

Sviluppo di un biosensore piezoelettrico per la determinazione della proteina MMP-9 in matrici reali

Tesi di Laurea Triennale in Chimica di: **Lorenzo Giacomelli** (lore10giac@hotmail.it)

Relatore: **Prof.ssa Maria Minunni** (maria.minunni@unifi.it)

Correlatore: **Dott.ssa Simona Scarano** (simona.scarano@unifi.it)

Lo scopo del presente lavoro di tesi è la messa a punto di una procedura veloce ed accurata per rilevare concentrazioni fisiologiche della proteina MMP-9 in siero umano, tramite misure piezoelettriche. Lo scopo finale è di utilizzare il sensore per applicazioni alla diagnostica clinica.

La determinazione della concentrazione della proteina MMP-9 è di fondamentale importanza poiché essa agisce da marcatore tumorale, essendo presente ad elevati livelli di concentrazione nel siero e nel liquor dei pazienti soggetti a forme tumorali. A tal fine è stato sviluppato un biosensore piezoelettrico formato da un cristallo di quarzo e oro sul quale viene immobilizzato un biorecettore, nel nostro caso l'aptamero F3B, in grado di legare la proteina target. Questo sensore, eccitato da una corrente elettrica alternata, produce oscillazioni meccaniche risonanti alla frequenza caratteristica dipendente dalla propria massa, per cui tutto ciò che si deposita sulla sua superficie causa una variazione della frequenza di risonanza proporzionale alla massa accumulata.

La procedura di base per la rilevazione della proteina è definita di "sandwich classico" e consiste nell'amplificare il segnale di frequenza che si otterrebbe facendo legare semplicemente la proteina all'aptamero F3B immobilizzato sul cristallo, mediante l'utilizzo dell'aptamero secondario 8F14A, in grado anch'esso di legare l'analita MMP-9, e della Streptavidina, utilizzata come *mass enhancer* da legare sul residuo di biotina dell'8F14A. Partendo da questo metodo, si è cercato di sviluppare una procedura alternativa al saggio di sandwich classico, in grado di ridurre i tempi di analisi ed aumentare il valore del segnale di frequenza ottenuto. Questa procedura, che prevede la co-incubazione dei diversi componenti, è stata studiata aggiungendo analita, aptamero secondario e Streptavidina in soluzione in diverse combinazioni e valutando l'effetto relativo sul segnale del sensore. Tra le diverse combinazioni studiate e valutate in buffer, si è scelto di applicare in siero quella basata sull'incubazione contemporanea di 8F14A 500 nM + Streptavidina 1 μ M, poiché ha fornito risultati relativamente migliori in termini di segnale Δf rispetto a quelli ottenibili con il sandwich classico, con un risparmio di circa 10 minuti sul tempo della misura. È stata così realizzata una calibrazione in matrice reale, variando la concentrazione della proteina MMP-9 nell'intervallo 1 – 25 nM.

Confrontando le rette di calibrazione ricavate dall'applicazione della procedura di incubazione in matrice ed in buffer, si è visto un andamento parallelo delle stesse, fattore che fornisce un ottimo risultato in quanto denota l'analogo comportamento del metodo, sia esso applicato in matrice reale che in tampone. Partendo da questo risultato, si sono ripetute le medesime misurazioni di Δf senza applicare il metodo di amplificazione del segnale, al fine di valutare separatamente il contributo dato da MMP-9 e dalle componenti del sandwich al valore di frequenza finale, sia in tampone che in siero.

Dai risultati ottenuti, si è visto come sia importante il contributo delle componenti del sandwich al segnale finale di Δf , poiché se si eseguissero misure di rilevazione di MMP-9 senza una procedura di amplificazione del segnale, si otterrebbero valori di frequenza minori di circa 5/10 Hz. Questo risultato, che si sapeva essere valido in tampone, è stato qui confermato anche in matrice reale.

I risultati finali ottenuti in questa ricerca sono quindi molto incoraggianti, poiché forniscono un metodo di rilevazione della proteina MMP-9 alternativo a quello del sandwich classico, in grado di ridurre significativamente i tempi di analisi e di aumentare il segnale di Δf registrato.