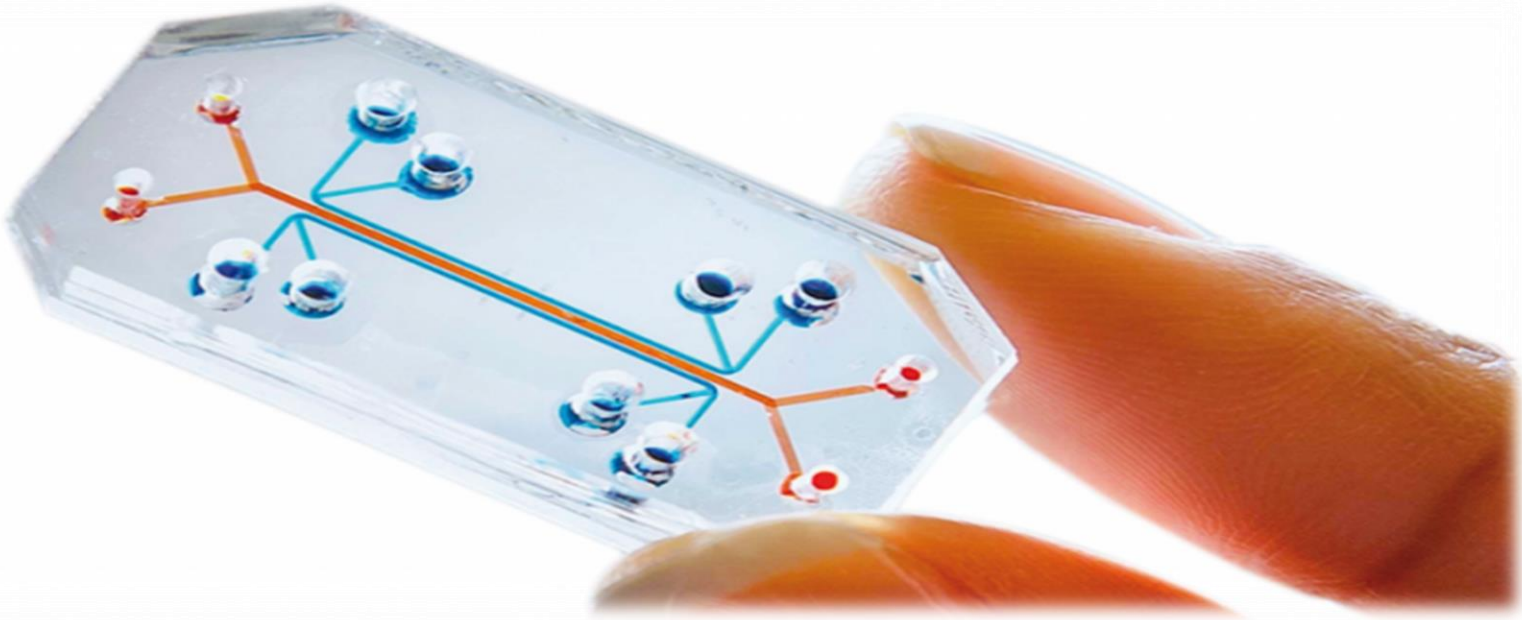


DIGIT~Bio~TECH



# LO3 BIOSENSORI & BIOCHIP PER UN FUTURO SOSTENIBILE

*Livello basale*

AUTORE:

**TSVETINA MIHAILOVA & KLIMENT PETROV**



## Sommario

Biosensori & Biochip: una panoramica .....	3
Schemi per i biosensori: Progettazione e funzionamento .....	4
1. Biosensori elettrochimici.....	4
2. Biosensori enzimatici .....	5
3. Biosensore immunologico.....	8
4. Biosensori del DNA .....	9
5. Il futuro dei biosensori clinici .....	12
Schemi per i biochip: Progettazione e funzionamento .....	13
1. Microarray di DNA .....	15
2. Chip microfluidico .....	17
3. Microarray proteico.....	20
4. Applicazioni dei biochip .....	22
Referenze.....	23



2019-1-BG01-KA203-062371

## Biosensori & Biochip: una panoramica

I biochip sono apparsi come una piattaforma microtecnologica innovativa per l'analisi delle biomolecole negli anni '80. Una varietà di tecnologie, come le scienze della vita, la tecnologia dell'informazione, la microelettronica e la micromeccanica, sono coinvolte nelle tecnologie sottostanti. I biochip sono considerati importanti strumenti potenziali nella moderna ricerca delle scienze della vita, nella diagnosi medica, nella scoperta di farmaci, nel monitoraggio della sicurezza alimentare e nell'agricoltura in quanto ad alte prestazioni, miniaturizzati, automatizzati e convenienti. Ci si aspetta che i biochip permettano di aumentare drasticamente la velocità e la portata del processo analitico e di fornire un enorme valore economico. Inoltre, negli ultimi anni, numerosi governi e aziende industriali nel mondo hanno investito molto in questo settore. La tecnologia dei biochip è per ora solo nella sua prima evoluzione. Si tratta di un settore in continua evoluzione. Il futuro della ricerca e dello sviluppo dei biochip è luminoso. C'è una concorrenza furiosa in questo settore.

Nella ricerca biomedica e nelle scienze della vita, la miniaturizzazione dei processi di laboratorio chimici e biomedici su microchip è un campo in rapida espansione. Le tecnologie Lab-on-chip porteranno molti vantaggi rispetto alle loro controparti di dimensioni macro. In particolare, i rapporti superficie-volume più alti si traducono in requisiti chimici ridotti, rifiuti ridotti, migliore controllo, elaborazione rapida e capacità significativa per l'elaborazione parallela e l'incorporazione del processo. Le tecnologie Lab-on-chip hanno il potenziale per avere un significativo impatto socio-economico. Nella medicina di laboratorio, i micro dispositivi completamente integrati per la sintesi chimica e la diagnosi delle malattie offrono una svolta scientifica e un cambiamento di paradigma nell'elaborazione chimica. Il progetto del genoma umano ha dato un enorme contributo a questa tecnologia.

Nel campo dell'analitica, i biosensori permettono grandi innovazioni che sono al tempo stesso agevolate e facilitate dagli sviluppi della biologia sintetica. Il potenziale dei biosensori di identificare una vasta gamma di molecole in modo facile e preciso li rende molto importanti per una varietà di applicazioni industriali, mediche, ecologiche e scientifiche. Le strategie di progettazione dei biosensori sono numerose quanto le loro applicazioni, con i principali gruppi di biosensori che includono acidi nucleici, proteine e fattori di trascrizione. In base all'uso previsto e ai parametri richiesti per una prestazione ottimale, ognuno di questi tipi di biosensori ha vantaggi e limitazioni. In particolare, considerazioni come la specificità del ligando, la sensibilità, la gamma dinamica, la gamma funzionale, la modalità di uscita, il tempo di attivazione, la facilità d'uso e la facilità di ingegneria devono essere considerate quando si sceglie il design del biosensore.



2019-1-BG01-KA203-062371

## SCHEMI PER I BIOSENSORI: PROGETTAZIONE E FUNZIONAMENTO

I biosensori sono sensori che trasformano i processi di bioriconoscimento attraverso un trasduttore fisico-chimico in segnali osservabili, con tecniche elettroniche e ottiche come due trasduttori principali. La creazione di biosensori risponde all'odierno bisogno crescente di diagnostica clinica. L'uso dei biosensori comporta una combinazione di vantaggi. I biosensori, in primo luogo, sono altamente sensibili. Questo perché le biomolecole hanno un'alta affinità per i loro bersagli, per esempio, gli anticorpi catturano gli antigeni con una costante di dissociazione alla scala nanomolare, e le interazioni DNA - DNA sono molto più forti di antigene-anticorpo. In secondo luogo, il riconoscimento biologico è tipicamente molto selettivo. L'enzima e il substrato sono come una serratura e una chiave, per esempio. Questa alta selettività porta spesso a biosensori che sono selettivi. In terzo luogo, la produzione di dispositivi biosensoriali poco costosi, integrati e pronti all'uso è diventata relativamente facile da sviluppare grazie allo sviluppo della moderna industria elettronica. La capacità di rilevare agenti patogeni o di eseguire analisi genetiche negli ospedali è certamente migliorata da questi sensori biologici; ancora più importante, sono particolarmente utili per le piccole cliniche e anche per le analisi point-of-care.

Per i biosensori con applicazioni cliniche, sono state sviluppate una serie di nuove tecniche. I biosensori sono, in generale, dispositivi analitici costruiti con un elemento di riconoscimento biologico e un trasduttore ottico/elettronico. L'elemento biologico è responsabile della cattura degli analiti in soluzione e il trasduttore trasforma l'evento di legame in una variazione di segnale misurabile. In base alla natura del riconoscimento, i biosensori basati su enzimi, i biosensori immunologici e i biosensori a DNA potrebbero classificare il tipo di biosensori. Inoltre, sono disponibili biosensori elettronici (elettrici o elettrochimici), biosensori ottici (fluorescenti, risonanza plasmonica di superficie o Raman) e biosensori piezoelettrici (microbilancia a cristallo di quarzo) a seconda del tipo di trasduttore.

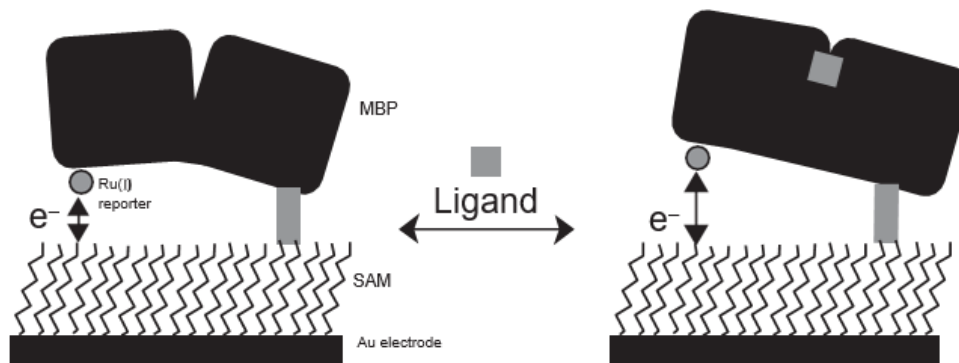
### 1. Biosensori elettrochimici

Per il rilevamento biologico, dove gli elettrodi funzionano sia come donatori di elettroni che come accettori di elettroni, le tecniche elettrochimiche sono particolarmente utili. Vasti esperimenti elettrochimici hanno dimostrato che la teoria del trasferimento di elettroni di Marcus è conforme anche al trasferimento eterogeneo di elettroni tra elettrodi e molecole redox confinate in superficie, simile alle coppie donatore-accettore in soluzioni omogenee. Ciò significa che piccoli cambiamenti di distanza nelle molecole redox confinate in superficie possono causare ampie variazioni nei tassi eterogenei di trasferimento di elettroni che si suppone si traducano in cambiamenti rilevabili dei segnali elettrochimici. Hellinga e collaboratori, per esempio, hanno suggerito una strategia di rilevamento elettrochimico che sfrutta i movimenti di flessione delle cerniere mediati dai ligandi delle proteine. Un elettrodo d'oro è stato prima rivestito con un monostato auto-assemblato (SAM), che fornisce una piattaforma versatile per l'immobilizzazione di proteine sito-specifiche. La proteina legante il maltosio (MBP) è stata poi



2019-1-BG01-KA203-062371

legata alla superficie dell'elettrodo d'oro con un particolare orientamento come il gruppo reporter redox del rutenio (Ru(II)) è fissato ad un certo intervallo sopra l'elettrodo. Quando il ligando maltosio si lega al sito attivo, il reporter Ru(II) si allontana dall'elettrodo causando un movimento di flessione a cerniera di MBP (Figura 1).



**Figura 1. Costruzione e funzionamento di un biosensore elettrochimico**

Questo cambiamento di distanza indotto dal legame del maltosio causa una diminuzione dei segnali elettrochimici dipendente dalla concentrazione, fornendo così un modo per percepire elettronicamente il maltosio. È stato anche dimostrato l'uso di questo approccio di rilevamento altamente generalizzato per rilevare vari analiti con una famiglia di proteine o enzimi sottoposti a cambiamenti conformazionali indotti dal legame del ligando.

## 2. Biosensori enzimatici

I primi biosensori mai documentati furono quelli basati sulla glucosio ossidasi (GOD), stabiliti da Clark e Lyons nel 1962. L'iperglicemia, una concentrazione cronicamente elevata di glucosio nel sangue, è comune nel *diabete mellito*. Di conseguenza, il controllo regolare della loro concentrazione di glucosio nel sangue è essenziale per i pazienti diabetici. Il vantaggio dell'elettrochimica accoppiata con la catalisi enzimatica è questo biosensore, e le sue versioni più recenti. Un elettrodo immobilizzato con GOD era il biosensore di Clark. La forma ossidata di GOD interagisce con il glucosio in presenza di glucosio e produce acido gluconico e GOD ridotto, con due elettroni e due protoni coinvolti. Poiché



2019-1-BG01-KA203-062371

l'ossigeno disciolto reagisce con il GOD ridotto, questa ossidazione del glucosio consuma anche l'ossigeno nella soluzione, producendo così perossido di idrogeno e GOD ossidato, e abbassando la pressione dell'ossigeno. Di conseguenza, rilevando elettrochimicamente l'ossigeno con un elettrodo di Clark per l'ossigeno, l'elettrodo può rilevare il glucosio. Questo tipo di sensore è considerato un biosensore di "prima generazione". La Yellow Springs Instrument Company (Ohio, USA) ha commercializzato questo biosensore di prima generazione negli anni '70.

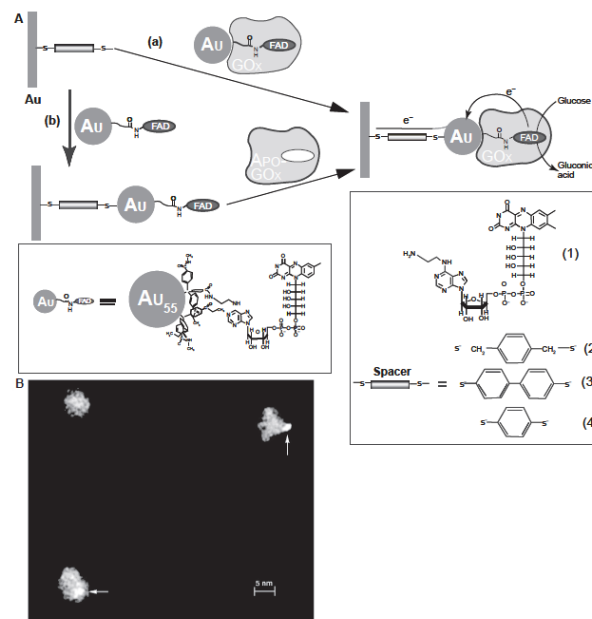
Il biosensore di seconda generazione sostituisce il substrato naturalmente esistente, l'ossigeno, con piccole molecole redox artificiali che agiscono come mediatori redox e scambiano elettroni tra gli elettrodi e gli enzimi. Per migliorare l'efficienza del sensore, cioè la sensibilità e il rapporto segnale-rumore, sono state utilizzate diverse molecole redox solubili, come il ferrocene, la tionina, il blu di metilene, il metilviolo. Questi mediatori sono stati inizialmente disciolti in una soluzione. Essi ottengono elettroni dagli elettrodi e poi, o viceversa, questi elettroni vengono trasferiti al centro redox degli enzimi. I mediatori immobilizzati sono stati suggeriti come un passo avanti, al fine di migliorare i biosensori senza reagenti. Per esempio, per il perossido di idrogeno, Ruan et al nel 1998 hanno documentato un sensore allo stato solido senza reagenti. Gli elettrodi d'oro sono stati prima modificati con L-cisteina, e poi multistrati di perossidasi di rafano (HRP) sono stati collegati da glutaraldeide al gruppo amminico della cisteina, e la tionina è stata ulteriormente legata all'enzima dallo stesso legame chimico. Come risultato, l'elettrodo d'oro era immobilizzato sia dall'enzima che dal mediatore, che poteva rilevare sensibilmente il perossido di idrogeno nella soluzione di prova senza ulteriore aggiunta di reagenti. Un vantaggio essenziale di questa configurazione del biosensore è che il mediatore è fissato sulla superficie dell'elettrodo, evitando così il problema della diffusione.

Una soluzione alternativa che includeva l'uso di polimeri redox è stata indicata da Heller e collaboratori. In primo luogo, hanno preparato un polimero legato con il complesso  $Os^{2+}$ . Questo tipo di polimero funziona come un "filo molecolare" e scambia elettroni tra l'enzima e l'elettrodo. Il polimero Os e la glucosio ossidasi sono poi co-immobilizzati sull'elettrodo di carbonio, che genera una risposta sensibile alla presenza di glucosio. Sono stati in grado di rendere elettroattive quasi al 100% le molecole di enzima immobilizzate utilizzando questi polimeri redox, che hanno contribuito a un metodo di rilevamento del glucosio ad altissima sensibilità.

La commercializzazione del biosensore di seconda generazione basato sull'enzima ebbe un discreto successo. Nel 1987, MediSense è stata fondata e sono stati rilasciati i sensori di glucosio Exactech<sup>TM</sup> pensati. Questo successo ha portato ad una rivoluzione sanitaria per i pazienti diabetici. Invece di viaggiare verso gli ospedali, erano in grado di controllare la loro concentrazione di glucosio nel sangue a casa. I biosensori MediSense e successivamente i biosensori amperometrici consistono in elettrodi di carbonio serigrafati monouso rivestiti di GOD e mediatori (strisce reattive). Il sensore inizia a funzionare quando una goccia di sangue viene applicata alla striscia reattiva e registra la risposta amperometrica, che viene trasformata in una cifra visualizzata sul display LCD, indicante la concentrazione di glucosio.

2019-1-BG01-KA203-062371

Più recentemente, progettando un enzima GOD ricostruito, Xiao et al (2003) hanno pubblicato una nuova generazione di biosensori per il glucosio. Hanno preparato prima l'apo-GOD senza il cofattore di flavin adenina dinucleotide (FAD), poi hanno funzionalizzato e ricostruito una nanoparticella d'oro di 1,4-nm con FAD nell'apo-GOD. Usando un monostrato di ditiolo, tale enzima ricostruito è stato allineato con gli elettrodi d'oro (Figura 2). Hanno dimostrato che il turnover del trasferimento di elettroni di questo enzima artificiale è di  $5000\text{ s}^{-1}$ , circa 8 volte superiore a quello dell'enzima normale ( $700\text{ s}^{-1}$ ). La nanoparticella d'oro in questo sistema serve da relè di elettroni per il cablaggio elettrico del centro redox dell'enzima. In questo settore, il biosensore di glucosio stabilito da Xiao et al rappresenta un nuovo percorso, libero da qualsiasi mediatore e altamente sensibile. Più recentemente, utilizzando nanotubi di carbonio a parete singola (SWNT) al posto delle nanoparticelle d'oro, il gruppo di Willner ha documentato una versione modificata di questo sensore e ha realizzato un'efficienza altrettanto superiore. Anche se non c'è ancora una commercializzazione di questa tecnologia, ci si aspetta che i biosensori all'avanguardia vengano ulteriormente migliorati.



**Figura 2. Costruzione e funzionamento del biosensore enzimatico a base di enzimi**



2019-1-BG01-KA203-062371

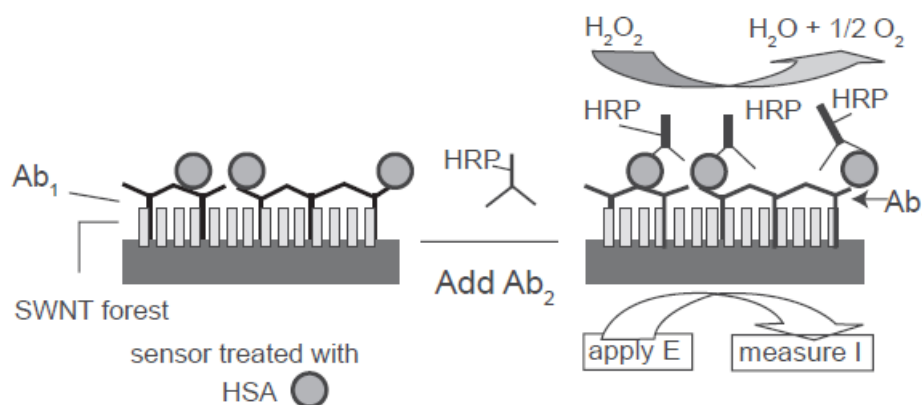
### 3. Biosensore immunologico

Per identificare target ambientali o clinicamente importanti, i biosensori immunologici dipendono da un sistema immunologico altamente specifico, cioè anticorpi e antigeni. In realtà, i biosensori immunologici sono una variante moderna del saggio immunoassorbente legato all'enzima (ELISA), con costi inferiori, maggiore velocità e convenienza del servizio e sensibilità paragonabile o addirittura superiore.

Tra i più comuni ci sono biosensori immunologici elettrochimici. Sono disponibili due tipi di biosensori immunologici. In primo luogo, l'elettrodo viene immobilizzato con un anticorpo di cattura, che cattura un particolare antigene bersaglio. Attraverso un anticorpo secondario taggato con molecole redox o enzimi, si ottiene la trasduzione del segnale. In secondo luogo, viene immobilizzato un antigene sull'elettrodo, che rileva anticorpi specifici.

Ju e colleghi hanno istituito un biosensore immunologico amperometrico per l'antigene carcinoembrionale (CEA). Gli anticorpi CEA marcati con tionina e HRP sono stati co-immobilizzati su un elettrodo di carbonio vetroso collegato con glutaraldeide. Nella soluzione, che era accoppiata alla reazione dell'elettrodo di tionina, HRP riduceva cataliticamente il perossido di idrogeno, portando ad un segnale catalizzato. Il centro redox dell'HRP è stato parzialmente bloccato dalla cattura del CEA, portando all'attenuazione dei segnali amperometrici.

Rusling e colleghi hanno recentemente sfruttato gli SWNT per migliorare le prestazioni del biosensore immunologico (Figura 3).



**Figura 3. Costruzione e funzionamento del biosensore immunologico**





2019-1-BG01-KA203-062371

Usando l'auto-assemblaggio mediato dal metallo, hanno progettato degli array allineati verticalmente di SWNT (foresta di SWNT) su elettrodi di grafite pirolitica. Anti-HSA, usando EDC/NHS, è stato poi legato covalentemente alle estremità carbossilate della foresta di SWNT. L'elettrodo è stato ulteriormente incubato con un anticorpo secondario anti-HSA marcato con HRP dopo aver catturato il target HSA. Il target HSA nella soluzione di test può essere identificato in base al segnale catalitico dell'HRP per il perossido di idrogeno. La sensibilità di rilevamento, che era di circa 1 nM, è stata notevolmente migliorata dall'uso delle foreste di SWNT. Ciò era probabilmente dovuto alla migliore reattività del trasferimento di elettroni dell'HRP incapsulato nelle foreste di SWNT.

Uno degli strumenti clinici più rilevanti è stato il test immunologico. Tuttavia, i metodi di analisi esistenti, come ELISA, richiedono strumenti grandi e costosi e specialisti ben addestrati. Per lo sviluppo di dispositivi economici, miniaturizzati e compatti, i metodi elettrochimici sono ben adattati. Di conseguenza, lo sviluppo di biosensori immunologici elettrochimici per soddisfare l'analisi sul campo e al punto di cura è altamente auspicabile. È importante menzionare che l'uso di elettrodi serigrafati monouso potrebbe essere cruciale verso questo obiettivo, paragonabile ai biosensori di glucosio. Al fine di effettuare saggi ad alta produttività (HTS), è anche importante stabilire microarray di anticorpi basati sull'elettrochimica.

#### 4. Biosensori del DNA

C'è stato un enorme interesse scientifico e tecnologico nell'identificazione degli eventi di ibridazione del DNA. L'interesse in rapida crescita nella diagnosi clinica basata su chip ha dimostrato particolarmente questa importanza. Pertanto, una varietà di tecniche, tra cui approcci ottici, acustici ed elettronici, sono stati sviluppati nel corso degli anni. Nei decenni passati, la rilevazione fluorescente ha dominato lo stato dell'arte dei genosensori tra di loro. Metodi elettrochimici, tuttavia, che si sono dimostrati efficaci in semplici specie chimiche, in particolare ioni metallici, hanno attirato un interesse sempre maggiore nelle applicazioni di rilevamento di specie biologicamente correlate.

I vantaggi della rilevazione elettronica includono: 1) la rilevazione elettrochimica è tipicamente poco costosa, consentendo così uno screening altamente sensibile e rapido; 2) diverse etichette elettroattive, ad es. metalloceni, sono stabili e insensibili all'ambiente, a differenza dei fluorofori che spesso hanno problemi di "photo-bleaching"; 3) la progettazione e la sintesi molecolare appropriate che generano una varietà di derivati, ciascuno con un potenziale redox specifico, hanno reso possibile l'etichettatura "multicolore"; 4) la rapida affermazione dell'industria del silicio ha aperto la strada alla produzione di massa di circuiti integrati, rendendo la rilevazione elettronica particolarmente appropriata e compatibile con le tecnologie basate sui microarray; 5) la crescita esponenziale della scienza e della tecnologia interfacciale ha svelato i misteri nel controllo preciso delle proprietà di superficie che sono uno degli ostacoli fondamentali nelle applicazioni bioelettroniche.



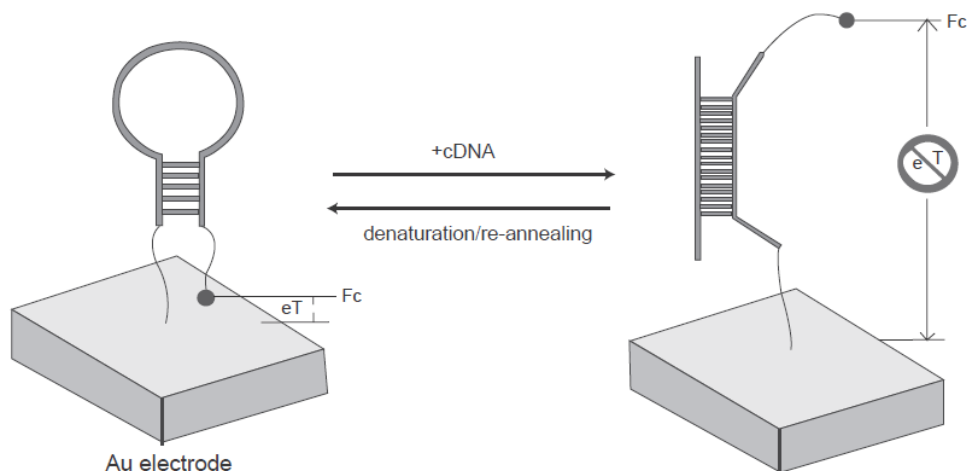
2019-1-BG01-KA203-062371

A tensioni applicate moderate, il DNA stesso è elettrochimicamente silenzioso, mentre interferenze significative sono previste ad alte tensioni che causano l'ossidazione/riduzione delle basi del DNA. Millan è stato il primo a suggerire rilevamenti selettivi della sequenza del bersaglio del DNA basati su indicatori di ibridazione elettroattivi che forniscono segnali elettronici e discriminazione del DNA a doppio e singolo filamento. Le rilevazioni di tipo "sandwich" sono state suggerite nel tentativo di ridurre l'elevato background derivato dal minore legame degli indicatori di ibridazione al ssDNA. Un filamento di DNA che possiede un'etichetta elettroattiva è stato introdotto per agire come molecola di segnalazione in aggiunta a una sonda di DNA immobilizzata. Allo stesso modo, con sonde nanoparticelle, Park e colleghi nel 2002 hanno sviluppato una rilevazione elettrica del DNA basata su array che dimostra alta sensibilità e selettività. Una tecnologia basata sull'attività di ossidazione relativamente alta della guanina e la sua cooperazione con catalizzatori redox esogeni è stata sviluppata da Thorp un anno dopo. La discriminazione di ds/ss è ottenuta dal fatto che la guanina ha una reattività di trasferimento di elettroni relativamente bassa nei duplex, a causa dell'effetto sterico. Nel rilevamento dei prodotti PCR, questo metodo è altamente sensibile, ma relativamente povero nel discriminare gli eventi di ibridazione. Inoltre, questo metodo è finora possibile solo su superfici ITO, perché l'alto potenziale di ossidazione esclude ancora l'uso dell'oro.

Nonostante i progressi, lo sviluppo di un sensore all-in-one (cioè senza reagenti) che segnala specificamente la cattura del bersaglio è ancora molto importante (cioè, evitando un ulteriore trattamento con molecole di segnale o indicatori di ibridazione). Un mezzo praticabile a questo scopo è fornito da aptameri di DNA o RNA. Gli aptameri sono DNA o RNA ben strutturati che hanno un'alta affinità e selettività per particolari target così come per gli enzimi naturali, mostrando così una robustezza superiore agli enzimi fragili. Sono stati uno strumento molto promettente per la terapia e la diagnosi. Fino ad allora, per qualsiasi bersaglio, la selezione in vitro ben sviluppata era in grado di produrre aptameri. Alla luce di questi vantaggi, si prevede che gli aptameri oligonucleotidici saranno i componenti di biosensing della prossima generazione. Una semplice forcina organizzata di DNA con un'etichetta elettroattiva (forcina elettronica di DNA) è stata usata da Fan e colleghi come blocco di costruzione per definire gli eventi di ibridazione (Figura 4).



2019-1-BG01-KA203-062371



**Figura 4. Costruzione e funzionamento del biosensore del DNA**

Il DNA hairpin-like era un aptamero incredibilmente affascinante che forma la base del riconoscimento di ibridazione omogenea di "fari molecolari" fluorescenti. La sequenza di DNA è stata progettata in modo che in assenza di bersagli, questo "segnalatore" è nello stato vicino mentre sarà "acceso" quando lega il suo particolare bersaglio genico. La presenza del disegno dello stem-loop nella struttura offre un interruttore on/off così come una stringenza per differenziare i singoli mismatch di ibridazione del DNA. Un terminale tiolato dà un'estremità appiccicosa alla superficie d'oro di questa forcina elettronica del DNA, mentre un tag di ferrocene trasduce i segnali elettronici all'altra estremità. La forcina iniziale localizza il ferrocene prossimalmente alla superficie dell'elettrodo, permettendo così il trasferimento interfacciale di elettroni. Dopo l'ibridazione, la formazione della struttura duplex lineare interrompe la forcina e allontana il ferrocene dall'elettrodo. Questo significativo cambiamento di distanza (fino a pochi nm) ha effettivamente bloccato il trasferimento di elettroni interfacciale e porta alla diminuzione dei corrispondenti segnali di corrente elettrochimica. Questa strategia offre l'opportunità di identificare obiettivi di DNA di 10 pM. Ancora più importante, un tale disegno trae vantaggio dall'integrazione all'interno di una singola struttura a forcina confinata in superficie della parte di cattura (sequenza della sonda) e della parte di segnalazione (specie elettroattive). In contrasto con la maggior parte dei sensori di DNA a stato solido proposti in precedenza, questo design è quindi effettivamente senza reagenti, cioè nessun reagente esogeno è richiesto durante il processo di riconoscimento a parte i bersagli di DNA. Questo fornisce la base per lo sviluppo di un analizzatore di DNA portatile e continuo che può essere utile per applicazioni mediche e militari.

Un mezzo per il trasferimento di elettroni a lungo raggio (ET) attraverso il suo impilamento di basi è stato suggerito come la doppia elica del DNA. Anche se questo problema è stato discusso per



2019-1-BG01-KA203-062371

molto tempo, Barton e colleghi hanno dimostrato elettrochimicamente che i film di DNA con elettrodi d'oro ben orientati permettono il trasferimento di elettroni a lungo raggio e che tale ET è altamente sensibile alle perturbazioni di impilamento delle basi come i mismatch. Hanno scoperto che gli intercalanti elettroattivi come il blu di metilene (MB) potrebbero essere efficacemente ridotti da un elettrodo modificato da un duplex di DNA completamente abbinato. L'esistenza di un solo mismatch, tuttavia, converte il mezzo ET filiforme in un isolante, interrompendo totalmente l'ET tra il MB e l'elettrodo. Attraverso saggi ciclici voltammetrici o coulometrici, che costituiscono la base di un rapido sensore di screening delle mutazioni del DNA, tale differenza può essere facilmente letta. Barton e colleghi hanno anche dimostrato che l'elettrocatalisi potrebbe migliorare la sensibilità di questa strategia. In soluzione, l'aggiunta di ferricianuro tira costantemente elettroni dal MB ridotto elettrochimicamente, amplificando il flusso di elettroni attraverso la doppia elica del DNA. Questo aiuta a rilevare ~108 molecole di DNA con un elettrodo da 30 µm. Hanno anche sviluppato sensori basati sul DNA per rilevare proteine legate al DNA in parallelo alla rilevazione del DNA. Si ritiene che alcune proteine o enzimi legati al DNA interagiscano con l'impilamento delle coppie di basi del DNA, trasformando la doppia elica del DNA da efficaci fili ET a isolanti. Hanno stabilito un modo sensibile per testare elettricamente una varietà di proteine legate al DNA basate sulla strategia di rilevamento comparabile. Crucialmente, questi sensori discriminano con successo le proteine che si legano al DNA, ma non interrompono l'impilamento delle basi. Questo conferma certamente che il cut-off del segnale sul legame delle proteine è dovuto all'alterazione del mezzo ET rilevante per l'impilamento delle basi.

## 5. Il futuro dei biosensori clinici

Nonostante il rapido miglioramento nello sviluppo dei biosensori, le applicazioni cliniche dei biosensori sono ancora poco comuni, con l'eccezione del monitor del glucosio. Questo è in diretto contrasto con il bisogno critico di test point-of-care nelle piccole cliniche. Assumiamo che le specifiche seguenti siano rilevanti. In primo luogo, alta sensibilità: Il miglioramento della sensibilità è una priorità costante nello sviluppo dei biosensori. È chiaro che il criterio della sensibilità varia da caso a caso. Per esempio, poiché i livelli di glucosio sono alti nel sangue, non è necessaria una sensibilità molto alta per la rilevazione del glucosio. Questo è fondamentalmente parte della ragione per cui i monitor di glucosio hanno avuto successo. Tuttavia, in molte situazioni, per soddisfare i requisiti della diagnostica molecolare e del rilevamento di agenti patogeni, è molto importante stabilire biosensori altamente sensibili con un rilevamento ottimale delle singole molecole. In secondo luogo, alta selettività: Nell'applicazione dei biosensori, questo può essere un ostacolo significativo. La maggior parte dei biosensori citati in letteratura funzionano molto bene in laboratorio, ma in campioni di prova reali, si possono affrontare problemi di serie. Di conseguenza, per prevenire l'adsorbimento non specifico della superficie, è importante stabilire nuovi approcci alla modifica della superficie. In terzo luogo, il multiplexing è cruciale per risparmiare tempo di analisi, che è particolarmente importante per le analisi di laboratorio o cliniche. È quindi importante stabilire array di elettrodi ad alta densità così come strumenti elettrochimici che possono condurre un gran numero di saggi simultaneamente. Quarto, per



2019-1-BG01-KA203-062371

aumentare la portabilità, è essenziale creare biosensori miniaturizzati, soddisfacendo così le esigenze di test sul campo e al punto di cura. Quinto, è opportuno integrare e automatizzare altamente un biosensore ideale. Una soluzione a questo obiettivo è offerta dalle attuali tecnologie lab-on-a-chip (microfluidica). Possiamo aspettarci che tutte queste caratteristiche siano integrate in futuro in biosensori di successo e che possano facilmente rilevare bersagli minuscoli in un breve periodo di tempo.

## SCHEMI PER I BIOCHIP: PROGETTAZIONE E FUNZIONAMENTO

Il termine "biochip" ha assunto diversi significati. Qualsiasi dispositivo o componente che introduce materiali biologici, sia estratti da specie biologiche che sintetizzati in laboratorio su un substrato solido, può essere considerato un biochip nel senso più generico. In termini pratici, tuttavia, sia le miniaturizzazioni, di solito in formato microarray, sia la possibilità di una produzione di massa a basso costo sono spesso coinvolti nei biochip. Il naso elettronico o il chip naso artificiale, la lingua elettronica, il chip di reazione a catena della polimerasi, il chip microarray del DNA (chip genico), il chip proteico e il lab-on-a-chip biochimico sono alcuni esempi che soddisfano queste qualifiche. Nel chip genico e nel chip proteico è stata fatta la ricerca più dinamica sui biochip.

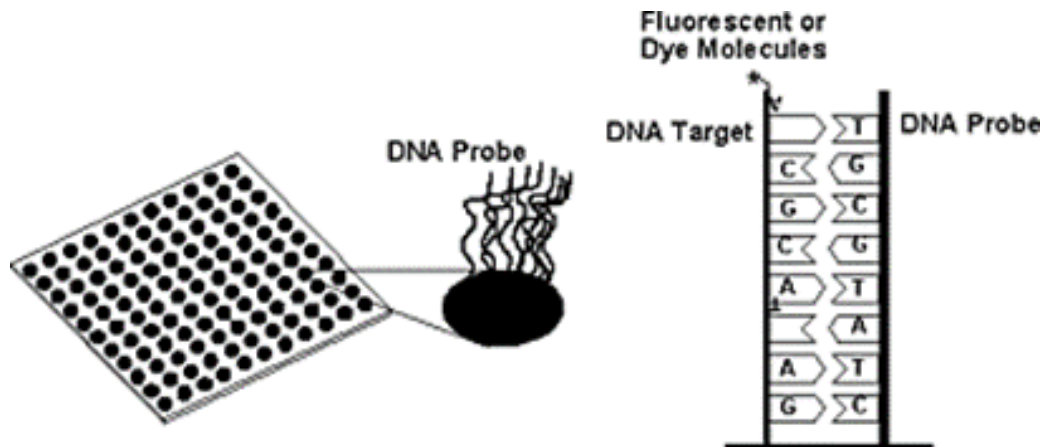
Molta attenzione è stata dedicata, in particolare, ai biochip che integrano la biotecnologia convenzionale con l'elaborazione dei semiconduttori, i sistemi micro-elettromeccanici (MEMS), l'optoelettronica e l'acquisizione ed elaborazione digitale di segnali e immagini.

Migliaia di geni e i loro derivati (cioè RNA e proteine) in un dato organismo vivente sono generalmente assunti per agire in un modo complicato e coordinato che crea il mistero della vita. I metodi tradizionali in biologia molecolare, tuttavia, operano tipicamente sulla base di "un gene in un esperimento", il che presuppone che il potenziale è molto limitato ed è difficile ottenere il "quadro completo" della funzione genica. Una nuova tecnologia, chiamata microarray di DNA, ha guadagnato una notevole attenzione tra i biologi negli ultimi decenni. Questa tecnologia mira a misurare l'intero genoma su un singolo chip in modo che, nel frattempo, i ricercatori possano ottenere un quadro migliore delle interazioni tra migliaia di geni.

Un gene o un DNA chip corrisponde a una matrice bidimensionale di piccole celle di reazione (100 x 100 µm ciascuna) prodotte utilizzando la robotica ad alta velocità su un substrato solido. Un wafer di silicio, un sottile foglio di vetro, plastica o una membrana di nylon potrebbero essere il substrato solido. Trilioni di molecole polimeriche di una particolare sequenza di frammenti di DNA a singolo filamento sono immobilizzati in ogni cella di reazione (Figura 5).



2019-1-BG01-KA203-062371

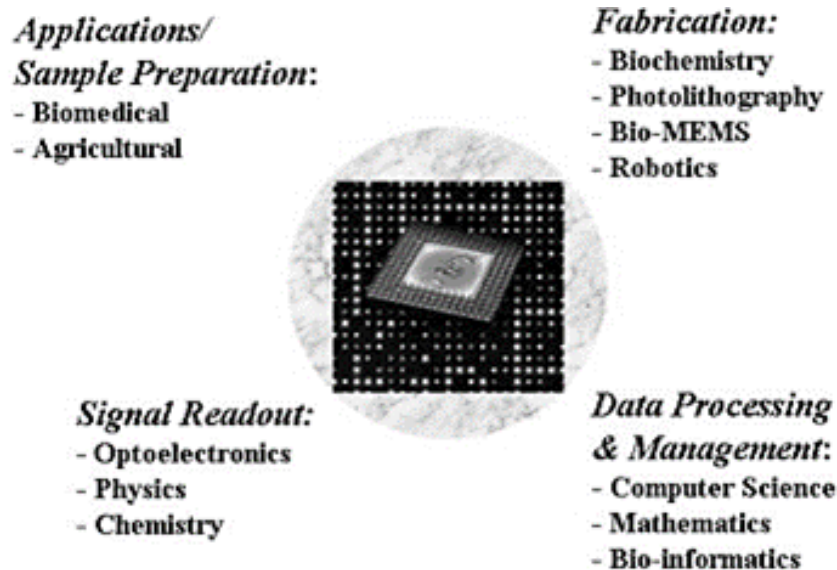


**Figura 5. Illustrazione schematica di un chip genico**

I frammenti di DNA possono essere sequenze di base brevi (da 20 a 25) (A, T, G e C) o filamenti di DNA complementari più lunghi (cDNA). In ogni cella, la sequenza univoca di basi (ad esempio CTATGC...) è preselezionata o configurata a seconda dell'uso previsto. Le sonde sono anche chiamate sequenze riconosciute di frammenti di DNA a singolo filamento immobilizzati sul substrato. I frammenti di DNA a doppio filamento si formano quando frammenti sconosciuti di campioni di DNA a singolo filamento, chiamati bersaglio, reagiscono (o ibridano) con le sonde sul chip, dove il bersaglio e la sonda sono complementari secondo la regola di accoppiamento di base (A accoppiato con T e G accoppiato con C). I campioni bersaglio sono spesso etichettati con tag, come fluorescenti, coloranti o molecole di radio-isotopo, per facilitare la diagnosi o l'analisi del chip ibridato. Ognuno è etichettato con il proprio tag distinguibile quando le destinazioni contengono più di un tipo di campione. Questo tipo di chip microarray di DNA fornisce una piattaforma in cui, in base alle dimensioni dell'array, il bersaglio o gli obiettivi sconosciuti possono teoricamente essere definiti con altissima velocità e alta produttività abbinando i componenti coinvolti nella ricerca e nello sviluppo della tecnologia biochip con decine di migliaia di diversi tipi di sonde attraverso l'ibridazione in parallelo, e le relative discipline tecniche sono indicate nella Figura 6. Fondamentalmente, la tecnologia dei biochip è interdisciplinare; è importante che scienziati e ingegneri di diverse discipline collaborino sinergicamente per spingere questa nuova tecnologia da un interesse di laboratorio a dispositivi e sistemi pratici.



2019-1-BG01-KA203-062371



**Figura 6. I componenti e le discipline tecniche associate coinvolte nella R&D della tecnologia biochip**

## 1. Microarray di DNA

Per quanto riguarda la proprietà della sequenza di DNA ad identità nota posta sulla matrice, ci sono due varianti della tecnologia del microarray di DNA:

**Tipo I:** la sonda cDNA (lunga 500~5.000 basi) viene immobilizzata utilizzando spotting robotizzato su una superficie solida come il vetro ed esposta separatamente o in miscela a una serie di bersagli. Questa strategia, "tradizionalmente" chiamata microarray di DNA, è in gran parte nota per essere stata sviluppata alla Stanford University.

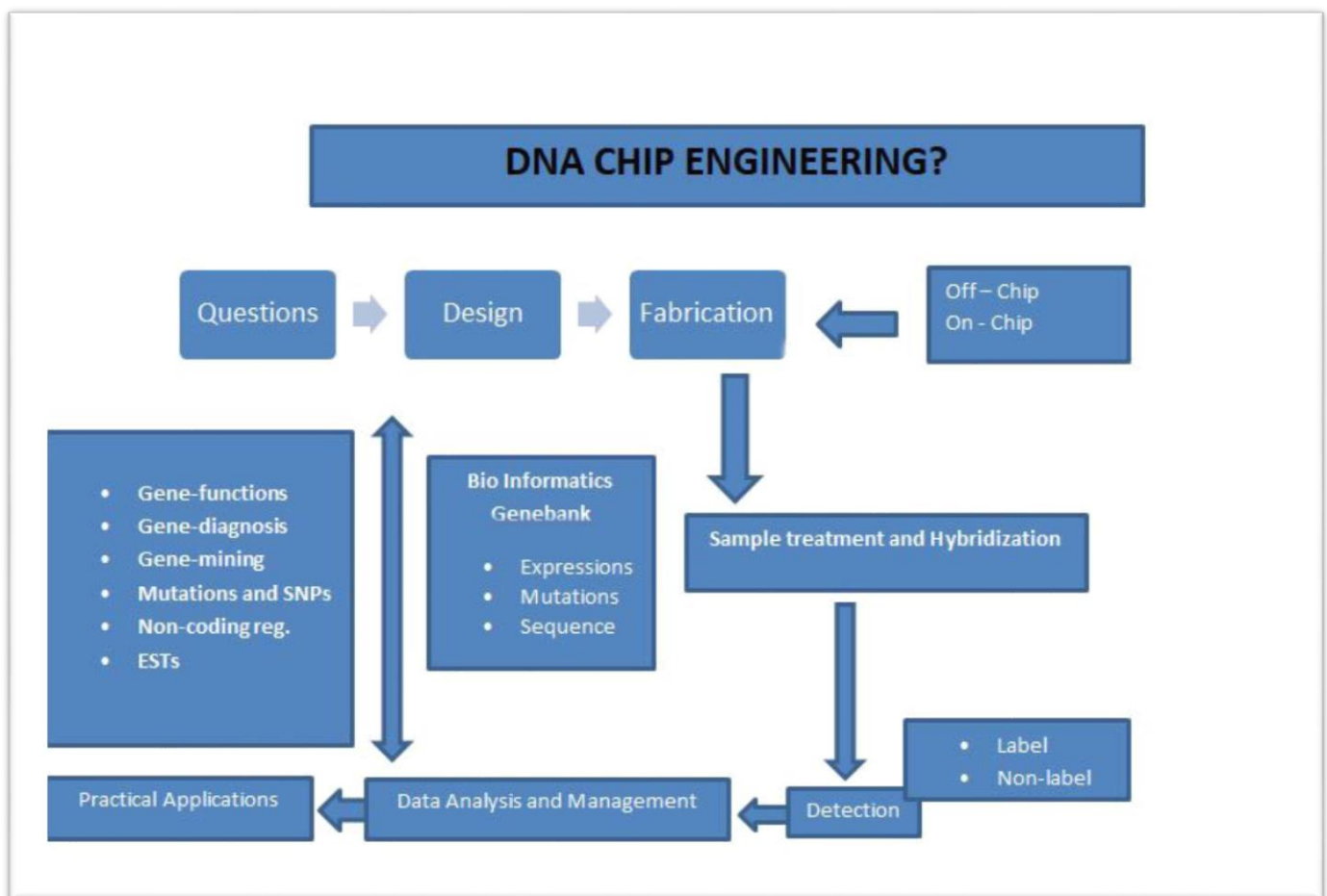
**Tipo II:** *in situ* (on-chip) o tramite sintesi convenzionale accompagnata da immobilizzazione on-chip, viene sintetizzato un array di sonde di oligonucleotidi (20~80-mer) o di acido nucleico peptidico (PNA). L'array viene esposto al DNA campione ibridato ed etichettato e determina l'identità/abbondanza delle sequenze complementari. Questo metodo, "storicamente" chiamato DNA chips, è stato stabilito da Affymetrix INC, che vende i suoi prodotti fabbricati fotolitograficamente con il marchio Genechip. I chip a base di oligonucleotidi sono sviluppati da diverse aziende che utilizzano tecnologie alternative di sintesi *in situ* o di deposizione.

A seconda del tipo di molecola immobilizzata, i biochip sono realizzati principalmente in due formati. Gli array di CDNA sono anche chiamati biochip che contengono prodotti PCR di 200 paia di basi fino a 2KB di dimensione immobilizzati lungo la lunghezza della molecola tramite un legame



2019-1-BG01-KA203-062371

incrociato covalente alla superficie dell'array. In alternativa, le sonde oligonucleotidiche possono essere sintetizzate *in situ* sull'array, oppure i legami covalenti ai termini possono essere fissati da oligo pre-sintetizzati. L'ingegneria dei genechip comprende diverse parti, come la fabbricazione, la preparazione del campione e l'ibridazione della sequenza bersaglio, la rilevazione dei risultati dell'ibridazione, la progettazione della sonda oligonucleotidica e l'analisi dell'immagine dell'ibridazione, e varie applicazioni, come si vede nella Figura 7.



**Figura 7. Diversi aspetti importanti legati alla tecnologia Genechip**

In primo luogo, secondo un obiettivo particolare, molte sequenze di geni rilevanti saranno selezionate dal database del DNA (polimorfismo nucleico singolo per un gene specifico, espressione





2019-1-BG01-KA203-062371

differenziale per un dato gruppo di geni o identificazione delle mutazioni). Determinando la sequenza e la lunghezza di ogni sonda e la sua esatta posizione sul chip, una serie di sonde oligonucleotidiche uniche sarà progettata sulla base delle sequenze selezionate. Con il metodo spotting o la sintesi on-chip, si può effettuare la sintesi del microarray di DNA. I geni target sono solitamente necessari per la fluorescenza per essere amplificati ed etichettati. Nella maggior parte dei casi sarà necessario selezionare i primer di PCR appropriati e ottimizzare le condizioni di amplificazione e ibridazione. Per i risultati dell'ibridazione su un genechip, ci sono diverse strategie di rilevamento. Un approccio tradizionale è la rilevazione a fluorescenza. Per il trattamento di una così grande quantità ottenuta da un genechip, è necessaria un'analisi dei dati basata sulle immagini fluorescenti e sulla configurazione del database. L'uso di prodotti PCR corrispondenti ai geni come molecole sonda è una piattaforma comune per la preparazione di microarray. Le fonti biologiche di librerie di cDNA offrono un modello efficace per l'amplificazione PCR delle sonde. Questa piattaforma è quindi denominata cDNA Arrays.

L'uso di sonde oligonucleotidiche invece di prodotti di PCR ha diversi vantaggi. In primo luogo, sono tipicamente di lunghezza simile e possono essere creati in modo tale da avere simili proprietà di ibridazione. In secondo luogo, possono essere configurati per ibridarsi contro la regione specifica del gene; il prodotto di PCR permette anche l'ibridazione incrociata tra geni omologhi che disturbano i profili di espressione genica di membri della stessa famiglia genica. Inoltre, la necessità di una noiosa amplificazione PCR delle molecole della sonda viene eliminata dagli array di oligonucleotidi e diminuisce il rischio di errore dovuto alla manipolazione del clone e alla contaminazione durante il trasferimento.

## 2. Chip microfluidico

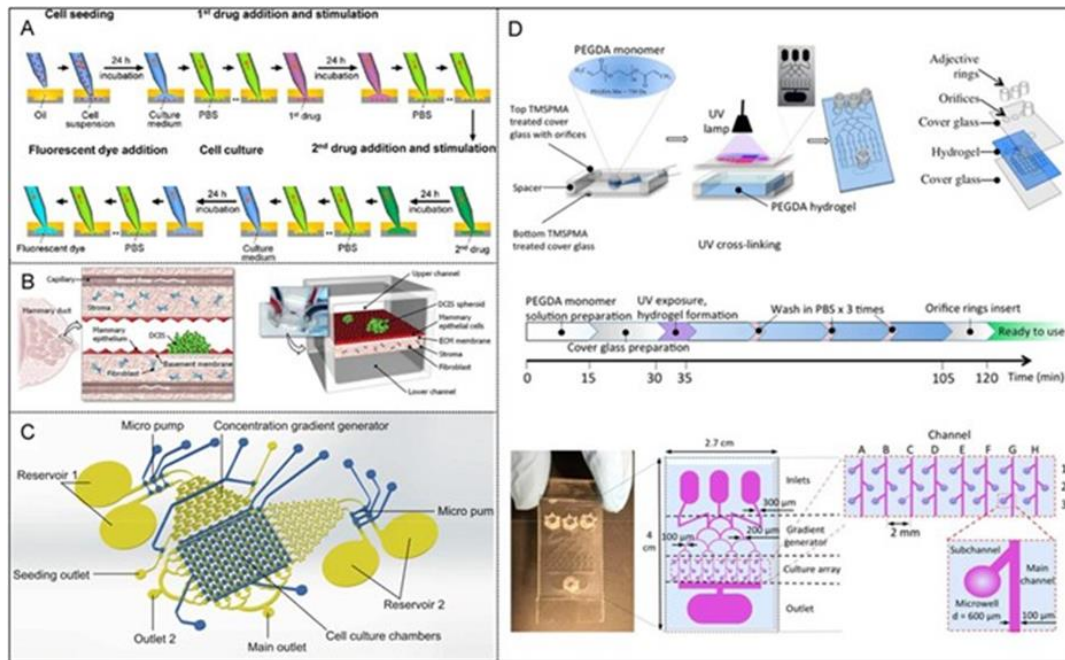
Negli ultimi decenni, la tecnologia microfluidica si è sviluppata rapidamente e fornisce molteplici applicazioni nelle scienze della vita. Grazie ai vantaggi distinti forniti dalla miniaturizzazione del sistema, è nata la rivoluzione della microfluidica, tra cui l'alta efficienza analitica, l'aumento della sensibilità, il miglioramento delle prestazioni analitiche, la rapida parallelizzazione del multiplexing, la capacità di gestire ed elaborare volumi di reagenti ridotti e l'impronta strumentale drasticamente ridotta.

La microfluidica potrebbe offrire simultaneamente efficienza analitica e alta capacità di throughput come tecnologia di miniaturizzazione, senza la mancanza di precisione e automazione. La tecnologia microfluidica non è solo un potente strumento per lo screening veloce e lo studio dello sviluppo di farmaci durante il processo di applicazione del farmaco, ma anche per i suoi dispositivi miniaturizzati per abbassare i costi e il consumo di reagenti.

Negli ultimi anni sono stati fatti progressi significativi nello sviluppo di componenti e sistemi di screening dei farmaci basati sulla microfluidica. Per lo screening dei farmaci, vengono utilizzati diversi

2019-1-BG01-KA203-062371

tipi di chip microfluidici per migliorare l'efficienza dello screening e diminuire i costi. Diversi tipi comuni di tecnologia chip sono descritti nei paragrafi seguenti.



**Figura 8. Applicazione di chip microfluidico nello screening farmacologico**

*Microfluidica a goccia* – Per eseguire esperimenti in flusso continuo o segmentato, la tecnologia microfluidica a goccia utilizza goccioline liquide compartimentate da un fluido immiscibile come vasi di reazione separati da nanolitri a picolitri. Tali metodi mostrano vantaggi significativi, come l'uso ridotto del campione, una migliore velocità di reazione e una maggiore efficienza e riproducibilità, gestendo volumi incredibilmente piccoli con un robusto controllo della composizione.

Sulla base del processo sequenziale tecnica droplet array, metodi microfluidici goccia può essere utilizzato per lo screening combinazione di farmaci (Figura 8A), per lo screening di varie combinazioni di dosaggio e lunghezze di somministrazione, e per perfezionare il regime ottimale di dosaggio minimamente consumato che è importante per situazioni di malattia combinata.

*Organo-su-chip* – La regolazione dettagliata della struttura e del flusso su microscala permette di costruire una modellazione precisa delle strutture su microscala dei tessuti degli organi. Gli organi su chip sono sistemi biomimetici che sono micro-ingegnerizzati e rappresentano unità funzionali essenziali



2019-1-BG01-KA203-062371

degli organi umani viventi. Le funzioni di più organi e tessuti, come il fegato, i reni, i polmoni e l'intestino, sono stati replicati come modelli in vitro fino ad oggi. Questi sistemi potrebbero essere utilizzati come modelli in vitro che permettono di simulare e modulare farmacologicamente processi biologici complessi.

Il chip d'organo simula i processi di base del corpo umano, utilizzando un certo numero di cellule per creare un chip biomimetico con funzioni fisiologiche simili sulla struttura unica del chip, che è paragonabile all'ambiente esterno reale della malattia rispetto al tipico modello di coltura monocellulare.

Al fine di replicare la complessa microarchitettura del tessuto canceroso, un microsistema che permette la co-cultura di sferoidi di tumore al seno con le cellule vicine in un sistema microfluidico 3D compartimentato è stato stabilito per contribuire a creare la piattaforma di screening di farmaci contro il cancro al seno (Figura 8B). Per lo studio della migrazione delle cellule tumorali e lo screening di farmaci anticancro, co-cultura di più tessuti con un sistema microfluidico potrebbe essere utilizzato.

*Altri chip microfluidici per lo screening farmacologico* – Ci sono diverse altre tecnologie applicate ai chip microfluidici per lo screening dei farmaci, oltre ai suddetti metodi esistenti, che estendono le idee dei ricercatori. L'aspetto più significativo e integrato dello sviluppo dei farmaci nella maggior parte delle industrie farmaceutiche e diverse biotecnologie in tutto il mondo è stato un sistema HTDS eccezionale.

Con l'uso di sistemi microfluidici di array di tessuti ad accesso aperto e di chip di microarray di cellule, è possibile effettuare lo screening di varie concentrazioni e combinazioni di farmaci. Varie configurazioni e array di piccole camere di coltura possono essere generate dal diverso design del chip. I generatori di gradiente di concentrazione possono fornire un efficace gradiente di concentrazione liquida, e questi dispositivi sono stati implementati e combinati con tecnologie microfluidiche da diversi gruppi di ricerca per ottimizzare i sistemi HTDS. I miscelatori microfluidici diffusivi in Figura 8C potrebbe anche riconoscere un HTDS completamente automatico.

Le piattaforme di array di cellule sono costruite utilizzando materiale polidimetilsilossano (PDMS) in alcuni canali microfluidici per lo screening dei farmaci. La struttura dei chip, però, è difficile e ha alcuni svantaggi, come i costosi stampi di silicio e l'assorbimento biomolecolare. Come matrice extracellulare naturale (ECM), l'idrogel diacrilato di poli (etilenglicole) (PEGDA) ha proprietà meccaniche e contenuto d'acqua identici. Gli idrogeli microfluidici PEGDA sono stati comunemente usati per l'incapsulamento delle cellule e sono permeabili a composti come acqua, biomolecole e sostanze chimiche. Al fine di ricercare l'effetto di trattamento combinatorio di due farmaci, sono stati utilizzati dispositivi microfluidici fatti di questi tipi di materiali e combinati con tecnologie di coltura di cellule cerebrali 3D (Figura 8D).

Il fascino del chip microfluidico è che per svolgere varie funzioni, può avere più strutture progettate e può essere combinato per estendere la sua gamma di applicazioni con diversi dispositivi e apparecchiature di test. Tuttavia, sono necessari notevoli sforzi di progettazione, produzione e



2019-1-BG01-KA203-062371

ottimizzazione. Ogni modello ha caratteristiche uniche. Viene utilizzato non solo per lo screening farmacologico, ma anche per il test farmacologico.

### 3. Microarray proteico

Nella ricerca sulle proteine, i microarray proteici sono strumenti utili in modo imparziale e ad alto rendimento, poiché permettono di caratterizzare in parallelo fino a migliaia di proteine purificate individualmente. L'adattabilità di questa tecnologia ha reso possibile il suo utilizzo in una vasta gamma di applicazioni, tra cui lo studio delle interazioni molecolari a livello di proteoma, l'analisi delle alterazioni post-traslazionali, la scoperta di nuovi bersagli farmacologici e la valutazione delle interazioni patogeno-ospite. Inoltre, la tecnologia ha già dimostrato di essere efficace nel profilare la specificità degli anticorpi, così come nell'identificare nuovi biomarcatori per le malattie autoimmuni e i tumori in particolare.

Le proteine sono biomolecole complesse con un ampio spettro di strutture e funzioni, e come tali, studiarle in modo avanzato è una sfida. Esistono tre tipi principali di microarray di proteine: funzionali, analitici e a fase inversa. I microarray di proteine funzionali sono assemblati in modo high-through-put con proteine purificate/sintetizzate, permettendo a centinaia e persino migliaia di proteine diverse di essere esaminate in parallelo con le loro proprietà biochimiche. Per rilevare o misurare campioni biologici complessi, i microarray proteici analitici utilizzano reagenti di affinità immobilizzati sull'array. Infine, i campioni biologici complessi immobilizzati sull'array sono utilizzati dai microarray proteici in fase inversa che utilizzano reagenti di affinità per l'identificazione.

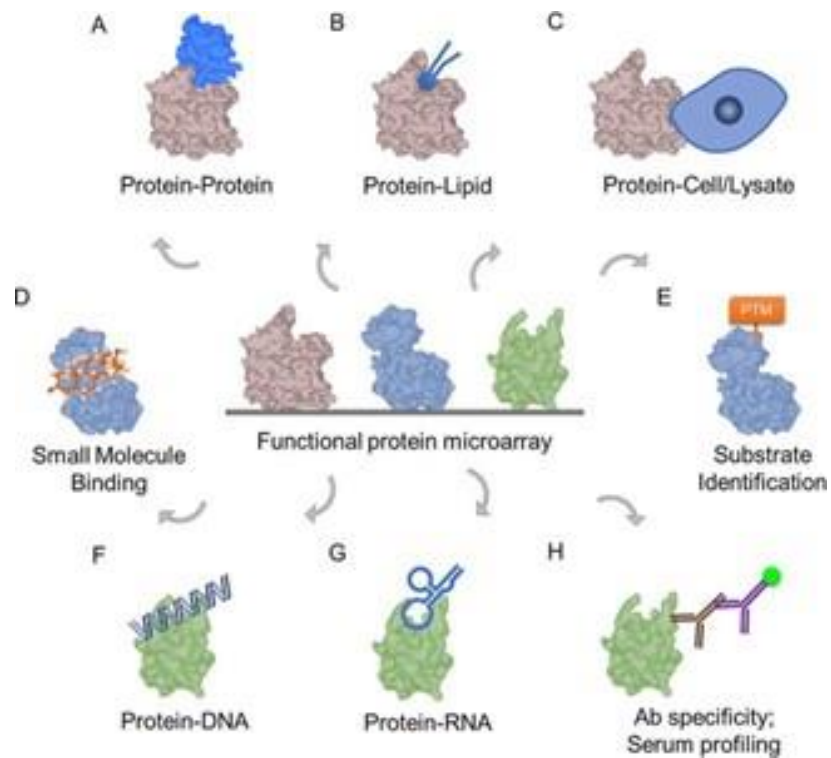
I microarray di proteine funzionali sono più capaci di identificare le interazioni deboli, più flessibili per le proteine a bassa abbondanza, e più capaci di analizzare campioni grezzi come il siero, rispetto ad altri metodi, come la spettrometria di massa. In termini di differenze nella copertura del proteoma, nelle lunghezze delle proteine e nelle pipeline di produzione, ad oggi sono stati prodotti diversi tipi di microarray di proteine funzionali.

*Sviluppo del Microarray proteico funzionale* – L'insieme delle proteine che possono essere espresse da un genoma è il proteoma. Tipicamente, la creazione di un microarray di proteoma purificato richiede l'assemblaggio di un insieme di cornici di lettura aperte (ORF) a livello genomico clonate in un vettore di espressione, l'espressione della proteina codificata nelle cellule, la purificazione della proteina individuale ad alta produttività e l'immobilizzazione della proteina su un microarray.

*Applicazione di Microarray di Proteoma di Lievito* – Per il profiling delle interazioni molecolari a livello del proteoma, i microarray delle proteine funzionali, specialmente i microarray del proteoma purificato, sono utili e permettono uno screening dettagliato e imparziale. I ricercatori hanno usato microarray di proteine funzionali nella ricerca fondamentale per studiare le interazioni proteina-proteina, le interazioni proteina-lipide, le interazioni proteina-DNA, proteina-cellula/lisati, legame di piccole molecole, interazioni proteina-RNA, e PTMs, come acetilazione, SUMOilazione, glicosilazione,

2019-1-BG01-KA203-062371

ubiquitinazione, fosforilazione e metilazione (Figura 9A-9G). Riassumiamo gli studi rappresentativi nella Tabella I sulla base delle applicazioni di ricerca visto in Figura 9.



**Figura 9. Applicazione di Microarray proteico funzionale**



2019-1-BG01-KA203-062371

#### 4. Applicazioni dei biochip

La maggior parte delle applicazioni emergenti dei biochip sono incluse nella tabella 1.

**Tabella 1. Applicazioni dei biochip**

<b>Biochip nel cibo</b>	Biochip che rileva organismi geneticamente modificati (ogm) negli alimenti.
<b>Biochip nella diagnostica</b>	Biochip di DNA che rivoluziona il modo in cui la professione medica esegue test sul sangue.
<b>Biochip nell'epidemia della Tuberculosis</b>	La tecnologia biochip dovrebbe aiutare a combattere la nuova varietà di ceppi resistenti ai farmaci della malattia.
<b>Biochip nel cancro</b>	La tecnologia dei chip Biosensor fornisce un accesso rapido e semplice alle informazioni critiche relative ai danni al DNA causati dai composti che producono cancro e aiuta nella diagnosi precoce del cancro del colon.
<b>Biochip nello sviluppo di farmaci</b>	Chip di DNA che trovano differenze genetiche tra le persone che rispondono a un farmaco e coloro che non lo fanno, a partire dalla fase II, o da studi clinici a metà stadio.



## Referenze

Adams DA, Brus L, Chidsey CED, et al. 2003. Charge transfer on the nanoscale: current status. *J Phys Chem B*, 107: 6668-97.

Ashley GW, Henise J, Reid R, et al. 2013. Hydrogel drug delivery system with predictable and tunable drug release and degradation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 2318–2323.

Bard AJ, Faulkner LR. 2001. *Electrochemical Methods*. New York: John W Willey & Sons.

Benson DE, Conrad DW, de Lorimier RM, et al. 2001. Design of bioelectronic interfaces by exploiting hinge-bending motions in proteins. *Science*, 293:1641–4.

Boon EM, Ceres DM, Drummond TG, et al. 2000. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nature Biotech*, 18:1096–100.

Boon EM, Livingston AL, Chmiel NH, et al. 2003. DNA-mediated charge transport for DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:12543–7.

Boon EM, Salas JE, Barton JK. 2002. An electrical probe of protein-DNA interactions on DNA-modified surfaces. *Nat Biotechnol*, 20:282-6.

Brazill SA, Kim PH, Kuhr WG. 2001. Capillary gel electrophoresis with sinusoidal voltammetric detection: A strategy to allow four-“color” DNA sequencing. *Anal Chem*, 73:4882–90.

Burgstaller P, Girod A, Blind M. 2002. Aptamers as tools for target prioritization and lead identification. *Drug Discov Today*, 7:1221–8.

Choi Y, Hyun E, Seo J, et al. 2015. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. *Lab Chip*, 15: 3350–3357.

Cooper MA, Dultsev FN, Minson T, et al. 2001. Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. *Nature Biotechnol*, 19:833–7.

Dai Z, Yan F, Yu H, et al. 2004. Novel amperometric immunosensor for rapid separation-free immunoassay of carcinoembryonic antigen. *J Immuno Methods*, 287:13–20.

Das, H.K. 2005. “Functional Genomics using Microarrays Technology.” Text book of Biotechnology, pp .1276-1288, Wiley Dreamtech Publisher.

Drummond TG, Hill MG, Barton JK. 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*, 21:1192–9.



2019-1-BG01-KA203-062371

Fan C, Plaxco KW, Heeger AJ. 2003. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of picomolar DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:9134–7.

Fan C, Plaxco KW, Heeger AJ. 2005. Biosensors based on binding-modulated donor-acceptor distances. *Trends Biotechnol*, 23:186–92.

Fan Y, Nguyen DT, Akay Y, et al. 2016. Engineering a brain cancer chip for high-throughput drug screening. *Sci. Rep.*, 6: 25062.

Fritz J, Cooper EB, Gaudet S, et al. 2002. Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:14142–6.

Gao Z, Binyamin G, Kim H-H, et al. 2002. Electrodeposition of redox polymers and co-electrodeposition of enzymes by coordinative crosslinking. *Angew Chem Int Ed*, 41:810–13.

Gaylord BS, Heeger AJ, Bazan GC. 2002. DNA detection using watersoluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 99:10954.

Griffiths AD, Tawfik DS. 2000. Man-made enzymes – from design to in vitro compartmentalisation. *Curr Opin Biotech*, 11:338–53.

Heeger AJ. 2000. Nobel Lecture: Semiconducting and Metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials [online]. URL: [http:// wwwnobelse](http://www.nobel.se).

Hook F, Ray A, Norden B, et al. 2001. Characterization of PNA and DNA immobilization and subsequent hybridization with DNA using acoustic- shear-wave attenuation measurements. *Langmuir*, 17:8305–12.

Hsiung LC, Chiang CL, Wang CH, et al. 2011. Dielectrophoresis-based cellular microarray chip for anticancer drug screening in perfusion microenvironments. *Lab Chip*, 11: 2333–2342.

Li Z, Su W, Zhu Y, et al. 2017. Drug absorption related nephrotoxicity assessment on an intestine-kidney chip. *Biomicrofluidics*, 11: 034114.

Lin D, Li P, Lin J, et al. 2017. Orthogonal screening of anticancer drugs using an open-access microfluidic tissue array system. *Anal. Chem.*, 89: 11976–11984.

Liu J, Zhang Y, Jiang M, et al. 2017. Electrochemical microfluidic chip based on molecular imprinting technique applied for therapeutic drug monitoring. *Biosens. Bioelectron.*, 91: 714–720.

Moore CD, Ajala O.Z, Zhu H. 2016. Applications in high-content functional protein microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 30: 21–27.





2019-1-BG01-KA203-062371

- Palecek E, Jelen F. 2002. Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors. *Crit Rev Anal Chem*, 32:261–70.
- Palecek E. 2004. Surface-attached molecular beacons light the way for DNA sequencing. *Trends Biotechnol*, 22:55–8.
- Park SJ, Taton TA and Mirkin CA. 2002. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 295:1503–6.
- Patolsky F, Lichtenstein A, Willner I. 2001. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. *Nature Biotech*, 19:253–7.
- Patolsky F, Weizmann Y, Wilner I. 2004. Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors. *Angew Chem Int Ed*, 43:2113–17.
- S. Mi, Z. Du, Y. Xu, et al. 2016. Microfluidic co-culture system for cancer migratory analysis and anti-metastatic drugs screening. *Sci. Rep.*, 6: 35544.
- Schuster GB. 2000. Long-range charge transfer in DNA: transient structural distortions control the distance dependence. *Acc Chem Res*, 33:253–60. Sullivan CKO. 2002. Aptasensors—the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem*, 372:44–8.
- Stone HA, Stroock AD, Ajdari A. 2004. Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 36: 381–411.
- Sugiura S, Hattori K, Kanamori T. 2010. Microfluidic serial dilution cell-based assay for analyzing drug dose response over a wide concentration range. *Anal. Chem.*, 82: 8278–8282.
- Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. 2000. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289:1757–60.
- Thorp HH. 2003. Reagentless detection of DNA sequences on chemically modified electrodes. *Trends Biotechnol*, 21:522–4.
- Umek RM, Lin SW, Vielmetter J, et al. 2001. Electronic detection of nucleic acids—A versatile platform for molecular diagnostics. *J Mol Diag*, 3:74–84.
- Van Hove AH, Antonienko E, Burke K, et al. 2015. Temporally tunable, enzymatically responsive delivery of proangiogenic peptides from poly (ethylene glycol) hydrogels. *Adv. Healthc. Mater.*, 4: 2002–2011.
- Whitesides GM, Grzybowski B. 2002. Self-assembly at all scales. *Science*, 295:2418–21.
- Willner I. 2002. Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry. *Science*, 298:2407.



2019-1-BG01-KA203-062371

Wosnick JH, Swager TM. 2000. Molecular photonic and electronic circuitry for ultra-sensitive chemical sensors. *Curr Opin Chem Biol*, 4:715–20.

Xiao Y, Patolsky F, Katz E, et al. 2003. Plugging into enzymes: nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299:1877–81.

Xu H, Wu H, Huang F, et al. 2005. Magnetically assisted DNA assays: High selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent transduction. *Nucleic Acids Res*, 33:e83.

Yu CJ, Wan YJ, Yowanto H, et al. 2001. Electronic detection of single-base mismatches in DNA with ferrocene-modified probes. *J Am Chem Soc*, 123:11155–61.

Yu X, Kim SN, Papadimitrakopoulos F, et al. 2005. Protein immunosensor using single-wall carbon nanotube forests with electrochemical detection of enzyme labels. *Mol Biosyst*, 1:70–8.



***Project website: [www.digit-biotech.eu](http://www.digit-biotech.eu)***

***The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.***