

---

# Theremino DNA Meter

---

Fluorimetro per la Misura della  
concentrazione di DNA

---

Ana Rodriguez (MUSE) - Lodovico Lappetito (Theremino)

---

# Sommario

Principio di funzionamento .....	3
Colorante Fluorescente “MidoriGreen” .....	4
Sorgente di Eccitazione .....	4
Fotodiodo .....	5
Filtro Ottico.....	6
Fluoresceina come sostituto del DNA + MidoriGreen.....	6
Realizzazione del Fluorimetro .....	7
Hardware .....	9
Lettura del Segnale del Fotodiodo .....	9
Alimentazione e Pilotaggio LED.....	10
Schema completo e PCB.....	11
Software .....	14
Theremino HAL.....	14
Theremino DNA Meter .....	15
Procedura di Calibrazione.....	16
Procedura di Misurazione.....	17
Procedura Manuale .....	18

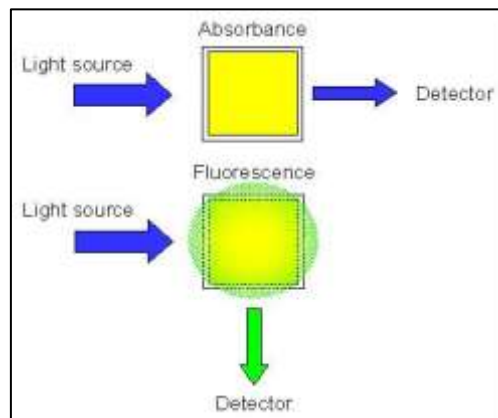
## Principio di funzionamento

Per la misura della concentrazione di acidi nucleici (DNA, RNA) in un campione sono disponibili svariati metodi.

Uno dei metodi si basa **sull'assorbimento** nel vicino ultravioletto : queste molecole assorbono selettivamente in una banda di lunghezze d'onda attorno ai 200nm. Misurando quindi la curva di assorbanza del campione è possibile determinare la concentrazione di acidi nucleici presenti nel campione. Questo metodo però richiede la disponibilità di una sorgente luminosa nella regione UV e di uno spettrometro sensibile a queste lunghezze d'onda.

Un metodo più semplice si basa invece sulla **fluorescenza** che alcune molecole coloranti acquisiscono quando si legano alle molecole degli acidi nucleici.

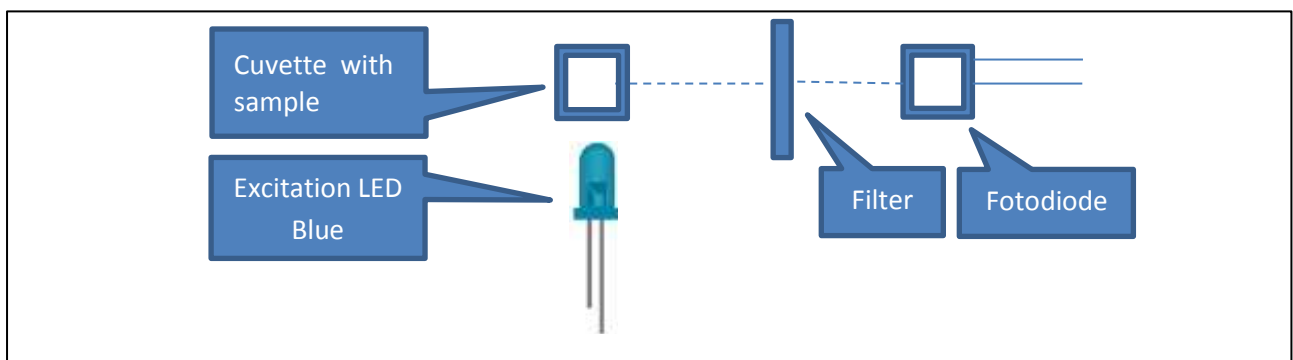
Aggiungendo al campione in esame un quantitativo noto di colorante e misurando l'intensità della fluorescenza è possibile risalire alla concentrazione di acidi nucleici presenti nel campione.



Il prototipo di molecola colorante è il bromuro di etidio che però è nocivo, essendo carcinogeno. Recentemente sono diventate disponibili altre sostanze che agiscono allo stesso modo ma sono più sicure rispetto al bromuro di etidio.

Nel nostro caso è stato adottato il colorante noto commercialmente come **MidoriGreen**.

Nella immagine riportata sotto è riportato lo schema a blocchi del fluorimetro.



La cuvette porta campione viene illuminata dalla sorgente di eccitazione (LED blue) ed ortogonalmente rispetto alla direzione di illuminazione è posto il fotodiode che raccoglie

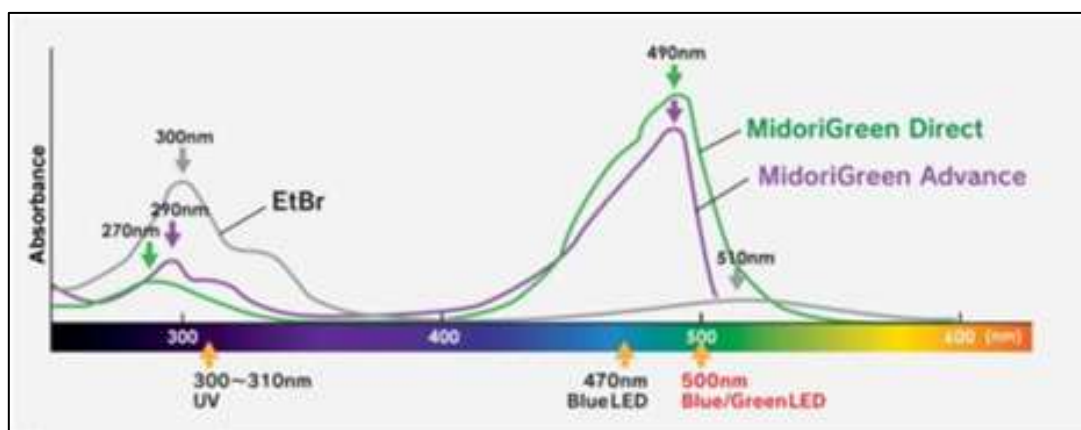
l'emissione di fluorescenza. La luce proveniente dal LED viene filtrata in modo che il fotodiode venga raggiunto soltanto dalla luce proveniente dalla fluorescenza del campione.

## Colorante Fluorescente "MidoriGreen"

Il colorante per acidi nucleici "MidoriGreen" è una nuova e sicura alternativa al tradizionale etidio bromuro (EtBr) per la rilevazione dsDNA, ssDNA e RNA in gel di agarosio. Quasi identico a EtBr in termini di prestazioni e utilizzo, MidoriGreen è molto meno nocivo per gli organismi viventi.

Il colorante "MidoriGreen" ha due picchi secondari fluorescenza di eccitazione (~300nm; ~400nm) e un forte picco di eccitazione centrato attorno **500nm**. L'emissione di fluorescenza è centrata intorno **540nm**.

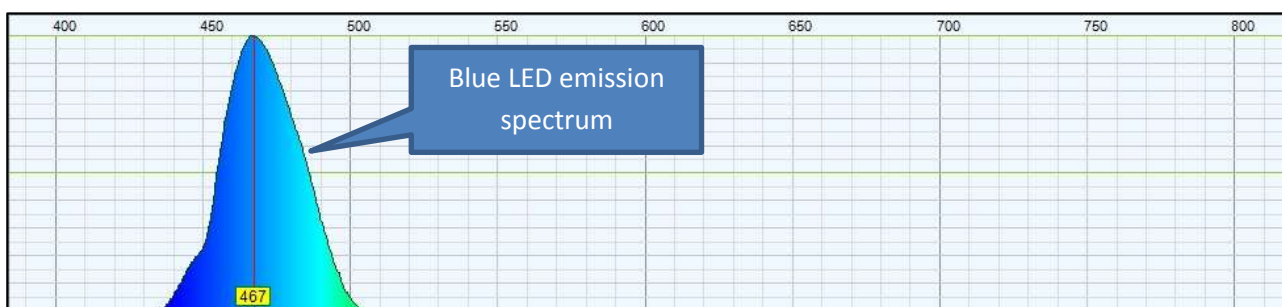
Nella immagine sotto viene riportato lo spettro di assorbimento del MidoriGreen paragonato allo spettro del bromuro di etidio.



## Sorgente di Eccitazione

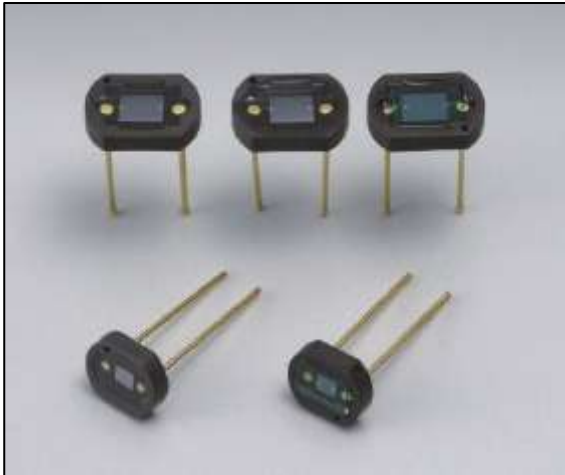
Come sorgente di eccitazione della fluorescenza viene utilizzato un semplice LED blue. Il LED Blue emette luce su di una lunghezza d'onda centrata sui **470nm**, vicina quindi al picco di assorbimento del MidoriGreen. Nella figura sotto viene mostrato lo spettro di emissione del LED. Come si vede dallo spettro l'emissione del LED è compresa circa dai 440 ai 500nm.

Usare un LED blue per l'eccitazione è conveniente rispetto alla sorgente UV anche perché in questo modo si evita di danneggiare le molecole di DNA che sono sensibili alla radiazione ultravioletta.



## Fotodiodo

Per la misura della intensità della fluorescenza viene utilizzato un fotodiodo ceramico Hamamatsu “general purpose” di tipo **S1133-14**. Caratterizzato da una buona sensibilità su di un ampio range di lunghezze d’onda e da una bassa “dark current”, utile quando si fanno misure di bassa luminosità.



Di seguito riportiamo le principali caratteristiche del fotodiodo :

**tipo** : S1133-14

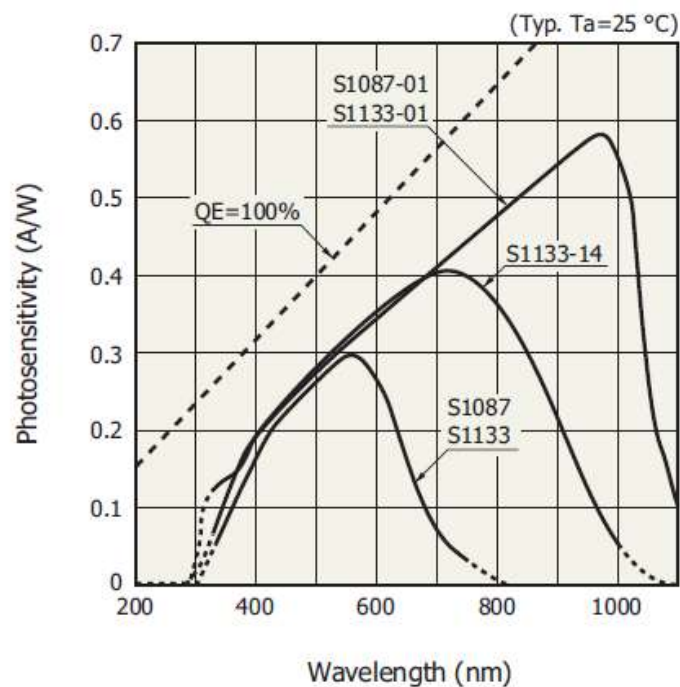
**Spectral response range  $\lambda$ (nm)** : 320 – 1000

**Peak sensitivity (nm)** : 720

**Dark Current  $I_d$  (pA)** : 20

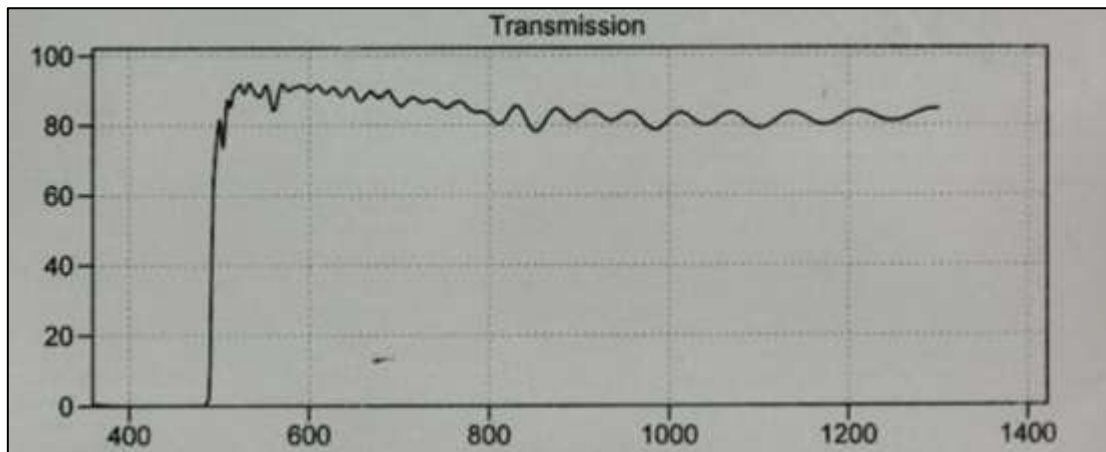
**Terminal Capacitance (pF)** : 200

Nella figura sotto viene mostrato lo spettro della sensibilità in funzione della lunghezza d’onda della luce.



## Filtro Ottico

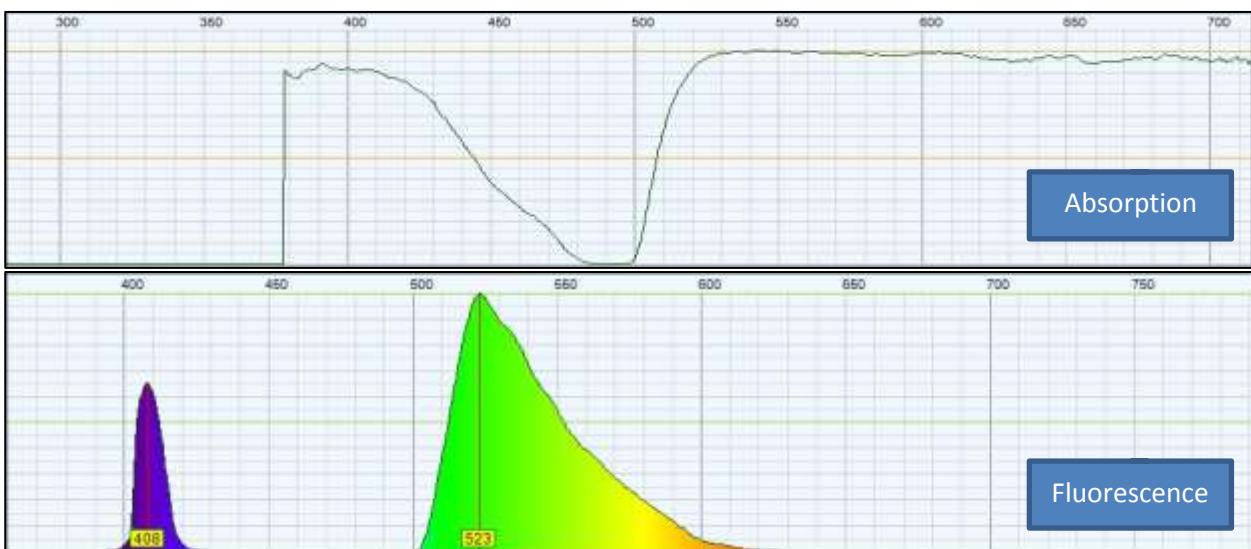
Per evitare che il fotodiodo venga raggiunto anche dalla luce proveniente dalla sorgente di eccitazione (LED blu con emissione a 470nm), il fotodiodo è stato schermato da un **filtro ottico "passa basso"** che fa passare solo la luce con lunghezza d'onda maggiore di **490nm**. In questo modo viene fermata l'emissione di eccitazione a 470nm ma non l'emissione di fluorescenza a 540nm. Dato che il LED emette comunque una piccola parte di luce anche oltre i 490nm il fotodiodo viene raggiunto anche da una piccola parte della emissione di eccitazione, della quale si tiene conto nel software di acquisizione dati.



## Fluoresceina come sostituto del DNA + MidoriGreen

Per i test e la calibrazione del fluorimetro non è strettamente necessario utilizzare campioni di DNA con relativo colorante : è sufficiente disporre di una soluzione diluita di fluoresceina, con la quale è possibile preparare dei campioni che simulano abbastanza fedelmente il comportamento di una soluzione di MidoriGreen.

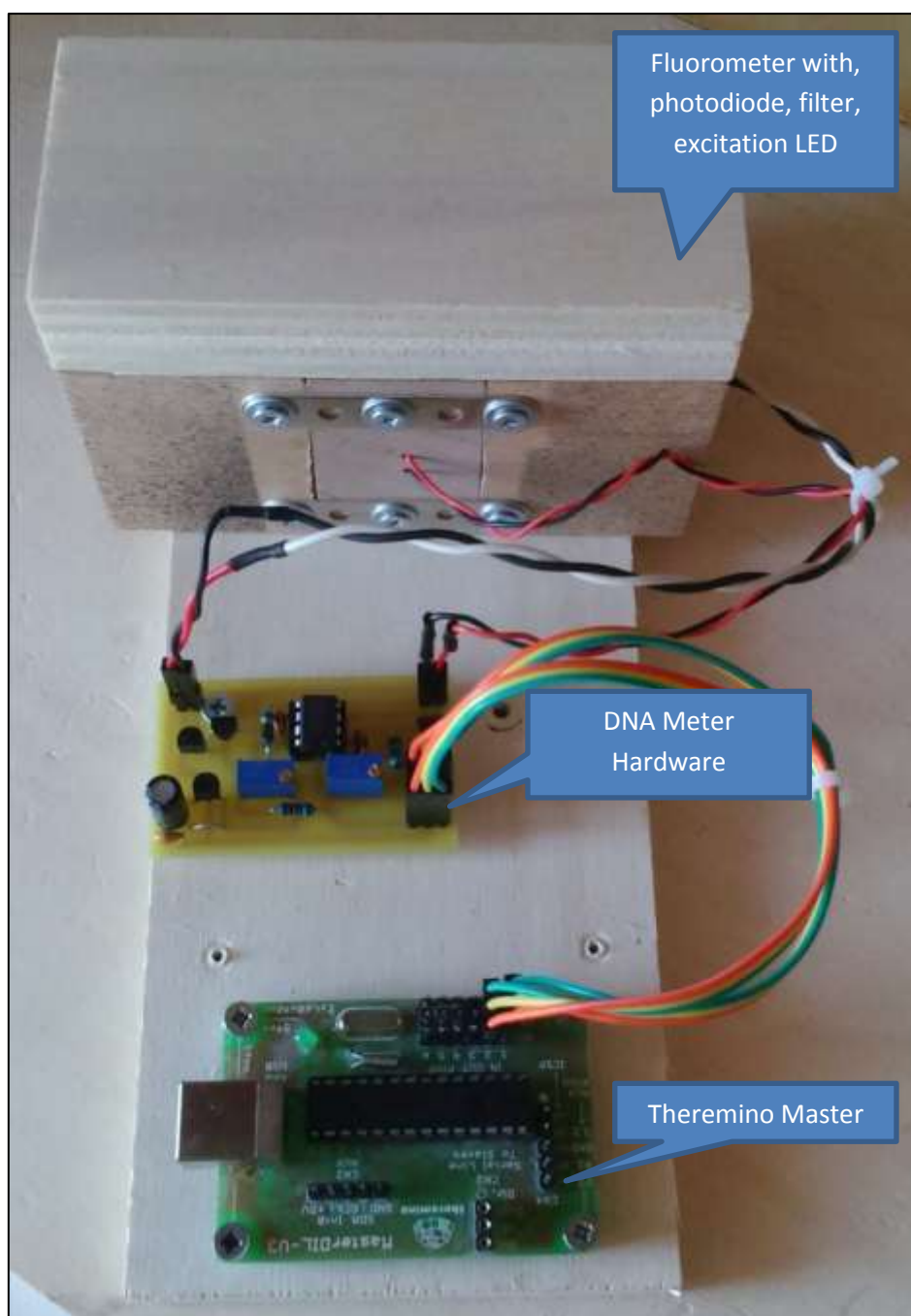
Nelle immagini riportate ci sono gli spettri di assorbimento e di fluorescenza della fluoresceina e si vede come seguono da vicino quelli del colorante MidoriGreen.



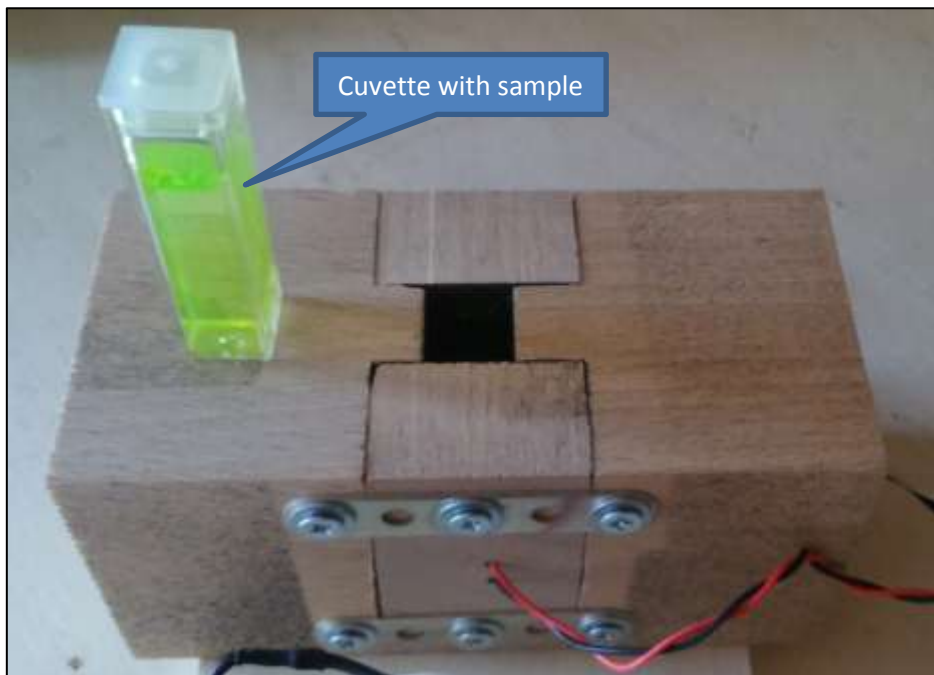
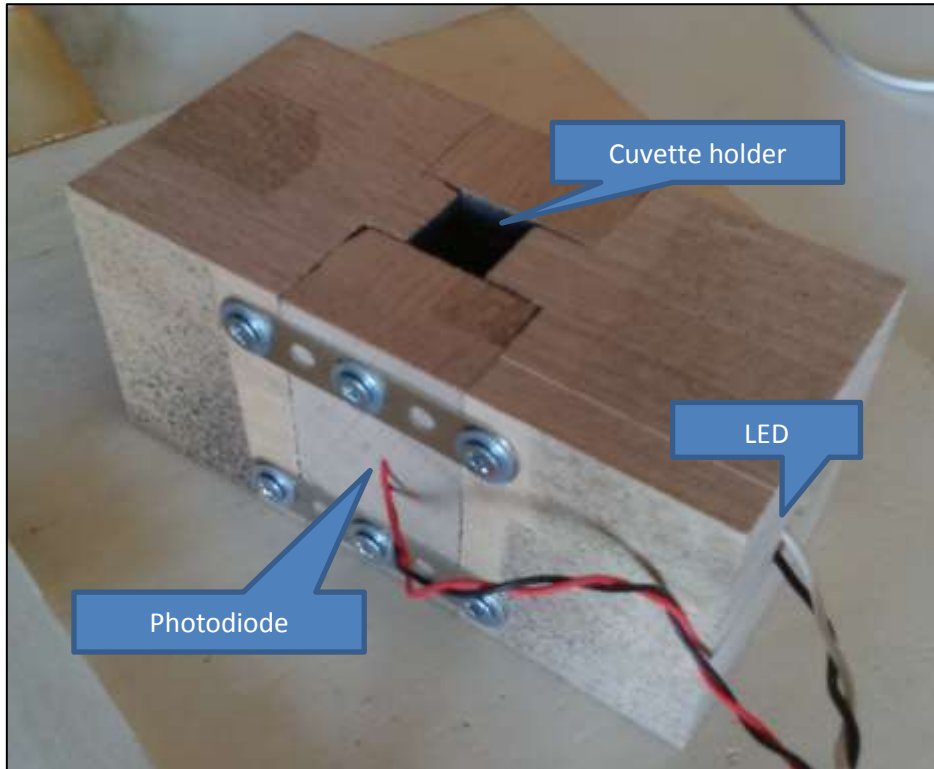
## Realizzazione del Fluorimetro

E' stato realizzato un prototipo di fluorimetro (immagini riportate nel seguito) per la misura della concentrazione di acidi nucleici. Lo strumento è basato sul principio della fluorescenza descritto nel capitolo precedente. Per la lettura del segnale del fotodiode e per il pilotaggio del LED di eccitazione è stato progettato e realizzato un circuito elettronico, denominato DNA Meter, che viene collegato al Theremino Master che effettua la lettura / scrittura dei dati che vengono gestiti da un apposito software descritto nel seguito.

Nella figura sotto si vede la cella porta-cuvette, che comprende anche fotodiode, LED e filtro, la scheda del DNA Meter ed il Theremino Master per l'acquisizione dei dati e per l'interfacciamento con il PC.



Nella immagine sotto si vede il dettaglio della cella porta cuvette che è composta da quattro blocchetti di legno fissati con staffe e viti, l'interno dei blocchetti è verniciato di nero per diminuire i riflessi. Due blocchetti sono forati e sagomati per ospitare fotodiiodo, filtro e LED. Nella seconda immagine viene anche mostrata una cuvette con la soluzione di fluoresceina utilizzata per i test.



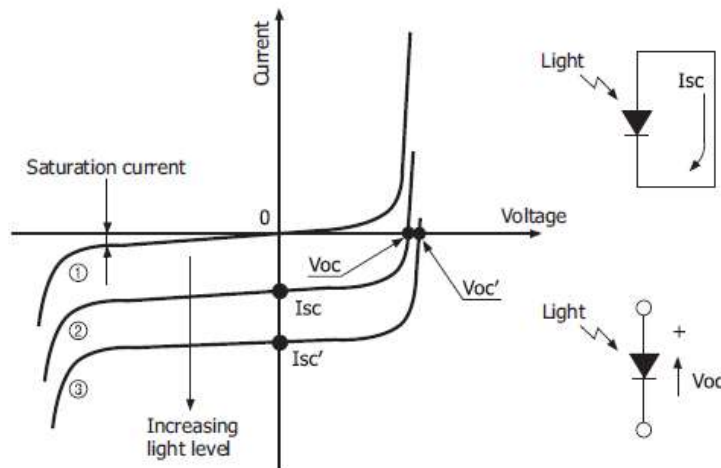


# Hardware

## Letture del Segnale del Fotodiiodo

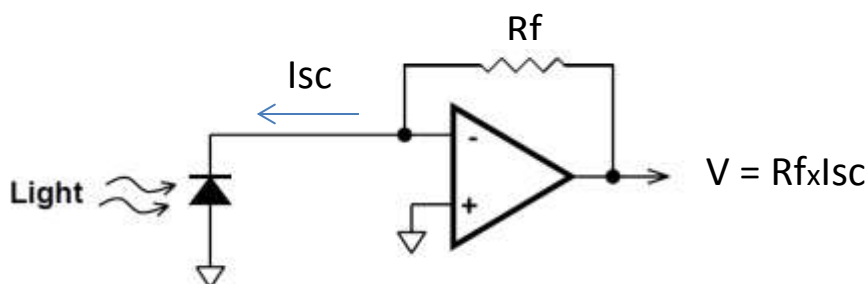
La parte hardware del DNA Meter è costituita dall'amplificatore del segnale del fotodiiodo, dal circuito di pilotaggio del LED di eccitazione e dalla sezione che provvede a fornire la tensione stabilizzata di 3,3V di alimentazione degli amplificatori operazionali. Il tutto viene alimentato a partire dai 5V forniti dalla scheda Theremino Master. I segnali analogici proporzionali alla luminosità captata dal fotodiiodo vengono inviati ad un **input analogico** e poi convertiti in digitale ed inviati al PC. Analogamente il segnale di pilotaggio del LED di eccitazione viene prodotto da un output digitale gestito direttamente dal software.

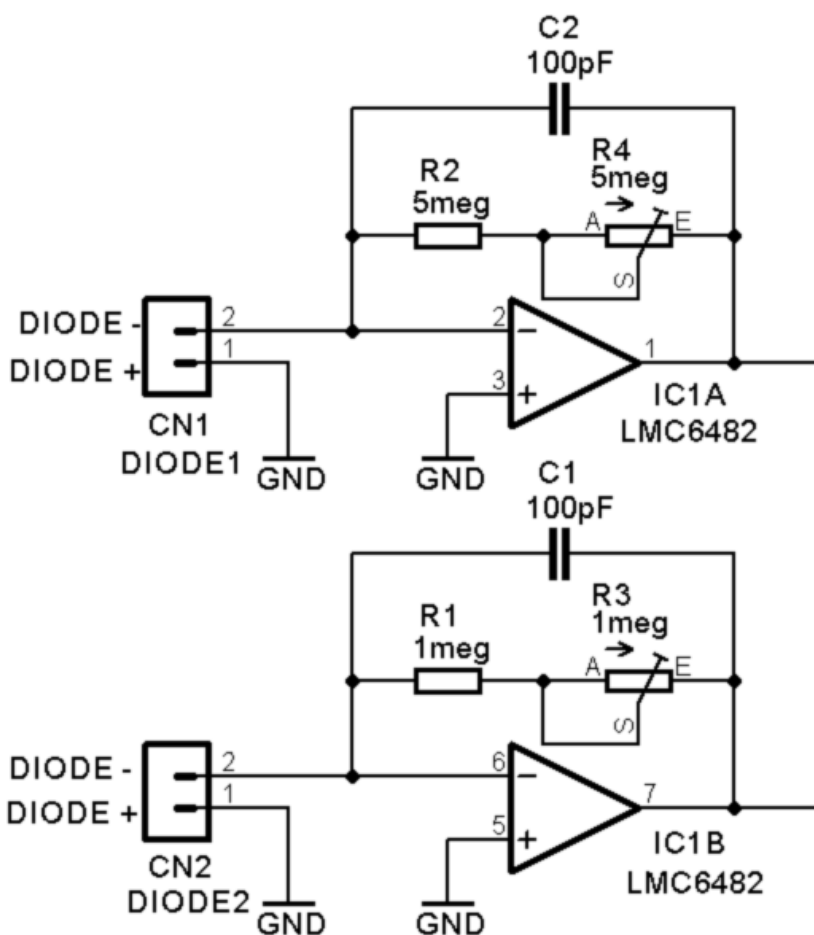
Il cuore dello strumento è il fotodiiodo. La caratteristica V-I è rappresentata nel grafico riportato sotto in cui si vede come la curva, nel quarto quadrante della polarizzazione inversa, si sposta su correnti maggiori in modo proporzionale alla luce incidente sulla giunzione P-N.



Per la lettura del segnale del fotodiiodo è stata scelta la configurazione in modalità fotovoltaica in cui l'anodo del fotodiiodo è collegato a massa, mentre il catodo è collegato al terminale invertente dell'amplificatore operazionale, anch'esso virtualmente a massa. Sul fotodiiodo non vi è quindi tensione e quindi il punto di lavoro si muove sull'asse della corrente a tensione nulla (**Isc** del diagramma sopra) : in questo modo la "dark current" è nulla. I principali vantaggi di questa configurazione sono :

- **Basso rumore**
- **Linearità di risposta**
- **Alta precisione**

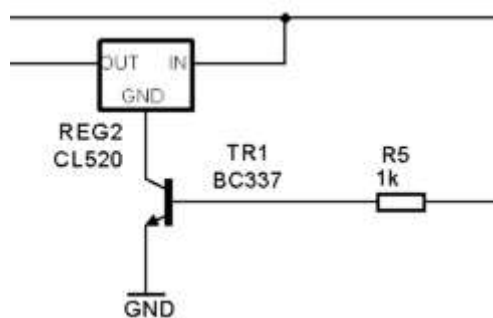
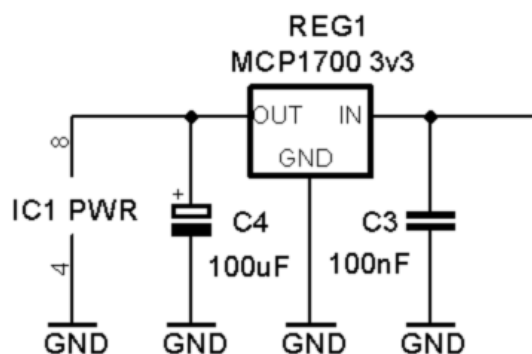




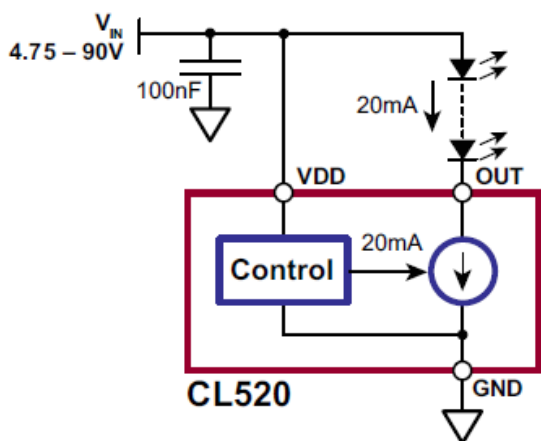
Lo schema che è stato adottato è quello riportato nella figura a sinistra. L'integrato **LMC6482** comprende due amplificatori operazionali rail-to-rail con stadio d'ingresso a CMOS caratterizzati da low input current. La tensione di alimentazione è singola ed è stato adottato il valore di 3,3V. In parallelo alla resistenza di feedback  $R_f$  è stato posto un condensatore da 100pF con lo scopo di stabilizzare l'amplificatore.  $C_f$  ed  $R_f$  costituiscono in pratica una cella passa-basso. Dato che l'integrato mette a disposizione due amplificatori si sono realizzati due canali : uno a guadagno medio ( $R_f = 1M\Omega$ ) ed uno a guadagno più elevato ( $R_f = 5M\Omega$ ), in entrambi i casi in serie alla resistenza di feedback è stato posto un trimmer dello stesso valore.

### Alimentazione e Pilotaggio LED

L'alimentazione dell'integrato LMC6482 viene ottenuta con il regolatore MCP1700 che fornisce una tensione stabilizzata di 3,3V. La tensione di ingresso del regolatore vale 5V e viene prelevata direttamente dalla scheda master.



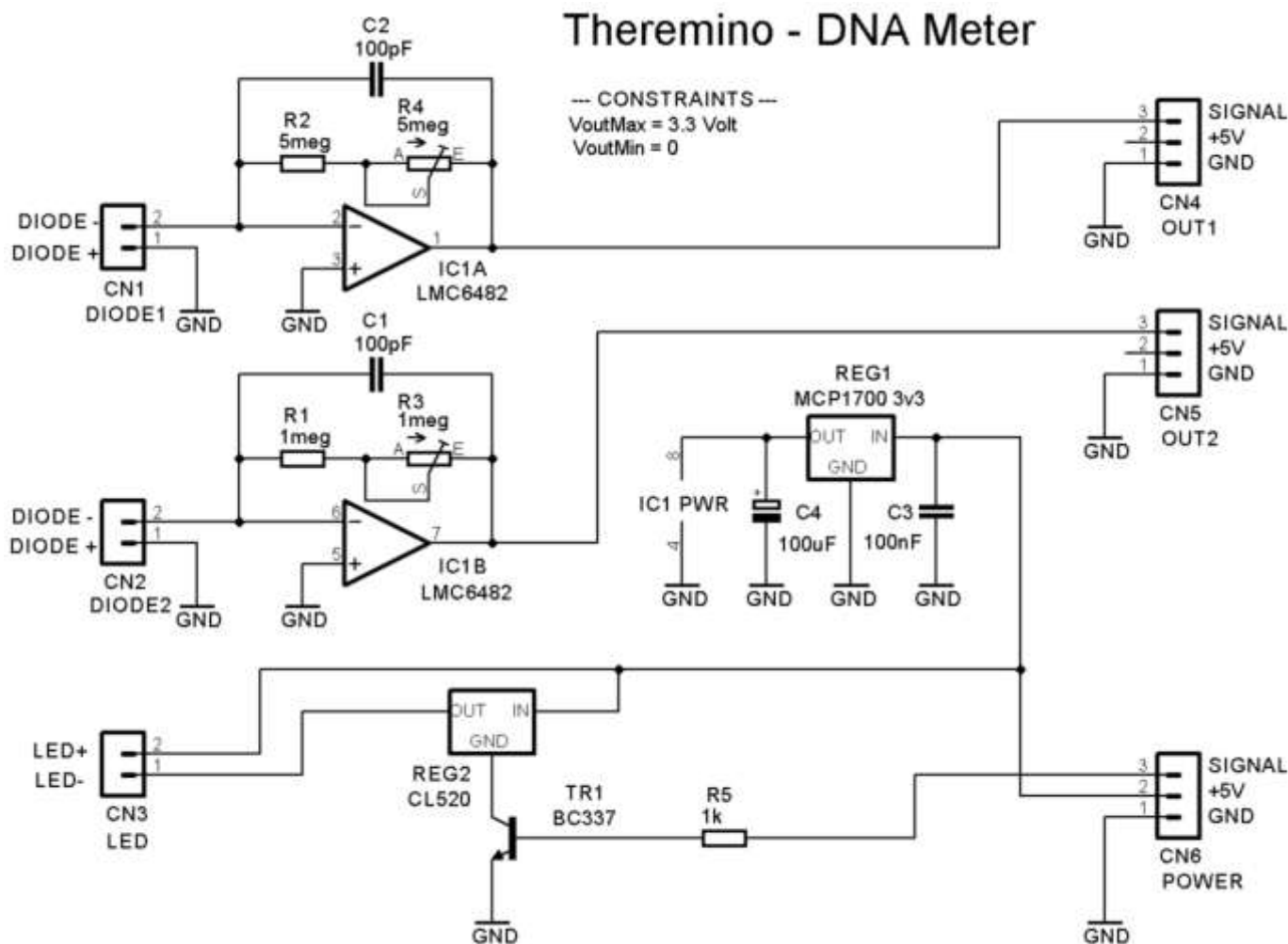
Il LED viene pilotato a **corrente costante** in modo da mantenere costante la sua emissione luminosa, il regolatore è il CL520 che fornisce una corrente costante di 20mA. L'accensione / spegnimento del LED viene ottenuto dal transistor BC337 pilotato da una uscita digitale della scheda master.



Nello schema riportato a destra viene schematizzato il funzionamento del driver per LED a corrente costante CL520.

### Schema completo e PCB

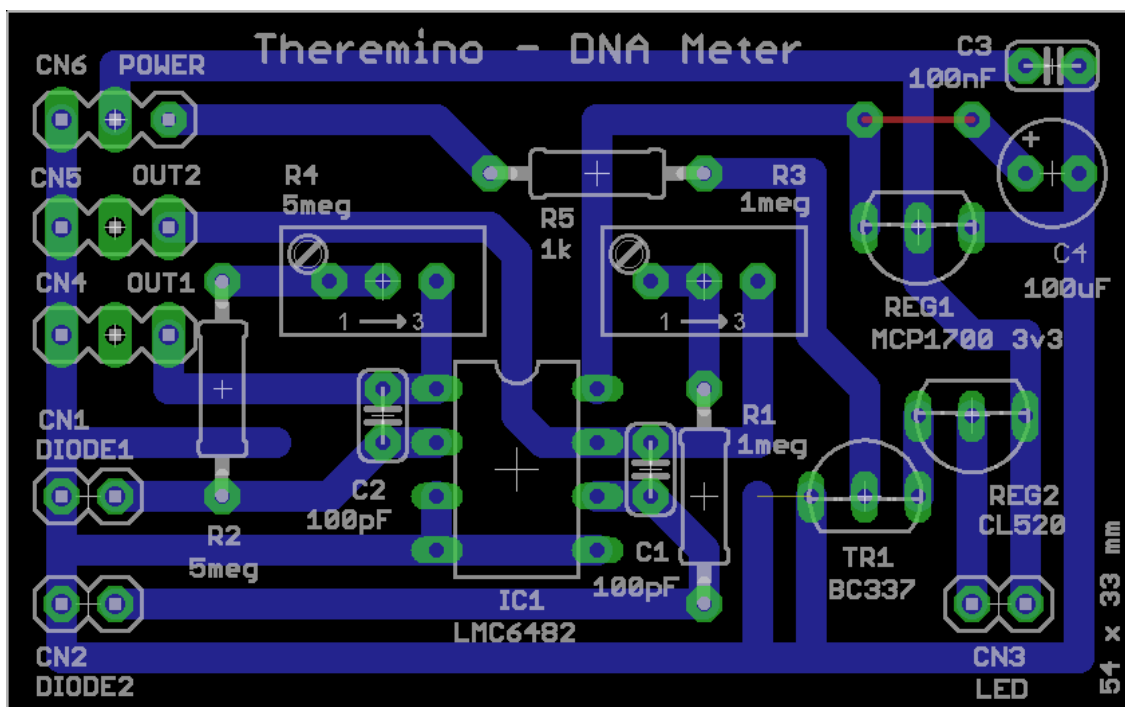
Nello figura seguente viene riportato lo schema completo comprendente i due canali per la lettura del segnale del fotodiode, la sezione di alimentazione e la sezione per il pilotaggio a corrente costante del LED di eccitazione :



Vista del PCB completo di connettori e componenti :



Vista del PCB con il dettaglio delle piste :





PCB del DNA Meter

Vista del PCB del Theremino Master completo di connettori e componenti :



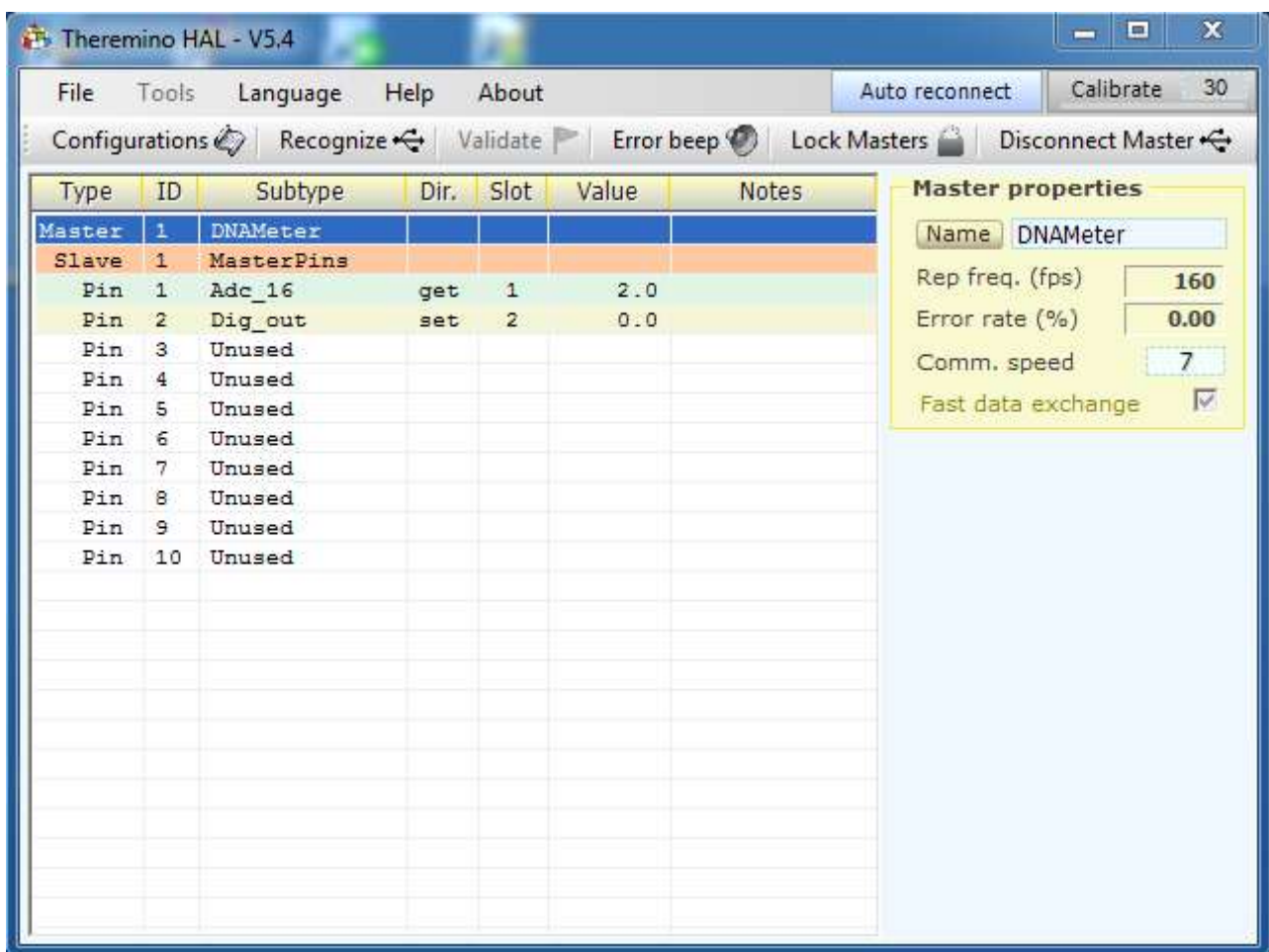
# Software

## Theremino HAL

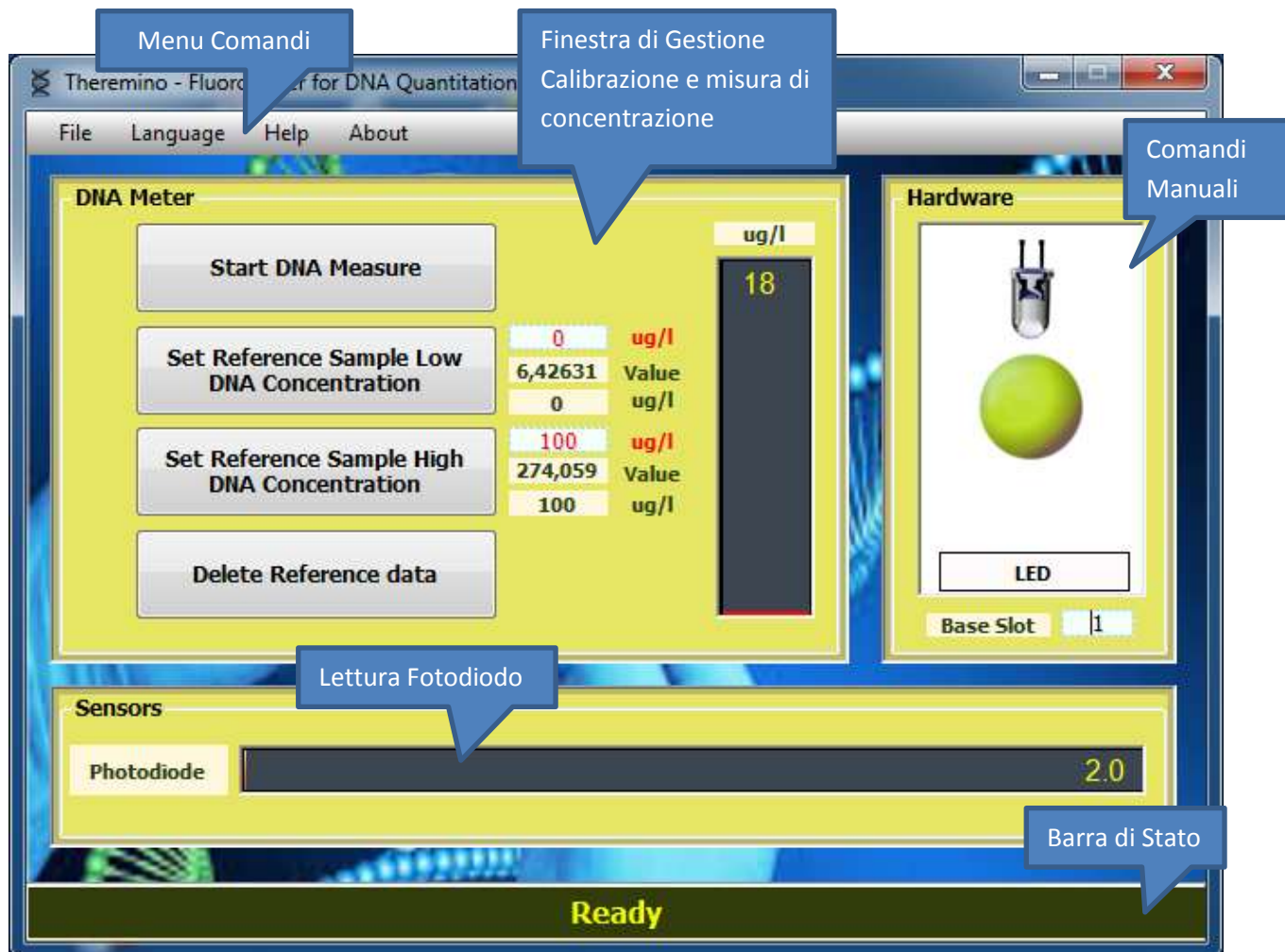
Il software del DNA Meter è basato sulla suite Theremino. L'applicazione che sovrintende alla comunicazione con l'hardware è **Theremino HAL**, la cui finestra viene mostrata nella figura sotto. HAL si occupa della comunicazione tra il PC ed il Master. La comunicazione avviene via interfaccia USB.

HAL viene lanciato automaticamente quando si avvia l'applicazione DNA Meter e deve continuare ad essere attivo.

Come si vede nella figura sotto il **pin 1** è riservato alla lettura del segnale analogico del fotodiode (ADC a 16 bit), mentre il **pin 2** è il segnale digitale che pilota il LED di eccitazione (Digital Output).



## Theremino DNA Meter



Nella immagine sopra si vede la finestra principale della applicazione **DNA Meter**.

### Menu Comandi :

- **File** : comandi relativi alla gestione della applicazione;
- **Language** : comandi per cambiare la lingua (Italiano, Inglese);
- **Help** : comandi per visualizzare la documentazione;
- **About** : informazioni sugli autori della applicazione;

**Barra di Stato** : Visualizza lo stato della applicazione. In particolare il messaggio di “Pronto” significa che l’applicazione è pronta per effettuare le operazioni di misurazione.

**Comandi Manuali** : da questa finestra è possibile attivare / disattivare manualmente il LED di eccitazione. Viene inoltre settato lo slot base sull’HAL sul quale viene inviato il segnale del fotodiode.

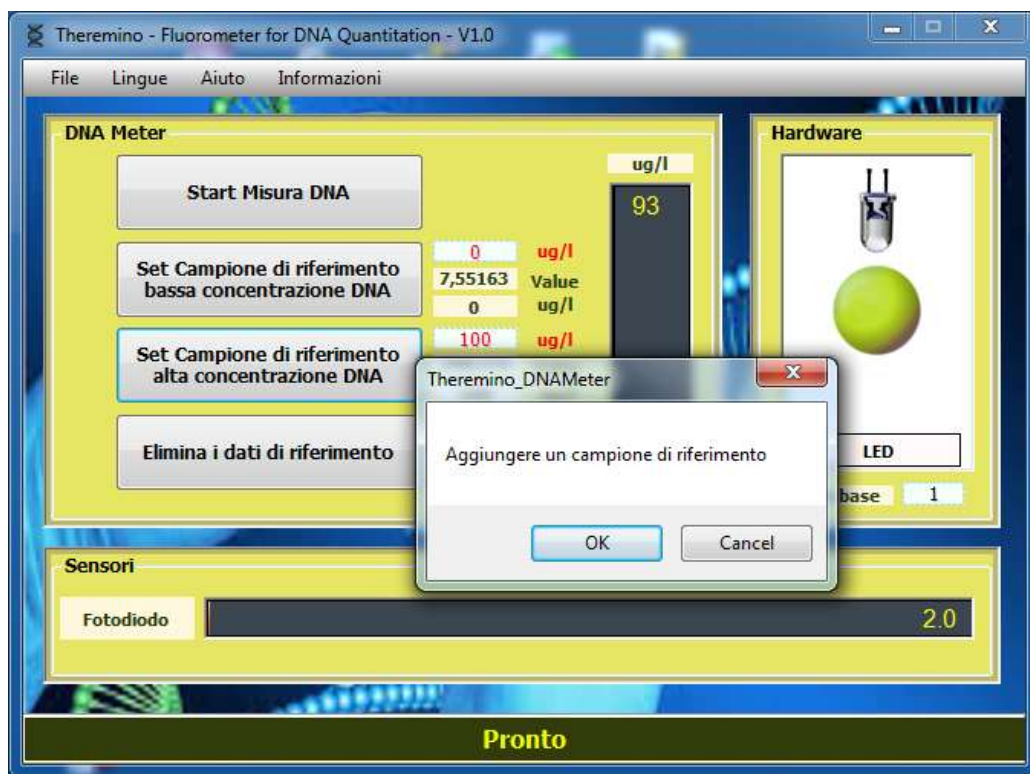
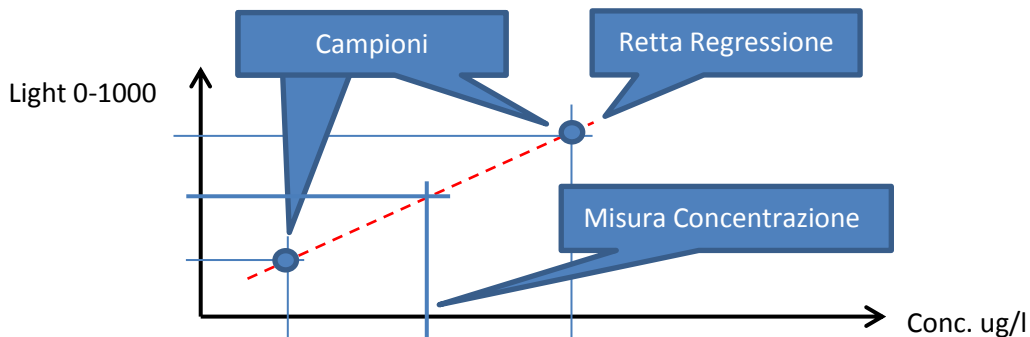
**Lettura Fotodiode** : questa finestra visualizza la lettura del fotodiode, con un valore da 0 a 1000 ed una cifra decimale.

**Finestra di Gestione** : questa finestra comprende i principali comandi per la calibrazione e la misura della concentrazione di DNA.

## Procedura di Calibrazione

La misura che viene fatta con il DNA Meter presuppone una precedente operazione di calibrazione che viene effettuata con due soluzioni campione : una a bassa concentrazione di DNA ed una ad alta concentrazione di DNA. Le **due concentrazioni devono essere note** e con i due campioni si effettua la calibrazione del DNA Meter. **Si inserisce nella casella di testo evidenziata in rosso la concentrazione nota e poi inserisce la cuvette con il campione per fare la misurazione con il pulsante apposito.** I dati dei campioni di riferimento possono essere eliminati con il pulsante indicato. Senza dati di riferimento non è possibile fare la misura di concentrazione.

Conoscendo le concentrazioni dei campioni e la corrispondente lettura del fotodiode, l'applicazione genera la **retta di regressione** che servirà per determinare la concentrazione di DNA del campione incognito.



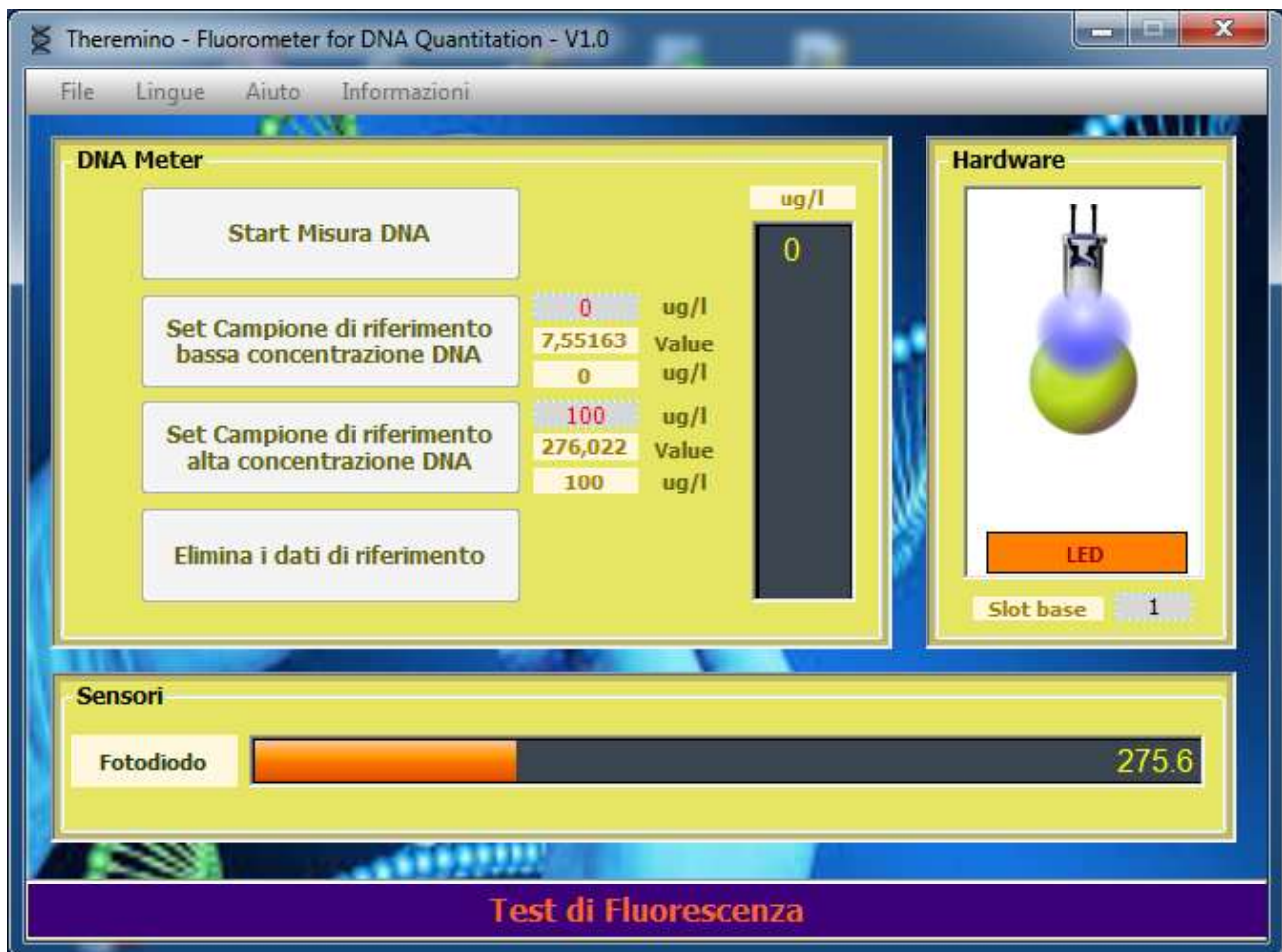
Nella immagine sopra si vede la procedura per l'aggiunta di un campione di riferimento.



## Procedura di Misurazione

Dopo che è stata fatta la procedura di calibrazione, lo strumento è pronto per effettuare misurazioni di concentrazione. La cuvette contenente il campione da misurare viene posta nello strumento e si avvia la misurazione con il comando "Start DNA Measure".

Durante la misurazione viene attivato il LED di eccitazione e viene acquisito il segnale letto dal fotodiode. La misura dura un paio di secondi, il tempo sufficiente ad avere un dato stabile. Il segnale letto dal fotodiode viene presentato nella barra inferiore, mentre il valore di concentrazione di DNA, calcolato sulla base della calibrazione con i campioni, viene presentato, in forma grafica e numerica sulla barra verticale.



## Procedura Manuale

Per effettuare dei test è anche possibile attivare e disattivare manualmente il LED di eccitazione. Questo viene fatto con il tasto "LED" posto nella finestra di destra con l'immagine grafica del LED. Il segnale letto dal fotodiode viene presentato nella barra inferiore, mentre in questo caso non viene fatta nessuna valutazione della concentrazione di DNA.

Theremino - Fluorometer for DNA Quantitation - V1.0

File Language Help About

**DNA Meter**

Start DNA Measure

Set Reference Sample Low DNA Concentration

Set Reference Sample High DNA Concentration

Delete Reference data

ug/l

18

0 ug/l Value

6,42631 ug/l Value

0 ug/l Value

100 ug/l Value

274,059 ug/l Value

100 ug/l Value

**Hardware**

LED

Base Slot 1

**Sensors**

Photodiode 270.7

**Manual test - Warning: A long test can change led temperatures**