

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

Anno accademico 2011-2012

Sviluppo di un biosensore elettrochimico per l'analisi di microRNA quali marker tumorali

Candidata: **Alice Mazzieri**

Relatore: Dott.ssa Ilaria Palchetti

Il cancro è la seconda causa di morte più diffusa in Italia (30% di tutti i decessi). Le persone a cui è stato diagnosticato un tumore sono circa 2.250.000 (che rappresentano oltre il 4% della popolazione residente). Data l'alta diffusione delle neoplasie è sorta la necessità sempre più pressante in ambito medico e farmacologico di trovare metodi analitici rapidi, sensibili e poco invasivi per poter effettuare una diagnosi precoce e sviluppare farmaci specifici.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato lo sviluppo di un biosensore elettrochimico per la determinazione dei marker tumorali. In particolare è stato sviluppato un genosensore per la determinazione dei microRNA.

I microRNA sono brevi filamenti di RNA di circa 22 nucleotidi che presentano un ruolo chiave nel controllo dell'espressione genica. Da studi recenti è emerso che in molte forme tumorali i livelli cellulari di microRNA sono spesso alterati. Tramite la loro quantificazione e differenziazione è pertanto emersa la possibilità di individuare le tipologie neoplastiche, sviluppare cure mirate e seguire lo sviluppo della malattia.

Un biosensore a DNA, o genosensore, è un dispositivo analitico che sfrutta come elemento di riconoscimento biomolecolare una sequenza oligonucleotidica a singolo filamento (DNA sonda) in grado di riconoscere e legare selettivamente una sequenza bersaglio complementare (microRNA target) tramite la reazione di ibridazione.

In questo lavoro di tesi la sonda nucleotidica biotinilata è stata immobilizzata su microparticelle paramagnetiche modificate con streptavidina.

La reazione d'ibridazione tra il DNA sonda e il filamento di microRNA target, anch'esso biotinilato, avviene sulla superficie delle microparticelle. Come marcatore enzimatico viene utilizzata la streptavidina alcalinofosfatasi che si lega selettivamente con l'RNA target ibridato in virtù del legame di affinità tra biotina e streptavidina. Al momento dell'incubazione con il substrato per la rilevazione elettrochimica, le microparticelle vengono depositate sulla superficie di un elettrodo di lavoro in grafite. Il substrato enzimatico è 1-Naftilfosfato che in presenza dell'alcalinofosfatasi viene idrolizzato a 1-Naftolo, prodotto elettroattivo, rilevabile tramite una misura voltammetrica ad impulsi differenziali.

Sono state ottimizzate varie condizioni sperimentali quali la concentrazione del DNA sonda, il tempo di incubazione del target, la concentrazione dell'enzima, il tempo di incubazione dell'enzima e il tempo di incubazione del substrato.

E' stato stimato un limite di rilevabilità di 78 pM e una deviazione standard relativa percentuale del 10%. Per studiare la selettività del metodo sono state eseguite analisi di riconoscimento tra microRNA target, il precursore e filamenti simili. Infine sono stati analizzati dei campioni reali ed in particolare microRNA estratti da cellule tumorali.