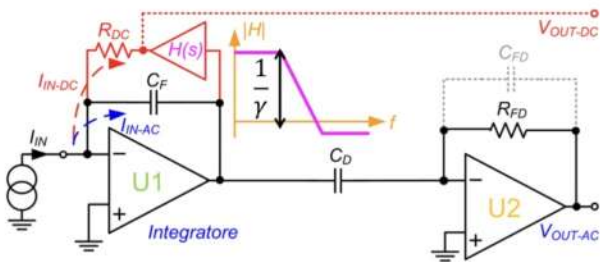
L'ESSENTIALE TENSIONE DEI COMPONENTI A BASSA F. FILTRARE DA |H|

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

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

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

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

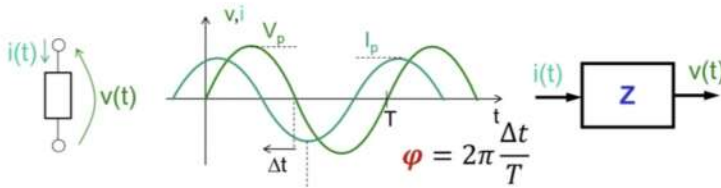


- U_2 infinitesima rispetto a U_1 quindi non la consideriamo
- $H(s)$, la possiamo diminuire molto aumentando R_{DC} .

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

$$S_i(f) = \sqrt{ \underbrace{i_1^2 + \left(\frac{v_1}{R_{DC}}\right)^2}_{U1} + \underbrace{(v_1 2\pi f C_F)^2 + \left(i_2^2 + \left(\frac{v_2}{R_{FD}}\right)^2 + (v_2 2\pi f C_D)^2 + \frac{4kT}{R_{FD}} \left(\frac{C_F}{C_D}\right)^2 + \frac{4kT}{R_{DC}} + \left(\frac{v_3}{\gamma R_{DC}}\right)^2}_{U2} }_{H(s)}$$

MISURA DELL' IMPEDENZA



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

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

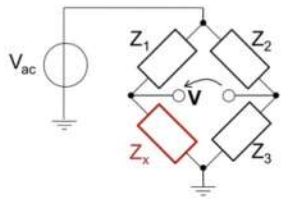
Impedance [Ohm]
• Complex quantity
• Change with frequency

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

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

TIPICI DI TECNICHE PER MISURARE L'IMPEDENZA

• Balancing Bridge



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

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

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 sappiamo il valore di Z_x della formula

Pros:

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

Cons:

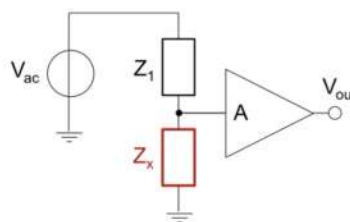
- Requires several switches
- Slow balancing routine
- Not very convenient for spectroscopy
- Inoltre dobbiamo sapere prima che impedenze andiamo cercando (resistenza/condensatore/induttore)
Questo contro si ricollega al primo

• Potentiometric: Half-Bridge

è solo un partitore di tensione

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

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



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

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

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

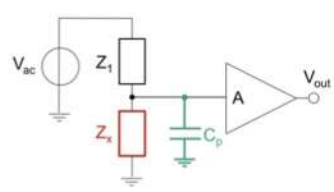
- $Z_x \gg Z_1: A V_{ac} - V_{out} \approx 0$
- $Z_x \ll Z_1: V_{out} \approx 0$

$\Rightarrow Z_1 \sim Z_x$
Difficult matching

Un altro limite di questa topologia è dato dagli elementi parassiti

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

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



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

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

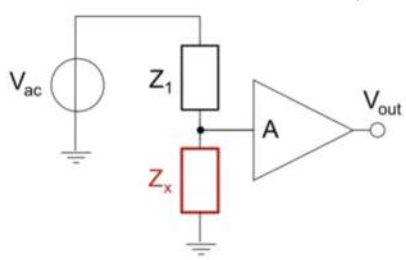
C_p reduces the accuracy!

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

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

Pros:

- Independent of the impedance
- One terminal can be grounded



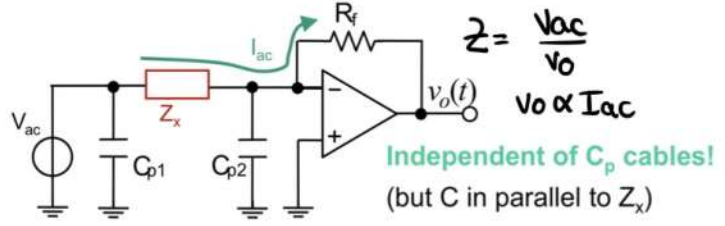
Cons:

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

CURRENT SENSING

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

Current readout: transimpedance amplifier

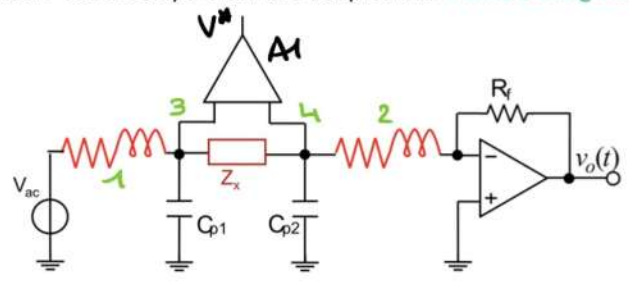


In pratica zero i condensatori parassiti grazie alla terra virtuale, infatti questi avranno sempre tensione zero e quindi nulla.

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 DOWUTO ALLE CONNESSIONI E AI FILI

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



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

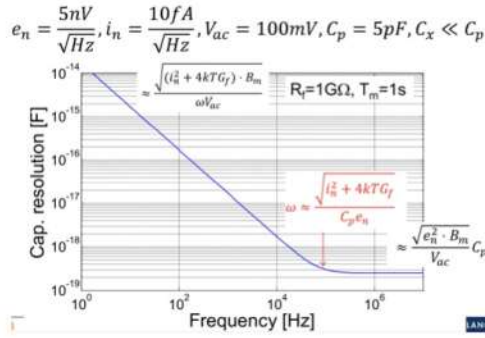
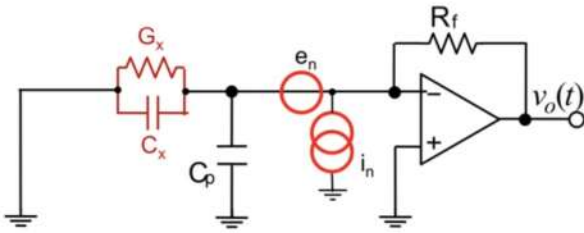
Per ricavare Z_x facendo $Z_x = \frac{V^*}{V/R_f}$

con V^* tensione ai capi di Z_x

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

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

Calcolo del rumore del current sensing



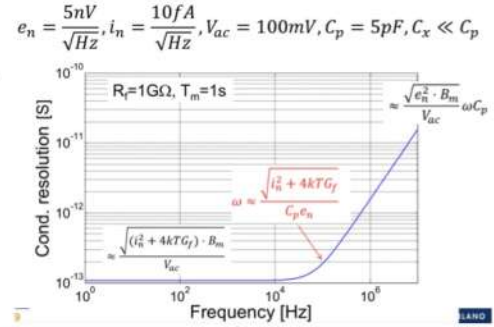
Simula l'andamento dell'SNR, notiamo che dopo un certo valore di frequenza non ha senso andare la frequenza

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

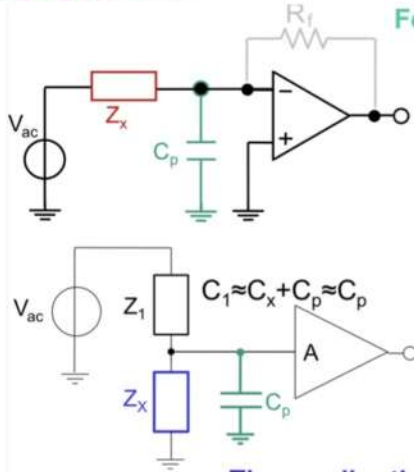
$$V_{ac} \Delta G_{xmin} = \sqrt{S_i B_m} \Rightarrow \Delta G_{xmin} = \frac{\sqrt{S_i B_m}}{V_{ac}}$$

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

Simula il rumore della corrente di input



COMPARIAMO LE RISOLUZIONI



Feedback does NOT alter SNR:

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

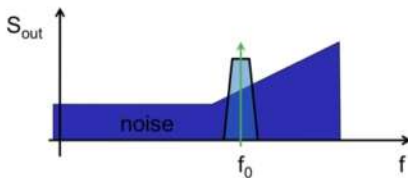
$$\Delta C_x \approx \frac{\sqrt{e_n^2 \cdot B_m}}{V_{ac}} 4 C_p$$

The smaller the C_p the better the resolution

Vedere slide per altre comparazioni

Dopo aver estratto la corrente dobbiamo estrarre il segnale per capire le diverse componenti? vogliamo anche ridurre il rumore

In both cases a sinusoidal excitation at f_0 is applied:



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

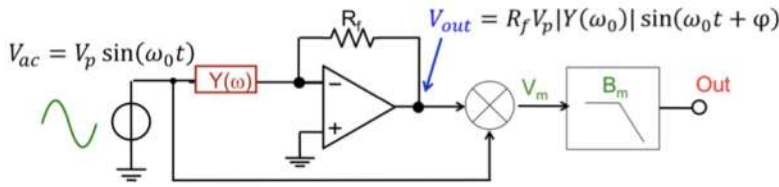
Se facciamo l'impedance spectroscopy f_0 cambia da 1Hz a 10MHz e quindi il passbanda dovrebbe essere tunable

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

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

Estremamente difficile fare ciò.

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



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

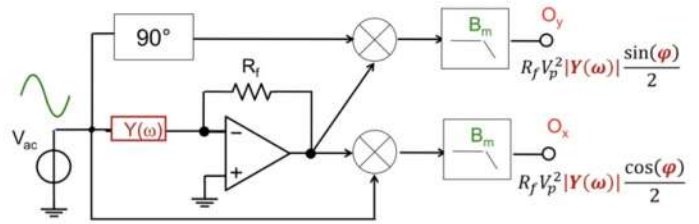
$$V_m = R_f V_p^2 |Y(\omega_0)| \frac{\cos(\varphi) - \cos(2\omega_0 t + \varphi)}{2}$$

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

Out DC signal corresponds to the admittance (in-phase)
The **averaging time** is set by the low-pass filter

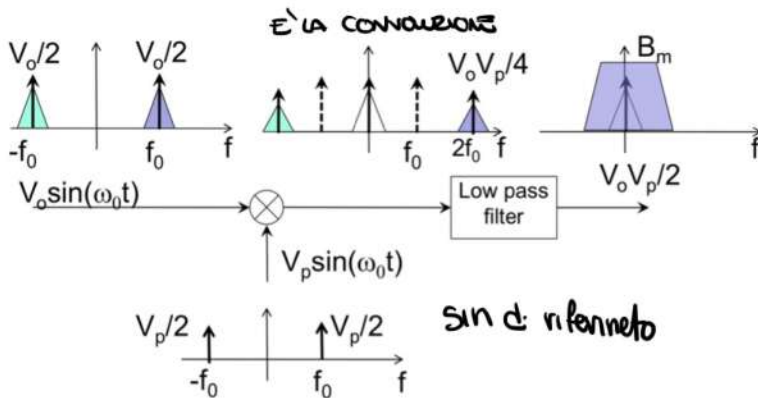
Se volessi anche la parte immaginaria allora

Abbiamo in output un valore dipendente dalle differenze di fase delle 2 componenti
Con questo ricavo la parte reale, cioè la componente orizzontale (parca $\cos \varphi$)



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

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



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

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

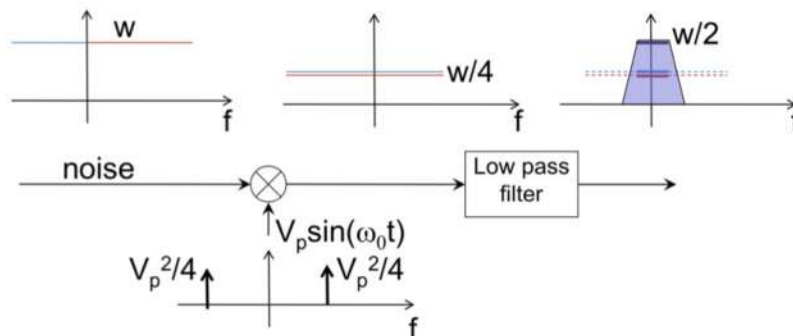
Poi noi mettiamo un passabasso e prendo tutto quello attorno a \emptyset

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

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

Per il rumore abbiamo (nel caso di rumore bianco)

Uncorrelated noise: **summing the power**



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

Si possono usare anche altri approcci al contrario di quello varando la Frequenza della sinusoidale. Time domain approach

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

Vantaggio: Veloce, perché faccio solo una volta

Svantaggio: Fare questo rende molto più difficile il circuito

Alternative **time-domain approach**:

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

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

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

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

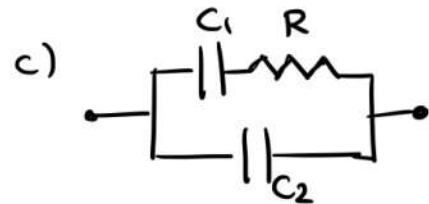
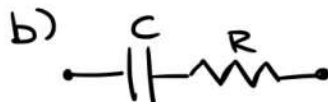
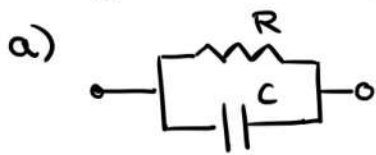
07.04.2021

2h

ESERCIZI

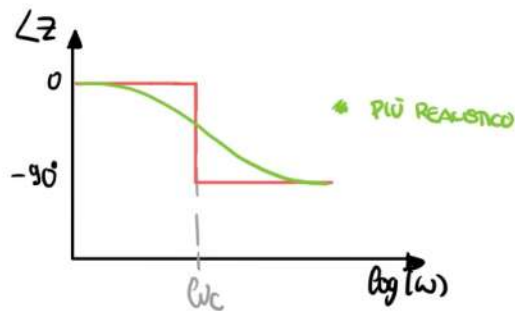
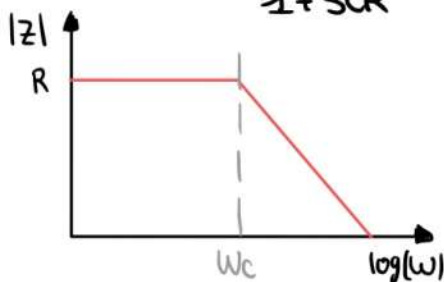
① IMPEDANCE MODELS AND PLOT

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



a) INIZIAMO CON BODE

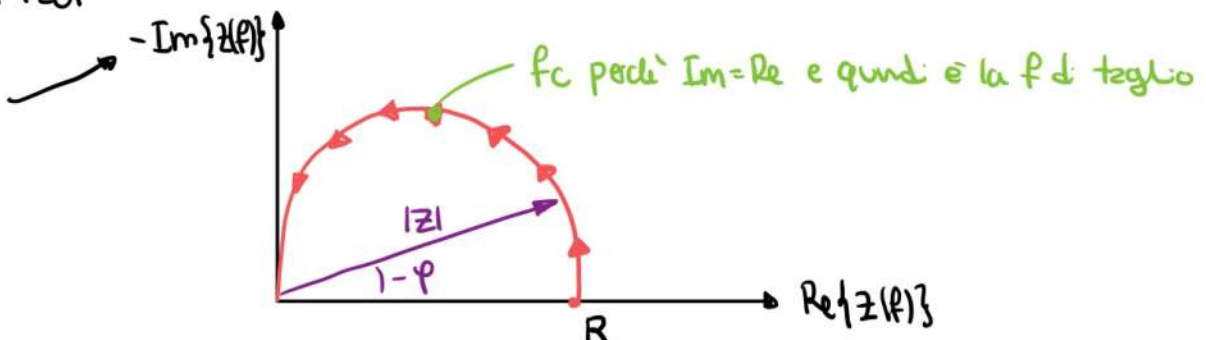
$$Z = R // \frac{1}{sC} = \frac{R}{1 + sCR}$$



(importante se è possibile vedere $C_1 = C_2$, $R = R_{sa}$ e $C_1 = C_2$)

> COLE-COLE PLOT

il meno è importante



Ricaviamo parte reale e immaginaria

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

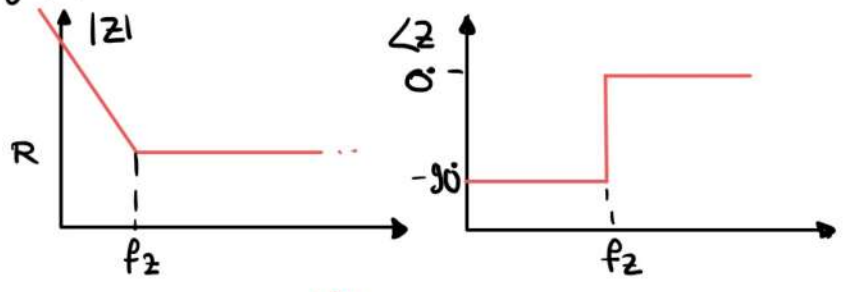
Per $f=0$ ho solo parte reale (R)

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

b)

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

BODE

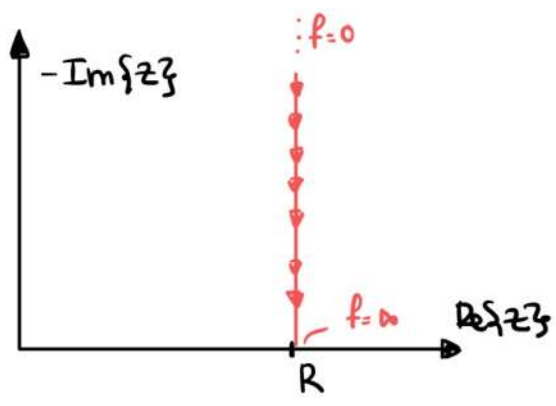


> COE-COE PLOT

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

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

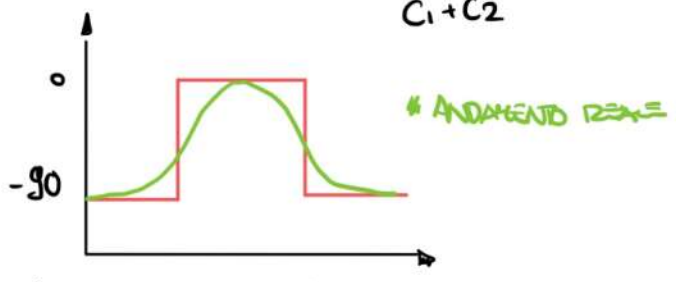
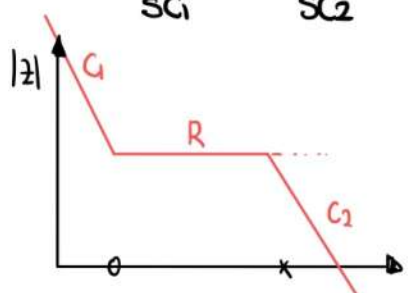
$f \rightarrow \infty : |Z| \rightarrow 0$



c)

$$Z = \frac{1+sC_1R}{sC_1} \cdot \frac{1}{sC_2} = \frac{1+sC_1R}{s(C_1+C_2)} \cdot \frac{1}{1+sR \frac{C_1 \cdot C_2}{C_1+C_2}}$$

$C_1 > C_2$



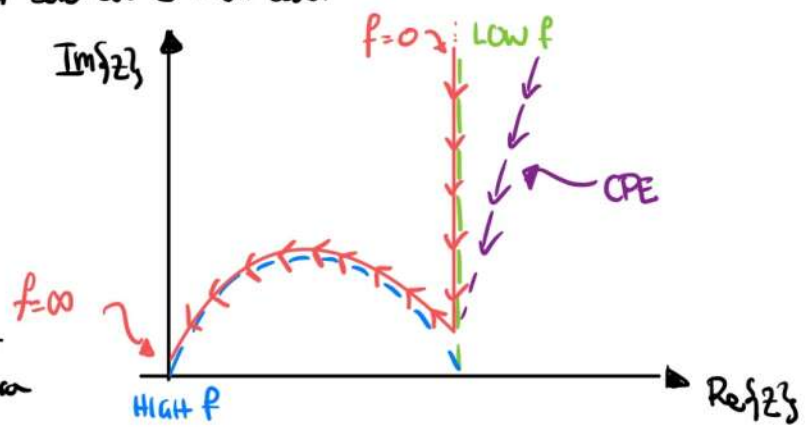
In tutti i casi in cui vogliamo misurare la resistenza di soluzione di un campione biologico e' dato unicamente da una finestra di frequenza dove abbiamo solo la resistenza (resistive plateau)

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

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

il coe-coe plot e' una combinazione dei 2 grafici visti prima

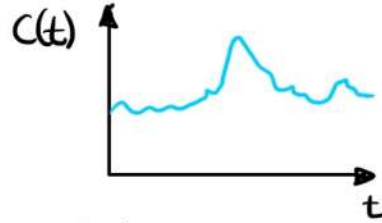
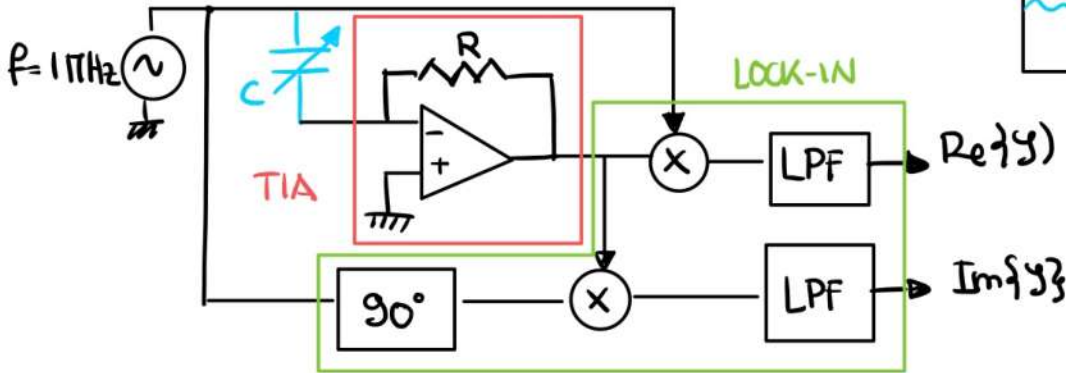
Nel caso di condensatore ideale la curva e' verticale mentre se abbiamo un CPE, constant phase element allora la linea e' tiltata a destra



ESERCIZIO 2

IMPEDENZA APPARENTE

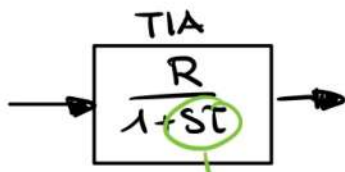
LOCK-IN DETECTOR, C cambia continuamente



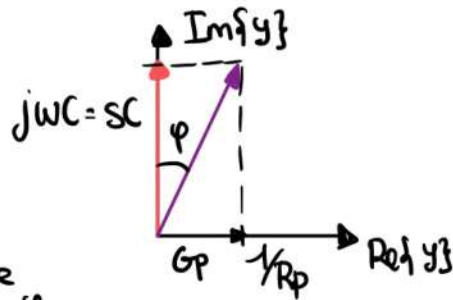
se $C = 1 \text{ pF}$
in teoria $\text{Re}\{Y\} = 0$

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

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



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



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

Ricaviamo φ grazie a $G_p = 171$

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

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

• Ricaviamo l'FDT del TIA

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

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

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

E QUINDI

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

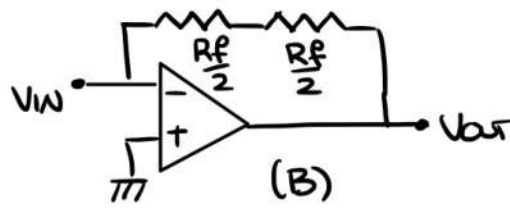
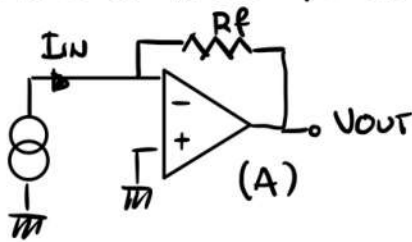
Dobbiamo quindi avere che l'amplificatore abbia banda 10 volte quella del segnale



ESERCIZIO 4

MISURAZIONE DI CORRENTE: BANDWIDTH EXTENSION

Cerchiamo un modo per aumentare la banda del trasimpedante amplifier



Confrontiamo i 2 schemi, perché B è meglio?

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



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

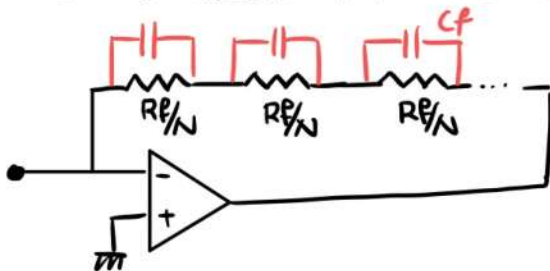
mentre nel caso A abbiamo che $Z = -\frac{R_F}{1 + sC_f R_F}$

Abbiamo lo stesso guadagno in continua R_F ma:

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

$$BWB = 2 \cdot BWA$$

ESTENDIAMO QUESTO A N-RESISTORI



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

Aumentiamo la banda di N

Tuttavia questa tecnica funziona solo per N piccoli e c'è un problema di matching, infatti questo risultato lo abbiamo solo se $C_{f1} = C_{f2} = C_{f3} \dots$ ed è molto difficile fare in modo che le capacità parassite siano uguali in tutte le resistenze.

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

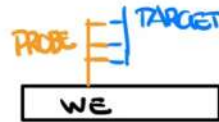
AGGIUNGE UN FILE ONLINE CON GLI ALTRI ESERCIZI + SOLUZIONI

12 Oct 2021

2h

CAPACITIVE DNA BIOSENSOR

Vogliamo trovare una sequenza di DNA in soluzione



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

cerchiamo che a noi interessa la Capacità Debye length

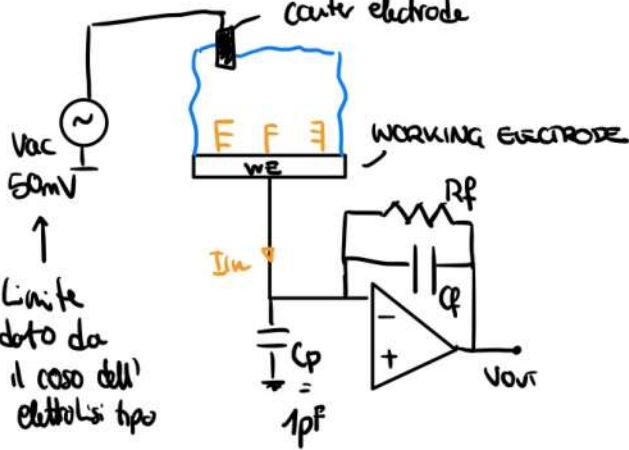
Allora modelliamo il sistema come



Ci interessa vedere un cello di capacità

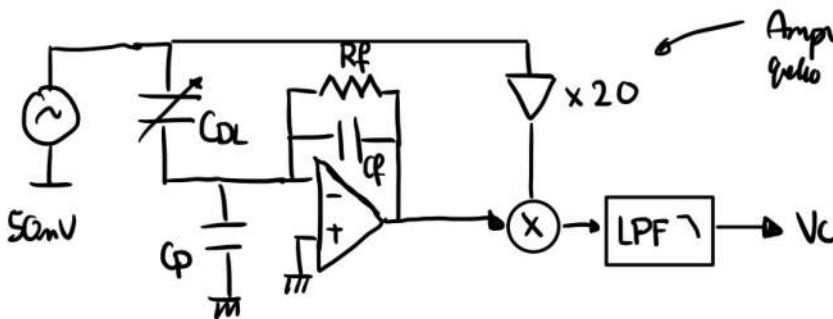


Non ci interessa Rsa quindi per noi Rsa → ∅



Limite dato da il caso dell' elettrolisi tipo

il modo migliore per studiare il sistema e il lock in

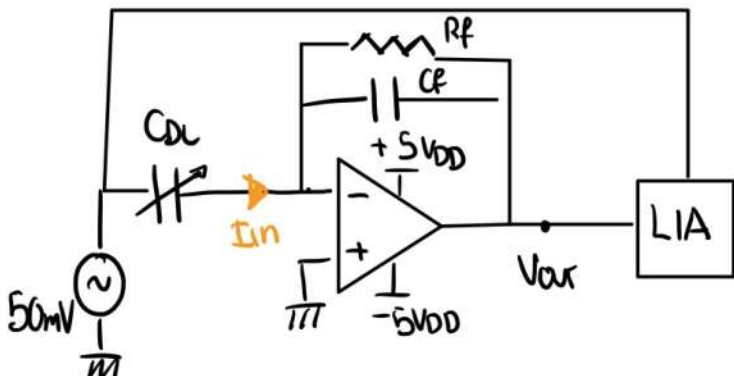


Amplificaz. di 20 il segnale d'uscita vale il quello d'ingresso e basso 50mV

DISK ELECTRODE 10µm Ø

ARRIVAL RATE 1molecule/sec

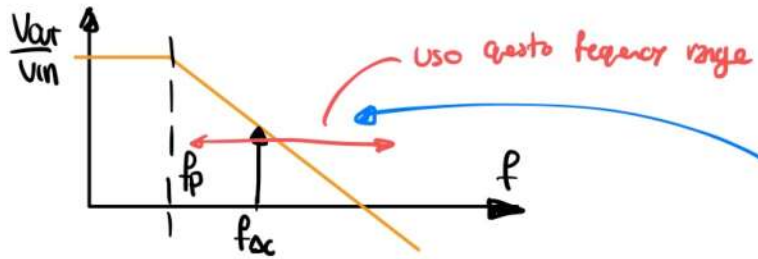
- a) Size Cp
- b) trovare la capacitive resolution con $BW_{LPF} = 100\text{Hz}$
- c) l'ibridazione del DNA da $\Delta C = 10/C_{de}$ trovare il minimo C misurabile
- d) che impatto ha il rumore su Vac?
- e) Trovare BW_{LPF} (non ho capito in che caso)



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

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

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



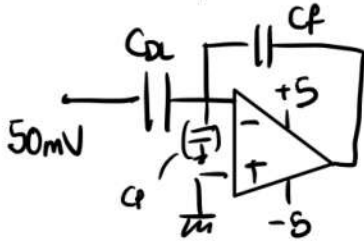
Visto che abbiamo un R_F molto grande e visto che noi misuriamo il condensatore C_F in un'area operata nella zona capacitiva della curva.

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

$$I_{in} = \frac{V_{ac}}{\frac{1}{sC}} = V_{ac} s C_{DL} \rightarrow \text{uso questa formula in questa } V_{out} = I_{in} \cdot \frac{-R_F}{1 + sC_F R_F}$$

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

Se $f_{ac} \gg f_p$ allora



$$V_{out} = -V_{ac} \cdot \frac{C_{DL}}{C_F} \quad | \quad E(+5, -5V)$$

questi valori devono stare tra -5 e 5 volt se c'è limitazione del OP.AMP

Se C_p non circola corrente.

Noi sappiamo che

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

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

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

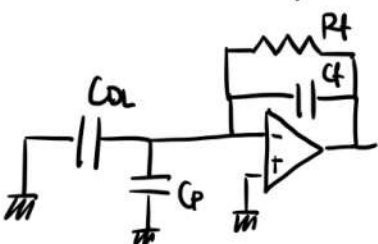
valore molto basso non si può comprare

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

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

• PUNTO b

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



Calcoliamo la C_{TOT} connessa all'input

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

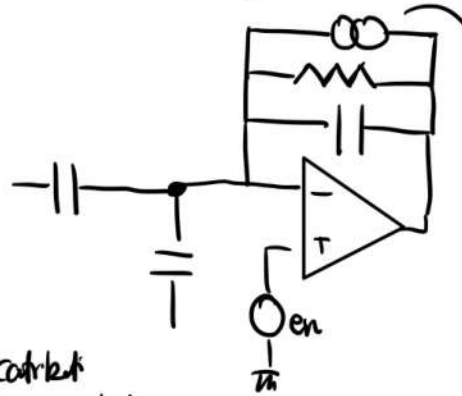
↑ stray ↑ sensor ↑ ampl

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

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

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

$$e_n = \frac{4 \mu V}{\sqrt{Hz}}$$



$$\frac{4KT}{Rf}$$

è la corrente del rumore di R_f , vedo la corrente che va verso l'input dell'OP-AMP

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

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

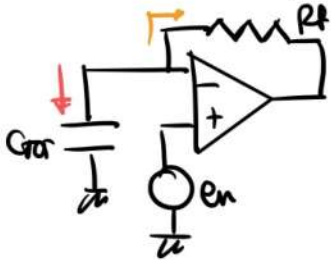
$26mV$
 $1,6 \cdot 10^{-19} C$



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 varia anche quello di -, cioè si produce una tensione o corrente che va a sommarsi sul segnale.

Abbiamo 2 correnti quella sul resistore e quella sui condensatori.



La parte sul resistore è

$$\sqrt{\frac{e_n^2}{Rf^2}} = \frac{4 \mu V}{\sqrt{Hz}} = 900 \mu A / \sqrt{Hz}$$

approssimabile a 0 se considerato o il rumore di Rf (è no di utraggi di zero Rf grande)

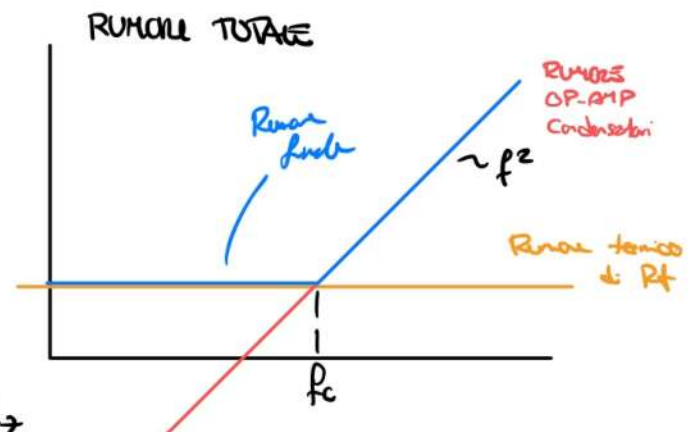
La parte sui condensatori è

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

è un rumore che varia con la frequenza

cerchiamo f_c per capire la Banda

$$\frac{4 \mu V}{\sqrt{Hz}} \cdot 2\pi f_c \cdot 10 pF = \frac{4 \mu A}{\sqrt{Hz}} \rightarrow f_c = 16 KHz$$



Dove mettiamo quindi la nostra sensing frequency?

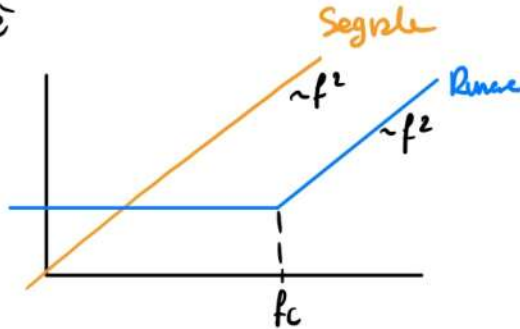
In general se il segnale non dipende dalla frequenza noi perdiamo una frequenza $< f_c$.

Tuttavia nel nostro caso il segnale dipende dalla frequenza, dobbiamo vedere qual è il segnale più a noi ci interessa l'SNR. Poi per capire il minimo segnale misurabile mettiamo $SNR=1$. (2 noi il segnale dipende dalla frequenza noi abbiamo un condensatore in ingresso)

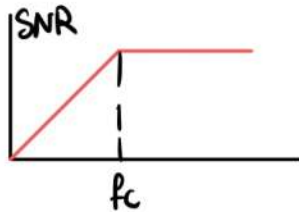
Infatti il segnale d'ingresso è

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

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



Allora l'SNR è



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

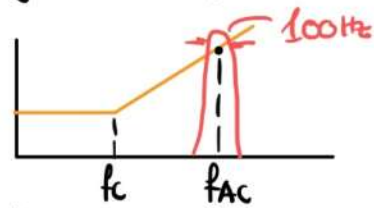
Supponiamo $f_{ac} = 200 \text{ kHz}$

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

il rumore dominante è quello dell'OP-AMP

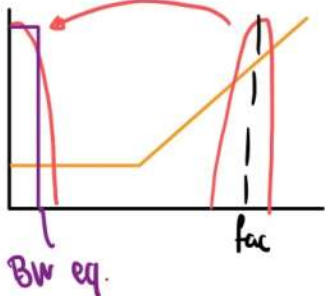
il lock in è fatto per integrare il segnale con banda 100 Hz attorno a f_{ac} .

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



il rumore quindi sarà calcolabile tramite l'SNR

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



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

↳ dato dal lock in

$$\begin{aligned} \text{Ma } SNR=1 &= \frac{\frac{C_{in}}{2}}{\sqrt{\frac{(E_n \cdot 2\pi f_{ac} \cdot G_{TOT})^2 \cdot BW}{2}}} \\ &= \frac{\frac{1}{2} V_{ac} \cdot 2\pi f_{ac} \cdot C_{in}}{E_n \cdot 2\pi \cdot f_{ac} \cdot G_{TOT} \cdot \sqrt{\frac{1}{2} BW}} = 1 \end{aligned}$$

↳ sopra dato dal lock in

↳ la nostra incognita

Perciò

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

CAPACITIVE RESOLUTION

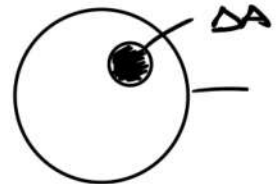
← FORMULA IMPORTANTE

Perciò $\Delta C = 11aF$ (arto Farad?)

PUNTO C

Supponiamo che C_{DL} cambia del 10% quando abbiamo l'ibridazione, se $\sigma_c = 11aF$ (con la minima capacità rilevabile) allora

$$\sigma_c = 11aF = \frac{0.1 pF}{\mu m^2} \cdot Area_{ele} \cdot 0.1 \quad \leftarrow 10\%$$



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

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

Limit of Detection lo posso vedere con n° di molecole / volume della area piccola quanto n° da la minima capacitativa.

Calcolerò il volume con un semicircolo sopra l'area



Noi sappiamo che il diametro del DNA è 2.5 nm.

Perciò il numero di molecole di DNA e' calcolabile con n° molec. DNA = $\frac{1.1 \cdot 10^{-3} \mu m^2}{\pi \left(\frac{2.5 nm}{2}\right)^2} = 224$ molecole

in una slice 2D

il volume del semi-circolo e'

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

e quindi:

$LoD = \frac{224}{Volume}$

14.04.2021

lezione

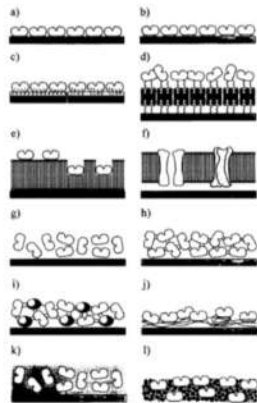
2h

Molecole

Come possiamo bloccare le molecole che usano come recettori?

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

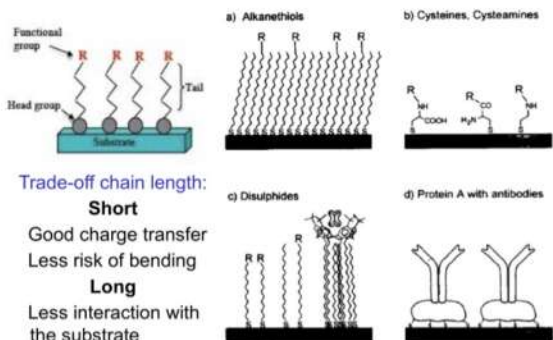
Ci sono altri modi per far attaccare le molecole, una sorta di bio lego [d] o di biopolimeri che bloccano le molecole. [g, h, i, j, k, l]



Molecular Affinity Biosensors

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

INIZIAMO STUDIANDO IL CASO E/F [e è uguale a 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

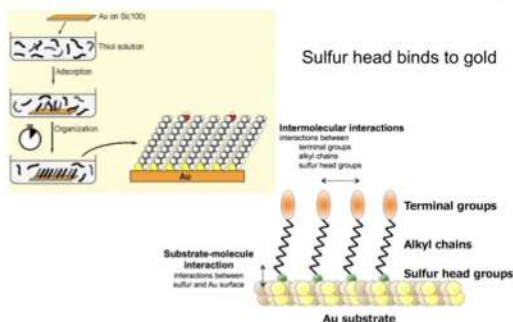


Noi ingegnerizziamo una testa per stare legata al substrato
 e una per legare con i reagenti.
 Possiamo anche scegliere la lunghezza.

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

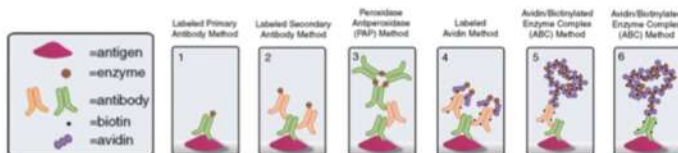
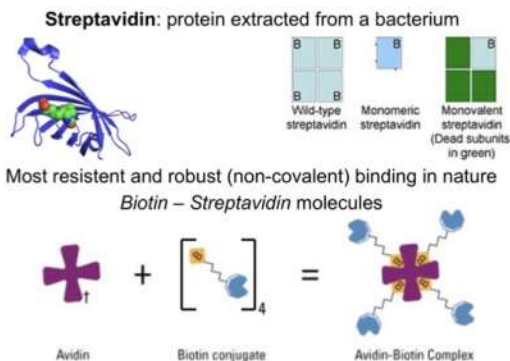
Tipicamente la lunghezza di questi recettori è 10 atomi di
 carbonio

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



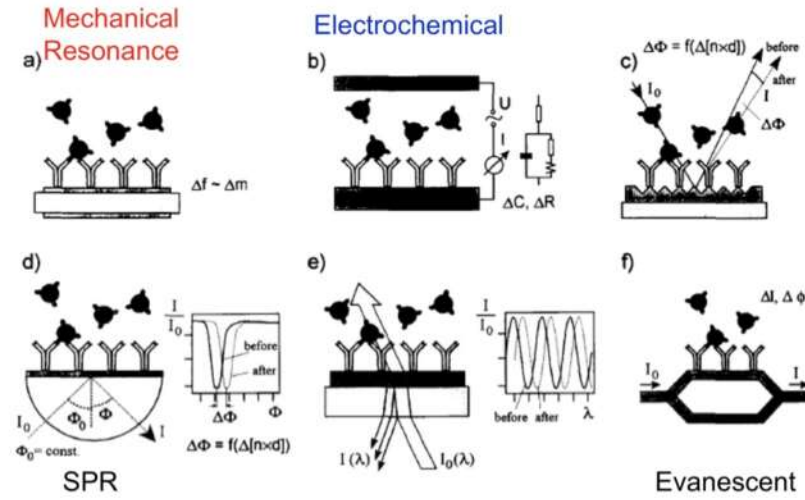
L'altro approccio è quello di lego, abbiamo una Streptavidin che è una proteina
 estratta da un batterio

Affinity used for sandwiches of molecules



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

TIPICI DI DETECTION (RICORDARLO)



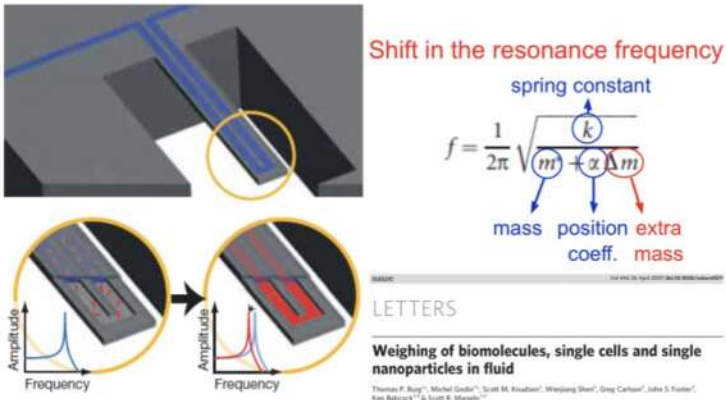
Ci sono anche delle tecniche a)/c) che studiano la presenza delle molecole in base alla variazione rifrazione della luce

d) è una tecnica molto complessa

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

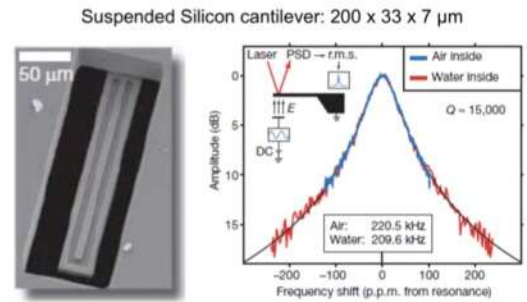
ESEMPIO DI TIPO e)

Leveraging mass-sensitive micromechanical resonance:



IN PRATICA HO CREATO UNA SPECIE DI NANO BIANCA

il risonatore è nell'ordine di grandezza di μm

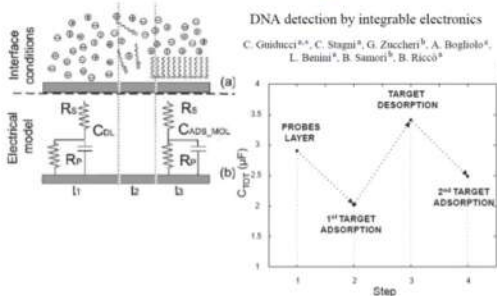


Per far risonare il sistema usiamo un piccolo campo magnetico e lo misuriamo con i laser.

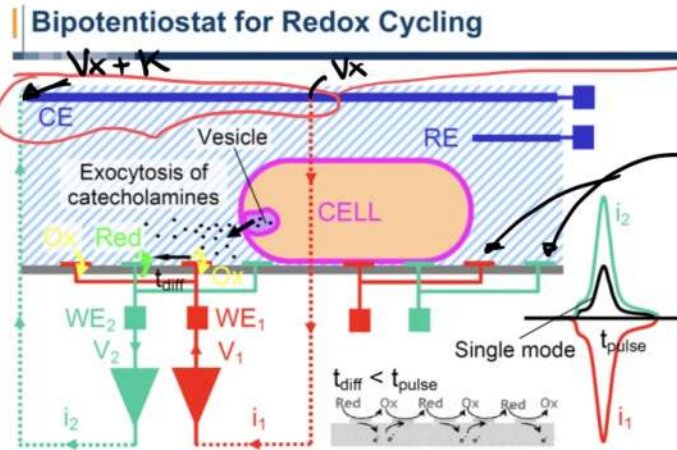
Per fare questo eseme noi siamo in un ambiente estremamente controllato (stabilizzazione umidità ecc...) Capiamo dunque che questo non è usabile in un lab on chip

CAPACITIVE DETECTION DNA

In pratica è l'esercizio che abbiamo fatto l'altro giorno



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

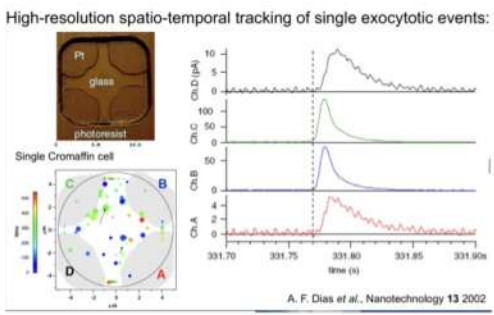


Bipotentiostat

Famiglia di 2 tipi di elettrodi:

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

SUB CELLULAR RESOLUTION (17.39)

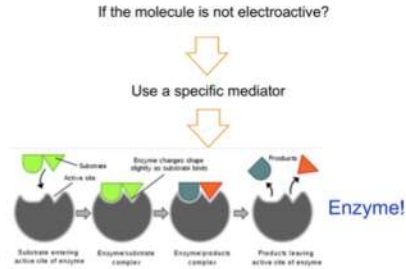


(Non ho ascoltato cosa ha detto)

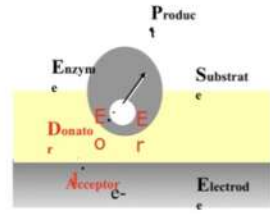
hanno funzioni diverse e noi vogliamo misurare solo un tipo di neurotrasmettitori, tuttavia essendo simili hanno voltammetria simile...

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

SE LA MOLECOLA NON È ELETTOATTIVA NON POSSIAMO USARE TECNICHE DI MISURAZIONE CHE USANO L'ELETTROCATALISI. Tuttavia possiamo risolvere facendo sì che la molecola si legga ad un enzima e questo fa sì che ci possano essere prodotti elettroattivi.



Un esempio di questa tecnica è il lettore del glucosio



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 bagno e lo attivo, ho un prodotto di reazione che è redox detectabile e perciò ottengo una corrente che è proporzionale al valore di glucosio.

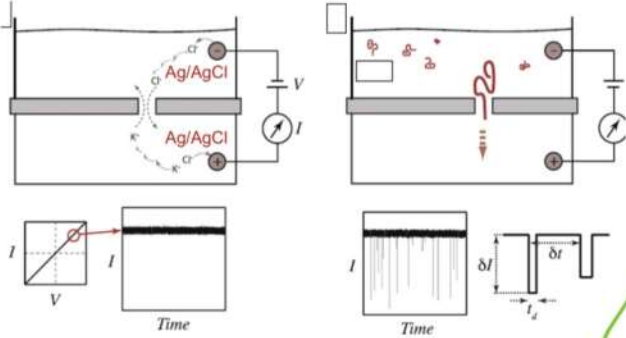
CAPIAMO CHE QUESTO È UN CASO FORTUNATO XÈ HO L'ENZIMA GIUSTO E NON HO BLOCCATO

DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

NANOSCALED TRANSDUCERS

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

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

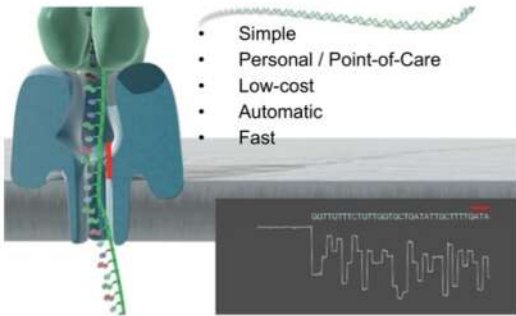


Non solo posso sapere quando la molecola passa nel buco (la molecola deve essere carica e deve avere un modo attivo per forzare questa operazione altrimenti non percepirebbe né di I), ma posso stimare ad esempio la lunghezza della catena di DNA o molte se ho un rivelatore di corrente estremamente sensibile posso vedere le variazioni di corrente di singoli pezzi di DNA (che sono n) e quindi di questi ho forme un paio diversa e quindi passa più o meno corrente.

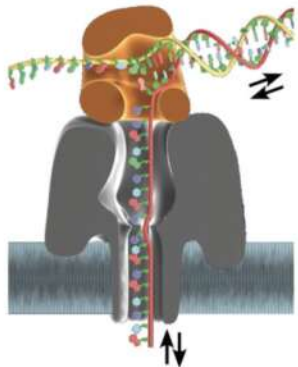
In pratica ho fatto un sequenziatore di DNA

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



Enzyme gateway



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

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

19.06.2021

2h

Simple preparation

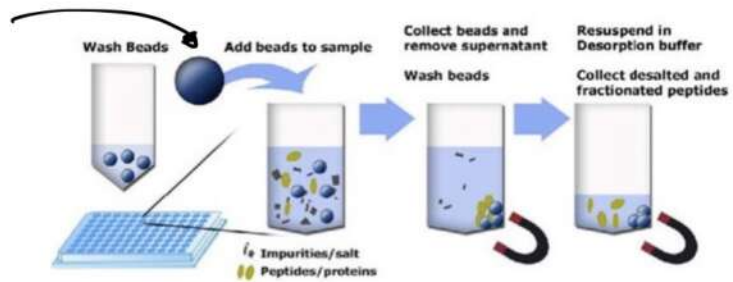
tipicamente vogliamo estrarre le molecole dalle cellule, gli step per la simple preparation sono

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

ESEMPIO DI PURIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE

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

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



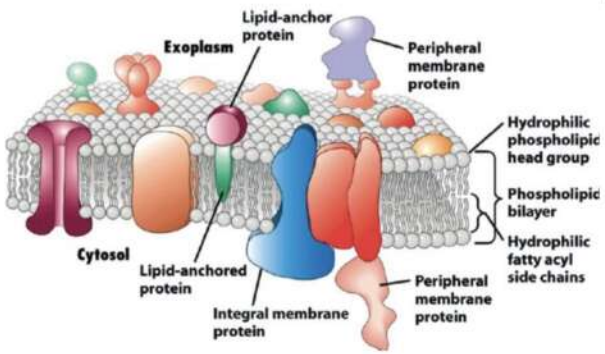
Tutto questo posso farlo direttamente in un biochip.

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

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

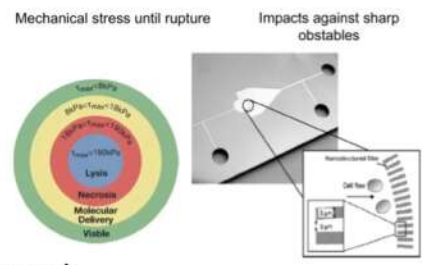
Very complex and robust: 4nm thickness, dynamical

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



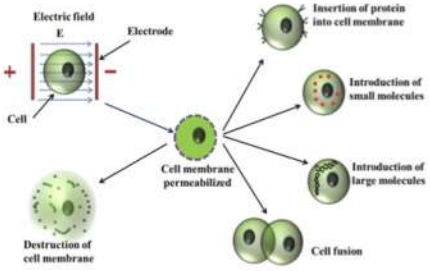
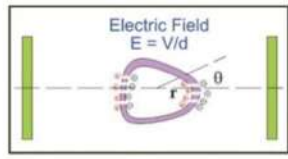
- Chimica (usa il sodio dodecil solfato, funziona e' facile ma poi abbiamo le molecole in soluzione con questo composto)

- Meccanica: con forza lanciamo la cellula contro uno degli spinteri a punta



Altre sono per compressione o tramite altre tecniche meccaniche.

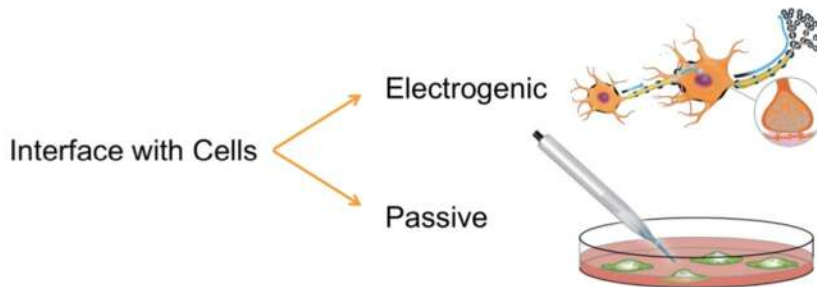
- Approccio elettrico. **ELECTROPORATION**:



se si applica un campo elettrico abbastanza alto si può distruggere la barriera della cellula. Se si usa un campo elettrico un po' più basso si può aprire temporaneamente la membrana della cellula in modo da poterci inserire dentro qualcosa. Tipicamente l'elettroporazione caso 1 è usata per riciclare il DNA.

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

Cellule



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

Direct Electrical Interface with Cells

Biological investigation mainly relies on optical microscopy

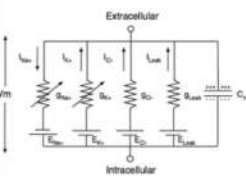
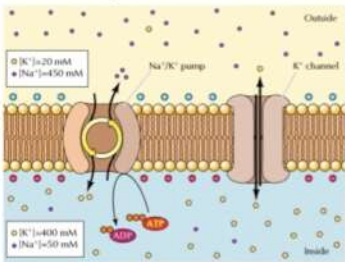
I VANTAGGI DELL'ELETTOGENICA

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

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

Electrical signals within cells are driven by ionic gradients:



Ion channels: transmembrane protein.

Se chiuso: $I = \emptyset$

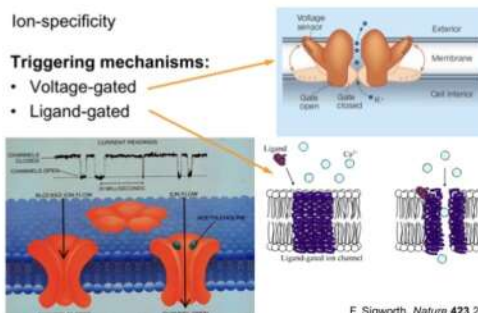
Se aperti il passaggio degli ioni è dato solo dalla diffusione

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

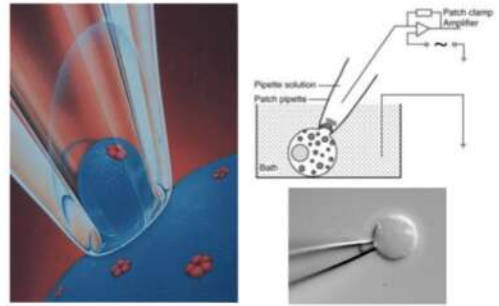
- Pumps (against diffusion, need energy)
- Ion channels (valves)
- Neurons
- Heart, muscles

Per interfacciarsi ad una cellula elettrogeica sono 3

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



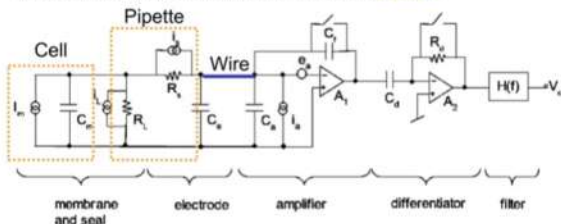
PATCH-CLAMP: Misuriamo la corrente di un singolo ION channel. Facciamo questo tramite una mini pipetta. Se siamo fortunati, nella parte che tocchiamo con la pipetta c'è solo un ION channel



la corrente di un singolo canale è estremamente piccola (per sodio e potassio 1-10pA per il calcio 0,1 pA) e abbiamo un timescale di ms. Abbiamo lo stesso problema della scorsa lezione.

L'aspetto critico è dato dagli elementi parassiti della pipetta

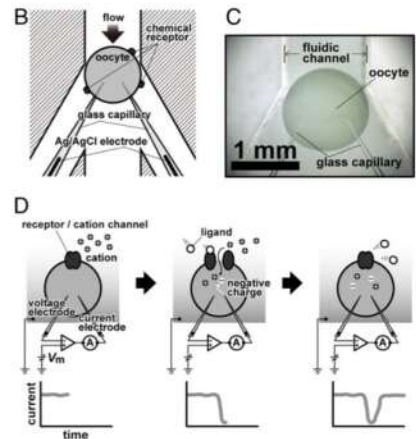
The dominating noise terms are due to the setup:



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

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

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



Live cell adrent sensor:

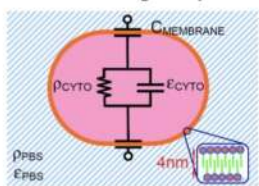
USO una molecola molto grande e ci mette dentro un elettrodo, basta uno. e misuriamo la presenza dei ION channel e quindi ci sarà una corrente

ALTRO TIPO DI CELLULE: 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



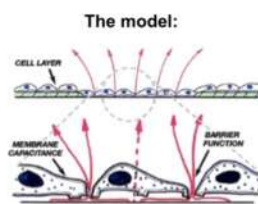
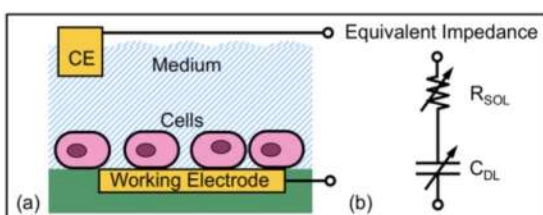
- $R_{PBS} = 66 \Omega \text{ cm}$
- $\epsilon_{PBS} = 78$
- $C_{MEM} = 0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$
- $R_{CYTO} \sim R_{PBS}$
- $\epsilon_{CYTO} = 60$

- Low frequency (below ~100kHz): insulating sphere
- Dead cells (lysis, broken membrane) are hardly discernable

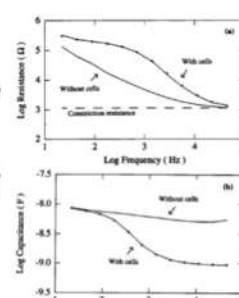
la membrana si comporta da capacità. la zona blu è il medio dove teniamo la cellula che è conduttiva. All'interno della cellula zero la resistenza e la capacità dei orto (?)

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

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



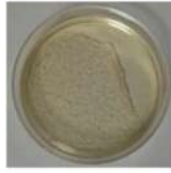
- Resistance increases
- Capacitance decreases



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

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

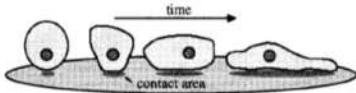
- Different mechanism are taking place:
- Sedimentation
 - Adhesion and spreading
 - Growth and reproduction
 - Response to chemo-mechanical stimuli
 - Confluence
 - Death



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

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

The contact area changes over time
Average population information



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

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

26.01.2021

2h

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

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



Questa lezione sarà sui DNA microarrays.

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

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

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

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

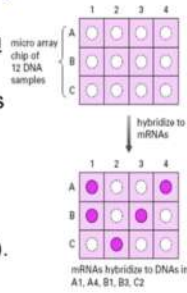
La DNA microarray funziona tramite l'ibridazione del DNA.
Praticamente quando scaldiamo il DNA sopra i 95° questo si apre (denaturazione del DNA)
Quando la temperatura cede sotto i 75° il DNA si riunisce (ibridazione) soltanto con il suo complementare (Non so se è vero).

Per fare il microarray io preparo un substrato con diversi pezzi di DNA che stanno cercando per metterlo la soluzione, sceldo e poi scagno 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



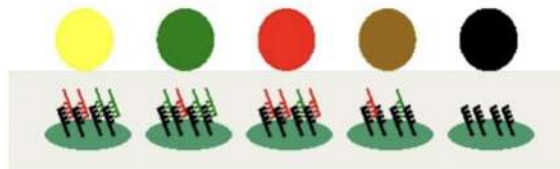
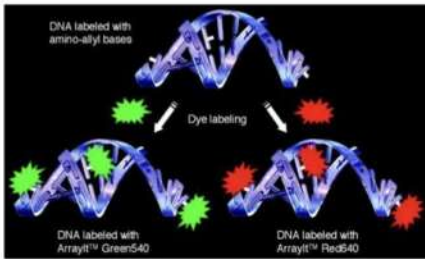
il metodo preferito per vedere se ho il DNA è per la fluorescenza. Posso fare questo attaccando chimicamente molecole fluorescenti al DNA prima dell'ibridazione.

Tramite la fluorescenza si possono usare anche più colori

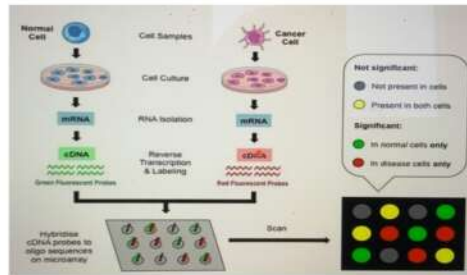
Two colors: Comparative tests

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

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



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

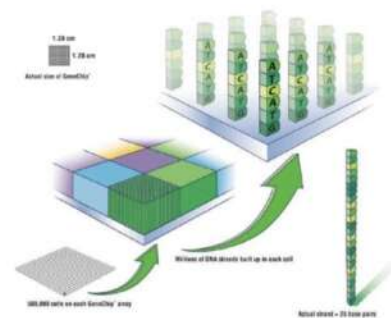
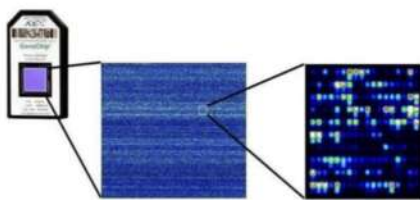


High density microarrays

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

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

Detail of microarray

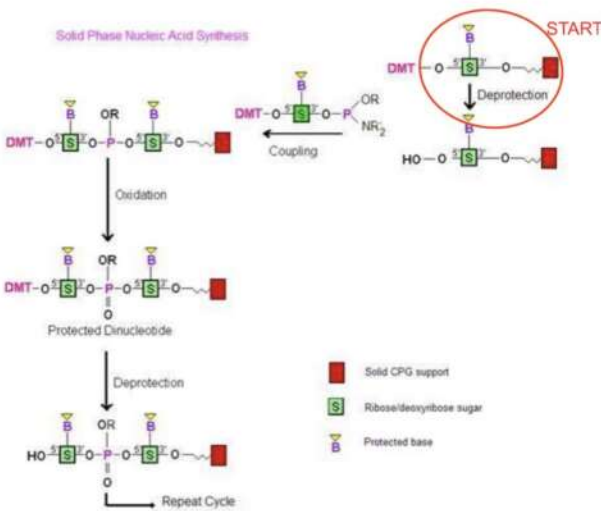


Come si può avere questo microarray e come facciamo ad avere il DNA che mettiamo sul microarray e come facciamo a impilarlo e tutto?

Artificial DNA synthesis

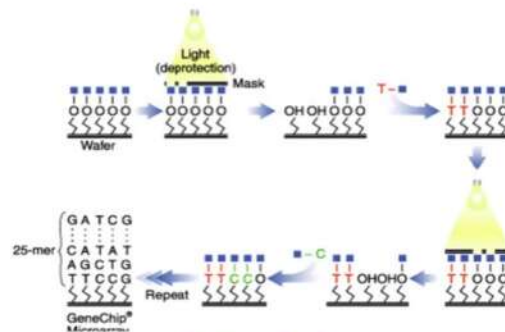
- We start with a base linked on its 3' end on a solid medium (i.e. Porous column, Bead, chip). The 5' end is protected by a 'capping' (DMT=Dimethoxytrityl), preventing the formation of other bonds.
- 1: DMT is chemically removed (i.e. with trichloroacetic acid TCA), the 5' carbon becomes reactive. The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

Il DMT nelle basi è molto importante perché blocca la possibilità che io per sbaglio possa mettere tante basi uguali una dietro l'altra e avere una scala tipo AAAAAAAAABBBBBBB... quando io volevo solo AB.



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

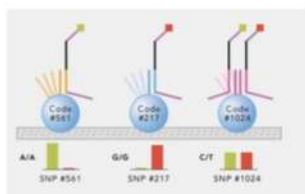
Per distruggere il DMT posso usare anche luce UV, grazie a questo e grazie alla fotolitografia posso a togliere il DMT solo dove devo e non a tutto.



Un altro modo di fare i microarray è quello di illumina 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 rimosse ecc..

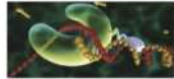


PCR (Reazione a catena della polimerasi)

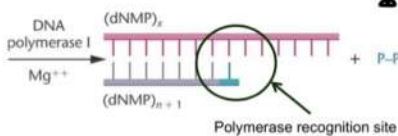
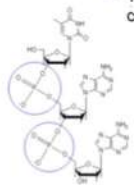
Permette di replicare in vitro copie identiche di un campione DNA iniziale. In pratica permette di amplificare il segnale.

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

DNA polimerase



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



Come fa il polimerasi a duplicare il DNA?

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

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

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

- For the reaction to happen it is required in solution to be present:

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

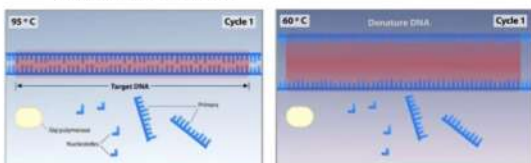
← i pezzi che la polimerasi andrà ad attaccare sul DNA

3 phases: Thermally driven:

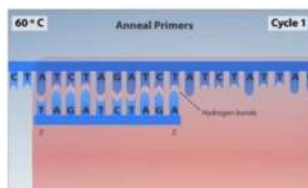
- Denaturation
 - At temperature around 100 C, the 2 DNA strands separate
- Annealing
 - At lower temperature (60 C), the single strands hybridize with primers, selecting the portion to be amplified
- Extension
 - At medium temperature (70 C), the polimerase start working, duplicating the DNA

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

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



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



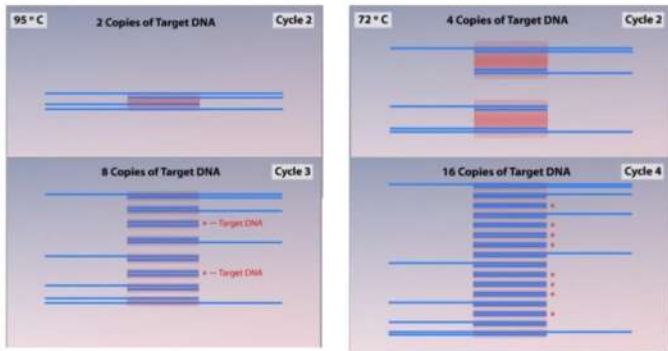
- Extension: the active phase of the reaction: starting from primers the new nucleotides are incorporated
- The temperature depends on the enzyme. Usually is about 72 degrees
- The result is a new DNA strand, starting from the primer and proceeding in 5' to 3' direction



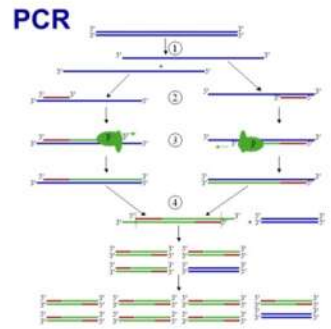
Quando raffreddiamo il primer si attacca al DNA

← Sono le linee da zero all'inizio l'altra parte è la base + PCR, il PCR funziona solo in una direzione

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



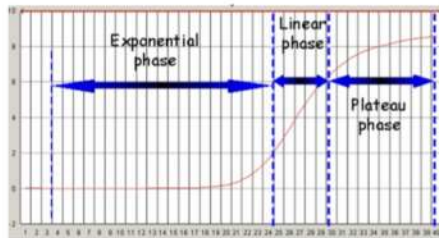
Capriamo quindi che andando avanti amplifichiamo solo il segmento del Primer e non tutto il DNA.



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

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

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



Usi della PCR

PCR to increase microarray sensitivity

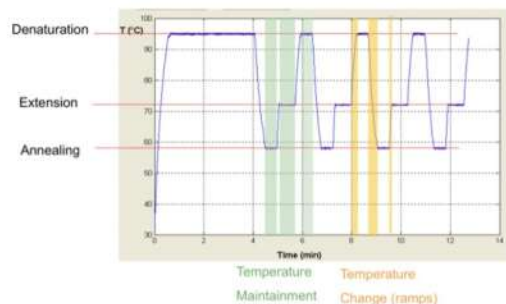
- Microarray signal is proportional to the DNA quantity
- If in the sample there is low DNA concentration, a direct hybridization may not be enough to detect the signal
- If a PCR is made before the microarray test, the potential DNA target is amplified and so become detectable.
- Quantitative information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

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

L'informazione sulla quantità iniziale di DNA sono perse

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

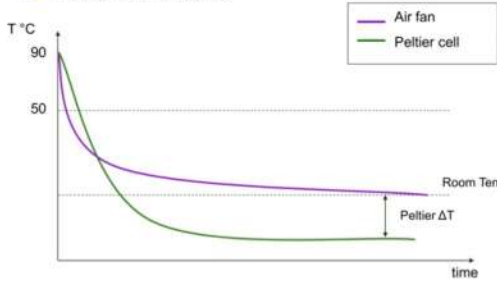
- **T denaturation**
 - Too high: polymerase can be damaged No reaction
 - Too low: DNA does not denature completely Low efficiency
- **T hybridization**
 - Too low: primers may bind a-specifically, amplifying unwanted DNA Wrong result
 - Too high: Primers do not bind. Low efficiency / No reaction
-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



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

Cooling

- The fastest the better!



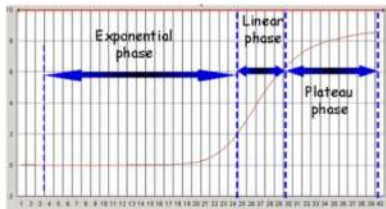
Peltier è + lenta ma va a meno gradi.

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.

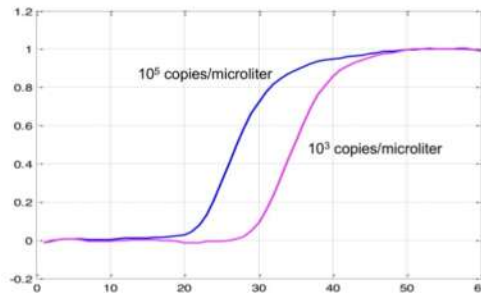
De non confondere con RT PCR che sta per reverse transcribed PCR.

← In pratica con questa prendo anche la quantità.



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

DNA Concentration



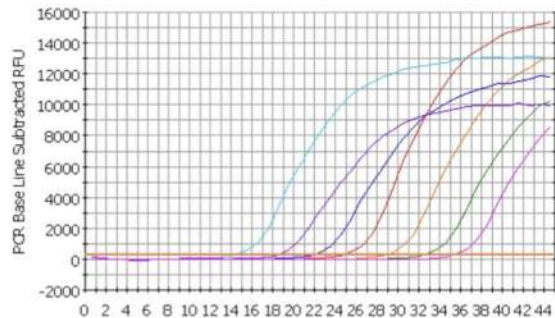
Abbiamo differenza solo in mezza all' amplificazione

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

PCR efficiency

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

→ Esempio con 7 campioni con diversi valori di concentrazioni



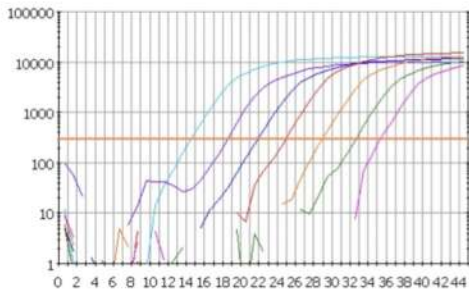
Il campione viola è diluito 1 milione di volte il primo (azzurro)

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

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

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

...In log scale



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



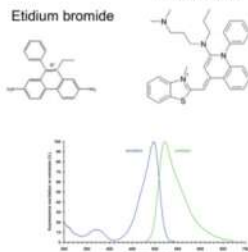
- The value of C_T varies linearly with the log of the initial concentration of DNA, on several orders of magnitude.
- Knowing the C_T (and the calibration curve) it is possible to obtain the value of the initial concentration

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

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

DNA Intercalants

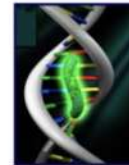
- Are molecules that fits inside the grooves of the DNA double helix
- Normally they are not fluorescent. They emit fluorescence only when coupled to DNA
- In a solution with excess of intercalants, the measure of fluorescence is directly proportional to the DNA concentration.



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

SYBR Green: principle

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



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

TaqMan probes

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

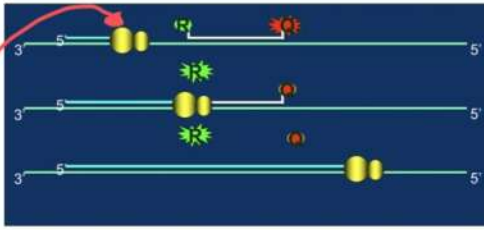


Ho una molecola verde e rossa, se queste sono abbastanza vicine sotto una luce fluorescente risultano buie. Per avere alla stessa distanza R e Q sono attaccate ad un pezzetto di DNA.

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

È la polimerasi quella che fa polymerase con il DNA.

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



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

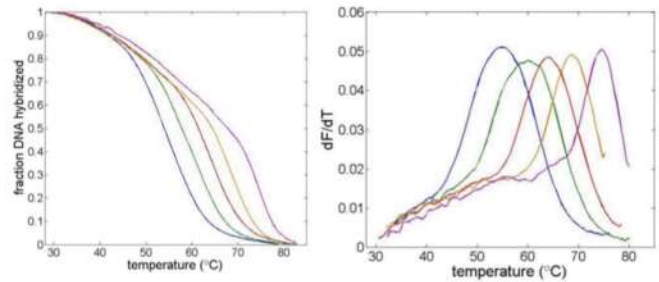
il prodotto di DNA che usiamo è un pezzo di DNA complementare che vogliamo rilevare

Questo l'ha fatto molto-molto veloce.

Melting curve

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

Melting curves



In base al picco si possono discriminare 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 60C
 - Faster than PCR, typ 10-15 min (continuous time)
- Disadvantages
 - Not quantitative (no cycles → no Ct → no calibration curve → no concentration)

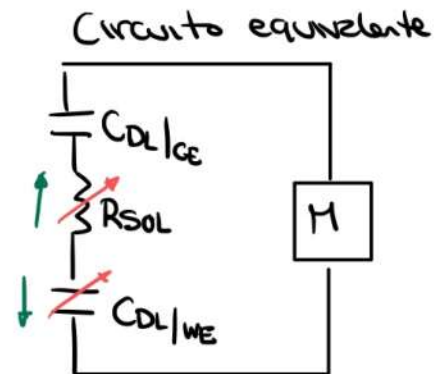
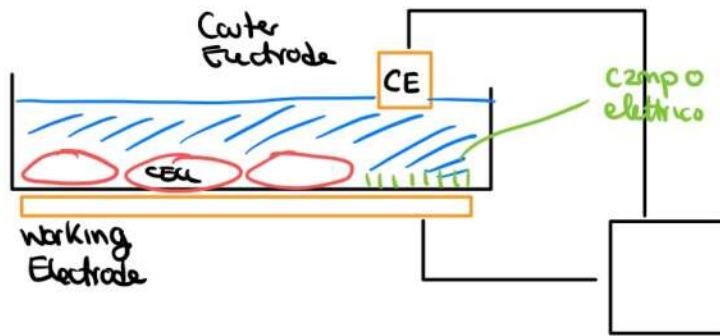
è più veloce della PCR classica ma non possiamo fare un quantitativo approssimativo con questa tecnica

Inoltre sono zone più difficili da realizzare

RITORNA LEZIONE CON IL CERMVATI

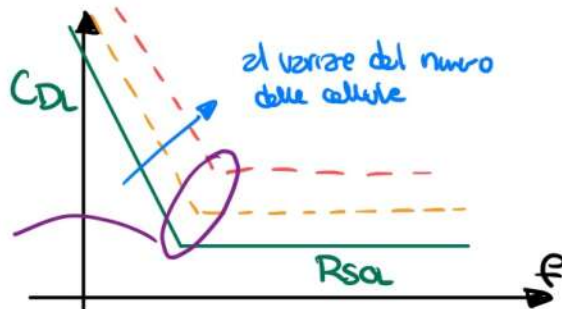
Controllare le cellule in modo dinamico.

Quando abbiamo una cellula in una soluzione ionica abbiamo un elemento ad alta impedenza dentro un liquido a bassa impedenza. Avviciniamo parlato della crescita delle cellule in un pozzo di Petroli.



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

$|Z(t, f_0)|$

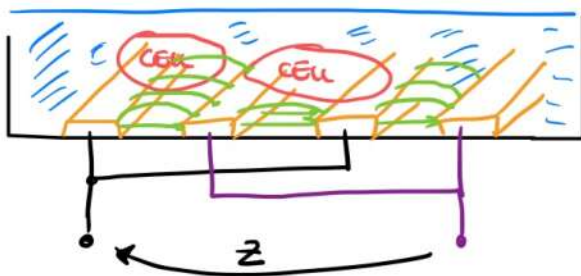


Tipicamente $CDL|CE$ è na la consideriamo perché è molto grande

qui ho la maggiore sensibilità

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

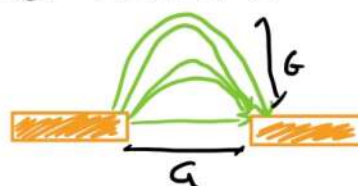
Questa era la vertical configuration, esiste anche un altro tipo di struttura filare:



Complanar Configuration

Quello che cambia rispetto a prima è il campo elettromagnetico E

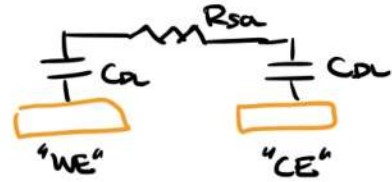
Possiamo dire che se la distanza tra gli elettrodi è G allora anche le linee del campo si allargano di una distanza G



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, perciò il livello d'interazione tra cellula e campo elettrico è diverso



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

IMPEDANCE FLOW CYTOMETER

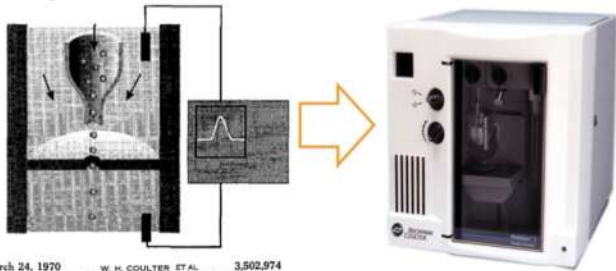
Vogliamo rilevare la presenza di cellule che viaggiano nel nostro microchannel

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

Invented by W.H. Coulter 1950

A routine lab. instrument

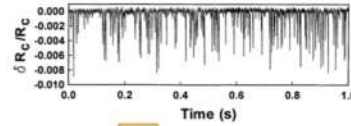
il picco di altezza di impedenza misurato è dipendente dalla grandezza della cellula quindi possiamo discretizzare le dimensioni delle cellule.



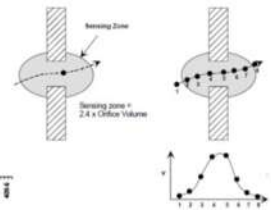
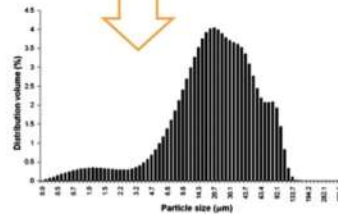
March 24, 1970 W. H. COULTER ET AL. 3,502,974 SIGNAL ANALYSIS APPARATUS FOR CONDUCTANCE AND RESISTANCE MEASUREMENTS IN A REGULATED CURRENT PAIR FOR PARTICLE CLASSIFICATION AND ANALYSIS Filed May 25, 1968 9 Sheets-Sheet 1

Measures DC resistive pulses for cell counting and sizing

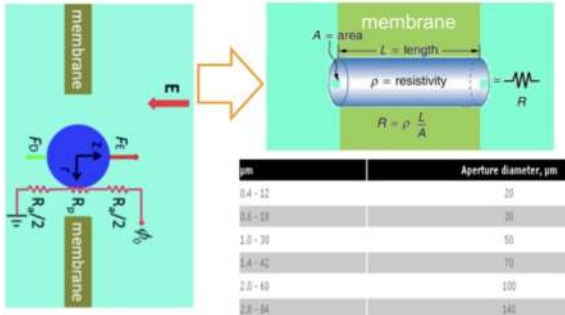
Tipicamente la parte con il micropro è intercambiabile.



$$\frac{\Delta R}{R} \approx \text{Volume}$$



For circular holes:

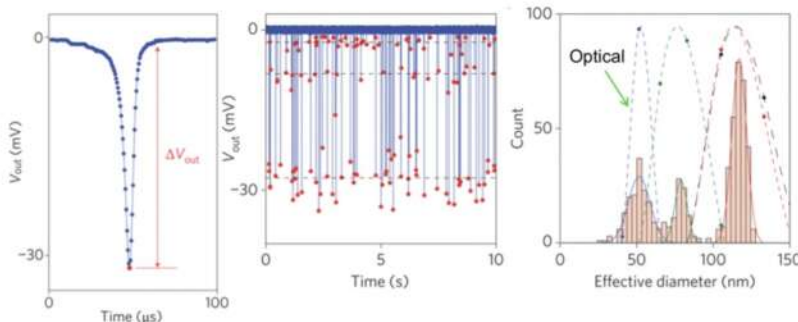


Aperture diameter, um	
0.4 - 12	25
0.5 - 15	35
1.0 - 30	50
1.5 - 45	75
2.0 - 60	100
2.5 - 84	140

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

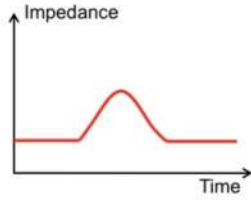
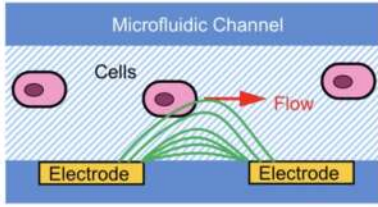
Vogliamo essere veloci a rilevare queste cellule, solo che c'è il solito trade off velocità rumore visto che per andare più veloce devo aumentare la banda dell'amplificatore

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



Qual'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 perde molto in sensibilità.

Possono trovare un modo di misurare le cellule senza contatto

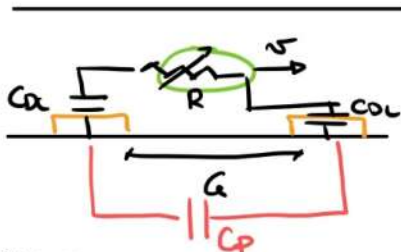


Usiamo il metodo di prima solo che qui le cellule navigano senza toccare l'elettrodo ma comunque vedo un cambiamento d'impedenza.

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

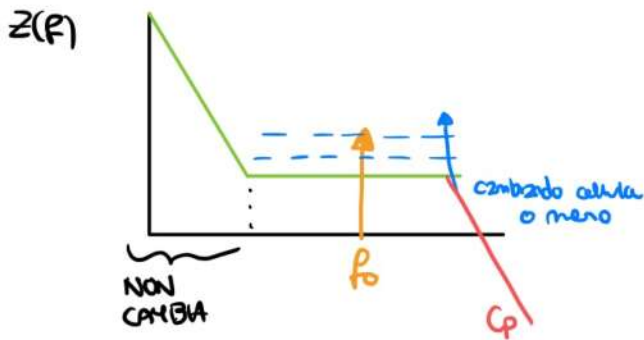
- A novel approach, pioneered by Morgan and Renaud (~2000)
- Tracking impedance between close electrodes over time
- Measurement in AC (to bypass double layer)
- High-throughput single-cell analysis (beyond sizing)

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



$$\Delta t = \frac{C}{V} \quad \text{tipicamente } \approx 91 \text{ ns}$$

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

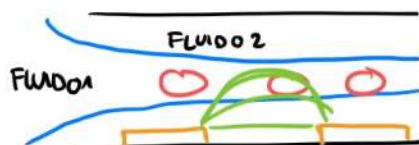


f_0 è il punto ottimo in questi casi dove fare la misurazione

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

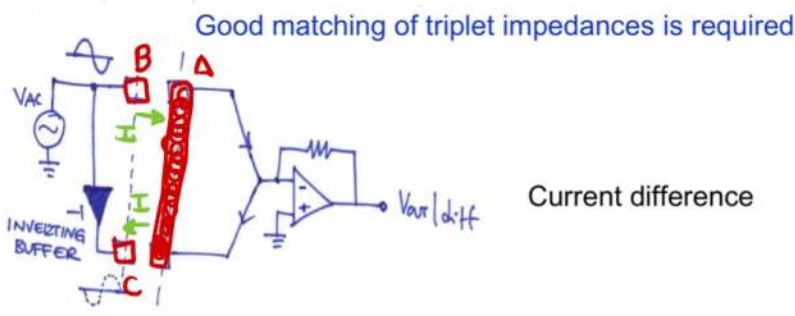
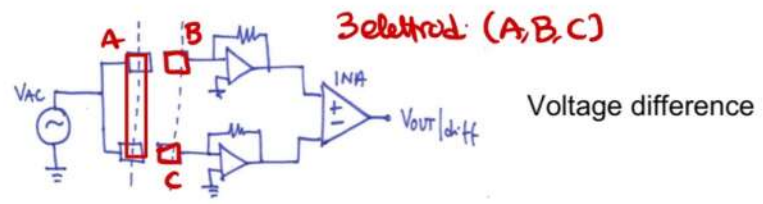
Un altro problema di questa tecnica è che l'altezza della variazione del picco di impedenza dipende dalla altezza cui passa la cellula, più la cellula è vicina agli elettrodi più il picco è alto (2 parti di volume).
 QUESTO È UN PROBLEMA SE VOGLIO ESTRARRE LA GRANDEZZA DELLE CELLULE.

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



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

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

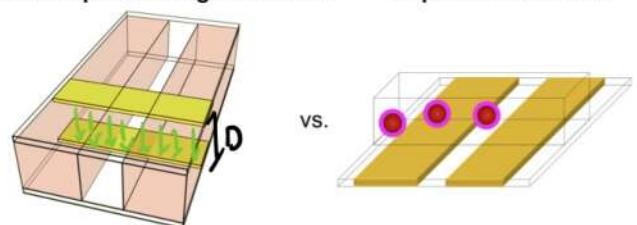


In condizioni di bilanciamento la corrente nel transimpedenza ampli è 0 quando non ha differenza allora non una corrente che entra nell'ampli

Quale tra i 2 è meglio? Dipende

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

Parallel-plate facing electrodes vs. Coplanar electrodes



- Pros:** signal independent of vertical position
- Cons:** difficult fabrication and alignment, clogging
- Pros:** ease of fabrication, no clogging (if focusing)
- Cons:** inhomogeneous field (vertical dispersion sensitivity, no simple expression)

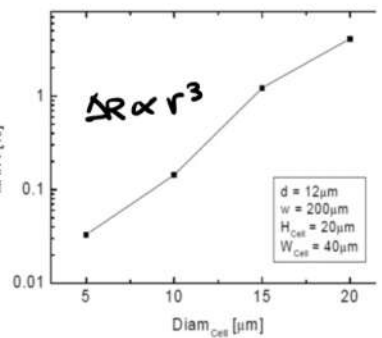
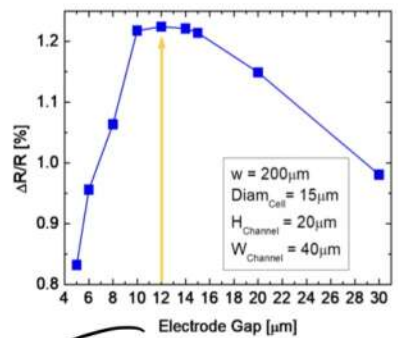
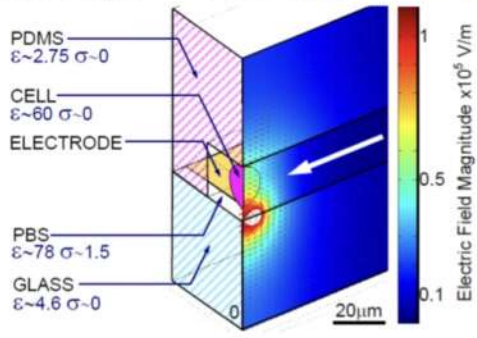
Uno dei lati negativi del caso coplanare è che il campo magnetico da calcolare è un cerchio.

- 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

Design of a Sensitive Electrode

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

- coplanar
- transverse
- 20 x 40µm²

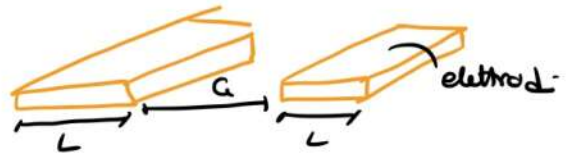
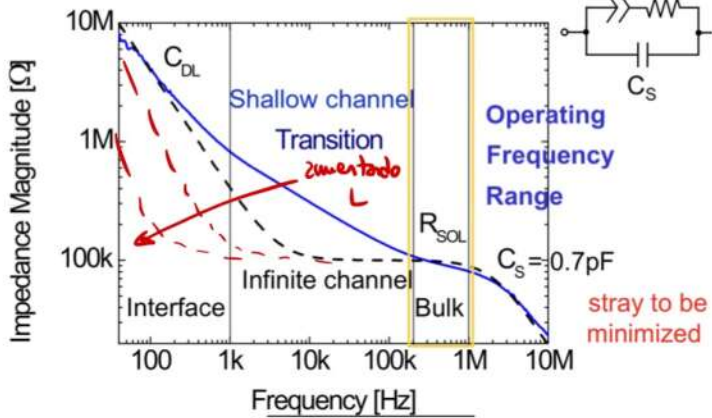


Distanza tra elettrodi

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

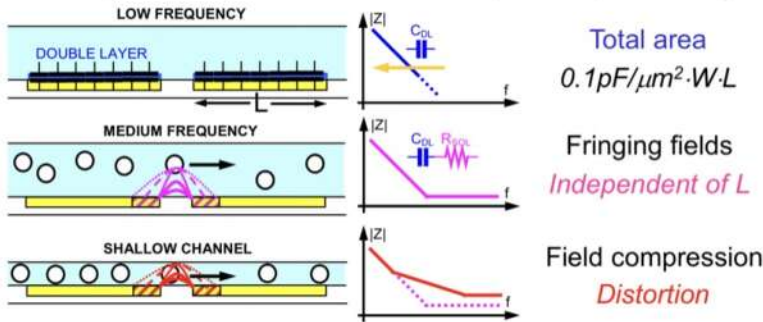
Un elemento importante è dato anche dalla lunghezza (larghezza) dell'elettrodo, perché la Double layer capacitance dell'elettrodo è dipendente della zona dell'elettrodo se zutto L zutto la zona del platou

Four regions in the impedance spectrum:



la curva nera tratteggiata è quella ideale, nella realtà vedo che ho più Impedanza (linea 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 (ho ridotto il canale)

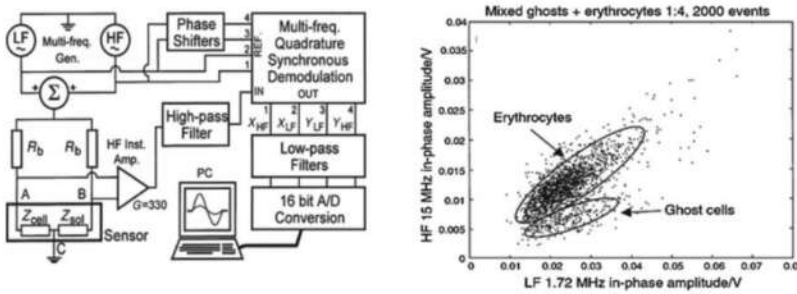
Different geometric parameters control separate spectral regions:



Questo fatto rende praticamente inutile fare un zutto della L degli elettrodi per zuntire il platou perché zuntò sempre il canale piccolo e ci sarà sempre questo effetto.

- 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**



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

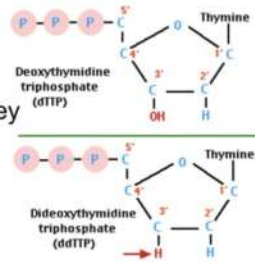
Two frequencies 1.7MHz and 15MHz

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

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

Prima generazione di sequenziamento (198x - 2004)

- Sanger method (Chain termination "dideoxy").
- In the PCR mix, beside the normal deoxy-triphosphate nucleotides, a small percentage of dideoxy-triphosphate 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

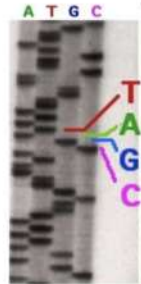


Teorica simile al PCR, la polimerasi aggiunge una base alla volta. Il DNA si attacca tra la 3^a e la 5^a base

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

Dna sequencing

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



Facciamo 4 test, ognuno modificato per una base.

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

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

In pratica credo che in pratica per ogni base ho tanti DNA di lunghezza diversa d'incremento da due cioè 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 realizzare con l'elettroforesi, ma non si può sequenziare direttamente tutto il genoma tipo quello umano con l'elettroforesi: si usa lo shotgun sequencing (cioè sequenziano piccole parti di DNA).

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.



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

ATTENZIONE !! lo il DNA cioè l'ho in diverse copie quindi lo spacco tutte e spaccandole casualmente zero delle parti che si sovrappongono.

Allora io sequenzo tutti i pezzi e poi con un SW io mi accorgo delle parti che si sovrappongono e allora unisco le 2 parti.

ATTENZIONE! potrei non riuscire a sequenziare tutto

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

Second Generation sequencing

Second generation

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

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

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

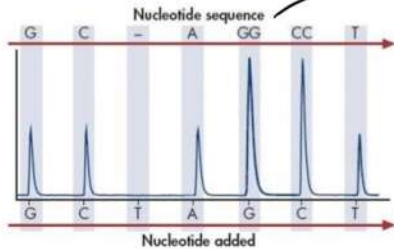
Prendiamo questa libreria e la mettiamo sull'array e sopra questa iniziamo a flushare sopra basi pure. Grazie ad un

effetto tipo PCR queste basi si attaccheranno alle loro basi complementari. Grazie a una tecnica che non ricordo vedo due queste basi si incorporano e quindi so che questa base è presente. Il grande vantaggio è che questo avviene in contemporanea per tutti i pezzi di DNA della "libreria": quindi riesco a prendere molte informazioni in parallelo.

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

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 ke' 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.

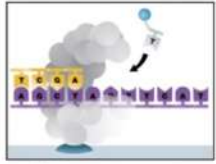
3a generazione di sequenziamento.

hanno sempre un array ma non va bloccato il DNA ma bensì la polimerasi

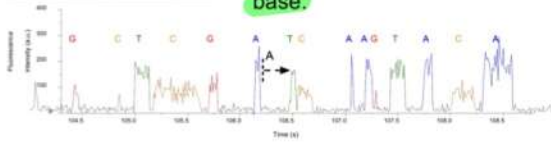
NON CI HO CAPITO NULLA !!!

lezioe (17.35)

Working principle



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



In pratica vedo che per zone la fluorescenza re: illuminano in un modo qualitativo la parte solo eterno e che è avvenuta la reazione.

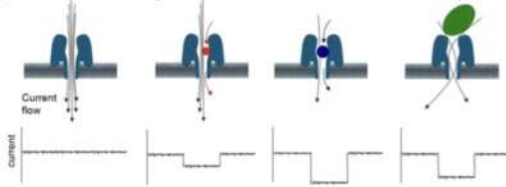
Il vantaggio è che noi dobbiamo fare flow e wash perché il DNA passa da solo nella polimerasi.

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

4^a generazione: Nanopori

Towards 4th generation: nanopores

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



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

Ci sono di nanopori nella membrana. Si basa sulla corrente che passa nel buco. (Stessa roba vista con il carminetti)

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

Più che altro è un metodo complementare rispetto ai precedenti; infatti tipicamente viene usato complementemente con la shotgun per "scegliere" la base che ci sta meglio.

Con la shotgun infatti posso vedere delle cose tipo il DNA che si è ricombinato.

12.05.2021

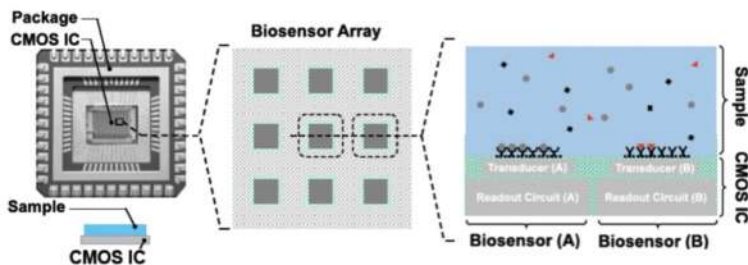
Lezione

2h

CMOS BioCHIP

Ci si aspetta che la microelettronica stenda nel campo medico.

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

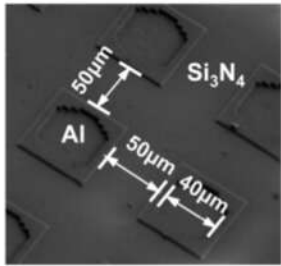


Aluminum of metal lines and bonding pad is too reactive and must be «converted» into gold or platinum for electrochemical detection.

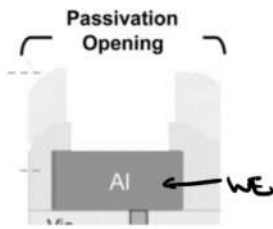
The top passivation (Si_3N_4) is waterproof.

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

Il problema 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'elettrochimistry. Abbiamo visto che il top sarebbe oro o platino.



CMOS Cross-section

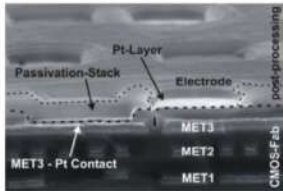


Abbrazzo che l'elettrodo e' qui, in una sorta di buco, questo succede per come e' stato creato il circuito (per passivazione?) questa montaggio puo' ridurre il movimento del fluido e la diffusione.

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

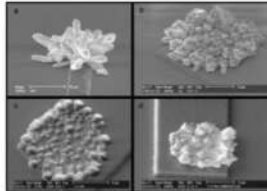
non c'è sic la montaggio. Si può fare questo ci sono 2 modi:

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

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

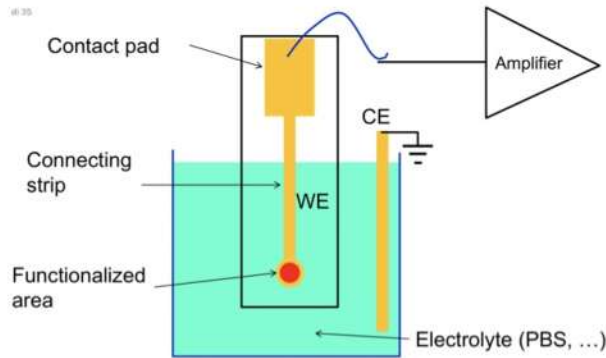
Lo svantaggio e' che non sono molto belli con questa tecnica

Qual'è l'impetto di avere il silicio come substrato di supporto?

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

Ci sono svantaggi ad avere il silicio come substrato però?

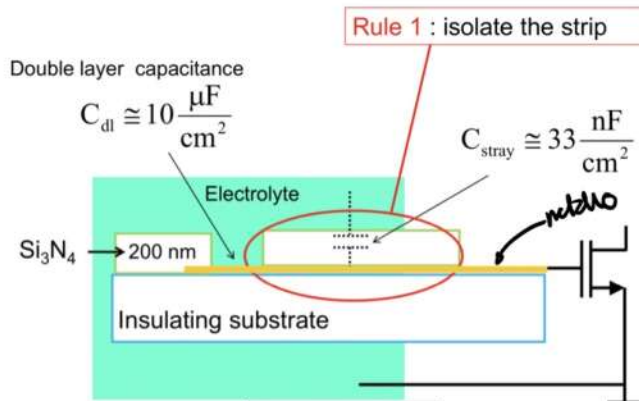
Sì, supponiamo di essere in una situazione del tipo



Possiamo avere 2 casi:

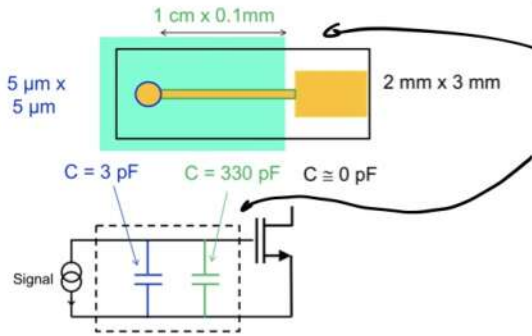
- Substrato isolato
- Substrato di silicio

Substrato isolato

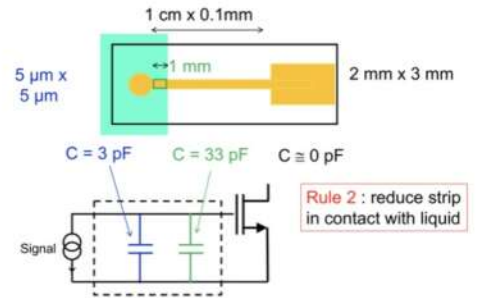


Avremmo comunque una capacità parassita dovuta al fatto che il metallo è isolato dal substrato da un piccolo strato di materiale isolante. Al contrario nel caso del vetro la zona isolante era molto alta e quindi la capacità era molto piccola.

Per ridurre questa capacità: Fare l'isolante + spesso possibile, e ridurre la lunghezza inutile per la quale sotto il working electrode non c'è acqua

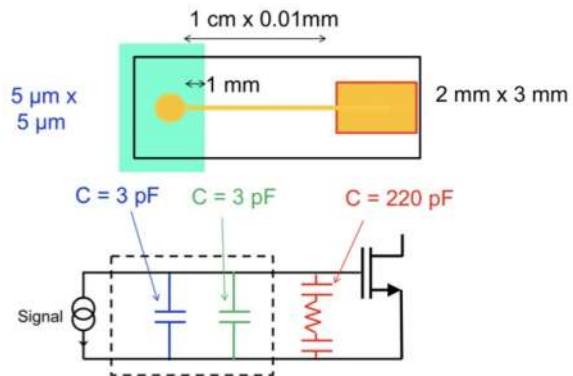
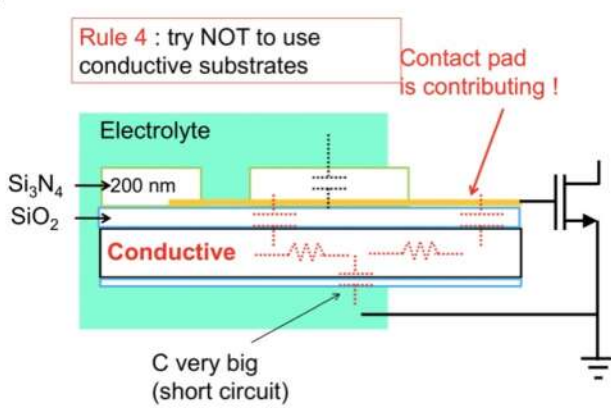


Se al posto di mettere dentro l'acqua mettiamo dentro solo il WS riduco questa capacità



Substrato di Silicio

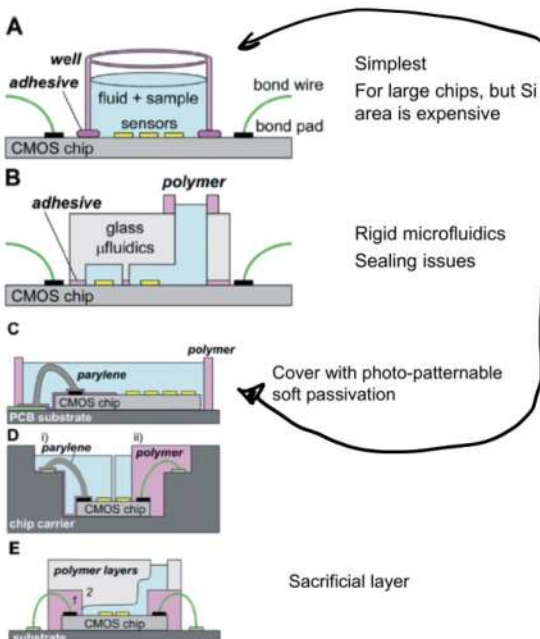
In pratica non c'è il substrato di silicio e sopra il silicio non c'è il metallo e l'isolante, il problema è che il silicio in pratica diventa conduttore.



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

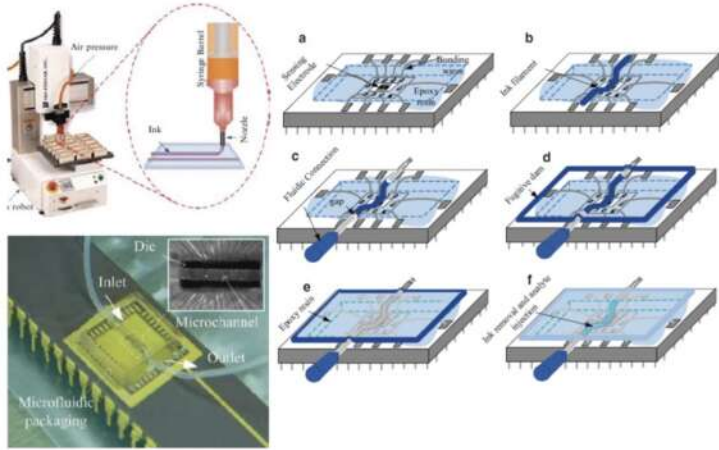
Packaging

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



Possiamo mettere un container per avere il fluido solo sulla parte di chip, il problema è che di solito la parte microfluidica è molto più grande di quella del chip, allora si può fare una rete nel caso ci copriamo tutto con un polimero e poi lo togliamo dove ci serve, ma è difficile dal punto di vista del substrato e materiali (quando intendo che è difficile pulire bene tutto)

Si può anche fare con un "filamento sacrificabile"



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

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

TESI INTERESSANTI PER IC

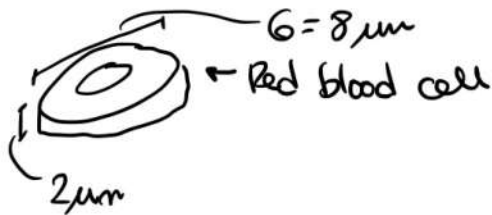
31.05.2021

Esercizi

2h

Esercizio sulla parte 1

Determinare la dimensione di un canale per aumentare e trasportare Red Blood cells con $Q = 1 \mu\text{l}/\text{min}$



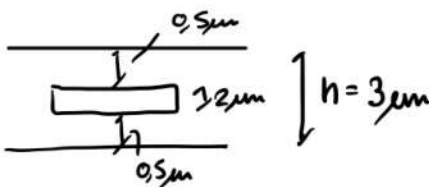
Voglio realizzare un canale piccolo abbastanza perché siano in linea un 2 RBC alla volta



Supponiamo che nella Top view perdano un micro per ogni lato



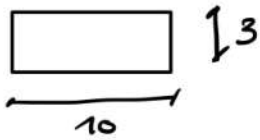
Nella side view



Dimensioni del canale per due celle zwinete.
Non considerano la possibilità del clogging

Non abbiamo un numero di cellule da 2e nel canale per ricreare la lunghezza. Perci ric supponiamo lunghezza 1mm.

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



$$\frac{3}{10} > 1,4$$

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

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

Allora

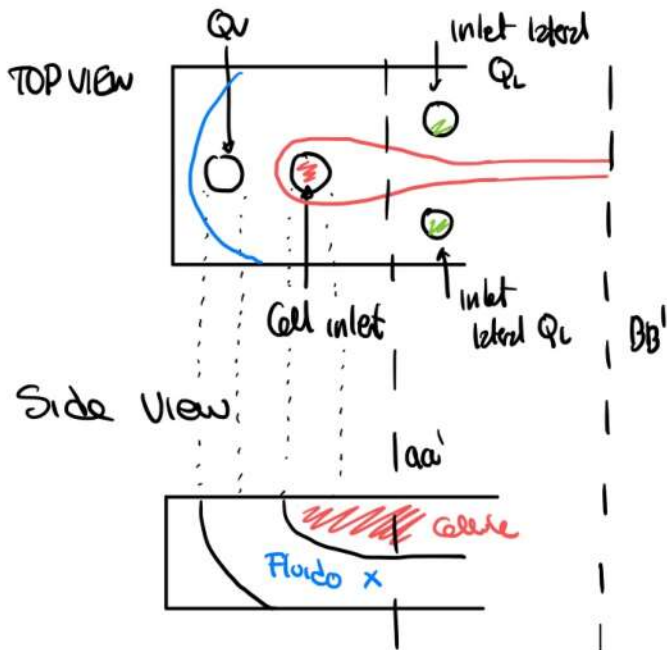
$$\Delta P = Q \cdot R = 10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{min}} \cdot \frac{10^{-3}}{60} \cdot 56 \cdot 10^{15} = 937 \text{ kPa} \approx 9,32 \text{ atm}$$

Numero decisamente troppo grosso (per un siringa abbiamo al max 7 atm ma proprio all'esterno)

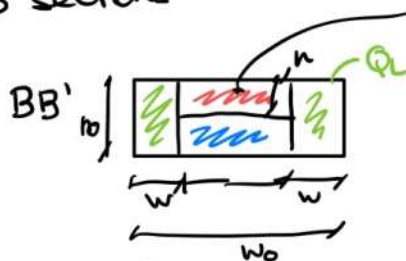
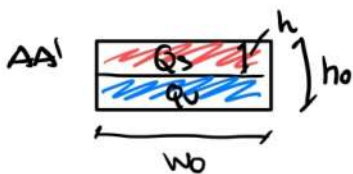
NON REALIZZABILE !!

Quelle soluzione possiamo avere per avere cellule dirette ma pressioni minori
 Usiamo il hydrofocusing
 Come facciamo a dimensionare i fluidi laterali?

Decidiamo ora $h_0 = 10 \mu\text{m}$ e $w = 20 \mu\text{m}$ (ricordiamo che nella resistenza e l'altezza al cubo quindi se raddiamo R si radda e P diminuisce)



Abbiamo definito 2 cross sections



Q_s quello che usavo, ho ridotto il canale sia di lato che di altezza

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

Dobbiamo trovare Q_v e Q_l per far uscire il canale di quelle dimensioni

Partizmo da AA'. La velocità di qualsiasi polo nella top region = e qualsiasi polo della bottom region

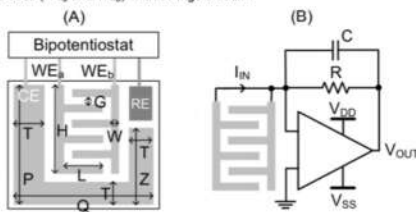
$$v = \frac{Q_S}{W_b \cdot h} = \frac{Q_U}{W_b \cdot (h_0 - h)} \rightarrow Q_U = \frac{Q_S \cdot (h_0 - h)}{h} = 2,33 \mu\text{l/min}$$

Adesso usiamo BB' per sapere la larghezza

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

Passiamo ora a esercizio tipo 2.

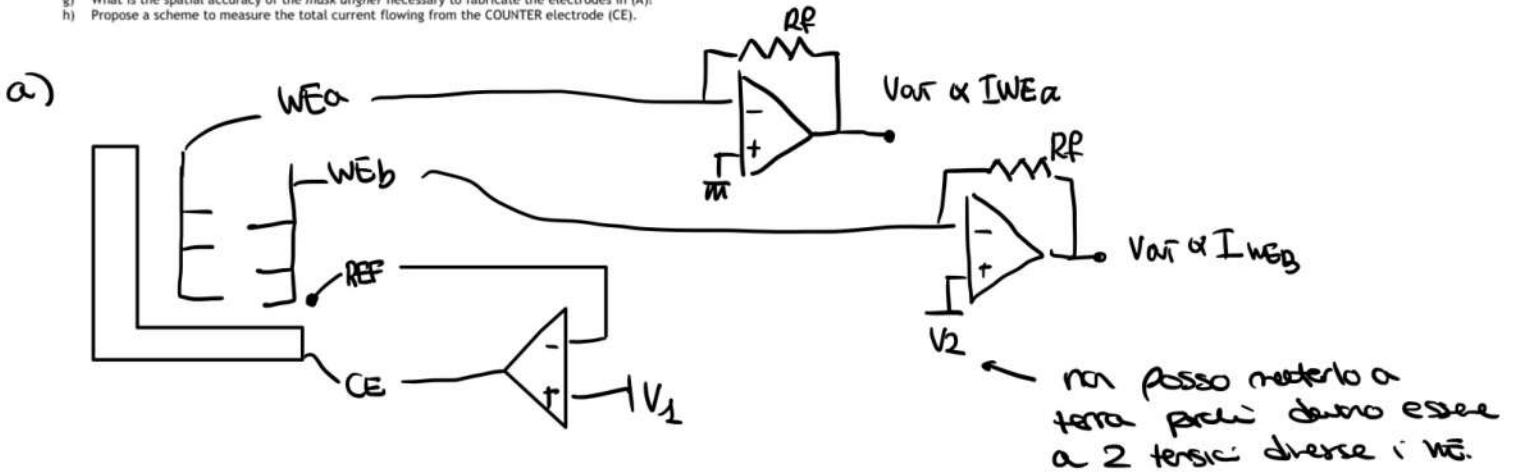
Exercise 2
Consider the following set of microfabricated planar electrodes, including a pair of interdigitated working electrodes (WE_a and WE_b) with 3 fingers each:



- W = 5 μm
- G = 5 μm
- H = 60 μm
- L = 50 μm
- T = 30 μm
- P = 100 μm
- Q = 100 μm
- Z = 60 μm
- C_{dl, PBS} = 0.1 pF/μm²
- R = 100 kΩ

Draw the correct signs of the opamp input terminals

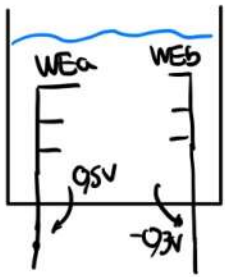
- a) Draw the detailed scheme of a Bipotentiostat connected to the electrodes shown in (A).
- b) For the Bipotentiostat of point a), set the biases in the circuit in DC in order to have the potential of WE_a = +0.5V (with respect to the solution), and the potential of WE_b = -0.3V (with respect to the solution).
Now consider both working electrodes connected together to a single current amplifier as shown in (B):
- c) Determine the value of the double layer capacitance C_{dl} connected at the amplifier input when the electrodes are in PBS. Is the C_{dl} of the counter electrode (CE) negligible?
- d) 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.
- e) Now considering the input equivalent voltage noise source of the opamp e_n = 3 nV/√Hz, determine the value the corner frequency and plot the input-referred noise spectrum.
- f) 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?
- g) What is the spatial accuracy of the mask aligner necessary to fabricate the electrodes in (A)?
- h) Propose a scheme to measure the total current flowing from the COUNTER electrode (CE).



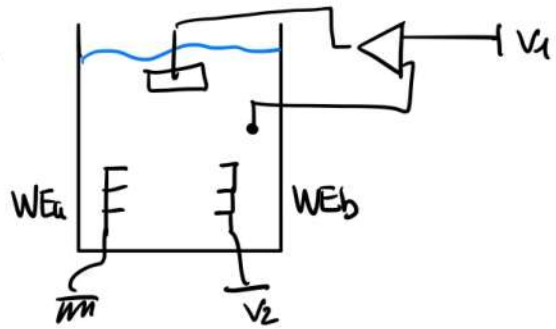
b) Scegliamo i valori di V1 e V2 per soddisfare i valori

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

WEb = -0.3V sempre rispetto alla soluzione

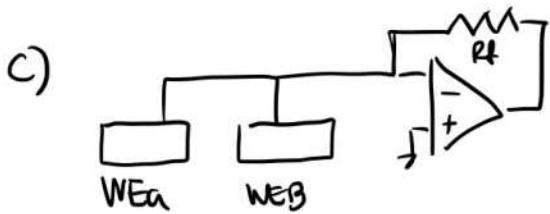


Però noi abbiamo zeta



Visto che WEA è a terra dobbiamo mettere il fluido a -0.5V così WEA si trova a 0.5V sopra la tensione del liquido.

$V_1 = -0.5V$ e quindi $V_2 = -0.8V$



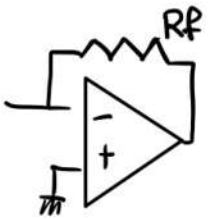
$C_{DL} = Area \cdot C_0$

PBS/Gold
 91 pF/ μm^2

Area counter electrode = 600 pF

Area working electrode = 20 pF.

d) NOISE



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

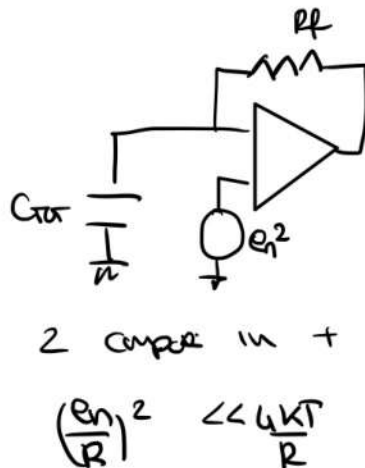
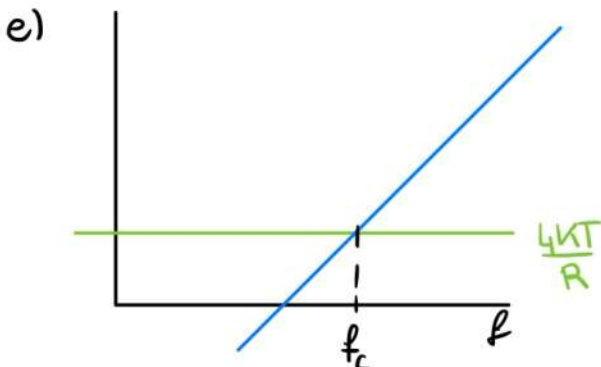
$$\sigma = \sqrt{\int \frac{4kT}{R} \cdot |H(f)|^2 df}$$

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

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

Da $BW = \frac{1}{2\pi RC}$

$BW = 25 kHz \rightarrow BW = \frac{1}{2\pi RC} \rightarrow C = 60 pF$



+ compute $(en 2\pi G_{TOT} f_c)^2$

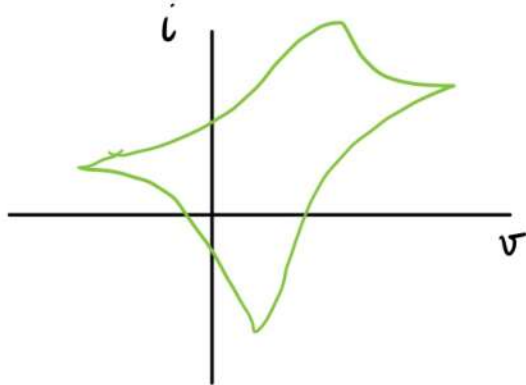
Per trovare f_c uguaglio i 2 termini

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

$G_{TOT} = C_{DL} + C_P$ chee giu' le Ca di 2 WS
 $= 210pF + 64pF$

$\rightarrow f_c = 77kHz$

f) Ciclovoltmetria



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

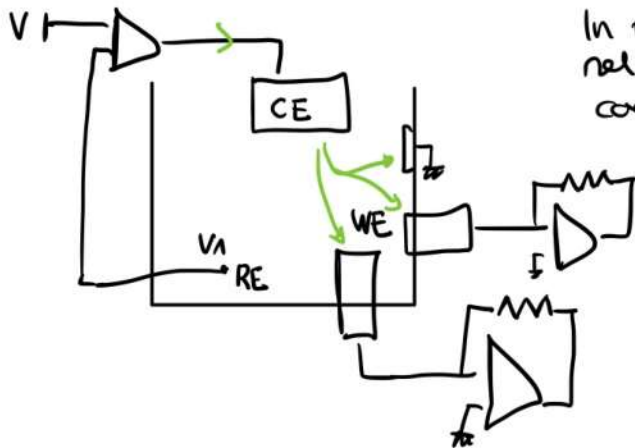
Dobbiamo ricordare la formula della corrente

$$I_{RMS} \propto A \cdot \sqrt{SR}$$

$$SR \uparrow (4)$$

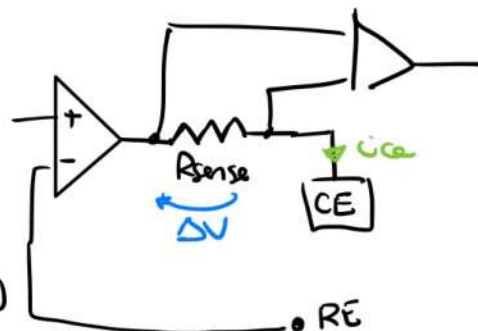
g) l'accuratezza per eliminare le mask deve essere almeno come il + piccolo compute fatto. in questo caso $G = S_{min}$

h) La corrente da scorie nel cutting non e' necessariamente la stessa del cutter



In prima approssimazione sono uguali ma nel fondo potremo avere delle rotte che riducono corrente

il miglior modo allora per misurare la corrente e'



Siamo dietro al loop quindi se mettiamo una grande R questa viene "assorbita" dal feedback perche' nel calcolo del loop

ALTRO ESAME INTERESSANTE: del 2014 quello con la ciclo voltammetria

Seminario

Introduzione del DNA

è composto da 4 basi diverse

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

Il DNA umano 3 billions di basi, ognuna può salvare 2 bit → 6Gbit di informazioni del DNA umano.

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

Si chiamano 3' e 5' perché è l'atomo di carbonio dello zucchero su cui le basi si attaccano.

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

DNA Complementarity

Le basi che tra di loro hanno un loro legame sono

Adenine → Timina

Citosina → Guanine (legame + forte di quello AT)

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

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

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